

**METABOLISCHE ROLLE DES ENZYMS PYRUVAT, PHOSPHAT
DIKINASE IN TRANSGENEN TABAKPFLANZEN**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freie Universität Berlin

vorgelegt von

Libia Iris Trejo-Télez
aus Mexiko

November 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Schmitt (Freie Universität Berlin)

2. Gutachter: P.D. Dr. Dirk Hinch (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm)

Disputation am 16 Dezember 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis Dezember 2004 am Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie der FU-Berlin, unter wissenschaftlicher Betreuung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Schmitt

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Trejo-Téllez, L. I., Stenzel, R., Köhn, C. und Schmitt, J. M. **Überexpression der Pyruvat, Pi Dikinase in Wurzeln steigert Wachstum und Samenertrag in Tabakpflanzen.** *In:* 15. Wissenschaftliche Arbeitstagung „Ökophysiologie des Wurzelraumes“. Im Druck.

Trejo-Téllez, L. I., Stenzel, R., Köhn, C. und Schmitt, J. M. **Überexpression der Pyruvat, Phosphat Dikinase führt zur Aluminium-Toleranz in transgenen Tabakpflanzen.** *In:* 15. Wissenschaftliche Arbeitstagung „Ökophysiologie des Wurzelraumes“. Im Druck.

Danksagung

Während der Zeit dieser Arbeit haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schmitt für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu können. Bei der Entwicklung von Ideen und der Durchführung der Arbeiten hatte ich viel Freiraum. Vielen Dank auch für die Hinweise nach dem kritischen Lesen des Manuskripts dieser Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Herrn PD. Dr. Dirk Hinch für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Carsten Köhn möchte ich ebenfalls für Anregungen, methodische Einweisungen, gute Zusammenarbeit und Korrektur dieser Arbeit meinen Dank aussprechen.

Frau Felicitas Wronski danke ich herzlich für die Freundlichkeit, für wertvolle Ratschläge und Empfehlungen, für die konstante Hilfe, für Anleitungen „im faszinierend deutschen Lebensstil“ und der europäischen Kulturen und für das Korrekturlesen nicht nur dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Naëmi Würtz für ihre Freundschaft, für die Korrektur dieser Arbeit und für alle netten Gesten an mich.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde von Frau Hilde Köth mit großem Engagement unterstützt. An dieser Stelle ein besonders herzliches Dankeschön.

Bei Frau Dr. Barbara Koller möchte ich mich für die Unterstützung bei den Photoaufnahmen des Wurzelwachstums und für hilfreiche Tips bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Sigrid Kimura für das Durchlesen dieser Arbeit und für ihre Freundlichkeit.

Meinen Dank möchte ich Frau Hannelore Kirschke aussprechen, die mir mit ihrer Arbeit das tägliche Arbeiten wesentlich erleichtert hat.

Ich bedanke mich bei Frau Renate Grünau, Carolina Teske, Anne de Oliveira und Vladan Bozovic für die nette Zeit zusammen.

Weiteres bedanke ich mich für das Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Ich bedanke mich bei meinen Geschwistern Brenda und Rubén für ihre Liebe und Solidarität.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Rubén und Adoración für ihre Liebe, ihre Unterstützung und die liebevolle Sorge um meine Tochter.

Ein ganz besonders lieber Dank gilt meinem Mann Fernando, der mich bei dieser Arbeit tatkräftig unterstützte und mir immer liebevoll zur Seite stand. Er half mir auch über die Stunden des Zweifels hinweg, in denen meine Forschung nicht recht vorwärtsgehen wollte.

Bei meiner Tochter Libia Fernanda bedanke ich mich sehr. Meine Liebe: „Danke schön für Dein Warten und für Dein Verständnis. Du bist das wunderbarste Mädchen dieser Welt. Ich liebe dich sehr“.

Dedico este trabajo a una personita maravillosa e inigualable, mi hija **Libia Fernanda**, por mantener mi espíritu pletórico de esperanza y regocijo; y a **Fernando**, el hombre que amo, por multiplicar su fortaleza cuando a mí me abandona, por su férrea voluntad y lucha incansable. A ambos, gracias por existir y por hacer de mí una mujer plena e inmensamente feliz.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....1

1.1. Pyruvat, Phosphat Dikinase..... 1

1.2. PPDK in verschiedenen Organismen 1

 1.2.1. Rolle der PPDK in Bakterien.....2

 1.2.2. Rolle der PPDK in Protisten.....3

 1.2.3. Rolle der PPDK in C₄-Pflanzen.....4

 1.2.4. Rolle der PPDK in CAM-Pflanzen.....6

 1.2.5. Rolle der PPDK in C₃-Pflanzen.....8

1.3. Modulation der PPDK-Aktivität *in planta*.....9

2. Zielsetzung.....11

3. Material und Methoden.....13

3.1. Material.....13

3.1.1. Pflanzenmaterial.....13

 3.1.1.1. *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Eiskraut)..... 13

 3.1.1.2. *Nicotiana tabacum* L. (Tabak)..... 13

3.1.2. Chemikalien und Lösungen..... 16

3.1.3. Proteine.....16

3.1.4. Labormaterial.....16

3.1.5. Geräte.....16

3.1.6. Radioaktives Material.....18

3.1.7. Enzyme und Kitsysteme..... 18

 3.1.7.1. Enzyme.....18

 3.1.7.2. Kitsysteme.....18

3.1.8. Antikörper.....18

3.1.9. Größenstandards..... 19

 3.1.9.1. Protein Marker.....19

 3.1.9.2. DNA-Marker.....19

3.1.10. Bakterienstämme	20
3.1.10.1. <i>Escherichia coli</i>	20
3.1.10.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3.2. Methoden	20
3.2.1. Proteinchemische und immunologische Methoden	20
3.2.1.1. Isolierung von Gesamt-Protein aus Tabakpflanzen.....	20
3.2.1.2. Quantitative Proteinbestimmung.....	21
3.2.1.3. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
3.2.1.4. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot).....	24
3.2.1.5. Ponceau S-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose.....	24
3.2.1.6. Immunologische Detektion durch spezifischer Antikörper.....	24
3.2.1.7. Colorimetrischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase.....	26
3.2.2. Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren	27
3.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Tabakpflanzen.....	27
3.2.2.2. Anzucht von <i>A. tumefaciens</i> zur DNA-Isolierung.....	28
3.2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i> (Midi-Präparation)..	29
3.2.2.4. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	29
3.2.2.5. Transformation von <i>E. coli</i>	30
3.2.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Midi Präparation).....	30
3.2.2.7. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	30
3.2.2.8.. Restriktionsanalyse.....	31
3.2.2.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
3.2.3. Hybridisierungsmethoden	32
3.2.3.1. RNA Agarosegelelektrophorese.....	32
3.2.3.2. Transfer von RNA auf Nitrozellulosemembranen (Northern Blot).....	33
3.2.3.3. Herstellung der radioaktiven cDNA-Sonde.....	33
3.2.3.4. Hybridisierung.....	34
3.2.3.5. Detektion von Signalen.....	34
3.2.4. Oberflächensterilisation von <i>N. tabacum</i>-Samen	35
3.2.5. Wachstumsversuch auf verschiedenen Stickstoff-Formen	35
3.2.5.1. Pflanzenanzucht.....	35
3.2.5.2. Dünge-Versuche.....	35
3.2.6. Bestimmung von Wachstumsparametern	36
3.2.6.1. Wachstum.....	37
3.2.6.2. Ermittlung der Blattflächen.....	37
3.2.6.3. Bestimmung des Frischgewichts.....	37
3.2.7. Probennahme	37
3.2.8. Quantitative Bestimmung von Chlorophyll und freien Aminosäuren	38
3.2.8.1. Probennahme und Probenaufarbeitung.....	38
3.2.8.2. Chlorophyllbestimmung.....	40
3.2.8.3. Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren mit Ninhydrin.....	40
3.2.9. Ertragsbestimmung	42
3.2.10. Versuche zur Al-Toleranz	42
3.2.10.1. Hydrokultur.....	42
3.2.10.2. Aluminium-Behandlungen.....	43

3.2.10.3. Untersuchung des Wurzelwachstums.....	43
3.2.10.4. Gewinnung von Exsudaten aus Tabakwurzeln.....	45
3.2.10.5. Messung der Extrusion von organischen Säuren.....	45
3.2.10.6. Wurzelfärbung mit Eriochrome Cyanine-R (ECR).....	47
3.2.11. Computer-Auswertungen.....	47
3.2.11.1. Statistische Berechnungen.....	47
3.2.11.2. Densitometrische Bestimmungen.....	48
4. ERGEBNISSE.....	49
4.1. Überprüfung der PPDK-Überexpression in den transgenen Tabakpflanzen.....	49
4.2. Stickstoff-Düngeversuche.....	51
4.2.1. Einfluss der Stickstoffform auf das Pflanzenwachstum.....	51
4.2.1.1. Wachstum des Sprosses.....	52
4.2.1.2. Frischgewicht.....	58
4.2.1.3. Blattfläche.....	59
4.2.1.4. Überblick über die Wachstumsparameter.....	61
4.2.2. Einfluss des Stickstoffs auf einige Metabolite des N-Stoffwechsels.....	62
4.2.2.1. Chlorophyllgehalte.....	62
4.2.2.2. Konzentration von freien Aminosäuren in Blättern und Wurzeln.....	67
4.2.2.3. Proteingehalt in Blättern und Wurzeln.....	71
4.2.3. Einfluss der Stickstoffform auf Enzyme für die CO₂-Fixierung.....	75
4.2.3.1. Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC).....	75
4.2.3.2. Ribulose-1,5-Biphosphat Carboxylase Oxygenase (RUBISCO).....	77
4.2.3.3. Verhältnis RUBISCO/PEPC.....	79
4.2.4. Blühbeginn.....	81
4.2.5. Ertrag.....	83
4.2.5.1. Kapselproduktion.....	83
4.2.5.2. Samengewicht.....	84
4.2.5.3. Samenertrag.....	86
4.3. Versuche zur Aluminium Toleranz.....	88
4.3.1. Wachstum der Pflanzen mit Aluminiumbehandlung.....	89
4.3.2. Proteinbestimmung in den Wurzeln unter Aluminium-Behandlung	91
4.3.3. Ermittlung der Inhibition des Wurzelwachstums bei Aluminiumbehandlung.....	93
4.3.4. Extrusion von organischen Säuren aus den Wurzeln von Tabakpflanzen.....	97
4.3.5. Wurzelfärbung mit Eriochrome Cyanine-R.....	99

5. DISKUSSION	102
5.1. PPDK-Überexpression in Tabakpflanzen (<i>Nicotiana tabacum</i>)	102
5.2. Stickstoffwechsel und Pyruvat, Phosphat Dikinase	103
5.3. Pyruvat, Phosphat Dikinase führt zu erhöhter Aluminium-Toleranz	113
5.4. Richtung der PPDK-Reaktion in Cytosol und Plastiden	116
5.5. Ausblick	119
6. ZUSAMMENFASSUNG	122
7. ABSTRACT	124
8. LITERATURVERZEICHNIS	126
9. ANHANG	135
9.1. Abkürzungsverzeichnis	135
9.1.1. Allgemein.....	135
9.1.2. Einheiten.....	137
9.1.3. Abkürzungen für Artnamen.....	137
9.2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	137
9.2.1. Abbildungsverzeichnis.....	137
9.2.2. Tabellenverzeichnis.....	139
9.3. Chemikalienliste	139
9.4. Lebenslauf	142
9.5. Ehrenwörtliche Erklärung	143