

Biotechnologische Ansätze
zur Reduktion
photorespiratorischer Verluste
in *A. thaliana*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Holger Fahnenstich

aus Meppen

Köln, 2008

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von April 2004 bis November 2007 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. U.-I. Flügge
 Prof. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2008

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran,
dass plötzlich zwei Probleme existieren,
wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)
US-amerikanischer Soziologe und Ökonom

Inhalt

| | |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis | IX |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Material und Methoden | 14 |
| 3. Ergebnisse | 70 |
| 4. Diskussion | 155 |
| 5. Literaturverzeichnis | 182 |
| 6. Abbildungsverzeichnis | 206 |
| 7. Tabellenverzeichnis | 211 |
| 8. Kurzzusammenfassung & Abstract | 212 |
| 9. Danksagungen & Formalia | 214 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis | IX |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Photosynthese | 1 |
| 1.1.1 Lichtreaktionen | 1 |
| 1.1.2 Kohlenstoffixierung in den so genannten Dunkelreaktionen | 2 |
| 1.2 Photorespiration | 3 |
| 1.2.1 Die Eigenschaften der RubisCO – Ursprung der Photorespiration | 3 |
| 1.2.2 Der photorespiratorische Stoffwechselweg | 4 |
| 1.2.3 Sinn und Nutzen der Photorespiration | 6 |
| 1.2.4 Natürliche Wege zur Verringerung von Photorespiration | 7 |
| 1.2.4.1 C ₄ -Photosynthese | 7 |
| 1.2.4.2 CAM-Photosynthese | 8 |
| 1.2.5 Technische Ansätze zur Reduzierung der mit Photorespiration verbundenen Verluste | 8 |
| 1.2.6 Die hier verfolgten Ansätze: GTT und GMM | 10 |
| 1.3 Die Rolle von Malat | 12 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 13 |
| 2. Material und Methoden | 14 |
| 2.1 Material | 14 |
| 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial | 14 |
| 2.1.2 Geräte | 14 |
| 2.2 Pflanzenanzucht | 14 |
| 2.2.1 Pflanzenmaterial | 14 |
| 2.2.2 Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Erde | 14 |
| 2.2.2.1 Gewächshaus | 15 |
| 2.2.2.2 Klimakammern | 15 |
| 2.2.2.3 Selektion auf Erde | 15 |
| 2.2.3 Anzucht von <i>A. thaliana</i> unter verschiedenen Bedingungen | 16 |
| 2.2.3.1 Wachstum unter erhöhter CO ₂ -Konzentration | 16 |
| 2.2.3.2 Wachstum unter Starklicht | 16 |
| 2.2.3.3 Wachstum in der Kühlkammer | 16 |
| 2.2.3.4 Applikation von Salzstress | 17 |
| 2.2.4 Oberflächensterilisation von <i>A. thaliana</i> -Samen | 17 |
| 2.2.5 Anzucht und Selektion von <i>A. thaliana</i> auf Agar-Platten | 17 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.6 | Externe Zugabe von Nährstoffen zu dunkelinkubierten <i>A. thaliana</i> Pflanzen | 18 |
| 2.2.7 | Transformation von <i>A. thaliana</i> durch Vakuuminfiltration | 18 |
| 2.2.8 | Probennahme | 18 |
| 2.3 | Mikrobiologische Methoden | 19 |
| 2.3.1 | Anzucht von <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| 2.3.2 | Herstellung TSS-kompetenter <i>E. coli</i> | 19 |
| 2.3.3 | Transformation TSS-kompetenter <i>E. coli</i> | 20 |
| 2.3.4 | Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 20 |
| 2.3.5 | Herstellung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i> | 21 |
| 2.3.6 | Elektrotransformation von <i>A. tumefaciens</i> | 21 |
| 2.4 | Molekularbiologische Methoden | 22 |
| 2.4.1 | Extraktion und Präparation von DNA und RNA | 22 |
| 2.4.1.1 | Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> | 22 |
| 2.4.1.2 | Isolierung genomischer DNA aus Pflanzengewebe | 22 |
| 2.4.1.3 | Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe | 23 |
| 2.4.2 | Elektrophorese von DNA | 24 |
| 2.4.3 | Quantifizierung von DNA und RNA..... | 25 |
| 2.4.3.1 | Photometrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen..... | 25 |
| 2.4.3.2 | Abschätzung von DNA-Konzentrationen in Agarosegelen..... | 25 |
| 2.4.4 | Enzymatische Modifikation von DNA..... | 26 |
| 2.4.4.1 | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen | 26 |
| 2.4.4.2 | Dephosphorylierung von DNA | 26 |
| 2.4.4.3 | Fill-In | 26 |
| 2.4.4.4 | Ligation von DNA Fragmenten..... | 27 |
| 2.4.5 | Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierungen | 27 |
| 2.4.5.1 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 27 |
| 2.4.5.2 | Colony-PCR | 28 |
| 2.4.5.3 | Sequenzierung eines DNA-Abschnitts..... | 28 |
| 2.4.6 | Southern Blot für genomische DNA..... | 29 |
| 2.4.6.1 | DNA-Transfer auf Nylonmembranen | 29 |
| 2.4.6.2 | Herstellung der Sonde | 30 |
| 2.4.6.3 | Radioaktive Markierung der Sonde | 30 |
| 2.4.6.4 | Kontrolle der Einbaurate von [³² P]dATP | 31 |
| 2.4.6.5 | Reinigung der radioaktiv markierten DNA-Sonde..... | 32 |
| 2.4.6.6 | Hybridisierung der Membran mit der markierten Sonde..... | 32 |
| 2.4.6.7 | Waschen der Membran und Auswertung | 32 |
| 2.4.7 | Herstellung von cDNA | 33 |
| 2.4.7.1 | Reverse Transkription..... | 33 |
| 2.4.7.2 | RT-PCR..... | 34 |
| 2.5 | Verwendete Vektoren und deren Herstellung | 34 |
| 2.5.1 | Verwendete Vektoren | 34 |
| 2.5.2 | Modifizierung von pGreenII | 34 |
| 2.5.3 | Klonierung der zu transformierenden Gene..... | 35 |
| 2.6 | Selektion transgener <i>A. thaliana</i>-Linien | 37 |
| 2.6.1 | Selektion..... | 37 |
| 2.6.2 | Verwendete transgene Pflanzen | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7 Messungen grundlegender phänotypischer Charakteristika an <i>A. thaliana</i>-Pflanzen | 38 |
| 2.7.1 Frisch- und Trockengewicht (FG&TG) | 38 |
| 2.7.2 Rosettendurchmesser | 39 |
| 2.7.3 Blattanzahl | 39 |
| 2.7.4 Oberfläche der Rosette | 39 |
| 2.8 Photosynthesemessungen | 39 |
| 2.8.1 Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie (PAM) | 39 |
| 2.8.2 Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in Blattrosetten | 40 |
| 2.9 Proteinbiochemie | 40 |
| 2.9.1 Proteinkonzentrationsbestimmung | 40 |
| 2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) | 41 |
| 2.9.3 Proteingelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue | 42 |
| 2.9.4 Western Blot | 42 |
| 2.9.5 Native PAGE | 44 |
| 2.9.6 Färbung für NADP-Malat-Enzym (NADP-ME)-Aktivität in nativen Gelen | 44 |
| 2.9.7 Färbung für SOD-Aktivität | 44 |
| 2.10 Messungen von Enzymaktivitäten in Blattextrakten von <i>A. thaliana</i> | 45 |
| 2.10.1 Allgemeines zu Enzymmessungen | 45 |
| 2.10.2 Glykolat-Oxidase (GO) | 46 |
| 2.10.3 Malat-Synthase (MS) | 47 |
| 2.10.4 NADP-Malat-Enzym (NADP-ME) | 48 |
| 2.10.5 Kombinierte Messung von Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS) und Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR) | 48 |
| 2.10.6 Katalase (Kat) | 49 |
| 2.10.7 Pyruvatkinase (PK) | 49 |
| 2.10.8 Phosphoglyzeratkinase (PGK) | 50 |
| 2.10.9 Isolation von Chloroplasten aus Blattmaterial | 51 |
| 2.11 Messung der Gehalte physiologisch interessanter Substanzen in Blattextrakten von <i>A. thaliana</i> | 52 |
| 2.11.1 Chlorophylle und Carotinoide | 52 |
| 2.11.2 Glyoxylat | 53 |
| 2.11.3 H_2O_2 | 54 |
| 2.11.4 Lösliche Zucker und Stärke | 55 |
| 2.11.5 Anthocyane | 57 |
| 2.11.6 ATP und ADP | 57 |
| 2.12 Umfangreiche Analyse des Primärmetabolismus mittels GC/MS | 58 |
| 2.12.1 Extraktion und Probenvorbereitung | 58 |
| 2.12.2 Gaschromatografie | 59 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.12.3 | Massenspektrometrie | 59 |
| 2.12.4 | Standards | 60 |
| 2.12.5 | Auswertung | 61 |
| 2.13 | Histologische, histochemische und mikroskopische Methoden..... | 61 |
| 2.13.1 | Immunolokalisation von NADP-ME in transgenen <i>A. thaliana</i> | 61 |
| 2.13.2 | Messung des Blattquerschnitts von <i>A. thaliana</i> -Blättern..... | 62 |
| 2.13.3 | Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten von <i>A. thaliana</i> -Blättern (Niessen 2006) | 63 |
| 2.13.3.1 | Herstellung der Schnitte..... | 63 |
| 2.13.3.2 | Ultramikrotomie..... | 64 |
| 2.13.3.3 | Kontrastierung der Schnitte | 64 |
| 2.13.3.4 | Elektronenmikroskopie..... | 64 |
| 2.13.4 | Färbung von Zelltodereignissen in vollständigen Blättern | 64 |
| 2.13.5 | Färbung von Zelltodereignissen zur Quantifizierung | 65 |
| 2.13.6 | Stärkefärbung in Blättern..... | 65 |
| 2.14 | In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide..... | 66 |
| 2.15 | Statistische Methoden und Berechnungen..... | 68 |
| 2.15.1 | Standardabweichung..... | 68 |
| 2.15.2 | Standardfehler | 69 |
| 2.15.3 | t-Test | 69 |
| 3. | Ergebnisse | 70 |
| 3.1 | Bestätigung der Transgeninsertionen auf genomischer Ebene..... | 71 |
| 3.1.1 | PCR..... | 71 |
| 3.1.2 | Southern Blot..... | 71 |
| 3.2 | Enzymaktivitäten transgener Linien | 73 |
| 3.2.1 | Glykolat-Oxidase (GO) | 73 |
| 3.2.2 | Malat-Synthase (MS)..... | 75 |
| 3.2.3 | NADP-Malat-Enzym (ME)..... | 77 |
| 3.2.4 | Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS) und Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR)..... | 78 |
| 3.2.5 | Katalase (Kat)..... | 80 |
| 3.3 | Der GO-Phänotyp | 82 |
| 3.3.1 | Wachstum und Entwicklung | 82 |
| 3.3.2 | Physiologische Eigenschaften | 84 |
| 3.3.3 | Zusammenfassung | 86 |
| 3.4 | Die Ursachen des GO-Phänotyps – Untersuchungen an doppelt transgenen Pflanzen unter variierenden Lichtstärken | 87 |
| 3.4.1 | GO & Co. – Sichtbare Phänotypen doppelt transgener Pflanzen | 87 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.4.1.1 | Die GO-TSS Pflanzen..... | 87 |
| 3.4.1.2 | Die GO-MS Pflanzen | 89 |
| 3.4.1.3 | Fazit | 90 |
| 3.4.2 | Einfluss der Lichtstärke auf den Phänotyp von GO und doppelt transgenen Pflanzen..... | 90 |
| 3.4.3 | Einfluss der Lichtstärke und der Expression des zweiten Transgens auf physiologische Parameter | 94 |
| 3.4.3.1 | Akkumulation von Glyoxylat..... | 94 |
| 3.4.3.2 | Akkumulation von H ₂ O ₂ | 96 |
| 3.4.3.3 | Superoxid-Dismutase (SOD) | 97 |
| 3.4.3.4 | Integrität und Leistung der Photosysteme | 98 |
| 3.4.3.5 | Synthese von Speicherstoffen | 99 |
| 3.4.4 | Einfluss der Lichtstärke und der Expression des zweiten Transgens auf den Primärmetabolismus | 100 |
| 3.5 | Die Linien des GO-TSS-TSR (GTT) Weges im Vergleich..... | 101 |
| 3.5.1 | Wachstum und Entwicklung | 101 |
| 3.5.2 | Photosynthetische Eigenschaften..... | 102 |
| 3.5.3 | Fazit..... | 103 |
| 3.6 | Die Linien des GO-MS-ME (GMM) Weges im Vergleich | 104 |
| 3.6.1 | Wachstum und Entwicklung | 104 |
| 3.6.2 | Photosynthetische Eigenschaften..... | 107 |
| 3.6.3 | Synthese von Speicherstoffen | 108 |
| 3.6.4 | Fazit..... | 109 |
| 3.7 | Die Einführung der Katalase in den GMM Weg: GMMK und GMK Pflanzen..... | 110 |
| 3.7.1 | Die GMMK Pflanzen | 111 |
| 3.7.2 | Die GMK Pflanzen | 113 |
| 3.7.3 | Fazit..... | 124 |
| 3.8 | Der konditionale Phänotyp der NADP-Malat-Enzym (ME) Pflanzen..... | 125 |
| 3.8.1 | ME Pflanzen zeigen im Kurz- bzw. Langtag unterschiedliche Eigenschaften..... | 125 |
| 3.8.2 | Andauernde Dunkelheit führt zu einer verfrühten Seneszenz | 139 |
| 3.8.3 | Rettung des Phänotyps durch exogene Zugabe von schnell verwertbaren Substraten | 146 |
| 3.9 | Die Salzresistenz der TSS-TSR Pflanzen..... | 149 |
| 3.9.1 | Der Phänotyp der TSS-TSR Pflanzen | 149 |
| 3.9.2 | Die Salztoleranz der TSS-TSR Pflanzen | 150 |
| 3.9.3 | Die Kältetoleranz der TSS-TSR Pflanzen..... | 154 |
| 4. | Diskussion | 155 |
| 4.1 | Der GO-Phänotyp – Bedrohung des Gesamtprojekts | 156 |
| 4.1.1 | Der Phänotyp | 156 |
| 4.1.2 | Die Rolle des Glyoxylats..... | 157 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.1.3 | Die Rolle des H ₂ O ₂ | 158 |
| 4.1.4 | Ist H ₂ O ₂ oder Glyoxylat verantwortlich für den GO-Phänotyp? | 160 |
| 4.1.5 | GO Pflanzen als Modell für oxidativen Stress? | 162 |
| 4.1.6 | Bedeutung des GO-Phänotyps für das Gesamtprojekt dieser Arbeit | 163 |
| 4.2 | Die GTT- und GMM-Ansätze – Opfer der GO | 163 |
| 4.2.1 | Die GTT Pflanzen | 164 |
| 4.2.2 | Die GMM Pflanzen | 164 |
| 4.3 | Der Lichtmengen-abhängige ME-Phänotyp | 165 |
| 4.3.1 | Der Phänotyp | 165 |
| 4.3.2 | Die möglichen Ursachen des ME-Phänotyps | 166 |
| 4.3.3 | Malat und Fumarat in <i>A. thaliana</i> | 171 |
| 4.3.4 | Weitere Ansätze für Untersuchungen an ME Pflanzen | 172 |
| 4.3.5 | Bedeutung für das Gesamtprojekt dieser Arbeit | 172 |
| 4.4 | Die GMMK Pflanzen | 173 |
| 4.5 | Der GMK-Ansatz – der Machbarkeitsbeweis (<i>proof of concept</i>) | 173 |
| 4.5.1 | Der Phänotyp der GMK Pflanzen – weniger H ₂ O ₂ , mehr Biomasse ... | 173 |
| 4.5.2 | Photosynthetische Charakteristika | 174 |
| 4.5.3 | Biochemische Eigenschaften | 175 |
| 4.5.4 | Vergleich mit einem ähnlichen Ansatz zur Reduktion photorespiratorischer Verluste | 177 |
| 4.5.5 | Fazit & Ausblick | 178 |
| 4.6 | Die Salztoleranz der TSS-TSR Pflanzen | 179 |
| 5. | Literaturverzeichnis | 182 |
| 6. | Abbildungsverzeichnis | 206 |
| 7. | Tabellenverzeichnis | 211 |
| 8. | Kurzzusammenfassung & Abstract | 212 |
| 8.1 | Kurzzusammenfassung | 212 |
| 8.2 | Abstract | 213 |
| 9. | Danksagungen & Formalia | 214 |
| 9.1 | Danksagungen | 214 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 9.2 | Erklärung | 217 |
| 9.3 | Publikationen und Tagungsbeiträge | 218 |
| 9.3.1 | Teilpublikationen..... | 218 |
| 9.3.2 | Tagungsbeiträge..... | 218 |
| 9.4 | Lebenslauf | 221 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| μE | μmol (Photonen) m ⁻² s ⁻¹ (= <i>mikro</i> -Einstein) |
| Abb. | Abbildung |
| Ac | Acetat |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| amu | Atomic Mass Unit, 1 amu = 1 Da |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| A _x | Absorption einer Lösung bei der Wellenlänge x |
| BASTA | Glufosinat (L-2-Amino-4-[hydroxy-(methyl)-phosphinyl]-buttersäure) |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin (Proteinstandard) |
| CaMV | Blumenkohl (<i>Cauliflower</i>) Mosaik Virus |
| cDNA | <i>complementary</i> DNA |
| CoA | Koenzym A |
| CoASH | freie, reduzierte Form des CoA |
| d.h. | das heißt |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphate |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DTNB | 3-Carboxy-4-nitrophenyl-disulfid (Ellmans Reagenz) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ETR | (photosynthetische) Elektronentransportrate |
| Fa. | Firma |
| FG | Frischgewicht |
| g | Gramm |
| GC/MS | kombinierte Gaschromatograf / Massenspektrometer-Einheit |
| GO | Glykolat-Oxidase |
| h | Stunde |

| | |
|--------------------------------|--|
| H ₂ O _{dd} | doppelt destilliertes Wasser |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HPLC | High Pressure Liquid Chromatography |
| IRGA | Infrarot-Gasaustausch |
| J | Joule |
| Kat | Katalase |
| kb | Kilobasen |
| LED | Leuchtdiode |
| MCS | Mehrfachklonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>) |
| ME | Malat-Enzym |
| min | Minuten |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MS | Malat-Synthase |
| MS-Salze | Nährsalze nach Murashige & Skoog |
| MSTFA | N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid |
| NAD ⁺ | Nikotinadenindinukleotid (oxidierte Form) |
| NADH | Nikotinadenindinukleotid (reduzierte Form) |
| NADP ⁺ | Nikotinadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form) |
| NADPH | Nikotinadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form) |
| NBT | Nitroblau-Tetrazolium |
| OD _x | optische Dichte (d.h. Absorption) einer Lösung bei der Wellenlänge x |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAM | Puls-Amplituden-Modulation |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PFD | Photonenflussdichte der photosynthetisch aktiven Strahlung |
| PGI | Phosphoglucoisomerase |
| PGK | Phosphoglyceratkinase |
| PGM | Phosphoglucomutase |
| PK | Pyruvatkinase |
| ppm | Konzentrationsangabe: Teile pro Million Teile |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| rbcS | kleine Untereinheit der RubisCO |

| | |
|---------|---|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion |
| RubisCO | Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| s. o. | siehe oben |
| s. u. | siehe unten |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ssDNA | Einzelstrang-DNA |
| Taq | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TG | Trockengewicht |
| TMS | Trimethylsilyl |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TSR | Tartronat-Semialdehyd-Reduktase |
| TSS | Tartronat-Semialdehyd-Synthase |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| vgl. | vergleiche |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| y x g | y-fache Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$) |

1. Einleitung

1.1 Photosynthese

Die Bedeutung der Photosynthese für das Leben auf diesem Planeten kann nicht überschätzt werden. Nahezu der gesamte Kohlenstoff, der in Organismen und fossilen Energieträgern gebunden ist, ist von der Photosynthese irgendwann als CO_2 aus der Atmosphäre assimiliert, reduziert und in höhermolekulare organische Verbindungen integriert worden. Weiterhin ermöglicht die von den Lichtreaktionen bereit gestellte Reduktionskraft dem photosynthetisierenden Organismus, anorganische Verbindungen, die Stickstoff, Phosphor, Schwefel und weitere essentielle Spurenelemente enthalten, aufzunehmen, bei Bedarf zu reduzieren und sie, in organische Verbindungen eingebaut, der Nahrungskette in der Biosphäre zuzuführen. Ein Nebeneffekt der Photosynthese ist ferner, dass sie den Sauerstoff in die Atmosphäre entlässt, den die meisten Lebewesen (auch die Pflanzen) zur Zellatmung und damit zur Energiegewinnung in den Mitochondrien benötigen.

1.1.1 Lichtreaktionen

Die Photonen des Lichts werden von Lichtsammelkomplexen „eingefangen“ und via Excitonttransfer (Heldt 2003) den Chlorophyllen in den Reaktionszentren der beiden Photosysteme zugeführt. Ein Elektron dieser Chlorophylle wird dabei von der übertragenen Lichtenergie angeregt und in diesem Zustand auf den folgenden Elektronenakzeptor in der Elektronentransportkette übertragen. Durch das nun fehlende Elektron wird Chlorophyll zu einem sehr starken Oxidationsmittel. Das Redoxpotential des Chlorophylls im Photosystem II ((PS II) Diner und Rappaport 2002) reicht sogar aus, um über sequentielle Elektronenübertragungen eines Mangan-Proteinkomplexes, Wasser in H^+ -Ionen und O_2 zu spalten. Die Elektronen werden, nachdem sie von PS II über den Cytochrom- b_6/f -Komplex und PS I (Nelson und Yocum 2006; Jensen et al. 2007) transportiert worden sind, auf Ferredoxin und schließlich auf NADP^+ übertragen (Ceccarelli et al. 2004; Lintala et al. 2007). Die Spaltung des Wassers und weitere Protonentransfers über Plastochinon und den Cytochrom b_6/f -Komplex sorgen für einen Protonengradienten an der

Thylakoidmembran, der von der thylakoidalen ATPase zur ATP-Synthese aus ADP und Phosphat genutzt wird (Nelson und Yocum 2006).

Wenn die Lichtstärke sehr hoch ist, tritt häufig die Situation ein, dass die Elektronenüberträger der Elektronentransportkette vollständig reduziert sind und somit die Elektronen von den angeregten Chlorophyllen nicht aufnehmen können. In der Folge können diese Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden, was zu Superoxidanionenradikalen ($\bullet\text{O}_2^-$) führt (Asada 1999; Asada 2000). Diese Radikale können die Entstehung von Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) fördern (s. 4.1.2), die durch die Oxidation von Lipiden Proteinen usw. erheblichen strukturellen Schaden im Plastiden verursachen können (Berlett und Stadtman 1997; Noctor et al. 2000; Kimura et al. 2001). Zusammen mit H_2O_2 , das auch als Signalmolekül dient (Desikan et al. 2000; Mittler und Berkowitz 2001; Laloi et al. 2004), werden diese Radikale zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst, deren effektive Kontrolle eine der wichtigsten Aufgaben der Pflanzen im Licht ist (Noctor et al. 2000; Apel und Hirt 2004). Daher haben sich in der Photosynthese nicht nur Mechanismen zur Entgiftung von ROS (Noctor und Foyer 1998) sondern auch zu deren Vermeidung entwickelt (Cruz et al. 2005). So kann über die Assoziation und Dissoziation von Lichtsammelkomplexen und den Photosystemen (Horton et al. 1996) die Menge der aufgenommenen Energie reguliert und über den Xanthophyllzyklus überschüssige Energie in Wärme abgeführt werden (Gilmore 1997).

1.1.2 Kohlenstofffixierung in den so genannten Dunkelreaktionen

Die in den Lichtreaktionen produzierten Reduktionsäquivalente und ATP werden in den so genannten Dunkelreaktionen der Photosynthese verwendet, um atmosphärisches CO_2 in organische Verbindungen einzubauen. Die entscheidende Reaktion wird dabei von der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) ausgeführt, die an den C_5 -Körper Ribulose-1,5-bisphosphat (RubP) das CO_2 anlagert, wobei ein äußerst labiles C_6 -Intermediat entsteht (Miziorko und Lorimer 1983), das sofort in zwei Moleküle 3-Phosphoglyzerat (3-PGA) zerfällt. Das 3-PGA wird nun mit ATP zu 2,3-Bisphosphoglyzerat phosphoryliert und anschließend mit NADPH zu Glyzerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) reduziert, womit ein Triosephosphat, also ein Zuckerderivat, als Produkt der Dunkelreaktion erreicht wäre (Raines 2003). G3P steht wiederum mit Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) über die Triosephosphatisomerase im Gleichgewicht. DHAP wird zu einem kleinen Teil über

den Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) aus den Plastiden transportiert und zum Aufbau von Saccharose im Cytosol verwendet (Häusler et al. 2000). Ein weiterer Teil geht, kondensiert zu Fruktose-6-Phosphat, in die Synthese transitorischer Stärke während der Lichtperiode ein (Beck und Ziegler 1989; Zeeman et al. 2007), aber der weitaus größte Teil wird in den reduktiven Pentosephosphatweg (Calvin-Benson-Zyklus (Bassham et al. 1954)) eingeschleust, der der Regeneration des CO₂-Akzeptors RubP dient (Woodrow und Berry 1988; Geiger und Servaites 1994; Raines 2003).

1.2 Photorespiration

Die Photosynthese besteht nicht nur aus der Fixierung von CO₂ und Freisetzung von O₂, sondern beinhaltet neben der bereits erwähnten Fixierung von N, S, P usw. auch den umgekehrten Prozess, nämlich die Freisetzung von vormals fixiertem CO₂ unter Sauerstoffverbrauch. Dieser Prozess wird Photorespiration genannt, da er nur im Licht stattfindet und seine Ursachen in den katalytischen Eigenschaften der RubisCO hat (Lorimer 1981; Ogren 2003).

1.2.1 Die Eigenschaften der RubisCO – Ursprung der Photorespiration

Die RubisCO ist ein Multiproteinkomplex, der in höheren Pflanzen aus acht großen, plastidär kodierten, katalytischen Untereinheiten und acht kleinen, kernkodierten Untereinheiten besteht (Miziorko und Lorimer 1983; Parry et al. 2003). Das Holoenzym hat sowohl Carboxylase- als auch Oxygenase-Aktivität und somit konkurrieren O₂ und CO₂ um die Bindung an die katalytische Stelle des Enzyms und damit um die Anlagerung an Ribulose-1,5-bisphosphat (RubP). Wenn O₂ statt CO₂ an der Reaktion mit RubP teilnimmt, entsteht ein Molekül 2-Phosphoglykolat (2-PG), welches das Ausgangssubstrat für den oxidativen C₂-Zyklus der Photosynthese (Photorespiration, Tolbert 1997 und Ogren 1984) ist und ein Molekül 3-PGA, das wie unter 1.1.2 beschrieben weiterverarbeitet wird.

Das Verhältnis, in dem die Carboxylase- zu der Oxygenase-Aktivität der RubisCO steht, ist abhängig von dem lokalen Konzentrationsverhältnis von CO₂ und O₂ am Ort der RubisCO und folgt der Gleichung:

$$v_c / v_o = V_c K_o C / t V_o K_c O$$

Hier gilt: v_c und v_o sind die momentanen Geschwindigkeiten der Carboxylierung/Oxygenierung, V_c und V_o sind deren maximale Geschwindigkeiten

(V_{\max}), K_o und K_c sind die K_M -Werte bezüglich O_2 bzw. CO_2 , C und O sind die Konzentrationen von CO_2 und O_2 und t ist 0,5 (Ogren 1984). Der konstante Term $V_c K_o / V_o K_c$ wird als Spezifitätsfaktor (τ) der RubisCO bezeichnet (Parry et al. 2003), der zwischen photosynthetisierenden Organismen variiert.

Wenn sich also das lokale Konzentrationsverhältnis von CO_2 zu O_2 erniedrigt, verringert sich auch das Verhältnis von Carboxylierung zu Oxygenierung und Photorespiration nimmt zu. Da CO_2 und O_2 eine unterschiedliche Abnahme der Wasserlöslichkeit bei steigender Temperatur zeigen ($[CO_2]/[O_2]=0,462$ bei $T=15^\circ C$ und $[CO_2]/[O_2]=0,0376$ bei $T=35^\circ C$, Taiz und Zeiger 2000), ist der Anteil der Oxygenase-Reaktion an der Gesamtaktivität der RubisCO unter atmosphärischen Bedingungen vor allem temperaturabhängig (Ku und Edwards 1977; Jordan und Ogren 1984).

1.2.2 Der photorespiratorische Stoffwechselweg

Nach der Oxygenase-Reaktion der RubisCO stehen zu Beginn dieses Stoffwechselweges (Abb. 1, folgende Seite) stöchiometrisch gesehen zwei Moleküle 2-Phosphoglykolat, die im weiteren Verlauf zu einem Molekül 3-PGA umgesetzt werden.

Dies involviert eine komplexe Reaktionsfolge (Tolbert 1997; Douce und Neuburger 1999; Wingler et al. 2000), in die Peroxisomen, Mitochondrien und Chloroplasten eingebunden sind und in deren Verlauf in der Reaktion der GDC in den Mitochondrien schließlich CO_2 freigesetzt wird (Abb. 1). Diese Reaktionen können in einer C_3 -Pflanze unter ungünstigen Bedingungen (hohe Temperaturen, geschlossene Spaltöffnungen) zu einem Verlust von bis zu 50% des in der Photosynthese fixierten Kohlenstoffs führen (Sharkey 1988; Häusler et al. 2001; Raines 2006). Da die Refixierung des bei der GDC freigesetzten NH_3 durch das GS/GOGAT-System die primäre Stickstoffassimilation der Pflanze um den Faktor 10 übersteigen kann (Leegood et al. 1995), wird über Ferredoxin zusätzlich viel Reduktionskraft aus den Photosystemen abgegriffen. Stickstoff ist für die Pflanze ein wesentlich wichtigerer Nährstoff als der viel häufigere Kohlenstoff und darüber hinaus wäre NH_3 (bzw. NH_4^+) in den hier anfallenden Mengen toxisch für die Pflanze (Britto und Kronzucker 2002). Zusammengenommen ist eine effektive Refixierung des freigesetzten NH_3 für die Pflanze unerlässlich, was dazu führt, dass eine Inhibition des GS-GOGAT-Systems (z. B. durch Herbizide (Tan et al. 2006)) letal ist.

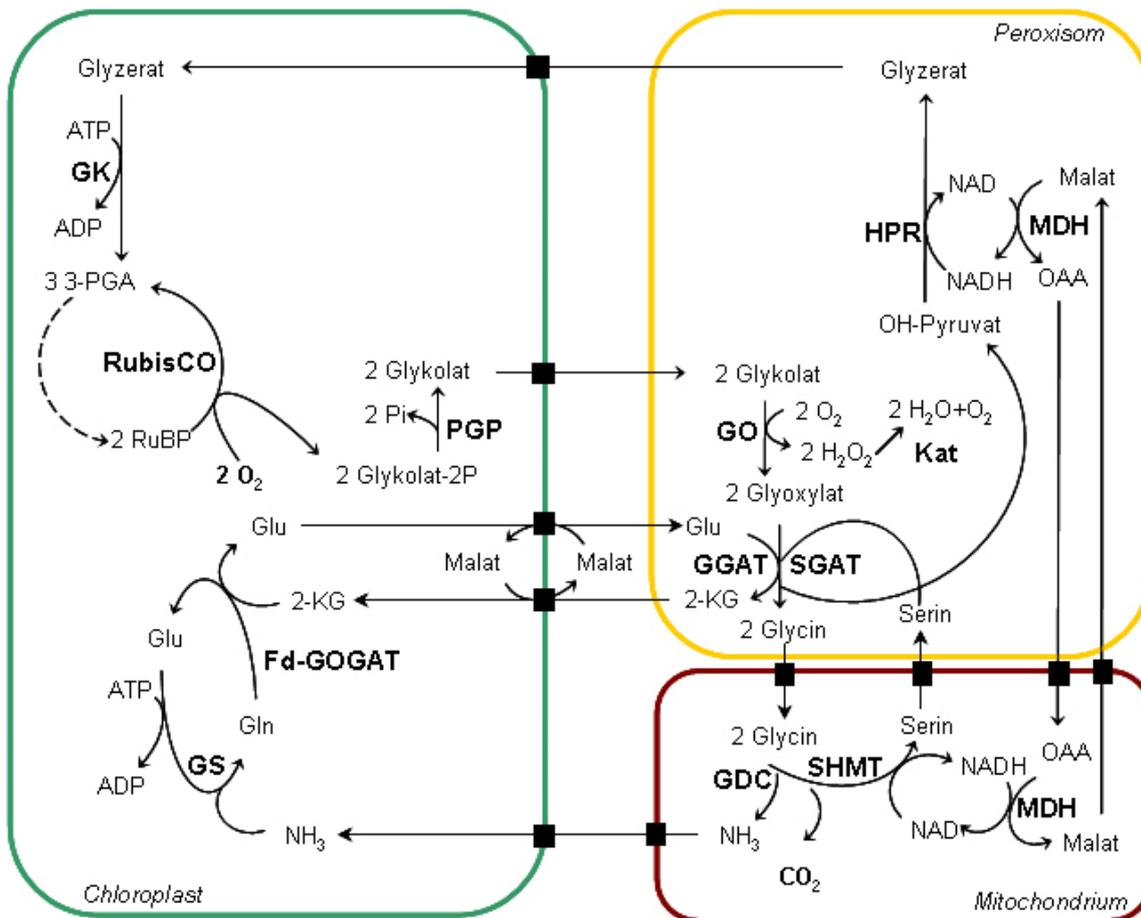


Abbildung 1: Der photorespiratorische Stoffwechselweg
 PGP = Phosphoglykolat-Phosphatase, GO = Glykolat-Oxidase, SGAT = Serin/Glyoxylat-Aminotransferase, GGAT = Glutamat/Glyoxylat-Aminotransferase, GDC = Glycin-Decarboxylase, SHMT = Serin-Hydroxymethyltransferase, HPR = Hydroxypyruvat-Reduktase, GK = Glyzerat-Kinase, GS = Glutamin-Synthetase, Fd-GOGAT = Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase, MDH = Malat-Dehydrogenase, 2-KG = 2-Ketoglutarat, Glu = Glutamat, Gln = Glutamin, Pi = anorganisches Phosphat, OAA = Oxalacetat, 3-PGA = 3-Phosphoglyzerat, RubP = Ribulose-1,5-bisphosphat

Im Gegensatz zu dem NH₃ ist das in den Peroxisomen produzierte H₂O₂ für die Pflanze nicht gefährlich, da es sofort und effektiv von der in den Peroxisomen lokalisierten Katalase entgiftet wird (Vandenabeele et al. 2004). Die Reduktionsäquivalente für die ebenfalls in den Peroxisomen ablaufende Reduktion des Hydroxypyruvats werden zumindest zum Teil (Raghavendra et al. 1998) über ein Malat/Oxalacetat-Shuttle von den Mitochondrien bereitgestellt, wo sie hauptsächlich von der GDC regeneriert werden, die im Licht mit etwa der fünffachen Rate des Citrat-Zyklus arbeitet (Douce et al. 2001) und Glycin damit zum bevorzugten Oxidationssubstrat pflanzlicher Mitochondrien macht (Krömer und Heldt 1991). Zudem produziert die GDC, die zusammen mit der SHMT bis zu 50% des Gesamtproteins der Mitochondrien ausmacht, Formyl-Tetrahydrofolat (CH₂-THF), das als zentraler Überträger von C₁-Einheiten u. a. an der Biosynthese von

Pyrimidinen und Purinen beteiligt ist (Hanson und Roje 2001; Bauwe und Kolukisaoglu 2003).

Aufgeklärt wurde der photorespiratorische Stoffwechselweg in großen Teilen durch die Arbeiten von C. R. Somerville und W. L. Ogren (z. B. Somerville und Ogren 1979, 1980, 1980, 1981, 1982, 1983; Review: Somerville 1986; Somerville 2001), die Mutanten von Enzymen dieses Weges isolierten, indem sie eine mutagenisierte Population unter atmosphärischer CO₂-Konzentration durchmusterten und diejenigen Linien charakterisierten, die dort nicht lebensfähig waren. Aber auch heute ist noch reges Forschungsinteresse auf diesem Gebiet vorhanden (Boldt et al. 2005; Engel et al. 2007), v. a. auch dadurch dass außer den beiden Dicarboxylattransportern der Plastiden (Weber et al. 1995; Taniguchi et al. 2002; Renné et al. 2003) noch keine Transportproteine der Photorespiration identifiziert wurden (Weber et al. 2005).

1.2.3 Sinn und Nutzen der Photorespiration

Der oxidative C₂-Zyklus (Tolbert 1997) hat vor allem die Aufgabe, $\frac{3}{4}$ des zunächst für den Calvin-Benson-Zyklus verlorenen Kohlenstoffs aus 2-Phosphoglykolat zu regenerieren. Da dabei Reduktionsäquivalente und ATP verbraucht werden, kann die Photorespiration unter hohen Beleuchtungsstärken die Photosysteme der Thylakoide vor einer Überreduktion und damit vor der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies schützen (Kozaki und Takeba 1996). Die Photorespiration spielt ebenfalls eine Rolle bei der Vermittlung von Trockenheitsresistenz, da bei geschlossenen Stomata und niedriger CO₂-Verfügbarkeit auf diesem Weg CO₂ bereitgestellt werden kann, so dass der Calvin-Benson-Zyklus weiterlaufen kann und sicher gestellt ist, dass immer noch Energie aus den Photosystemen abgegriffen wird (Noctor et al. 2002). Weiterhin sind einige Metabolite dieses Stoffwechselweges wie Glycin und Serin an verschiedenen Biosynthesewegen beteiligt, jedoch können diese (bis auf CH₂-THF, Engel et al. 2007) auch auf anderem Wege hergestellt werden, wie in C₄-Pflanzen zu beobachten ist. Zusammengenommen ist also die Photorespiration vor allem Recycling von Phosphoglykolat und Ventil für überschüssige Energie der Photosynthese und eröffnet somit die Möglichkeit, durch ihre Reduktion Pflanzen die Lichtenergie effektiver ausnutzen zu lassen.

1.2.4 Natürliche Wege zur Verringerung von Photorespiration

In den heute vorkommenden photosynthetisierenden Organismen haben sich bereits einige Wege zur Verringerung der Photorespiration etabliert, die hauptsächlich auf einer lokalen Konzentrationserhöhung von CO_2 am Ort der RubisCO basieren. So haben bestimmte Algen CO_2 -Konzentrationsmechanismen (Kaplan und Reinhold 1999; Giordano et al. 2005) und höhere Pflanzen die C_4 - und die CAM-Photosynthese entwickelt.

1.2.4.1 C_4 -Photosynthese

Die C_4 -Photosynthese beruht auf einer räumlichen Trennung von primärer CO_2 -Fixierung in den Mesophyllzellen und endgültiger CO_2 -Fixierung durch die RubisCO in den gasdichten Leitbündelzellen (Hatch 1987). Die Differenzierung dieser beiden Zelltypen ist normalerweise essentiell für die C_4 -Photosynthese (Kranz-Anatomie), auch wenn in speziellen Fällen bereits Einzelzell- C_4 -Photosynthese beobachtet wurde (Lara et al. 2002; Edwards et al. 2004).

In den Mesophyllzellen wird CO_2 als HCO_3^- von der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) vorfixiert. Das entstandene Oxalacetat ist sehr reaktiv und wird daher zu organischen Säuren wie Malat oder Aspartat umgewandelt, die als transienter Kohlenstoffspeicher in die Leitbündelscheidenzellen transportiert und dort decarboxyliert werden.

C_4 -Pflanzen werden dabei in drei Gruppen eingeteilt, die durch den Typ des decarboxylierenden Enzyms in den Leitbündelscheidenzellen definiert werden: (1) NADP-Malat-Enzym-Typ, (2) NAD-Malat-Enzym-Typ, (3) Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Typ (Heldt 2003). Neben dem transienten Kohlenstoffspeicher (Malat bei (1), Aspartat bei (2)+(3)) unterscheiden sich die drei Gruppen auch in dem subzellulären Ort der Decarboxylierung, in der Art der Regeneration des HCO_3^- -Akzeptors PEP und in der Energiebilanz (Hatch 1987; Furbank et al. 1990). Die strenge Aufteilung der C_4 -Pflanzen auf diese drei Gruppen wird in jüngster Zeit allerdings aufgeweicht, da vermehrt von Pflanzen berichtet wird, die mehr als ein decarboxylierendes Enzym besitzen (Wingler et al. 1999; Calsa und Figueira 2007; Muhaidat et al. 2007).

Durch die Freisetzung von vorfixiertem CO_2 in den gasdichten Leitbündelzellen entsteht eine CO_2 -Pumpe, die wesentlich höhere CO_2 -Konzentrationen als in den Mesophyllzellen von C_3 -Pflanzen ermöglicht. Dadurch wird die Oxygenase-Reaktion

der RubisCO nahezu vollständig unterdrückt und die RubisCO carboxyliert im Gegenzug mit nahezu maximaler Geschwindigkeit V_{max} , welche die RubisCO von C_3 -Pflanzen unter ambienten Bedingungen niemals erreicht. Zudem sind die spezifischen Aktivitäten der C_4 -RubisCO höher als die der C_3 -Formen, wodurch weniger RubisCO für die gleiche Photosyntheseleistung benötigt wird. Dies ermöglicht den C_4 -Pflanzen eine wesentlich bessere Effizienz hinsichtlich der photosynthetischen Stickstoffnutzung, da die RubisCO das häufigste Protein in Blättern ist und damit etwa 20-30% des Gesamtstickstoffs in Blättern von C_3 -Pflanzen, aber nur 6% in C_4 -Blättern ausmacht (Sage et al. 1987). Klassische C_4 -Pflanzen sind z. B. Mais, Zuckerrohr und Hirse und eher in subtropischen bzw. tropischen Breiten beheimatet.

1.2.4.2 CAM-Photosynthese

Die CAM-Photosynthese ist vom Prinzip her ähnlich der C_4 -Photosynthese. Allerdings liegt hier eine zeitliche Trennung der Vorfixierung von CO_2 in organische Säuren und der endgültigen Fixierung durch die RubisCO vor (Heldt 2003).

Das CO_2 wird nachts bei geöffneten Stomata wiederum von der PEPC fixiert, zu Malat reduziert und in die Vakuole transportiert. Tagsüber kann die Pflanze dann bei geschlossenen Stomata das Malat aus der Vakuole entnehmen und decarboxyliertes CO_2 mit der RubisCO fixieren (Cushman und Bohnert 1999; Dodd et al. 2002). Diese Art der Photosynthese wird vor allem von Crassulaceen an sonnigen, trockenen Standorten verwendet und geht mit niedrigen Wachstumsraten einher.

1.2.5 Technische Ansätze zur Reduzierung der mit Photorespiration verbundenen Verluste

Da auf Grund der Verhältnisse in C_4 - und CAM- Pflanzen davon ausgegangen werden kann, dass die Photorespiration an sich nicht essentiell für den pflanzlichen Metabolismus ist, stellt sich (auch vor einem ökonomischen Hintergrund) die Frage, ob die Photorespiration oder die mit ihr verbundenen Verluste an Energie und fixiertem Kohlenstoff nicht auch in C_3 -Pflanzen reduziert werden könnten und ob dies eine höhere Biomassenproduktion nach sich zöge. Um diese Frage zu erörtern, wurden bereits mehrere Ansätze verfolgt, die auf verschiedene Strategien zurückgehen:

Ein häufig verfolgter Ansatz ist, die kinetischen Konstanten (und damit τ , s. o.) der RubisCO zu verändern. Dafür wurde auf der einen Seite in vielen Studien versucht, durch *site-directed mutagenesis* die katalytischen Eigenschaften der großen Untereinheit zu verändern. Alle bisherigen Ansätze führten jedoch sogar zu einer weniger effizienten RubisCO und müssen von daher als gescheitert angesehen werden (Whitney et al. 1999; Spreitzer und Salvucci 2002; Andersson und Taylor 2003; Parry et al. 2003).

Auf der anderen Seite wird innerhalb der photosynthetisierenden Organismen nach RubisCO-Enzymen mit besseren katalytischen Eigenschaften gesucht, um diese dann in wirtschaftlich bedeutende Pflanzen (*crop plants*) einzuschleusen. Solch eine RubisCO mit höherem τ wurden in Rotalgen gefunden (Read und Tabita 1994; Uemura et al. 1997), allerdings führte die Expression der großen Untereinheit dieser Enzyme in Tabak zu keiner detektierbaren Aktivität (Whitney et al. 2001), da offenbar zur Faltung des Proteins benötigte Hilfsproteine fehlten (Cloney et al. 1993). Eine mögliche Lösung dieses Problems scheint die Plastomtransformation zu bieten (Whitney und Andrews 2003). Innerhalb der höheren Pflanzen dagegen ist die Variation in den katalytischen Eigenschaften der RubisCO nicht sehr groß und die *crop plants* scheinen bereits die effizientesten Formen zu besitzen, auch wenn kürzlich in einer Studie mediterrane Pflanzen mit höherem τ gefunden wurden (Galmes et al. 2005), deren Carboxylierungsgeschwindigkeiten aber noch nicht bestimmt wurden (Raines 2006). Dies alles führte zu einem wieder erstarkenden Interesse an der Erforschung und Manipulation der kleinen Untereinheit der RubisCO, die noch nicht in ihrer Funktion verstanden ist (Spreitzer 2003).

Ein anderer Ansatz zur Reduktion der Photorespiration ist, Enzyme aus C_4 -Pflanzen in C_3 -Pflanzen zu überexprimieren, um so deren CO_2 -Konzentrationsmechanismen zu übertragen (Matsuoka et al. 2001). Im Gegensatz zu einigen Ansätzen mit RubisCO-Untereinheiten (s. o.) konnten C_4 -Enzyme funktional in C_3 -Pflanzen exprimiert werden (Häusler et al. 2002; Leegood 2002; Miyao 2003). So wurden die Maisgene für die PEPC, die Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK) oder das NADP-Malat-Enzym (NADP-ME) in Reis überexprimiert (Ku et al. 1999; Takeuchi et al. 2000; Jiao et al. 2002; Fukayama et al. 2003; Raines 2006), wobei jedoch kein Effekt auf die photosynthetischen Eigenschaften festgestellt werden konnte, sondern, im Gegenteil, die Expression des NADP-ME zu unterentwickelten Pflanzen mit photooxidativen Schädigungen führte (Tsuchida et al. 2001). In transgenen Kartoffelpflanzen, die

PEPC und NADP-ME exprimierten, konnte dagegen eine Erniedrigung des CO_2 -Kompensationspunktes beobachtet werden, was eine Reduktion der Photorespiration nahelegt, deren Ursache aber nicht abschließend geklärt werden konnte. Außerdem zeigten diese Pflanzen Verschiebungen im Muster endogener Enzyme und Veränderungen der Pigmentausstattung (Häusler et al 1999, 2001 und 2002).

Trotz der Vielzahl der vorgestellten Studien zur Übertragung von C_4 -Eigenschaften auf C_3 -Pflanzen, ist bis jetzt noch kein Versuch publiziert worden, in dem alle beteiligten Enzyme des C_4 -Weges in C_3 -Pflanzen zu exprimieren (Leegood 2002; Raines 2006), aber schon jetzt steht fest, dass die Kranz-Anatomie der C_4 -Pflanzen für ein Funktionieren der C_4 -Photosynthese unerlässlich ist (Häusler et al. 2002). Da auch in Zellen mit Einzelzell- C_4 -Photosynthese spezialisierte Organellen vorkommen, die in C_3 -Pflanzen so nicht zu finden sind (Raines 2006), kann somit in C_3 -Pflanzen keine vollständig funktionierende C_4 -Photosynthese etabliert werden, aber es sollte dennoch möglich sein, photorespiratorische Verluste zu verringern.

1.2.6 Die hier verfolgten Ansätze: GTT und GMM

Neben den genannten Strategien existiert noch eine weitere, deren grundlegende Idee es ist, das durch die Oxygenase-Reaktion der RubisCO und nachfolgende Dephosphorylierung entstehende Glykolat bereits im Chloroplasten zu metabolisieren. Dabei entstehendes CO_2 würde am Ort der RubisCO freigesetzt und könnte so die lokale CO_2 -Konzentration erhöhen, was wiederum zu einer verminderten Oxygenase-Aktivität der RubisCO (s. o.) und damit zu einem selbstregulierten System führen würde. Um dies zu erreichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit an der Etablierung von zwei alternativen Stoffwechselwegen im Chloroplasten gearbeitet:

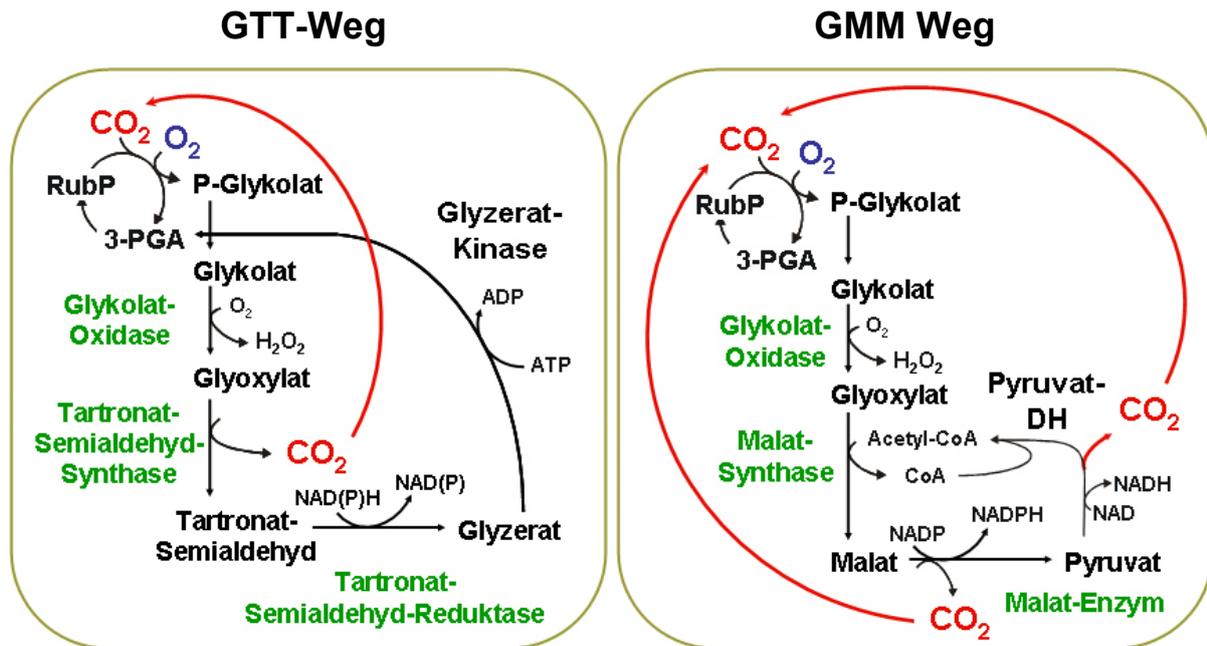


Abbildung 2: Die beiden vorgeschlagenen Stoffwechselwege zur Verminderung photorespiratorischer Verluste GTT und GMM im Vergleich. In grüner Farbe markiert sind die Enzyme, die notwendigerweise transgen in die Pflanzen eingebracht werden müssen.

In dem **GTT-Weg** soll das entstandene Glykolat im Chloroplasten durch drei aufeinander folgende Reaktionen transgen eingebrachter Enzyme zu Glycerat umgesetzt werden, das dann über die Glycerat-Kinase wieder Eingang in den Calvin-Benson-Zyklus findet (Abb. 2). Die Summenformel dieses Weges ist damit:



Zur Etablierung dieses Ansatzes müssen die Gene für die Glykolat-Oxidase (GO, *A. thaliana*, At3g14420, s. 3.2.1), die Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS, *E. coli*, NP_415040) und die Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR, *E. coli*, NP_417594, s. 3.2.4) mit Transitpeptidsequenzen für die richtige subzelluläre Lokalisation in das Genom von *A. thaliana* eingebracht werden.

In dem **GMM Weg** dagegen soll der Kohlenstoff aus dem Glykolat nicht wieder zurück in den Calvin-Zyklus gebracht werden, sondern über eine Reaktionsfolge von drei transgen eingebrachten Enzymen und unter der Zuhilfenahme der plastidären Pyruvat-Dehydrogenase vollständig zu CO_2 oxidiert werden (Abb. 2). Die Summenformel dieses Weges stellt sich damit so dar:



Die Verfolgung dieses Ansatzes macht es nötig, Gene für die Glykolat-Oxidase (GO, At3g14420, s. 3.2.1), Malat-Synthase (MS, *C. pepo*, X56948, s. 3.2.2) und das Malat-

Enzym (ME, *Z. mays*, J05130.1, s. 3.2.3) inklusive der nötigen Transitpeptidsequenzen in das *A. thaliana* Genom zu transferieren.

Die beiden Ansätze unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Energiebilanz: Während bei dem GMM-Weg zwei Reduktionsäquivalente entstehen wird bei dem GTT Weg ein NADH oxidiert und auch ein ATP verbraucht. Gemeinsam ist beiden Ansätzen dagegen die Glykolat-Oxidase als Startenzym, die das Glykolat unter gleichzeitiger Produktion von H₂O₂ oxidiert.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass ein dem GTT Ansatz recht ähnliches Projekt zum Erfolg, also zu größeren Pflanzen bei verbesserter CO₂-Assimilation, geführt hat (Kebeish et al. 2007). In diesem Fall wurde statt der im GTT Ansatz vorgeschlagenen Glykolat-Oxidase die Glykolat-Dehydrogenase aus *E. coli* verwendet

1.3 Die Rolle von Malat

Da Malat in einem erkenntnisreichen Teil dieser Arbeit (3.8) eine wichtige Position einnimmt, soll noch kurz auf die wichtigsten Eigenschaften dieses Metabolits in Pflanzen eingegangen werden.

Malat spielt eine zentrale Rolle in den meisten Organellen der Pflanzenzelle, zwischen denen es schnell (Kalt et al. 1990) über vielfältige Transportsysteme ausgetauscht werden kann (Taniguchi et al. 2002; Emmerlich et al. 2003; Renné et al. 2003; Scheibe 2004). Malat ist involviert in viele zelluläre Prozesse wie die Nitrat-Reduktion, Fettsäuresynthese, Photorespiration (Abb. 1), Stomatabewegungen (als Osmotikum), Kontrolle des zellulären pH, Redox-Gleichgewicht und den Transport und Austausch von Reduktionsäquivalenten zwischen den verschiedenen Organellen (Lance und Rustin 1984). Der Malat-Gehalt zeigt dabei in Blättern von C₃-Pflanzen einen circadianen Rhythmus mit den höchsten Werten am Ende der Lichtperiode. Die Malat-Synthese findet im Licht durch die aufeinander folgenden Reaktionen der PEP-Carboxylase (PEPC) und der Malat-Dehydrogenase (MDH) statt, wobei die PEPC-Aktivität ebenfalls sehr stark reguliert ist (Fontaine et al. 2002; Nimmo 2003; Sullivan et al. 2005). Wenn der Malat-Gehalt im Tagesverlauf einen bestimmten Wert übersteigt, wird es in die Vakuole eingelagert (Gout et al. 1993), von wo aus es nachts bei deaktivierter PEPC wieder entlassen wird. Das entlassene Malat kann dann, von dem Malat-Enzym (s. 3.2.3) zu Pyruvat decarboxyliert, den Citrat-Zyklus in den Mitochondrien antreiben (Martinoia und Rentsch 1994). Neben der

Speicherung in der Vakuole kann Malat aber auch von der Fumarase zu Fumarat umgesetzt werden (Gout et al. 1993), was zusätzlichen Bedarf für Transportprozesse schafft, da das Cytosol keine Fumarase-Aktivität besitzt. Unterstützt wird diese Aussage durch die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse von Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum*), die eine reduzierte Fumarase-Expression und konsequenterweise erhöhte Malat-Gehalte zeigten (Nunes-Nesi et al. 2007).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die beiden vorgeschlagenen artifiziellen Stoffwechselwege GMM und GTT in den Plastiden von *A. thaliana* Pflanzen zu etablieren. Das Ziel dabei sollte sein, Pflanzen zu erzeugen, die weniger stark von photorespiratorischen Verlusten betroffen sind als der Wildtyp und somit verbesserte Wachstums- und Photosyntheseigenschaften zeigen. Da diese Ansätze neuartig waren und die meisten der nötigen Enzyme zu Beginn der Arbeit noch nie in Plastiden von *A. thaliana* exprimiert worden waren, sollten auch einige der intermediären einzeln und doppelt transgenen Pflanzenlinien kurz charakterisiert und auf mögliche Hinweise zum Gelingen des Gesamtprojekts untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Biomol (Hamburg), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), CS GmbH (Langerwehe) und Serva (Heidelberg) verwendet. Biochemikalien und Enzyme, einschließlich der dazugehörigen Puffer stammten von den Firmen MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden) und New England Biolabs (Frankfurt/Main). Allgemeines Verbrauchsmaterial wurde über die Firma KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar) bezogen.

2.1.2 Geräte

Die Typenbezeichnungen und die Hersteller der verwendeten Geräte sind, soweit diese für die Durchführung von Bedeutung waren, bei den jeweiligen Versuchsteilen aufgeführt.

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Pflanzenmaterial

Es wurde ausschließlich mit *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Cv. Columbia (*A. thaliana*) gearbeitet. Der Wildtyp dieser Pflanzen wird in der vorliegenden Arbeit mit Col-0 bezeichnet.

2.2.2 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

A. thaliana Samen wurden in 9 cm Plastiktöpfe (Pöppelmann, Lohne) ausgesät. Das enthaltene Substrat war ein Gemisch von 3 Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray,

Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz). Die Aussaat wurde für zwei Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert. Nach etwa zwei Wochen wurden die Pflanzen in 77er Multiplatten (Nitsch & Sohn, Kreuztal) oder Einzeltöpfe mit identischem Substrat pikiert.

2.2.2.1 Gewächshaus

Im Gewächshaus herrschten Langtag-Bedingungen, also ein Licht/Dunkel-Rhythmus von 16:8 h und eine relative Luftfeuchtigkeit von etwa 40%. In der Lichtperiode betrug die Temperatur 21°C, während der Dunkelperiode 18°C. Die Photonenflussdichte der photosynthetisch aktiven Strahlung (PFD) war naturgemäß großen Schwankungen unterworfen. Es wurde aber durch technische Maßnahmen (automatische Beleuchtung/Verdunkelung) versucht, das Ausmaß dieser Schwankungen gering zu halten.

2.2.2.2 Klimakammern

Zur besseren Reproduzierbarkeit der Phänotypen und besonders der Metabolitanalysen mittels GC/MS wurden die Pflanzen in genauer kontrollierbaren Bedingungen in Klimakammern angezogen. Hierfür standen begehbare Pflanzenkammern (Fa. Weiss, Reiskirchen) und Pflanzenanzuchtschränke (Fa. Percival, Perry, USA) zur Verfügung. Die Temperaturen lagen in beiden Fällen während der Lichtperiode bei 22°C und während der Nachtperiode bei 18°C. Die Luftfeuchtigkeit wurde konstant bei 50% gehalten. In diesen Kammern wurden zwei verschiedene Tageslängen bei unterschiedlichen Beleuchtungsstärken appliziert. Die Beleuchtungsstärken sind in den jeweiligen Versuchsteilen angegeben, Für die Tageslänge gilt, dass im Langtag (LT) 16 Stunden Licht gegeben wurden und im Kurztag (KT) nur 8 Stunden.

2.2.2.3 Selektion auf Erde

Transgene Pflanzen, die das BASTA-Resistenzgen trugen, konnten auf Erde selektioniert werden. Dazu wurden die zu selektionierenden Pflanzen wie in 2.2.2 ausgesät und ab einem Alter von etwa zwei Wochen, wenn das autotrophe Wachstum eingesetzt hatte, einmal täglich für drei Tage mit einer BASTA-Lösung

besprüht. Überlebende Pflanzen wurden eine Woche später in neue Töpfe oder Multiplatten (s. 2.2.2) pikiert.

BASTA-Lösung:

| | |
|--------------|------------|
| 0,001% (w/v) | Glufosinat |
| 0,1% (v/v) | Tween 20 |

2.2.3 Anzucht von *A. thaliana* unter verschiedenen Bedingungen

2.2.3.1 Wachstum unter erhöhter CO₂-Konzentration

Zur Anzucht von *A. thaliana* unter erhöhter CO₂-Konzentration wurden die Pflanzen in einen weitgehend gasdichten Plexiglasbehälter mit den Maßen 63 x 61 x 24 cm (Auftragsarbeit der Versuchswerkstatt des Bot. Inst.) transferiert. Dieser Behälter ist in einem Klimaschrank (Fa. Percival, Perry, USA, s. 2.2.2.2) aufgebaut. Er verfügt über eine regelbare CO₂- und Pressluftzufuhr, sowie einen Ventilator zur Luftzirkulation. Außerdem ist an der Frontseite eine Klappe für die bessere Zugänglichkeit eingelassen. Das eingeleitete CO₂ stammt aus Gasflaschen, die von der Firma Carbo aus Köln bezogen wurden.

In der CO₂-Kammer wurde ein Licht/Dunkel-Rhythmus von 8:16 Stunden eingehalten und der CO₂-Gehalt wurde auf 2000 ±200 ppm oder 4000 ±200 ppm eingestellt. Die PFD ist in den jeweiligen Versuchsteilen angegeben.

2.2.3.2 Wachstum unter Starklicht

Um die Auswirkungen von Starklicht auf die Pflanzen zu bestimmen, wurden sie in eine Phytokammer (Vötsch, Balingen) transferiert, in der Lichtstärken von 30-700 µE erreicht werden konnten. Dabei wurde ein Licht/Dunkel-Rhythmus von 16:8 h, eine Temperatur von 22°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50% eingehalten.

2.2.3.3 Wachstum in der Kühlkammer

Kältestress wurde in einem Kühlraum des botanischen Instituts simuliert, in dem eine Umgebungstemperatur von 4°C herrschte. Eine aufgehängte Lichtbank sorgte für die Beleuchtung mit einer PFD von 60 ±10 µE bei einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16:8 Stunden.

2.2.3.4 Applikation von Salzstress

Für die Simulation von Salzstress wurden die Pflanzen mit einer NaCl-Lösung gegebener Konzentration gegossen, wenn das Substrat bei allen Pflanzen gleichmäßig nahezu trocken war.

2.2.4 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen

Zur Aussaat auf Agarplatten wurden die Samen durch mindestens sechsstündige Begasung mit Chlorgas in einem Exsikkator sterilisiert. Die Chlorgasentwicklung wurde durch Zugabe von 3 ml konzentrierter HCl zu 100 ml 12%iger Na-Hypochlorit-Lösung erreicht.

2.2.5 Anzucht und Selektion von *A. thaliana* auf Agar-Platten

Sterilisierte Samen wurden auf MS-Agar-Platten ausgelegt und anschließend für zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Daraufhin wurden sie in einen Klimaschrank (Fa. Rubarth, Laatzen) überführt, in dem sie bei 22°C, einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16:8 h und einer PFD von 40 ±5 µE bis zum Pikieren auf Erde oder der Durchführung weiterer Experimente verblieben.

MS-Agar:

| | |
|-------------|---|
| 1% (w/v) | Saccharose |
| 0,44% (w/v) | Murashige&Skoog (MS)-Salze (Duchefa, Haarlem, NL) |
| 0,8% (w/v) | Agar |

Für Selektionen transgener Pflanzen auf Agarplatten wurden dem autoklavierten MS-Agar steril filtrierte Antibiotikalösungen hinzugefügt:

| | |
|-------------|-----------------------------|
| Kanamycin | 50 µg/ml Endkonzentration |
| Hygromycin | 30 µg/ml Endkonzentration |
| Sulfadiazin | 5,25 µg/ml Endkonzentration |

2.2.6 Externe Zugabe von Nährstoffen zu dunkelinkubierten *A. thaliana* Pflanzen

Um zu testen, inwieweit die verfrühte dunkel-induzierte Seneszenz der ME Pflanzen (3.8.3) durch die externe Zugabe von Nährstoffen beeinflusst werden kann, wurden drei Wochen alte, auf MS-Agar-Platten gewachsene Pflanzen (2.2.5), in Petrischalen transferiert, die mit Whatman-Papier (Whatman, Kent (UK)) ausgelegt waren, welches zuvor mit der jeweiligen Lösung getränkt worden war.

2.2.7 Transformation von *A. thaliana* durch Vakuuminfiltration

Die Transformation von Pflanzen wurde nach Bechtold et al. (1993) durchgeführt. Agrobakterien, die den jeweiligen binären Vektor zur Pflanzentransformation enthielten, wurden bei 28°C in einer Flüssigkultur (2.3.2) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Die Kultur wurde daraufhin bei 2500 x g abzentrifugiert und das resultierende Bakterienpellet in dem Infiltrationsmedium vorsichtig wieder aufgenommen.

Infiltrationsmedium:

| | |
|-------------|------------------------|
| 5% (w/v) | Saccharose |
| 0,22% (w/v) | MS-Salze mit Vitaminen |
| Ein Tropfen | Tween 20 |
| | pH 5,6 / KOH |

Blühende *A. thaliana*-Pflanzen, deren offene Blüten und die Schoten entfernt waren, wurden kopfüber in einem Exsikkator in die Agrobakteriensuspension getaucht, so dass alle verbliebenen Blütenknospen untergetaucht waren. Nach dreimaligem Anlegen eines Vakuums für 5 Minuten wurden die Pflanzen aus dem Exsikkator entnommen und unter einer Plastikhaube für die nächsten zwei Tage feucht gehalten.

2.2.8 Probennahme

Sofern in den jeweiligen Versuchsteilen nicht anders angegeben, wurden zur Probennahme alle Blätter von mindestens 5 Einzelpflanzen abgeschnitten, in Alufolie gesammelt und in flüssigem N₂ eingefroren. Anschließend, oder nach Lagerung der

Proben bei -80°C , wurden die Proben in flüssigem N_2 gemörstert, passend abgewogen auf Reaktionsgefäße für die einzelnen Versuche verteilt, wieder in flüssigem N_2 eingefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*, Stamm Dh5 α) wurden entweder auf LB-Platten oder in LB-Flüssigkultur bei einer Wachstumstemperatur von 37°C angezogen. Falls erforderlich, wurden Antibiotika zur Selektion transgener Organismen zugegeben. Stammkulturen wurden erstellt, indem $500\ \mu\text{l}$ der Bakterienkultur mit $500\ \mu\text{l}$ 60%igem Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert wurden.

LB-Medium und -Platten:

| | |
|-------------|-------------------------|
| 1% (w/v) | Trypton |
| 0,5% (w/v) | Hefeextrakt |
| 1% (w/v) | NaCl |
| [1,5% (w/v) | Bacto-Agar für Platten] |

Antibiotikakonzentrationen:

| | |
|---------------------|-----------|
| 25 $\mu\text{g/ml}$ | Kanamycin |
|---------------------|-----------|

2.3.2 Herstellung TSS-kompetenter *E. coli*

Bakterien des Dh5 α -Stammes wurden in 5 ml LB-Medium (s. 2.3.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (New Brunswick G25, Edison (USA)) angezogen. Danach wurde 1 ml der Übernachtskultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml frischem LB-Medium überimpft und 2 h bei 37°C unter Schütteln bis zum Anfang der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert ($\text{OD}_{600} = 0,3-0,4$). Die Kultur wurde dann für 10 min bei 3000 rpm sedimentiert. Die Sedimente wurden in 10 ml eisgekühltem TSS-Medium (Chung und Miller 1993) aufgenommen, 15 min auf Eis gestellt, zu $50\ \mu\text{l}$ in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

TSS-Medium:

| | |
|-----------|------------------------|
| 10% (w/v) | Polyethylenglykol 8000 |
| 5% (w/v) | Dimethylsulfoxid |
| 20-50 mM | MgCl ₂ |
| 20-50 mM | MgSO ₄ |
| | pH 6,5 / NaOH |

2.3.3 Transformation TSS-kompetenter *E. coli*

Zu 50 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz (s. 2.4.4.4) oder 50-200 ng Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, kurz auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium (s. 2.3.1) versetzt. Die Kultur wurde für 1 h bei 37°C leicht geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden 200-1000 µl auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

2.3.4 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens des Stamms GV3101 (*A. tumefaciens*) mit dem Helferplasmid pSoup (Hellens et al. 2000) wurden entweder auf YEB-Platten oder in YEB-Flüssigkultur bei einer Wachstumstemperatur von 28°C angezogen. Falls erforderlich, wurden Antibiotika zur Selektion transgener Organismen zugegeben. Stammkulturen wurden wie in 2.3.1 erstellt.

YEB-Medium und -Platten:

| | |
|--------------|-------------------------|
| 0,5% (w/v) | Bacto-Pepton |
| 0,5% (w/v) | Rindfleischextrakt |
| 1% (w/v) | Hefeextrakt |
| 0,5% (w/v) | Saccharose |
| 0,05% (w/v) | MgSO ₄ |
| [1,5% (w/v)] | Bacto-Agar für Platten] |

Antibiotikakonzentrationen:

| | |
|-----------|------------|
| 25 µg/ml | Gentamycin |
| 100 µg/ml | Kanamycin |

| | |
|-----------|-------------|
| 150 µg/ml | Rifampicin |
| 12 µg/ml | Tetracyclin |

2.3.5 Herstellung elektrokompenter *A. tumefaciens*

Als Vorkultur wurden Agrobakterien in 5 ml MGL-Medium angeimpft. Nachdem diese bis zur frühen Sättigung gewachsen waren, wurde die Vorkultur in 100 ml MGL verdünnt, so dass die OD₆₀₀ ca. 0,04-0,08 betrug. Die Agrobakterien wurden dann ca. 4 h bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 angezogen. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (5 min, 4°C, 2500 x g) und in 40 ml eisgekühlten 1 mM HEPES (pH 7,0) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Agrobakterien im gleichen Volumen eisgekühlten 1 mM HEPES (pH 7,0), 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, wiederum sedimentiert und dann in 2 ml eiskaltem 1 mM HEPES (pH 7,0), 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, für 30 s sedimentiert und in 200-400 µl HEPES/Glycerin aufgenommen. 50 µl-Aliquots der kompetenten Agrobakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

MGL-Medium:

| | |
|---------------|---------------------------------|
| 0,5% (w/v) | Bacto-Trypton |
| 0,25% (w/v) | Hefeextrakt |
| 0,5% (w/v) | NaCl |
| 0,5% (w/v) | Mannit |
| 0,116% (w/v) | Na-Glutamat |
| 0,025% (w/v) | KH ₂ PO ₄ |
| 0,01% (w/v) | MgSO ₄ |
| 0,0001% (w/v) | Biotin |

2.3.6 Elektrotransformation von *A. tumefaciens*

50 µl gefrorene, kompetente Agrobakterien wurden mit 2 µl DNA (0,5 µg) 2 min auf Eis inkubiert und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden die Bakterien in eine eiskalte 0,2 cm Elektroporationsküvette (PEQlab, Erlangen) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω und 2,5 kV Puls. Der Transformationsansatz wurde sofort mit 1 ml YEB-Medium versetzt und 2 h bei 28°C

unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden die Zellen durch kurze Zentrifugation ankonzentriert und 50-200 µl auf YEB-Platten ausgestrichen, die dann bei 28°C für 2-3 Tage inkubiert wurden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Extraktion und Präparation von DNA und RNA

2.4.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Minimaßstab wurde das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München) verwendet, wobei nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen wurde.

2.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Eine schnelle Möglichkeit, DNA in ausreichender Menge und Reinheit z. B. für PCR (s. 2.4.5.1) oder Southern Blots (s. 2.4.6) zu erhalten, stellt die Extraktion dieser aus Blütenmaterial nach dem Protokoll von Liu (Liu et al. 1995) dar. Dazu wurden zwei bis vier Blütenstände geerntet, in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zu dem mit einem Bohrhomogenisator (RW 16, IKA-Werke, Staufen) gemörserten homogenen Gemisch wurden 250 µl Extraktionspuffer gegeben, gefolgt von weiterem Mörsern bis zum Auftauen, wonach eine nochmalige Zugabe von 250 µl Extraktionspuffer erfolgte. Anschließend wurde das Gemisch mit 400 µl PCI versetzt, kräftig geschüttelt und 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol gefällt. Nach zehn Minuten Inkubation bei RT schloss sich wiederum ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 3500 rpm an. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol zweimal gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde schließlich in 50 µl TE/RNaseA (10 µg/ml) oder H₂O_{dd} aufgenommen und in ca. 30 min auf dem Schüttler in Lösung gebracht.

PCI:

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| 25 : 24 : 1 (v/v/v) | Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol |
|---------------------|--------------------------------------|

2x Puffer:

| | |
|----------|-------------------|
| 0,6 M | NaCl |
| 100 mM | Tris / HCl pH 7,5 |
| 40 mM | EDTA |
| 4% (w/v) | Sarkosyl |
| 1% (w/v) | SDS |

Extraktionspuffer:

| | |
|--------|--------------------------------|
| 25 ml | 2x Puffer |
| 20 ml | 12 M Harnstoff |
| 2,5 ml | Phenol |
| 2,5 ml | H ₂ O _{dd} |

2.4.1.3 Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe

Für die RNA-Extraktion mit Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden 50-100 mg Pflanzenmaterial je Eppi abgewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur Extraktion von RNA mit dem Bohrhomogenisator (RW 16, IKA-Werke, Staufen) unter Zugabe von 1 ml TRIZOL gemörsert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben und geschüttelt. Nach weiteren zwei Minuten und einer Zentrifugation mit 12000 x g bei 4°C für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation (4°C, 7500 x g, 5 min) wurde der Überstand entfernt, das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft für 30 min getrocknet. Das trockene Pellet wurde schließlich in 50-100 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

DEPC-H₂O:

| | |
|------------|--------------------------------------|
| 0,2% (v/v) | DEPC |
| | Kräftig rühren lassen, autoklavieren |

2.4.2 Elektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten bezüglich ihrer Länge für analytische und präparative Zwecke (Maniatis et al. 1982). Eingewogene Agarose wurde in 50-250 ml 1x TAE-Puffer im Mikrowellenherd einige Minuten erhitzt, bis sie vollständig gelöst war. Die eingesetzte Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Für DNA-Fragmente von 1-10 kb wurde ein 1%iges Gel eingesetzt und für Fragmente mit einer Länge von einigen hundert bp wurde ein 1,5%iges Gel gewählt. Zu dieser Lösung wurde nach Abkühlung auf handwarme Temperatur 1/25000 Volumen Ethidiumbromidlösung gegeben, vermischt und die Lösung dann in eine abgedichtete Flachbett-Gelkammer gegossen, in der sich ein aufgehängter Kamm befand.

Nach Erstarren des Gels wurde es in eine Laufkammer gelegt, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt wurde, bis das Gel gut bedeckt war. Nach Entfernen des Kamms konnten die Proben, zu denen vorher 1/9 Volumen 10x Auftragepuffer gegeben wurde, in die zurückgebliebenen Taschen im Gel geladen werden. Zur Größenbestimmung der aufgetragenen DNA-Fragmente wurde zusätzlich in einer eigenen Tasche 2-15µl 1 kb-Ladder aufgetragen.

An die Gelkammer wurde nun eine regelbare Spannungsquelle (LKB GPS 200 / 400, Pharmacia, Karlsruhe) angeschlossen und die DNA-Fragmente wurden bei 1-1,5 mA pro cm² elektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufrichtung der DNA-Fragmente ist dabei vom (-) zum (+) - Pol der angelegten Gleichspannung.

Anschließend wurden die DNA-Banden auf einer UV-Durchlichtapparatur ($\lambda=254$ nm) sichtbar gemacht. Über ein angeschlossenes Geldokumentationssystem (Fa. Intas, Göttingen) konnten die Bandenmuster als Foto sowie als Bilddateien (TIFF-Format) archiviert werden.

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer):

| | |
|-------|-------------------|
| 2 M | Tris / HAc pH 1,5 |
| 50 mM | EDTA |

1 kb-Ladder:

| | |
|--------|--|
| 100 µl | 10x Auftragepuffer |
| 100 µl | 1 kb-Ladder (1 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe) |
| 800 µl | H ₂ O _{dd} |

10x Auftragepuffer:

| | |
|-------------|-------------------|
| 20% (w/v) | Ficoll 400 |
| 1% (w/v) | SDS |
| 0,05% (w/v) | Bromphenolblau |
| 0,05% (w/v) | Tris / HAc pH 7,5 |
| 100mM | EDTA |

Ethidiumbromid-Lösung:

| | |
|----------|----------------|
| 1% (w/v) | Ethidiumbromid |
|----------|----------------|

2.4.3 Quantifizierung von DNA und RNA**2.4.3.1 Photometrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen**

RNA absorbiert ebenso wie DNA UV-Strahlung maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Eine Extinktionsdifferenz $\Delta A_{260}=0,025$ entspricht einer RNA-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$. Aus der Absorption A von Lösungen bei dieser Wellenlänge kann also die Konzentration der RNA bestimmt werden. Eventuelle Verunreinigungen durch Proteine, Kohlenhydrate und Phenolderivate können durch die parallele Bestimmung der Absorptionen bei $\lambda=280$ nm und $\lambda=320$ nm abgeschätzt werden. Dabei sollte bei reinen RNA-Präparationen die Absorption bei $\lambda=320$ nm gegen 0 tendieren und der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,6 und 1,7 liegen.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 3 μl der RNA-Präparation (s. 2.4.1.3) mit 597 μl DEPC- H_2O (s. 2.4.1.3) verdünnt und die Absorptionen im Photometer (Ultrospec III, Pharmacia, Karlsruhe) bestimmt. Vorher wurde als Nullwert die Absorption von 600 μl DEPC- H_2O für alle 3 Wellenlängen eingestellt.

2.4.3.2 Abschätzung von DNA-Konzentrationen in Agarosegelen

Für eine grobe Abschätzung der DNA-Menge in bestimmten Banden eines Agarosegels wurden die Leuchtstärken dieser unter UV-Licht (s. 2.4.2) mit der des DNA-Größenmarkers einer definierten Menge verglichen. Dabei gilt bei der 1kb-Ladder der angegebenen Konzentration (s. 2.4.2), dass die Banden des Markers (aufgetragene μl Marker $\times 10$) ng DNA enthalten, wobei die 1,6 kb-Bande genau doppelt soviel DNA enthält. Wenn nun also zwei unterschiedliche Mengen Marker

(beispielsweise 2 und 5 μl) aufgetragen wurden, ließ sich die DNA-Konzentration in den Banden von Interesse relativ gut abschätzen. Für eine genauere Bestimmung von DNA-Mengen kann das Foto des Gels als TIFF-Bild im Computer gespeichert werden und mit dem Programm NIH Image Quant 1.60 /ppc ausgewertet werden. Hierbei erfolgt die Auswertung ebenfalls als Vergleich der Leuchtintensitäten der einzelnen Banden, ist aber durch die computergestützte Berechnung genauer.

2.4.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA innerhalb spezifischer palindromischer Sequenzen schneiden. Die Spaltung von DNA wurde mit den vom Hersteller (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot oder Fa. Promega, Mannheim) mitgelieferten Puffern durchgeführt, wobei zwischen 0,4 und 1 U Enzym pro μg DNA eingesetzt wurde (1 U Enzym spaltet 1 μg dsDNA pro Stunde). Die Inkubation während der Reaktion wurde nach den Temperaturempfehlungen der Hersteller durchgeführt.

2.4.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Zu linearisierter DNA wurde 1 U SAP (alkalische Phosphatase aus Shrimps) und 1 x Dephosphorylierungspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 μl hinzugefügt. Der Ansatz mit glatt endenden („blunt-end“) DNA-Fragmenten wurde für 60 min bei 65°C, der mit überhängend endenden („sticky end“) DNA-Fragmenten für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die SAP für 15 min bei 65°C inaktiviert und die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach beiliegendem Protokoll gereinigt.

2.4.4.3 Fill-In

Zum Auffüllen von überhängenden 5'-Enden wurde die Klenow-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) benutzt. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Puffer, 1/40 Volumen dNTP-Mix (je 10 mM) und 1 μl Klenow-Polymerase (Roche, Mannheim) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Hitze

inaktiviert (10 min bei 70°C) und die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach beiliegendem Protokoll gereinigt.

2.4.4.4 Ligation von DNA Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase verbindet DNA-Fragmente, die endständige 3'-OH-Gruppen tragen, mit solchen, die 5'-Phosphatgruppen besitzen. Die Reaktion findet unter ATP-Hydrolyse statt. Dabei können sowohl zueinander komplementäre als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. DNA-Fragment und Vektor wurden im molaren Verhältnis 5:1 gemischt und für einen 20 µl-Ansatz weiterhin 2 µl 10x Ligase-Puffer und 1-2 U T4 DNA-Ligase (Promega) zugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht in einem auf 12°C temperierten Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz direkt für die Transformation kompetenter Bakterienzellen verwendet.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierungen

2.4.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ((Saiki et al. 1985) und (Saiki et al. 1988)) ist eine Methode zur enzymatischen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf einem sich 25-35 mal wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Bindung von spezifischen reziproken Oligonukleotiden (*Primer*, s. 2.14) an die eingesetzte Matrizen-DNA und anschließender Neusynthese der DNA-Stränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (\Rightarrow Taq-Polymerase, Qiagen, Hilden). Dabei verdoppelt sich in jedem Zyklus die Anzahl der gewünschten DNA-Fragmente, die Konzentration dieser nimmt also exponentiell zu. Um den Erfolg der Reaktion zu verifizieren, wurde anschließend ein Teil des Reaktionsansatzes auf ein Agarose-Gel geladen und die Größe des PCR-Produktes bestimmt.

| <u>Standard PCR - Ansatz:</u> | | <u>Standard – PCR - Programm:</u> | | |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|
| 0,2 - 1 µg | Matrizen-DNA | (1) | 94°C 4 min | Denaturierung |
| 0,25 pmol | vorwärts <i>Primer</i> | (2) | 94°C 45 s | Denaturierung |
| 0,25 pmol | rückwärts <i>Primer</i> | (3) | 55°C* 45 s | Anlagerung der <i>Primer</i> |
| 0,1 µl | Taq-Polymerase | | | |
| 1 µl | 10 x Puffer | (4) | 72°C ~60 s / kb | DNA-Synthese |
| 0,2 µl | dNTPs (je 10mM) | (5) | 25-35 mal | (2)-(4) wiederholen |
| 0,2 µl | dNTPs (je 10 mM) | (6) | 72°C 5 min | finale DNA-Synthese |
| ad 10 µl | H ₂ O (bidest) | (7) | 16°C ∞ | Ende |

* = Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide hängt von ihrer Basensequenz ab.

2.4.5.2 Colony-PCR

Als schnelle Methode, eine Vielzahl von Bakterienkolonien auf einer Agarplatte auf das Vorhandensein eines Transgens zu testen, diente die Colony-PCR. Dabei wurde von den zu testenden Kolonien jeweils mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze ein wenig Material abgenommen und direkt zu einem PCR-Ansatz gegeben (s. 2.4.5.1).

2.4.5.3 Sequenzierung eines DNA-Abschnitts

Sequenzierungen wurden im Institut für Genetik der Universität zu Köln mit dem ABI 3730 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems GmbH) durchgeführt. Die Probenvorbereitung einschließlich der Sequenzierungsreaktion erfolgte jedoch im eigenen Hause mit dem Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach einem modifizierten Protokoll der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977).

Sequenzierungsreaktion (10µl-Ansatz):

10-100 ng DNA

| | |
|--------|------------------------------------|
| 0,5 µl | <i>Primer</i> (10µmol/µl) |
| 1 µl | Puffer |
| 2 µl | BigDye 3.1 |
| | ad 10 µl mit HPLC-H ₂ O |

Die Sequenzierreaktion fand im Thermocycler (Biozym PTC 100/200) bei folgenden Bedingungen statt:

| | | | |
|------|--------|---|-----------|
| 96°C | 20 sec | } | 35 Zyklen |
| 96°C | 10 sec | | |
| 55°C | 10 sec | | |
| 60°C | 4 min | | |
| 4°C | ∞ | | |

Anschließend wurde jeder Ansatz 1:1 mit HPLC-H₂O verdünnt und zur Analyse in das Institut für Genetik gebracht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Programme Chromas LITE Version 2.0 oder EditView Version 1.0.

2.4.6 Southern Blot für genomische DNA

Das Southern-Blot-Verfahren (Southern 1975) dient dazu, DNA aus einem Agarosegel mit identischem Verteilungsmuster auf eine Nylonmembran zu transferieren. Aus diesem Gemisch an DNA-Fragmenten werden dann später mit Hilfe spezifischer, radioaktiv markierter ssDNA-Sonden einzelne Fragmente nachgewiesen.

2.4.6.1 DNA-Transfer auf Nylonmembranen

Zuerst wird die DNA-Probe, die auf das Vorhandensein einer Zielsequenz getestet werden soll (hier ein Verdau genomischer Pflanzen-DNA) einer Agarose-Gelelektrophorese (2.4.2) bei niedriger Spannung für einige Stunden unterzogen, um eine möglichst gute Auftrennung der Fragmentmischung zu erhalten (Sambrook et al. 1989). Dieses Agarosegel wird anschließend unter leichtem Schwenken 30 min in Denaturierungslösung inkubiert, neutralisiert (20 min in Neutralisierungslösung) und schließlich mit einer hochkonzentrierten Salzlösung (20x SSC) geblottet. Der Aufbau war dabei dergestalt, dass eine mit 20x SSC gefüllte Wanne mit einer Glasplatte abgedeckt wurde. Über die Glasplatte wurde Whatman-Papier (Whatman, Kent (UK))

gelegt, so dass es zu beiden Seiten in die Salzlösung eintauchte. Auf das Whatman-Papier wurde das neutralisierte Gel mit den Taschen nach oben gelegt, darauf dann die passend zugeschnittene Nylonmembran (Hybond N⁺, Fa. Amersham, Piscataway, USA), 3 Lagen Whatman-Papier und ein etwa 5 cm hoher Stapel Küchenpapier. Auf diesen Stapel wurde eine Glasplatte gelegt, die mit Gewichten (400-500 g) beschwert wurde. Nach 12-16 h wurde die Apparatur abgebaut und die Membran in einem UV-Crosslinker (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam (NL)) mit einer Energie von 120 mJ irreversibel mit der DNA vernetzt. Die Membran war trocken bei Raumtemperatur lagerbar.

Denaturierungslösung:

| | |
|-------|------|
| 1,5 M | NaCl |
| 0,5 M | NaOH |

Neutralisierungslösung:

| | |
|-------|--------------------|
| 1 M | NH ₄ Ac |
| 0,5 M | NaOH |

20x SSC:

| | |
|-------|-------------------------|
| 0,3 M | Na ₃ -Citrat |
| 3 M | NaCl |

2.4.6.2 Herstellung der Sonde

Die Sonde ist ein Stück DNA, das vollständig aus einem Teil der gesuchten DNA-Sequenz besteht und zur Detektion dieser auf der Nylonmembran dient. Hierfür muss sie zunächst über PCR (2.4.5.1) von isolierter Ziel-DNA amplifiziert und anschließend radioaktiv markiert werden.

2.4.6.3 Radioaktive Markierung der Sonde

20 ng der isolierten DNA-Fragmente wurden mit 10 µl Oligomarkierungspuffer versetzt und mit H₂O_{dd} aufgefüllt, so dass nach Zugabe aller folgenden Komponenten ein Gesamtvolumen von 50 µl in den Reaktionsgefäßen vorlag. Die Ansätze wurden für 10 min auf 95°C zur Denaturierung der DNA-Stränge inkubiert. Nach dem Abkühlen und Anzentrifugieren der Lösung wurden 2 µl BSA (10 µg/µl) und 1 µl

Klenow-Fragment (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; [10 U/ μ l]), sowie 40 μ Ci [32 P]dATP (ICN, Aurora/USA) hinzugegeben und die Ansätze für 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 30°C inkubiert. In dieser Reaktion paaren die Hexadesoxynukleotide zufällig an die eingesetzte Sonden-DNA und die Klenow-Polymerase synthetisiert von dort aus einen komplementären Strang, wobei radioaktives [32 P]dATP eingebaut wird.

Oligomarkierungspuffer:

Der Oligomarkierungspuffer wurde aus drei getrennt angesetzten Lösungen hergestellt. Die Lösungen A, B und C wurden aliquotiert, bei -20°C gelagert und zur Verwendung im Verhältnis (v/v/v) 1: 2,5: 1 gemischt.

Lösung A:

| | |
|-----------|--------------------------|
| 1,25 M | Tris/HCl pH 8,2 |
| 0,125 M | MgCl ₂ |
| 2% (v/v) | β -Mercaptoethanol |
| je 0,5 mM | dNTPs außer dATP |

Lösung B:

| | |
|-----|-------------------|
| 2 M | HEPES/NaOH pH 6,6 |
|-----|-------------------|

Lösung C:

| | |
|----------------------|---|
| 3,6 μ g/ μ l | Hexadesoxynukleotide (dN ₆) (Roche, Mannheim) |
|----------------------|---|

2.4.6.4 Kontrolle der Einbaurrate von [32 P]dATP

Die Einbaurrate wurde vor Reinigung und Verwendung der Sonden kontrolliert, um dem Einsatz evtl. zu niedriger spezifischer Aktivitäten vorzubeugen. War die Einbaurrate zu gering, so konnte die Inkubationszeit (s. 2.4.6.3) verlängert werden.

1 μ l der Markierungsreaktion wurde dazu mit 100 μ l H₂O_{dd} verdünnt und die DNA nach Zugabe von 5 μ l Träger-DNA (10 mg/ml Heringssperma-DNA) mit 140 μ l 20%iger Trichloressigsäure für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Nachfolgend wurde der Ansatz 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde die Radioaktivität des Pellets und des abgenommenen wässrigen Überstandes mit dem Zählrohr (Series 900, UniEquip, Martinsried) gemessen und die prozentuale Verteilung des 32 P berechnet. Ab einer Markierungsrate von mindestens 70% (im Pellet) wurden die Ansätze weiter aufgearbeitet.

2.4.6.5 Reinigung der radioaktiv markierten DNA-Sonde

Eine S200 spin column HR (Fa. Amersham, Piscataway, USA) wurde leicht geöffnet und in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Nach kurzer Zentrifugation (1 min, 3000 rpm) wurde das Gefäß mit dem eluierten TE-Puffer verworfen und durch ein neues ersetzt. Auf die spin column wurde nun der verbliebene Sondenansatz (s. 2.4.6.3 und 2.4.6.4) aufgetragen und wiederum eine Minute bei 3000 rpm zentrifugiert. Die spin column wurde daraufhin verworfen und das Eluat im Reaktionsgefäß für 10 min bei 95°C denaturiert.

2.4.6.6 Hybridisierung der Membran mit der markierten Sonde

Die Hybridisierungslösung wurde wegen des enthaltenen SDS auf 65°C vorgewärmt und dann zu der DNA-tragenden Membran (s. 2.4.6.1) gegeben. Diese wurde in einem Hybridisierungssofen (OV 1, Fa. Biometra, Göttingen) unter Rotation eine Stunde bei 65°C vorhybridisiert. Danach wurde zu der Membran und der Hybridisierungslösung die denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde (s. 2.4.6.5) gegeben und für mindestens 12 h im Hybridisierungssofen unter Rotation bei 65°C die eigentliche Hybridisierung durchgeführt.

100x Denhardt-Lösung:

| | |
|-----------|------------------------|
| 2 % (w/v) | Ficoll 400 |
| 2 % (w/v) | Polyvinylpyrrolidin 40 |
| 2 % (w/v) | BSA |

Hybridisierungslösung:

| | |
|-------------|------------------|
| 6 x | SSC (s. 2.4.6.1) |
| 5 x | Denhardt-Lösung |
| 0,5 % (w/v) | SDS |

2.4.6.7 Waschen der Membran und Auswertung

Mit 2 Waschlösungen wurde eine Waschung steigender Stringenz durchgeführt. Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung abgenommen welche für eine weitere Verwendung bei -20°C gelagert werden konnte. Die markierte Membran wurde dann unter Rotation im Hybridisierungssofen bei 65°C zweimal für 30 min mit

jeweils frischer Waschlösung 1 gewaschen. Bei denselben Bedingungen wurde dann noch 10 min mit Waschlösung 2 gewaschen. Die jeweils vorangegangene Lösung wurde im flüssigen radioaktiven Abfall entsorgt. Die Membranen wurden feucht in Gefrierbeutel eingeschweißt und auf Bildspeicherfolien des Phosphoimagers (Molecular Dynamics, Krefeld) exponiert. Je nach Intensität der von den Membranen ausgehenden Radioaktivität konnte die Expositionsdauer von 5 h bis zu einer Woche reichen. Danach wurden die Folien mit dem Storm 860-Scanner (Molecular Dynamics, Krefeld) eingelesen und ein virtuelles Abbild der Signalverteilung durch das Programm Image Quant (Molecular Dynamics, Krefeld) berechnet.

Waschlösung 1 (niedrige Stringenz):

| | |
|-------------|------------------|
| 2 x | SSC (s. 2.4.6.1) |
| 0,1 % (w/v) | SDS |

Waschlösung 2 (hohe Stringenz):

| | |
|-------------|------------------|
| 0,2 x | SSC (s. 2.4.6.1) |
| 0,1 % (w/v) | SDS |

2.4.7 Herstellung von cDNA

2.4.7.1 Reverse Transkription

Bei einer Reversen Transkription (RT) wird RNA von einem retroviralen Enzym als Matrize für die Neusynthese von complementary DNA (cDNA) verwendet. Es werden also DNA-Kopien der enthaltenen RNAs erstellt. Für eine RT mit einem Endvolumen von 20 µl wurde zuerst nach 2.4.3.1 das Volumen RNA-Lösung bestimmt, das 2 µg RNA enthält. Zu diesem Volumen wurde 1 µl Oligo-dT (0,5 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) gegeben. Mit H₂O_{dd} wurde auf 13 µl aufgefüllt, die Mixtur für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5x First-Strand-Buffer und 2 µl DTT (0,1 M) wurde die Lösung bei 42°C für 2 min kurz erwärmt und dann mit 1 µl Reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen) die Reaktion gestartet, die für 50 min auf 42°C lief. Abgestoppt wurde diese Reaktion durch den Transfer auf 70°C und Inkubation auf dieser Temperatur

für 15 min. Die erhaltene cDNA konnte bei -20°C gelagert oder direkt für PCR verwendet werden.

2.4.7.2 RT-PCR

Die RT-PCR ermöglicht einen semi-quantitativen Vergleich der mRNA-Mengen bestimmter Gene in einer RNA-Präparation. Dafür wird cDNA (s. 2.4.7.1) in 2 getrennten PCR-Reaktionen eingesetzt, die im linearen Amplifikationsbereich ablaufen (≤ 30 Zyklen). Es werden *Primer* (Oligonukleotide, s. 2.14) eingesetzt, die in der einen Reaktion spezifisch für die cDNA von Interesse sind, in der anderen, zum Vergleich, spezifisch sind für eine cDNA eines Gens hoher konstitutiver Expression, welches in unserem Falle Actin (Actin 2: At3g18780) war. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel (s. 2.4.2) aufgetragen und anhand der Leuchtstärke der resultierenden Banden konnte auf die relative Häufigkeit der cDNAs (und damit der ursprünglichen mRNAs) geschlossen werden (s. 2.4.3.2).

2.5 Verwendete Vektoren und deren Herstellung

2.5.1 Verwendete Vektoren

Für TA-Klonierungen von PCR-Fragmenten und deren Proliferation in *E. coli* wurde der Vektor pGEMT-easy (Promega, Mannheim) eingesetzt. Für *blunt-end* Klonierungen wurde der Vektor TOPO-Blunt (Invitrogen) eingesetzt.

Für die Transformation von Agrobakterien und damit auch für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von Pflanzen wurde ein modifizierter pGreenII (Hellens et al. 2000) eingesetzt.

2.5.2 Modifizierung von pGreenII

Bevor der Vektor pGreenII sinnvoll eingesetzt werden konnte, mussten zuerst einige Veränderungen vorgenommen werden. So wurden einige Schnittstellen, die in der *multiple cloning site* (MCS) des Vektors vorhanden waren durch Schneiden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (s. 2.4.4.1), Auffüllen (s. 2.4.4.3) der überhängenden 5'-Enden und Ligation (s. 2.4.4.4) entfernt. Dies war der Fall für die KpnI, Sall, EcoRV, PstI, SmaI, BamHI, SpeI und XbaI-Schnittstellen in der MCS. Zwischen die

verbliebene EcoRI und die HindIII-Schnittstelle wurde der CaMV 35S-Promotor, die MCS und der Octopin-Synthetase-Terminator aus dem Vektor pBinAR-Hyg (Bevan 1984) kloniert. Die Resistenzgene nos-Kan (Kanamycin-Resistenz), nos-Hyg (Hygromycin-Resistenz), nos-Bar (BASTA-Resistenz) und nos-Sul (Sulfadiazin-Resistenz) zur Selektion transformierter Organismen wurden in die StuI-Schnittstelle des modifizierten pGreenII kloniert (Abb. 3).

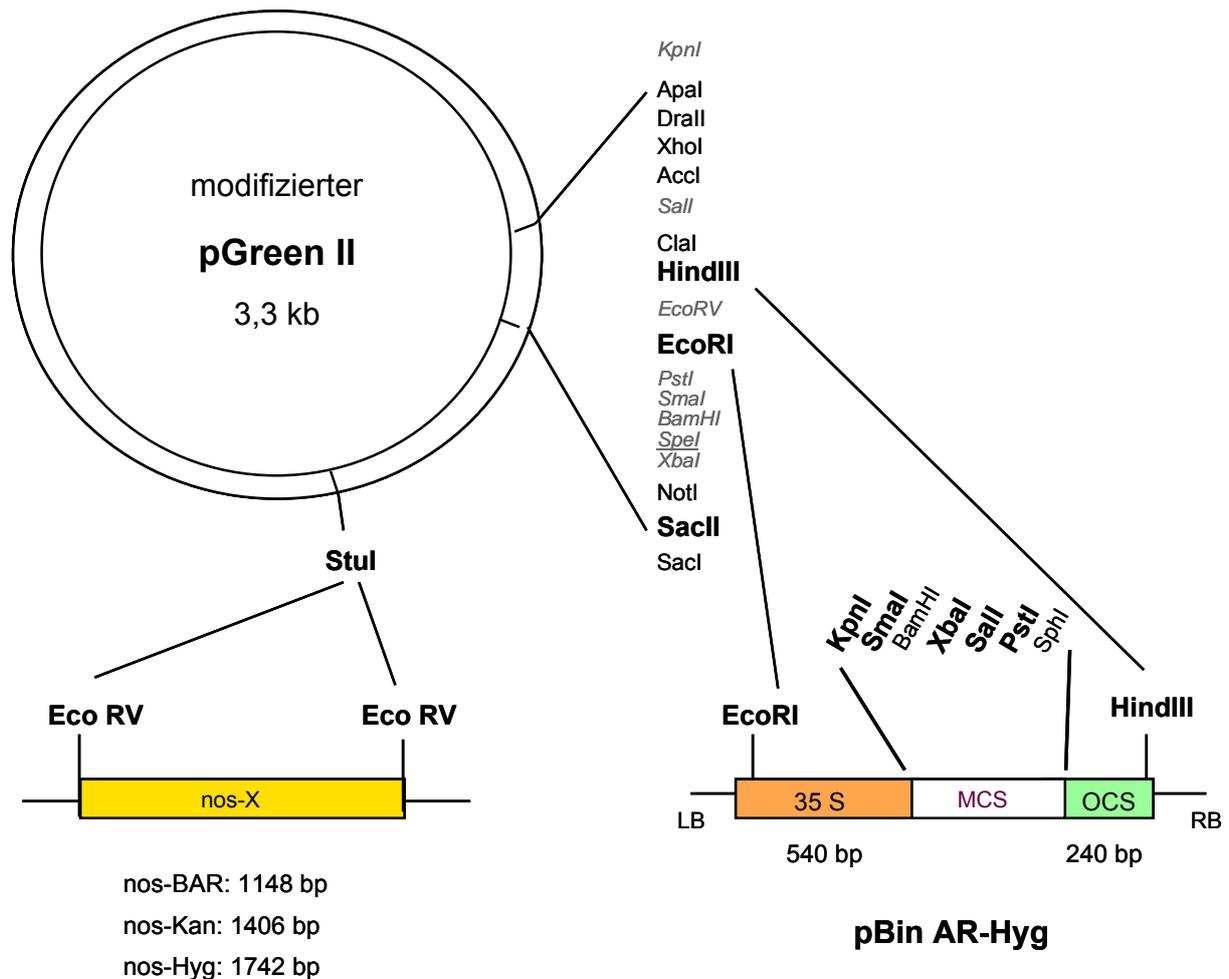


Abbildung 3: Erstellung des modifizierten pGreenII-Vektors.

Die kursiv geschriebenen Schnittstellen wurden entfernt, die fett geschriebenen zur Klonierung genutzt. Weitere Erklärungen siehe Text.

2.5.3 Klonierung der zu transformierenden Gene

Die Gene der bakteriellen Enzyme Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS, NP_415040) und Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR, NP_417594) wurden von genomischer *E. coli*-DNA über PCR (s. 2.14) amplifiziert und in den Vektor pGEMT-easy kloniert. Über RT-PCR (s. 2.4.7.2) wurden die Gene für die Glykolat-Oxidase (GO, At3g14420) aus *A. thaliana*-Blatt-cDNA, die Malat-Synthase (MS, X56948) aus

cDNA von Kürbiskeimblättern (*Cucurbita pepo*) und das NADP-Malat-Enzym (ME, J05130.1) aus cDNA von Maisblättern (*Zea mays*) amplifiziert und ebenfalls in den Vektor pGEMT-easy (GO & ME) oder den Vektor TOPO blunt (MS) kloniert. Im Fall der GO und der MS wurden jeweils die für die Aminosäuren (A/SRL) der vermuteten (Mori et al. 1991; Horng et al. 1995) peroxisomalen Sortierungssequenz kodierenden Basen bei der RT-PCR weggelassen. Das Gen für die Katalase (von Ossowski et al. 1991; Shikanai et al. 1998) wurde wiederum über PCR aus genomischer DNA von *E. coli* amplifiziert (KatE, M 55161) und in den Vektor TOPO-Blunt kloniert.

Um in den Zielpflanzen die exprimierten Proteine in die Chloroplasten zu leiten, wurden die stromalen Targetingsequenzen der *rbcS* (kleine RubisCO-Untereinheit) aus Sojabohnen (*Glycine max*), der *rbcS* aus Kürbis (*C. pepo*) und der Phosphoglucomutase von *A. thaliana* über PCR amplifiziert und vor die jeweiligen cDNAs (bei pflanzlicher Herkunft) bzw. genomischen DNAs (bei bakterieller Herkunft) kloniert. Die fertigen Konstrukte von GO, MS, TSR und Kat wurden dann mit KpnI und XbaI, ME mit SacII und XbaI und TSS mit Sall und PstI aus pGEMT-easy bzw. TOPO-Blunt ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des modifizierten (s. 2.5.2) pGreenII kloniert (Abb. 3).

Tabelle 1: Zusammenfassung der erstellten Konstrukte zur Transformation von *A. thaliana*

| Gen | Herkunft | Promotor | Selektionsmarker | Transitpeptid-Sequenz |
|------|--------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|
| GO | <i>A. thaliana</i> | CaMV 35S | Kanamycin | pgm (<i>A. thaliana</i>) |
| TSS | <i>E. coli</i> | CaMV 35S | Hygromycin | <i>rbcS</i> (<i>G. max</i>) |
| TSR | <i>E. coli</i> | CaMV 35S | BASTA | <i>rbcS</i> (<i>G. max</i>) |
| MS | <i>C. pepo</i> | rbS3C (<i>S. lycopersicum</i>) | Hygromycin | rbS3C (<i>S. lycopersicum</i>) |
| ME | <i>Z. mays</i> | CaMV 35S | BASTA | ME (<i>Z. mays</i>) |
| KatE | <i>E. coli</i> | rbS3C (<i>S. lycopersicum</i>) | Sulfadiazin | rbS3C (<i>S. lycopersicum</i>) |

2.6 Selektion transgener *A. thaliana*-Linien

2.6.1 Selektion

Die aus den nach 2.2.7 transformierten Blüten gewonnenen Samen (T_1 -Generation) wurden, je nach Selektionsmarker (2.5) auf Erde (2.2.2.3) oder auf Agarplatten (2.2.5) selektioniert und die überlebenden Pflanzen auf Erde pikiert. Jede dieser Pflanzen konstituierte eine neue transgene Pflanzenlinie. Die Samen dieser Pflanzen (T_2 -Generation) wurden einer zweiten Selektionsrunde unterworfen und die resultierenden Pflanzen wurden per PCR (s. 3.1.1) auf die Anwesenheit des Transgens von Interesse getestet. Außerdem wurden von diesen Pflanzen einzeln die Samen (T_3 -Generation) gesammelt und nur ein Teil dieser zur Mendelschen Bestimmung der homozygoten Insertion (bei 100% überlebenden Pflanzen) auf Anwesenheit des Resistenzgens selektioniert. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden nur Pflanzen verwendet, die die transgenen Insertionen homozygot integriert hatten.

2.6.2 Verwendete transgene Pflanzen

Die Pflanzen, die nur ein Transgen trugen (Glykolat-Oxidase (GO), Malat-Synthase (MS), NADP-Malat-Enzym (ME), Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS), Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR) und Katalase (Kat)) wurden durch Transformation von *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Cv. Columbia Pflanzen erstellt.

Die Strategien für die Erstellung doppelt, dreifach oder vierfach transgener Pflanzen können zusammengefasst nachstehender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 2: Liste der verschiedenen Pflanzenlinien und deren Herstellung

| Anzahl der Transgene | Name der Linie(n) | erhalten durch |
|----------------------|-------------------|------------------------|
| 1 | GO (alle) | Transformation mit GO |
| | MS (alle) | Transformation mit MS |
| | ME (alle) | Transformation mit ME |
| | TSS (alle) | Transformation mit TSS |
| | TSR (alle) | Transformation mit TSR |

| | Kat (alle) | Transformation mit Kat |
|---|--|--|
| 2 | GO-TSS 6, 21 GO-TSS 74, 93 GO-ME 25 & 60 TSS-TSR 16 TSS-TSR 18 GO5-MS 2 & 6 GO-MS (alle) | Kreuzung von GO 5 mit TSS 2 Kreuzung von GO 5 mit TSS 13 Kreuzung von GO 5 mit ME 5 Kreuzung von TSS 2 mit TSR 5 Kreuzung von TSS 13 mit TSR 5 Transformation von GO 5 mit MS Transformation von MS 4 mit GO |
| 3 | GO-MS-ME (GMM) -25 (alle) GO-MS-ME (GMM) -60 (alle) GO-TSS-TSR (GTT) -21 GO-TSS-TSR (GTT) -74 GO-MS-Kat (GMK) (alle) | Transformation von GO-ME 25 mit MS Transformation von GO-ME 60 mit MS Transformation von GO-TSS 21 mit TSR Transformation von GO-TSS 74 mit TSR Transformation von GO 5-MS 6 mit Kat |
| 4 | GO-MS-ME-Kat (GMMK) 60-4 (alle) GO-MS-ME-Kat (GMMK) 60-11 (alle) | Transformation von GMM 60-4 mit Kat Transformation von GMM 60-11 mit Kat |

Für die weiteren Kreuzungen bzw. Transformationen wurden die Linien ausgewählt, die nur eine Transgeninsertion auf genomischer Ebene aufwiesen und zudem eine hohe spezifische Aktivität des/der bereits eingebrachten transgenen Enzyme zeigten (s. Abschnitt 3).

2.7 Messungen grundlegender phänotypischer Charakteristika an *A. thaliana*-Pflanzen

2.7.1 Frisch- und Trockengewicht (FG&TG)

Das Frischgewicht wurde bestimmt, indem die komplette Blattrosette einer Pflanze abgeschnitten und gewogen wurde. Nachdem diese Rosette(n) daraufhin mindestens 2 Tage in einem offenen Gefäß bei 60°C getrocknet wurden, konnte auch deren Trockengewicht bestimmt werden.

2.7.2 Rosettendurchmesser

Für die Bestimmung des durchschnittlichen Rosettendurchmessers wurde der jeweils größte zu messende Rosettendurchmesser der einzelnen Pflanzen aufgenommen.

2.7.3 Blattanzahl

Es wurden alle sichtbaren Blätter einer Blattrosette gezählt.

2.7.4 Oberfläche der Rosette

Für die Oberflächenbestimmung einer Blattrosette wurde diese auf Klarsichtfolie gelegt, die Blätter gespreizt und dann deren Umrisse auf die Folie gezeichnet. Diese Folie wurde dann am Computer eingescannt und die Flächeninhalte der Blattrosetten wurden mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA) berechnet.

2.8 Photosynthesemessungen

2.8.1 Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie (PAM)

Dynamische Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz wurden mit einem Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer (PAM-2000, Walz, Effeltrich) gemessen. Grundlegende Größen wie variable Fluoreszenz (F_v), Fluoreszenz im Fließgleichgewicht (F_t), maximale Fluoreszenz lichtadaptierter Blätter (F_m'), Grundfluoreszenz dunkeladaptierter Blätter (F_0) und maximale Fluoreszenz dunkeladaptierter Blättern (F_m) wurden wie beschrieben (Schreiber et al. 1986) während der Experimente alle 10 bis 30 s ermittelt. Die aus den Messwerten abgeleiteten Parameter der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung (q_N), photochemischen Fluoreszenzlöschung (q_P) und das F_v/F_m -Verhältnis wurden ebenfalls wie beschrieben (Schreiber et al. 1986) berechnet. Die Rate des photosynthetischen Elektronentransports wurde nach Genty (Genty et al. 1989) berechnet. Vor der Bestimmung von F_0 und F_m und dem folgenden Start der Lichtreihe wurden die Pflanzen 10 min dunkeladaptiert. Die Inkubationszeit bei jeder gegebenen Lichtintensität betrug während der Lichtreihe 8-10 Minuten.

2.8.2 Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in Blattrosetten

Zur Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses wurden zuerst abgeschnittene Blattrosetten von *A. thaliana* Pflanzen aus den angegebenen Wachstumsbedingungen auf 60°C für zwei Tage getrocknet. Das Kohlenstoffisotopenverhältnis des getrockneten Pflanzenmaterials wurde dann in Zusammenarbeit mit S. Madhavan vom Department of Biochemistry, Beadle Center, University of Nebraska, Lincoln (Nebraska, USA) nach der Methode von Madhavan et al. 1991 bestimmt.

2.9 Proteinbiochemie

2.9.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Konzentration von Proteinen in Lösungen zu bestimmen, wurde eine Methode verwandt, die bereits von Bradford (1976) vorgeschlagen wurde. Das Prinzip der hier zugrunde liegenden Farbreaktion ist, dass das in der Rotiquant-Lösung enthaltene Coomassie Brilliant Blue G250 bei der Bindung an vorwiegend basische Aminosäuren von dem kationischen in den anionischen Zustand übergeht. Im kationischen Zustand absorbiert es Licht maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda=470$ nm und im anionischen bei $\lambda=595$ nm.

Reaktionsansatz für Eichgerade:

| | |
|-----------------------|---|
| 10-200 μl | 0,1 mg/ml BSA (bovine serum albumine) |
| 5 μl | Extraktionspuffer der zu messenden Proteinprobe |
| 200 μl | Rotiquant |
| ad 1000 μl | mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ |

Reaktionsansatz für Proben:

| | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| 5 μl | Proteinprobe |
| 200 μl | Rotiquant |
| ad 1000 μl | mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ |

Die Ansätze wurden wie angegeben zusammengemischt und deren Absorptionen A_{450} und A_{590} nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min bis maximal 1 h bei Raumtemperatur in einem Photometer (Novospec II, Pharmacia, Karlsruhe) bestimmt. Als Nullwert diente die Absorption einer leeren Küvette bei $\lambda=590\text{nm}$. Der Quotient A_{590}/A_{450} ist hier das Maß für die Proteinkonzentration, wobei die BSA-Eichgerade von 0-10 $\mu\text{g/ml}$ linear war und einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 \geq 0,958$ aufwies.

2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Minigel Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) hergestellt. Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED gestartet. Bei der Elektrophorese waren die Kathoden- und Anodenpuffertanks voneinander getrennt und durch die Gele miteinander verbunden. Die mit Probenpuffer 1:1 versetzten Proben und der Molekulargewichtsmarker (SM0441 Prestained Marker, MBI Fermentas) wurden aufgetragen, 10 min bei 10 mA einlaufen gelassen, 2 min bei 40 mA fokussiert und bis die Proteinfront das Ende des Trenngels erreicht hatte bei 25 mA aufgetrennt.

Sammelgelpuffer:

| | |
|------------|-------------------|
| 500 mM | Tris / HCl pH 6,8 |
| 0,4% (w/v) | SDS |

Trenngelpuffer:

| | |
|------------|-------------------|
| 1,5 M | Tris / HCl pH 8,8 |
| 0,4% (w/v) | SDS |

Sammelgel:

| | |
|-------------|--|
| 25% (v/v) | Sammelgelpuffer |
| 15% (w/v) | Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) |
| 0,06% (w/v) | APS |
| 0,3% (v/v) | TEMED |

Trenngel (12,5%ig):

| | |
|-----------|----------------|
| 25% (v/v) | Trenngelpuffer |
|-----------|----------------|

| | |
|-------------|--|
| 42% (w/v) | Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) |
| 0,05% (w/v) | APS |
| 0,05% (v/v) | TEMED |

Elektrodenpuffer:

| | |
|------------|--------|
| 250 mM | Tris |
| 192 mM | Glycin |
| 0,5% (w/v) | SDS |

2x Probenpuffer:

| | |
|---------------|-------------------|
| 125 mM | Tris / HCl pH 6,8 |
| 20% (w/v) | Glycerin |
| 5% (w/v) | SDS |
| 5% (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| 0,0025% (w/v) | Bromphenolblau |

2.9.3 Proteingelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die Proteinfärbung erfolgte nach Weber und Osborn (1969). Dazu wurden die Färbelösungen I und II zu gleichen Teilen gemischt und die PAGE-Gele darin mindestens 30 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Die Gele wurden dann in Entfärber überführt und bis zur Entfärbung des Gelhintergrundes unter Wechseln der Lösung entfärbt. Bei Bedarf wurde das Ergebnis sofort fotografisch dokumentiert.

Färbelösung I:

| | |
|------------|---|
| 0,5% (w/v) | Coomassie Brilliant Blue (Serva-Blue G250, Serva) |
|------------|---|

Färbelösung II:

| | |
|-----------|------------|
| 20% (v/v) | Essigsäure |
|-----------|------------|

Entfärbelösung:

| | |
|-----------|------------|
| 10% (v/v) | Essigsäure |
| 40% (v/v) | Methanol |

2.9.4 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Fa. BioRad) wurde mit einer Transfer-Kammer (Carboglass, Schleicher&Schuell) im *semi-dry-blot*-Verfahren nach Khyse-Andersen (1984) durchgeführt. Der Aufbau der

Apparatur und die Vorbereitung der Lösungen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers der verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer (RotiBlot-System, Roth, Karlsruhe). Vor dem Aufbau des Systems wurde die PVDF-Membran 10 s in Methanol aktiviert. Der Elektrotransfer dauerte 60-120 min bei $1\text{mA} \times \text{cm}^{-2}$ Gelfläche. Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Membran zügig in Blockierpuffer überführt und mindestens eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur mit Proteinen aus der Milchlösung abgesättigt. Der primäre, gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtete Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:3000 in den Blockierungspuffer gegeben und 1-3 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal für 10 min mit TBST-T und einmal 10 min mit TBS gewaschen und anschließend der sekundäre, mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper einer 1:3000-Verdünnung in Blockierpuffer appliziert. Nach einer ein- bis zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran wie nach Entfernen der primären Antikörperlösung gewaschen und schließlich solange in Färbelösung geschwenkt, bis Banden des blau gefärbten, unlöslichen Niederschlags aus NBT- und BCIP-Addukten sichtbar waren. Die Membran wurde dann kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ überführt, an der Luft getrocknet und zur besseren Konservierung in Folie eingeschweißt. Die Antikörperlösungen konnten bei -20°C eingefroren und mehrfach wieder verwendet werden.

Puffer A:

| | |
|--------|-------------------|
| 100 mM | Tris / HCl pH 9,5 |
| 100 mM | NaCl |
| 5 mM | MgCl ₂ |

10x TBS:

| | |
|--------|-------------------|
| 100 mM | Tris / HCl pH 7,4 |
| 1,5 M | NaCl |

TBST-T:

| | |
|-------------|--------------|
| 10% (v/v) | 10x TBS |
| 0,2% (v/v) | Triton X-100 |
| 0.05% (v/v) | Tween 20 |

Färbelösung:

| | |
|-------|------------------------|
| 10 ml | Puffer A |
| 33 µl | BCIP (5% (w/v) in DMF) |

| | | |
|------------------------|----------|--------------------------------------|
| | 66 µl | NBT (5% (w/v) in 70% DMF) |
| <u>Blockierlösung:</u> | | |
| | 4% (w/v) | Magermilchpulver (Heirler) in 1x TBS |

2.9.5 Native PAGE

Für den qualitativen Nachweis von Enzymaktivitäten in Proteinextrakten, wurden native, d.h. nicht denaturierende Proteingele (native PAGE) verwendet (Gerrard-Wheeler et al. 2005). Die Vorgehensweise und die Puffer sind dabei wie in 2.9.2 beschrieben, allerdings wird das SDS nicht zu den aufgeführten Puffern zugegeben. Zusätzlich wurden die Gele bei 10°C gefahren, damit die vorhandenen Enzymaktivitäten nicht beeinträchtigt werden.

2.9.6 Färbung für NADP-Malat-Enzym (NADP-ME)-Aktivität in nativen Gelen

Die NADP-Malat-Enzym-Aktivität (NADP-ME) ließ sich in einem nativen Gel (2.9.5) nachweisen, indem das Gel in der Färbelösung bei 30°C inkubiert wurde. Die im Gel vorhandene Aktivität setzt dabei das Malat in Pyruvat unter Reduktion von NADPH zu NADP um (s. 2.10.4). Das in der Lösung enthaltene Phenazinmethosulfat oxidiert wiederum das NADPH und gibt die Elektronen an Nitroblau-Tetrazolium weiter, das dann gut sichtbar als blaues Präzipitat ausfällt.

Färbelösung für NADP-ME:

| | |
|------------|-----------------------|
| 50 mM | Tris / HCl pH 7,5 |
| 10 mM | L-Malat |
| 10 mM | MgCl ₂ |
| 0,5 mM | NADP |
| 35 mg/ml | Nitroblau-Tetrazolium |
| 0,85 mg/ml | Phenazinmethosulfat |

2.9.7 Färbung für SOD-Aktivität

Der Nachweis von SOD-Aktivitäten in Proteinextrakten wurde wie bereits beschrieben (Gupta et al. 1993) durchgeführt. Gefrorenes Blattmaterial (100 mg, s.

2.2.8) wurde mit 300 µl Extraktionspuffer versetzt, gevortext und bei 4°C und 20000 rpm 20 min zentrifugiert. Die Proteinextrakte (15-30 µg pro Probe) wurden dann auf ein natives Gel (s. 2.9.5, 12%iges Trenn-, 5%iges Sammelgel) geladen, das zuvor bereits eine halbe Stunde nur mit 1x Davis-Puffer bei 15 mA bei 4°C gelaufen war. Das mit Proben geladene Gel wurde dann bei 15 mA bei 4°C gefahren. Anschließend wurde das Gel 10 min mit 25 mM Tris-HCl pH 8 gewaschen und dann für 15 min in Dunkelheit mit der Färbelösung entwickelt.

Extraktionspuffer:

| | |
|-------|--|
| 50 mM | KH ₂ PO ₄ pH 7,5 |
| 50 mM | NaCl |
| 1 mM | EDTA |
| 1 mM | Ascorbat |
| 1 mM | PMSF |

1x Davis-Puffer:

| | |
|--------------|----------|
| 0,302% (w/v) | Tris |
| 1,44% (w/v) | Glycin |
| 2 mM | Ascorbat |

Färbelösung:

| | |
|------------|-------------------------|
| 50 mM | Tris-HCl pH 8 |
| 10 mM | EDTA |
| 0,2% (v/v) | TEMED |
| 0,3% (v/v) | 50 mg/ml NBT in 70% DMF |
| 120 µM | Riboflavin |

2.10 Messungen von Enzymaktivitäten in Blattextrakten von *A. thaliana*

2.10.1 Allgemeines zu Enzymmessungen

Die Enzymmessungen in dieser Arbeit wurden mit Extrakten löslicher Proteine aus Blättern durchgeführt, wobei je nach Gewicht zwischen 200 und 500 µl Extraktionsmedium je Probe verwandt wurden. Dabei wurde ein ungefähres Verhältnis von 10 µl Medium je mg Blattmaterial angestrebt.

Die auf -80°C gelagerten und gemörserten Proben wurden in flüssigem N_2 zum Arbeitsplatz gebracht, dort mit kaltem Extraktionspuffer unter vortexen extrahiert und dann bei 14000 rpm und 4°C fünf Minuten abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die eigentlichen Messungen wurden hauptsächlich in einem Multiplatten-Photometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) in Multiplatten (Elisa-Platte Microton, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit einem jeweiligen Volumen von 200 μl durchgeführt. Die Ansteuerung des Geräts, wie auch die nachfolgende Auswertung wurde mit der Software EasyWinKinetics 32bit (Fa. TEKAN, Crailsheim) getätigt. Einzig die Katalase-Messung (2.10.6) wurde in Quarzglasküvetten mit einem Volumen von 1000 μl in einem UV/Vis-Photometer durchgeführt.

Für die 200 μl -Reaktionen wurden 5 oder 10 μl und für die 1000 μl -Reaktionen 50 μl Proteinextrakt eingesetzt, wobei das notwendige Substrat immer am Schluss, und, im Falle der Multiplatten, durch eine Mehrkanalpipette nahezu simultan zugesetzt wurde. Als Kontrolle dienten Reaktionsansätze ohne zugegebenen Proteinextrakt, deren Absorptionsänderungen von denen der Proben abgezogen wurden. Alle Reaktionen fanden bei 25°C statt.

Nach den eigentlichen Enzymmessungen wurde mit einem Aliquot der Extrakte eine Proteinbestimmung (s. 2.9.1) zur Berechnung der spezifischen Aktivität durchgeführt.

2.10.2 Glykolat-Oxidase (GO)

Die Glykolat-Oxidase (GO) katalysiert die Umwandlung von zwei Mol Glykolat zu zwei Mol Glyoxylat unter gleichzeitiger Reduktion von einem Mol O_2 zu einem Mol H_2O_2 .

Die Bestimmung der GO-Aktivität in Blattextrakten hat einen ähnlichen chemischen Hintergrund wie die Glyoxylat-Bestimmung (s. 2.11.2). Zugegebenes Glykolat wird von der GO zu Glyoxylat umgesetzt, welches mit dem im Ansatz enthaltenen Phenylhydrazin Glyoxylat-Phenylhydrazon bildet, das UV-Strahlung maximal bei $\lambda=324\text{ nm}$ absorbiert (Baker und Tolbert 1966).

Die Messung wurde modifiziert nach Yamaguchi und Nishimura (2000) durchgeführt und die Zunahme der Absorption der Lösung bei $\lambda=320\text{ nm}$ verfolgt

GO-Extraktionspuffer:

| | |
|--------|--------------------|
| 100 mM | HEPES / KOH pH 7,2 |
| 1 mM | EDTA |
| 10 mM | β-Mercaptoethanol |

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 µl):

| | |
|---------|------------------------------------|
| 100 mM | Triethanolamin pH 7,8 |
| 3 mM | EDTA |
| 4 mM | Phenylhydrazin |
| 0,75 mM | oxidiertes Glutathion |
| 2,3 mM | Na-Glykolat (→ Start der Reaktion) |

2.10.3 Malat-Synthase (MS)

Die Malat-Synthase (MS) kondensiert ein Mol Acetyl-CoA und ein Mol Glyoxylat zu einem Mol Malat unter Freisetzung von einem Mol CoA(-SH).

Der Nachweis der MS-Aktivität wird über eine Reaktion des im Ansatz enthaltenen DTNB erreicht. Das DTNB reagiert mit den Sulfhydryl-Gruppen des CoASH, welches bei der Reaktion freigesetzt wird und dies bewirkt eine Färbung, die über eine Absorptionsänderung bei $\lambda=410\text{nm}$ verfolgt werden kann. In diesem Fall wurde die Reaktion durch die nahezu simultane Gabe von Glyoxylat zu den Reaktionsansätzen gestartet.

MS-Extraktionspuffer:

| | |
|-------|-------------------|
| 50 mM | Tris / HCl pH 8 |
| 1 mM | MgCl ₂ |

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 µl):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 50 mM | Tris / HCl pH 8 |
| 5 mM | MgCl ₂ |
| 3 mM | Acetyl-CoA |
| 1,6 mM | DTNB (Ellmanns Reagenz) |
| 4 mM | Glyoxylat (→ Start der Reaktion) |

2.10.4 NADP-Malat-Enzym (NADP-ME)

Das NADP-Malat-Enzym katalysiert die Decarboxylierung von einem Mol Malat unter gleichzeitiger Oxidation dieses zu einem Mol Pyruvat. Unter Reduktion von einem Mol NADP⁺ zu einem Mol NADPH wird dabei 1 Mol CO₂ freigesetzt.

Die Reaktion kann durch die Änderung der Absorption bei $\lambda=340$ nm verfolgt werden, die durch die Entstehung des NADPH verursacht wird. Die Messung wurde durch die Zugabe von Malat gestartet.

ME-Extraktionspuffer:

| | |
|------------|--------------------------|
| 50 mM | Tris / HCl pH 8 |
| 5 mM | MgCl ₂ |
| 2 mM | EDTA |
| 10% (v/v) | Glyzerin |
| 0,1% (v/v) | Triton X-100 |
| 10 mM | β -Mercaptoethanol |

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 μ l):

| | |
|--------|---|
| 50 mM | Tris / HCl pH 8 |
| 20 mM | MgCl ₂ |
| 0,8 mM | NADP |
| 5 mM | L-Malat (\rightarrow Start der Reaktion) |

2.10.5 Kombinierte Messung von Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS) und Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR)

Die Aktivität der beiden Enzyme Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS) und Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR) wurde in einem gekoppelten Ansatz bestimmt. Bei dieser Reaktionsfolge werden von der TSS zwei Mol Glyoxylat unter Freisetzung von einem Mol CO₂ zu einem Mol Tartronat-Semialdehyd kondensiert. Dieses wird dann von der TSR zu Glyzerat reduziert, wobei ein Mol NADH zu NAD⁺ oxidiert wird, was in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden kann.

Die Messung fand in einer Multiplatte statt und wurde durch die Zugabe von Glyoxylat gestartet.

TSS / TSR-Extraktionspuffer:

| | |
|-------|-------------------|
| 50 mM | Tris / HCl pH 7,3 |
| 10 mM | β-Mercaptoethanol |

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 µl):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 100 mM | KH ₂ PO ₄ |
| 5 mM | MgCl ₂ |
| 5 mM | TPP |
| 0,28 | NADH |
| 6 mM | Glyoxylat (→ Start der Reaktion) |

2.10.6 Katalase (Kat)

Die Katalase katalysiert die Disproportionierung von zwei Mol H₂O₂ zu zwei Mol H₂O und einem Mol O₂. Da H₂O₂ UV-Licht bei λ=240 nm maximal absorbiert, konnte die Reaktion in einem UV/Vis-Photometer (LKB, Biochrom, UK) mit angeschlossenem Plotter (Fa. Linseis) verfolgt werden. Die Reaktion fand hier in einem Endvolumen von 1000 µl in einer Quarzglasküvette statt und wurde durch die Zugabe von H₂O₂ gestartet.

Kat-Extraktionspuffer:

| | |
|------------|--------------------------------------|
| 50 mM | KH ₂ PO ₄ pH 7 |
| 1% (w/v) | PVP-40 |
| 0,1% (v/v) | Triton X-100 |

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 1000 µl):

| | |
|-------|--|
| 50 mM | KH ₂ PO ₄ pH 7 |
| 10 mM | H ₂ O ₂ (→ Start der Reaktion) |

2.10.7 Pyruvatkinase (PK)

Die Pyruvatkinase (PK) katalysiert die Dephosphorylierung von einem Mol PEP zu einem Mol Pyruvat, wobei das Phosphat benutzt wird, um ein Mol ADP zu ATP umzuwandeln (Substratkettenphosphorylierung). Zum Nachweis der PK-Aktivität (Knowles et al. 1998) wird dem Ansatz noch Lactat-Dehydrogenase zugesetzt, die das entstandene Pyruvat zu Lactat reduziert. Bei dieser Reaktion wird NADH zu NAD⁺ oxidiert, was durch eine Messung in der Absorptionsänderung bei λ=340nm

verfolgt werden kann. Die PK kommt in *A. thaliana* sowohl in einer cytosolischen als auch in einer plastidären Isoform vor. Um diese beiden Isoformen getrennt messen zu können, müssen die Reaktionsansätze auf das pH-Optimum der jeweiligen Isoform eingestellt werden. Die Messung fand in Multiplatten (2.10.1) statt und wurde durch die Zugabe von PEP gestartet.

PK-Extraktionspuffer:

| | |
|------------|---------------------|
| 50 mM | HEPES / NaOH pH 7,5 |
| 2 mM | DTT |
| 5 mM | MgCl ₂ |
| 1 mM | EDTA |
| 0,1% (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| 0,5% (v/v) | Triton X-100 |
| 10% (v/v) | Glyzerin |

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 µl):

| | | |
|-------------|--|--|
| 50 mM | HEPES / NaOH | a) pH 6,9 für cytosolische Isoform b) pH 8,1 für plastidäre Isoform |
| 2 mM | ADP | |
| 50 mM | KCl | |
| 10 mM | MgCl ₂ | |
| 0,02% (w/v) | BSA | |
| 2 mM | DTT | |
| 2 U | Lactat-Dehydrogenase (Roche, Mannheim) | |
| 2 mM | PEP (→ Start der Reaktion) | |

2.10.8 Phosphoglyzeratkinase (PGK)

Die Phosphoglyzeratkinase (PGK) katalysiert die Phosphorylierung von einem Mol Glyzerat-3-Phosphat zu einem Mol 1,3-Bisphosphoglyzerat unter Dephosphorylierung von einem Mol ATP zu ADP. Zum Nachweis der PGK-Reaktion (Burrell et al. 1994) wurde Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase zugesetzt, die das entstandene 1,3-Bisphosphoglyzerat zu Glyzerinaldehyd-3-Phosphat umsetzt und dabei NADH zu NAD⁺ oxidiert, was als Absorptionsänderung bei λ=340nm verfolgt werden kann. Die Messung fand in Multiplatten (2.10.1) statt und wurde durch die Zugabe von ATP gestartet.

PGK-Extraktionspuffer:

| | |
|------------|---------------------|
| 50 mM | HEPES / NaOH pH 7,5 |
| 2 mM | DTT |
| 5 mM | MgCl ₂ |
| 1 mM | EDTA |
| 0,1% (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| 0,5% (v/v) | Triton X-100 |
| 10% (v/v) | Glyzerin |

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 µl):

| | |
|--------|--|
| 100 mM | HEPES / NaOH pH 7,6 |
| 1 mM | EDTA |
| 2 mM | MgSO ₄ |
| 0,2 mM | NADH |
| 6,5 mM | Glyzerat-3-Phosphat |
| 3,3 U | Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| 1 mM | ATP (→ Start der Reaktion) |

2.10.9 Isolation von Chloroplasten aus Blattmaterial

Als Nachweis der korrekten Lokalisierung der transgen eingebrachten Enzyme sollten Chloroplasten aus *A. thaliana*-Blattmaterial präpariert werden, um mit diesen Enzymaktivitätsmessungen vorzunehmen. Bei der Isolation wurde vorgegangen, wie bereits beschrieben (Kebeish et al. 2007). Intakte Chloroplasten wurden präpariert, indem ca. 5 g gefrorenes Blattmaterial (s. 2.2.8) in 50 ml Extraktionspuffer gemörsert wurden. Nach einer Filtration durch drei Lagen Miracloth wurde die Lösung bei 1000g für 10 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml SH-Puffer aufgenommen und davon wurden 0,5 ml auf 1 ml eines 35%igen Percollgradienten (35% Percoll, 65% SH-Puffer) geladen. Dieser Gradient wurde für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und das Chloroplastenpellet mit 1 ml SH-Puffer gewaschen. Die Proteine konnten nun mit den bei den Enzymmessungen angegebenen Extraktionspuffern extrahiert und gemessen werden.

Extraktionspuffer:

| | |
|-------|--------------------|
| 50 mM | HEPES / KOH pH 7,5 |
|-------|--------------------|

| | |
|-------------|---------------------|
| 1 mM | EDTA |
| 1 mM | MgCl ₂ |
| 0,1% (w/v) | BSA |
| 0,02% (w/v) | Na-ascorbat |
| 300 mM | Mannitol |
| 0,5% (w/v) | Polyvinylpyrrolidon |

SH-Puffer:

| | |
|--------|--------------------|
| 50 mM | HEPES / KOH pH 7,5 |
| 333 mM | Mannitol |

2.11 Messung der Gehalte physiologisch interessanter Substanzen in Blattextrakten von *A. thaliana*

2.11.1 Chlorophylle und Carotinoide

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Blättern (Graan und Ort 1984) wurde gefrorenes Material (50-100 mg, s. 2.2.8) mit 1 ml Extraktionsmedium versetzt. Anschließend wurden die Proben 10 min im Dunkeln auf Eis inkubiert, um Chlorophyllverlusten durch Photooxidation vorzubeugen. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) wurden die Überstände der Proben 1:3 mit Extraktionsmedium verdünnt und jeweils 1 ml in Plastikküvetten (Fa. Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag) überführt. Im Photometer (Novospec II, Pharmacia, Karlsruhe) wurden dann die Absorptionen bei den Wellenlängen 480, 645, 647, 652, 663 und 664 nm bestimmt, wobei jeweils eine Küvette mit Extraktionsmedium als Nullwert diente.

Die Berechnung der Chlorophyll- und Carotinoidgehalte erfolgte mit folgenden Formeln:

$$\begin{aligned}
 \text{Chlorophyll a [g/mg FG]} &= 13,19 A_{664} - 2,57 A_{647} \\
 \text{Chlorophyll b [g/mg FG]} &= 22,1 A_{647} - 5,26 A_{664} \\
 \text{Chlorophyll a+b [g/mg FG]} &= 7,93 A_{664} + 19,53 A_{647} \\
 \text{Carotinoide [g/mg FG]} &= 0,08 (A_{480} + 0,144 A_{663} - 0,638 A_{645})
 \end{aligned}$$

2.11.2 Glyoxylat

Die Bestimmung des Glyoxylat-Gehaltes erfolgte modifiziert nach Häusler et. al, 1996:

Die gefrorenen Proben (30-100 mg, s. 2.2.8) wurden nach Zugabe von 10 µl Extraktionspuffer pro mg Blattmaterial gevortext. Anschließend wurden sie 5 min bei 80°C inkubiert und dann 10 min auf Eis stehen gelassen.

Nach kurzer Zentrifugation (2 min, 10000 x g) wurden 200 µl des Überstandes abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Dazu wurden 750 µl 18,5% HCl und 50 µl 4% (w/v) $K_3Fe[(CN)_6]$ gegeben und erneut zentrifugiert (2 min, 10000 x g). Der Überstand wurde in Küvetten (Fa. Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag) überführt und die Absorption bei 520 nm gemessen. Die Messung der Absorption bei $\lambda=520$ nm erfolgte dabei exakt 8 min nach Zugabe von $K_3Fe[(CN)_6]$. Als Nullwert diente für jede gemessene Pflanzenlinie eine Probe ohne Zugabe von $K_3Fe[(CN)_6]$.

Für die Quantifizierung der gemessenen Werte wurde eine Eichreihe konstruiert, die über einen Bereich von 0-50 µM Glyoxylat linear war und üblicherweise einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 \geq 0,9998$ aufwies. Für diese Eichgerade wurde das eingewogene Glyoxylat in Extraktionspuffer gelöst und durchlief das gesamte Versuchsprotokoll mit Ausnahme der Zentrifugationsschritte. Als Nullwert diente hierbei eine Probe ohne enthaltenes Glyoxylat.

Das Prinzip der hier stattfindenden Reaktionen, die schließlich in einer für das enthaltene Glyoxylat spezifischen Farbreaktion münden ist folgendes (Beyer und Walter 1998):

Carbonylgruppen, wie sie im Glyoxylat und in Zuckern des Rohextraktes vorkommen reagieren mit dem enthaltenen Phenylhydrazin unter Bildung von Phenylhydrazonen. Im Gegensatz zum Glyoxylatphenylhydrazon reagieren die Zuckerphenylhydrazone in schwach saurer Lösung (hier 100 mM HCl) mit überschüssigem Phenylhydrazin weiter zu in Wasser schwer löslichen Osazonen und können somit leicht abzentrifugiert werden. Das Eisen des danach zugegebenen $K_3Fe[(CN)_6]$ wird von dem Glyoxylatphenylhydrazon von Fe^{+III} zu Fe^{+II} reduziert, was in einer rötlichen Färbung sichtbar wird.

Extraktionspuffer:

100 mM HCl

0,1% (w/v) Phenylhydrazin

2.11.3 H₂O₂

Die Messung von H₂O₂ in Blattextrakten erfolgte modifiziert nach Okuda et al., 1991: Die gefrorenen Proben (30-100 mg, s. 2.2.8) wurden unter Zugabe von 10 µl pro mg FG 0,2 M HClO₄ homogenisiert und auf Eis gestellt. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min, 20000 x g, 4°C) wurden 300µl des Überstands in ein neues Gefäß transferiert und mit 4 M KOH auf pH 7-7,5 gebracht und erneut zentrifugiert (1 min, 1000 x g). 200 µl dieses Überstandes wurden dann auf eine 1,2 ml Anionenaustauscher-Säule (AG1-x8, 200-400 mesh, Chloridform, 0,8 x 4 cm, Bio-Rad, Hercules (USA)) aufgetragen und mit 2 x 800 µl H₂O_{dd} in ein neues Gefäß eluiert, wobei das H₂O₂ mit der zweiten Fraktion eluierte. 500 µl des Eluats wurden dann für eine Farbreaktion zum Nachweis von H₂O₂ verwendet. Diese wurde in Küvetten überführt und 8 Minuten nach Reaktionsstart durch Peroxidasezugabe wurde die Absorption bei λ=590 nm gemessen.

Die H₂O₂-Eichreihe durchlief hier nicht das ganze Protokoll, sondern wurde direkt für die Farbreaktion verwendet. Als Nullwert diente sowohl für die Eichreihe als auch für die Proben der A₅₉₀-Wert der Messlösung ohne zugegebenes H₂O₂. Die Eichreihe war über einen Bereich von 0-20 nmol H₂O₂ linear und wies Korrelationskoeffizienten von R² ≥ 0,98 auf.

Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus (Ngo und Lenhoff 1980) für die Farbreaktion ist, dass das Hydrazon des MBTH in Gegenwart von H₂O₂ von der Peroxidase zu einem Elektrophil oxidiert wird, das mit DMAB zu dem Indaminfarbstoff reagiert, der Licht bei einer Wellenlänge von λ=590 nm absorbiert.

Farbreaktion:

| | |
|--------|---|
| 500 µl | Eluat oder H ₂ O ₂ -Lösung für die Eichgerade |
| 200 µl | 12,5 mM DMAB in 0,375 M Phosphat-Puffer pH 6,5 |
| 40 µl | 0,05% (w/v) MBTH |
| 10 µl | 12,5 U/ml Peroxidase (Sigma, Taufkirchen) |

2.11.4 Lösliche Zucker und Stärke

Für die Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker und Stärke in Blattextrakten wurden gefrorene Proben (50-100 mg, s. 2.2.8) zur Extraktion löslicher Zucker mit 750 µl 80% Ethanol versetzt, gevortext und 15 min auf 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Zu dem Pellet wurde ein zweites Mal 750 µl 80% Ethanol gegeben, gevortext und wiederum 15 min auf 80°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurden die Überstände der ersten und zweiten Extraktion vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen) zur Trockne eingengt.

Das resultierende, ausgebleichte Pellet, das noch die Stärke enthielt, wurde, versetzt mit 200 µl 0,2 N KOH, 45 min bei 95°C erhitzt. Bei diesem Schritt ging die in der Probe enthaltene Stärke in Lösung. Die erhitzten Proben wurden kurz auf Eis abgekühlt und dann mit 1 M Essigsäure auf pH 5-6 gebracht. 3,5 U α-Amylase und 2,5 U Amyloglukosidase in 40 µl 0,1 M NaAc pH 4,6 wurden zur enzymatischen Hydrolyse der Stärke hinzupipettiert und die Ansätze über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die eingengten ethanolischen Extrakte wurden in 500 µl H₂O_{dd} mit einem Rührspatel resuspendiert und anschließend bei 14000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Enzyme in den Stärkeextrakten wurden für 10 min auf 95°C desaktiviert, woran sich ebenfalls eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 Minuten anschloss.

Die eigentliche Bestimmung der Zucker- und Stärkekonzentrationen fand in einer Multiplatte (s. 2.10.1) in einem Endvolumen von 200 µl statt. Von den Stärkeextrakten wurden 5 µl und von den Zuckerextrakten 50 µl zur Messung eingesetzt. Es wurde ein gekoppelt-enzymatischer Test (Bergmeyer 1970; Stitt et al. 1989) durchgeführt, bei dem verschiedene Enzyme dazu verwandt wurden, nach und nach die vorhandenen Zucker zu Glucose-6-Phosphat umzusetzen, welches schließlich von der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase unter Reduktion von NAD⁺ zu NADH (was bei λ=340 nm verfolgt wurde) oxidiert wurde (Abb. 4).

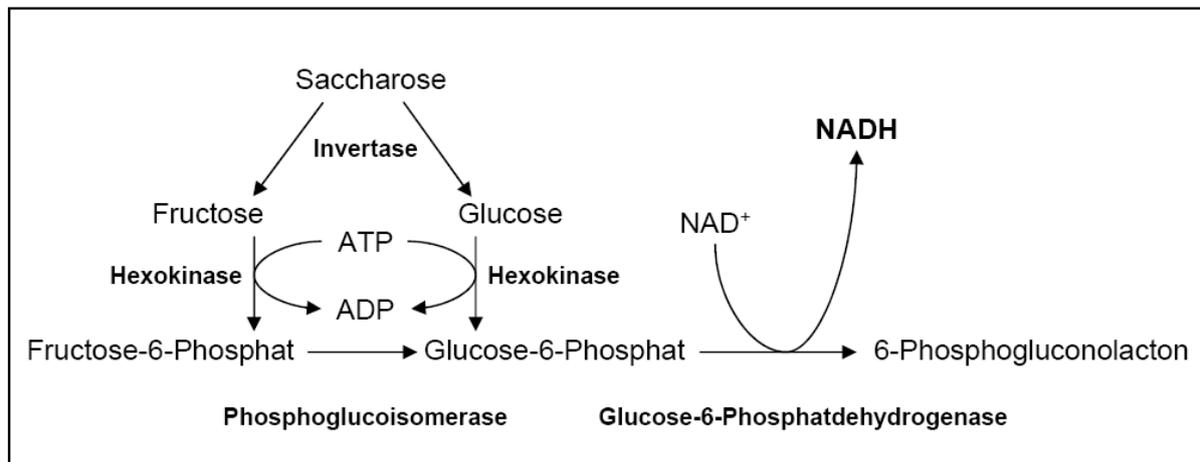


Abbildung 4: Schema der enzymatischen Reaktionen beim Nachweis von Saccharose, Fructose und Glucose

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 µl):

| | |
|--------|---------------------------------|
| 50 mM | HEPES / KOH pH 8 |
| 0,8 mM | NAD ⁺ |
| 2 mM | ATP |
| 10 mM | MgCl ₂ |
| 0,2 U | Glucose-6-Phosphatdehydrogenase |

Der Messansatz inklusive der Probe wurde zusammengestellt und zur Bestimmung des Anfangswertes in das Photometer gegeben. Nach einigen Messungen wurde die Platte entfernt und mit Hilfe eines metallenen Stempels mit 96 Nadeln (Werkstatt des Bot. Inst.), die zuvor jeweils mit 1 µl einer 750 U/ml Hexokinaselösung beschickt worden waren, wurde die Reaktion simultan in allen Kavitäten gestartet und die Multiplatte wieder ins Photometer gegeben. Nachdem die Absorption nicht weiter anstieg, wurde die Platte wiederum entfernt und das nächste Enzym (je 1 µl einer 350 U/ml Phosphoglucoisomeraselösung) zugegeben und weitergemessen. Ebenso wurde mit dem letzten Enzym (je 1 µl Invertaselösung (eine Spatelspitze Enzym (750000 U/mg) pro ml) verfahren. Da in den Stärkeextrakten nach der enzymatischen Hydrolyse nur noch Glucose vorhanden war, wurden hier nur die Hexokinase und die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase benötigt (Abb. 4).

2.11.5 Anthocyane

Für die Messung der Anthocyangehalte in Blättern wurden die gefrorenen Proben (50-100 mg s. 2.2.8) mit 500 µl Extraktionspuffer versetzt, gevortext und 3 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden daraufhin über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert und am nächsten Tag bei 14000 rpm 20 min herunterzentrifugiert. Vom Überstand wurden 400 µl abgenommen, auf 1 ml aufgefüllt und die Absorption der Lösung wurde bei den Wellenlängen 535 und 650 nm bestimmt. Die A_{650} dient hier als Korrektur zur Berechnung der korrekten A_{535} , die nach der Raleigh-Formel (Lange et al. 1971) berechnet werden konnte:

$$A_{535} (\text{korr.}) = A_{535} - 2,2 \times A_{650}$$

Extraktionspuffer für Anthocyane:

| | |
|-----------|--------------------------------|
| 81% (v/v) | H ₂ O _{dd} |
| 1% (v/v) | konz. HCl |
| 18% (v/v) | 1-Propanol |

2.11.6 ATP und ADP

ATP und ADP wurden am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm in Zusammenarbeit mit Alisdair Fernie und María Ines Zanor über HPLC gemessen. Die Probennahme fand am Botanischen Institut in Köln statt. Die gefrorenen Proben (ca. 100 mg s. 2.2.8) wurden mit Trichloressigsäure extrahiert und dann wurden über HPLC nach dem Protokoll von Fernie et al. (2001) die Gehalte von ADP und ATP bestimmt.

2.12 Umfangreiche Analyse des Primärmetabolismus mittels GC/MS

2.12.1 Extraktion und Probenvorbereitung

Die Methode zur Extraktion und Derivatisierung der GC-MS Proben stellt eine leichte Modifikation bereits publizierter Methoden (Roessner et al. 2000; Colebatch et al. 2004) dar.

Gefrorene Proben (70-180 mg, s. 2.2.8) wurden nach Zugabe von 300 µl auf -20°C gekühltem Methanol und 30 µl ebenfalls auf -20°C gekühltem 0,3 mg/ml Ribitol (Adonitol) in Methanol gevortext und 15 min auf 70°C geschüttelt. Das Ribitol diene in der späteren Messung als interner Standard. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, kurzes vortexen und erneutes Schütteln, diesmal bei 37°C für 5 min. Als letztes wurden 400 µl HPLC-Wasser dazugegeben, woraufhin sich eine polare und durchsichtige Phase und eine apolare grüne Phase bildeten. Es wurde erneut gevortext und danach für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Von der oberen polaren Phase wurden 160 µl abgenommen und in ein verschließbares GC-Fläschchen überführt. Die Proben wurden dann in einem Vakuumkonzentrator (s. 2.11.4) zur Trockne eingengt und konnten in dieser Form bei -20°C gut verschlossen gelagert werden.

Vor der Derivatisierung wurden die Probenfläschchen geöffnet für mindestens 15 min in einen Exsikkator mit angeschlossener Vakuumpumpe gestellt, um Kondenswasser zu entfernen. Dann wurde zu jeder Probe 40 µl einer Methoxyaminlösung (20 mg Methoxyamin-HCl in einem ml Pyridin abs.) gegeben, kurz gevortext und die Proben für 90 min bei 30°C inkubiert. Die Methoxymierung durch Methoxyamin Hydrochlorid verhindert die Ringbildung von reduzierenden Zuckern und schützt Ketogruppen vor einer möglichen Decarboxylierung (Schweer 1982).

Danach wurden 70 µl MSTFA mit dazugegeben, erneut gevortext und für 30 min bei 37°C inkubiert. MSTFA silyliert Carboxyl-, Hydroxyl-, Amin- und Amidgruppen. Diese bilden eine kovalente Bindung zu dem Silizium des MSTFA, das noch drei Methylgruppen (Trimethylsilyl, TMS) gebunden hat. Durch die Silylierung werden die Siedepunkte der Metabolite abgesenkt, wodurch sie während des GC-Laufs von der Säule eluieren können. Zudem verändert sich durch die Derivatisierung die Masse der zu untersuchenden Substanzen dergestalt, dass eine Silylierung das

Molekulargewicht um 72 amu und eine Methoxymierung das Molekulargewicht um 29 amu relativ zur Ausgangssubstanz erhöhte.

Die derivatisierten Proben wurden in Bördeldeckelfläschen mit Mikroeinsätzen überführt und mit einem Deckel fest verschlossen. Die Proben waren so bereit zur Messung. Es wurden nie mehr als 24 Proben vorbereitet, da die Proben nach 24 h degenerierten.

2.12.2 Gaschromatografie

Das verwendete GC/MS-System benutzte Helium 5.0 als Trägergas, das mit einem konstanten Druck von 60,7 kPa anlag. Als Trennsäule diente eine HP-5ms-Kapillarsäule (Agilent, USA) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Länge von 30 m, deren Trägermaterial (5%-Phenyl)-methylpolysiloxan war.

Ein GC/MS-Lauf wurde durch eine splitless-Injektion von 2 µl Probe gestartet, die von einem Autosampler zur Verfügung gestellt wurde. Die Temperatur des GC-Ofens betrug für 5 min 70°C und stieg dann mit einer Rate von 5°C/min bis auf 280°C an. Diese Temperatur wurde für 7 min gehalten, bevor wieder auf 70°C gekühlt wurde und ein neuer Lauf beginnen konnte. Die Temperatur des Einspritzblocks lag konstant bei 250°C und die der Verbindung zwischen GC-Ofen und Massenspektrometer bei 280°C.

2.12.3 Massenspektrometrie

Das angeschlossene Massenspektrometer ionisiert und fragmentarisiert die von der Säule eluierenden Substanzen und beschleunigt diese dann in einem elektromagnetischen Feld im Hochvakuum (ca. $3,3 \times 10^{-5}$ Torr). Je nach Flugbahn der einzelnen Fragmente kann auf ihr jeweiliges Masse zu Ladung-Verhältnis (m/z) geschlossen werden. Die Ionenquelle war auf 230°C und das Quadrupol auf 150°C temperiert.

In den ersten 7 Minuten eines jeden Laufes war das Massenspektrometer abgeschaltet, da in dieser Zeit das Lösungsmittel (hier Pyridin) von der Säule eluiert, was ein eingeschaltetes Massenspektrometer sehr stark beanspruchen würde und somit zu sehr kurzen Wartungsintervallen und einer Verringerung der allgemeinen Lebensdauer führen würde.

Geeicht wurde das Massenspektrometer mit Perfluorotributylamin (PFTBA). Dies geschah über die ChemStation-Software (Agilent, USA) als Ausführung eines so genannten Autotunes.

Zur Messung wurde die Scan-Methode gewählt. Bei dieser Betriebsart werden alle Massen von 50-600 amu in 0,1 amu Schritten kontinuierlich gemessen, wobei der Analysator 2,69 Durchgänge durch dieses Spektrum pro Sekunde misst. Im Gegensatz dazu steht die SIM-Methode (selected ion monitoring), bei der nur vorher definierte Ionen zu definierten Zeiten gemessen werden. Die SIM-Methode bietet den Vorteil einer höheren Sensitivität für die Messung von sehr niedrig abundanten Stoffen, birgt aber den Nachteil, dass vor einer Messung klar sein muss, was genau zu welchem Zeitpunkt gemessen werden soll. Eine nachträgliche Neuauswertung in Hinsicht auf weitere Metabolite ist, im Gegensatz zur Scan-Methode, nicht möglich.

2.12.4 Standards

Um Standards für die Massenspektrenbibliothek herzustellen, wurde etwa 1 mg der Substanz in 1 ml H₂O_{dd} gelöst. Davon wurden 5-15 µl in ein GC-Fläschchen überführt und für eine halbe Stunde in dem Vakuumkonzentrator (s. 2.11.4) getrocknet. Es folgte die Derivatisierung und Messung. Falls die Substanz sehr labil war, wurde eine Spatelspitze (viel weniger als 1 mg) der Substanz direkt in ein GC-Fläschchen gegeben und derivatisiert. Die derivatisierte Lösung wurde bei Bedarf 1:10 mit Pyridin verdünnt und gemessen.

Im Idealfall sollte die Messung einen großen Peak in Form einer Glockenkurve ergeben. War dies der Fall und stimmten auch die m/z-Verhältnisse der Ionen mit den vorberechneten (s. 2.12.1) überein, wurde die Substanz mit Retentionszeit und den charakteristischen Ionen in die Bibliothek (s. 2.12.5) aufgenommen. War diese Substanz zudem auch in der mitgelieferten „Wiley“-Datenbank enthalten, wurde ein Abgleich mit diesen Daten zur Bestätigung vorgenommen. Für die charakteristischen Ionen einer Substanz gilt: je höher das Molekulargewicht, desto eindeutiger. Außerdem dürfen auf keinen Fall die Ionen mit den Molekulargewichten 73 und 147 gewählt werden, da diese Ionen des Derivatisierungsmittels MSTFA sind und für den größten Teil des Hintergrundsignals bei einer Messung verantwortlich sind.

2.12.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ChemStation (Agilent, USA). Um die Läufe im Scan-Modus auszuwerten, musste zunächst eine Datenbank mit den Metaboliten von Interesse, ihren Retentionszeiten und den zugehörigen Ionen erstellt werden. Mit Hilfe dieser Datenbank ist es möglich, die Läufe automatisch hinsichtlich des Vorhandenseins und der Abundanzen der Metabolite von Interesse auszuwerten. Als Ergebnis wird eine Tabelle in einer Textdatei ausgegeben, die mit den gängigen Tabellenkalkulationsprogrammen weiterbearbeitet werden kann. Außerdem können jederzeit neue Metabolite zu der Datenbank hinzugefügt werden und es können alte Läufe erneut auf das Vorhandensein dieser neuen Substanzen getestet werden.

2.13 Histologische, histochemische und mikroskopische Methoden

2.13.1 Immunolokalisation von NADP-ME in transgenen *A. thaliana*

Für die *In-situ*-Immunolokalisation wurden die Blattpräparate in LR-Gold-Acrylharz eingebettet. 0,8 µm starke Schnitte wurden auf mit Silan beschichteten Objektträgern getrocknet und für die Immunolokalisation verwendet (Fahnenstich et al. 2007).

Die Präparate wurden für eine Stunde in TBST/BSA inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Anschließend wurden die Präparate für zwei Stunden mit einem Serum gegen die große Untereinheit der Spinat-RubisCO (1:1000 verdünnt) oder für vier Stunden mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen das rekombinante Mais-NADP-Malat-Enzym (Saigo et al. 2004) inkubiert. Als Kontrolle wurden die Präparate mit den korrespondierenden Prä-Immunsereen mit TBST/BSA inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST/BSA wurden die Proben für eine Stunde mit Protein A-gold (15 nm, Amersham, USA), welches 1:100 mit TBST/BSA verdünnt war, inkubiert. Die Präparate wurden dann mit TBST/BSA, TBST und H₂O_{dd} gewaschen, bevor sie mit einer Silberverstärkungsreagenz nach den Herstellerangaben (Amersham) behandelt und mit 0,25% (w/v) Safranin O gefärbt wurden (Fahnenstich et al. 2007). Die gefärbten Proben wurden am Mikroskop (Nikon Eclipse E800) analysiert und fotografiert (Digitalkamera KY-F1030, JVC).

10x TBS:

| | |
|--------|-------------------|
| 100 mM | Tris / HCl pH 7,4 |
| 1,5 M | NaCl |

TBST:

| | |
|------------|----------|
| 10% (v/v) | 10x TBS |
| 0,1% (v/v) | Tween 20 |

TBST/BSA:

| | |
|------------|----------|
| 10% (v/v) | 10x TBS |
| 0,1% (v/v) | Tween 20 |
| 1% (w/v) | BSA |

2.13.2 Messung des Blattquerschnitts von *A. thaliana*-Blättern

Für die Bestimmung der Dicke von *A. thaliana*-Blättern mussten diese zunächst für die lichtmikroskopische Untersuchung eingebettet werden (Niessen 2006). Dazu wurden frisch geerntete Blätter über Nacht in Fixierungslösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Material durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe dehydriert (jeweils 30 min in 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 2 x 100% EtOH). Der Ethanol wiederum wurde durch eine Rotihistolreihe entfernt (jeweils 30 min 25%, 50%, 75% Rotihistol in EtOH, 2 x 100% Rotihistol). Nach einer zweistündigen Inkubation in Paraplast/Rotihistol (1:1) wurden die Proben in 100% verflüssigtem Paraplast über Nacht inkubiert. Alle genannten Inkubationsschritte erfolgten bei 60°C.

Nachdem die in Paraplast inkubierten Blätter bei Raumtemperatur erkaltet und erstarrt waren, konnten am Mikrotom 12 µm dicke Querschnittspräparate erstellt werden. Die Präparate wurden bei 42°C mit einem Tropfen Wasser auf einem Objektträger über Nacht getrocknet.

Die getrockneten Präparate wurden wiederum einer absteigenden Rotihistolreihe (100%, 50% und 25% Rotihistol in EtOH, jeweils 20 min) und einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 70%, 50%, 30%, 15%, 0% EtOH, jeweils 15 min) zur Entwachsung unterzogen.

Die nun fertigen Präparate wurden am Lichtmikroskop analysiert und mit Hilfe des Programms Diskus (Hilgers, Königswinter) wurde die Dicke des Blattquerschnitts genau zwischen der Mittelvene und dem ersten lateralen Leitbündel gemessen. Pro Pflanzenlinie wurden dabei mindestens 80 Messungen vorgenommen (Niessen 2006).

Fixierungslösung:

| | |
|----------|--|
| 50 mM | KH ₂ PO ₄ pH 7,2 |
| 2% (v/v) | Formaldehyd |
| 1% (w/v) | Glutaraldehyd |

2.13.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten von *A. thaliana*-Blättern (Niessen 2006)

2.13.3.1 Herstellung der Schnitte

Die Proben für die Elektronenmikroskopie wurden zunächst als 1 mm² große Blattstückchen in 2% Glutaraldehyd gegeben und vakuuminfiltiert. Nach fünfstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4°C über Nacht gelagert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 100 mM Na-Phosphatpuffer gewaschen und 4 Stunden bei 4°C in 2% OsO₄ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O_{dd} war die Fixierung beendet.

Die Entwässerung wurde durch 15 min Inkubation in 25% Aceton, 120 min Inkubation in 50% Aceton/1% Uranylacetat und eine Acetonreihe (jeweils 20 min in 70%, 96% und 3 x 100% Aceton) gewährleistet.

Die Einbettung in Spurr-Medium (Spurr 1969) begann mit einer Inkubation in Spurr/Aceton (1:1) für 16 Stunden bei Raumtemperatur. Weitere Inkubationen in Spurr/Aceton (3:1 für 4 Stunden) und in purem Spurr-Medium (4 h gefolgt von 16 h) schlossen sich an. Zur endgültigen Einbettung wurde etwas Spurr-Medium in passenden Förmchen vorgelegt und die Blattproben in diese Förmchen überführt. Die Proben waren somit nach einer finalen Aushärtung für drei Tage bei 60°C bereit für die Ultramikrotomie.

Spurr-Medium (immer frisch anzusetzen (Spurr 1969)):

| | |
|-------|---|
| 6,5 g | Nonenylbernsteinsäure |
| 2,5 g | 3,4-Epoxy-cyclohexylmethyl-3,4-epoxy-cyclohexylcarboxylat |
| 1,5 g | D.E.R. 736 pract |

0,1 g Dimethylaminoethanol

2.13.3.2 Ultramikrotomie

Von den eingebetteten Präparaten wurden an einem RMC-Ultramikrotom MT 6000-XL mit einem Diamantmesser 60-80 nm dicke Schnitte erstellt. Diese Schnitte wurden auf mit Pioloform befilmte EM-Trägernetze gebracht.

2.13.3.3 Kontrastierung der Schnitte

Für die Kontrastierung der Schnitte wurde 2% Uranylacetat und Bleicitrat verwendet. Beide Lösungen wurden vor Gebrauch gut abzentrifugiert. Die eigentliche Kontrastierung fand statt durch Überschichtung der Präparate mit den genannten Lösungen und anschließender Inkubation im Dunkeln (10 min für Uranylacetat, 3 min für Bleicitrat). Danach wurden die EM-Trägernetze mit H₂O_{dd} gewaschen und vorsichtig getrocknet.

2.13.3.4 Elektronenmikroskopie

Die Präparate wurden mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf die Chloroplasten gelegt wurde. Am Elektronenmikroskop konnten mit einer Plattenkamera (65x90 mm) Fotos gemacht werden (Filmmaterial Agfa Scientia 23D56 P3 AH), deren Negative von Hand in der Dunkelkammer entwickelt wurden. Diese wurden dann von Siegfried Werth (Fotolabor des Bot. Inst.) eingescannt und per Software (Photoshop, Adobe, USA) in Positive umgewandelt.

2.13.4 Färbung von Zelltodereignissen in vollständigen Blättern

Die Färbung von Zelltodereignissen wurde, wie in Fahnenstich et al. (2007) beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden die Blätter in 0,1%iger Evans Blau-Lösung inkubiert und für 5 min vakuumfiltriert. Danach wurden sie dreimal mit H₂O_{dd} abgespült und mit 80% Ethanol bei 70°C das Chlorophyll entfernt. Fixiert wurden die Blätter im Anschluss daran mit der Fixierungslösung und abschließend fotografiert.

Fixierungslösung:

| | |
|------------|-------------|
| 50% (v/v) | Ethanol |
| 5% (v/v) | Essigsäure |
| 3,7% (v/v) | Formaldehyd |

2.13.5 Färbung von Zelltodereignissen zur Quantifizierung

Für die Quantifizierung von Zelltodereignissen in Blättern wurde verfahren, wie in Fahnenstich et al. (2007) beschrieben. Zunächst wurden abgeschnittene Blätter in einer 0,1%igen Evans Blau-Lösung inkubiert und für 5 min vakuumfiltriert. Anschließend wurden die Blätter dreimal mit H_2O_{dd} gewaschen und der Farbstoff, der im Blatt von toten Zellen gebunden war, wurde danach mit Extraktionspuffer auf 60°C extrahiert. Die Menge Evans Blau im Extrakt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

Extraktionspuffer:

| | |
|-----------|----------|
| 50% (v/v) | Methanol |
| 1% (v/v) | SDS |

2.13.6 Stärkefärbung in Blättern

Mit Lugol'scher Lösung kann Stärke in Blättern angefärbt werden. Stärke besteht im Wesentlichen aus Amylose (unverzweigte Glukoseketten) und Amylopektin (verzweigte Glukoseketten). Beide Bestandteile werden durch das in der Lösung enthaltene Jod angefärbt, indem es sich in die Helices der Stärkeketten einlagert. Amylose erscheint dabei dunkelblau und Amylopektin blaugrau. Vor der Färbung werden die Blätter mit 75% EtOH bei 75°C entfärbt. Die Färbung erfolgt durch Inkubation der entfärbten Blätter in Lugol'scher Lösung für 10 min, die anschließend mit Wasser abgespült wird.

Lugol'sche Lösung:

| | |
|----------|----|
| 2% (w/v) | I |
| 4% (w/v) | KI |

2.14 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Im Folgenden werden alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide einzeln aufgeführt. Die Schreibweise ist von links nach rechts in 5'→3'-Richtung.

Zur Klonierung der zu transformierenden Gene wurden diese zuerst aus cDNA über RT-PCR bzw. aus genomischer DNA über PCR amplifiziert. Dafür wurden folgende *Primer* verwendet:

| Name | Sequenz |
|----------|--------------------------------------|
| GO fow | TACAATTGGAGATCACTAACGTTACCGAGT |
| GO rev | TGGGACACTCCACGTCCTTAGTCTAGACTAGTA |
| TSS fow | TAGAATTCGCAAAAATGAGAGCCGTTGAC |
| TSS rev | CGGTCGACTTATTCATAGTGCATGAAGCAGGT |
| TSR fow | TAGAATTCATTGATATGACTATGAAAGTTGGT |
| TSR rev | CGTCTAGATTAACGAGTAACTTCGACTTTCGCCA |
| MS fow | ACACCGGTCGCTGGGAATGTATTCTGAATCGGCA |
| MS rev | CACATAGGCATACATCATCCCAGGTGAGTCGACGTT |
| ME fow | CATGCCATGGCGATGGTCTCCAACG |
| ME rev | ACGCTCGAGGCACTACCGGTAGTTGCG |
| KatE fow | ACACCGGTCGCAACATAACGAAAAGAACCCA |
| KatE rev | ACGTCGACTCAGGCAGGAATTTTGTCAATCT |

Der Klonierungsstrategie folgend wurden über die GO Oligonukleotide MunI und SpeI-Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende des PCR-Produkts eingeführt. Die Oligonukleotide MS und Kat führten AgeI und Sall-Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende des Produkts ein und über die ME Oligonukleotide wurden NcoI und XhoI Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende des PCR-Produkts eingeführt. Ferner wurden über die TSS Oligonukleotide EcoRI und Sall und über die TSR Oligonukleotide EcoRI und XbaI-Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende des Produkts eingeführt.

Um die Expression und die korrekte subzelluläre Lokalisation der transgenen Enzyme zu steuern, mussten auch Promotor- und Transitpeptidsequenzen aus genomischer DNA von *A. thaliana*, *S. lycopersicum* und *G. max* (2.5.3) mit den folgenden *Primern* amplifiziert werden:

| Name | Sequenz |
|------------------------|-----------------------------------|
| PGM fow | TAGGTACCCAATCAACAATGACGTGCGACCTAC |
| PGM rev | GAGATTAAATCGTTGCCGACGAAGCAATTGTA |
| rbS3C fow | ACGAGCTCATCCAGAATTGGCGTTGGATTA |
| rbS3C rev | AGCAACGGTGAAGAGTCAGTTGCAACCGGTAT |
| tpSoja-rbcS (kpnI) fow | TAGGTACCAGCTTGGATATCTGGCAGCAGAAA |
| tpSoja-rbcS (Sall) fow | TAGTCGACAGCTTGGATATCTGGCAGCAGAAA |
| tpSoja-rbcS rev | TACAATTGCATAGAAGCCATCATGCATT |

Die Oligonukleotide PGM fow & PGM rev wurden so konstruiert, dass das PCR-Produkt am 5'-Ende eine KpnI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine MunI-Schnittstelle enthält. Ebenso wurden über das Design der rbS3C fow & rev Oligonukleotide, die benutzt wurden, um Promotor- und Transitpeptidsequenz der kleinen RubisCO-Untereinheit der Tomate (rbS3C, X66072) zu amplifizieren, eine SacI und eine AgeI-Schnittstelle am 5'- bzw. 3'-Ende des PCR-Produkts eingeführt. Für die Klonierung des TSR-Konstruktes wurde über das Oligonukleotid tpSoja-rbcS (kpnI) fow eine KpnI-Schnittstelle und für das TSS-Konstrukt über tpSoja-rbcS (Sall) fow eine Sall-Schnittstelle am 5'-Ende des PCR-Produkts eingeführt (vgl. 2.5.3, Tab. 1).

Die PCRs zur Bestätigung der Transgeninsertionen auf genomischer Ebene (3.1.1) wurden jeweils mit einem Transitpeptid-spezifischen und einem Gen-spezifischen Oligonukleotid durchgeführt (z. B. rbS3C fow + MS rev für die Detektion einer MS-Insertion, vgl. Tab. 1).

Die Sonden, die für die Southern-Blots (2.4.6; 3.1.2) verwendet wurden, waren spezifisch für die zusammen mit den jeweiligen Transgenen transformierten Resistenzgene und wurden durch folgende Oligonukleotide erstellt:

| Name | Sequenz |
|------------|----------------------------|
| nos fow | TGCTCCACTGCAGTTCCATAA |
| BastaR rev | TCCAGCTGCCAGAAACCCACGTCA |
| KanR rev | ATCGCCATGGGTCACGACGAGAT |
| HygR rev | ATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGC |
| SulR rev | GTTTCGACAGCACGTGCAGCGATGT |

Für die in 3.8 angesprochenen RT-PCRs wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet:

| Name | Sequenz |
|------------|----------------------------|
| Actin2 fow | TGTACGCCAGTGGTCCTACAACC |
| Actin2 rev | GAAGCAAGAATGGAACCACCG |
| NTT1 fow | GCGAAGCCAAGAAATCTACATGGG |
| NTT1 rev | TCCAAGGGAACCGTTTCCGCTTTC |
| NTT2 fow | CCGAGCAGGATGACTCCAAGG |
| NTT2 rev | AGACACAGCGGCGATGGCGGTGTC |
| ACC1 fow | GACGTTAAGTGGGTTACCAGAGG |
| ACC1 rev | TGCAGCCTTGGCATCATTAGCTAG |
| ACC2 fow | CAGGACATTCGTGGTTATGCTTCG |
| ACC2 rev | CTTGGCAGACTTGGAGTAATGGC |
| ACC3 fow | CAAGCTCGTGGTACTGTGTCTCT |
| ACC3 rev | CACAATGAGCTGGAGCTTGTCATA |
| ACC4 fow | ATGGCTTTGATCGGAAAATCCGAG |
| ACC4 rev | CTGAACCCAATGCTTATAAGCAAT |
| ACC5 fow | ATGTGTATTTCAAAGAAGACGAAGAA |
| ACC5 rev | GATCCCTCCCAATTCAAGAACCT |

2.15 Statistische Methoden und Berechnungen

2.15.1 Standardabweichung

Die Standardabweichung (StAbw) ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um den ermittelten Mittelwert und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$StAbw = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}, \quad x_i = \text{Einzelwert}, \quad \bar{x} = \text{Mittelwert}, \quad n = \text{Anzahl der Einzelwerte}$$

2.15.2 Standardfehler

Der Standardfehler ist ein in der Biologie häufig gewähltes Maß für die Streuung der Einzelwerte um einen Mittelwert. Bei der Berechnung wird die Standardabweichung durch die Quadratwurzel der Anzahl der Einzelwerte (n) geteilt, so dass die Streuung um den Mittelwert mit zunehmender Probenzahl abnimmt.

$$\text{Standardfehler} = \frac{\text{StAbw}}{\sqrt{n}}$$

2.15.3 t-Test

Der t-Test (oder auch *student's t-test*) wird verwendet, um zu testen, ob zwei Gruppen von (Mess-)Werten statistisch signifikant voneinander unterschiedlich sind. Der Test liefert als Ergebnis eine Wahrscheinlichkeit p für den Fall, dass die beiden betrachteten Wertegruppen gleich sind. Bei $p < 0,05$ ist also eine $>95\%$ ige Wahrscheinlichkeit für die Verschiedenheit der beiden Wertegruppen gegeben. Der Test wurde von W. S. Gosset 1908 entwickelt und unter dem Pseudonym „Student“ veröffentlicht (Gosset 1908).

3. Ergebnisse

Das Hauptthema dieser Arbeit ist die Etablierung von Stoffwechselwegen zur teilweisen Umgehung und Reduktion der Photorespiration mit dem Ziel, Pflanzen mit einer größeren Biomasse als der Wildtyp zu erzeugen. Um dieses Ziel zu erreichen, mussten mehrere Transgene in die Modellpflanze (Meyerowitz 1987) *A. thaliana* eingeschleust werden. Die Vorgehensweise war dabei dergestalt, dass zuerst für alle beteiligten Gene einzeln transgene Pflanzen hergestellt wurden, denen dann durch erneute Transformation oder Kreuzung die weiteren Transgene eingeführt wurden. Diese Strategie führte zu einer großen Anzahl von transgenen Linien und, da die eingebrachten Enzymaktivitäten direkt mit dem Primärmetabolismus des Chloroplasten interagierten, auch zu einer großen Variationsbreite von Phänotypen. Zunächst soll über die Ergebnisse von Southern Blots und Enzymmessungen nachgewiesen werden, dass die später näher betrachteten Linien tatsächlich transgene Pflanzenlinien darstellen.

Die Beschreibung des GO-Phänotyps soll verdeutlichen, mit welchen Grundproblemen der gesamte Ansatz behaftet war. Davon ausgehend werden die zweifach und dreifach transgenen Pflanzen der beiden großen Ansätze (s. 1.2.6) hinsichtlich ihres Phänotyps, ihres Wachstums und ihrer physiologischen Eigenschaften unter verschiedenen Bedingungen vorgestellt.

Die Erkenntnisse aus diesen Ausführungen führten zu einer Modifikation des Ansatzes, die letztendlich zu einem erfolgreichen Abschluss des Projektes führte und deren Ergebnisse in dem Abschnitt über die GMK und GMMK-Pflanzen ausgeführt werden.

Da einige der erstellten Pflanzenlinien sehr interessante Phänotypen zeigten, soll in den anschließenden Kapiteln noch auf zwei von ihnen näher eingegangen werden. Zunächst wird auf den Tageslängen-abhängigen Phänotyp der ME-Pflanzen eingegangen (Fahnenstich et al. 2007), der neue Fragen hinsichtlich der Bedeutung von Malat und Fumarat aufwirft, um letztlich über die Salzresistenz der TSS-TSR Pflanzen zu berichten und den Ergebnisteil abzuschließen.

3.1 Bestätigung der Transgeninsertionen auf genomischer Ebene

3.1.1 PCR

Wie in 2.6.1 beschrieben, wurden selektionierte Pflanzen der T₂-Generation auf das Vorhandensein des jeweiligen neu transformierten Transgens mittels PCR (2.4.5.1) getestet. Die verwendeten *Primer* sind unter 2.14 aufgeführt. Alle der im weiteren Ergebnisteil behandelten Pflanzenlinien wurden in diesem Verfahren positiv auf die Anwesenheit einer genomischen Integration des jeweiligen Transgens getestet.

3.1.2 Southern Blot

In den meisten der im Folgenden beschriebenen Pflanzenlinien wurde zudem mit Southern Blots (2.4.6) die Anzahl der transgenen Insertionen auf genomischer Ebene bestimmt, um eventuelle multiple Insertionen zu erkennen. Als Sonden wurden dabei DNA-Fragmente eingesetzt, die komplementär zu denen der eingeführten Selektionskassetten waren, wobei sie einen Teil des Nopalin-Synthetase-Promotors und des jeweiligen Resistenzgens (s. 2.5.3 & 2.14) überspannten.

Tabelle 3: Ergebnisse der Southern-Blot-Experimente: Anzahl der Transgeninsertionen auf genomischer Ebene in den transgenen Linien. Fett gedruckt sind die Linien, die Ausgangspunkt für weitere Kreuzungen oder Transformationen (2.6.2) waren; n. b. steht für nicht bestimmt.

| Linie | Anzahl der Insertionen des Konstrukts | | | | | |
|-------------|---------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|
| | GO | MS | ME | Kat | TSS | TSR |
| GO 5 | 1 | | | | | |
| GO 14 | 2 | | | | | |
| GO 16 | 1 | | | | | |
| GO 19 | 2 | | | | | |
| GO 20 | 1 | | | | | |
| MS 4 | | 2 | | | | |
| MS 5 | | 1 | | | | |
| ME 2 | | | 1 | | | |
| ME 4 | | | 1 | | | |
| ME 5 | | | 1 | | | |
| Kat 1-5 | | | | 1 | | |
| Kat 2-9 | | | | 4 | | |

-Tabelle 3 Fortsetzung-

| Linie | Anzahl der Insertionen des Konstrukts | | | | | |
|------------------|---------------------------------------|----|----|-----|-------|-------|
| | GO | MS | ME | Kat | TSS | TSR |
| TSS 2-15 | | | | | 1 | |
| TSS 13-1 | | | | | 1 | |
| TSR 5 | | | | | | 1 |
| GO-TSS 6 | 1 | | | | 1 | |
| GO-TSS 21 | 1 | | | | 1 | |
| GO-TSS 74 | 1 | | | | 1 | |
| GO-TSS 93 | 1 | | | | 1 | |
| GTT 21-1 | 1 | | | | 1 | n. b. |
| GTT 21-3 | 1 | | | | 1 | n. b. |
| GTT 74-3 | 1 | | | | 1 | n. b. |
| GO-ME 25 | 1 | | 1 | | | |
| GO-ME 60 | 1 | | 1 | | | |
| GO-MS 11 | n. b. | 2 | | | | |
| GO-MS 14 | n. b. | 2 | | | | |
| GO 5-MS 2 | 1 | 1 | | | | |
| GO 5-MS 6 | 1 | 1 | | | | |
| TSS-TSR 16 | | | | | n. b. | n. b. |
| TSS-TSR 18 | | | | | n. b. | n. b. |
| GMM 60-4 | 1 | | 1 | | | |
| GMM 60-8 | 1 | | 1 | | | |
| GMM 60-11 | 1 | | 1 | | | |
| GMK 3 | 1 | 1 | | 1 | | |
| GMK 9 | 1 | 1 | | 3 | | |
| GMMK 60-4-2 | 1 | | 1 | | | |
| GMMK 60-11-7 | 1 | | 1 | | | |
| GMMK 60-11-8 | 1 | | 1 | | | |

3.2 Enzymaktivitäten transgener Linien

Im vorangegangenen Ergebnisteil wurde die Insertion der Transgene auf genomischer Ebene und deren Anzahl gezeigt. Diese Ergebnisse treffen aber noch keine Aussage über die korrekte Expression der eingebrachten Konstrukte. Wenn das eingebrachte Transgen wie in den vorliegenden Fällen ein Enzym ist, ist der stichhaltigste Nachweis der erfolgreichen Expression die Messung der Aktivität. Im Folgenden sollen nun die Enzymaktivitäten der transgen eingebrachten Enzyme in allen später betrachteten Linien zusammengestellt werden.

3.2.1 Glykolat-Oxidase (GO)

Die Glykolat-Oxidase (EC 1.1.3.15) ist ein peroxisomales Enzym, dessen Rolle in dem photorespiratorischen Stoffwechselweg die Oxidation von Glykolat zu Glyoxylat ist (Kisaki und Tolbert 1969; Tolbert 1997). Die dreidimensionale Struktur dieses Enzyms, ein α/β -Fass mit FMN als Kofaktor (Lindqvist und Branden 1989; Stenberg et al. 1995), und damit auch der Reaktionsmechanismus, ist bereits gut charakterisiert. Im *A. thaliana*-Genom finden sich zwei Gene (At3g14415 und At3g14420) mit einer Sequenzidentität von 82%, die für Glykolat-Oxidasen kodieren. Über die Regulation der GO-Expression auch nach einer Analyse des peroxisomalen Proteoms (Fukao et al. 2002) kaum etwas bekannt, allerdings lassen Daten aus Tabak eine entwicklungsabhängige Expression der GO vermuten, die mit der Photomorphogenese einhergeht (Barak et al. 2001).

Durch ihre Rolle in der Photorespiration (1.2.2) muss die GO im Licht jederzeit zur Verfügung stehen, da sich die Lichtverhältnisse im Freiland durch Beschattung schnell ändern können und damit die Flüsse durch die photosynthetischen und photorespiratorischen Stoffwechselwege hoch variabel sind. Dies führt dazu, dass auch in untransformierten Col-0 Pflanzen hohe Aktivitäten der GO gemessen werden konnten.

Die Aktivitäten wurden in Proben von *A. thaliana*-Blattmaterial gemessen, wie in 2.10.2. beschrieben wurde.

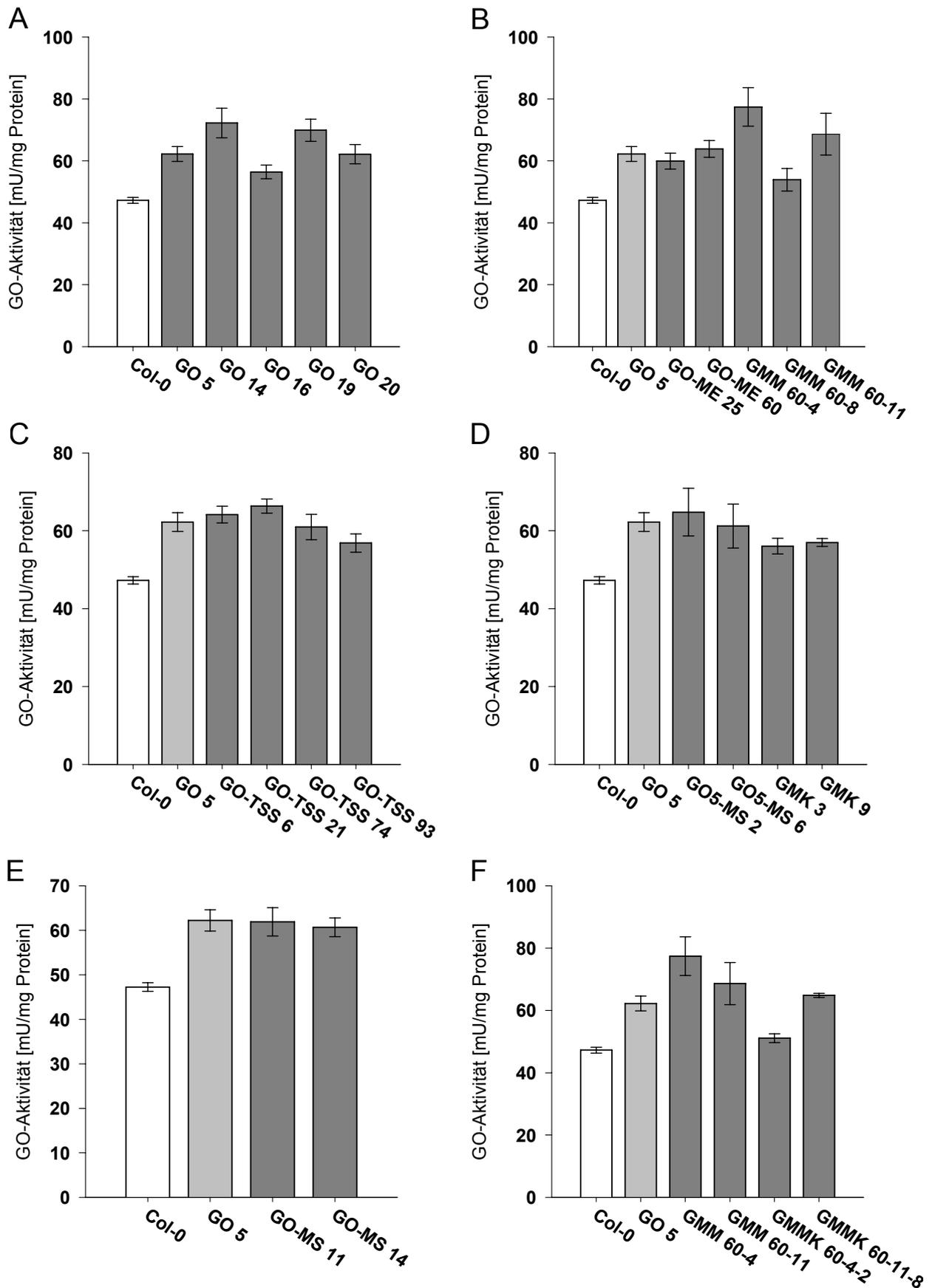


Abbildung 5: Darstellungen der gemessenen GO-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen. Die Ergebnisse sind aufgeteilt in (A) GO Pflanzen, (B) GO-ME und GO-MS-ME (GMM) Pflanzen des GMM-Weges, (C) GO-TSS Pflanzen des GTT-Weges, (D) GO-MS-Kat

(GMK) und GO5-MS Pflanzen, (E) GO-MS Pflanzen und (F) GMM und GMM Pflanzen mit Katalase (GMMK). Zur besseren Vergleichbarkeit werden immer auch die Wildtyp-Aktivität und die der Linie GO 5 gezeigt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 6$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Wie in der Abbildung 5 A-F zu sehen ist, weisen alle untersuchten Pflanzenlinien, die auch per PCR positiv auf die Anwesenheit des GO-Transgens (s. 3.1.1) getestet worden waren, eine signifikant erhöhte GO-Aktivität in Blattextrakten gegenüber dem zugehörigen Wildtyp auf. Im Wildtypextrakt wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität von $47,26 \pm 0,99$ mU/mg Protein gemessen, und die transgenen Pflanzen zeigten Aktivitäten zwischen $51,11 \pm 1,42$ mU/mg Protein (GMMK 60-4-2) und $77,42 \pm 6,19$ mU/mg Protein (GMM 60-4). Zusätzlich konnte exemplarisch für die Linie GMK 3 die korrekte subzelluläre Lokalisation der GO durch eine Aktivitätsmessung in einer Plastidenisolation nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die Linie GO 5 mit einer spezifischen Aktivität von $62,23 \pm 2,40$ mU/mg Protein wurde, wie in 2.6.2, 3.3 und von Fahnenstich (2004) bereits näher erläutert, verwendet, um die weiteren Linien mit Kombinationen von Transgenen mit GO zu erzeugen und wird deswegen in dieser Arbeit häufig als Kontrolle angeführt.

3.2.2 Malat-Synthase (MS)

Die Malat-Synthase (EC 2.3.3.9) ist ein peroxisomales Enzym, das in *A. thaliana* nur während der ersten Tage des Wachstums aktiv ist, wenn die Speicherlipide mobilisiert werden (Cornah et al. 2004; Penfield et al. 2005; Pracharoenwattana et al. 2005). Sobald das autotrophe Wachstum einsetzt, wird die Malat-Synthase nicht länger exprimiert.

Die zur Transformation verwendete Malat-Synthase (Mori et al. 1991) aus *C. pepo*-cDNA (X56948, s. 2.5.3) wurde, wie beschrieben, mit dem Promotor und der Transitpeptidsequenz der kleinen RubisCO-Untereinheit von *S. lycopersicum* fusioniert und sollte daher in ihrer Expression in *A. thaliana* lichtreguliert sein (Kuhlemeier et al. 1989; Uozumi et al. 1994). Aus diesem Grund wurden die Proben für diese Messung immer etwa zur Mitte der Lichtperiode genommen und die eigentliche Messung fand wie in 2.10.3 beschrieben statt.

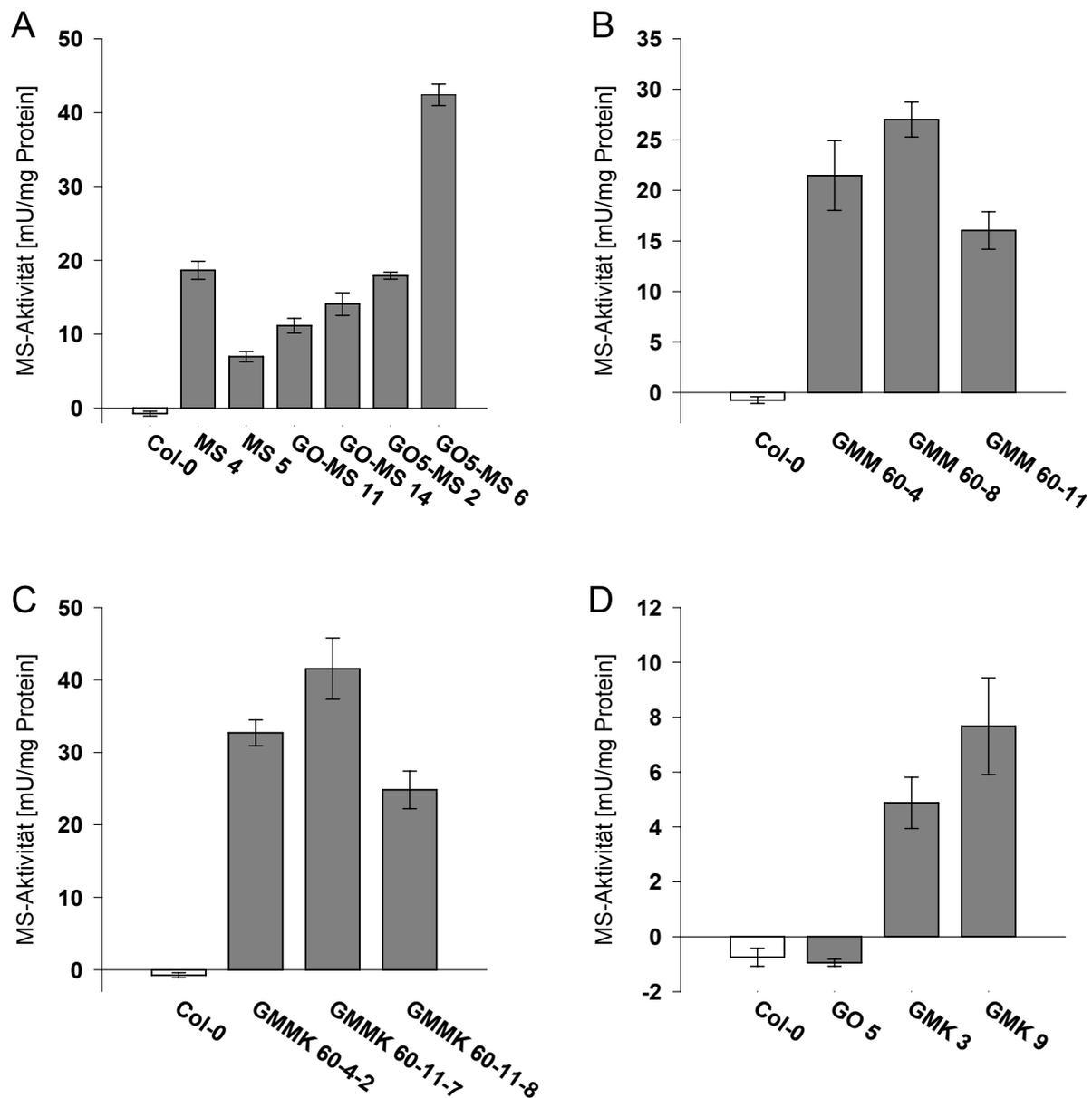


Abbildung 6: Darstellungen der gemessenen MS-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen.

Aufgeteilt sind die Ergebnisse in (A) MS, GO-MS und GO5-MS Pflanzen, (B) GO-MS-ME (GMM) Pflanzen, (C) GO-MS-ME-Kat (GMMK) Pflanzen, (D) GO und GO-MS-Kat (GMK) Pflanzen. Der besseren Vergleichbarkeit halber wird immer die MS-Aktivität des zugehörigen Wildtyps Col-0 aufgeführt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von $n \geq 6$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Da in dem Wildtyp, wie erwartet, keine MS-Aktivität festgestellt werden konnte, ist aus der Abbildung 6 A-D eindeutig ersichtlich, dass die getesteten Pflanzenlinien das PCR-Ergebnis bestätigten. Es wurden MS-Aktivitäten zwischen $4,88 \pm 0,93$ (GMK 3) und $42,4 \pm 1,45$ mU/mg Protein (GO5-MS 6) gemessen. Zusätzlich konnte exemplarisch für die Linie GMK 3 die korrekte subzelluläre Lokalisation der MS durch

eine Aktivitätsmessung in einer Plastidenisolation nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die Linie MS 4 mit einer spezifischen Aktivität von $18,67 \pm 1,23$ mU/mg Protein wurde wie in 2.6.2 beschrieben verwendet, um die GO-MS Linien 11 und 14 durch Transformation mit dem GO-Konstrukt zu erstellen. Die Linien GO5-MS 2 und 6 entstanden aus einer Transformation von GO 5 mit dem MS-Konstrukt (s. 2.6.2 und 2.5.3).

3.2.3 NADP-Malat-Enzym (ME)

Das NADP-Malat-Enzym (EC 1.1.1.40) katalysiert die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von NADP^+ zu NADPH. Es ist sowohl als plastidäres als auch als cytosolisches Enzym bekannt, das im Pflanzenreich sehr weit verbreitet ist und in verschiedene Stoffwechselwege eingebunden ist (Drincovich et al. 2001). Auch in *A. thaliana* sind 4 Isoformen (AtNADP-ME1-4) des NADP-Malat-Enzyms vorhanden (Gerrard-Wheeler et al. 2005). In *Zea mays* wurden bis dato zwei cDNAs für NADP-MEs gefunden und die zugehörigen Proteine charakterisiert (Rothermel und Nelson 1989; Maurino et al. 2001; Detarsio et al. 2003; Saigo et al. 2004). Eines dieser NADP-Malat-Enzyme (J05130.1) nimmt im Mais die Rolle des decarboxylierenden Enzyms der C_4 -Photosynthese ein (NADP-Malat-Enzym-Typ s. 1.2.4.1) und wurde in der vorliegenden Arbeit in *A. thaliana* Pflanzen überexprimiert (s. 2.5.3 und 2.6.2). Die Messung der Enzymaktivitäten in Blattextrakten wurde durchgeführt wie in 2.10.4 beschrieben.

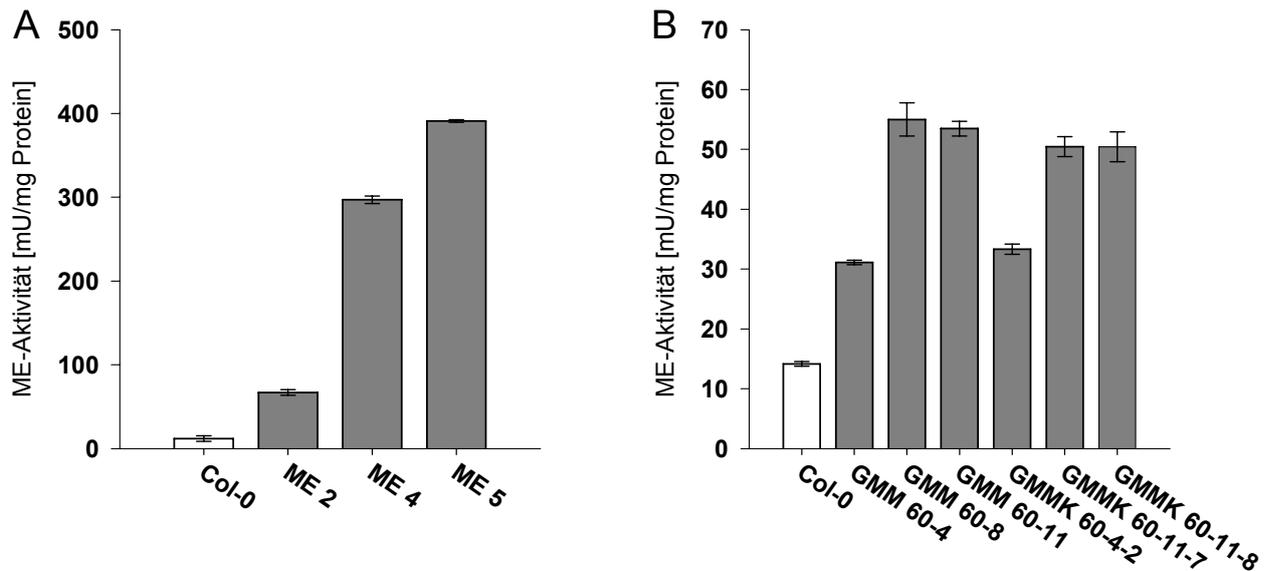


Abbildung 7: Darstellungen der gemessenen ME-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen. Aufgeteilt sind die Ergebnisse in (A) die ME Pflanzen, (B) die GO-MS-ME (GMM) und die GMM Pflanzen mit Katalase (GMMK). Zur besseren Übersicht wird immer die ME-Aktivität des zugehörigen Wildtyps Col-0 aufgeführt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von $n \geq 6$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Aus Abbildung 7 A geht hervor, dass die Transformation mit dem ME-Konstrukt in einfach transgenen Pflanzen zu sehr hohen spezifischen ME-Aktivitäten (391 \pm 1,6 mU/mg Protein bei ME 5) verglichen mit dem Wildtyp Col-0 (12 \pm 3,4 mU/mg Protein) führt (Fahnenstich et al. 2007). Die Pflanzen der Linie 5 wurden schließlich ausgewählt, um mit GO 5 (s. 3.2.1 und 2.6.2) Pflanzen gekreuzt zu werden. Die aus der darauf folgenden Transformation mit dem MS-Konstrukt (GMM Pflanzen, s. 2.6.2; 3.6) und dem Katalase-Konstrukt (GMMK Pflanzen, s. 2.6.2; 3.7.1) resultierenden Linien zeigten nicht mehr die hohen spezifischen Aktivitäten der einfach transgenen ME Pflanzen (Abb. 7 B). Dennoch kann angesichts einer etwa doppelt (GMM 60-4) bis mehr als vierfachen (GMM 60-8) gegenüber dem Wildtyp erhöhten NADP-ME Aktivität von einer erfolgreichen Expression des ME-Konstrukts ausgegangen werden.

3.2.4 Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS) und Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR)

Kornberg und Sadler zeigten bereits 1961, dass *E. coli* auf Glykolat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Außer einer Glykolat-Dehydrogenase benötigen die Bakterien aber noch zwei weitere Enzyme zur Assimilation des Glykolats. Die

Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS, EC 4.1.1.47, NP_415040) katalysiert die Kondensation von zwei Molekülen Glyoxylat zu einem Molekül Tartronat-Semialdehyd (Gupta und Vennesland 1964; Chang et al. 1993), und die Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR, EC 1.1.1.60, NP_417594) katalysiert die NADH-abhängige Reduktion von Tartronat-Semialdehyd zu Glycerat (Gotto und Kornberg 1961; Kohn 1968; Hubbard et al. 1998; Njau et al. 2000).

In Pflanzen wurden bisher keine Enzyme mit ähnlichen katalytischen Eigenschaften identifiziert, also muss davon ausgegangen werden, dass dieser Weg in Pflanzen nicht existiert, obwohl in einer Studie (Fiehn et al. 2000) das Intermediat Tartronat-Semialdehyd in Pflanzenextrakten identifiziert wurde. Die genannten Gene (2.5.3 und 2.6.2) wurden in Pflanzen transformiert und eine Aktivitätsmessung an resultierenden Pflanzen nach 2.10.5 durchgeführt.

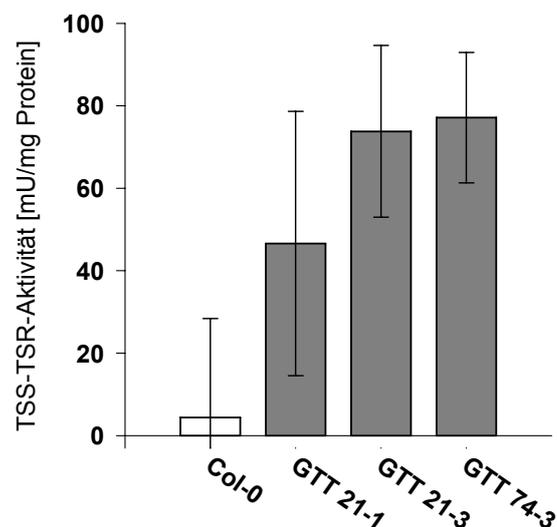


Abbildung 8: Darstellungen der gemessenen TSS-TSR-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp (Col-0) und transgenen GTT Pflanzen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von n=3 Einzelmessungen ± Standardabweichung.

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass die Pflanzen, die mit allen Konstrukten für den vollständigen GTT-Weg (s. 1.2.6 und 3.5) transformiert wurden und deren Insertion bestätigt wurde (3.1), auch eine TSS-TSR-Aktivität ($77,11 \pm 15,82$ mU/mg Protein bei GTT 74-3) aufweisen, die deutlich höher als die des zugehörigen Wildtyps Col-0 ($4,38 \pm 24,2$ mU/mg Protein) ist.

3.2.5 Katalase (Kat)

Die Katalase (EC 1.11.1.6) ist ein unter mehrzelligen Lebewesen ubiquitäres Enzym (McClung 1997). Es katalysiert die Disproportionierung von H_2O_2 zu H_2O und $\frac{1}{2} \text{O}_2$ und ist von daher in die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eingebunden, wie sie z. B. bei den Elektronenübertragungsreaktionen an der inneren Mitochondrienmembran entstehen. Bei Pflanzen entsteht zudem während der Photorespiration H_2O_2 in den Peroxisomen, weswegen auch dort eine Katalase benötigt wird. Für die Chloroplasten allerdings, in denen ebenfalls viele ROS entstehen, ist bis jetzt noch keine Katalase-Aktivität nachgewiesen worden. Trotzdem kodiert das *A. thaliana*-Genom für drei Isoformen der Katalase, die unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (McClung 1997) und durch Seneszenzprozesse in Ihrer Expression stark beeinflusst werden (Zimmermann et al. 2006). Ein Knockout der Katalase 2 (Cat 2) führt zu einem photorespiratorischen Phänotyp, an dem die Effekte von ROS-Akkumulation auf die gesamte Pflanze, die circadianen Rhythmen und den H_2O_2 -vermittelten Zelltod untersucht wurden (Queval et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Einführung der Katalase in die Chloroplasten nötig, da sich die H_2O_2 -Produktion der transgenen GO als ein zu großes Problem für den Gesamtansatz herausstellte (s. 3.3; 3.4 & 4.1.6). Die Messung der Katalase in Blattextrakten wurde wie beschrieben (2.10.6) durchgeführt. Da das verwendete Katalase-Konstrukt ebenso wie das der MS mit einem rbcS-Promotor ausgestattet ist (s. 2.5.3 und 3.2.2), wurden wiederum Proben aus der Mitte der Lichtperiode verwendet.

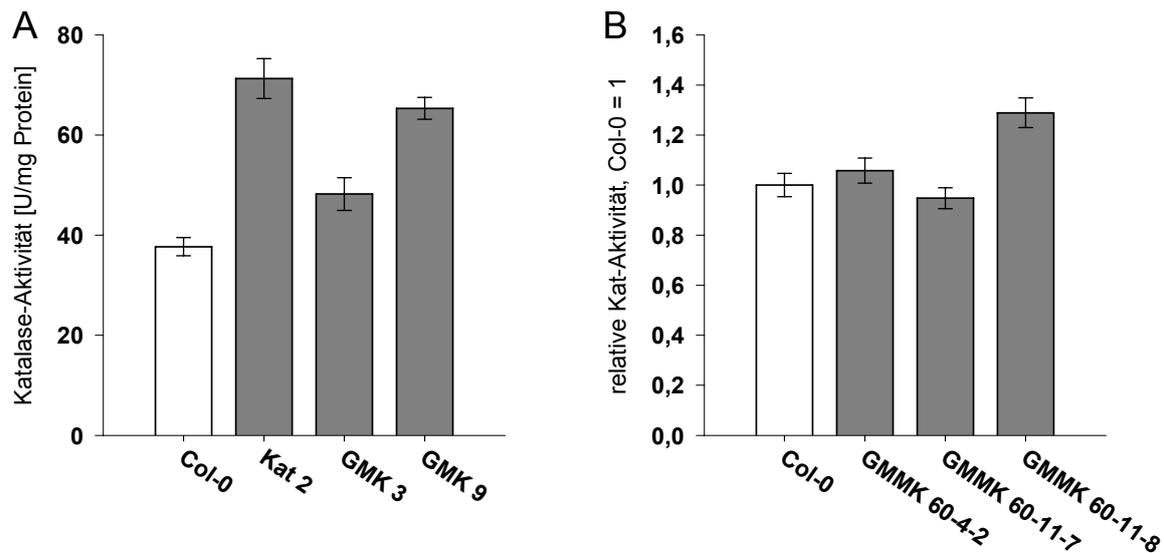


Abbildung 9: Darstellungen der gemessenen Katalase-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen. Die Ergebnisse sind aufgeteilt in (A) einfach transgene Kat 2 und GO-MS-Kat (GMK) Pflanzen und (B) GO-MS-ME-Kat (GMMK) Pflanzen wobei immer der Wildtyp Col-0 zum Vergleich mit aufgeführt ist. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung. (B) wurde übernommen aus der Bachelorarbeit von A. Maier (2006).

Die Ergebnisse in Abbildung 9 A zeigen deutlich einen signifikanten Unterschied in den gemessenen Katalase-Aktivitäten zwischen dem Wildtyp ($37,68 \pm 1,81$ U/mg Protein), den einfach transgenen Kat Pflanzen (Kat 2: $71,27 \pm 4,00$ U/mg Protein) und den untersuchten GMK-Linien (GMK 3: $48,20 \pm 3,26$; GMK 9: $65,33 \pm 2,19$ U/mg Protein). Dagegen konnten in Abbildung 9 B lediglich Pflanzen der Linie GMMK 60-11-8 eindeutig höhere Aktivitäten als der Wildtyp Col-0 aufweisen.

3.3 Der GO-Phänotyp

Wie in der Einleitung (s. 1.2.6) ausgeführt, ist die Glykolat-Oxidase (GO) das erste Enzym in beiden vorgeschlagenen artifiziellen Stoffwechselwegen zur Verminderung von Photorespiration. Es ist daher von besonderer Wichtigkeit zu wissen, wie die Pflanze auf die Anwesenheit der GO-Aktivität in den Chloroplasten reagiert, um die Chancen und eventuelle Hindernisse bei der Etablierung der künstlichen Stoffwechselwege einzuschätzen. Da die Expression der GO sehr negative Effekte auf die Pflanzen hatte und zu einem starken Phänotyp (3.3.1 und 3.3.2) führte, wurde versucht, die genaue Ursache dieses Phänomens zu eruieren, was im anschließenden Kapitel erläutert werden soll (3.4).

3.3.1 Wachstum und Entwicklung

Der Phänotyp und weitere physiologische Eigenschaften der GO Pflanzen wurden teilweise in der Diplomarbeit von Fahnenstich (2004) beschrieben.

Allgemein gilt für die GO Pflanzen, dass sie langsamer als der Wildtyp wachsen und eine eher gelbliche Blattfarbe (Abb. 10) zeigen, wenn sie im Gewächshaus angezogen werden. Die stärkste Ausprägung des GO-Phänotyps zeigte die Linie GO 19 mit zwei transgenen Insertionen (3.1.2).

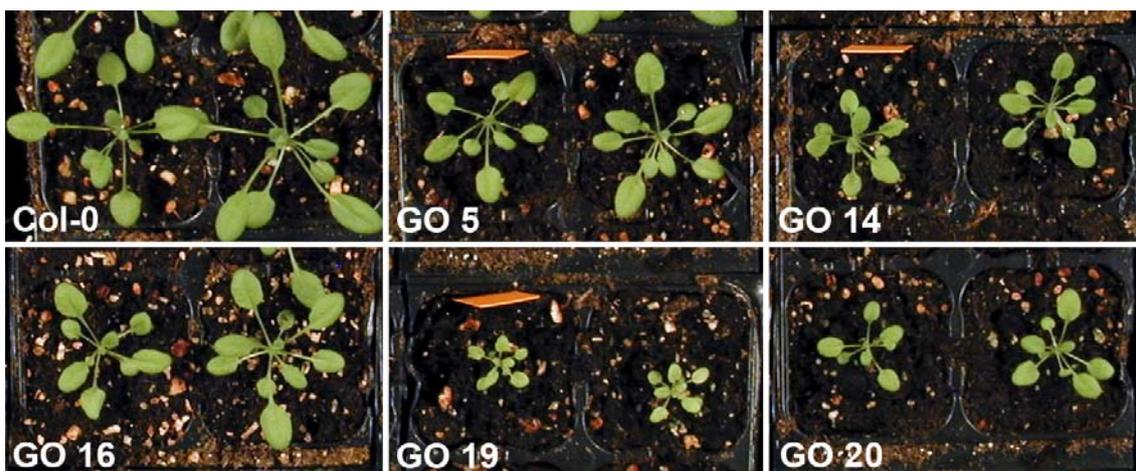


Abbildung 10: 4 Wochen alte, im Langtag (Gewächshaus) gewachsene Col-0 und GO Pflanzen im Vergleich

Zusätzlich tritt unter diesen Bedingungen bei den GO Pflanzen auch der Übergang von der vegetativen zur generativen Phase gegenüber dem Wildtyp verspätet ein (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zeitlicher Verlauf des Anteils blühender Pflanzen an der Gesamtpopulation der jeweiligen GO und Col-0 Linien im Langtag (Gewächshaus).

| Linie | Alter der Pflanzen | | | |
|-------|--------------------|----------|----------|----------|
| | 5 Wochen | 6 Wochen | 7 Wochen | 8 Wochen |
| Col-0 | 61% | 100% | 100% | 100% |
| GO 5 | 49% | 100% | 100% | 100% |
| GO 14 | 11% | 57% | 100% | 100% |
| GO 16 | 3% | 19% | 81% | 100% |
| GO 19 | 0% | 7% | 55% | 97% |
| GO 20 | 5% | 41% | 100% | 100% |

Wurden die GO Pflanzen aber im Alter von 15 Tagen in eine Umgebung erhöhter CO₂-Konzentration (s. 2.2.3.1) überführt, verschwand der Phänotyp und die GO

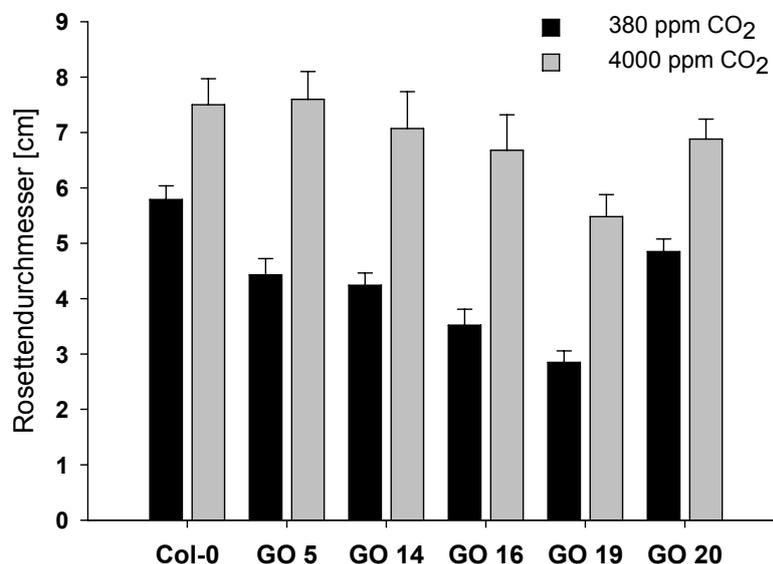


Abbildung 11: Vergleich der Rosettendurchmesser fünf Wochen alter GO und Col-0 Pflanzen, die ab einem Alter von 15 Tagen einerseits im Gewächshaus bei 380 ppm CO₂ und andererseits in der CO₂-Kammer (Langtag, 70 μ E) bei 4000 ppm CO₂ angezogen wurde.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von $n \geq 6$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Pflanzen erreichten tendenziell die Größe der Wildtyppflanzen (Abb. 11). Der geringere Durchmesser v. a. der Linie GO 19 mit zwei genomischen Insertionen

könnte mit den schlechteren Startbedingungen der GO Pflanzen durch 15-tägiges Wachstum in ambierter CO₂-Konzentration zusammenhängen.

Die Daten des Experiments zu Abbildung 11 stellen die klare Verbindung des Phänotyps zur Aktivität der GO her. Da das Substrat (Glykolat) für die GO-Reaktion nur zur Verfügung steht, wenn die RubisCO Oxygenase-Reaktionen durchführt (s. 1.2.1) und dies bei 4000 ppm CO₂ äußerst selten vorkommt, ist sie unter diesen Bedingungen inaktiv, was zu einem Verschwinden des Phänotyps führt (Fahnenstich 2004).

3.3.2 Physiologische Eigenschaften

Da nun die Verbindung zwischen dem Phänotyp und der Aktivität des transgenen Enzyms hergestellt werden konnte, war die Frage, welcher Aspekt der GO-Aktivität schädlich für die Pflanze war. Als Kandidaten galten dabei besonders die beiden Produkte der Reaktion, H₂O₂ und Glyoxylat. Sowohl über H₂O₂ (Kaiser 1979; Desikan et al. 1998; Noctor et al. 2000; Apel und Hirt 2004) wie auch über Glyoxylat (Chastain und Ogren 1985; Chastain und Ogren 1989; Campbell und Ogren 1990; Häusler et al. 1996) finden sich in der Literatur Berichte bezüglich schädlicher Auswirkungen auf die Zellen allgemein und die Photosynthese im Besonderen, wobei die schädigende Wirkung von H₂O₂ auch über die Pflanzenforschung hinaus bekannt ist (Balaban et al. 2005; DeJong et al. 2007).

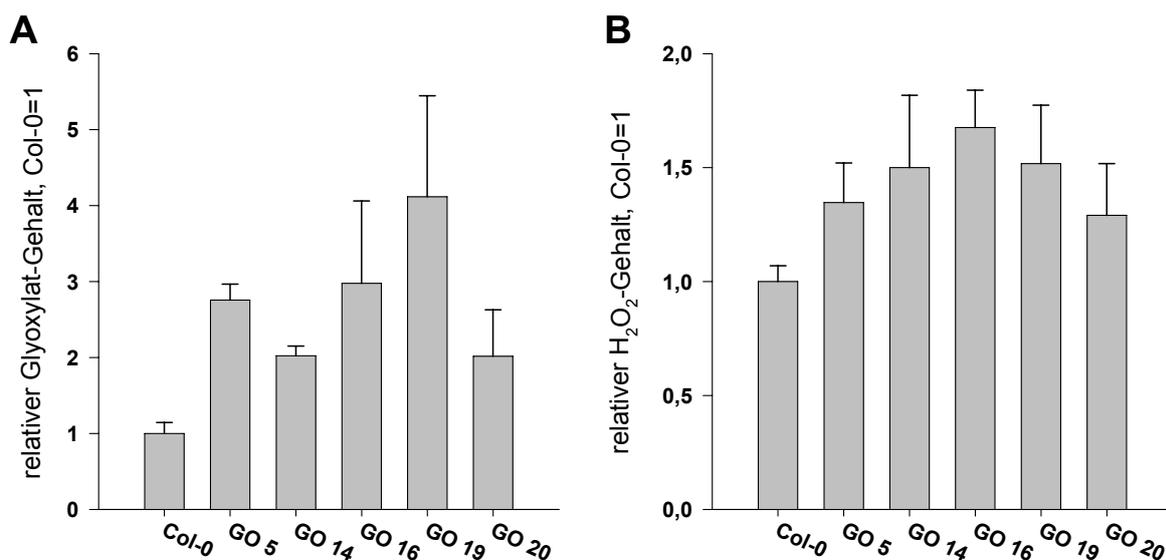


Abbildung 12: Vergleich der Gehalte von Glyoxylat (A) und H₂O₂ (B) in Blattextrakten von fünf Wochen alten GO und Col-0 Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus n≥3 Einzelmessungen ±Standardabweichung (Fahnenstich 2004). Die Probennahme fand um 14 Uhr statt.

Um diesen Punkt zu untersuchen, wurden die Gehalte von H_2O_2 und Glyoxylat in Blattextrakten gemessen und anhand von Abbildung 12 A+B lässt sich schließen, dass unter Gewächshaus-Bedingungen beide Produkte der GO-Reaktion in den Blättern von GO-Pflanzen akkumulieren.

Als letztes Ergebnis aus der grundlegenden Charakterisierung des GO-Phänotyps soll hier auf die Kapazitäten der photosynthetischen Elektronentransportketten der GO und Col-0 Pflanzen eingegangen werden. Da die GO Pflanzen kleiner und zudem gelblicher als der Wildtyp waren, lag es nahe, Störungen in dem Photosyntheseapparat zu vermuten, besonders, da auch H_2O_2 involviert war, das über die Mehler-Peroxidase-Reaktion in direkter Wechselwirkung mit den Elektronentransportprozessen steht (Asada 1999). Untersucht wurden in diesem Zusammenhang die höchsten Elektronentransportraten, die die Pflanzen bei gegebenen Lichtstärken erreichen konnten, wobei diese immer weiter gesteigert wurden („Lichtreihe“, s. 2.8.1).

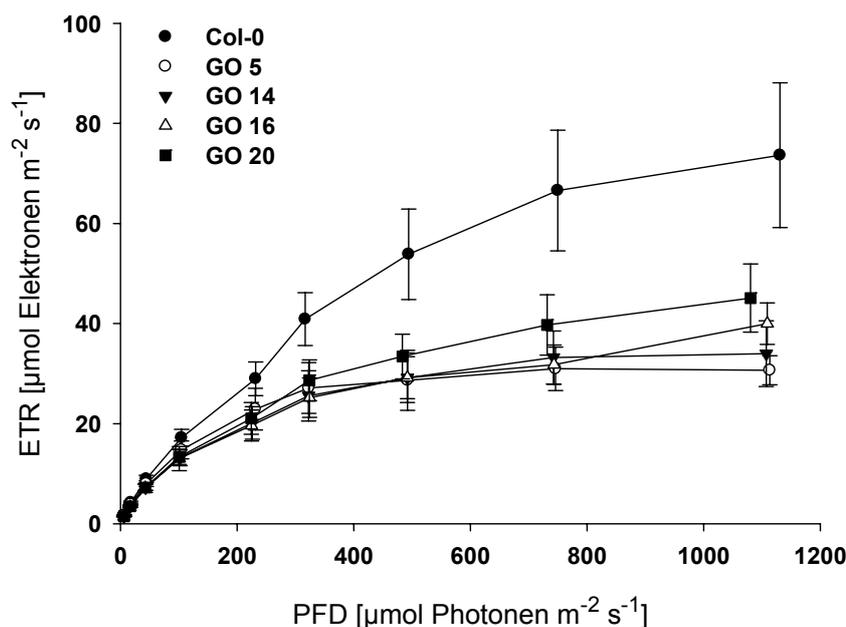


Abbildung 13: Photosynthetische Elektronentransportraten fünf Wochen alter GO und Col-0 Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) während einer Lichtreihe. Dargestellt sind Mittelwerte aus $n=3$ Messungen \pm Standardabweichung

Wie zu erwarten war, zeigte sich auch bei der Messung des Elektronentransports über eine Lichtreihe die geringere Leistungsfähigkeit der GO Pflanzen gegenüber den Wildtyppflanzen (Abb. 13). So erreichten die GO Pflanzen nur zwischen 41,6% (GO 5) und 59,6% der photosynthetischen Elektronentransportraten des Wildtyps. Dieses Phänomen war besonders ausgeprägt bei hohen Lichtintensitäten zu beobachten, bei denen die Flüsse durch den photorespiratorischen Stoffwechselweg

höher werden (Veljovic-Jovanovic et al. 2001) und somit der GO mehr Substrat zur Verfügung steht, das zu H_2O_2 und Glyoxylat im Chloroplasten umgesetzt werden kann. Die Linie GO 19 konnte dieser Messung auf Grund ihrer zu geringeren Größe nicht unterzogen werden.

3.3.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die GO Pflanzen in ambienten CO_2 -Konzentrationen weniger leistungsfähig und zudem in ihrer Entwicklung gegenüber dem Wildtyp verzögert waren. Die Ursache dafür konnte der transgenen Expression der Glykolat-Oxidase zugeordnet werden, deren beiden Produkte Glyoxylat und H_2O_2 in den Blättern von GO Pflanzen akkumulierten. Die hauptsächliche Verantwortlichkeit für den Phänotyp konnte allerdings noch nicht abschließend einem der beiden Metabolite zugeordnet werden, was im folgenden Abschnitt versucht werden soll. Für die in der Einleitung (1.2.6) vorgeschlagenen Stoffwechselwege wäre H_2O_2 als Ursache für den GO-Phänotyp ein großes Hindernis, denn für die Entfernung von H_2O_2 ist im Gegensatz zum Glyoxylat kein Enzym vorgesehen. In Ermangelung vielversprechender Alternativen zur Glykolat-Oxidase (4.5.5) wurde die Linie GO 5 mit einer genomischen Insertion (s. 3.1.2), einer GO-Aktivität von 32% über der des Wildtyps (3.2.1) und einem moderaten Phänotyp zur Verwendung in weiteren Kreuzungen und Transformationen ausgewählt.

3.4 Die Ursachen des GO-Phänotyps – Untersuchungen an doppelt transgenen Pflanzen unter variierenden Lichtstärken

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt dargelegt, konnte von Fahnenstich (2004) die Hauptursache des GO-Phänotyps (H_2O_2 oder Glyoxylat) nicht eindeutig bestimmt werden. Zur Klärung dieses Punktes und zur feineren Charakterisierung des GO-Phänotyps sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Versuche auch unter Einbeziehung doppelt transgener Pflanzen aus den vorher beschriebenen Ansätzen (1.2.6 & 2.6.2) durchgeführt werden, deren Ergebnisse im Folgenden vorgestellt werden.

Zuerst wird dabei auf die doppelt transgenen Pflanzen, die aus Kreuzungen und Transformationen der Linie GO 5 entstanden sind (2.6.2) und deren sichtbare Phänotypen eingegangen (3.4.1). Daran anschließend wird der Einfluss der Lichtstärke auf die Phänotypen der untersuchten Linien erläutert, und zwar aufgeteilt in die Auswirkungen auf den sichtbaren Phänotyp (3.4.2) und die Auswirkungen auf weitere physiologische Parameter (3.4.3). Die durchgeführten GC/MS Analysen zu den Auswirkungen der Hochlichtinkubation finden sich in Abschnitt 3.7.

3.4.1 GO & Co. – Sichtbare Phänotypen doppelt transgener Pflanzen

Für die Untersuchung der Frage, ob Glyoxylat oder H_2O_2 für den GO-Phänotyp hauptsächlich verantwortlich ist, sind doppelt transgene Pflanzen, die das nächste Enzym des Weges (1.2.6) zur Weiterverarbeitung von Glyoxylat tragen, besonders wichtig (2.6.2; 3.2). Sollte in ihren Blättern, bei gleichzeitiger Persistenz des GO-Phänotyps, kein Glyoxylat mehr akkumulieren, wäre dies ein eindeutiger Hinweis auf eine übermäßige Verantwortung des H_2O_2 für den retardierten GO-Phänotyp. Ebenso würde ein Verschwinden des Phänotyps in diesen Linien auf eine große Beteiligung des Glyoxylats am GO-Phänotyp schließen lassen.

3.4.1.1 Die GO-TSS Pflanzen

Um den ersten vorgeschlagenen Stoffwechselweg (GTT-Weg, 1.2.6) in *A. thaliana*-Pflanzen zu etablieren, wurden GO 5 Pflanzen mit TSS-Pflanzen gekreuzt (2.6.2). Die resultierenden GO-TSS Pflanzen werden hier kurz vorgestellt.

Die GO-TSS Pflanzen waren im Keimlingsstadium von den GO Pflanzen nicht zu unterscheiden (Abb. 14). Sie zeigten dieselbe gelbliche Blattfarbe und waren überwiegend von kleinerem Wuchs als der Wildtyp.

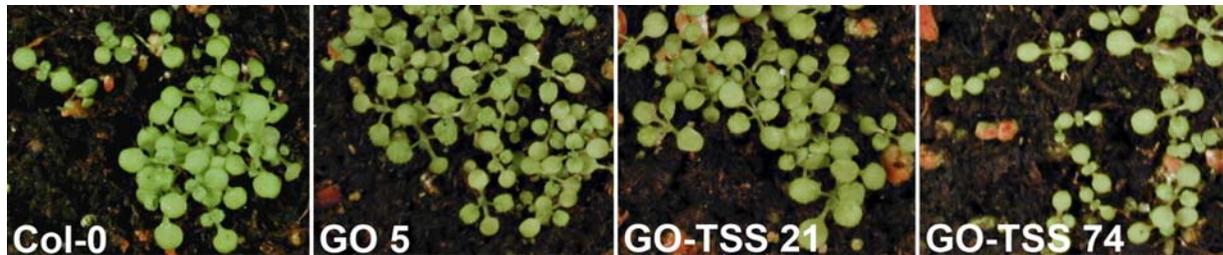


Abbildung 14: Zwei Wochen alte, im Langtag (Gewächshaus) gewachsene, Col-0, GO 5 und GO-TSS 21+74 Pflanzen im Vergleich.

Wurden die GO-TSS Pflanzen ab einem Alter von zwei Wochen weiterhin im Gewächshaus angezogen, entwickelten sie sich auch weitgehend wie die GO Pflanzen und zeigten die eindeutigen Merkmale dieses Phänotyps (Abb. 15).



Abbildung 15: Vier Wochen alte Col-0, GO-TSS und TSS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich.

Allerdings waren die Blätter der GO-TSS Pflanzen charakteristisch retikuliert gemustert (Abb. 16). Dies erinnerte an das Blattmuster der *DiT1*-Antisense-Pflanzen (Schneider et al. 2006). Auch die *DiT1*-Antisense-Pflanzen zeigten grüne Interkostalfelder und ausgebleichte Leitbündel.



Abbildung 16: Vergleich der Blätter von Col-0 und GO-TSS Pflanzen aus dem Gewächshaus in einem Alter von 5 Wochen.

DiT1 kodiert für einen Malat/2-Ketoglutarat-Antiporter in der inneren Plastidenhüllmembran und ist von daher auch mit der Photorespiration assoziiert. (1.2.2).

Wurden die GO-TSS und GO Pflanzen aber ab einem Alter von zwei Wochen in eine Klimakammer transferiert, so entwickelten sich die Pflanzen ein wenig anders:

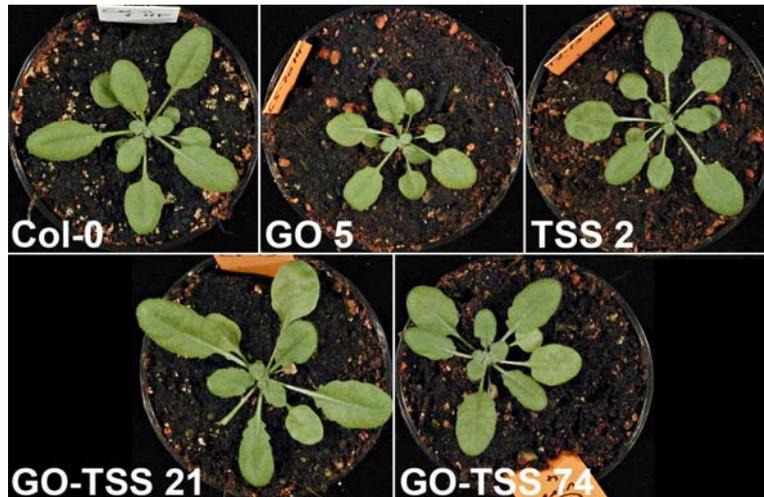


Abbildung 17: 5 Wochen alte, ab einem Alter von zwei Wochen in der Klimakammer (Langtag, 50µE) gewachsene, Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen im Vergleich.

Der Phänotyp der Pflanzen in Abbildung 17, die ab einem Alter von 14 Tagen in den kontrollierten Bedingungen einer Klimakammer (Langtag, 50 µE) angezogen wurden, deutet darauf hin, dass die Expression der Tartronat-Semialdehyd-Synthase (TSS) im GO-Hintergrund unter diesen Bedingungen durchaus zu einer Verbesserung des Phänotyps führen kann. Die GO-TSS Pflanzen der Linien 21+74 waren größer als die GO-Pflanzen, aber in der Summe doch noch etwas kleiner als der Wildtyp. Die TSS Pflanzen hingegen waren unter allen untersuchten Bedingungen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

3.4.1.2 Die GO-MS Pflanzen

Der zweite vorgeschlagene Stoffwechselweg (GMM-Weg, 1.2.6), fordert zunächst die Expression der Malat-Synthase (MS) im GO-Hintergrund, und so wurden GO 5 Pflanzen mit dem MS-Konstrukt (→ **GO5-MS**) und MS 4 Pflanzen mit dem GO Konstrukt (→ **GO-MS**, s. 2.6.2 & 2.5.3) transformiert. Die resultierenden homozygoten GO-MS und GO5-MS Pflanzen werden hier kurz vorgestellt.



Abbildung 18: Fünf Wochen alte GO und GO-MS Pflanzen, die in einer Klimakammer (120 μ E, Kurztag) gewachsen waren, im Vergleich.

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, zeigen die GO-MS Pflanzen unter den gegebenen Bedingungen (Kurztag, 120 μ E) eine leichte Abschwächung des GO-Phänotyps, der unter diesen Bedingungen allerdings stark ausgeprägt war. Unter Langtagbedingungen im Gewächshaus wurde ebenfalls deutlich, dass die GO-MS Pflanzen keine oder höchstens eine geringfügige Verbesserung des Phänotyps gegenüber den GO Pflanzen aufweisen (nicht gezeigt). Sie wuchsen wie die GO Pflanzen langsamer als der Wildtyp und zeigten eine gelblichere Blattfarbe, allerdings war der Phänotyp dort bei den GO wie den GO-MS Pflanzen nicht so stark ausgeprägt wie in den für Abbildung 18 gewählten Bedingungen.

3.4.1.3 Fazit

Die GO-MS und die GO-TSS Pflanzen zeigen von den äußeren Merkmalen her keine durchschlagende Veränderung oder gar Verbesserung des GO-Phänotyps. Die MS und TSS Pflanzen dagegen sind unter den gewählten Bedingungen äußerlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

3.4.2 Einfluss der Lichtstärke auf den Phänotyp von GO und doppelt transgenen Pflanzen

Die im vorigen Abschnitt erwähnten unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich des Phänotyps der GO, GO-MS und GO-TSS Pflanzen in den Klimakammern einerseits und dem Gewächshaus andererseits, lassen vermuten, dass die Stärke des GO-Phänotyps in gewissen Grenzen variabel ist, abhängig von äußeren Bedingungen. In diesem Zusammenhang, eingedenk der Überlegungen zu den PAM-Ergebnissen (3.3.2), scheint die Lichtintensität der wahrscheinlichste Kandidat für den

modulierenden Faktor auf den Phänotyp zu sein, besonders weil diese im Gewächshaus stark fluktuiert (2.2.2.1 & 3.9) und somit auch sehr hohe Bereiche erreicht, wohingegen in der Klimakammer keine Schwankungen auftreten. Im Gegensatz dazu sind Luftfeuchtigkeit und Temperatur sowohl im Gewächshaus als auch in der Klimakammer gut kontrollierbar und zudem ähnlich (2.2.2).

Diese Überlegungen führten zu einer Reihe von Experimenten, bei denen die Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien verschiedenen Lichtintensitäten ausgesetzt und beobachtet wurden. In diesem Abschnitt wird nun die Variabilität der äußeren Merkmale des GO-Phänotyps bei wechselnden Lichtverhältnissen beleuchtet.

Zuerst wurden in diesem Zusammenhang GO Pflanzen im Alter von vier Wochen in eine Phytokammer transferiert, in der hohe Lichtintensitäten (600 μE , s. 2.2.3.2) erreicht wurden. Diese Lichtintensität liegt bereits in dem Bereich, in dem die GO Pflanzen in den PAM-Messungen (3.3.2) deutlich niedrigere Elektronentransportraten als der Wildtyp aufwiesen.



Abbildung 19: Col-0 und GO Pflanzen, die im Alter von 4 Wochen aus dem Gewächshaus in Hochlichtbedingungen (600 μE , 16:8 h Licht/Dunkel) transferiert wurden, fotografiert im Abstand von jeweils etwa einer Woche.

In diesem Experiment fiel auf, dass die Blätter der GO Pflanzen während der ersten Tage nach dem Transfer in Hochlichtbedingungen ausbleichen (Abb. 19) und an einigen Stellen Nekrosen bildeten (Abb. 20 & 21), die auf oxidative Schädigungen zurückzuführen waren (Landry et al. 1995; Bouche et al. 2003). Im Gegensatz dazu zeigten die Blätter des Wildtyps keine Schädigungen, sondern akkumulierten als Stressantwort (Vanderauwera et al. 2005) von Beginn an Anthocyane und wurden somit immer dunkler. Die Anthocyan synthese schien bei den GO Pflanzen gehemmt (vgl. Abb. 22), so dass sie während der ersten zwei Wochen im Hochlicht kaum Schutzpigmente synthetisierten, und wiederum waren die genannten Eigenschaften besonders ausgeprägt bei der Linie GO 19 mit den zwei genomischen Insertionen (vgl. 3.3). Allerdings überlebten alle GO Pflanzen diese Behandlung und bildeten Samen aus.



Abbildung 20: Col-0, GO, GO-TSS und TSS Pflanzen im Alter von fünf Wochen, die teils vollständig im Gewächshaus, teils seit 10 Tagen bei 600 μ E (16:8 h Licht/Dunkel) angezogen wurden.

Die doppelt transgenen GO-TSS und GO-MS Pflanzen (3.4.1) verhielten sich unter Hochlichtbedingungen wie die GO Pflanzen. Sie blichen aus und akkumulierten im Gegensatz zum Wildtyp keine Anthocyane (Abb. 20 & 21). Es war also auch unter diesen Bedingungen keine Verbesserung des GO-Phänotyps durch die Einführung der zusätzlichen Aktivitäten zu erkennen.



Abbildung 21: Vergleich von Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen, die unter verschiedenen Lichtintensitäten angezogen wurden und mit Hochlicht behandelt wurden. Alle Lichtintensitäten wurden unter Langtagbedingungen in Klimakammern eingestellt.

Der visuelle Eindruck, nach dem die GO Pflanzen unter Hochlichtbedingungen keine Anthocyane akkumulierten, konnte durch eine Quantifizierung dieser in Blattextrakten von Col-0, MS, GO und GO-MS Pflanzen bestätigt werden (Abb. 22). Dies ist im

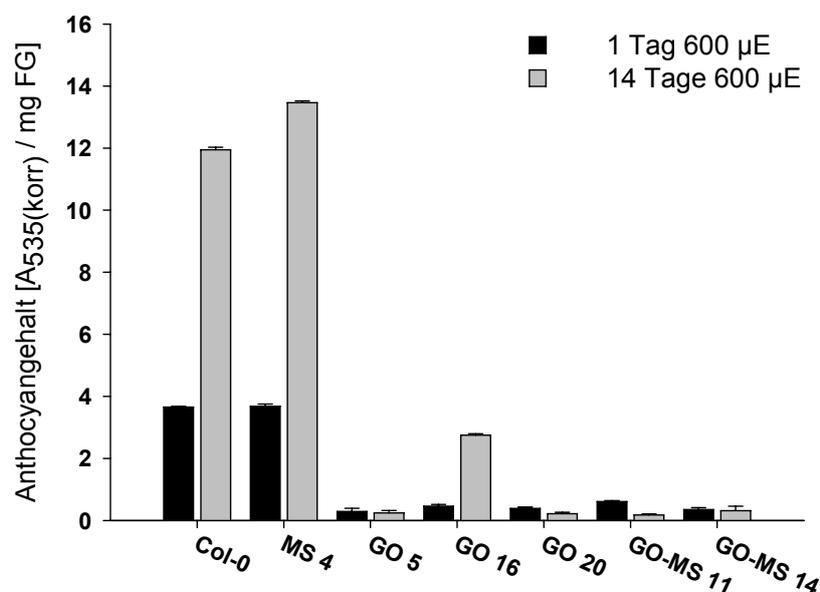


Abbildung 22: Anthocyaninhalte in Blattextrakten von Col-0, GO, GO-MS und MS Pflanzen, die bis zu einem Alter von 4 Wochen bei 30 µE angezogen (Langtag) und dann auf 600 µE Hochlicht transferiert wurden (s. Abb. 21). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus n=3 Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Zusammenhang mit der Suche nach der Ursache des GO-Phänotyps besonders interessant, da bereits mehrfach berichtet wurde, dass oxidativer Stress, besonders durch H_2O_2 , die Anthocyan synthese inhibiert (Vanderauwera et al. 2005; Miller et al. 2007).

Wurden GO und GO-MS Pflanzen hingegen unter sehr niedrigen Lichtintensitäten (30 μE , Abb. 21) angezogen, verschwand der charakteristische GO-Phänotyp. Die GO Pflanzen hatten unter diesen Bedingungen dieselbe Blattfarbe und erreichten dieselbe Größe wie die Wildtyppflanzen.

Es kann also zusammenfassend gesagt werden, dass der GO-Phänotyp in der Stärke seiner Ausprägung in hohem Maße von der angewandten Lichtstärke abhängig ist. So führte eine sehr niedrige Lichtstärke (30 μE , Abb. 21) zu einem nahezu vollständigen Verschwinden des Phänotyps, eine moderate Lichtstärke (75 μE , Abb. 10, 20 & 21) zu kleineren, gelblicheren Pflanzen und schließlich eine hohe Lichtstärke (600 μE , Abb. 19-21) zu nekrotischen Läsionen durch oxidative Schäden und einer behinderten Stressantwort (Abb. 19 & 22).

3.4.3 Einfluss der Lichtstärke und der Expression des zweiten Transgens auf physiologische Parameter

Die beobachtete Verstärkung des GO-Phänotyps unter Konditionen mit höheren Beleuchtungsstärken sollte auf physiologischer Ebene näher untersucht werden, um die Ursache dieses Phänomens zu ergründen. Da die Daten von doppelt transgenen Pflanzen, die bereits das nächste (s. 1.2.6) Glyoxylat-metabolisierende Enzym enthalten, in diesem Zusammenhang sehr hilfreich sein könnten, wurden sie in die Untersuchungen mit einbezogen.

3.4.3.1 Akkumulation von Glyoxylat

Zuerst stellte sich die Frage, inwieweit die Produkte der GO-Reaktion (H_2O_2 und Glyoxylat) in dem Gewebe der transgenen Pflanzen unter den verschiedenen Bedingungen akkumulierten.

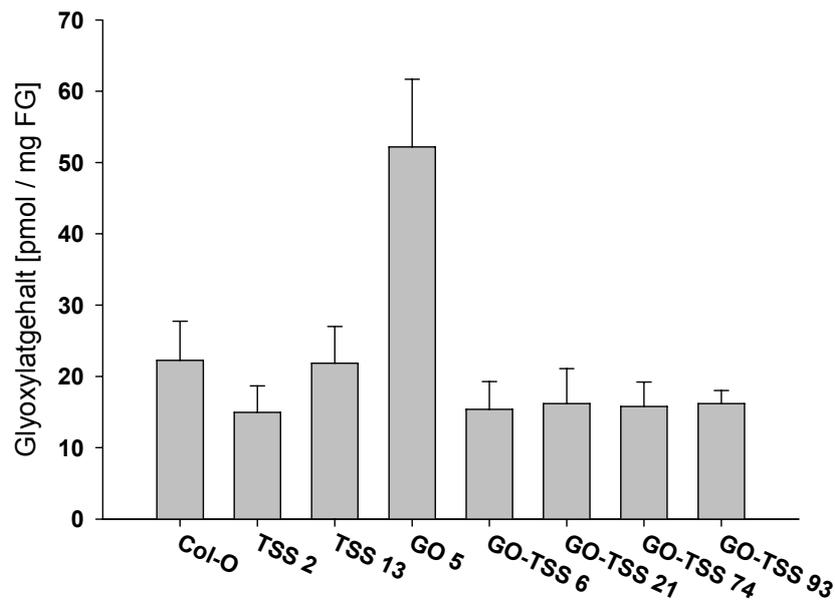


Abbildung 23: Glyoxylat-Gehalte von 5 Wochen alten Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen aus dem Gewächshaus im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler, Probennahme fand um 14 Uhr statt.

Für die GO-TSS Pflanzen konnte die durch die Messung des Glyoxylat-Gehalts in Pflanzen aus dem Gewächshaus indirekt die Funktionalität der eingeführten TSS nachgewiesen werden, da sie wieder mit dem Wildtyp Col-0 ($22,25 \pm 5,47$ pmol/mg FG) vergleichbare oder sogar etwas niedrigere Gehalte (GO-TSS 6: $15,37 \pm 3,9$ pmol/mg FG) aufwiesen, wohingegen die GO-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp etwa 2,5-fach erhöhte Glyoxylat-Gehalte ($52,18 \pm 9,47$ pmol/mg FG) akkumulierten (Abb. 23).

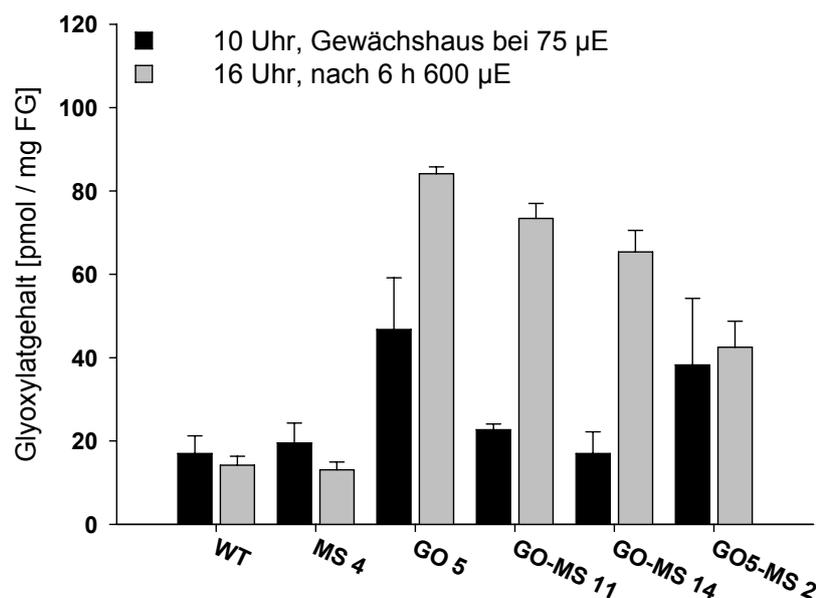


Abbildung 24: Glyoxylat-Gehalte 5 Wochen alter Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) und nach 6 h Hochlichtbehandlung bei $600 \mu\text{E}$ im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Bei den GO-MS Pflanzen zeichnete sich bezüglich der Glyoxylat-Gehalte ein ähnliches Bild zu den GO-TSS Pflanzen. So wiesen auch die GO-MS Pflanzen mit Ausnahme derer der Linie GO5-MS 2 unter Gewächshausbedingungen niedrigere Glyoxylat-Gehalte (GO-MS 14: $16,99 \pm 5,2$ pmol/mg FG) als die GO Pflanzen ($46,74 \pm 12,4$ pmol/mg FG) auf, die etwa auf der Höhe des Wildtypwertes ($16,99 \pm 4,24$ pmol/mg FG) waren.

Wurden die Gehalte nach sechsständiger Inkubation bei $600 \mu\text{E}$ erneut ermittelt, zeigte sich, dass die GO-MS Pflanzen trotz der MS-Aktivität mehr Glyoxylat (GO-MS 14: $65,35 \pm 5,18$ pmol/mg FG) als der Wildtyp ($14,16 \pm 2,17$ pmol/mg FG) akkumulierten, aber dennoch signifikant unter den Gehalten der GO Pflanzen ($84,15 \pm 1,6$ pmol/mg FG) blieben (Abb. 24).

3.4.3.2 Akkumulation von H_2O_2

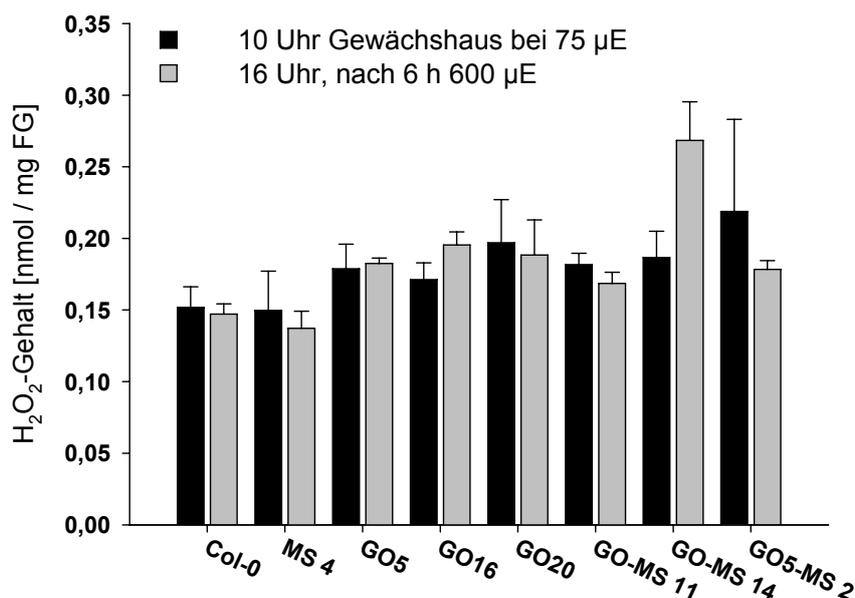


Abbildung 25: H_2O_2 -Gehalte 5 Wochen alter Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) und nach 6 h Hochlichtbehandlung bei $600 \mu\text{E}$ im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler

Der Gehalt des zweiten Produkts der GO-Reaktion, H_2O_2 , war unter Gewächshausbedingungen in GO (GO 5: $0,179 \pm 0,017$ nmol/mg FG) und GO-MS (GO-MS 14: $0,182 \pm 0,008$ nmol/mg FG) Pflanzen gleichermaßen gegenüber dem Wildtyp ($0,152 \pm 0,014$ nmol/mg FG) erhöht. Allerdings zeigte sich, im Gegensatz zum Glyoxylat (Abb. 24), keine Erhöhung der H_2O_2 -Gehalte nach 6 h Hochlicht in den untersuchten Linien (Ausnahme: GO-MS 14). Also waren auch nach dieser

Behandlung die Unterschiede zwischen GO, GO-MS und Wildtyppflanzen und die absoluten Gehalte ungefähr genauso groß wie im Gewächshaus (Abb. 25).

3.4.3.3 Superoxid-Dismutase (SOD)

H₂O₂ kann als Produkt der Reaktion der SOD (Cakmak und Marschner 1992; Kliebenstein et al. 1998) das Reaktionsgleichgewicht dieser mehr auf die Seite der Superoxidanionen verlagern, was zur Bildung von Hydroxylradikalen führen kann (Asada 2000), die massive oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren hervorrufen (Berlett und Stadtman 1997; Noctor et al. 2000; Kimura et al. 2001).

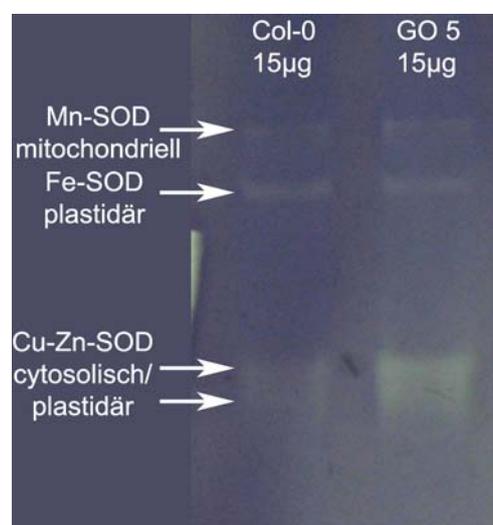


Abbildung 26: Natives Gel, gefärbt für SOD-Aktivität mit Proteinextrakten aus fünf Wochen alten Col-0 und GO-Pflanzen aus dem Langtag (60µE), die 6 h mit 200 µE Hochlicht behandelt worden sind.

Die Gewichtsangaben beschreiben die aufgetragene Proteinmenge, die Angaben links vom Gel ordnen den Banden die einzelnen SOD-Isoformen zu.

Die SOD-Aktivität ihrerseits scheint durch oxidativen Stress positiv reguliert zu sein (Cakmak und Marschner 1992). Dies war der Grund, in Proteinextrakten von Hochlicht-behandelten GO und Col-0 Pflanzen die SOD-Aktivität semi-quantitativ zu untersuchen (Abb. 26), denn eine höhere Aktivität der SOD würde auch auf ein höheres Maß an oxidativem Stress hindeuten. In der Tat wurde in den Extrakten der GO Pflanzen eine stärkere Bande, also eine höhere Aktivität, bei den Cu/Zn SOD gefunden, von denen cytosolische und plastidäre Isoformen existieren (Kliebenstein et al. 1998).

3.4.3.4 Integrität und Leistung der Photosysteme

H_2O_2 , das Superoxidanion und das Hydroxylradikal werden als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Produktion von ROS im Chloroplasten das D1 Protein des Photosystems II (PSII) schädigen kann (Krause 1991; Asada 2000) bzw. dessen Reparatur blockieren kann (Nishiyama et al. 2006; Murata et al. 2007). Die Integrität des D1 Proteins bzw. des PSII lässt sich mit Hilfe des F_V/F_M Verhältnisses (s. 2.8.1) bestimmen (Krause 1991).

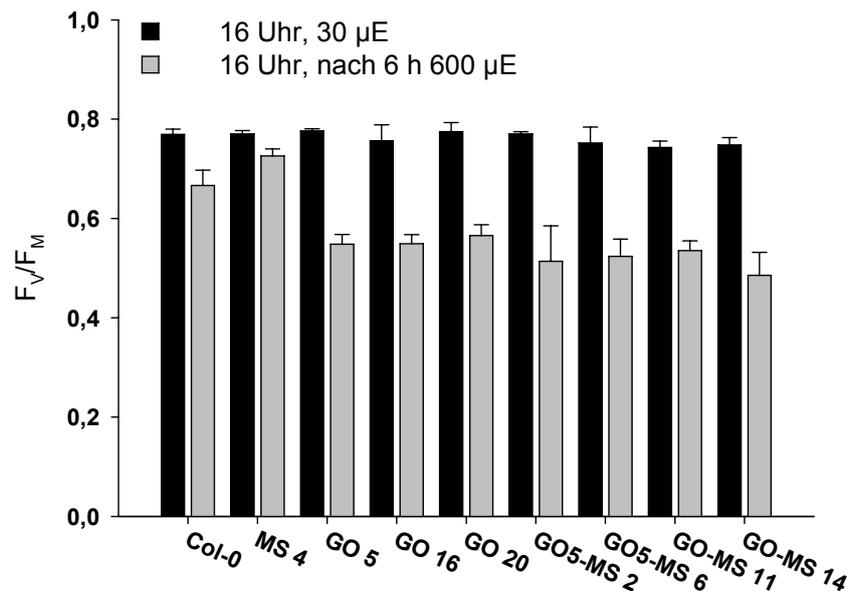


Abbildung 27: F_V/F_M -Verhältnisse von Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen, die bei 30 μE im Langtag angezogen wurden und denselben Pflanzen nach 6 h Hochlicht von 600 μE im Vergleich.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 8$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Aus Abbildung 27 wird deutlich, dass alle untersuchten GO (GO5: $0,55 \pm 0,02$) und GO-MS (GO5-MS 6: $0,52 \pm 0,03$) Pflanzen nach einer sechsstündigen Inkubation unter 600 μE Hochlicht deutlich niedrigere F_V/F_M Verhältnisse und damit eine höhere Photoinhibition (Aro et al. 1993; Nishiyama et al. 2006) als die Wildtyppflanzen ($0,67 \pm 0,02$) bzw. die Pflanzen der Linie MS 4 ($0,72 \pm 0,01$) zeigten. Im Gegensatz dazu waren die F_V/F_M -Verhältnisse der untersuchten Linien vor der Hochlichtanwendung nicht zu unterscheiden.

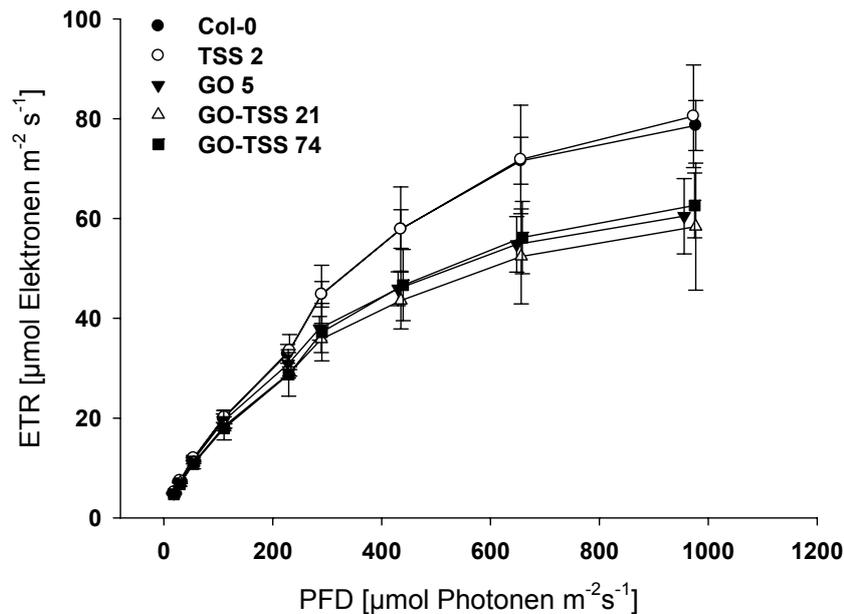


Abbildung 28: Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) fünf Wochen alter Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen aus dem Gewächshaus während einer Lichtreihe. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Eine Inhibition des Photosystems II bei Hochlichtbedingungen wäre auch eine gute Erklärung für die niedrigen photosynthetischen Elektronentransportraten bei hohen Lichtintensitäten, wie sie schon bei den GO Pflanzen beobachtet wurden (Abb. 13). Auch die GO-TSS Pflanzen zeigten etwa ebenso hohe ETR wie die GO Pflanzen, wobei bei den TSS Pflanzen keine Veränderung zum Wildtyp zu erkennen war (Abb. 28).

3.4.3.5 Synthese von Speicherstoffen

A. thaliana-Pflanzen akkumulieren als höhere Pflanzen während des Tages transitorische Stärke in ihren Chloroplasten, die während der Nacht zur Aufrechterhaltung des Metabolismus im Dunkeln wieder abgebaut wird (Preiss 1982; Beck und Ziegler 1989; Weise et al. 2006; Zeeman et al. 2007). Studien an Mutanten für die Stärkesynthese (Caspar et al. 1985; Lin et al. 1988) haben gezeigt, dass die Akkumulation von Stärke zwar nicht lebenswichtig für die Pflanzen ist, aber einen großen Effekt auf das Wachstumsverhalten hat (Schulze et al. 1991). Aus diesem Grund wurde der Gehalt von Stärke in GO, TSS und doppelt transgenen GO-TSS Pflanzen bestimmt.

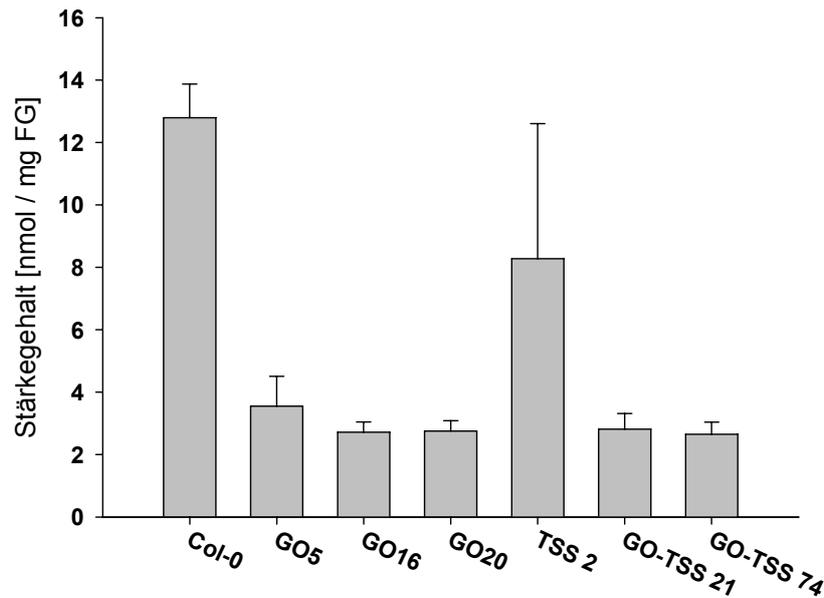


Abbildung 29: Stärkegehalte von 5 Wochen alten Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich
Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus n=3 Einzelmessungen \pm Standardabweichung, die Probenahme war 7 h nach Beginn der Lichtperiode.

Dabei war deutlich zu erkennen (Abb. 29), dass die GO und auch die GO-TSS Pflanzen erheblich weniger Stärke akkumulierten als der Wildtyp Col-0 und die TSS Pflanzen, wobei bei den letzteren der Messfehler recht hoch war. Für die GO-MS Pflanzen wurde ein qualitativer Stärkenachweis mit Lugol'scher Lösung durchgeführt, dessen Ergebnis unter 3.7.2 (Abb. 45) dargestellt ist.

3.4.4 Einfluss der Lichtstärke und der Expression des zweiten Transgens auf den Primärmetabolismus

Im Rahmen der Charakterisierung der doppelt transgenen Pflanzen und der Beschreibung der Hochlichtwirkung wurden auch Analysen des Primärmetabolismus unter verschiedenen Bedingungen mittels GC/MS (s. 2.12) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente werden, der besseren Übersichtlichkeit wegen, im Kapitel über die GMK Pflanzen (3.7) aufgeführt, die ebenfalls untersucht wurden.

3.5 Die Linien des GO-TSS-TSR (GTT) Weges im Vergleich

Der GTT-Weg ist der erste der beiden postulierten Ansätze zur Verminderung der photorespiratorischen Verluste (1.2.6). Die Summenformel der Reaktionen lautet:



Es konnten im Verlauf dieser Arbeit Pflanzen erstellt werden, die den Stoffwechselweg vollständig etabliert hatten und nun kurz vorgestellt werden sollen.

3.5.1 Wachstum und Entwicklung

Die Pflanzen, die alle drei Gene des ersten großen Ansatzes (GTT, 1.2.6) enthielten, wurden erzeugt, indem GO-TSS Pflanzen der Linien 21 und 74 (2.6.2 & 3.4) mit dem TSR-Konstrukt transformiert wurden. Die Pflanzen, die homozygot für alle drei Transgene waren und zudem die zugehörigen Enzymaktivitäten zeigten (3.2), wurden zu einer ersten Charakterisierung im Gewächshaus angezogen.



Abbildung 30: Fünf Wochen alte Col-0, GO und GTT Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich.

Dabei (Abb. 30) zeigte sich jedoch recht schnell, dass bei den GTT Pflanzen zwar der GO-Phänotyp etwas abgeschwächt war, aber die Pflanzen dennoch nicht die Größe des Wildtyps erreichten oder gar größer als dieser waren. Die Verbesserung gegenüber den GO Pflanzen war dergestalt, dass die Blattfarbe der GTT Pflanzen wieder ein dem Wildtyp ähnliches Grün darstellte und die GTT Pflanzen zudem größer waren als die GO Pflanzen.



Abbildung 31: Sechs Wochen alte Col-0, GO und GTT Pflanzen aus dem Kurztag (75 μE).

Besonders ausgeprägt waren diese Eigenschaften, wenn die Pflanzen unter Kurztagbedingungen in der Klimakammer (Abb. 31) angezogen wurden.

3.5.2 Photosynthetische Eigenschaften

Da die GTT Pflanzen eine leichte Verbesserung des Phänotyps gegenüber den GO Pflanzen zeigten, stellte sich die Frage, ob diese Verbesserung auch in den photosynthetischen Eigenschaften wahrnehmbar ist.

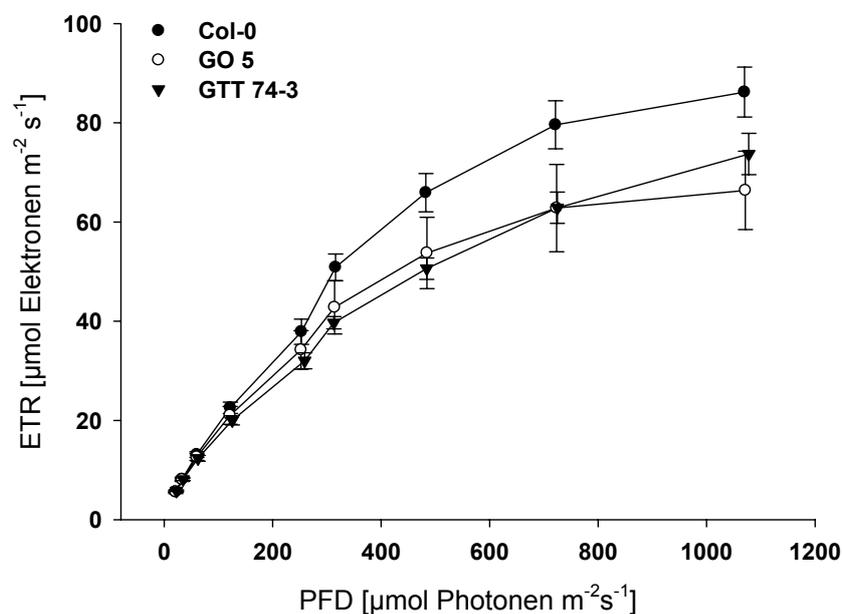


Abbildung 32: Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) fünf Wochen alter Col-0, GO und GTT Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) während einer Lichtreihe. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Allerdings konnte bei der Messung der Elektronentransportraten während einer Lichtreihe keine bessere Leistungsfähigkeit der GTT Pflanzen verglichen mit den GO Pflanzen erkannt werden (Abb. 32). Allenfalls bei sehr hohen Lichtintensitäten

(>1000 μE) könnte eine leichte Überlegenheit der GTT Pflanzen vorhanden gewesen sein, die jedoch nicht über die Fehlerbereiche hinausging.

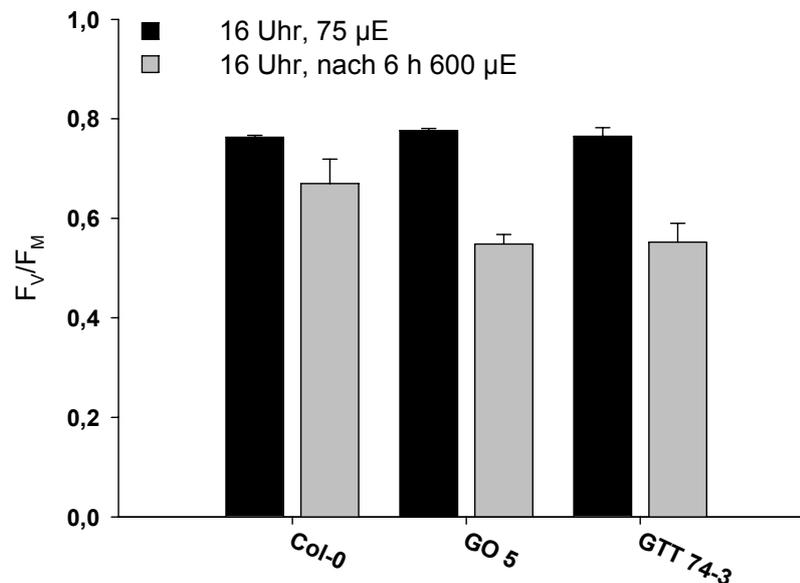


Abbildung 33: F_V/F_M -Verhältnisse von Col-0, GO, und GTT Pflanzen, die bei 75 μE im Langtag angezogen wurden und denselben Pflanzen nach 6 h Hochlicht mit 600 μE im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Eine bessere photosynthetische Leistung der GTT Pflanzen bei hohen Lichtintensitäten erscheint allerdings nicht mehr plausibel, wenn die Ergebnisse aus Abbildung 33 in Betracht gezogen werden. So konnte bei den GTT Pflanzen nach sechs Stunden Hochlichtbehandlung bei 600 μE das gleiche gegenüber dem Wildtyp erhöhte Maß an Photoinhibition (s. 3.4.3.4) wie bei den GO Pflanzen ermittelt werden.

3.5.3 Fazit

Die GTT Pflanzen zeigten zwar im Gewächshaus und besonders unter Kurztagbedingungen in der Klimakammer eine Verbesserung des Phänotyps gegenüber den GO Pflanzen, jedoch erreichten sie nicht die Größe des Wildtyps oder waren gar größer als dieser (Abb. 30 & 31). Weiterhin wurden bei den GTT Pflanzen keine Verbesserungen der photosynthetischen Leistungsfähigkeit oder der Hochlichtsensitivität verglichen mit den GO Pflanzen erkannt (Abb. 32 & 33). Aus den genannten Gründen wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.6 Die Linien des GO-MS-ME (GMM) Weges im Vergleich

Der GMM-Weg ist der zweite der beiden vorgeschlagenen Wege zur Verminderung der Verluste durch Photorespiration (s. 1.2.6). Die Summenformal des GMM-Weges lautet:



Auch für den GMM-Weg konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Pflanzen erstellt werden, die diesen vollständig etabliert hatten und die nun kurz charakterisiert werden sollen.

3.6.1 Wachstum und Entwicklung

Die Pflanzen, die alle drei Gene des zweiten großen Ansatzes (GMM, 1.2.6) enthielten, wurden erzeugt, indem GO-ME Pflanzen der Linien 25 und 60 (2.6.2) mit dem MS-Konstrukt transformiert wurden. Das Wachstum der homozygoten Pflanzen wurde, nachdem die Enzymaktivitäten der transgen exprimierten Proteine bestätigt wurden (3.2), an Pflanzen im Gewächshaus verfolgt.



Abbildung 34: Fünf Wochen alte Col-0, GO und GMM Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich.

Dabei stellte sich heraus, dass die GMM Pflanzen deutlich größer wuchsen als die GO Pflanzen und etwa die Größe der Wildtyppflanzen erreichten (Abb. 34). Die Blattfarbe der GMM Pflanzen kann als blasses Grün beschrieben werden, ähnlich dem der ME Pflanzen (s. 3.8).

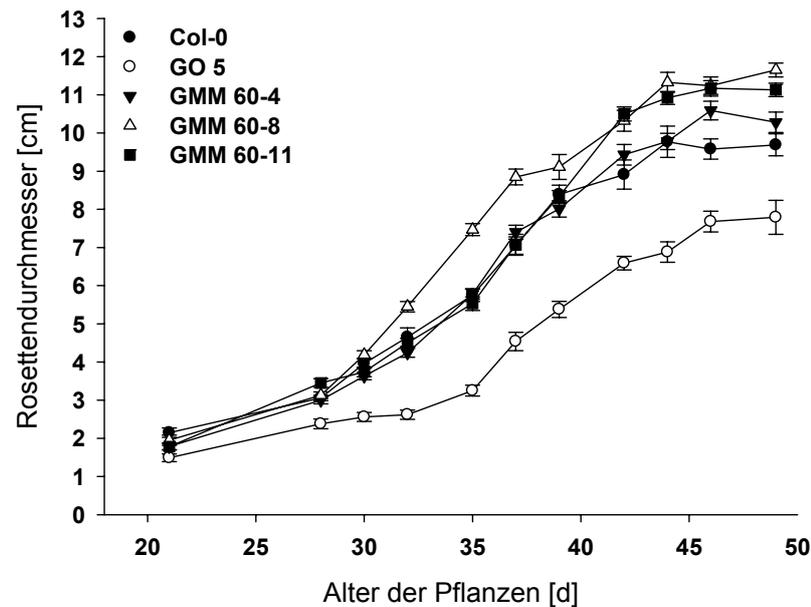


Abbildung 35: Rosettendurchmesser der Col-0, GO und GMM Pflanzen im Verlauf der Pflanzenentwicklung im Langtag (Gewächshaus) im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 10$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Um jedoch eine genauere Aussage hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der GMM Pflanzen treffen zu können, wurden deren Rosettendurchmesser über einen Zeitraum von vier Wochen ab einem Alter von 21 Tagen protokolliert (Abb. 35). Die gewonnenen Daten erlauben die Aussage, dass die GMM Pflanzen in der Mehrheit (GMM 60-8 war etwas größer) bis Tag 40 keine Wachstumsunterschiede zum Wildtyp zeigten. Danach jedoch nahm ihr Rosettendurchmesser noch einige Tage zu, während der des Wildtyps stagnierte, und so waren die GMM Pflanzen am Ende des Beobachtungszeitraums größer als die des Wildtyps Col-0.

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf des Anteils blühender Pflanzen an der Gesamtpopulation der jeweiligen GMM und Col-0 Linien im Gewächshaus

| Linie | Alter der Pflanzen | | | |
|-----------|--------------------|----------|----------|----------|
| | 4 Wochen | 5 Wochen | 6 Wochen | 7 Wochen |
| Col-0 | 0% | 61% | 100% | 100% |
| GO 5 | 0% | 14% | 82% | 98% |
| GMM 60-4 | 0% | 30% | 93% | 100% |
| GMM 60-8 | 0% | 37% | 95% | 100% |
| GMM 60-11 | 0% | 14% | 93% | 100% |

Hinsichtlich des Zeitpunkts des Übergangs von der vegetativen in die generative Phase war bei den GMM Pflanzen allerdings keine Veränderung gegenüber den GO Pflanzen zu erkennen (Tab. 5). Ebenso wie diese blühten die GMM Pflanzen später als der Wildtyp (Tab. 4).

Hinsichtlich der Größe der GMM Pflanzen ergab sich aber ein anderes Bild, wenn die Pflanzen unter Kurztagbedingungen angezogen wurden.

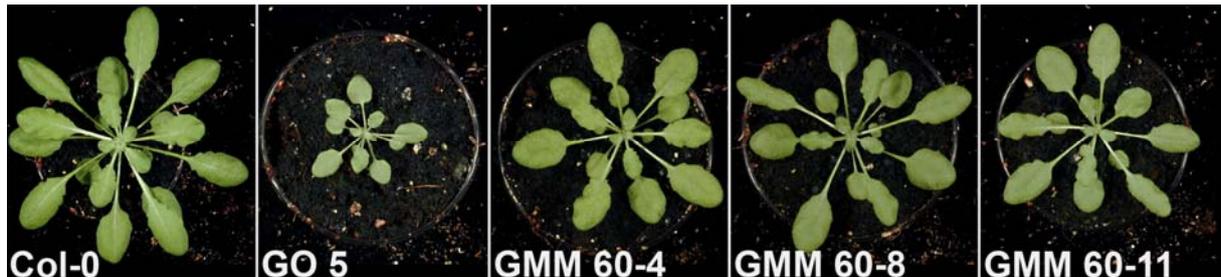


Abbildung 36: Sechs Wochen alte Col-0, GO und GMM Pflanzen, die ab einem Alter von 14 Tagen im Kurztag (75 μ E) gewachsen waren.

Unter Kurztagbedingungen (Abb. 36) waren die GMM Pflanzen zwar immer noch deutlich größer als die GO Pflanzen, erreichten jedoch nicht mehr die Größe der Wildtyppflanzen und zeigten zudem eine noch weiter ausgebleichte Blattfarbe, vergleichbar mit dem bei den ME Pflanzen beobachteten Kurztagphänotyp (s. 3.8).

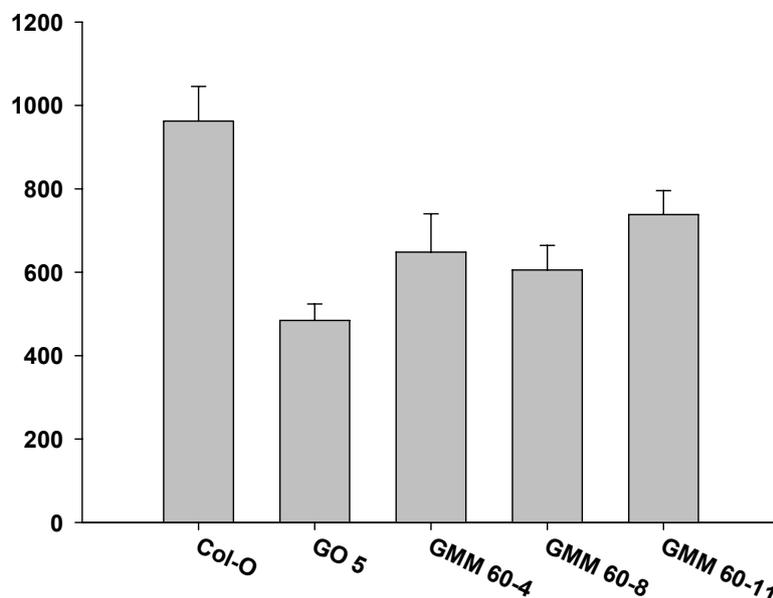


Abbildung 37: Frischgewicht 7 Wochen alter Col-0, GO und GMM Pflanzen, die ab einem Alter von 14 Tagen im Kurztag (75 μ E) gewachsen waren, im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=5$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Der geringere Wuchs unter Kurtagbedingungen konnte auch durch die Messung des Frischgewichts sieben Wochen alter Pflanzen bestätigt werden (Abb. 37). So waren

die Rosetten der GMM Pflanzen (GMM 60-11: $738,2 \pm 57,3$ mg) zwar schwerer als die der GO Pflanzen ($484,5 \pm 39,3$ mg), aber deutlich leichter als die des Wildtyps Col-0 ($962,4 \pm 82,9$ mg).

3.6.2 Photosynthetische Eigenschaften

Ebenso wie bei den GTT Pflanzen stellte sich bei den GMM Pflanzen die Frage, ob neben der hier beobachteten Verbesserung des Wachstums gegenüber den GO Pflanzen auch eine Verbesserung der Effizienz der Lichtreaktionen der Photosynthese nachgewiesen werden kann.

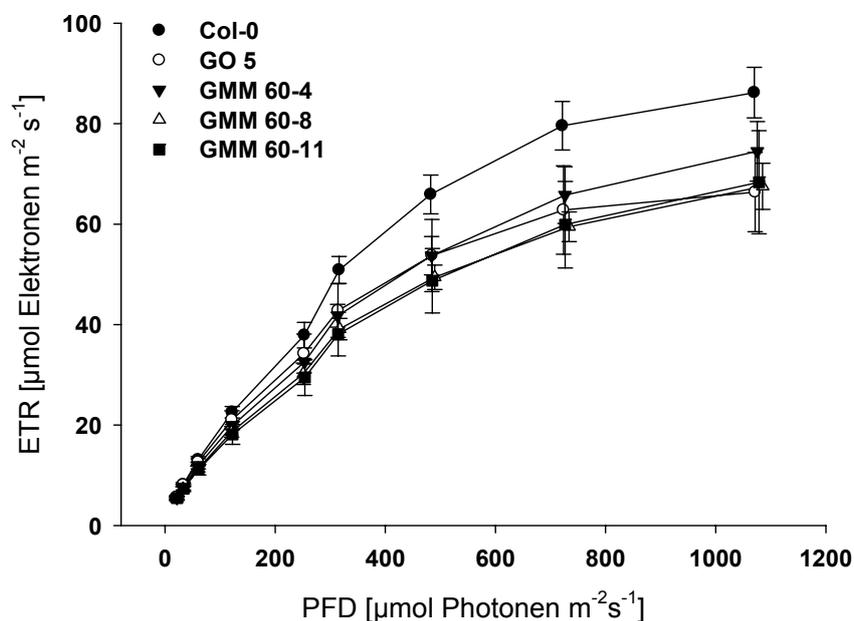


Abbildung 38: Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) fünf Wochen alter Col-0, GO und GMM Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) während einer Lichtreihe. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Allerdings konnte auch bei den GMM Pflanzen keine generelle, signifikante Verbesserung des photosynthetischen Elektronentransports (ETR), besonders bei hohen Lichtintensitäten, gegenüber den GO Pflanzen festgestellt werden (Abb. 38).

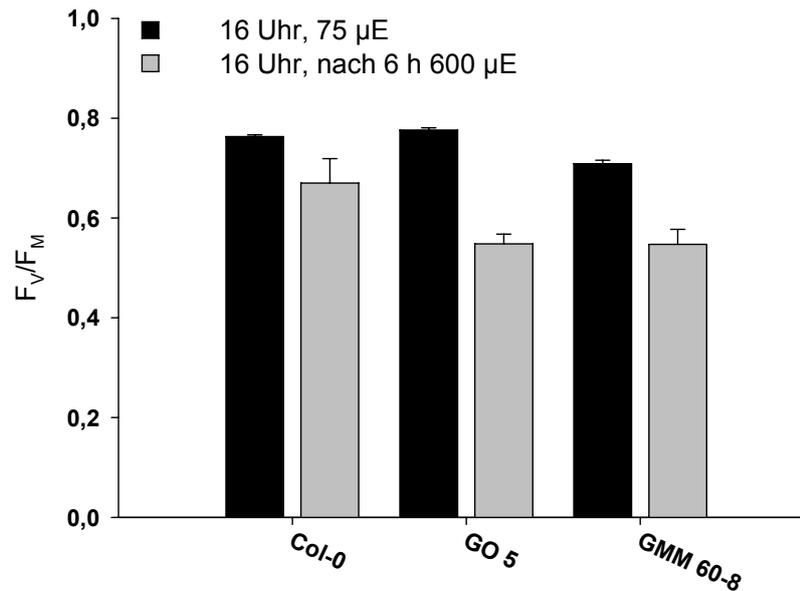


Abbildung 39: F_v/F_m -Verhältnisse von Col-0, GO, und GMM Pflanzen, die bei 75 μ E im Langtag angezogen wurden und von denselben Pflanzen nach 6 h Hochlicht bei 600 μ E im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Auch hinsichtlich der Photoinhibition (vgl. 3.4.3.4) nach sechsständiger Inkubation bei 600 μ E Hochlicht zeigten die GMM Pflanzen keine Verbesserung gegenüber den GO Pflanzen (Abb. 39).

3.6.3 Synthese von Speicherstoffen

Aus den bereits in 3.4.3.5 genannten Gründen wurden die GMM Pflanzen aus dem Gewächshaus, die verglichen mit den GO Pflanzen ein gutes Wachstum zeigten, einer Stärkebestimmung unterzogen.

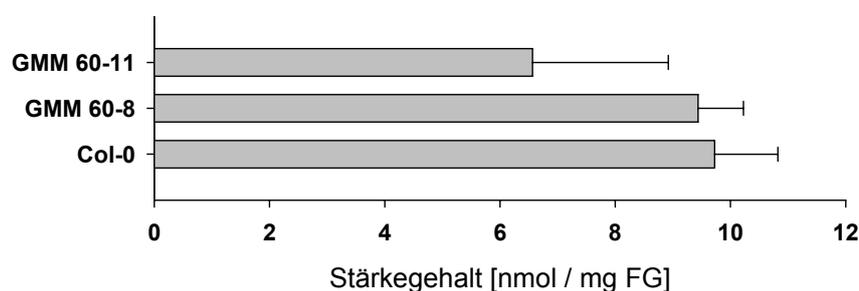


Abbildung 40: Stärkegehalt von fünf Wochen alten Col-0 und GMM Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung, Probennahme war 7 h nach Beginn der Lichtperiode.

Die hierbei ermittelten Werte zeigten, dass die Expression der MS und ME im GO Hintergrund die Akkumulation von Stärke während des Tages wieder knapp auf

Wildtypniveau heben kann (vgl. 3.4.3.5). So erreichten die Pflanzen der Linie GMM 60-8 den gleichen Stärkegehalt wie der Wildtyp, die Pflanzen der Linie GMM 60-11 jedoch nicht ganz, wobei auch ein recht großer Meßfehler zu verzeichnen war (Abb. 40).

3.6.4 Fazit

Die GMM Pflanzen zeigten unter Gewächshausbedingungen eine deutliche Verbesserung des Wachstums gegenüber den GO Pflanzen und übertrafen ab einem Alter von etwa 42 Tagen sogar die Größe des Wildtyps. Zusätzlich wurden in Blattextrakten von GMM Pflanzen dem Wildtyp ähnliche Stärkekonzentrationen gemessen, was ebenfalls eine Verbesserung verglichen mit den GO Pflanzen darstellte. Allerdings konnte kein gegenüber den GO Pflanzen erhöhter Elektronentransport festgestellt werden, und auch die Behandlung mit Hochlicht führte zu demselben hohen Ausmaß an Photoinhibition wie bei den GO Pflanzen. Darüber hinaus konnte der im Gewächshaus beobachtete Phänotyp der GMM Pflanzen unter Kurztagbedingungen nicht reproduziert werden, dort waren die GMM Pflanzen zwar immer noch größer als die GO Pflanzen, aber deutlich kleiner und blasser als der Wildtyp. Dieses Phänomen konnte in der Folge weiterer Untersuchungen (3.8 & Fahnenstich et al. 2007) der Expression des Malat-Enzyms (ME) zugeordnet werden (3.8 & 4.3), welches somit für diesen Ansatz weniger geeignet erschien. Da aber zwischenzeitlich die Existenz eines NADP-Malat-Enzyms in den Chloroplasten von *A. thaliana* nachgewiesen wurde (Gerrard-Wheeler et al. 2005), das zudem noch dem ME aus Mais ähnliche kinetische Eigenschaften aufweist, konnte postuliert werden, dass der GMM-Ansatz (s. 1.2.6) auch ohne das ME funktionieren kann (4.3).

3.7 Die Einführung der Katalase in den GMM Weg: GMMK und GMK Pflanzen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln deutlich wurde, konnte durch die Expression der weiteren Enzyme des GTT- oder GMM-Weges eine Verbesserung des GO-Phänotyps unter bestimmten Bedingungen erreicht werden (3.5 & 3.6). Allerdings erreichten nur die GMM Pflanzen unter Gewächshausbedingungen die Größe des Wildtyps und wuchsen teilweise über diese hinaus. Ansonsten zeigten alle mehrfach transgenen Linien, die auch die GO enthielten, einen mehr oder weniger stark ausgeprägten GO-Phänotyp, was besonders bei den Ergebnissen der Hochlichtstudien deutlich wurde. Da die Aktivitäten der Glyoxylat-abbauenden Enzyme in GO-MS, GMM, GTT und damit indirekt auch in GO-TSS Pflanzen bestätigt werden konnten und zudem auch niedrigere Glyoxylat-Gehalte in GO-TSS und GO-MS Pflanzen als in GO Pflanzen gemessen wurden, musste von einem großen Einfluss des von der GO produzierten H_2O_2 ausgegangen werden. Als Lösung für dieses Problem wurde die Expression eines weiteren Enzyms, der Katalase aus *E. coli* (*katE*) im vielversprechenden GMM-Hintergrund angestrebt (→ GMMK Pflanzen). Auf Grund der neuen Erkenntnisse (Gerrard-Wheeler et al. 2005), die dafür sprechen, dass das Malat-Enzym in dem GMM-Ansatz nicht nötig ist (s. 3.6.4) und der negativen Auswirkungen der Expression dieses Enzyms (3.8 & Fahnenstich et al. (2007)), wurden auch GO-MS Pflanzen mit dem Katalase-Konstrukt transformiert (2.6.2), was zu den GMK-Pflanzen führte.

Sowohl die GMMK als auch die GMK Pflanzen werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

3.7.1 Die GMMK Pflanzen

Die GMMK Pflanzen wurden durch die Transformation der vielversprechenden Linien GMM 60-4 und 60-11 (vgl. 3.6) mit dem Katalase-Konstrukt erstellt. Von den aus dieser Transformation entstandenen Linien soll hier nur auf die am besten wachsenden exemplarisch eingegangen werden. Nachdem die Transgeninsertionen und deren Enzymaktivitäten bestätigt waren (3.1 & 3.2), wurden die GMMK Pflanzen zur Evaluation ihres Wachstums unter verschiedenen Bedingungen angezogen (Maier 2006).

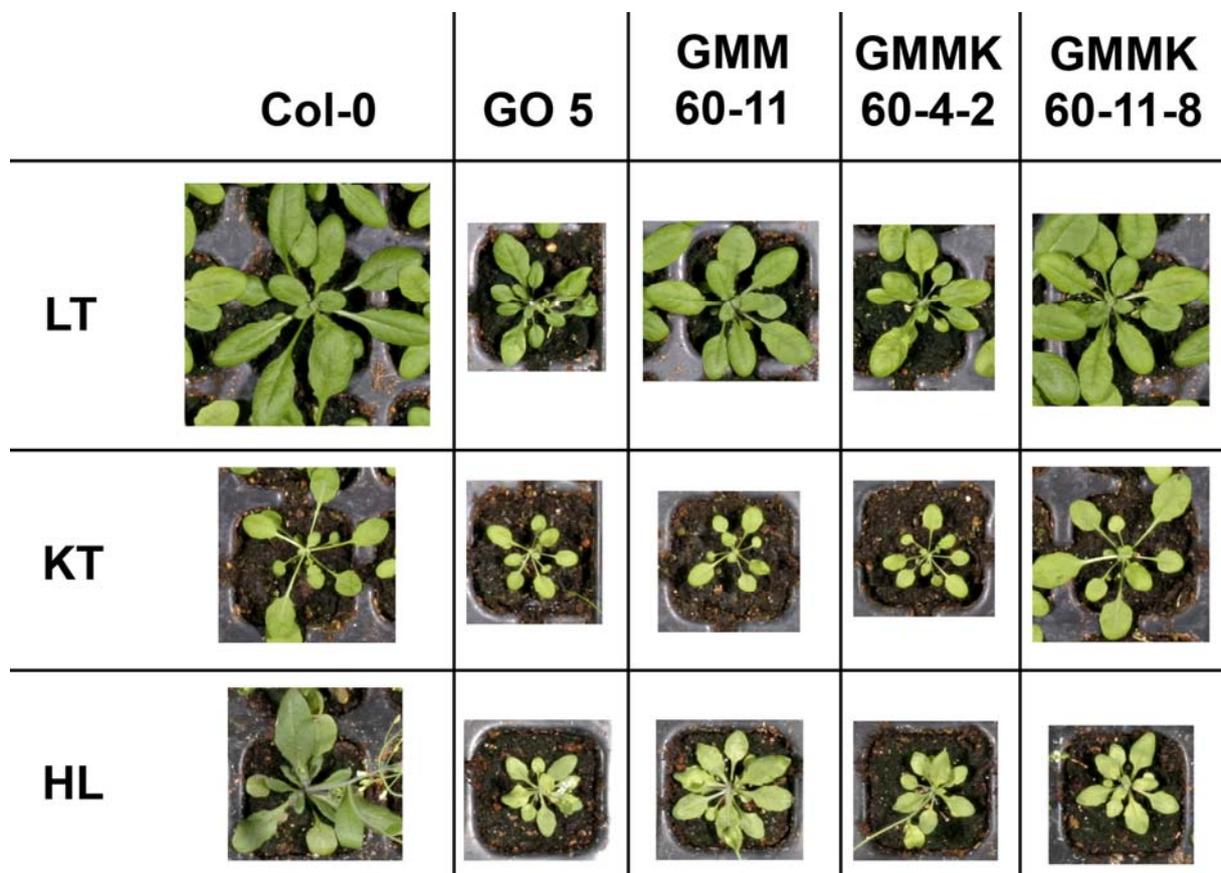


Abbildung 41: 33 Tage alte Col-0, GO, GMM und GMMK Pflanzen aus verschiedenen Anzuchtbedingungen im Vergleich. LT = Langtag (50 μ E), KT = Kurztag (70 μ E), HL = Pflanzen aus LT, die seit neun Tagen unter 600 μ E Hochlicht angezogen wurden.

Dabei wurde deutlich (Abb. 41), dass die Pflanzen der Linie GMMK 60-11-8 sowohl im Langtag wie auch im Kurztag größer wuchsen als die Pflanzen der Linie GMM 60-11, wobei sie aber nicht die Größe des Wildtyps übertrafen. GMMK 60-4-2 Pflanzen dagegen hatten unter diesen Bedingungen keinen größeren Habitus als die GO Pflanzen und waren unter Langtagbedingungen sogar von kleinerem Wuchs als die GMM 60-11 Pflanzen. Ferner war die Blattfarbe der GMMK und GMM Pflanzen im

Kurztag wesentlich heller als die des Wildtyps, was allerdings auch bei den GO Pflanzen beobachtet werden konnte, so dass dieses Phänomen nicht eindeutig der GO- und/oder der ME-Expression (vgl. 3.3; 3.4 & 3.8) zugeordnet werden konnte.

Wurden die Pflanzen in einem Alter von 24 Tagen in Starklicht von 600 μE überführt, so stellte sich nach neun Tagen heraus, dass die GMMK Pflanzen unter Starklicht noch immer die Merkmale des GO-Phänotyps in derselben Stärke wie die GO Pflanzen selbst ausprägen (Abb. 41) und unter der Bildung von photooxidativen Läsionen ausbleichen (vgl. 3.4.2 & Maier 2006).

Da die Linie GMMK 60-11-8 unter Langtagbedingungen zu einem größeren Habitus als ihre Vorläuferlinie GMM 60-11 heranwuchs und die Größe des Wildtyps erreichte, sollte ermittelt werden, ob diese Wachstumsverbesserung auch mit einer Verbesserung des photosynthetischen Elektronentransports einherging.

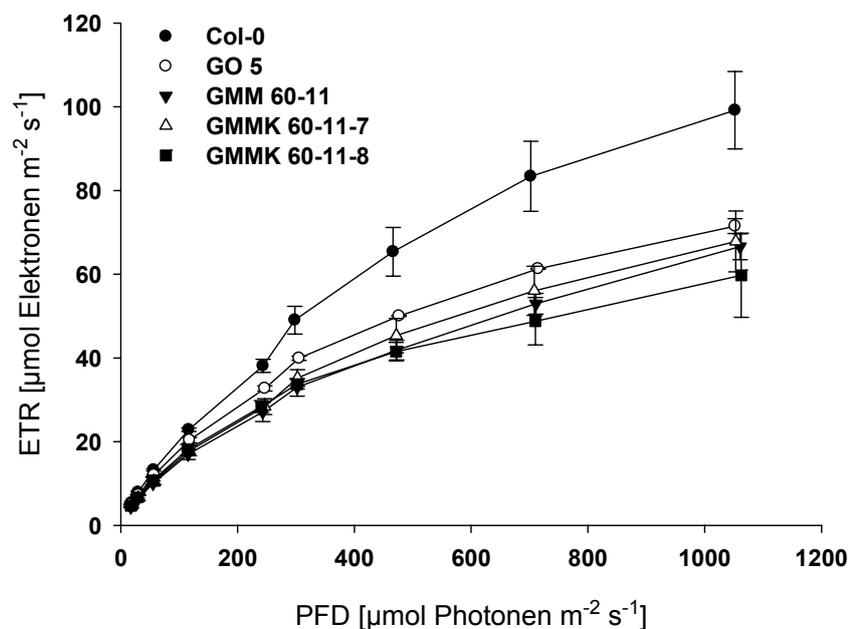


Abbildung 42: Photosynthetische Elektronentransportraten fünf Wochen alter Col-0, GO, GMM und GMMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus)
Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=3$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung

Es konnte allerdings wie schon bei den GMM Pflanzen (Abb. 38) keine Steigerung der Elektronentransportraten bei den Linien GMMK 60-11-7 und 60-11-8 gegenüber GO 5 gemessen werden (Abb. 42).

Da die GMMK Pflanzen nicht größer als der Wildtyp wuchsen, niedrigere Elektronentransportraten als dieser zeigten, unter Hochlicht wie GO Pflanzen reagierten und wegen den in 3.8 ausführlich dargelegten Problemen mit der ME Expression wurden die GMMK Pflanzen nicht weitergehend charakterisiert.

3.7.2 Die GMK Pflanzen

Die GMK Linien entstanden durch die Transformation von Pflanzen der Linie GO5-MS 6 mit dem Katalase-Konstrukt. Von den resultierenden Linien soll hier nur exemplarisch auf die Linien GMK 3 und 9, die in Vorexperimenten repräsentative Wachstumseigenschaften (Maier 2006) und vorhandene Katalase-Aktivitäten (Abb. 9) zeigten, eingegangen werden.

Wenn die GMK Pflanzen unter Kurztagbedingungen mit moderater Lichtintensität (120 μ E) angezogen wurden, waren die Pflanzen der Linie GMK 3 und 9 größer als GO und GO-MS Pflanzen, wobei die GMK 3 Pflanzen sogar einen größeren Habitus als der Wildtyp entwickelten (Abb. 43).



Abbildung 43: Sechs Wochen alte Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die bei 120 μ E im Kurztag gewachsen waren.

Zusätzlich konnte hinsichtlich der Blattfarbe kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und GMK 3 festgestellt werden und auch die Pflanzen der Linie GMK 9 waren dunkler grün als die der Linien GO 5 und GO-MS 11 (vgl. Abb. 21).

Bereits in Kapitel 3.3 (Abb. 11) wurde gezeigt, dass die Auswirkungen der GO Expression auf den Phänotyp durch Anzucht der Pflanzen unter erhöhter CO₂-Konzentration verhindert werden konnten. Somit sollte auch der größere Wuchs der GMK 3 Pflanzen, falls er eine Folge der GO Expression sein sollte, bei hohen CO₂-Konzentrationen (2000 \pm 200 ppm CO₂) nicht auftreten. In der Tat war bei Pflanzen, die unter diesen Bedingungen im Kurztag bei moderater Lichtstärke gewachsen waren, kein Unterschied zwischen den GO-exprimierenden Pflanzen (darunter auch



Abbildung 44: Sieben Wochen alte Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die bei einer CO₂-Konzentration von 2000 \pm 200ppm CO₂ (Kurztag, 120 μ E) gewachsen waren.

GMK 3) und den Wildtyppflanzen bezüglich Größe oder Blattfarbe feststellbar (Abb. 44).

Auch bei der Stärkeakkumulation während der Lichtperiode zeigten die GO, GO-TSS und GMM Pflanzen starke Defizite gegenüber dem Wildtyp (vgl. Abb. 29 & 40), so dass sich angesichts der Größe der GMK Pflanzen die Frage stellte, ob dieses Problem durch die Expression der Katalase reduziert wurde.

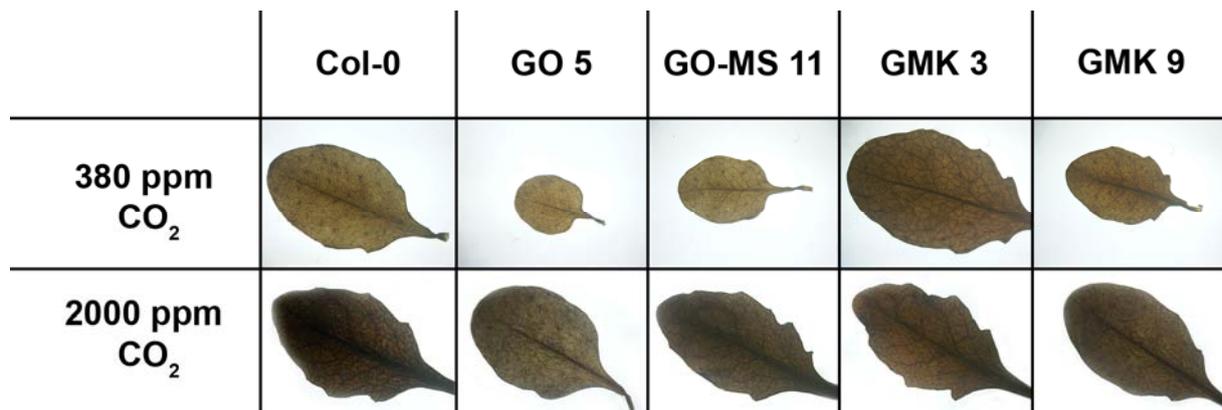


Abbildung 45: Stärkefärbung von Blättern von Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die im Kurztage bei 120 μ E unter zwei verschiedenen CO₂-Konzentrationen gewachsen waren. Die Probennahme fand am Ende der Lichtperiode statt.

Um dies zu evaluieren, wurden von Pflanzen unter den genannten Bedingungen (Abb. 43 & 44) am Ende der Lichtperiode Blattproben zur Stärkefärbung mit Lugol'scher Lösung genommen (Abb. 45). Erwartungsgemäß konnten unter Bedingungen erhöhter CO₂-Konzentration keine Unterschiede im Stärkegehalt der untersuchten Linien festgestellt werden. Dagegen wurde bei den Proben aus ambienter CO₂-Konzentration (Abb. 45, 380 ppm CO₂, vgl. 3.4.3.5) deutlich, dass GO 5 und GO-MS 11 in diesem Vergleich am wenigsten Stärke akkumulierten, wohingegen GMK 3 und 9 sogar eine stärkere Färbung als der Wildtyp zeigten.

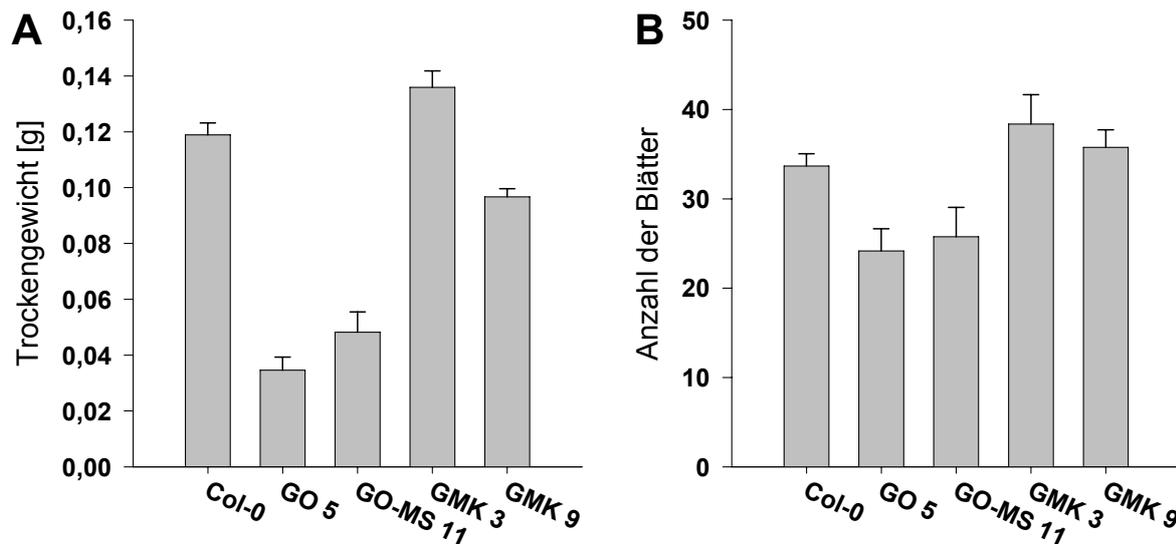


Abbildung 46: (A) Trockengewicht von sechs Wochen alten und (B) Blattanzahl von acht Wochen alten Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μ E). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 6$ Einzelmessungen \pm Standardfehler (A) bzw. Standardabweichung (B)

Der visuelle Eindruck aus Abbildung 43 konnte durch Messungen des Trockengewichts bestätigt werden (Abb. 46 A). So waren die getrockneten Rosetten der GMK 3 Pflanzen etwa 14% schwerer als die des Wildtyps, wohingegen die Trockengewichte der GO 5 (29% vom Wildtypwert), GO-MS 11 (41%) und GMK 9 (81%) Pflanzen nicht das Wildtypniveau erreichten. Bemerkenswert dabei war, dass die Pflanzen der Linie GMK 9 zwar nicht das Wildtypgewicht erreichten, aber dennoch etwa doppelt soviel Biomasse aufbauten wie die GO-MS 11 Pflanzen.

Interessant ist auch, dass die Blattanzahl (Abb. 46 B), die als Indikator für das Stadium der Ontogenese angesehen werden kann (Bagnall 1993; Berardini et al. 2001), bei den Pflanzen der Linien GMK 3 und 9 um 14% bzw. 6% gegenüber Col-0 erhöht, bei den GO 5 und GO-MS 11 Pflanzen jedoch um 28% bzw. 25% niedriger als beim Wildtyp war.

Ebenso wie in den vorangegangenen Kapiteln sollte auch bei den GMK Pflanzen die Leistungsfähigkeit der Photosysteme bestimmt werden, indem photosynthetische Elektronentransportraten gemessen wurden. Entgegen den Ergebnissen, die bisher mit den GO, GO-TSS, GTT, GMM und GMMK Pflanzen gewonnen wurden (Abb. 13, 28, 32, 38 & 42), entwickelten die GMK Pflanzen der Linie GMK 3 besonders bei hohen Lichtintensitäten eine deutlich höhere Elektronentransportrate als der Wildtyp (Abb. 47). Die Linie GMK 9 erreichte mit dem Wildtyp vergleichbare Werte,

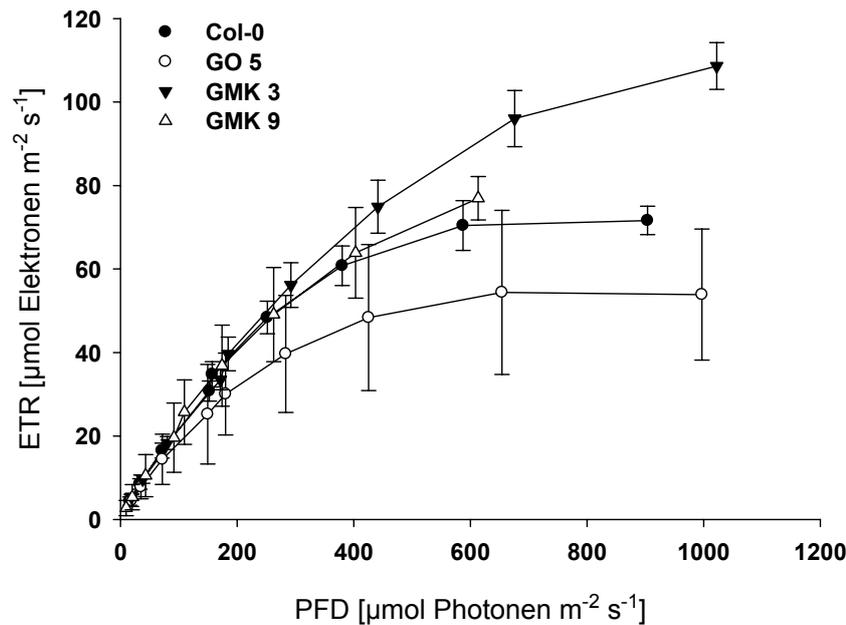


Abbildung 47: Photosynthetische Elektronentransportraten sechs Wochen alter Col-0, GO und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μE)
Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

wobei die Linie GO 5 das aus den vorigen Messungen bekannte Ergebnis, nämlich eine klar gegenüber dem Wildtyp verringerte Elektronentransportrate, zeigte (Abb. 47). Zur besseren Übersicht sind die interpolierten Werte bei einer PFD von 600 μE hier noch in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Photosynthetische Elektronentransportraten von sechs Wochen alten Col-0, GO 5, und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μE) bei PFD = 600 μE .
Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

| | Col-0 | GO 5 | GMK 3 | GMK 9 |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ETR (600 μE) | 70,5 \pm 5,9 | 52,9 \pm 9,8 | 89,1 \pm 3,4 | 75,8 \pm 2,6 |

Da eine höhere Elektronentransportrate aber keine Aussagen bezüglich des Verhältnisses von Photorespiration und photosynthetischer Kohlenstofffixierung erlaubt, sollte das Kohlenstoffisotopenverhältnis von ^{13}C zu ^{12}C in GMK und Col-0 Pflanzen bestimmt werden. ^{13}C ist ein natürlich vorkommendes, stabiles Isotop des Kohlenstoffs und liegt im CO_2 der Atmosphäre in einem Anteil von etwa 1,109% vor (Gillon und Griffiths 1997). Der in Pflanzen fixierte Kohlenstoff zeigt aber einen geringeren Anteil von ^{13}C verglichen mit atmosphärischem CO_2 ($\delta^{13}\text{C}$). Die hauptsächlichen Gründe für dieses Ungleichgewicht sind die gegenüber $^{12}\text{CO}_2$

reduzierte Diffusivität von $^{13}\text{CO}_2$ durch die Stomata und die Diskriminierung der RubisCO gegen $^{13}\text{CO}_2$ (Farquhar et al. 1989). Wenn allerdings das Verhältnis interzellulärer zu atmosphärischer CO_2 -Konzentration niedrig ist, wie es zum Beispiel bei geschlossenen Stomata aber auch bei erhöhter Carboxylierungseffizienz der Fall ist, kann die Diskriminierung der RubisCO nicht aufrecht erhalten werden. Unter diesen Umständen wird wieder vermehrt $^{13}\text{CO}_2$ assimiliert und der Betrag des $\delta^{13}\text{C}$ sinkt. Anders als die RubisCO diskriminiert die Glycin-Decarboxylase des photorespiratorischen Stoffwechselweges entgegen anderer Decarboxylasen (O'Leary 1989) gegen ^{12}C -Glycin, so dass das von ihr freigesetzte CO_2 in ^{13}C angereichert ist, was dazu führt, dass durch Photorespiration der Betrag des $\delta^{13}\text{C}$ größer wird (Ivlev et al. 1996; Igamberdiev et al. 2001). Eine Messung des $\delta^{13}\text{C}$ vollständiger Blattrosetten integriert diese Effekte über die gesamte Pflanzenentwicklung und ist daher ein guter Indikator für die Carboxylierungseffizienz und die photorespiratorischen Verluste während dieser Zeitspanne.

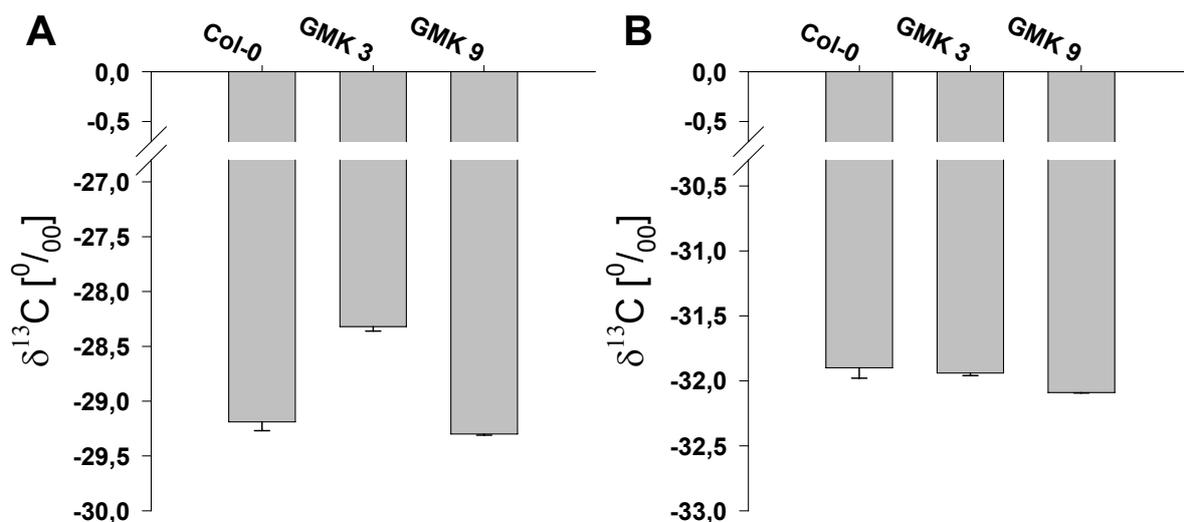


Abbildung 48: Kohlenstoffisotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ in Promille (‰) von acht Wochen alten Col-0 und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μE) bei (A) 380 ppm CO_2 und (B) 2000 ppm CO_2 . Die dargestellten Werte sind relativ zu der Umgebungsluft bei der Messung und Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Die Messung des niedrigeren $\delta^{13}\text{C}$ in GMK 3 Pflanzen (Abb. 48) verdeutlichte, dass sie im Kurztag bei 120 μE und ambienter CO_2 -Konzentration (380 ppm) weniger von photorespiratorischen Kohlenstoffverlusten betroffen waren bzw. eine höhere Carboxylierungseffizienz zeigten als der Wildtyp und die GMK 9 Pflanzen. Dagegen war unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen erhöhter CO_2 -Konzentration das $\delta^{13}\text{C}$ bei allen untersuchten Linien in etwa gleich.

Da die GMK Pflanzen, insbesondere die der Linie GMK 3, eine deutliche Verbesserung hinsichtlich ihrer Wachstums- und Photosyntheseigenschaften gegenüber den GO und GO-MS Pflanzen darstellten (Abb. 43, 46, 47 & 48) kam die Frage, auf, ob auch die schädigenden Auswirkungen von Starklicht, die den GO-Phänotyp charakterisieren, bei diesen Pflanzen reduziert sind.

Diese Frage sollte beantwortet werden, indem Col-0, GO, MS, GO-MS und GMK Pflanzen in Hochlichtbedingungen überführt und nach sechs Tagen evaluiert wurden. Die GO 5 und GO-MS 11 Pflanzen verhielten sich unter diesen Bedingungen wie erwartet (vgl. Abb. 19, 20, 21 & 41) und zeigten ausgebleichte Blätter und photooxidative Schädigungen. Der Wildtyp und die MS 4 Pflanzen dagegen waren durch die Akkumulation von Anthocyanen bereits von dunklerer Blattfarbe, und offensichtliche Schädigungen waren nicht sichtbar. Von den GMK Pflanzen verhielten sich die der Linie 9 in diesem Experiment wie die GO und GO-MS Pflanzen, aber die der Linie GMK 3 waren weder ausgebleicht noch offensichtlich geschädigt (Abb. 49) und somit eher mit Col-0 und MS 4 vergleichbar.

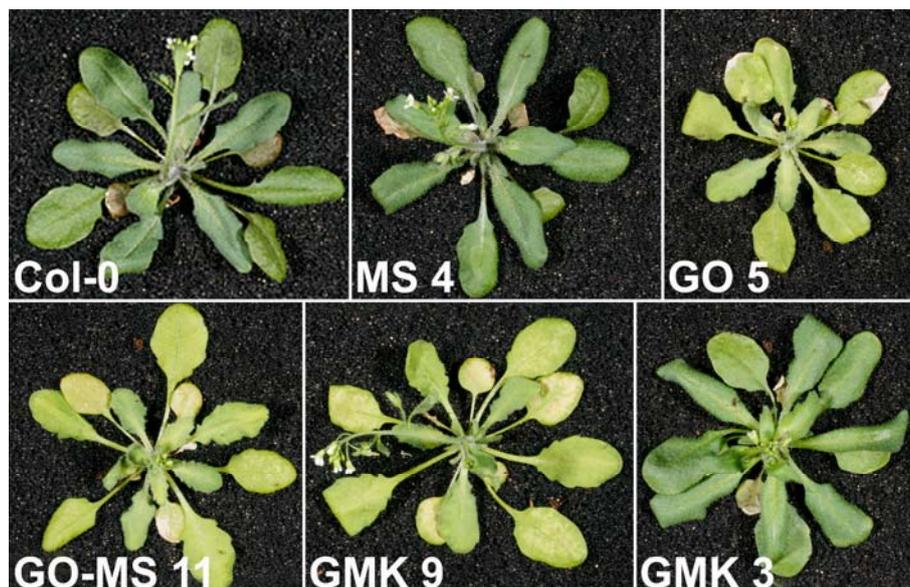


Abbildung 49: Col-0, GO, MS, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus), die in einem Alter von fünf Wochen auf 600 μ E Hochlicht transferiert und nach sechs Tagen fotografiert wurden.

Offensichtlich konnten also die GMK 3 Pflanzen die schädigenden Auswirkungen der GO Expression unter Bedingungen hoher Lichtstärken kompensieren.

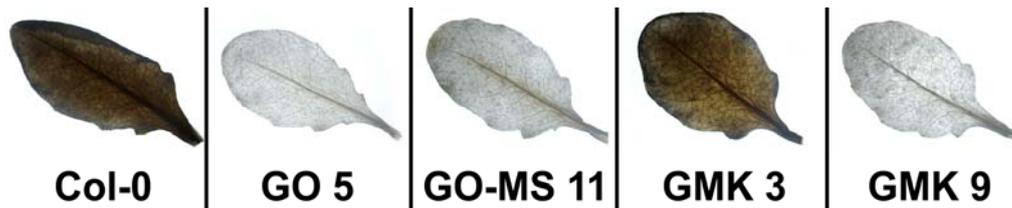


Abbildung 50: Stärkefärbung von Blättern von Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus), die in einem Alter von fünf Wochen auf 600 μE Hochlicht transferiert und nach sechs Tagen am Ende der Lichtperiode gefärbt wurden.

Diese Aussage konnte auch durch eine Stärkefärbung von Blättern der unter Starklicht von 600 μE inkubierten Pflanzen am Ende der Lichtperiode bestätigt werden (Abb. 50). In den Blättern der GO Pflanzen war unter diesen Bedingungen nahezu keine Stärke nachweisbar, dagegen konnte bei den Linien GO-MS 11 und GMK 9 zumindest eine geringe Stärkemenge ermittelt werden. Wildtyppflanzen und Pflanzen der Linie GMK 3 akkumulierten gleichermaßen in großer Menge transitorische Stärke, in etwa vergleichbar mit jener am Ende eines Tages in CO_2 -angereicherter Atmosphäre (Abb. 45).

Da die Starklichtbedingungen so ausgeprägte Effekte auf die GO-exprimierenden Pflanzen zeigten (vgl. 3.4), sollten die Auswirkungen dieser auch auf biochemischer Ebene näher beleuchtet werden. Zuerst sollten dabei die Änderungen der Gehalte von H_2O_2 und Glyoxylat, den Produkten der GO-Reaktion, untersucht werden.

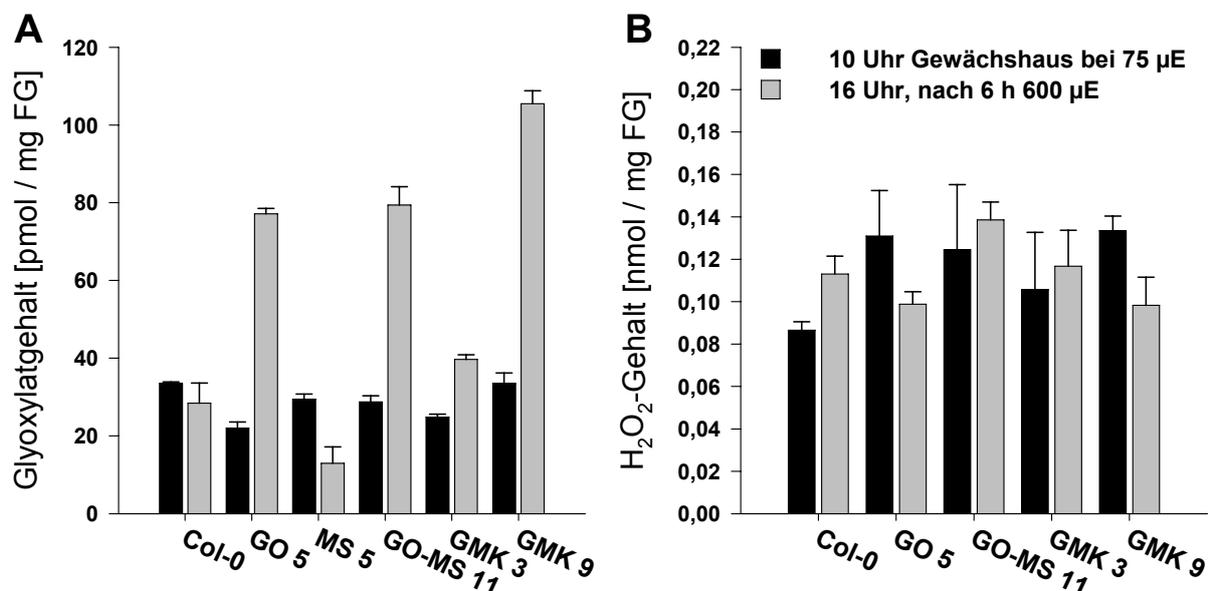


Abbildung 51: (A) Glyoxylat- und (B) H_2O_2 -Gehalte fünf Wochen alter Col-0, GO, MS, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) und nach 6 h Hochlichtbehandlung bei 600 μE im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Sechs Stunden nach dem Transfer in Hochlicht von 600 μE (Abb. 51 A) zeigten die GO 5 Pflanzen die schon in Abb. 24 dargestellten hohen Glyoxylat-Gehalte verglichen mit dem Wildtyp, wobei sie allerdings unter Gewächshausbedingungen entgegen früher ermittelten Werten (Abb. 23 & 24) sogar niedrigere Gehalte als Col-0 aufwiesen. Im Gegensatz zu den in Abb. 24 dargestellten Ergebnissen konnten die Pflanzen der Linie GO-MS 11 hier keine niedrigeren Glyoxylat-Gehalte nach der Hochlichtbehandlung vorweisen, und bei GMK 9 wurden sogar noch gegenüber GO 5 deutlich erhöhte Werte festgestellt. Einzig in GMK 3 Pflanzen schien das von der GO produzierte Glyoxylat unter diesen Bedingungen effektiv abgebaut zu werden. Interessanterweise war, wie schon in Abb. 24 für MS 4 zu sehen, bei MS 5 Pflanzen nach 6 h Hochlicht ein deutlich niedrigerer Glyoxylat-Gehalt als vor der Behandlung messbar.

Die Messung des H_2O_2 -Gehaltes ließ wie bereits in Abb. 25 kaum Unterschiede zwischen den Linien unter den verschiedenen Konditionen erkennen.

Neben der Messung von Glyoxylat und H_2O_2 waren bei diesen Pflanzen auch die weitergehenden Auswirkungen der Katalase-Expression auf den Metabolismus von Interesse, und so sollte ein Profil des Metabolismus unter Niedrig- und Starklicht erstellt werden. Da die Pflanzen aus dem Gewächshaus für eine Metabolitenanalyse mittels GC/MS nur bedingt geeignet sind (vgl. 3.9), wurden für diese Messung Pflanzen unter 30 μE im Langtag angezogen. Diese wurden dann für 6 h 600 μE ausgesetzt und zu gleichen Zeiten wie die Kontrollpflanzen unter 30 μE beprobt (16 Uhr). Die für die Beurteilung des GMK Phänotyps wichtigsten Ergebnisse dieses Experiments finden sich in Tabelle 7.

Wenn zunächst nur die Ergebnisse der Pflanzen von 30 μE betrachtet werden, so fällt auf, dass die Unterschiede bei den Hexosen nicht sehr stark ausgeprägt waren.

So enthielten die Blätter von Kat 1 und GMK 3 Pflanzen signifikant mehr Glukose und

Tabelle 7: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der GC/MS-Analyse von Blattextrakten von Col-0, MS, Kat, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die unter 30 μE (Langtag) angezogen wurden und dann im Alter von fünf Wochen einerseits unter diesen Bedingungen 6 h nach Beginn der Lichtperiode, andererseits nach 6 h 600 μE Starklicht beprobt wurden. Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung, ein * markiert mit $p \leq 0,05$ vom Wildtyp signifikant unterschiedliche Werte. (Tabelle s. folgende Seite)

Tabelle 7 (Beschreibung siehe vorige Seite)

| | Col-0 | Kat 1 | MS 4 | GO 5 | GO 16 | GO-MS 11 | GMK 3 | GMK 9 |
|---------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Glukose | 6 h 30 µE | 22,52 ±1,9* | 11,89 ±0,65 | 10,21 ±1,62 | 10,87 ±0,99 | 11,49 ±2,36 | 12,13 ±0,65* | 10,87 ±0,64 |
| | 6 h 600 µE | 99,9 ±3,7* | 77,28 ±3,8* | 36,7 ±0,6* | 48,5 ±1,6* | 35,8 ±0,5* | 86,8 ±8,6* | 103,5 ±2,5* |
| Saccharose | 6 h 30 µE | 27,6 ±0,4* | 65,2 ±2,6* | 56,5 ±2,6* | 49,7 ±1,0* | 24,5 ±2,3* | 36,3 ±2,7 | 33,8 ±0,7 |
| | 6 h 600 µE | 355,3 ±1,5* | 215,4 ±20* | 166,0 ±5,5* | 147,3 ±2,2* | 160,9 ±6,1* | 173,5 ±3,1* | 236,2 ±8,2* |
| Fumarat | 6 h 30 µE | 44,6 ±1,8* | 16,3 ±0,9* | 17,9 ±0,4* | 12,8 ±0,4* | 11,9 ±0,4* | 42,7 ±1,3 | 29,9 ±3,0 |
| | 6 h 600 µE | 223,1 ±48,7 | 142,1 ±14,7* | 62,4 ±2,7* | 66,3 ±1,0* | 67,8 ±3,0* | 79,1 ±5,4* | 138,1 ±24,9 |
| Malat | 6 h 30 µE | 4,45 ±0,28* | 2,16 ±0,17* | 2,31 ±0,11* | 1,46 ±0,02* | 2,01 ±0,04* | 5,02 ±0,98 | 2,74 ±0,22 |
| | 6 h 600 µE | 4,48 ±0,43 | 5,63 ±0,87 | 3,17 ±0,08* | 2,53 ±0,09* | 4,23 ±0,25* | 3,00 ±0,12* | 6,85 ±1,00 |
| Galaktonat- | 6 h 30 µE | 0,012 ±0,001 | 0,008 ±0,002 | 0,023 ±0,003* | 0,020 ±0,003* | 0,021 ±0,003* | 0,015 | 0,011 ±0,001 |
| γ-lakton | 6 h 600 µE | 0,013 ±0,003 | 0,017 ±0,001 | 0,027 ±0,005 | 0,026 ±0,005* | 0,034 ±0,003* | 0,015 ±0,002 | 0,012 ±0,004 |
| Glycin | 6 h 30 µE | 0,51 ±0,03* | 0,90 ±0,05* | 0,54 ±0,03* | 0,63 ±0,03 | 0,68 ±0,04 | 0,51 ±0,08 | 0,35 ±0,14 |
| | 6 h 600 µE | 49,8 ±8,1 | 55,2 ±9,3 | 17,6 ±1,1* | 16,6 ±0,2* | 18,5 ±0,9* | 9,5 ±1,9* | 28,1 ±5,1* |
| Serin | 6 h 30 µE | 16,5 ±1,3 | 17,3 ±1,3 | 13,0 ±2,8 | 14,7 ±0,9 | 18,8 ±1,2 | 6,7 ±1,8* | 9,0 ±2,8* |
| | 6 h 600 µE | 7,3 ±1,8 | 7,6 ±1,1 | 14,4 ±1,5 | 15,6 ±0,5* | 15,5 ±0,4* | 5,9 ±0,5* | 7,6 ±1,5* |
| Glycin/Serin | 6 h 30 µE | 0,031 ±0,002* | 0,052 ±0,001* | 0,051 ±0,002 | 0,043 ±0,001 | 0,037 ±0,001 | 0,082 ±0,01* | 0,032 ±0,009 |
| Verhältnis | 6 h 600 µE | 5,99 ±0,21 | 7,19 ±0,20* | 1,24 ±0,05* | 1,07 ±0,02* | 1,19 ±0,04* | 1,58 ±0,24* | 3,81 ±0,38* |

auch mehr Fruktose (nicht gezeigt) als der Wildtyp, wobei letzteres auch für GMK 9 galt. Höhere Saccharosegehalte konnten in MS 4 und den GO Linien nachgewiesen werden, GO-MS 11 und auch Kat 1 erreichten die Wildtypwerte nicht. Bei den wichtigen Intermediaten Malat und Fumarat (vgl. 3.8 & 4.3) waren die Unterschiede schon zahlreicher. So akkumulierten die GO Linien, GO-MS 11 und MS 4 geringere Mengen an Malat und Fumarat als Col-0, im Gegensatz zu Kat 1, die höhere Werte für beide Metabolite aufweisen konnte und GMK 3, die zumindest höhere Fumarat-Gehalte als der Wildtyp zeigte.

Hinsichtlich der Gehalte von Glycin und Serin, die beide Intermediate des photorespiratorischen Stoffwechselweges sind, bleibt lediglich festzuhalten, dass Glycin bei 30 μ E auf niedrigem Niveau in den Linien Kat 1 und GO 5 weniger, in MS 4 höher und Serin in den Linien GMK 3 und 9 weniger abundant als im Wildtyp anzutreffen war.

Wenn nun zusätzlich die Daten der Hochlichtinkubation betrachtet werden, wird deutlich, dass die Gehalte der Zucker Glukose, Fruktose (nicht gezeigt) und Saccharose und auch der Intermediate des Citrat-Zyklus Malat und Fumarat in allen untersuchten Linien teils drastisch anstiegen. Im Einzelnen konnte beobachtet werden, dass die Glukosegehalte der GO 5, 16 und GO-MS 11 Pflanzen deutlich niedriger als die des Wildtyps waren und die der GMK, MS 4 und Kat 1 Pflanzen sich zwischen diesen Extremen befanden. Die nicht in Tabelle 7 gezeigten Fruktosegehalte waren im Hochlicht sogar zwischen dem Wildtyp und den GMK, MS 4 und Kat 1 Pflanzen nicht zu unterscheiden, wohingegen die GO und GO-MS 11 Pflanzen auch hier sehr niedrige Gehalte präsentierten. Zu den Saccharosegehalten lässt sich anmerken, dass außer der Linie Kat 1 keine andere Linie in der Lage war, ähnlich viel Saccharose zu akkumulieren wie Col-0. Die niedrigsten Werte waren hierbei wiederum bei den GO und GO-MS 11 Pflanzen zu finden. Die GMK 3 und 9 Pflanzen zeigten dagegen zusammengenommen einen deutlichen Trend, mehr Saccharose zu produzieren als die GO und GO-MS 11 Pflanzen.

Etwa auf dieselbe Weise lassen sich auch die Ergebnisse für Fumarat unter Hochlicht zusammenfassen: Kat 1 erreichte die Wildtypwerte, die GO und GO-MS 11 Pflanzen enthielten am wenigsten Fumarat und dazwischen lagen die Gehalte der MS 4 und GMK 9 Pflanzen. Die Linie GMK 3 zeigte zwar noch deutlich höhere Fumarat-Gehalte als GO und GO-MS 11 (wenn auch niedrigere als MS 4 und GMK 9), allerdings ließ sich dies für den Malat-Gehalt bei 600 μ E so nicht festhalten, da

sich dort die Linien GO 5, 16, GO-MS 11 und GMK 3, verglichen mit Col-0, MS 4, Kat 1 und GMK 9, auf niedrigem Niveau kaum unterschieden.

Durch die Zunahme des metabolischen Flusses durch die Photorespiration bei Hochlicht (vgl. Abb. 49, 3.4) war nahezu eine Verhundertfachung des Glycingehaltes im Wildtyp zu beobachten, die sich zusammen mit einem fast halbierten Seringehalt sehr stark auf das Glycin/Serin-Verhältnis auswirkte. Bei den GO-exprimierenden Pflanzen war dagegen ein viel geringerer Anstieg des Glycingehaltes und konsequenterweise des Glycin/Serin-Verhältnisses zu beobachten mit den niedrigsten Werten bei der Linie GMK 3. Entgegen dem Wildtyp veränderten sich die Seringehalte in diesen Pflanzen durch die Hochlichtbehandlung nicht, sondern blieben tendenziell konstant, wobei die GMK Pflanzen beider Linien immer noch die geringsten Seringehalte aufwiesen, die sich nun etwa in der Größenordnung des Wildtyps befanden.

Konsistent mit der Vermutung, dass die GO-exprimierenden Pflanzen von oxidativem Stress durch H_2O_2 betroffen sind, zeigten sich die Gehalte für Galaktonat- γ -laktone, die in den GO-Linien und GO-MS 11 unter Niedrig- und Hochlicht höher als im Wildtyp waren. Galaktonat- γ -laktone ist die direkte Vorstufe in dem Biosyntheseweg von Ascorbat (Wheeler et al. 1998), der durch oxidativen Stress aktiviert wird (Smirnov 2000) und so konnte auch in allen Linien außer denen, die Katalase exprimierten, ein Anstieg des Galaktonat- γ -laktone-Gehaltes nach Transfer in Hochlichtbedingungen beobachtet werden.

Diese GC/MS-Analyse wurde auch mit acht Wochen alten Pflanzen durchgeführt, die unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen erhöhter CO_2 -Konzentration (2000 ± 200 ppm CO_2) bei normaler Lichtstärke ($120 \mu E$) gewachsen waren (Tab. 8, folgende Seite) und gegen Ende der Lichtperiode beprobt wurden. Dabei zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen keine Unterschiede in den Gehalten der photorespiratorischen Aminosäuren Glycin und Serin zwischen den untersuchten Linien auftraten und auch die Menge an Galaktonat- γ -laktone war zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien nicht zu unterscheiden.

Tabelle 8: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der GC/MS-Analyse von Blattextrakten von Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die unter 120 μ E (Kurztag) bei einer CO₂-Konzentration von 2000 \pm 200 ppm angezogen wurden und im Alter von acht Wochen am Ende der Lichtperiode beprobt wurden. Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus n=4 Einzelmessungen \pm Standardabweichung, ein * markiert mit $p \leq 0,05$ vom Wildtyp signifikant unterschiedliche Werte.

| | Col-0 | GO 5 | GO-MS 11 | GMK 3 | GMK 9 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Galaktonat-γ-laktone | 0,039 \pm 0,004 | 0,036 \pm 0,006 | 0,043 \pm 0,007 | 0,033 \pm 0,008 | 0,037 \pm 0,006 |
| Glycin | 0,190 \pm 0,005 | 0,192 \pm 0,014 | 0,195 \pm 0,008 | 0,208 \pm 0,007 | 0,242 \pm 0,013 |
| Serin | 5,66 \pm 0,34 | 5,81 \pm 0,23 | 6,43 \pm 0,21 | 4,80 \pm 0,12 | 5,72 \pm 0,07 |
| Glycin/Serin-Verhältnis | 0,034 \pm 0,003 | 0,033 \pm 0,003 | 0,031 \pm 0,004 | 0,043 \pm 0,003* | 0,042 \pm 0,006 |

3.7.3 Fazit

Mit der Kombination aus GO, MS und Katalase war es möglich, Pflanzen zu erzeugen, die unter den gewählten Bedingungen weniger stark von photorespiratorischen Verlusten betroffen waren und größer wuchsen als der Wildtyp. Insgesamt ist damit das Projekt zur Reduktion photorespiratorischer Verluste mit den Pflanzen der Linie GMK 3 zu einem erfolgreichen Abschluss gekommen.

3.8 Der konditionale Phänotyp der NADP-Malat-Enzym (ME) Pflanzen

Im Rahmen der Etablierung des zweiten vorgeschlagenen Stoffwechselweges (GMM-Weg, s. 1.2.6) wurden auch einfach transgene Pflanzen erstellt, die das C₄-NADP-Malat-Enzym aus *Z. mays* in ihren Plastiden exprimieren (ME Pflanzen). Für die generierten Linien konnte die Transgeninsertion auf genomischer Ebene (3.1), die Aktivität (3.2) und die korrekte subzelluläre Lokalisation (Abb. 52) des transgenen Enzyms bestätigt werden.

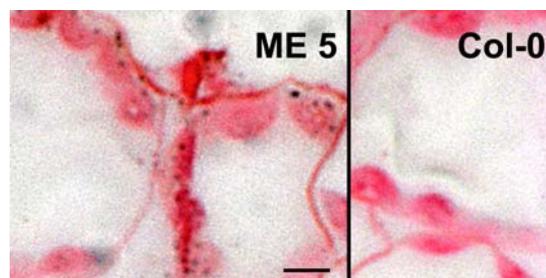


Abbildung 52: Immunolokalisation von C₄-NADP-Malat-Enzym in fixierten mikroskopischen Schnitten von Col-0 und ME 5 Blättern. Die Immunopräzipitate sind als schwarze Punkte zu sehen, die Chloroplasten erscheinen rot (Fahnenstich et al. 2007). Der schwarze Balken entspricht 5 µm.

Die ME Pflanzen wurden, wie alle anderen erstellten Linien auch, einer Durchmusterung auf interessante Phänotypen unter verschiedenen Bedingungen unterzogen, und dabei fiel auf, dass der Phänotyp der ME Pflanzen sehr plastisch auf eine Änderung der Lichtverhältnisse reagierte, was in diesem Kapitel ausgeführt werden soll.

3.8.1 ME Pflanzen zeigen im Kurz- bzw. Langtag unterschiedliche Eigenschaften

Wurden ME Pflanzen, die im Kurztag gewachsen waren, mit ME Pflanzen aus dem Langtag verglichen, so fiel sofort auf, dass die ME Pflanzen aus dem Kurztag eine gelblichere, bleichere Blattfarbe als die Pflanzen aus dem Langtag hatten (Abb. 53).

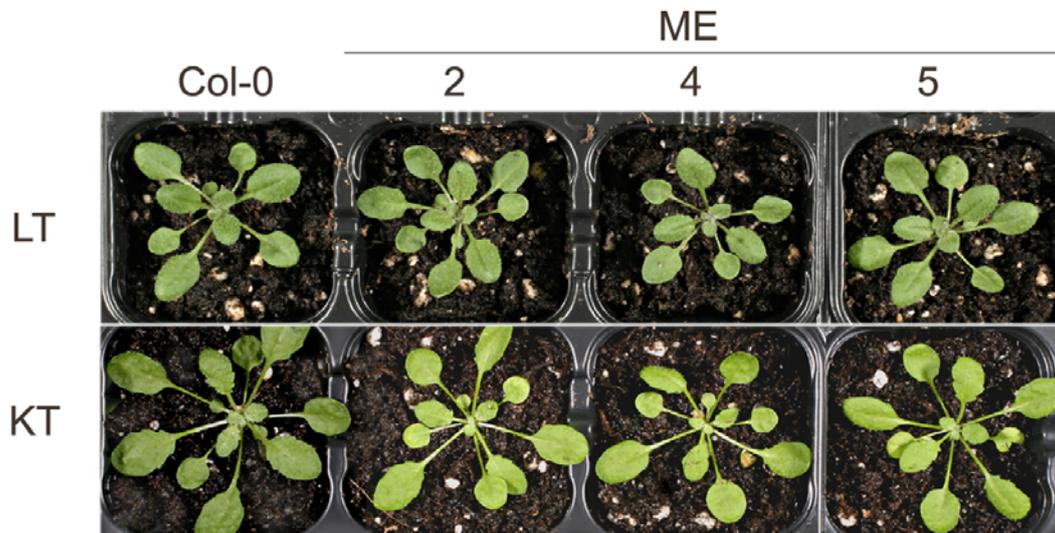


Abbildung 53: Col-0 und ME Pflanzen, die in vier Wochen lang im Langtag (LT, 70 μ E) oder fünf Wochen im Kurztag (KT, 70 μ E) gewachsen waren im Vergleich.

Zudem waren sie kleiner als der ebenfalls im Kurztag gewachsene Wildtyp Col-0 was bei den ME Pflanzen aus dem Langtag nicht beobachtet werden konnte.

Die veränderte Blattfarbe legte Messungen des Chlorophyllgehaltes nahe, bei denen, auf Grund eines niedrigeren Chlorophyll b Gehaltes unter Kurztagbedingungen ein erhöhtes Chlorophyll a/b-Verhältnis der ME Pflanzen gegenüber Col-0 festgestellt wurde (7-12% höher, Abb. 54 A).

Weiterhin entstand bei Probennahmen der Eindruck, dass die ME Pflanzen aus dem Kurztag besonders leicht bezogen auf ihre Fläche waren, und eine Quantifizierung des Frischgewicht zu Fläche-Verhältnisses bestätigte diesen Eindruck (ME Pflanzen: 71-83% vom Wildtyp, Abb. 54 B).

Auf der Suche nach der Ursache dieses Phänomens wurde in mikroskopischen Schnitten festgestellt, dass die ME Pflanzen im Kurztag einen reduzierten Blattdurchmesser (44-59%, gemessen nahe der Mittelrippe als Abstand von oberer zu unterer Epidermis (Niessen 2006)) gegenüber den Col-0 Pflanzen aufwiesen (Abb. 54 C & 55 A).

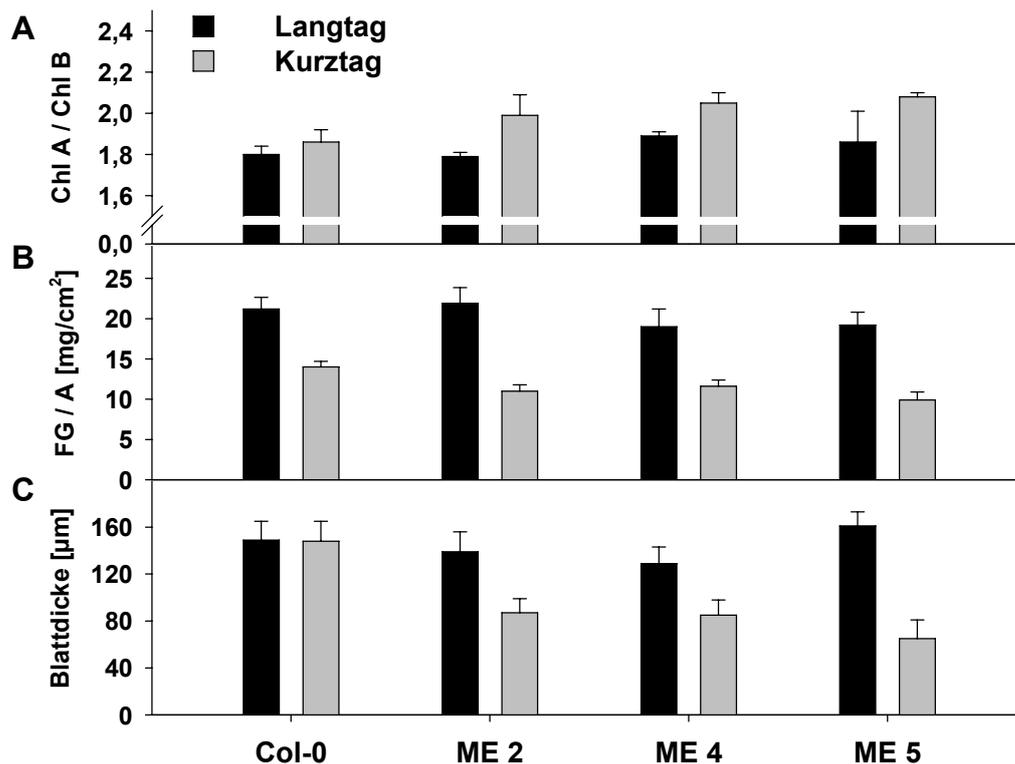


Abbildung 54: (A) Chlorophyll A zu B Verhältnis, (B) Verhältnis von Frischgewicht zu Fläche und (C) Blattdicke von Col-0 und ME Pflanzen aus dem Kurztag (70 µE) und Langtag (70 µE) im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Bei (A) n=4, (B) n≥6, (C) n≥90.

Die reduzierte Dicke der Blätter könnte zusätzlich zu der veränderten Chlorophyllzusammensetzung auch eine Ursache für den helleren Farbton der Blätter sein, da das Licht die dünneren Blättern einfacher passieren kann und sie somit heller erscheinen.

Die veränderte Pigmentausrüstung provozierte die Frage, ob die Struktur der Chloroplasten und die photosynthetischen Eigenschaften der ME Pflanzen unter Kurztagbedingungen gegenüber dem Wildtyp verändert waren. Zu diesen Punkten wurden weitergehende Untersuchungen angestellt.

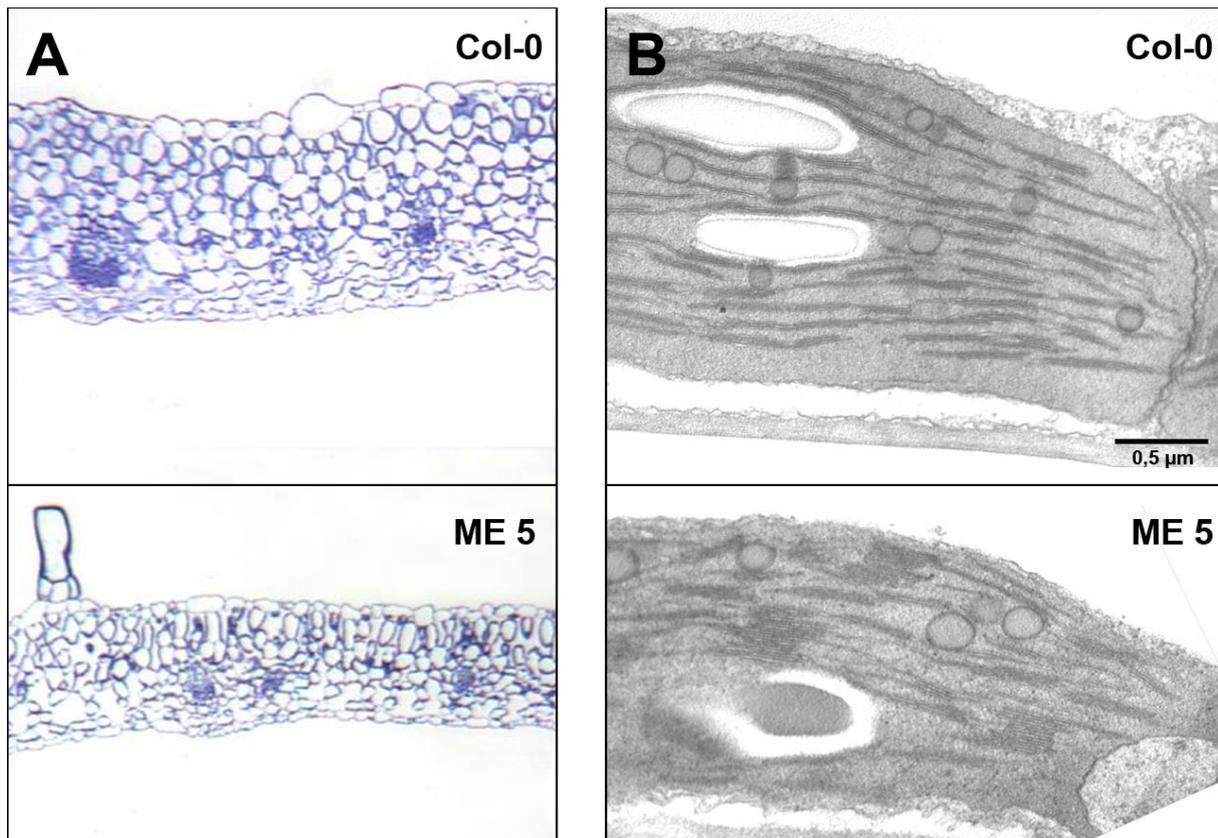


Abbildung 55: (A) Mikroskopische Aufnahmen von fixierten Blattquerschnitten und (B) EM-Bilder der Chloroplasten von Col-0 und ME 5 aus dem Kurztag (70 µE) im Vergleich (Niessen 2006).
Für jeweils beide Bilder in (A) und (B) gilt die gleiche Vergrößerung.

Um die Struktur der Chloroplasten zu untersuchen, wurden am Transmissions-Elektronenmikroskop (2.13.3) Ultradünnschnitte von ME und Col-0 Pflanzen aus dem Kurztag (8:16 h und 12:12 h) verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Chloroplasten von ME Pflanzen ein höheres Maß an Grana-Stapelung aufwiesen als die des Wildtyps. Anhand mehrerer Präparate wurde diese Eigenschaft der ME Pflanzen quantifiziert und die Ergebnisse in Tabelle 9 zusammengefasst (Niessen 2006).

Tabelle 9: Anteil [%] der Thylakoide mit x gestapelten Grana an der Gesamtmenge untersuchter Thylakoide von im Kurztag (70 µE) gewachsenen Col-0 und ME 5 Pflanzen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n \geq 6$

| Linie | Anzahl der Grana pro Granathylakoid | | | |
|-------|-------------------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | 2 | 3-4 | 5-8 | 9 und mehr |
| Col-0 | 14,9 \pm 2,26 | 76,47 \pm 2,05 | 8,73 \pm 1,58 | 0,16 \pm 0,16 |
| ME 5 | 15,79 \pm 2,78 | 53,33 \pm 3,66 | 21,91 \pm 1,94 | 6,31 \pm 1,43 |

Auch die Messung von photosynthetischen Eigenschaften lieferte interessante Erkenntnisse, die einen starken Einfluss der Tageslänge auf die Eigenschaften der ME Pflanzen weiter bestätigten.

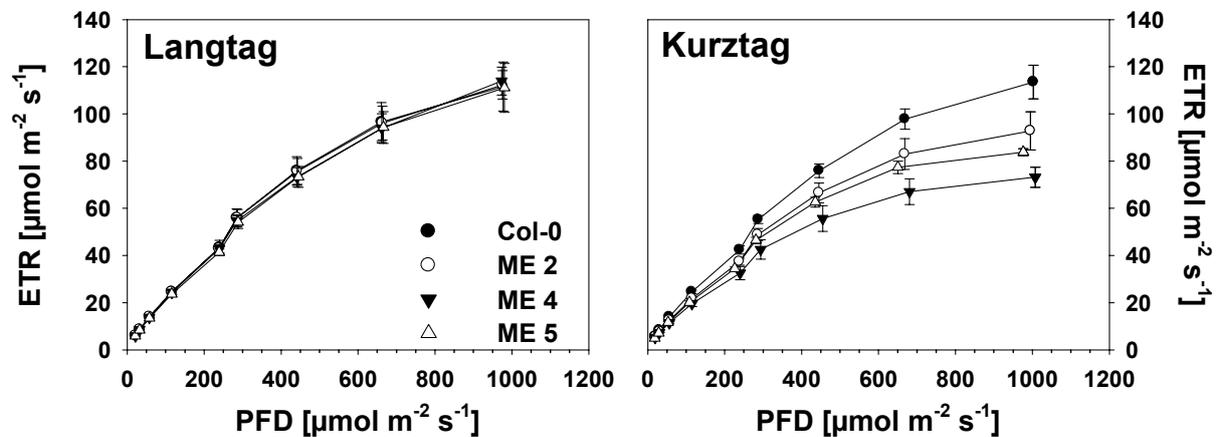


Abbildung 56: Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) von Col-0 und ME Pflanzen, die vier Wochen im Langtag (70 μE) bzw. fünf Wochen im Kurztag (70 μE) gewachsen waren. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung

So konnte gezeigt werden, dass die ME Pflanzen aus dem Kurztag gegenüber Col-0 besonders bei hohen Lichtintensitäten nur deutlich verringerte Elektronentransportraten entwickelten (Abb. 56), wohingegen dies bei ME Pflanzen aus dem Langtag nicht beobachtet werden konnte. Bei diesen Messungen fiel weiterhin auf, dass die Kurztag-ME-Pflanzen mit zunehmender Lichtintensität ein stärker werdendes nicht-photochemisches Quenching (NPQ) zeigten, das über den Werten des zugehörigen Wildtyps lag (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied zwischen diesen Wildtyp und ME Pflanzen hinsichtlich der Parameter F_0 und $1-q_p$ gefunden werden (nicht gezeigt), wie es bei einem höheren Reduktionszustand der Elektronentransportkette, möglicherweise ausgelöst durch das vom ME produzierte NADPH, zu erwarten gewesen wäre (Krause 1991).

Wurden Col-0 und ME Pflanzen aus Kurztag und Langtag dagegen mit 600 μE Hochlicht über eine längere Zeit behandelt, waren die Unterschiede in den ermittelten F_V/F_M Verhältnissen nicht sehr stark (Abb. 57). So zeigten sowohl die ME Pflanzen aus dem Kurz- wie aus dem Langtag nach 5 h Hochlicht einen größeren Abfall im F_V/F_M Verhältnis als Col-0, die anschließende Regeneration dauerte bei den Kurztagpflanzen jedoch vier Tage, während die Langtagpflanzen bereits nach zwei Tagen wieder ein stabiles F_V/F_M Verhältnis erreicht hatten, das aber niedriger als das der Kurztagpflanzen war. Außerdem schloss sich bei den Kurztagpflanzen an diese

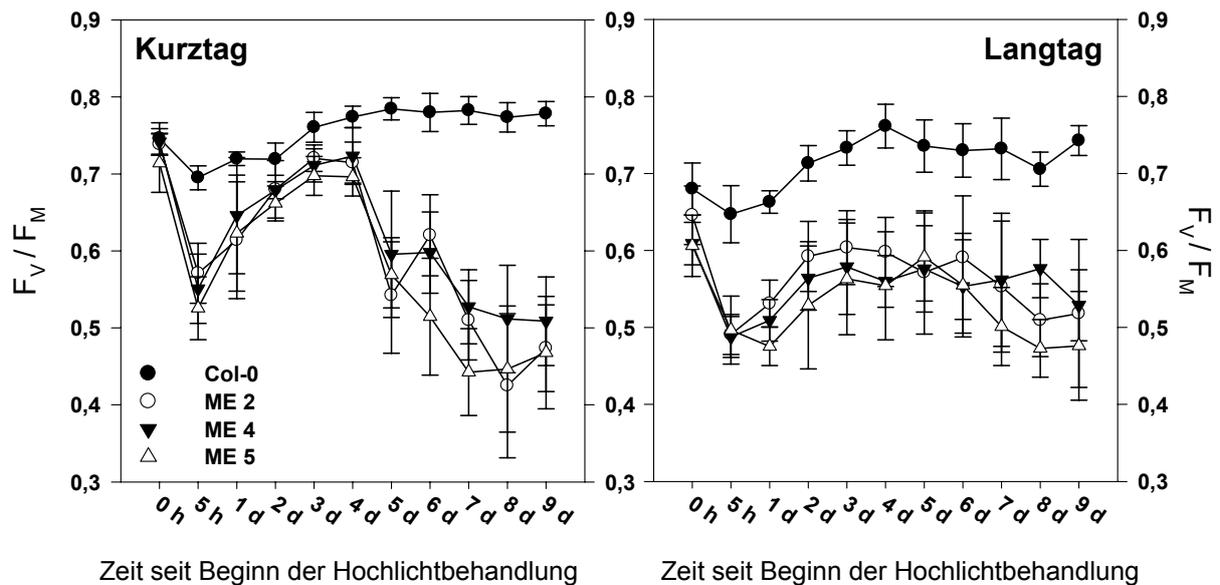


Abbildung 57: F_V/F_M -Verhältnisse von Col-0 und ME Pflanzen aus Kurz- und Langtag (je 70 μE), die in 600 μE Hochlicht überführt und daraufhin jeden Tag gemessen wurden. Die Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 8$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Regeneration direkt eine wiederum starke Verringerung des F_V/F_M Verhältnisses an, welcher bei Langtagpflanzen erst ab Tag sechs der Behandlung einsetzte. Es muss aber angemerkt werden, dass keine der ME Pflanzen während dieses Experiments die F_V/F_M -Werte des Wildtyps erreichte (Abb. 57).

Tageslängen-abhängige Effekte werfen die Frage auf, ob sie allein ein Resultat der Tageslänge oder vielleicht auch der Lichtmenge oder gar dem Produkt aus beidem sind. Um dies zu testen, wurden ME Pflanzen im Kurztag unter verschiedenen Lichtstärken (30, 50 und 150 μE) angezogen und grundlegende physiologische Parameter wurden aufgezeichnet.

Anhand der Fotos von den Pflanzen wurde aber schon deutlich, dass der ME-Phänotyp mit zunehmender Lichtintensität schwächer wurde und umgekehrt auch noch stärker ausgeprägt war, wenn die Lichtintensität mit 30 μE sehr gering war (Abb. 58). Die großen Unterschiede bezüglich des Alters der fotografierten und für die Experimente zu Abb. 59 verwendeten Pflanzen erklären sich durch die extrem unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Lichtintensitäten.

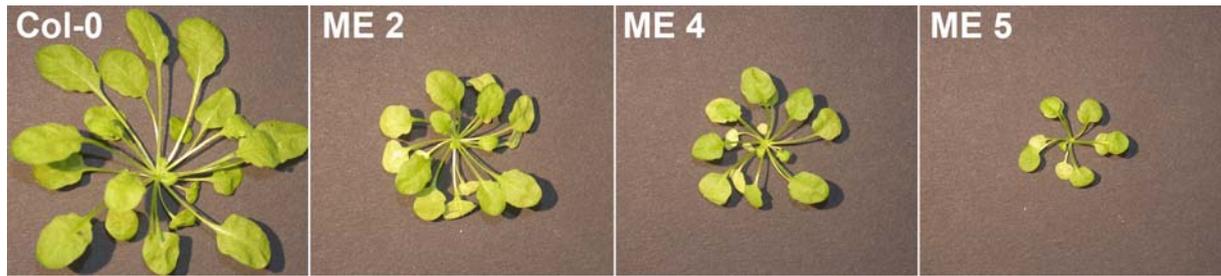


Abbildung 58: 14 Wochen alte, im Kurztag bei 30µE gewachsene Col-0 und ME Pflanzen.

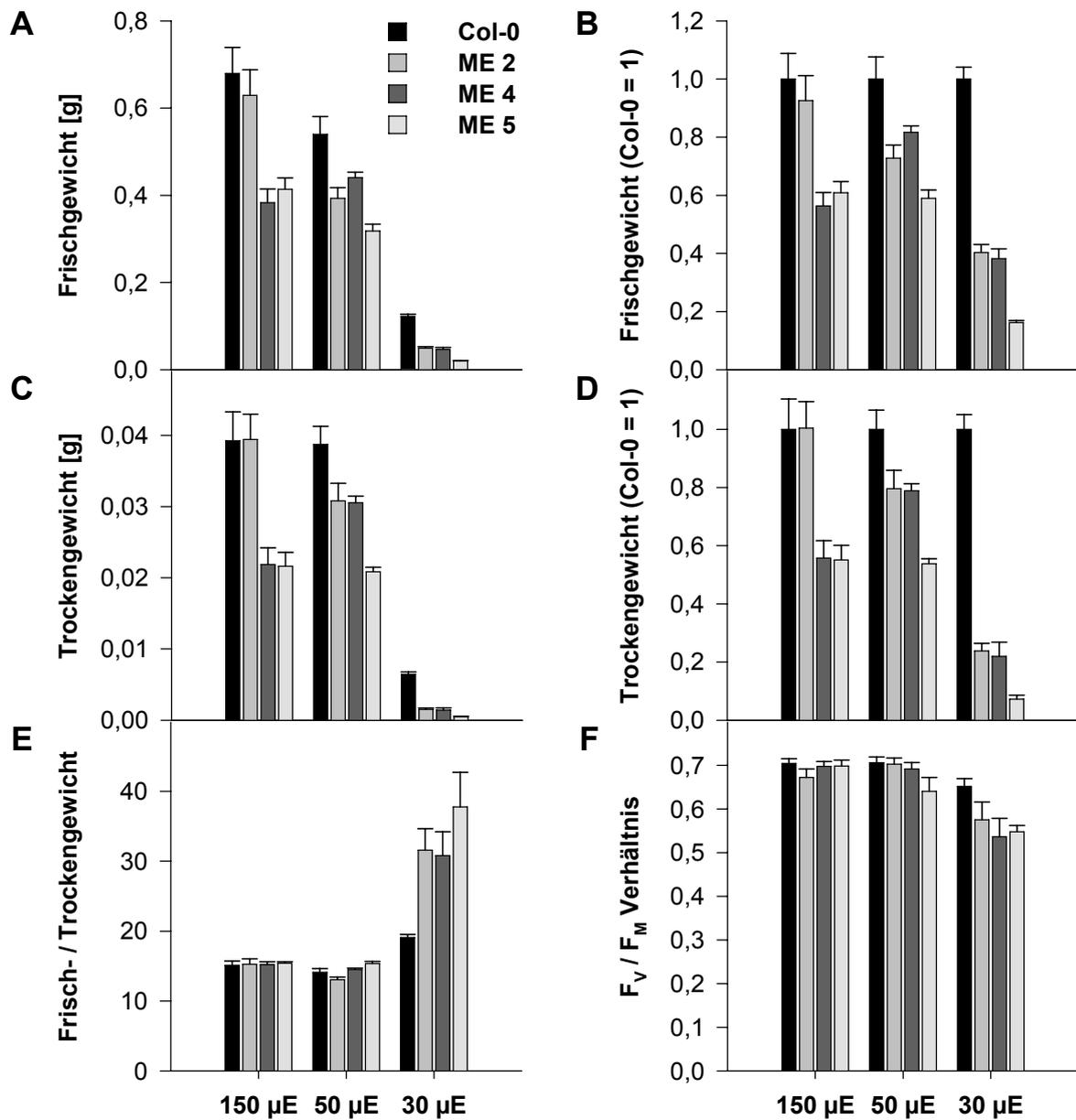


Abbildung 59: Vergleich verschiedener Eigenschaften der Col-0 und ME Pflanzen im Kurztag unter verschiedenen Beleuchtungsstärken: (A)+(B) Frischgewicht, (C)+(D) Trockengewicht, (E) Verhältnis von Frisch- zu Trockengewicht und (F) das F_V / F_M Verhältnis. Für (A)-(E) ist $n=8$, für (F) ist $n \geq 10$, die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern.

Die Unterschiede, die bereits in der Abbildung 58 deutlich wurden, konnten durch die Messung des Frisch- und Trockengewichts bestätigt werden. So zeigten besonders die relativen Werte (Abb. 59 B & D), dass bei 150 μE sowohl bei Frisch- und Trockengewicht die Linie ME 2 (die mit der niedrigsten transgenen Enzymaktivität, s. 3.2.3) noch Wildtypniveau erreichte, wohingegen bei 50 μE alle ME Pflanzen leichter als die des Wildtyps waren, was bei 30 μE noch deutlicher ausfiel. Zusätzlich ist bei den ME Pflanzen, die bei 30 μE gewachsen waren, ein höheres Frisch- zu Trockengewichtsverhältnis festgestellt worden. Ferner geht aus Abbildung 59 F hervor, dass bei 150 μE keine Unterschiede in den F_V/F_M -Verhältnissen von Col-0 und ME Pflanzen gemessen werden konnten, aber bereits bei 50 μE zeigt die Linie ME 5 (die mit der höchsten ME-Aktivität, s. 3.2.3) einen Abfall dieses Parameters gegenüber Col-0, und bei 30 μE schließlich wurden bei allen ME Linien niedrigere F_V/F_M -Verhältnisse als beim Wildtyp nachgewiesen.

Bezüglich der Empfindlichkeit für kurze Tageslängen und auch im Hinblick auf die im nächsten Kapitel beschriebenen Auswirkungen von Dauerdunkel auf die ME Pflanzen wurde ein ganz ähnlicher Phänotyp bereits beschrieben (Reiser et al. 2004; Reinhold et al. 2007). Die beschriebenen Pflanzen sind Nullmutanten für die plastidären ATP/ADP-Translokatoren (AtNTT 1 & 2), die vor allem im Dunkeln die Versorgung des Chloroplasten mit ATP gewährleisten. Die große Ähnlichkeit des Phänotyps und seine gleiche Modulation durch Variation der Lichtstärken und Tageslängen führten zu der Vermutung, dass auch der ME-Phänotyp durch Störungen der plastidären ATP-Versorgung verursacht wird. Die NTT-Mutanten versuchen den Wegfall des ATP-Imports in die Chloroplasten durch eine Erhöhung der Expression und Aktivität von stromalen, ADP phosphorylierenden Enzymen wie der Pyruvatkinase (PK) und der Phosphoglyzeratkinase (PGK) zu kompensieren. Sollte der Phänotyp der ME Pflanzen also mit dem Mangel an ATP in den Chloroplasten verbunden sein, sollten auch in den ME Pflanzen höhere Aktivitäten von PK und PGK sowie stärkere Expressionen der hier vorhandenen NTTs und eventuell auch der mitochondrialen ATP-Transporter AtACC1-5 (Fiore et al. 1998) nachzuweisen sein.

Die Messungen der Pyruvatkinase (Abb. 60) unter verschiedenen Tageslängen und Lichtstärken konnten diese Vermutung allerdings noch nicht bestätigen, da unter allen gemessenen Konditionen keine signifikanten Unterschiede zwischen den ME

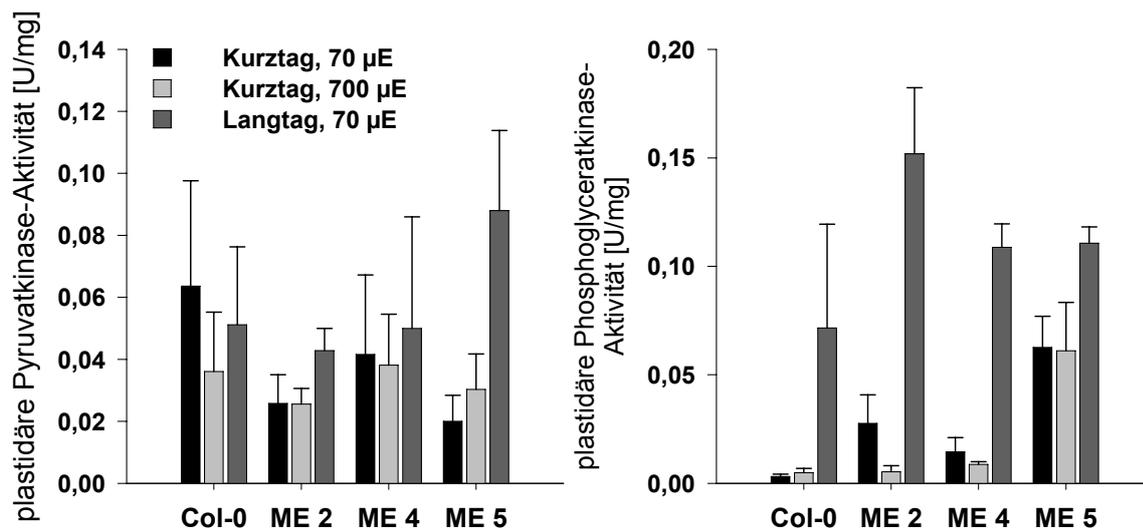


Abbildung 60: Die Aktivitäten der plastidären Pyruvat- und Phosphoglyceratkinase von Col-0 und ME Pflanzen unter verschiedenen Lichtstärken und Tageslängen im Vergleich. Die Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 5$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung und die Probenahme fand am Ende der jeweiligen Dunkelperiode statt (Niessen 2006).

und Col-0 Pflanzen offensichtlich wurden.

Anders verhielt es sich dagegen mit der Messung der Phosphoglyceratkinase (Abb. 60), bei der unter Kurztagbedingungen eine deutlich erhöhte Aktivität in Extrakten von ME Pflanzen, besonders der Linie 5, gegenüber dem Wildtyp auffiel. Unter Langtagbedingungen war die gemessene absolute Aktivität aller Linien zwar höher, aber es waren (auch auf Grund des hohen Messfehlers der Wildtypproben) keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Linien auszumachen.

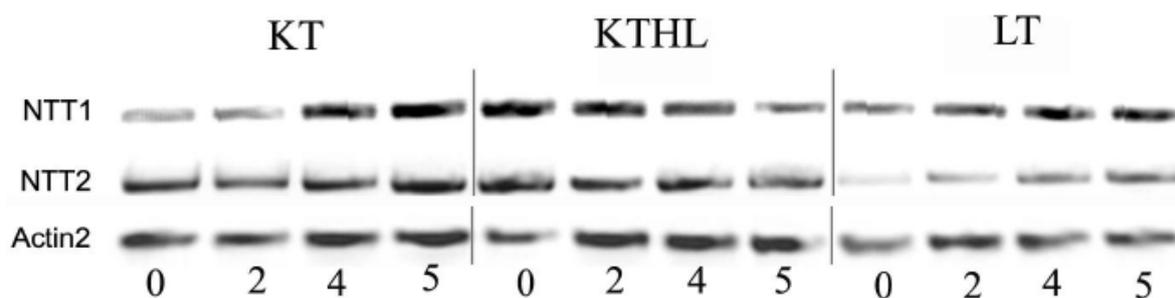


Abbildung 61: Banden der Gelelektrophoresen von semiquantitativen RT-PCRs. Gezeigt sind die Banden der Amplifikation der cDNAs von NTT 1 & 2 und von Actin 2 aus Blatt-cDNA von Col-0 (\rightarrow 0) und ME Pflanzen (\rightarrow 2, 4, 5). KT = Kurztag, 70 μ E; KTHL = Kurztag mit 700 μ E Hochlicht; LT = Langtag, 70 μ E. Probenahme war am Ende der jeweiligen Dunkelperiode (Niessen 2006).

Expressionsstudien der NTTs (Abb. 61) ergaben, dass im Langtag (LT) die Expression von NTT 1 im Wildtyp höher ist als die von NTT 2, wohingegen sich diese Verhältnisse im Kurztag (KT) umkehrten. Im Vergleich mit den ME Pflanzen zeigte sich, dass diese im Langtag höhere Expressionsstärken für beide NTTs erreichten,

aber im Kurztag nur die Expression von NTT 1 gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Bei den Proben aus dem Kurztag mit Hochlicht (700 μ E) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Parallel mit denselben cDNAs durchgeführte RT-PCRs auf die Gene AtACC1-5 ließen lediglich unter Langtagbedingungen eine stärkere Expression von ACC 2 und 3 in allen ME Linien relativ zu Col-0, aber ansonsten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Linien in den anderen Konditionen erkennen (nicht gezeigt).

Letzte Klarheit in diesem Punkt sollte eine Messung der Gehalte von ATP und ADP in Blattextrakten von Col-0 und ME Pflanzen bringen, die nach 2.11.6 in Zusammenarbeit mit Maria Inés Zanol (MPI Golm) durchgeführt wurde.

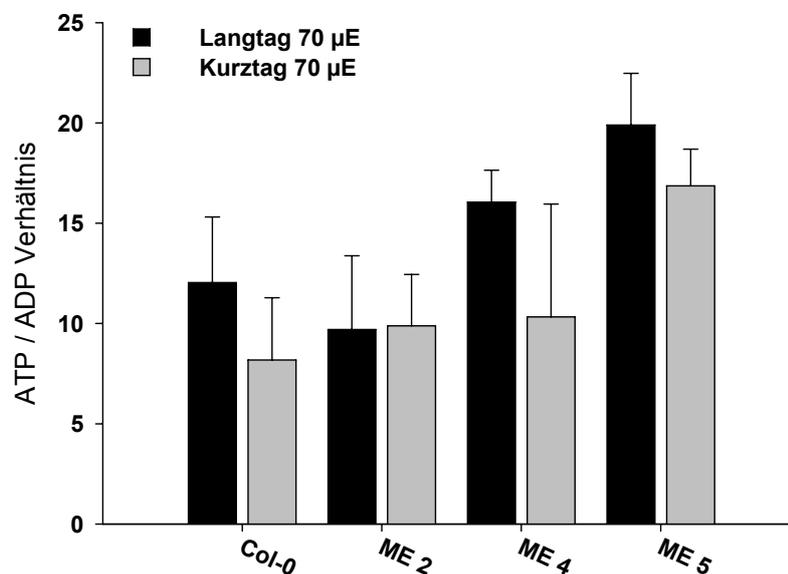


Abbildung 62: Das ATP zu ADP Verhältnis in Blattextrakten von vier Wochen alten Col-0 und ME Pflanzen aus dem Langtag bzw. fünf Wochen alten Pflanzen aus dem Kurztag. Die Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung und die Probennahme fand drei Stunden nach dem Ende der jeweiligen Dunkelperiode statt.

Das aus diesen Messungen abgeleitete ATP/ADP Verhältnis, das ein wichtiger Indikator und Regulator des zellulären Energiezustandes ist (Igamberdiev und Kleczkowski 2006; Reinhold et al. 2007), war im Langtag bei den Pflanzen der Linien ME 4 und 5 tendenziell gegenüber dem Wildtyp erhöht, aber noch im Rahmen der Standardabweichungen. Auch unter Kurztagbedingungen, die den Phänotyp der ME Pflanzen hervorriefen, konnte in den Pflanzen der Linie ME 5 ein erhöhtes ATP/ADP Verhältnis nachgewiesen werden (Abb. 62). Diese Ergebnisse konnten im Kurztag allerdings für die anderen ME Linien nicht bestätigt werden, deren ATP/ADP-Verhältnisse vergleichbar mit dem Wildtyp waren.

Da von diesen Ergebnissen auf keine schwerwiegenden Beeinträchtigungen in der ATP-Versorgung der Plastiden der ME Pflanzen geschlossen werden konnte, sollte ein möglichst komplettes Bild des Primärmetabolismus der ME und Wildtyppflanzen während eines Tagesgangs aufgenommen werden, um die Auswirkungen der zusätzlichen NADP-ME-Aktivität in den Chloroplasten der ME Pflanzen auf den Metabolismus besser einschätzen zu können. Dafür wurden während eines Tagesganges im Langtag und an ausgewählten Punkten im Kurztag von ME und Col-0 Pflanzen Proben zur simultanen Messung von ~80 Metaboliten mittels GC/MS und zur Stärkebestimmung genommen.

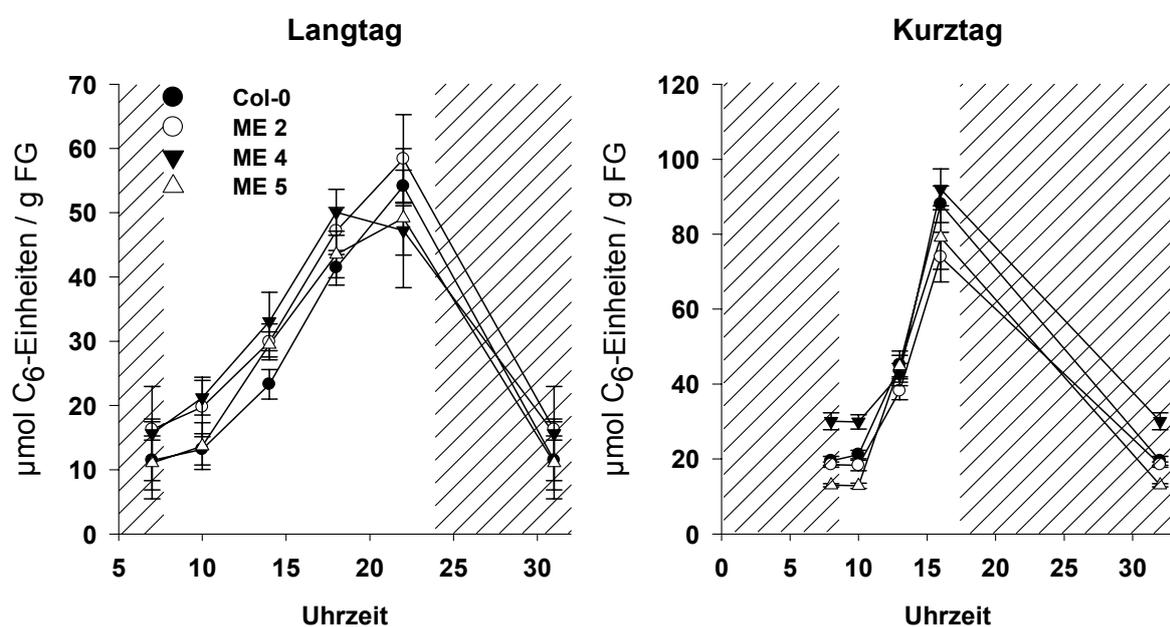


Abbildung 63: Verlauf der Stärkegehalte von vier bzw. fünf Wochen alten Col-0 und ME Pflanzen aus dem Lang- bzw. Kurztag (70 μ E) während eines Tagesganges im Vergleich. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus $n=4$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung, die schraffierten Felder markieren die Dunkelperiode.

Die Stärkebestimmung (Abb. 63) während der Kurz- und Langtagesgänge offenbarte keine Unterschiede in der Stärkeakkumulation oder dem nächtlichen Abbau zwischen den Col-0 und ME Pflanzen. Zwar gab es z. B. zum Beginn der Lichtperiode im Kurztag Unterschiede im Stärkegehalt der ME Pflanzen und Col-0, aber es ist kein eindeutiger Trend der ME Pflanzen hin zu mehr oder weniger Stärke im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Bei den hier nicht dargestellten Gehalten der Zucker (Saccharose, Fruktose und Glukose) konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Col-0 und ME Pflanzen während der Tagesgänge ermittelt werden, so dass davon ausgegangen werden musste, dass der Zucker-Metabolismus in den ME Pflanzen nicht beeinträchtigt war.

Ein anderes Bild ergab sich jedoch bei den Ergebnissen der GC/MS Analyse (s. 2.12) von Proben aus dem Langtagesgang von ME und Col-0 Pflanzen, wie sie in Abbildung 65 dargestellt sind. Die ME Pflanzen produzierten in dieser Untersuchung ein nahezu deckungsgleiches Ergebnis, so dass in der Abbildung der Übersichtlichkeit halber nur die Linie ME 4 gezeigt wird (Fahnenstich et al. 2007).

Wie erwartet sind die Gehalte von Malat in den ME Pflanzen gegenüber Col-0 dramatisch reduziert (Abb. 65, Übersicht in Tabelle 10), wobei auch das metabolisch nahestehende Fumarat (Behal und Oliver 1997; Nunes-Nesi et al. 2007) ebensolche Unterschiede zum Wildtyp aufweist. Diese beiden Metaboliten akkumulieren während der Lichtphase, bevor sie kurz vor der Dunkelperiode ihr Maximum erreichen, um dann im Dunkeln wieder bis auf ein Minimum zum Beginn der Lichtperiode abgebaut zu werden. Dieser Abbau verläuft bei Malat kontinuierlich, bei Fumarat dagegen ergibt sich ein schneller Abbau in der ersten Stunde der Dunkelheit, gefolgt von einem ebenso sprunghaften Anstieg, woran sich der endgültige Abbau bis zum Ende der Nacht anschließt. Diesen Verlauf im Tagesgang zeigen auch die ME Pflanzen, aber auf einem wesentlich niedrigeren Niveau und ohne den nächtlichen Zwischenanstieg beim Fumarat.

Im Zusammenhang mit Fumarat fiel bei den GC/MS Messungen überdies auf, dass Fumarat, wie aus den Gaschromatogrammen ersichtlich (Abb. 64), an vielen Punkten des Tagesganges neben Saccharose der Metabolit mit der zweithöchsten Konzentration in den Extrakten war.

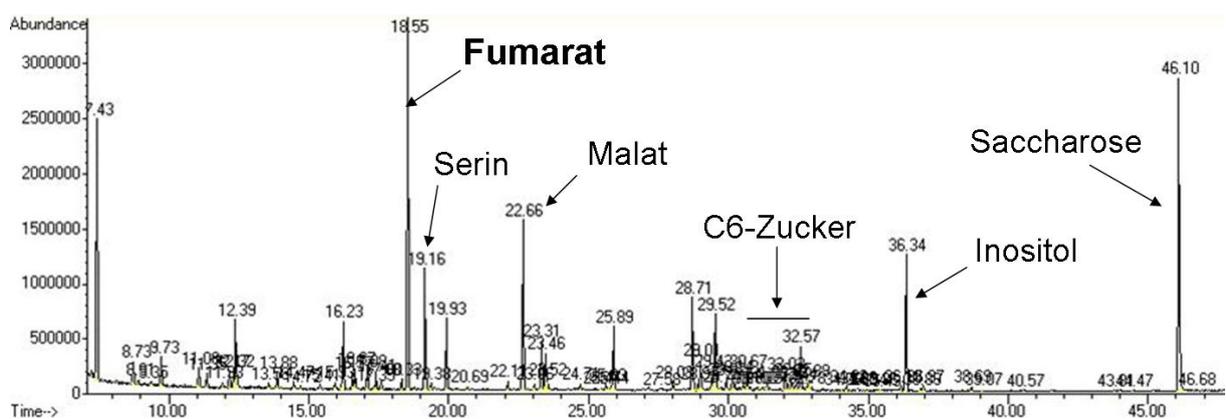


Abbildung 64: Gaschromatogramm eines GC/MS Laufes, Probe von Col-0 am Ende der Lichtperiode

Die Gehalte von Pyruvat, dem Produkt der ME-Reaktion waren in allen ME Linien gegenüber dem Wildtyp stark erhöht (70% mehr am Ende der Nachtperiode, Abb. 65), wobei jedoch das Muster des Tagesverlaufs gleich dem von Col-0 war. Dabei

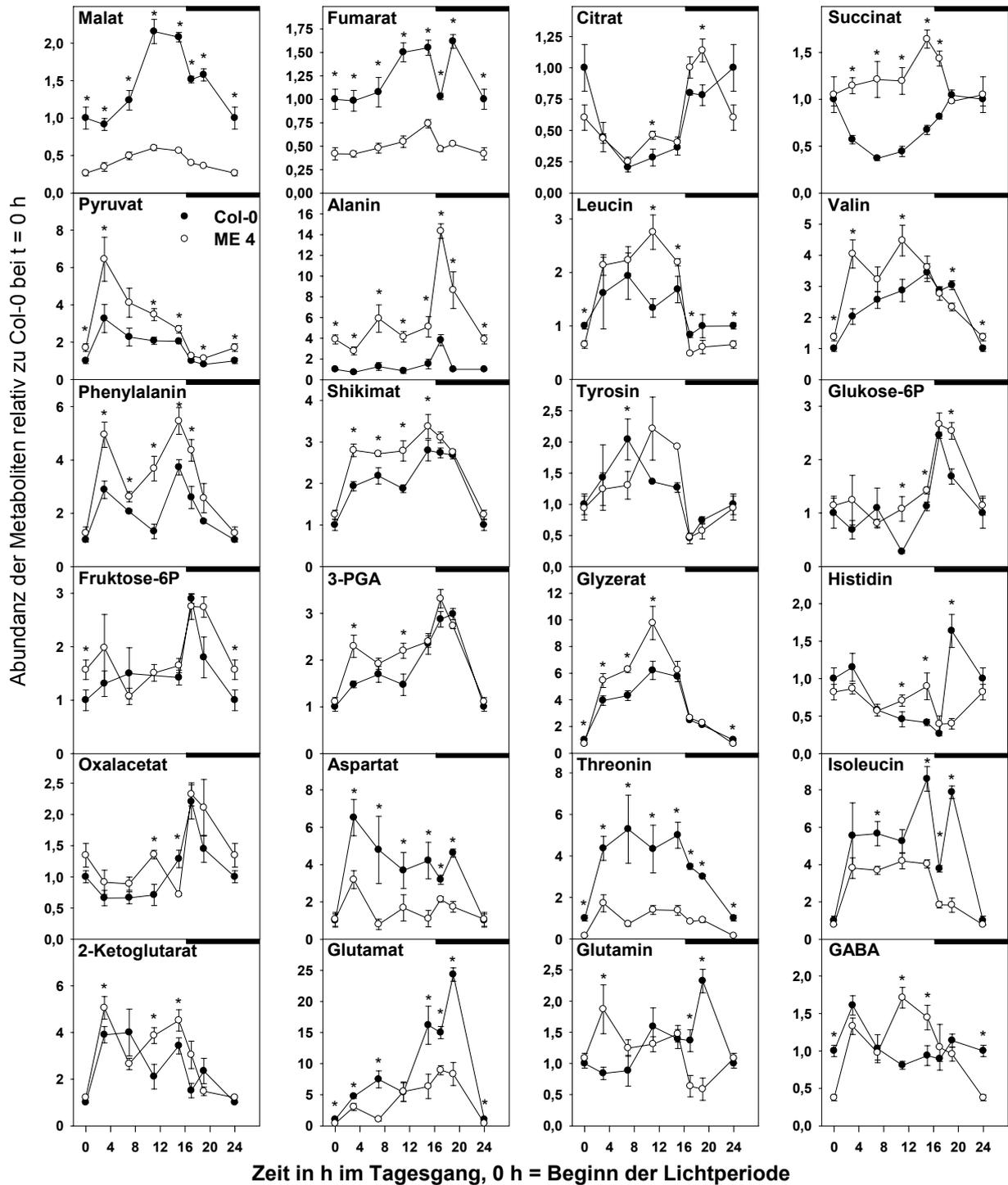


Abbildung 65: Ergebnisse der GC/MS-Analysen von Blattextrakten von vier Wochen alten Col-0 und ME Pflanzen aus dem Langtag (70 μ E). Zur besseren Übersichtlichkeit werden nur die Ergebnisse von Col-0 (gefüllte Kreise) und ME 4 (offene Kreise) wiedergegeben. Ein * markiert ME 4-Werte, die signifikant ($p < 0,05$) von denen des Wildtyps unterschiedlich sind, der schwarze Balken zeigt die Dunkelperiode an. Die Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

zeigte Pyruvat in allen Linien am Anfang der Lichtperiode die höchste Akkumulation des Tagesganges (bei ME Pflanzen etwa doppelt so hoch wie bei Col-0), gefolgt von einem stetigen Abbau hin zu einem basalen Niveau am Ende des Tages.

Die von Pyruvat abgeleiteten Aminosäuren Leucin, Valin und besonders Alanin (Schulze-Siebert et al. 1984) veränderten ihre Gehalte im Tagesverlauf nach dem gleichen Muster wie beim Wildtyp, waren aber wie Pyruvat in ME Pflanzen höher konzentriert.

Die organischen Säuren Citrat, 2-Ketoglutarat und Oxalacetat zeigten vergleichbare Gehalte und Veränderungen in allen Linien. Interessanterweise war der Succinatgehalt in den transgenen Linien über die ganze Lichtperiode gegenüber dem Wildtyp erhöht, während in der zweiten Hälfte der Dunkelperiode alle Linien wieder ähnliche Werte aufwiesen.

Weiterhin waren in den ME Pflanzen die Gehalte von Aspartat, Threonin, Isoleucin und Methionin während des gesamten Tagesgangs gegenüber dem Wildtyp erhöht (außer Leu und Asp am Ende der Nacht).

Glutamat und GABA veränderten sich im Tagesverlauf zwar wie beim Wildtyp, aber während der Glutamatgehalt außer am Ende der Nacht niedriger als bei Col-0 war, war der GABA-Gehalt am Ende der Lichtperiode höher und am Ende der Dunkelperiode niedriger als beim Wildtyp. Der erhöhte GABA-Gehalt könnte durch eine erhöhte Umwandlung von Glutamat zu GABA (Bouche et al. 2003; Studart-Guimaraes et al. 2007) bedingt sein, wofür auch die höheren Gehalte an Succinat in den ME Pflanzen zu diesen Zeitpunkten sprächen.

Die Gehalte von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat zeigten nahezu synchrone Veränderungen während des Tagesganges mit einer Akkumulation zu Beginn der Dunkelperiode, und auch zwischen den untersuchten Linien wurden keine großen Unterschiede offensichtlich.

Die mit der Photosynthese assoziierten Metabolite 3-PGA und Glyzerat (Tolbert 1997; Raines 2003) akkumulierten während der Lichtperiode und wurden im Dunkeln (3-PGA etwas verzögert, Abb. 65) wieder abgebaut, wobei sie in den ME Pflanzen in höheren Konzentrationen als im Wildtyp vorlagen.

Shikimat, das aus der Kondensation von PEP (aus 3-PGA) und Erythrose-4-Phosphat entsteht und die Ausgangssubstanz für die Synthese von aromatischen Verbindungen ist (Voll et al. 2003), wurde in den ME Pflanzen, zusammen mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, gleichfalls in höheren Konzentrationen als in

Col-0 Pflanzen gefunden. Andererseits waren die Gehalte der aromatischen Aminosäure Tyrosin gegenüber dem Wildtyp unverändert und Tryptophan lag unterhalb der Detektionsgrenze.

Auch im Kurztag wurden unter verschiedenen Lichtintensitäten (30 μE und 75 ± 5 μE) an ausgewählten Punkten (so auch an den Übergängen von Licht- zu Dunkelperioden) Proben zur Analyse in der GC/MS genommen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse entsprachen in ihrer generellen Tendenz denen des Langtags. So waren auch im Kurztag die Gehalte von Malat und Fumarat in den ME Pflanzen gegenüber dem Wildtyp stark erniedrigt, und auch die im Langtag in den ME Pflanzen beobachteten höheren Gehalte von Pyruvat und seinen Derivaten konnten bei Kurztagpflanzen an den untersuchten Punkten bestätigt werden.

Große Unterschiede zeigten sich jedoch beim Vergleich der auf den jeweiligen Wildtyp bezogenen relativen Fumarat- und Malat-Gehalte unter den verschiedenen Tageslängen und auch Lichtstärken, zusammengefasst in Tabelle 10.

Tabelle 10: Die Gehalte von Malat und Fumarat in den Pflanzen der ME Linien bei verschiedenen Tageslängen und Beleuchtungsstärken am Ende der Licht- und Dunkelperiode. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Linien (ME 2,4 und 5 \rightarrow $n \geq 12$) als prozentualer Anteil am jeweiligen Wildtypwert.

| | Langtag (75 ± 5 μE) | | Kurztag (75 ± 5 μE) | | Kurztag (30 μE) | |
|---------|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | Ende Tag | Ende Nacht | Ende Tag | Ende Nacht | Ende Tag | Ende Nacht |
| Malat | 22% | 26% | 25% | 23% | 36% | 6% |
| Fumarat | 44% | 39% | 27% | 24% | 22% | 3% |

Bei diesen Berechnungen fiel auf, dass sich der relative Fumarat-Gehalt von ME Pflanzen durch das Wachstum im Kurztag gegenüber dem Langtag an beiden Licht/Dunkel-Übergängen nahezu halbiert hatte, wohingegen der relative Malat-Gehalt nahezu unverändert blieb. Wurden die Pflanzen dann im Kurztag bei Schwachlicht (30 μE , vgl. Abb. 58) angezogen, so konnten Malat- und Fumarat-Gehalte gemessen werden, die nur noch 6% respektive 3% der Wildtypgehalte zu diesem Zeitpunkt darstellten.

3.8.2 Andauernde Dunkelheit führt zu einer verfrühten Seneszenz

Die in 3.8.1 dargestellten Ergebnisse zeigten eindeutig, dass eine geringere Lichtmenge zu einer stärkeren Ausprägung des ME-Phänotyps führt. Es stellte sich

daher zwangsläufig die Frage, wie die ME Pflanzen auf eine längere Periode absoluter Dunkelheit reagieren würden.



Abbildung 66: Im Langtag (70 μ E) gewachsene Col-0 und ME Pflanzen, die ab einem Alter von 30 Tagen für vier Tage ohne Licht inkubiert wurden.

Um diese Frage zu beantworten, wurden ME und Col-0 Pflanzen aus dem Langtag (vgl. Abb. 53) für mehrere Tage abgedunkelt. Während sich der Wildtyp nach vier Tagen im Dunkeln immer noch grün zeigte, waren die ME Pflanzen bereits in einem Stadium fortgeschrittener Seneszenz angelangt, was sich durch die gelben Blätter manifestierte (Abb. 66). Wurden die Pflanzen in diesem Stadium wieder ins Licht überführt, zeigte der Wildtyp weiterhin normales Wachstum, die ME Pflanzen hingegen waren nicht mehr zu retten und vergingen nach wenigen Tagen. Dieselben Symptome fortschreitender Seneszenz zeigten sich im Dauerdunkel auch beim Wildtyp, jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 3-4 Tagen gegenüber den ME Pflanzen, bei denen die ersten Symptome nach etwa zweieinhalb Tagen auftraten. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Seneszenzsymptome, also die Gelbfärbung der Blätter, wie bei einer normalen, also einer entwicklungsabhängigen Seneszenz, fortschritten (Lim et al. 2007). Diese Symptome zeigten sich demnach zuerst an der Spitze der Blätter und breiteten sich von dort in Richtung der Blattbasis aus (Abb. 67 E), außerdem bleiben die Blattvenen ein wenig länger grün und lebensfähig, um den Export von Nährstoffen aus den sterbenden Zellen zu gewährleisten (Buchanan-Wollaston et al. 2005).

Damit abschließend geklärt werden konnte, ob das Phänomen korrekt als Seneszenz bezeichnet werden kann, wurden weitere Parameter gemessen, von denen bekannt war, dass sie sich im Zuge einer Seneszenz stark verändern, wie das F_v/F_m -Verhältnis, der Chlorophyll- und Proteingehalt und natürlich die Anzahl und die räumliche Verteilung von Zelltodereignissen in den Blättern (Abb. 67, Buchanan-Wollaston et al. (2005), Diaz et al. (2005)).

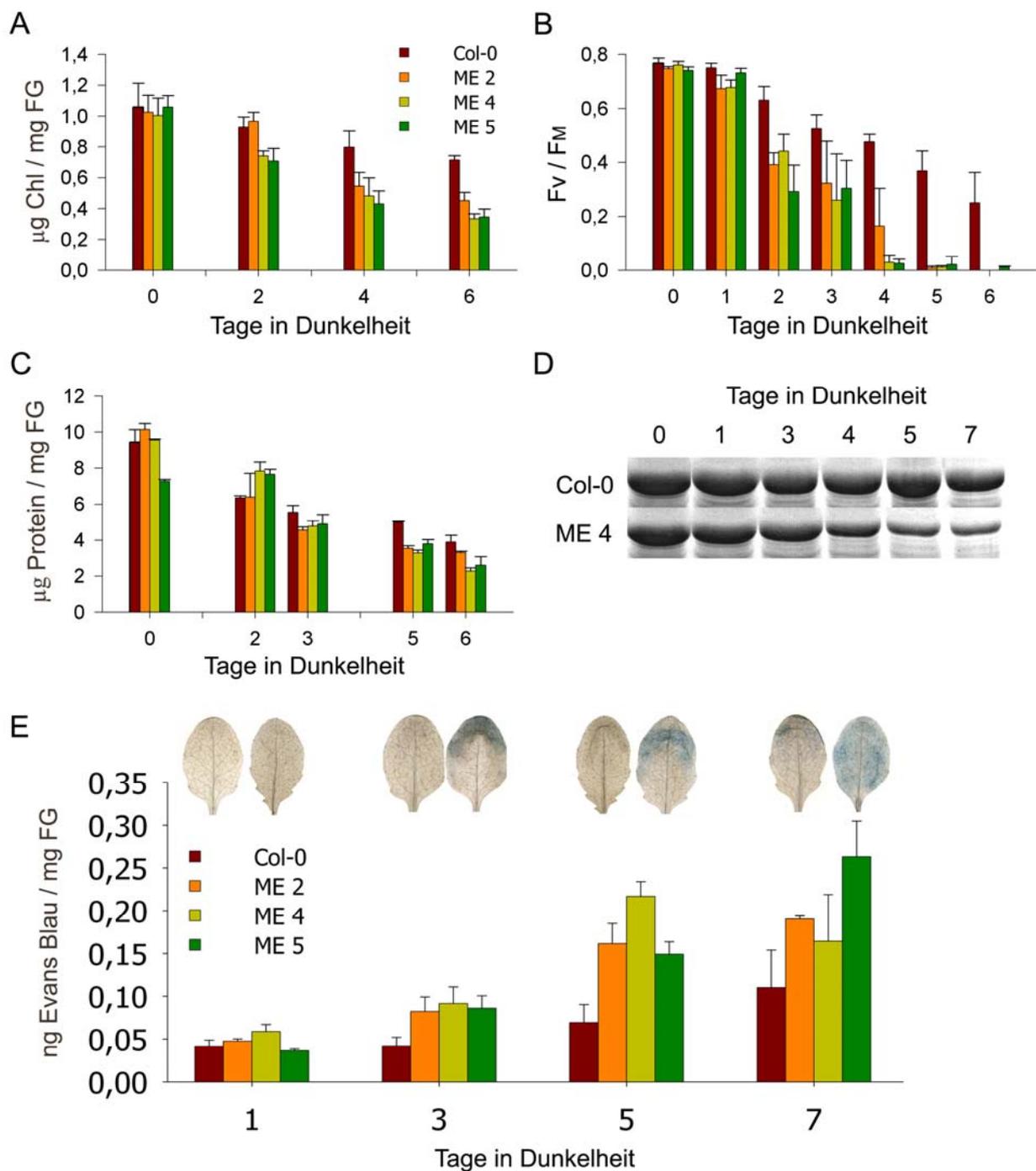


Abbildung 67: Verschiedene seneszenz-assoziierte Parameter, gemessen an Col-0 und ME Pflanzen aus dem Langtag (70 μE), die im Alter von 30 Tagen in die Dunkelheit überführt wurden. (A) Chlorophyllgehalt bezogen auf Frischgewicht, (B) Fv/FM Verhältnis, (C) Proteingehalt bezogen auf Frischgewicht, (D) Fotos von der 54 kDa Bande der RubisCO in SDS-Gele, beladen mit Proteinextrakten aus Blättern und gefärbt mit Coomassie Blue; (E) Fotos: *in situ*-Färbung von Zelltodereignissen in Blättern von Col-0 (jeweils links) und ME Pflanzen zu den unten angegebenen Tagen in Dunkelheit; Diagramm: Quantifizierung von Zelltodereignissen in Blattextrakten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus $n=6$ Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Bei diesen Untersuchungen konnten die Aussagen, die auf Grund der Äußerlichkeiten der ME Pflanzen im Dauerdunkel gemacht wurden, bestätigt werden. So fiel der Chlorophyllgehalt in ME Pflanzen deutlich schneller als im Wildtyp (Abb. 67 A) und das F_V/F_M -Verhältnis der ME Pflanzen erreichte bereits nach zwei Tagen Dunkelheit Werte, die der Wildtyp erst nach fünf Tagen im Dunkeln annahm, als bei den ME Pflanzen schon kaum noch Fluoreszenz der Photosysteme feststellbar war (Abb. 67 B).

Auch bei der Proteinbestimmung (Abb. 67 C) kann ein Trend der ME Pflanzen zu geringeren Werten als bei Col-0 erkannt werden, wirklich deutlich wird der fortschreitende Proteinabbau jedoch bei Betrachtung des RubisCO-Gehaltes in Proteinextrakten (Abb. 67 D). Die ME Pflanzen hatten am Tag drei der Dunkelheit schon einen erkennbaren Anteil der RubisCO abgebaut, und dieser Prozess setzte sich bis zum Ende des Experiments fort, wobei jedoch der Wildtyp kaum Anzeichen eines beginnenden Abbaus der RubisCO zeigte.

Die Färbung von Zelltodereignissen letztlich verdeutlichte nicht nur, dass das photometrisch bestimmte Ausmaß des Zelltods in den ME Pflanzen im Dunkeln um etwa 2-3 Tage schneller zunimmt als beim Wildtyp, sondern es konnte auch durch die histochemische Färbung der Zelltodereignisse bestätigt werden, dass sich diese in Ihrer Zunahme von der Spitze des Blattes zur Basis entwickeln (Abb. 67 E).

Nachdem nachgewiesen war, dass es sich bei dem beobachteten Dunkelphänotyp (Abb. 66) der ME Pflanzen um eine verfrühte dunkel-induzierte Seneszenz handelt, stellte sich wiederum die Frage nach der Ursache dieser Entwicklung. Weiterhin musste natürlich in Betracht gezogen werden, dass diese Seneszenz eine extreme Form des Kurztagphänotyps (vgl. 3.8.1) ist und daher die gleichen Ursachen hat.

Ebenso wie bei der Untersuchung des Kurztagphänotyps wurde auch hier angestrebt, ein möglichst komplettes Bild des Primärmetabolismus während der Dunkelinkubation zu erstellen. Dafür wurden wiederum während dieser Phase Proben für die Bestimmung von Stärke, löslichen Zuckern und für die Analyse in der GC/MS genommen.

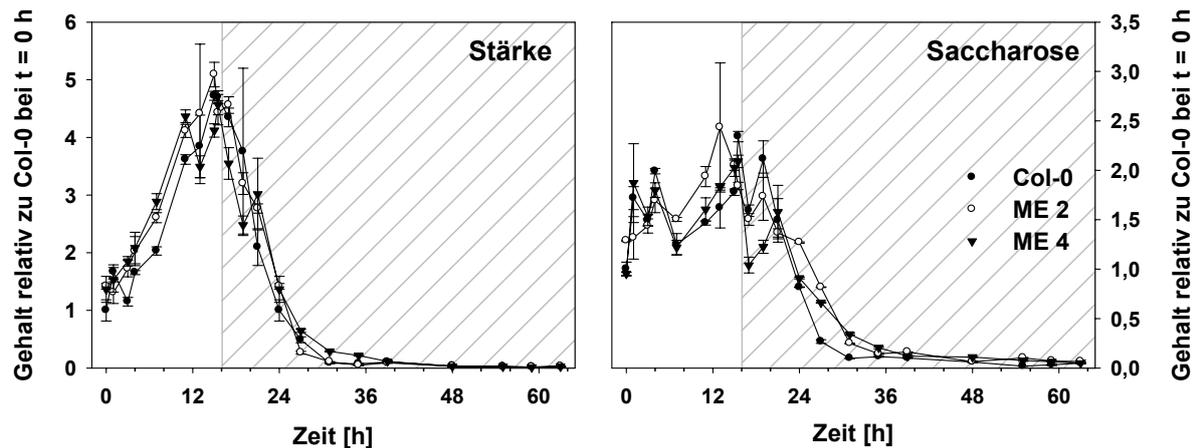


Abbildung 68: Verlauf des Stärke- und Saccharosegehaltes in Col-0 und ME Pflanzen während der Dunkelinkubation (schraffierter Bereich). Die Pflanzen waren zu Beginn des Experiments 30 Tage alt und im Langtag (70 μ E) gewachsen. Die Werte sind Mittelwerte aus n=8 Einzelmessungen \pm Standardabweichung.

Die Messungen von Stärke in den Blättern der Col-0 und ME Pflanzen (Abb. 68) erbrachten keine Anhaltspunkte für veränderten Stärkeaufbau oder -abbau in den ME Pflanzen. So synthetisierten sowohl Col-0 als auch ME Pflanzen bis zum Eintritt der Dunkelheit Stärke bis zu einem vergleichbaren Niveau und bauten sie von dort ausgehend mit gleicher Geschwindigkeit ab, bis etwa 32 h nach Beginn der Dunkelheit nahezu alles verbraucht war. Auch beim Verlauf der Saccharosegehalte während dieses Experiments konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den ME Linien und dem Wildtyp festgestellt werden. Die Saccharosegehalte der untersuchten Linien oszillierten im Licht, wobei aber kein genereller Trend beobachtet werden konnte. Nach etwa 4 h im Dunkeln setzte ein genereller Verbrauch von Saccharose ein, der 24 h später beendet war, wenn der Saccharosegehalt ein basales Niveau in allen Linien erreicht hatte.

Die Gehalte von Saccharose im Dunkeln wurden ebenso wie die von Glukose und Fruktose auch in der GC/MS gemessen (Abb. 69), und es bestätigte sich der photometrisch für Saccharose ermittelte Verlauf (Abb. 68). Glukose und Fruktose zeigten eine ähnliche Entwicklung, auch ihre Gehalte sanken im Dunkeln in ME und Col-0 Pflanzen gleichermaßen ab und verweilten dann auf einem basalen Wert (Abb. 69).

Die Gehalte von Malat, Fumarat, Citrat, Succinat und 2-Ketoglutarat sanken während der ersten Stunden in Dunkelheit sehr schnell ab und verweilten auf diesem niedrigen Niveau während der nächsten Tage, bevor sie in ME Pflanzen am Tag vier und in Col-0 Pflanzen am Tag sechs der Dunkelbehandlung stark anstiegen.

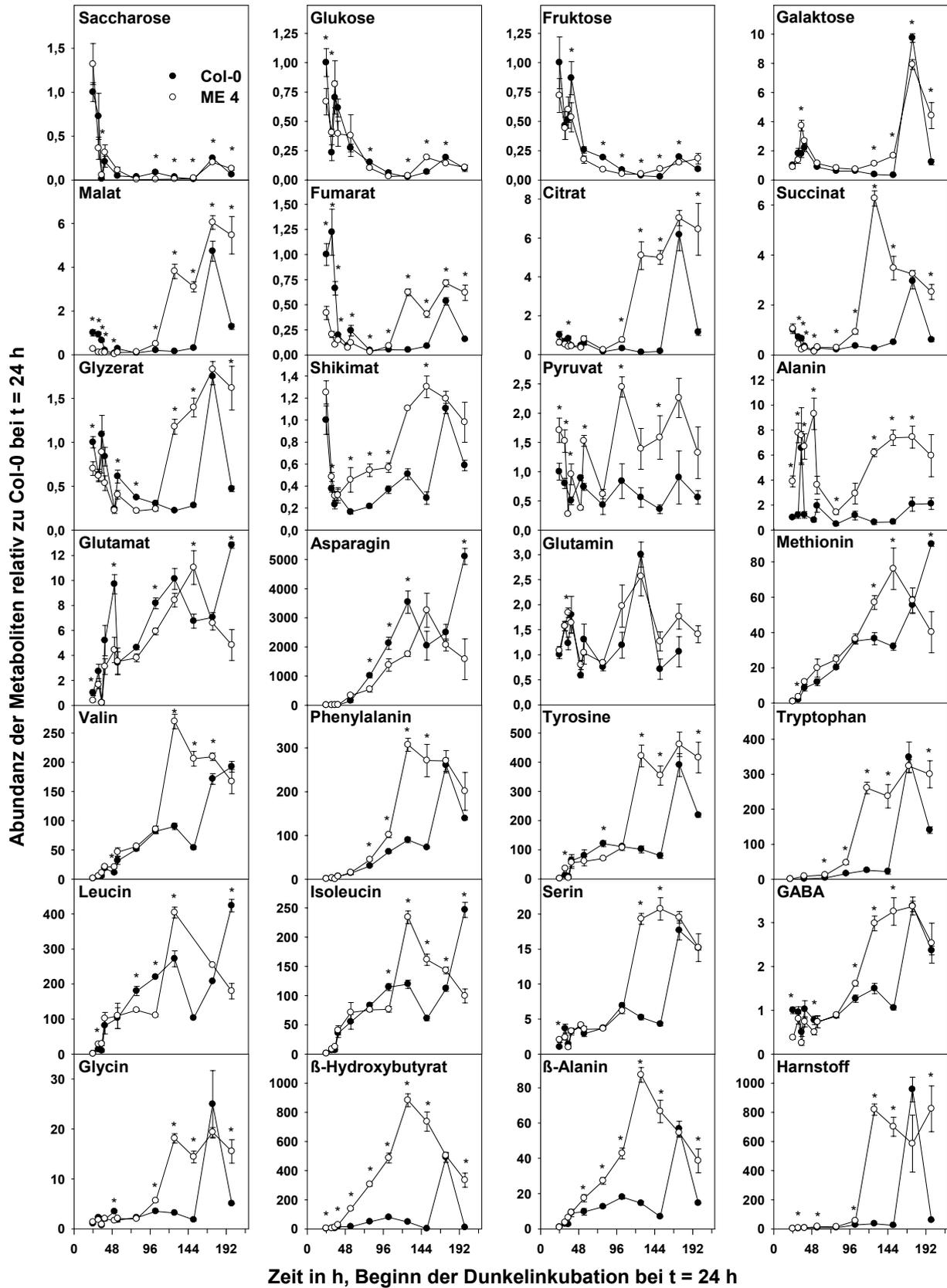


Abbildung 69: Ergebnisse der GC/MS-Analysen von Blattextrakten von Col-0 und ME Pflanzen aus dem Dauerdunkel nach Langtag (70 μ E). Der besseren Übersichtlichkeit halber werden nur die Ergebnisse von Col-0 (gefüllte Kreise) und ME 4 (offene Kreise) wiedergegeben. Ein * markiert ME 4-Werte, die signifikant ($p < 0,05$) von denen des Wildtyps unterschiedlich sind. Die Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 4$ Einzelmessungen \pm Standardfehler.

Dieser Verlauf wurde auch bei Shikimat und Glyzerat beobachtet, allerdings waren die Anstiege im späteren Verlauf des Experiments nicht so ausgeprägt wie bei den Intermediaten des Citrat-Zyklus (Abb. 69).

Im Gegensatz dazu verringerten sich die Gehalte von Pyruvat in den ersten Stunden Dunkelheit und blieben dann während der gesamten Dauer des Experiments auf niedrigem Niveau, wobei die ME Pflanzen immer höhere Gehalte als der Wildtyp vorzuweisen hatten.

Auch die Gehalte von Aminosäuren wurden während der Inkubation im Dunkeln verfolgt, und dabei zeigte sich, dass der Gehalt von Alanin in den ersten Stunden im Dunkel in den ME und kurzzeitig auch in den Col-0 Pflanzen anstieg, um dann aber nach zwei Tagen ohne Licht minimale Werte zu erreichen. Im Wildtyp wurde dann ein leichter Anstieg von Alanin nach sechs Tagen im Dunkeln registriert, während sich in den ME Pflanzen bereits zwei Tage vorher ein starker Anstieg des Alaningehaltes ereignete. In beiden Fällen fiel dieser Anstieg zeitlich mit dem Auftreten erster Seneszenzsymptome zusammen.

Die Glutamat- und Asparagingehalte verliefen in ME und Col-0 Pflanzen ohne Licht nahezu gleich. Der Glutamatgehalt stieg nach 24 h an, sank am nächsten Tag ab und nahm danach wiederum weiter zu. ME Pflanzen erreichten maximale Werte am Tag fünf, und für den Wildtyp wurden zwei Maxima erkannt, eines am Tag vier und das andere am Tag sieben. Die Asparaginkonzentration war zu Beginn der Dunkelphase nahe dem Detektionslimit, stieg aber nach 24 h stetig an und erreichte maximale Werte zu denselben Zeitpunkten wie Glutamat. Glutamin zeigte im Verlauf in ME und Col-0 Pflanzen das gleiche Profil mit zwei Maxima, jeweils nach 15 h und nach vier Tagen im Dunkeln.

Ein konstanter Anstieg direkt nach Beginn der Dunkelinkubation wurde dagegen in den Gehalten der Aminosäuren Methionin, Valin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Leucin, Isoleucin und Serin beobachtet. In den ME Pflanzen stiegen sie dann am Tag vier sehr stark an und erreichten dort ihre Maximalwerte, während dieser Anstieg und die maximalen Akkumulationen bei Col-0 Pflanzen auf Tag sechs verschoben waren. Auch bei β -Hydroxybutyrat und β -Alanin konnte dieses Profil der Konzentrationsveränderung beobachtet werden.

GABA und Glycin (ebenso wie Harnstoff und Ribose) verweilten in den ersten Tagen ohne Licht auf niedrigen Konzentrationen und steigerten sich dann in den ME

Pflanzen am Tag vier sehr stark. Im Wildtyp trat dies auch auf, aber auch hier fand der starke Anstieg erst am Tag sechs statt.

3.8.3 Rettung des Phänotyps durch exogene Zugabe von schnell verwertbaren Substraten

Die in 3.8.2 beschriebene dunkel-induzierte Seneszenz konnte beschleunigt werden, indem drei Wochen alte, auf MS-Agar-Platten gewachsene, Pflanzen auf Whatman-Papier überführt wurden, das mit Wasser getränkt war, und im Dunkeln inkubiert wurden. Bei diesem Aufbau stellten sich die Symptome der Seneszenz bei den ME Pflanzen bereits nach zwei und bei den Col-0 Pflanzen nach vier Tagen ein. Dieses System wurde genutzt, um zu testen, inwieweit die dunkel-induzierte Seneszenz durch die externe Zugabe von Nährstoffen verzögert werden konnte.

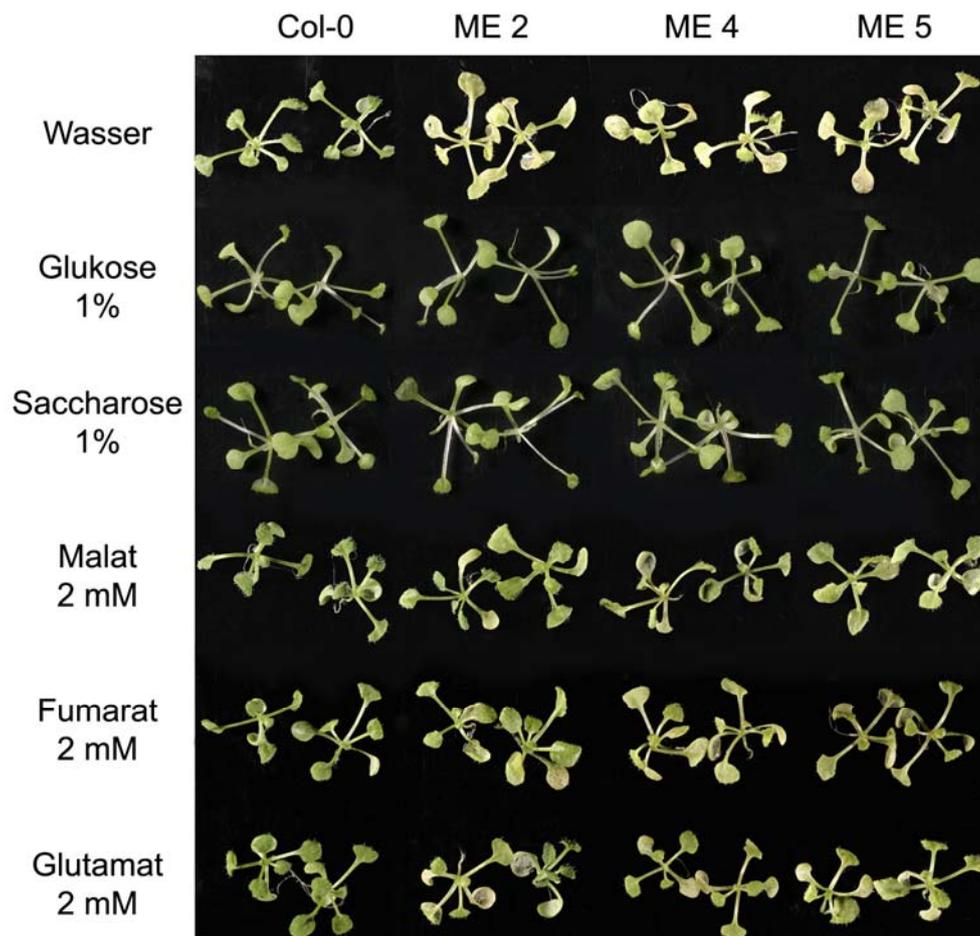


Abbildung 70: Col-0 und ME Pflanzen, die nach drei Wochen Wachstum auf MS-Agar auf Whatman-Papier, getränkt mit verschiedenen Lösungen, transferiert und dann drei Tage im Dunkeln inkubiert wurden.

Zu diesem Zweck wurde das Wasser, mit dem das Whatman-Papier getränkt wurde, durch verschiedene Nährstofflösungen definierter Konzentrationen ersetzt und die

Pflanzen im Dunkeln inkubiert. Wie in Abbildung 70 zu sehen ist, verhinderte die externe Zugabe von Glukose, Saccharose und L-Malat die vorzeitige dunkelinduzierte Seneszenz bei den ME Pflanzen nach drei Tagen im Dunkeln, während sie durch Fumarat und Glutamatwenigstens deutlich abgeschwächt wurde. Keine Komplementation oder Abschwächung des Phänotyps konnte durch die externe Gabe von L-Leucin oder L-Valin erreicht werden (nicht gezeigt).

Besonders interessant erschien in diesem Zusammenhang, die metabolischen Änderungen zu erfassen, die mit der verhinderten Seneszenz der ME Pflanzen durch Zugabe von Glukose vermutlich einhergingen. Also wurden von den Pflanzen, die während der Dunkelinkubation mit Glukose und Wasser versorgt worden waren, Proben für die Messung in der GC/MS genommen.

Aussagekräftige Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 71 eingeflossen.

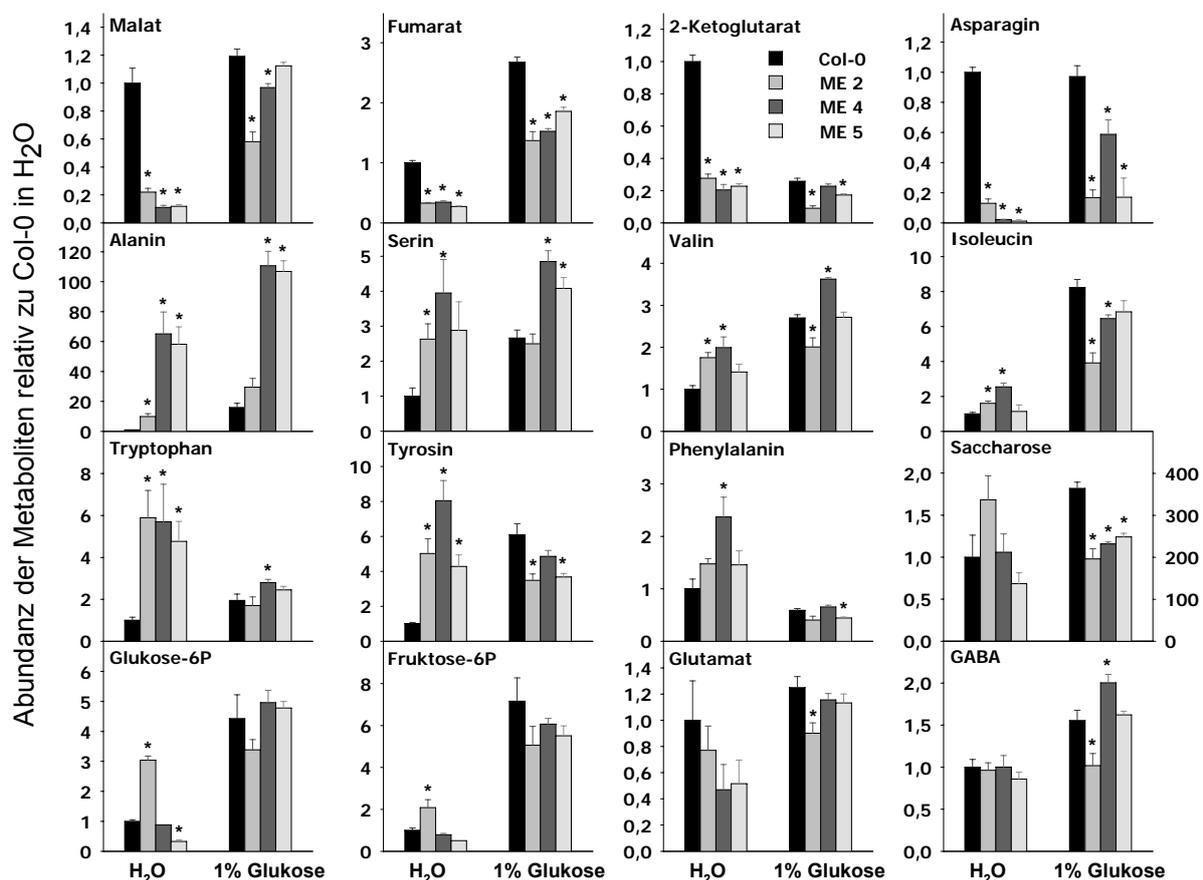


Abbildung 71: GC/MS Ergebnisse der Proben von Col-0 und ME Pflanzen, die, versorgt mit Wasser oder 1% Glukose, drei Tage im Dunkeln inkubiert waren (Fahnenstich et al. 2007). Die Werte sind Mittelwerte aus $n \geq 8$ Einzelmessungen \pm Standardfehler. Ein * markiert ME-Werte, die signifikant ($p < 0,05$) von denen des Wildtyps unterschiedlich sind.

Bei den nur mit Wasser versorgten Pflanzen konnten signifikant niedrigere Gehalte von Malat, Fumarat, 2-Ketoglutarat und Asparagin verglichen mit dem Wildtyp Col-0 beobachtet werden. Alanin, Valin, Serin, Isoleucin, Tryptophan und Tyrosin

akkumulierten signifikant stärker in den Blättern der ME als in denen der Col-0 Pflanzen, und auch Phenylalanin zeigte diese Tendenz, wohingegen die Gehalte von Saccharose, Glukose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat und auch von Glukose und Fruktose (hier nicht gezeigt) sich in allen Linien auf ähnlichem Niveau befanden. Auch bei anderen gemessenen Metaboliten wie GABA und Glutamat konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Linien festgestellt werden.

Wenn die Pflanzen supplementiert mit Glukose drei Tage im Dunkeln verbrachten (Abb. 71), erhöhten sich beim Wildtyp die Gehalte von Malat und Fumarat 1,2- bzw. 2,7-fach gegenüber den Pflanzen ohne Glukose. In den ME Pflanzen mit Glukose dagegen zeigten diese Substanzen einen fünf- bzw. sechsfach höheren Gehalt als mit Wasser. Es erscheint wichtig zu bemerken, dass diese Gehalte von Malat und Fumarat in den ME Pflanzen mit Glukose vergleichbar oder sogar höher als die des Wildtyps mit Wasser sind, der nach den drei Tagen im Dunkeln noch keinerlei Seneszenzsymptome erkennen ließ.

Im Vergleich der Messergebnisse beider Konditionen wird weiterhin deutlich, dass der Wildtyp mit Glukose einen deutlich niedrigeren Gehalt von 2-Ketoglutarat als mit Wasser hat, wohingegen die ME Pflanzen keine Veränderung zeigen. Die Asparagingehalte andererseits sind im Wildtyp in beiden Konditionen gleich, aber in den ME Pflanzen mit Glukose höher.

Ein weiterer wichtiger Punkt in dieser Vergleichsstudie ist, dass Valin, Tryptophan und Phenylalanin in dem Ansatz mit Glukose bei allen Linien vergleichbare Werte annahmen und die Konzentrationen von Leucin und Tyrosin in ME Pflanzen sogar niedriger als die des Wildtyps waren. Alanin und Serin dagegen wurden unter diesen Bedingungen zu hohen Konzentrationen zumindest in zwei ME Linien angehäuft und dabei vermutlich aus Pyruvat synthetisiert, dem Produkt der ME-Reaktion. Wie erwartet werden konnte, wurden Saccharose und die freien und phosphorylierten Formen der Zucker in den mit Glukose versorgten Pflanzen in sehr hohen Konzentrationen gegenüber denen in Pflanzen ohne Glukose gefunden, wobei in den ME Pflanzen für die freien Zucker niedrigere Werte als bei den Col-0 Pflanzen ermittelt wurden (Abb. 71).

3.9 Die Salzresistenz der TSS-TSR Pflanzen

Die TSS-TSR Pflanzen wurden im Rahmen der Etablierung des GTT-Weges (s. 1.2.6) erstellt, um sie später mit dem GO-Konstrukt zu transformieren. In den TSS-TSR Pflanzen sollten die TSS und damit auch die TSR zwar mit ihrer Aktivität in Chloroplasten der transgenen *A. thaliana* Pflanzen lokalisiert (vgl. Abb. 8) aber nicht mit Substrat versorgt sein. Das von der TSS benötigte Substrat Glyoxylat sollte ausschließlich in den Peroxisomen von der Glykolat-Oxidase hergestellt und auch dort direkt weiter metabolisiert werden, so dass im Chloroplasten kein Glyoxylat anfallen sollte (Tolbert 1997).

3.9.1 Der Phänotyp der TSS-TSR Pflanzen

TSS-TSR Pflanzen wurden ebenso wie die GO-TSS Pflanzen erstellt, um den ersten vorgeschlagenen Ansatz zur Verminderung der Photorespiration (GTT-Weg, 1.2.6) zu verfolgen. Dazu wurden TSR 5 Pflanzen mit TSS 2 (\rightarrow TSS-TSR 16) und mit TSS 13 (\rightarrow TSS-TSR 18) Pflanzen gekreuzt (2.6.2). Die resultierenden homozygoten Pflanzen wurden im Rahmen der Durchsicht auf möglicherweise interessante Phänotypen im Gewächshaus angezogen.



Abbildung 72: Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) in einem Alter von 30 Tagen im Vergleich.

Dabei fiel zunächst nur auf, dass die TSS-TSR Pflanzen ein wenig kleiner als der Wildtyp wuchsen, dafür aber einen kompakteren Habitus mit kürzeren Petiolen ausbildeten (Abb. 72). Zudem waren sie immer von etwas dunklerer Blattfarbe und im Vergleich zu den Col-0, TSS und TSR Pflanzen sehr leicht stressinduziert, was aus der Akkumulation von Anthocyanen geschlossen wurde. Dieses Verhalten trat bereits bei geringen Änderungen der äußeren Gegebenheiten, v. a. der Lichtverhältnisse auf, so dass es im Gewächshaus recht häufig der Fall war.

Um diese Eigenschaft unter reproduzierbaren Bedingungen zu beobachten, wurden Pflanzen zuerst in einer Klimakammer angezogen und dann in 600 μ E Hochlicht transferiert.



Abbildung 73: Col-0, TSR, TSS und TSS-TSR Pflanzen, die ab einem Alter von 4 Wochen für 14 Tage unter Hochlichtbedingungen (600 μ E, Langtag) wuchsen.

Bei diesem Experiment bestätigte sich der Eindruck aus dem Gewächshaus, nach dem die TSS-TSR Pflanzen schneller größere Mengen an Anthocyanen akkumulieren. So verdeutlicht die Abbildung 73, dass die TSS-TSR Pflanzen eher eine lila Blattfarbe im Gegensatz zu den grünlichen Rottönen der Col-0, TSS und TSR Pflanzen entwickelten.

3.9.2 Die Salztoleranz der TSS-TSR Pflanzen

Im Rahmen der normalen Charakterisierung wurden auch wässrige Extrakte von TSS-TSR Pflanzen präpariert und bis zur Analyse auf -20°C gelagert. Dabei fiel auf, dass die Extrakte der TSS-TSR Pflanzen deutlich schneller auftauten bzw. später einfroren als die Extrakte anderer Pflanzen. Dies war ein Indiz dafür, dass die TSS-TSR Pflanzen eventuell Substanzen akkumulierten, die Kälte- oder Salzstressresistenz vermittelten.

Die TSS-TSR und die zugehörigen Kontrollpflanzen (Abb. 74) wurden daraufhin in einem Alter von 33 Tagen im Gewächshaus mit einer 150 mM, bzw. einer 300 mM

NaCl-Lösung gegossen, nachdem das Substrat zuvor nahezu ausgetrocknet war. Sieben Tage nach dem Beginn der Wässerung mit 150 mM NaCl war bei allen

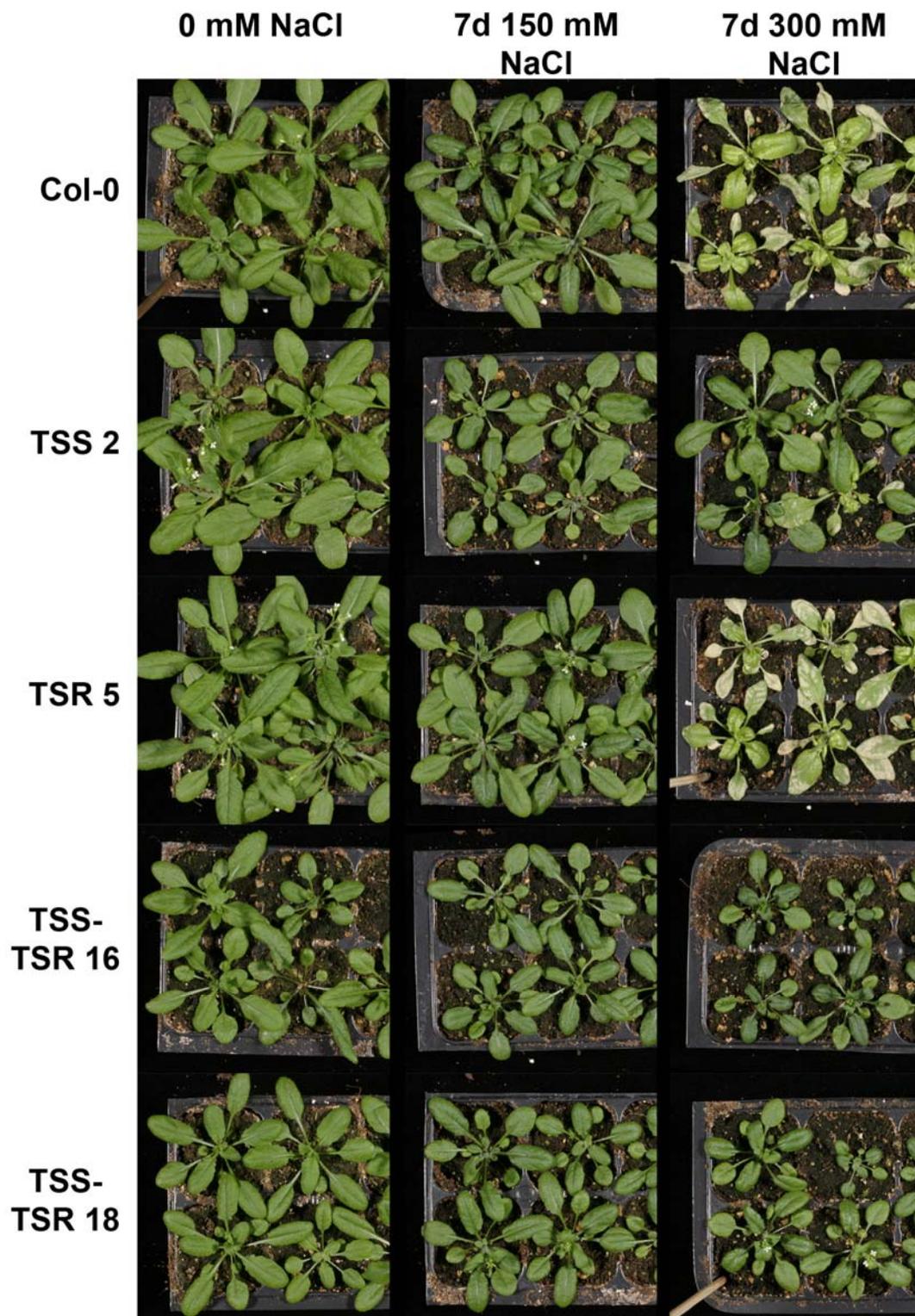


Abbildung 74: 40 Tage alte, im Langtag (Gewächshaus) gewachsene, Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Pflanzen, die ab sieben Tagen vor diesen Aufnahmen mit Salzlösungen verschiedener Konzentration gegossen wurden, im Vergleich.

untersuchten Linien die für Salzstress typische Arretierung des Wachstums zu sehen (Munns 2002; Xiong und Zhu 2002), aber darüber hinausgehend war kein Unterschied zwischen den Linien festzustellen. Im Gegensatz dazu waren an den Col-0 und TSR Pflanzen nach sieben Tagen mit 300 mM NaCl deutliche Schädigungen aufgetreten, und auch die Pflanzen der Linie TSS 2 zeigten beginnende Läsionen unter diesen Stresskonditionen. Die TSS-TSR Pflanzen dagegen schienen außer einem langsameren Wuchs (s. o.) keine nachteiligen Effekte des Salzstresses auszuprägen.

Nach dem Salzresistenztest mit adulten Pflanzen sollte auch noch die Keimungsfähigkeit der TSS-TSR Pflanzen bei hohen Salzkonzentrationen im Substrat ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Samen auf MS-Agar-Platten, die mit 100 bzw. 150 mM NaCl supplementiert waren, ausgesät und deren Keimungseffizienz während der ersten Tage nach der Aussaat bestimmt.



Abbildung 75: Drei Tage alte Col-0 und TSS-TSR Pflanzen bei der Keimung auf MS-Agar zu dem 100 mM NaCl hinzugefügt wurden.

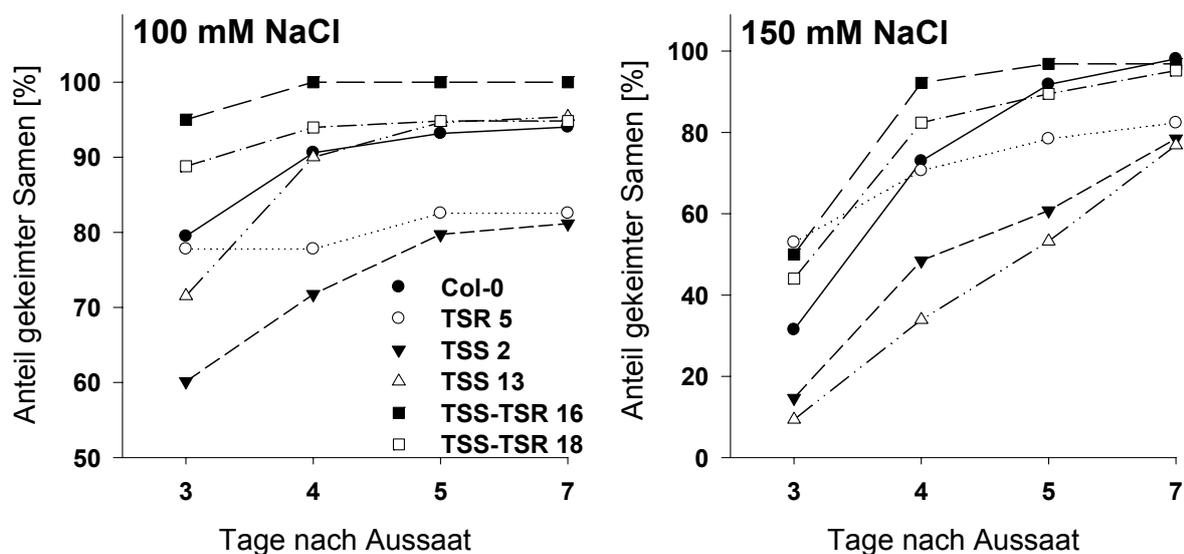


Abbildung 76: Anteil der gekeimten Col-0, TSR, TSS und TSS-TSR Samen an der ausgesäten Gesamtmenge drei bis sieben Tage nach der Aussaat auf MS-Agar-Platten mit 100 oder 150 mM NaCl.

Die Ergebnisse dieses Experiments bestätigten eine höhere Salztoleranz der TSS-TSR Pflanzen. So waren drei Tage nach der Aussaat sowohl bei 100 mM als auch bei 150 mM NaCl mehr TSS-TSR Samen als Col-0 Samen gekeimt (Abb. 75 & 76). Die Samen des Wildtyps keimten etwas später, aber auch dieser erreichte ab Tag fünf in beiden Konditionen die Keimungseffizienz der TSS-TSR Pflanzen, und auch der Anteil der nicht gekeimten Samen (Tab. 11) war bei beiden NaCl-Konzentrationen zwischen Wildtyp und TSS-TSR Pflanzen vergleichbar. Im Gegensatz dazu waren die TSS und TSR Samen scheinbar empfindlicher für die hohen Salzkonzentrationen, da sie langsamer keimten (Abb. 76, Ausnahme: TSS 13 bei 100 mM NaCl) und am Ende des Beobachtungszeitraums, sieben Tage nach der Aussaat, die höchsten Anteile an nicht gekeimten Samen vorzuweisen hatten (Tab. 11).

Tabelle 11: Anteil (in %) der nicht gekeimten Col-0, TSR, TSS und TSS-TSR Samen an der Gesamtmenge nach der Aussaat auf MS-Agar-Platten mit 100 oder 150 mM NaCl.

| | Col-0 | TSR 5 | TSS 2 | TSS 13 | TSS-TSR 16 | TSS-TSR 18 |
|-------------|-------|-------|-------|--------|---------------|---------------|
| 100 mM NaCl | 5,98 | 17,46 | 18,84 | 4,62 | 0 | 5,17 |
| 150 mM NaCl | 1,84 | 17,65 | 21,54 | 26,32 | 3,12 | 4 |

3.9.3 Die Kältetoleranz der TSS-TSR Pflanzen

Da die Motivation für diese Studien aus der Beobachtung des unterschiedlichen Einfrierens der wässrigen Extrakte der TSS-TSR Pflanzen herrührte, sollte auch noch die Reaktion der TSS-TSR Pflanzen auf Kältestress untersucht werden.



Abbildung 77: Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Pflanzen, die seit 18 Tagen, ab einem Alter von 24 Tagen, in der Kühlkammer inkubiert wurden im Vergleich. Vor dem Transfer waren die Pflanzen für vier Wochen im Gewächshaus angezogen worden.

Dazu wurden vier Wochen alte Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Pflanzen aus dem Gewächshaus in eine Kühlkammer mit aufgehängter Lichtbank transferiert und bei 4°C und 50 μ E inkubiert. Nach 18 Tagen ergab sich dann das Bild in Abbildung 77: Die Pflanzen der Linien Col-0, TSS 2 und TSR 5 zeigten Läsionen an einigen Blättern und hatten allesamt bereits begonnen zu blühen, was allgemein als Stressantwort gilt. Dagegen waren noch alle Blätter der TSS-TSR Pflanzen grün, und die Blüte hatte noch nicht eingesetzt.

4. Diskussion

Als Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit wurden unter Punkt 1.4 die Etablierung der Stoffwechselwege GMM und GTT in *A. thaliana*-Pflanzen, die kurze Charakterisierung von intermediär entstandenen transgenen Linien, sowie schließlich die Generierung von Pflanzenlinien mit gegenüber dem Wildtyp reduzierten photorespiratorischen Verlusten formuliert.

Die GMM und GTT-Stoffwechselwege wurden funktional in die Zielpflanzen integriert und diese dann charakterisiert (3.5 & 3.6). Auf dem experimentellen Weg dorthin wurden viele Pflanzenlinien mit teilweise sehr interessanten Phänotypen und großem Nutzen auch für das Gesamtprojekt erstellt. So legte die erfolgreiche Charakterisierung des Lichtmengen-abhängigen Phänotyps der ME Pflanzen (3.8; Fahnenstich et al. 2007) zusammen mit neueren Erkenntnissen (Gerrard-Wheeler et al. 2005) nahe, dass das NADP-Malat-Enzym aus dem GMM-Ansatz entfernt werden kann. Zusätzlich deutete die detaillierte Untersuchung des GO-Phänotyps in GO, GO-MS und GO-TSS Pflanzen (3.3 & 3.4) schon früh auf die Notwendigkeit einer zusätzlichen Katalase hin. Zusammengenommen führten diese Studien und nachfolgende Überlegungen zu dem GMK-Ansatz, der schließlich Pflanzen hervorbrachte, die größer als der Wildtyp wuchsen und scheinbar weniger stark von photorespiratorischen Verlusten betroffen waren (3.7).

Als Nebenprodukt wurden darüber hinaus auch noch die TSS-TSR Pflanzen generiert, die eine höhere Salztoleranz als der Wildtyp zeigten (3.9) und wie andere Teilbereiche dieser Arbeit noch viele Ansatzmöglichkeiten für weitere Untersuchungen bieten.

Für alle in Abschnitt 3 beschriebenen Pflanzenlinien konnten die jeweiligen Transgeninsertionen auf genomischer Ebene (3.1) und die Aktivitäten der transgen eingeführten Enzyme bestätigt werden (3.2). Für die GO, MS und ME konnte zudem über Aktivitätsmessungen in Plastidenisolationen (3.2.1 & 3.2.2) bzw. Immunolokalisation (Abb. 52) die korrekte subzelluläre Lokalisation nachgewiesen werden.

In der folgenden Diskussion sollen nun die in Abschnitt 3 dargestellten Ergebnisse an sich und vor dem theoretischen Hintergrund diskutiert werden. Außerdem soll versucht werden, diese Ergebnisse im Hinblick auf ihre Bedeutung für das

Gesamtprojekt einzuordnen und Strategien für zukünftige Untersuchungen zu entwickeln.

4.1 Der GO-Phänotyp – Bedrohung des Gesamtprojekts

Die Glykolat-Oxidase (GO) aus *A. thaliana* wurde gewählt, da die aus drei Untereinheiten bestehende Glykolat-Dehydrogenase aus *E. coli* drei Transformationen nötig gemacht hätte und zu Beginn des Projekts noch keine der später entdeckten Einzelgen-Glykolat-Dehydrogenasen bekannt war (Bari et al. 2004; Eisenhut et al. 2006). Neben diesen praktischen Überlegungen wurde auch davon ausgegangen, dass die H₂O₂-Entgiftungskapazität der Chloroplasten (4.1.3) ausreichen würde, um auch das zusätzliche H₂O₂ aus der GO-Reaktion zu verarbeiten. Da die GO ferner das Startenzym für beide vorgeschlagenen Stoffwechselwege zur Reduktion photorespiratorischer Verluste war, war es wichtig für die erfolgreiche Etablierung dieser Stoffwechselwege, die Auswirkungen der GO-Expression auf *A. thaliana* Pflanzen zu charakterisieren und zu verstehen. Sollten an diesem Punkt nämlich bereits Probleme auftauchen, wären damit beide Ansätze gefährdet.

4.1.1 Der Phänotyp

In der Tat war die Expression der GO mit einem starken Phänotyp verbunden. Im Vergleich mit dem Wildtyp wuchsen die GO Pflanzen langsamer (Abb. 11), blühten später (Tab. 4) und zeigten eine gelbliche Blattfarbe (Abb. 10 & 17), die auf oxidative Schäden schließen ließ (Vandenabeele et al. 2004), wie sie schon häufiger bei Pflanzen mit Problemen im photorespiratorischen Stoffwechselweg beobachtet wurden (Igarashi et al. 2003; Voll et al. 2006; Queval et al. 2007). Die Stärke des beobachteten Phänotyps (Abb. 10) ließ sich mit der gemessenen GO-Aktivität (Abb. 5) korrelieren, da die Linien GO 14 und 19 mit den höchsten Aktivitäten die kleinsten Pflanzen ausbildeten und umgekehrt die Pflanzen der Linien GO 5 und 16 mit moderaten Aktivitäten die größten der GO Pflanzen waren. Durch das Verschwinden des GO-Phänotyps bei Anzucht unter erhöhter CO₂-Konzentration (4000 ppm, Abb. 11), die dazu führt, dass Photorespiration kaum stattfindet (1.2.1) und somit die GO kein Substrat erhält, konnte eine eindeutige Verbindung zwischen der GO-Aktivität und dem Auftreten des Phänotyps hergestellt werden (3.3.1).

Die weitere Charakterisierung der GO Pflanzen ergab, dass sie, verglichen mit dem Wildtyp, wesentlich niedrigere maximale photosynthetische Elektronentransportraten (Abb. 13), geringere Stärkeakkumulationen (Abb. 29 & 45), aber höhere Glyoxylat- und H_2O_2 -Gehalte (Abb. 12) aufwiesen. Ferner konnte unter Starklichtbedingungen, unter denen der absolute Fluss durch die Photorespiration stark erhöht ist (Veljovic-Jovanovic et al. 2001), eine weitere Ausbleichung der GO Pflanzen, eine deutlich verzögerte Produktion von Anthocyanen (Abb. 19 & 22) und eine stark erhöhte Photoinhibition des Photosystems II (Abb. 27) beobachtet werden.

Da eine klare Verbindung zwischen der GO-Aktivität und dem Auftreten des GO-Phänotyps etabliert werden konnte, provoziert dies die Frage, welches der beiden Produkte der GO-Reaktion, H_2O_2 oder Glyoxylat, für das Entstehen des Phänotyps verantwortlich ist. Eine Rolle des durch die GO-Aktivität im Chloroplasten erniedrigten Glykolat-Gehaltes kann in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, da unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen ohne Glykolat-Produktion kein GO-ähnlicher Phänotyp beim Wildtyp beobachtet wurde. Zudem kann die GO auch nur einen Teil des produzierten Glykolats verwenden, da sie mit dem putativen Glykolat/Glyzerat-Transporter der inneren Plastidenmembran in Konkurrenz steht (Howitz und McCarty 1985, A. Bräutigam und A.P.M. Weber pers. Kommunikation) und auf diese Weise, wie auch an den Glycin-Gehalten unter Starklicht zu sehen ist (Tab. 7), immer noch ein signifikanter Anteil des Glykolats in den normalen photorespiratorischen Stoffwechselweg eintritt.

4.1.2 Die Rolle des Glyoxylats

Obwohl bisher noch keine Glyoxylat produzierende Enzymaktivität in den Chloroplasten höherer Pflanzen eindeutig nachgewiesen werden konnte, kann dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Glyoxylat in den Chloroplasten vorkommt. So wurde an isolierten Thylakoiden eine ETR-abhängige Glyoxylat-Produktion nachgewiesen (Goyal und Tolbert 1996) und auch über plastidäre Glyoxylat-Reduktase-Aktivitäten wurde mehrfach berichtet (Mulligan et al. 1983; Givan und Kleczkowski 1992), wobei aber bisher keine Gene für diese Aktivitäten identifiziert werden konnten.

Trotz dieser Unsicherheiten wurden zur Aufklärung der Wirkung von Glyoxylat auf Chloroplasten schon viele Studien durchgeführt, vor allem zur Erforschung der Letalität von photorespiratorischen Mutanten. Es wurde dabei mehrfach festgestellt,

dass Glyoxylat die RubisCO-Aktivierung *in vitro* und *in vivo* inhibiert (Oliver und Zelitch 1977; Mulligan et al. 1983; Chastain und Ogren 1985; Cook et al. 1985; Chastain und Ogren 1989; Campbell und Ogren 1990; Häusler et al. 1996). Der Mechanismus dieser Inhibition ist noch nicht vollständig verstanden, wobei ein Effekt auf die RubisCO-Aktivase ausgeschlossen werden konnte (Chastain und Ogren 1989).

Sollte im Chloroplasten tatsächlich Glyoxylat produziert werden (wie in den GO-exprimierenden Pflanzen, s. Abb. 12, 23, 24 & 51), kann es auf Grund des fehlenden Glyoxylat-Zyklus und nicht vorhandener Transaminasen nur auf drei Wegen weiterreagieren (Igamberdiev 1989). Die Glykolat-Oxidase der GO Pflanzen könnte Glyoxylat weiter zu Oxalat oxidieren (Igamberdiev et al. 2001), welches in der GC-MS-Analyse aber nicht beobachtet wurde (nicht gezeigt). Ferner könnte Glyoxylat angesichts der erhöhten Produktion von H_2O_2 in GO Pflanzen nicht-enzymatisch durch H_2O_2 zu Formiat und CO_2 oxidiert werden (Grodzinski 1979). Formiat inhibiert reversibel das Photosystem II (Feyziev et al. 2000) und kann vermutlich durch eine Formiat-Dehydrogenase (Olson et al. 2000) oder über die Kondensation mit Glycin zu Serin entgiftet werden (Shingles et al. 1984). Als letzte Möglichkeit kann Glyoxylat von der oben erwähnten Glyoxylat-Reduktase zu Glykolat umgesetzt werden, was zusammen mit der GO einen verschwenderischen Zyklus konstituieren würde, in dem H_2O_2 produziert und Reduktionskraft verbraucht würde.

Alternativ zu Reaktionen im Chloroplasten kann Glyoxylat scheinbar auch in das Cytosol transportiert werden (Howitz und McCarty 1985) und dort weiterreagieren oder eventuell in den Mitochondrien von der Glykolat-Dehydrogenase zu Glykolat reduziert werden (Bari et al. 2004; Niessen et al. 2007).

4.1.3 Die Rolle des H_2O_2

H_2O_2 entsteht in den Chloroplasten normalerweise während der Mehler-Peroxidase-Reaktion, die Teil des so genannten Wasser-Wasser-Zyklus ist (Asada 1999 und 2000). Ursprung dieser Reaktionsfolge ist, dass die Elektronenakzeptoren der photosynthetischen Elektronentransportkette reduziert sind und keine angeregten Elektronen von den Photosystemen abnehmen, die in der Folge auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Foyer und Noctor 2000; Murata et al. 2007). Dies kann z. B. unter Starklicht (Vanderauwera et al. 2005) oder bei geschlossenen Stomata und somit geringer Verfügbarkeit von CO_2 , die mit reduzierter Calvin-Zyklus-

Aktivität einhergeht, vorkommen (Hoffmann et al. 2005). Das dabei entstandene Superoxidanionenradikal $\cdot\text{O}_2^-$ sollte schnell über die Superoxid-Dismutase (SOD, Heldt 2003) mit Protonen zu H_2O_2 und O_2 umgesetzt werden, da es sonst Metalle z. B. aus prosthetischen Gruppen von Enzymen reduzieren kann, die dann ihrerseits das H_2O_2 zu OH^- und dem Hydroxylradikal $\cdot\text{OH}^-$ umwandeln. Das Hydroxylradikal, für das kein entgiftendes Enzym existiert, kann massive oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren hervorrufen (Berlett und Stadtman 1997; Noctor et al. 2000; Kimura et al. 2001) und damit die Struktur des Chloroplasten bedrohen.

Zusammengefasst werden diese Radikale und H_2O_2 zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, Apel und Hirt 2004). Favorisierte Ziele für die oxidative Wirkung von ROS im Chloroplasten sind die Proteine in den Reaktionszentren der Photosysteme, was zu Photoinhibition führt, wobei neuere Studien darauf hindeuten, dass sie eher die Reparatur dieser Proteine behindern (Nishiyama et al. 2006; Murata et al. 2007) statt sie direkt zu schädigen, wie früher angenommen (Krause 1991; Asada 2000). H_2O_2 kann zudem durch Thioredoxin aktivierte Enzyme z. B. des Calvin-Zyklus wieder deaktivieren, indem es die Disulfidbrücken oxidiert (Kaiser 1976; Kaiser 1979).

Es ist also für die Pflanzen besonders wichtig, diese ROS zu beseitigen. In den Chloroplasten kann $\cdot\text{O}_2^-$ von Carotinoiden oder Tocopherolen eingefangen werden (Mittler 2002) oder von der erwähnten SOD zu H_2O_2 umgesetzt werden. Das H_2O_2 wiederum wird durch eine Ascorbat-spezifische Peroxidase (APX; Nakano und Asada, 1981) zu zwei H_2O umgesetzt. Das dabei oxidierte Ascorbat wird entweder über Ferredoxin mit Elektronen aus dem PS I oder über Glutathion wieder reduziert (Heldt, 2003, Mullineaux und Rausch 2005). Außerdem gibt es im Chloroplasten Peroxiredoxine, die ebenfalls in der Lage sind, H_2O_2 und andere Peroxide zu entfernen (Dietz 2003). Da Membranen allerdings kein Hindernis für H_2O_2 darstellen (Willekens et al. 1997), findet der Abbau von H_2O_2 auch durch die Katalase in den Peroxisomen, die APX in Mitochondrien (Jimenez et al. 1997) und die APX im Cytosol, die kürzlich als zentrale Komponente der ROS-Abwehr identifiziert wurde (Davletova et al. 2005), statt.

Neben den Gefahren, die vom H_2O_2 ausgehen, hat dieses Molekül aber auch seine Aufgabe in der Pflanze, indem es als Signalüberträger (Desikan et al. 1998; Mittler und Berkowitz 2001; Laloi et al. 2004; Bright et al. 2006; Halliwell 2006; Laloi et al.

2007) und bei der Steuerung von Genexpression (Desikan et al. 2000; Desikan et al. 2001; Queval et al. 2007) eine wichtige Rolle spielt. Durch seine Interaktion mit Redoxpaaren (z. B. Glutathion/oxidiertes Glutathion), die durch die Reaktionen von Peroxidasen vermittelt werden, steht es zudem mit dem Redox-System der Zelle in Wechselwirkung, das (v. a. über Thioredoxin, s. o.) die fundamentalen energetischen Prozesse wie Photosynthese, Calvin-Zyklus-Enzyme, mitochondriellen Enzyme und die Atmungskette und auch Genexpression als Antwort auf verschiedenste Reize steuert (Karpinski et al. 1997; Aluru und Rodermeil 2004; Noctor et al. 2004; Baier und Dietz 2005; Buchanan und Balmer 2005; Fey et al. 2005; Geigenberger et al. 2005; Mullineaux und Rausch 2005; Dietz et al. 2006; Noctor 2006; Heiber et al. 2007).

Unter normalen Bedingungen wird angenommen, dass etwa 70% des in der photosynthetisierenden Zelle einer C₃-Pflanze produzierten H₂O₂ in den Peroxisomen im Zuge der Photorespiration anfällt (Noctor et al. 2002). In den GO Pflanzen wird durch die Aktivität der GO nun ein Teil dieser 70% in den Chloroplasten verlagert, was zu einer leicht erhöhten Akkumulation von H₂O₂ führte (Abb. 12 & 25), die jedoch nicht in allen Fällen beobachtet werden konnte (Abb. 51). Dies kann damit zusammenhängen, dass die Messung durch die niedrige Konzentration und hohe Reaktivität des H₂O₂ recht fehleranfällig war. Andererseits stellt sich angesichts der Membranpermeabilität (Willekens et al. 1997), der vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten und der Signalwirkung von H₂O₂ auch die Frage, ob überhaupt die gemessenen absoluten Gehalte oder nicht eher die Rate der Produktion von H₂O₂ für die Auswirkungen entscheidend sind. Diese konnte allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell nicht bestimmt werden.

4.1.4 Ist H₂O₂ oder Glyoxylat verantwortlich für den GO-Phänotyp?

In Anbetracht dieser Ausführungen könnte im Chloroplasten der GO Pflanzen akkumulierendes Glyoxylat also durchaus seinen Anteil an der Ausprägung des GO-Phänotyps haben, indem es die RubisCO-Aktivierung oder über Formiat das Photosystem II inhibiert (4.1.2). Diese Effekte sind möglicherweise eine Ursache für den geringeren Wuchs und die niedrigeren Elektronentransportraten der GO Pflanzen verglichen mit dem Wildtyp. Der postulierte verschwenderische Zyklus über die GO und die Glyoxylat-Reduktase (4.1.2) würde dagegen Reduktionskraft verbrauchen, was als eine zentrale Aufgabe der Photorespiration gesehen wird

(Noctor et al. 2002) und daher, abgesehen von der Produktion von H_2O_2 , nicht mit negativen Effekten einhergehen sollte.

Wenn zusätzlich die mehrfach transgenen Pflanzen in diese Überlegungen einbezogen werden, erscheint eine dominierende Rolle des Glyoxylats aber eher unwahrscheinlich. So zeigten die GO-MS und die GO-TSS Pflanzen trotz Wildtyp-ähnlicher Gehalte von Glyoxylat unter normalen Konditionen (Abb. 23 & 24) einen deutlichen GO-Phänotyp (Abb. 14, 15 & 21). Allerdings wuchsen die GO-MS Pflanzen (Abb. 18 & 43) tendenziell und die GMM und GTT Pflanzen deutlich besser als die GO Pflanzen (Abb. 30, 31, 34, 35, 36), aber nur einige der GMM-Linien wuchsen im Gewächshaus genauso gut oder besser als der Wildtyp (Abb. 34, 35 & 36). Daraus kann geschlossen werden, dass das Glyoxylat, welches in diesen Pflanzen nicht mehr akkumuliert, teilweise für den GO-Phänotyp verantwortlich ist.

Alle Ergebnisse betrachtend, muss aber die weitaus größere Verantwortung für den GO-Phänotyp bei H_2O_2 liegen. Dafür sprechen eben besonders die GO-MS und GO-TSS Pflanzen, die einen deutlichen GO-Phänotyp zeigten und im Falle der GO-MS Pflanzen auch höhere H_2O_2 -Gehalte vorzuweisen hatten (Abb. 25). Zusätzlich ist eine große Ähnlichkeit zwischen dem GO-Phänotyp und den Phänotypen von Pflanzen, deren Kapazität zur Entgiftung von ROS experimentell herabgesetzt wurde (Veljovic-Jovanovic et al. 2001; Rizhsky et al. 2002; Pnueli et al. 2003; Rizhsky et al. 2003), festzustellen. Diese Pflanzen zeigten in unterschiedlicher Stärke retardiertes Wachstum (vgl. Abb. 11), eine verzögerte Entwicklung (vgl. Tab. 4 & 5), geringere photosynthetische Leistungsfähigkeit (vgl. Abb. 13, 28, 32 & 38) und meist gelblichere Blätter als der jeweilige Wildtyp (vgl. Abb. 10, 15 & 18). Weiterhin kann die niedrige Akkumulation von Photosynthaten (Tab. 7) und Stärke (Abb. 29, 40, 45 & 50) in GO-exprimierenden Pflanzen durch eine fortwährende Inaktivierung der normalerweise im Licht aktivierten Enzyme u. a. des Calvin-Zyklus (Schürmann und Jacquot 2000; Buchanan et al. 2002; Buchanan und Balmer 2005) und der AGPase der Stärkesynthese (Hendriks et al. 2003; Geigenberger et al. 2005) durch H_2O_2 erklärt werden (4.1.3). Die relativ zum Wildtyp höheren Gehalte der Ascorbat-Vorstufe Galaktonat- γ -laktone in GO-exprimierenden Pflanzen sowohl unter Hoch- als auch Niedriglicht aber nicht unter erhöhter CO_2 -Konzentration (Tab. 7 & 8) legen ebenfalls eine erhöhte photorespirationsabhängige ROS-Wirkung auf den Metabolismus nahe (Wheeler et al. 1998; Smirnov 2000).

Eine Inkubation GO-exprimierender Pflanzen unter Starklicht ließ schließlich eindeutig ROS-spezifische Effekte sichtbar werden. Das Ausbleichen der Blätter von GO-exprimierenden Pflanzen und das Auftreten von oxidativen Schäden mit zunehmender Dauer der Hochlichtbehandlung (Abb. 19, 20 & 21) können der erhöhten Produktion von ROS zugeschrieben werden (Landry et al. 1995; Bouche et al. 2003), ebenso wie die Inhibition der Anthocyan-Akkumulation unter diesen Stressbedingungen (Abb. 22) ein durch H_2O_2 ausgelöster Effekt ist (Vanderauwera et al. 2005; Miller et al. 2007). Konsequenterweise konnten in den GO-exprimierenden Pflanzen auch ein höheres Maß an Photoinhibition des PS II (Abb. 27, 33 & 39) und niedrigere photosynthetische Elektronentransportraten bei hohen Lichtintensitäten (Abb. 13, 28, 32 & 38) als im Wildtyp festgestellt werden, da die gesteigerte Produktion von ROS im Hochlicht die Schädigung des PS II vorantreibt (3.1.4). Ebenfalls verringert ist die Fähigkeit der GO-exprimierenden Pflanzen, die gesteigerte Lichtmenge in Photosynthate wie Zucker und organische Säuren (Malat & Fumarat) umzusetzen, wodurch auf eine weiterhin inhibierte Calvin-Zyklus-Aktivität geschlossen werden kann (Tab. 7).

Zusammenfassend lassen sich diese Ergebnisse und Überlegungen so, dass das H_2O_2 zwar hauptverantwortlich für das Auftreten des GO-Phänotyps ist, aber eine wenn auch untergeordnete Rolle des Glyoxylats wahrscheinlich ist.

4.1.5 GO Pflanzen als Modell für oxidativen Stress?

Die Erforschung der Wirkung von ROS und der von ihnen ausgelösten Signalkaskaden konzentriert sich momentan hauptsächlich auf die Analyse von Pflanzen, die in Paraquat (überträgt Elektronen von PS I auf O_2), DCMU (blockiert den Elektronentransport) oder direkt in H_2O_2 inkubiert wurden oder deren Gehalt an antioxidativen Enzymen modifiziert wurde. Bei den Ansätzen mit Paraquat, DCMU und H_2O_2 ist das Problem, dass die Stärke des oxidativen Stresses kaum reguliert werden kann, die Blätter erst infiltriert werden müssen und dass sofort verschiedene ROS gebildet werden, so dass zwar der ROS-Stress im Allgemeinen beobachtet werden kann, aber im Detail kaum Aussagen zu der Rolle einer einzelnen reaktiven Sauerstoffspezies möglich sind. Der Nachteil der modifizierten Enzymaktivitäten ist dagegen, dass von vornherein mit einem artifiziellen System gearbeitet wird, in dem nicht eindeutig ist, inwieweit beobachtete Effekte der ROS-Akkumulation oder der verringerten ROS-Entgiftung geschuldet sind.

Da außerdem kein System bekannt ist, das es ermöglicht, nicht-invasiv H_2O_2 direkt im Chloroplasten zu produzieren, wobei die Menge des produzierten H_2O_2 pro Zeiteinheit einfach durch die Lichtstärke reguliert werden kann (vgl. Abb. 21), bieten sich die GO Pflanzen als Forschungsobjekt in diesem Zusammenhang an. Wie in 4.1.4 dargelegt, ist der Einfluss von Glyoxylat wahrscheinlich gering im Verhältnis zu dem des H_2O_2 , aber um den ROS-Stress der GO Pflanzen sicher von den Effekten des Glyoxylats trennen zu können, müssen GO-MS und GO-TSS Pflanzen als Kontrollen hinzugezogen werden.

Die Studien zu diesem Thema haben bereits begonnen und werden in Zusammenarbeit mit Dr. Telma Scarpeci von der Universidad Nacional de Rosario durchgeführt. Im Vordergrund steht dabei zuerst die Untersuchung von GO-exprimierenden Pflanzen unter verschiedenen Lichtintensitäten, wobei besonderes Augenmerk auf die Aktivitäten antioxidativer Enzyme (z. B. APX, SOD (Abb. 26)) und die Transkriptabundanz ROS-regulierter Gene gelegt werden wird (z. B. nach Desikan et al. 2000).

4.1.6 Bedeutung des GO-Phänotyps für das Gesamtprojekt dieser Arbeit

Die Erkenntnis, dass H_2O_2 und nicht Glyoxylat das Hauptproblem der GO Pflanzen ist, führte unausweichlich zu einer Änderung der gesamten Strategie zur Erstellung von Pflanzen, die weniger stark von photorespiratorischen Verlusten betroffen sein sollten. Es war nun klar, dass der GO-Phänotyp auf keinen Fall durch die Expression der im GTT bzw. GMM-Ansatz folgenden Enzyme verschwinden würde, und so wurde die Expression eines vierten, H_2O_2 -verarbeitenden Enzyms notwendig. Die Wahl fiel dabei auf die bakterielle Katalase (von Ossowski et al. 1991; Shikanai et al. 1998), deren Gen dann aus dem *E. coli*-Genom amplifiziert wurde

4.2 Die GTT- und GMM-Ansätze – Opfer der GO

Da die GTT und GMM Pflanzen das ursprüngliche Ziel der vorliegenden Arbeit darstellen (1.2.6) sollen die von ihnen erhaltenen Ergebnisse hier kurz diskutiert werden. Als diese Pflanzen erstellt wurden, lagen die in 4.1.4 diskutierten Ergebnisse noch nicht vollständig vor, so dass diese Pflanzen, wenn auch kurz, charakterisiert wurden.

4.2.1 Die GTT Pflanzen

Die GTT Pflanzen waren größer als die GO Pflanzen, aber kleiner als der Wildtyp (Abb. 30) und zeigten eine dem Wildtyp ähnliche Blattfarbe. Da bereits für die GO-TSS Pflanzen ein mit Col-0 vergleichbarer Glyoxylat-Gehalt gemessen wurde (Abb. 23), kann davon ausgegangen werden, dass dies auch für GTT Pflanzen gilt. Also müssen die Photoinhibition nach 6h Hochlicht und die verglichen mit dem Wildtyp niedrigeren photosynthetischen Elektronentransportraten (Abb. 33 & 32) einzig der Wirkung des H_2O_2 zugerechnet werden. Die Integration der Katalase wurde für den GTT-Ansatz allerdings nicht in Betracht gezogen, da die GTT wie auch die TSS-TSR Linien ohne Ausnahme kleiner wuchsen als der Wildtyp (Abb. 72 & 74) und somit dem gesamten Ansatz mit TSS und TSR wenig Erfolgchancen eingeräumt wurden. Die schlechtere Wachstumsleistung der TSS-TSR-exprimierenden Pflanzen könnte durch eventuell akkumulierendes Tartronat-Semialdehyd verursacht worden sein, über dessen Wirkung in Pflanzen allerdings nichts bekannt ist, obwohl es durchaus in Pflanzenextrakten vorzukommen scheint (Fiehn et al. 2000).

Das geringe Wachstum der GTT und auch der TSS-TSR Pflanzen verwundert ein wenig, wenn es mit einer kürzlich erschienenen Studie verglichen wird (vgl. 4.5.4), in der ein recht ähnlicher Ansatz zu scheinbar deutlich reduzierten photorespiratorischen Verlusten und größeren Pflanzen geführt hat (Kebeish et al. 2007).

4.2.2 Die GMM Pflanzen

Die GMM Pflanzen waren unter Langtagbedingungen deutlich größer als die GO Pflanzen und teilweise sogar größer als der Wildtyp (Abb. 34). Allerdings zeigten auch die GMM Pflanzen nach 6 h Hochlicht verstärkte Photoinhibition und verglichen mit dem Wildtyp verringerte photosynthetische Elektronentransportraten (Abb. 38 & 39). Nachdem für die GO-MS Pflanzen bereits Glyoxylat-Gehalte auf Wildtyp-Niveau bestimmt wurden (Abb. 24) und in GMM Pflanzen von ähnlichen Verhältnissen ausgegangen werden konnte, mussten diese Ergebnisse wiederum den schädigenden Wirkungen des H_2O_2 zugeordnet werden. Die guten Wachstumseigenschaften dieser Pflanzen unter Langtagbedingungen könnten ihre Ursache in der durch das zusätzliche ME verursachten plastidären Produktion von NADPH haben, welches Reduktionskraft für die teilweise Entgiftung von H_2O_2

bereitstellen würde. Diese guten Wachstumseigenschaften und die gegenüber GO Pflanzen deutlich verbesserte Stärkesynthese einiger GMM-Linien (Abb. 35 & 40), ließen sie als die idealen Kandidaten für die Expression der Katalase erscheinen.

4.3 Der Lichtmengen-abhängige ME-Phänotyp

4.3.1 Der Phänotyp

Die ME Pflanzen wuchsen im Langtag wie der Wildtyp (Abb. 53), wobei auch hinsichtlich des Elektronentransports, des Chlorophyll A/B-Verhältnisses, des Frischgewicht/Fläche-Verhältnisses und der mikroskopisch bestimmten Blattdicke keine Unterschiede zu Col-0 offenbar wurden (Abb. 54). Dies steht im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Ergebnissen, die mit NADP-Malat-Enzym überexprimierenden Reispflanzen erhalten wurden. Diese Pflanzen zeigten unter normalen Langtagbedingungen massive photooxidative Schäden, Wachstumshemmung und eine starke Photoinhibition des PS II (Takeuchi et al. 2000; Tsuchida et al. 2001). Tabakpflanzen, die das NADP-ME überexprimierten zeigten dagegen keine phänotypischen Änderungen aber eine verringerte stomatare Leitfähigkeit (Laporte et al. 2002).

Wenn die ME Pflanzen der vorliegenden Arbeit aber unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, so wuchsen sie kleiner als der Wildtyp (Abb. 53). Im Vergleich mit diesem enthielten ihre gelblicheren Blätter zudem mehr Chlorophyll b und damit ein höheres Chlorophyll a/b-Verhältnis und weniger Frischgewicht pro Flächeneinheit, was durch eine reduzierte Blattdicke verursacht wurde (Abb. 54 & 55). Wurde die zur Verfügung stehende Lichtmenge, also das Produkt aus Belichtungsstärke und Tageslänge, durch Herabsetzen der Lichtstärke weiter verringert, so verstärkten sich die Unterschiede zwischen ME und Col-0 Pflanzen (Abb. 58). Bei geringerer Lichtmenge reduzierte sich das Wachstum der ME Pflanzen noch stärker, sie akkumulierten weniger Frisch- und Trockengewicht und zeigten schließlich bei sehr geringer Lichtintensität (30 μE) verringerte F_V/F_M -Verhältnisse verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 59).

Die extreme Form des ME-Phänotyps manifestierte sich bei nicht vorhandener Belichtung, also wenn die Pflanzen im Dunkeln inkubiert wurden (Abb. 66). Unter diesen Bedingungen wurden die ME Pflanzen sehr schnell gelb und gingen

schließlich etwa 2-3 Tage früher als der Wildtyp ein, der unter diesen Bedingungen natürlich auch nicht dauerhaft lebensfähig war. Es konnte durch die in Abbildung 67 dargestellten Untersuchungen bestätigt werden, dass es sich bei diesem Prozess, der nach 72 h im Dunkeln nicht mehr durch Beenden der Dunkelinkubation aufgehalten werden konnte, um eine beschleunigte dunkel-induzierte Seneszenz handelt, da in ME Pflanzen dieselben Veränderungen beobachtet wurden, die im Wildtyp erst einige Tage später auftraten und allgemein mit Seneszenz assoziiert werden (Buchanan-Wollaston et al. 2005; Diaz et al. 2005).

4.3.2 Die möglichen Ursachen des ME-Phänotyps

Die Suche nach den Ursachen des ME-Phänotyps führte zu Untersuchungen des Zucker- und Stärkemetabolismus, photosynthetischer Parameter, des Redox-Zustandes, des ATP/ADP-Haushaltes und der Expression beteiligter Gene und schließlich zu einer umfassenden Analyse des Primärmetabolismus der ME und Col-0 Pflanzen und soll hier skizziert werden.

Da Störungen im Stärke- und Zuckerstoffwechsel der Pflanze häufig mit negativen Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum verbunden sind (Caspar et al. 1985; Lin et al. 1988), wurde eine Analyse der Stärke- und Zuckergehalte der ME Pflanzen im Tagesgang vorgenommen, die allerdings keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien aufdecken konnte (Abb. 63). Da auch während der Dunkelinkubation zwischen den untersuchten Linien keine Differenzen in diesen Parametern auftraten, kommen Beeinträchtigungen des Zucker- und Stärkehaushalts nicht als Ursache für den ME-Phänotyp in Frage (Abb. 68).

Die Messung photosynthetischer Parameter verdeutlichte dagegen, dass die ME Pflanzen im Kurztag nur eine geringere Elektronentransportrate erreichen können als der Wildtyp (Abb. 56). Außerdem war in den Plastiden von ME Pflanzen im Kurztag ein höherer Grad an Grana-Stapelung zu beobachten (Abb. 55). In den gestapelten Bereichen der Grana findet sich hauptsächlich PS II (Heldt 2003). Die Organisation der Grana-Stapelung ist hoch dynamisch und reagiert auf Veränderungen der Licht- und Redox-Verhältnisse (Rozak et al. 2002; Pfeiffer und Krupinska 2005). Da diese Untersuchung noch nicht mit ME Pflanzen aus dem Langtag durchgeführt wurde, kann noch nicht abschließend beurteilt werden, ob das Phänomen nur von der ME-Expression oder zusätzlich auch von der Tageslänge abhängt. Trotzdem deutet die

veränderte Grana-Stapelung (Abb. 55 & Tab. 9), der reduzierte Chlorophyll B-Gehalt und der geringere Elektronentransport auf Probleme des PS II hin. Ausgelöst werden könnten diese durch eine gestörte Redox-Balance, möglicherweise verursacht durch die gesteigerte Produktion von NADPH durch das zusätzliche Malat-Enzym im Chloroplasten, wie bereits für Reispflanzen berichtet wurde (Tsuchida et al. 2001). Unterstützen würde diese Argumentation auch der beobachtete drastische Abfall des F_V/F_M -Verhältnisses in ME Pflanzen bei Hochlichtinkubation – unabhängig von der zur Anzucht verwendeten Tageslänge (Abb. 57). Weitere Messungen konnten die Hypothese der gestörten Redox-Balance aber nicht bestätigen. So war der Aktivierungszustand der plastidären Malat-Dehydrogenase (gemessen von Mariana Saigo, Universidad Nacional de Rosario, nicht gezeigt), der als Indikator für den Redoxzustand gilt (Tsuchida et al. 2001) unter Langtagbedingungen nicht zwischen dem Wildtyp und den ME Linien zu unterscheiden. Außerdem konnte ohne Hochlichtinkubation kaum eine Änderung der Grundfluoreszenz des PS II und damit des F_V/F_M -Verhältnisses in ME Pflanzen gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden (Abb. 57 & 67), wie es bei Problemen im Redox-System zu erwarten gewesen wäre (Krause 1991). Zusammenfassend scheinen gewisse Störungen der Redox-Balance und des PS II in den ME Pflanzen unter bestimmten Bedingungen aufzutreten, die aber nicht ausschlaggebend für den unter 4.3.1 beschriebenen Phänotyp sein sollten.

Eine andere Möglichkeit zur Erklärung des Kurztag-Phänotyps der ME Pflanzen ergab sich aus den Arbeiten über die plastidären ATP/ADP-Translokatoren (NTT 1 & 2). Die Aufgabe dieser Translokatoren ist es, nachts ATP im Gegentausch mit ADP aus dem Cytosol (und damit hauptsächlich aus der mitochondrialen Atmungskette) in die Chloroplasten zu transportieren (Reiser et al. 2004; Reinhold et al. 2007), womit vorwiegend die im Dunkeln stattfindende Tetrapyrrol-Biosynthese versorgt wird (Tanaka und Tanaka 2007). Wenn die ATP-Versorgung in einer langen Nacht nicht gewährleistet ist, akkumuliert in den Plastiden das (phototoxische) Intermediat Protoporphyrin IX, das in der folgenden Lichtperiode angeregte Elektronen auf O_2 übertragen kann. Dabei entstehen Radikale, die den Plastiden schädigen (Kruse et al. 1995; Mock und Grimm 1997) und so zu einem Kurztag-Phänotyp bei den NTT-Mutanten führen (vgl. 4.1.3 & 4.1.4; Reinhold et al. 2007).

Bei den Untersuchungen zu dieser Hypothese konnte eine gegenüber dem Wildtyp verstärkte Expression von NTT 1 in ME Pflanzen am Ende der Dunkelperiode im

Kurztag ermittelt werden, die auf einen erhöhten nächtlichen ATP-Import in die Plastiden hindeuten könnte (Abb. 61). Auch die Expression der mitochondrialen ATP/ADP-Translokatoren ACC 2 und ACC 3 war in den ME Pflanzen am Ende der Dunkelperiode gegenüber den Wildtyppflanzen allerdings im Langtag erhöht (nicht gezeigt). Eventuell soll auf diese Weise mehr ATP von den Mitochondrien für die Plastiden bereitgestellt werden. Eine Verbindung zwischen dem Kurztag-Phänotyp und dem ATP/ADP-Haushalt kann auch mit Hilfe der Ergebnisse der PGK-Messung konstruiert werden, da dieses glykolytische Enzym in den ME Pflanzen im Kurztag eindeutig aktiver ist als im Wildtyp und so im Chloroplasten benötigtes ATP bereitstellen kann (Abb. 60). Die Aktivitätsmessung der PK indes gibt in diesem Zusammenhang keinen eindeutigen Hinweis, da zwischen den Linien kein Unterschied offensichtlich wird (Abb. 60). Gegen eine verringerte ATP-Verfügbarkeit als Ursache des ME-Phänotyps scheint das Ergebnis der ATP/ADP-Messung (gemessen in Zusammenarbeit mit María I. Zanor, MPI Golm) zu sprechen, das in den ME Pflanzen eher höher als im Wildtyp bestimmt wurde und so eine bessere Versorgung mit ATP in den ME Pflanzen als im Wildtyp nahelegt (Abb. 62). Das ATP/ADP-Verhältnis ist aber in einem Blattextrakt gemessen worden und kann so keine Auskünfte über die für diese Diskussion wichtige subzelluläre Verteilung des ATP und ADP machen.

Eindeutig gegen eine Beteiligung des Nukleotid-Haushalts am ME-Phänotyp spricht, dass eine Protoporphyrin IX-Akkumulation als Ursache der Läsionen an NTT-Mutanten ausgemacht wurde (Reinhold et al. 2007). Die schädigende photooxidative Wirkung dieses Intermediats benötigt Licht und kann so als Ursache zumindest für die verfrühte dunkel-induzierte Seneszenz ausgeschlossen werden (Fahnenstich et al. 2007). Für den Kurztag-Phänotyp aber sollte angesichts der oben diskutierten Deregulationen eine Beteiligung der ATP/ADP-Balance nicht endgültig außer Acht gelassen werden.

Nachdem die vorgestellten Hypothesen den ME-Phänotyp in seiner Gesamtheit nur unbefriedigend erklärten, sollte über eine Metabolitanalyse des Primärstoffwechsels im Tagesgang geklärt werden, ob hier eine andere schwerwiegende Beeinträchtigung vorliegt (Abb. 65). Obwohl Malat ein sehr zentraler Metabolit mit vielfältigen Funktionen im pflanzlichen Stoffwechsel ist (1.3 & 4.3.3), war das Ausmaß der ermittelten Abweichungen im Primärmetabolismus der ME Pflanzen gegenüber dem Wildtyp recht überschaubar. Wie erwartet konnten verglichen mit

Col-0 in den ME Pflanzen deutlich verringerte Gehalte von Malat aber auch des metabolisch nahestehenden Fumarats gemessen werden. Die beiden Metaboliten zeigten eine Akkumulation während der Lichtperiode, gefolgt von einem Abbau im Dunkeln, wobei die in den ME Pflanzen festgestellten maximalen Mengen von Malat und Fumarat im Licht nicht die minimalen Werte des Wildtyps am Ende der Dunkelperiode erreichten (Abb. 65). Malat und Fumarat sind über die Reaktion der mitochondrialen Fumarase verbunden und in Tomatenpflanzen mit einem Defekt in dem Fumarase-Gen konnten erhöhte Malat-Gehalte ermittelt werden (Nunes-Nesi et al. 2007). Auffallend war, dass außer für Malat, Fumarat und Succinat keine Unterschiede bei den Citrat-Zyklus-Intermediaten zwischen ME und Col-0 Pflanzen entdeckt wurden (Abb. 65). Daneben waren in ME Pflanzen, wie ebenfalls antizipiert werden konnte, die Gehalte des Produkts der ME-Reaktion Pyruvat und der von Pyruvat abgeleiteten Aminosäuren Leucin, Valin und Alanin gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht. Die für die Produktion dieser Aminosäuren nötigen Aminogruppen stehen so nicht mehr für Aspartat und Glutamat zur Verfügung, deren Kohlenstoffgerüste Oxalacetat und 2-Ketoglutarat nun weiterhin dem Citrat-Zyklus zur Verfügung stehen können, aus dem konstant Malat abgezogen wird. Daneben könnten die niedrigen Gehalte von Glutamat zusammen mit den gegenüber dem Wildtyp erhöhten Succinat-Gehalten auch auf eine Umsetzung von Glutamat über GABA zu Succinat hindeuten (Stuart-Guimaraes et al. 2007), das so in den Citrat-Zyklus eingehen könnte.

Die Metabolitanalyse der dunkelinkubierten ME und WT Pflanzen lieferte über die bereits erwähnten hinaus keine neuen Erkenntnisse bezüglich der Ursache des ME-Phänotyps (Abb. 69). Allerdings konnte durch diese Untersuchung auch auf metabolischer Ebene gezeigt werden, dass die ME Pflanzen tatsächlich eine verfrühte dunkel-induzierte Seneszenz zeigen, da ein gegenüber dem Wildtyp zwei bis drei Tage früherer Anstieg in den Gehalten Seneszenz-assoziiierter Aminosäuren Asparagin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin und Tryptophan festgestellt werden konnte (Diaz et al. 2005; Abb. 69).

Im Zusammenhang mit Aminosäuren wäre auch noch eine weitere Ursache der verfrühten dunkel-induzierten Seneszenz denkbar, da Ishizaki et al. 2005 & 2006 über einen mitochondrialen Elektronentransportkomplex ETF berichteten, der in die β -Oxidation und den Katabolismus von Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten wie Leucin und Isoleucin involviert ist und Pflanzen mit einem Defekt in einem der

beteiligten Gene ebenfalls eine verfrühte Seneszenz im Dunkeln zeigen. Da aber keine Unterschiede in der Höhe der Akkumulation von Leucin und Isoleucin zwischen Wildtyp und ME Pflanzen erkennbar waren (Abb. 69) und auch keine Probleme während der Keimung von ME-Samen auffällig wurden (nicht gezeigt), bei der in *A. thaliana* hauptsächlich Speicherlipide mobilisiert werden (Penfield et al. 2005), wurde diese Hypothese verworfen.

Nachdem also intensiv nach Hinweisen gesucht wurde, die die bekannten Spezialfälle von verfrühter dunkel-induzierter Seneszenz mit den in ME Pflanzen beobachteten Vorgängen in Verbindung zu bringen und dabei keine zufriedenstellende Lösung gefunden wurde, blieb als mögliche Erklärung nur noch der Mangel an Kohlenstoffgerüsten (*carbon starvation*) - die normale Ursache dunkel-induzierter Seneszenz (Hensel et al. 1993; Quirino et al. 2000; Fujiki et al. 2001; Lam et al. 2001).

Dieser Mangel wird von der Pflanze normalerweise über sinkende Gehalte von Zuckern wahrgenommen. Dieses Signal kommt auf Grund der fehlenden Unterschiede zwischen ME und Col-0 Pflanzen (Abb. 63 & 68) aber hier nicht in Frage, so dass das Signal für den Seneszenz auslösenden Mangel vermutlich über die niedrigen Gehalte von Malat oder Fumarat vermittelt wird. Unterstützung erhält diese These durch die Möglichkeit, die verfrühte Seneszenz durch Supplementierung der ME Pflanzen mit leicht metabolisierbaren Kohlenstoffquellen wie Glukose, Saccharose, Malat und Fumarat zu verhindern (Abb. 70), was einen starken Hinweis auf *carbon starvation* als Ursache der verfrühten dunkel-induzierten Seneszenz gibt (Fujiki et al. 2001). Die Metabolitanalyse der Pflanzen dieses Experiments (Abb. 71) offenbarte zudem, dass wiederum keine Unterschiede in den Zuckergehalten zwischen ME und Col-0 Pflanzen innerhalb beider Behandlungen auftraten, aber dass stattdessen die Malat- und Fumarat-Gehalte der supplementierten ME-Pflanzen das Niveau der nicht-seneszenten, in Wasser inkubierten Wildtyppflanzen erreichten. Da in dieser Analyse keine anderen Unterschiede zwischen den Behandlungen und zwischen den ME und Col-0 Pflanzen gefunden wurden, die zur Erklärung der verhinderten Seneszenz geeignet wären, muss auch dies als wichtiges Argument für eine bedeutende Rolle des Duos Malat und Fumarat eingeordnet werden. Die Ursache der verfrühten dunkel-induzierten Seneszenz scheint also, trotz Wildtyp-ähnlicher Mengen von Zuckern und Stärke, eine durch die niedrigen Malat und/oder Fumarat-Gehalte ausgelöste *carbon starvation* zu sein.

Auch für den beobachteten Kurztag-Phänotyp der ME Pflanzen scheint eine Beteiligung reduzierter Gehalte von Malat und Fumarat wahrscheinlich. So konnte ermittelt werden, dass mit abnehmender Tageslänge und Lichtintensität der Phänotyp an Stärke gewinnt (Abb. 53, 58 & 59) und gleichzeitig die am Ende der Dunkelperiode gemessenen Gehalte von Malat, aber besonders von Fumarat dramatisch absinken (Tab. 10). Dies könnte dazu führen, dass die ME Pflanzen bei wenig Licht im Kurztag am Ende jeder Nacht in eine Phase der *carbon starvation* geraten, die bereits das Seneszenzprogramm startet (Fujiki et al. 2001), welches durch die folgende Lichtperiode wieder gestoppt wird und so das Wachstum der Pflanzen stark gestört ist.

4.3.3 Malat und Fumarat in *A. thaliana*

Malat und Fumarat sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht als mögliche Signalgeber im pflanzlichen Metabolismus in Betracht gezogen worden, obwohl beide wichtige Rollen in der Physiologie von *A. thaliana* erfüllen (1.3). Malat bildet mit Oxalacetat ein Redox-Paar, das in der Zelle dazu dient, Redox-Äquivalente zwischen den verschiedenen Organellen der Zelle auszutauschen (Scheibe 2004). Über eine Störung dieses Systems in ME Pflanzen könnten neben der zusätzlichen NADPH-Produktion durch die ME auch die eventuell Redox-assoziierten Teilaspekte (4.3.2) des ME-Phänotyps erklärt werden. Malat steht zudem im Verdacht, das Substrat der *light-enhanced dark respiration* (LEDR) zu sein, einem mehrere Minuten andauernden Anstieg der Dunkelrespiration von Pflanzen nach voriger Belichtung (Reddy et al. 1991; Padmasree et al. 2002; Parys und Jastrzebski 2006). Es wird spekuliert, dass die LEDR dazu dient, Photosynthate zu Beginn der Dunkelperiode schnell zur Produktion von ATP zu verwenden, was für die ME Pflanzen bedeuten würde, dass sie auf Grund der verglichen mit dem Wildtyp niedrigen Malat-Gehalte bereits von einem energetisch gesehen schlechteren Start in die Dunkelperiode als der Wildtyp betroffen wären.

Auch Fumarat scheint eine wichtige Rolle in *A. thaliana* zu erfüllen. Es wurde berichtet, dass Fumarat in sehr hohen Konzentrationen (mehrere mg pro g FG) in *A. thaliana*-Blättern gemessen werden konnte (Chia et al. 2000) und damit etwa dieselben Konzentrationen wie die Zucker erreichte, was auch in den vorliegenden Untersuchungen beobachtet werden konnte (Abb. 64). Chia et al. (2000) fanden große Mengen von Fumarat auch in anderen C₃-Pflanzen, die diese organische

Säure im Tagesverlauf akkumulierten. Zudem wurde Fumarat im Phloem von *A. thaliana* in einer hohen Konzentration nachgewiesen (1/10 von Saccharose), was Fumarat zu einem möglichen systemischen Signalgeber des Kohlenstoffstatus der Pflanze macht.

4.3.4 Weitere Ansätze für Untersuchungen an ME Pflanzen

Um weitere Klarheit über den ME-Phänotyp und die zu Grunde liegenden Ursachen zu erhalten, sollte ein verstärktes Augenmerk auf das Verhalten der ME Pflanzen im Kurztag gelegt werden. So könnte hier eine kombinierte Analyse des Primärmetabolismus und der Expression im Tagesverlauf Auskunft über die Wechselwirkung von Metabolitgehalten und eventuell von diesen ausgelöste Expressionen von Genen, die mit Seneszenz oder *carbon starvation* assoziiert sind zu geben. Weiterhin sollten die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen an anderen Pflanzenlinien mit Störungen im Malat/Fumarat-Metabolismus durchgeführt werden, um eine kritische Menge dieser Metaboliten zu ermitteln, ab der ein Phänotyp entwickelt wird. Durch die Einbeziehung von Pflanzenlinien, die andere Enzyme als das ME mehr oder weniger stark als der Wildtyp exprimieren wäre zudem möglich, Nebeneffekte wie den Redox-Effekt auszuschließen. Ob Fumarat als Transport- und Speicherform von photosynthetisch fixiertem Kohlenstoff eine wichtige Rolle spielt, wie die Studie von Chia et al. 2000 nahelegt, könnte am besten über Kreuzungen der ME Pflanzen mit Mutanten oder Pflanzen mit reduzierter Expressionsstärke essentieller Gene der Stärkesynthese oder des Saccharosetransports und die Beurteilung der resultierenden Phänotypen geschehen. Sollte sich bei all diesen Untersuchungen eine Signalwirkung von Fumarat oder auch von Malat bestätigen lassen, so wäre die Ebene der Regulation von pflanzlicher Entwicklung durch den Kohlenstoff-Metabolismus nicht mehr nur auf die Zucker beschränkt (Rolland et al. 2002; Rolland und Sheen 2005), sondern würde auch den Status der organischen Säuren einbeziehen und könnte ein neues Forschungsfeld begründen.

4.3.5 Bedeutung für das Gesamtprojekt dieser Arbeit

Für das Gesamtprojekt dieser Arbeit, also die Erstellung von Pflanzen, die weniger von photorespiratorischen Verlusten betroffen sind, bedeuteten diese Erkenntnisse,

dass der GMM-Ansatz durch die zu erwartenden negativen Effekte der ME-Expression stark gefährdet war (vgl. Abb. 37). Allerdings deuteten während dieser Arbeit veröffentlichte Ergebnisse darauf hin, dass in *A. thaliana*-Chloroplasten bereits eine für das Funktionieren des GMM-Stoffwechselweges ausreichende NADP-ME-Aktivität vorhanden ist (Gerrard-Wheeler et al. 2005), so dass die transgene Einführung des NADP-ME mit all seinen Konsequenzen nicht mehr nötig erschien.

4.4 Die GMMK Pflanzen

Die GMMK Pflanzen zeigten hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften geringfügige Verbesserungen gegenüber den GMM Pflanzen (Abb. 41). Allerdings waren die photosynthetischen Elektronentransportraten weiterhin deutlich niedriger als die des Wildtyps (Abb. 42) und auch unter Hochlicht zeigten sie einen eindeutigen GO-Phänotyp (Abb. 42), obwohl die Transformation mit der Katalase (Kat) erfolgreich war (3.1) und eine, wenn auch nur leicht erhöhte Kat-Aktivität in ihren Blattextrakten bestimmt werden konnte (Abb. 10, Maier 2006).

4.5 Der GMK-Ansatz – der Machbarkeitsbeweis (*proof of concept*)

Der GO-MS-Kat-(GMK)-Ansatz entstand aus zwei Modifikationen des GMM-Ansatzes (1.2.6). Nach den Erfahrungen mit den GO Pflanzen und den daraus resultierenden Überlegungen (4.1.6) wurde die Einführung der Katalase als notwendig angesehen. Zusätzlich erschien nach den in 4.3.5 ausgeführten Schlussfolgerungen aus dem ME-Phänotyp die Einbeziehung des Malat-Enzyms nicht mehr nötig, so dass die Glykolat-Oxidase, die Malat-Synthase und die Katalase den endgültigen Ansatz zur Reduzierung photorespiratorischer Verluste bilden sollten.

4.5.1 Der Phänotyp der GMK Pflanzen – weniger H₂O₂, mehr Biomasse

Nachdem bereits die GO-MS Pflanzen ein besseres Wachstum als die GO Pflanzen zeigten (Abb. 21 & 43), wurden sie von den GMK Pflanzen noch deutlich übertroffen. Die Pflanzen der Linie GMK 3 wuchsen unter Kurztagbedingungen und moderater Lichtstärke (120 μ E) sogar signifikant besser als Col-0 (Abb. 43). Das

Trockengewicht der GMK 3 Pflanzen war unter diesen Bedingungen ebenfalls größer als das des Wildtyps, wofür eine Kombination aus größerem Rosettendurchmesser und höherer Blattanzahl verantwortlich zu sein scheint (Abb. 43 & 46).

Die bei GO und GO-MS Pflanzen beobachtete gegenüber Col-0 reduzierte Stärkesynthese während der Lichtperiode trat bei den GMK Pflanzen nicht auf, sondern sie schienen im Gegenteil eher eine größere Stärkemenge in ihren Blättern zu akkumulieren als der Wildtyp (Abb. 45). Zusätzlich waren die GMK Pflanzen ebenso wie die GO Pflanzen unter erhöhter CO₂-Konzentration hinsichtlich des Phänotyps und der Stärkemenge nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 44 & 45), woraus geschlossen werden kann, dass der GMK Phänotyp von der Photorespiration und den sich daraus ergebenden Produkten der GO-Aktivität abhängt. Da andererseits der starke Phänotyp der GO und GO-MS Pflanzen bei den GMK Pflanzen unter normalen Kurztagbedingungen nicht mehr auftritt, muss davon ausgegangen werden, dass die Reaktionssequenz über die Glykolat-Oxidase und die Malat-Synthase mit anschließender Disproportionierung des H₂O₂ durch die Katalase erfolgreich etabliert wurde.

Neben den Größenunterschieden im Kurztag konnten durch die Inkubation bei Hochlicht mit 600 µE für einige Tage allerdings noch weitere Differenzen zwischen den GMK Linien ausgemacht werden. So blichen die Pflanzen der Linie GMK 9 wie die GO und GO-MS Pflanzen weiterhin aus und schienen von einer Inhibition der Anthocyan- und Stärkesynthese betroffen zu sein, wogegen die Pflanzen der Linie GMK 3 ihre grüne Farbe behielten, Anthocyane produzierten und am Ende des Tages auch eine mit dem Wildtyp vergleichbare Stärkemenge akkumulierten (Abb. 49 & 50).

4.5.2 Photosynthetische Charakteristika

Die Messung der photosynthetischen Elektronentransportraten ließ ebenfalls eine ausgeprägte Verbesserung der GMK gegenüber den GO Pflanzen und teilweise auch gegenüber dem Wildtyp erkennen (Abb. 47). So waren die für GMK 3 Pflanzen bestimmten Elektronentransportraten besonders bei hohen Lichtintensitäten, die bei den GO Pflanzen immer zu massiven Problemen geführt hatten, sogar deutlich höher als die des Wildtyps. Auch die für GMK 9 bestimmten Werte waren besser als die sonst für die GO-exprimierenden Pflanzen ermittelten Raten und lagen dabei etwa auf Wildtyp-Niveau. Dagegen zeigten die GO Pflanzen verglichen mit Col-0 in dieser

Messung die schon häufiger bestimmten niedrigeren Elektronentransportraten. Obwohl der Meßfehler der GO-Messung hier recht hoch war, stellt er angesichts der guten allgemeinen Datenlage für diese Eigenschaft des GO-Phänotyps (Abb. 13, 28, 32 & 38) die genannten Schlussfolgerungen nicht in Frage.

Den endgültigen Nachweis dafür, dass durch den GMK-Ansatz ein geringeres Ausmaß an photorespiratorischen Verlusten möglich ist, lieferte die Messung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses $\delta^{13}\text{C}$ in der getrockneten Biomasse von GMK und Col-0 Pflanzen (Abb. 48). Während bei den Pflanzen, die unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen gewachsen waren, keine Unterschiede des $\delta^{13}\text{C}$ erkannt werden konnten, zeigten die GMK 3 Pflanzen unter normalen Kurztagbedingungen ein (vom Betrag her) deutlich gegenüber Col-0 und auch GMK 9 Pflanzen verringertes $\delta^{13}\text{C}$. Für dieses Ergebnis ist nach jetzigem Kenntnisstand keine Erklärung außer einer verringerten Photorespiration bzw. einer gesteigerten Carboxylierungseffizienz der Photosynthese denkbar (Farquhar et al. 1989; Gillon und Griffiths 1997; Igamberdiev et al. 2004).

Die Unterschiede, die in den absoluten Werten des $\delta^{13}\text{C}$ zwischen den Pflanzen beider Behandlungen bestehen, sind technischer Natur: Das zur Erhöhung der CO_2 -Konzentration eingeleitete und von den für Abb. 48 B beprobten Pflanzen aufgenommene CO_2 ist industriell produziert und hat deswegen ein anderes Kohlenstoffisotopenverhältnis als die Raumluft, die von den Pflanzen unter photorespiratorischen Bedingungen aufgenommen wurde (Abb. 48 A). Die Ergebnisse der $\delta^{13}\text{C}$ -Messung für beide Bedingungen beziehen sich aber auf denselben Standard, wodurch die Unterschiede in den absoluten Werten zustande gekommen sind.

4.5.3 Biochemische Eigenschaften

Die Ergebnisse der GC/MS-Analysen von Pflanzen aus dem Niedriglicht und nach sechsständiger Hochlichtinkubation (Tab. 7) gaben noch einen weiteren Hinweis auf eine funktionierende Detoxifizierung des von der GO produzierten H_2O_2 , da in den GMK Pflanzen, anders als in GO und GO-MS Pflanzen, unter beiden Bedingungen keine erhöhten Galaktonat- γ -laktone-Gehalte mehr auftraten, die für erhöhten ROS-Stress indikativ gewesen wären (Wheeler et al. 1998; Smirnov 2000).

Auch die Werte für die Zucker Glukose und Saccharose und die organischen Säuren Malat und Fumarat unterstützen diese These, da sie unter Niedriglicht in den GMK im

Gegensatz zu den GO Pflanzen in viel höheren, mit dem Wildtyp vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen werden konnten, was auf eine geringere Inhibition der Kohlenstofffixierung (4.1.3) hindeutet. Allerdings erreichten diese Metabolite in GMK Pflanzen nach Hochlichtbehandlung zwar deutlich größere Mengen als in den GO Pflanzen, aber häufig nicht die Gehalte des Wildtyps (Tab. 7). Da diese Eigenschaften aber teilweise auch bei MS und Kat Pflanzen festgestellt wurden, die phänotypisch unter keiner Bedingung vom Wildtyp zu unterscheiden waren, muss für diese Metabolite von einem durch die Hochlichtinkubation bedingten hoch dynamischen Stoffwechsel ausgegangen werden, der einen Vergleich schwierig macht.

Eindeutig interpretieren lassen sich dagegen die in den GO-exprimierenden Pflanzen nach Hochlichtinkubation drastisch gegenüber dem Wildtyp verringerten Werte für Glycin und damit auch für das Glycin/Serin-Verhältnis (Tab 7). Diese Werte weisen nach, dass die Glykolat-Oxidase und damit auch die Kombination aus dieser mit der Malat-Synthase ihr Substrat aus dem photorespiratorischen Stoffwechselweg beziehen, in dem das Glycin normalerweise produziert wird (Tolbert 1997). Somit funktionieren die transgen eingeführten Enzyme an der vorgesehenen Stelle und verringern dadurch den metabolischen Fluss durch die Photorespiration. Dabei fällt auf, dass der Glycin-Gehalt nach Hochlicht in GMK 3 Pflanzen deutlich geringer, in GMK 9 Pflanzen aber deutlich höher als in den GO und GO-MS Pflanzen ist.

Die GC/MS-Daten, die von den unter erhöhter CO₂-Konzentration inkubierten Pflanzen gewonnen wurden, bestätigen erneut, dass auch der metabolische Phänotyp der GO, GO-MS und GMK Pflanzen von der Photorespiration abhängt (Tab. 8): Unter diesen nicht-photorespiratorischen Bedingungen wurden keine Unterschiede in den photorespiratorischen Aminosäuren Glycin und Serin zwischen den Linien gefunden und auch der Gehalt von Galaktonat- γ -laktone war in GO-exprimierenden Linien und Col-0 gleich, so dass von einer nicht vorhandenen H₂O₂-Produktion durch die GO ausgegangen werden kann.

Die Ursache für den großen Unterschied zwischen den Pflanzen der Linien GMK 3 und 9 hinsichtlich des Phänotyps und der weiteren ermittelten Eigenschaften (Abb. 43, 45, 46, 47, 48, 49 & 50) ist nicht ohne weiteres ersichtlich. Die Variationsbreite des Phänotyps zwischen den GMK Linien deutet aber schon darauf hin, dass genau aufeinander abgestimmte Enzymaktivitäten essentiell für das vorteilhafte Funktionieren des GMK-Ansatzes sind. Die GMK 9 Pflanzen zeigten zwar höhere

Katalase-Aktivitäten in Blattextrakten als GMK 3 Pflanzen, schienen aber dennoch stark unter ROS-Stress zu leiden, vielleicht verursacht durch eine gestörte Signalweiterleitung über H_2O_2 durch übermäßigen Abbau durch die Katalase (Laloi et al. 2007). In diesem Punkt könnten eine Transkriptionsanalyse ROS-regulierter Gene und die Messung der auf ROS reagierenden Enzymaktivitäten, wie unter 4.1.5 vorgeschlagen, weitere Klarheit bringen. Auch die gegenüber GMK 3 stark erhöhten Glycin-Gehalte der GMK 9 Pflanzen könnten auf nicht perfekt abgestimmte Enzymaktivitäten hindeuten, die es den GMK 9 Pflanzen nicht erlauben, eine ähnlich große Menge an Metaboliten aus dem photorespiratorischen Stoffwechselweg abzugreifen wie es in den GMK 3 Pflanzen geschieht.

4.5.4 Vergleich mit einem ähnlichen Ansatz zur Reduktion photorespiratorischer Verluste

Kürzlich wurde von einem Ansatz zur Reduktion photorespiratorischer Verluste berichtet, in dem der gesamte katabolische Stoffwechselweg für Glykolat von *E. coli* auf *A. thaliana*-Pflanzen übertragen wurde, bestehend aus der Glykolat-Dehydrogenase, der Glyoxylat-Carboligase und der Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (Kebeish et al. 2007). Auch bei diesem Ansatz konnte in den Pflanzen, die den vollständigen Ansatz exprimierten, wie in der vorliegenden Arbeit relativ zu Col-0 eine deutliche Zunahme der Biomasse bei den resultierenden Pflanzen festgestellt werden, die mit einer erhöhten Carboxylierungseffizienz und niedrigerem CO_2 -Kompensationspunkt der Photosynthese einherging. Über ein gegenüber dem Wildtyp reduziertes Glycin/Serin-Verhältnis und eine erhöhte CO_2 -Evolution einer mit Glykolat gefütterten Plastidenpräparation der transgenen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass der eingeführte Stoffwechselweg mit dem photorespiratorischen Weg verbunden ist und in den Plastiden arbeitet.

Allerdings konnten von Kebeish et al. alle diese Eigenschaften in etwas geringerem Ausmaß bereits in den Pflanzen beobachtet werden, die lediglich das Startenzym, die Glykolat-Dehydrogenase, exprimierten. Mit der Kenntnis der GO-Daten (Abb. 12, 23 & 24) und der Argumentation in 4.1.2 kann davon ausgegangen werden, dass auch in diesen Pflanzen unter photorespiratorischen Bedingungen Glyoxylat akkumuliert. Dies wiederum würde unter Berücksichtigung der von Kebeish et al. dargelegten Eigenschaften dieser Pflanzen bedeuten, dass diese Glyoxylat-Akkumulation, entgegen allem was bisher zu diesem Thema veröffentlicht wurde (vgl.

4.1.2), eine überaus positive Wirkung auf die Photosynthese hat und darüber hinaus die Photorespiration teilweise inhibiert. Da der Glyoxylat-Gehalt in den transgenen Pflanzen nicht ermittelt wurde und dieser Punkt nur am Rande diskutiert wurde, können die von Kebeish et al. erhaltenen Ergebnisse auch für die Pflanzen, die den vollständigen Weg exprimierten, hier nicht abschließend interpretiert werden.

Aber auch wenn die Verbesserung des Wachstums und der photosynthetischen Leistungsfähigkeit der von Kebeish et al. erstellten Pflanzen nicht vollständig erklärt werden kann so unterstützen sie dennoch die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse, indem sie zeigen dass die beobachteten Verbesserungen durch eine Modifikation des photorespiratorischen Metabolismus im Prinzip möglich sind.

4.5.5 Fazit & Ausblick

Die von den GMK Pflanzen erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es möglich ist, auf einem hier skizzierten Weg in die Photorespiration einzugreifen und dass dabei Pflanzen entstehen können, die dem Wildtyp in photosynthetischer Effizienz und Wachstum überlegen sind.

Wie an den unterschiedlichen Ergebnissen mit den Pflanzen der Linien GMK 3 und 9 aber auch zu sehen ist, sind die durch den GMK-Ansatz reduzierten photorespiratorischen Verluste vermutlich sehr stark von einer gut koordinierten Expression der drei beteiligten Gene abhängig. Dies könnte für den eventuellen Transfer des GMK-Ansatzes auf wirtschaftlich bedeutende Pflanzen zu einem Problem werden, da unter Umständen eine sehr große Population transformierter Pflanzen auf verbesserte Wachstumseigenschaften durchgesehen werden müsste. Vor diesem Hintergrund wäre der Austausch der H₂O₂-produzierenden Glykolat-Oxidase gegen eine der kürzlich beschriebenen Glykolat-Dehydrogenasen (Bari et al. 2004; Eisenhut et al. 2006) wünschenswert, da damit die Expression der Katalase und der Eingriff in das ROS-System vermieden werden könnte. Auf diese Weise könnten die positiven Auswirkungen des GMK-Ansatzes durch die Transformation von nur zwei Genen auf die Zielpflanzen übertragen werden – eine deutliche Erleichterung der Selektion auch gegenüber dem von Kebeish et al. 2007 vorgestellten Ansatz, der die Transformation von fünf Genen fordert.

Der GMK-Ansatz oder der eben vorgeschlagene modifizierte Ansatz könnten zudem durch die zusätzliche Überexpression der plastidären Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) und/oder der Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) noch

verbessert werden. Es wurde nämlich gezeigt, dass unter lichtgesättigten Bedingungen die Regeneration von RubP durch den Calvin-Zyklus für die C₃-Photosynthese zum Flaschenhals der Carboxylierung durch die RubisCO wird und somit die Geschwindigkeit dieser bestimmt (Raines 2003; Lawson et al. 2006). So hatte die Überexpression der SBPase und auch der FBPase verglichen mit dem Wildtyp deutlich gesteigerte CO₂-Assimilationsraten, besseres Wachstum und gesteigerte Gehalte von RubP in den transgenen Pflanzen zur Folge (Miyagawa et al. 2001; Tamoi et al. 2006). Da anhand der Ergebnisse der GMK Pflanzen davon ausgegangen werden kann, dass diese mit einer höheren Rate CO₂ assimilieren als der Wildtyp, würde eine Kombination des GMK-Ansatzes mit den Vorteilen der SBPase/FBPase-Überexpression noch eine weitere Verbesserung der Biomassenproduktion der resultierenden Pflanzen erwarten lassen.

4.6 Die Salztoleranz der TSS-TSR Pflanzen

Bezüglich der Toleranz gegenüber den im Boden vorhandenen NaCl-Konzentrationen können die Pflanzen in Glykophyten (u. a. *A. thaliana*), die kaum NaCl im Boden vertragen und Halophyten, von denen einige noch bei einer NaCl-Konzentration wachsen, die der doppelten von Meerwasser entspricht, unterteilt werden (Xiong und Zhu 2002). Hohe NaCl-Konzentrationen im Boden verringern die Wasserverfügbarkeit für die Pflanzen durch ein reduziertes osmotisches Potential. Aber auch NaCl an sich kann negative Effekte ausüben, besonders das Na⁺, welches aber auf Grund seiner hohen physikalischen Ähnlichkeit mit dem benötigten K⁺ nicht effizient von der Aufnahme über die Wurzeln ausgeschlossen werden kann. Der hauptsächliche Unterschied zwischen Halophyten und Glykophyten besteht darin, dass erstere aufgenommenes Na⁺ sehr effizient in die Vakuole einlagern oder aus den Zellen ausschließen können und/oder kompatible Solute (Substanzen, die nicht sehr reaktiv sind, aber das osmotische Potential absenken) wie Glycin-Betain (Holmstrom et al. 2000; Yang et al. 2007) synthetisieren, wohingegen Glykophyten diese Fähigkeiten zwar teilweise besitzen, aber nur eingeschränkt nutzen (Xiong und Zhu 2002). Ist die Menge an NaCl zu groß, so stellt sich Salzstress ein, der sich bei *A. thaliana* durch eine Arretierung des Rosettenwachstums und eine beschleunigte Entwicklung über die Blüte zur Seneszenz auszeichnet (Munns 2002).

Gemessen an diesen Symptomen zeigten die TSS-TSR Pflanzen eindeutig eine relativ zu Col-0 erhöhte Toleranz gegenüber extern appliziertem NaCl über die ganze Spanne ihres Lebenszyklus, die bei den TSS und TSR Pflanzen nicht beobachtet werden konnte (Abb. 74, 75 & 76; Tab. 11). Bei den TSS-TSR-Pflanzen konnte ebenfalls eine größere Tendenz zur Ausprägung von Stresssymptomen bei Schwankungen der äußeren Bedingungen und sogar eine leicht erhöhte Kältetoleranz beobachtet werden (3.9.1; Abb. 73 & 77).

Über die Ursache für diese Phänomene kann angesichts der geringen Menge vorhandener Daten nur spekuliert werden.

Ein großes Problem für die Interpretation dieser Eigenschaften der TSS-TSR Pflanzen ist die Tatsache, dass die Enzymkombination aus TSS und TSR ohne die GO im Chloroplasten nach gängiger Theorie (4.1.2) nicht mit Substrat versorgt werden sollte und somit kein vom Wildtyp unterschiedlicher Phänotyp zu erwarten war. Da aber ein Phänotyp auftrat, muss entweder Glyoxylat auch im Wildtyp-Chloroplasten entstehen oder eine unbekannte Seitenreaktion der TSS-TSR-Kombination zu den beobachteten Charakteristika der TSS-TSR Pflanzen führen, wie es für andere Aldehyd-Dehydrogenasen bereits beobachtet wurde (Kotchoni et al. 2006). Zur Klärung dieses Punktes würde sich eine detaillierte metabolische Analyse dieser Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen anbieten.

Eine Beteiligung des Redox-Haushaltes an der Salztoleranz kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da von der TSS-TSR-Kombination nicht, wie von den entsprechenden Studien gefordert (Huang et al. 2005; Cheng und Long 2007), Reduktionsäquivalente bereitgestellt, sondern durch die TSR verbraucht werden.

Die Signalwege, die zu Ausbildung von Salzstress führen, teilen allerdings viele Elemente und Hormone mit Signalwegen anderer Stressarten wie osmotischem, mechanischem und Kälte-induziertem Stress (Munns 2002; Ma et al. 2006), so dass in Anbetracht der erhöhten Neigung der TSS-TSR Pflanzen zur Ausbildung von Stresssymptomen (3.9.1; Abb. 73) auch eine Deregulation in der generellen Stressantwort in Frage kommt. Dies würde ebenfalls die beobachtete Kältetoleranz (Abb. 77) erklären und zudem nahelegen, die TSS-TSR Pflanzen auf die Toleranz gegen weitere abiotische Stressarten (Hitze, Licht, Verwundung) zu testen. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wäre einerseits zu prüfen, ob völlig ungestresste TSS-TSR Pflanzen ebenfalls eine erhöhte Salztoleranz zeigen und ob andererseits in TSS-TSR Pflanzen aus einer variierenden Umgebung tatsächlich die Transkripte

Stress-assoziiertes Gene relativ zum Wildtyp in erhöhter Menge vorliegen und die Pflanzen so auf weitere abiotische Stressereignisse vorbereiten (Piao et al. 2001).

5. Literaturverzeichnis

- Aluru, M. R. und Rodermel, S. R. (2004).** "Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase." *Physiol Plant* 120(1): **4-11**.
- Andersson, I. und Taylor, T. C. (2003).** "Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414(2): **130-140**.
- Apel, K. und Hirt, H. (2004).** "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." *Annu Rev Plant Biol* 55: **373-99**.
- Aro, E. M., Virgin, I. und Andersson, B. (1993).** "Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover." *Biochim Biophys Acta* 1143(2): **113-34**.
- Asada, K. (1999).** "THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: **601-639**.
- Asada, K. (2000).** "The water-water cycle as alternative photon and electron sinks." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1402): **1419-31**.
- Bagnall, D. J. (1993).** "Light Quality and Vernalization Interact in Controlling Late Flowering in Arabidopsis Ecotypes and Mutants." *Ann Bot* 71(1): **75-83**.
- Baier, M. und Dietz, K. J. (2005).** "Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology." *J Exp Bot* 56(416): **1449-62**.
- Baker, A. L. und Tolbert, N. E. (1966).** "Glycolate Oxidase (ferredoxin containing form)." *Meth. Enzymol.* 9: **338-342**.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. und Finkel, T. (2005).** "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* 120(4): **483-95**.
- Barak, S., Nejidat, A., Heimer, Y. und Volokita, M. (2001).** "Transcriptional and posttranscriptional regulation of the glycolate oxidase gene in tobacco seedlings." *Plant Mol Biol* 45(4): **399-407**.
- Bari, R., Kebeish, R., Kalamajka, R., Rademacher, T. und Peterhänsel, C. (2004).** "A glycolate dehydrogenase in the mitochondria of Arabidopsis thaliana." *J. Exp. Bot.* 55(397): **623-630**.
- Bassham, J. A., Benson, A. A., Kay, L. D., Harris, A. Z., Wilson, A. T. und Calvin, M. (1954).** "The Path of Carbon in Photosynthesis. XXI. The Cyclic Regeneration of Carbon Dioxide Acceptor." *J. Am. Chem. Soc.* 76(7): **1760-1770**.

- Bauwe, H. und Kolukisaoglu, U. (2003).** "Genetic manipulation of glycine decarboxylation." *J Exp Bot* 54(387): **1523-35**.
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1993).** "*In planta* Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants." *C R Acad Sci III Sci Vie* 316: **1194-1199**.
- Beck, E. und Ziegler, P. (1989).** "Biosynthesis and Degradation of Starch in Higher Plants." *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40: **95-117**.
- Behal, R. H. und Oliver, D. J. (1997).** "Biochemical and molecular characterization of fumarase from plants: purification and characterization of the enzyme--cloning, sequencing, and expression of the gene." *Arch Biochem Biophys* 348(1): **65-74**.
- Berardini, T. Z., Bollman, K., Sun, H. und Poethig, R. S. (2001).** "Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40." *Science* 291(5512): **2405-7**.
- Bergmeyer, H. U. (1970).** *Methoden der enzymatischen Analyse*. Weinheim, New York, Verlag Chemie.
- Berlett, B. S. und Stadtman, E. R. (1997).** "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." *J Biol Chem* 272(33): **20313-6**.
- Bevan, M. (1984).** "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation." *Nucleic Acids Res* 12(22): **8711-21**.
- Beyer und Walter (1998).** *Lehrbuch der Organischen Chemie*. Stuttgart, Leipzig, S. Hirzel Verlag
- Boldt, R., Edner, C., Kolukisaoglu, U., Hagemann, M., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Morgenthal, K. und Bauwe, H. (2005).** "D-GLYCERATE 3-KINASE, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family." *Plant Cell* 17(8): **2413-20**.
- Bouche, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S. G. und Fromm, H. (2003).** "Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): **6843-8**.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: **248-54**.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S. und Neill, S. J. (2006).** "ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis." *Plant J* 45(1): **113-22**.
- Britto, D. T. und Kronzucker, H. J. (2002).** "NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review." *Journal of Plant Physiology* 159(6): **567-584**.

- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J. F., Wu, S. H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. und Leaver, C. J. (2005).** "Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis." *Plant J* 42(4): **567-85**.
- Buchanan, B. B. und Balmer, Y. (2005).** "REDOX REGULATION: A Broadening Horizon." *Annual Review of Plant Biology* 56(1): **187-220**.
- Buchanan, B. B. und Balmer, Y. (2005).** "Redox regulation: a broadening horizon." *Annu Rev Plant Biol* 56: **187-220**.
- Buchanan, B. B., Schurmann, P., Wolosiuk, R. A. und Jacquot, J. P. (2002).** "The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond." *Photosynth Res* 73(1-3): **215-22**.
- Burrell, M. M., Mooney, P. J., Blundy, M., Carter, D., Wilson, F., Green, J., Blundy, K. S. und Rees, T. a. (1994).** "Genetic manipulation of 6-phosphofruktokinase in potato tubers." *Planta* 194(1): **95-101**.
- Cakmak, I. und Marschner, H. (1992).** "Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves." *Plant Physiol* 98(4): **1222-1227**.
- Calsa, T., Jr. und Figueira, A. (2007).** "Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts." *Plant Mol Biol* 63(6): **745-62**.
- Campbell, W. J. und Ogren, W. L. (1990).** "Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphat carboxylase/oxygenase in intact, lysed and reconstituted chloroplasts." *Photosynth Res* 23: **257-268**.
- Caspar, T., Huber, S. C. und Somerville, C. (1985).** "Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity." *Plant Physiol*. 79(1): **11-17**.
- Ceccarelli, E. A., Arakaki, A. K., Cortez, N. und Carrillo, N. (2004).** "Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1698(2): **155-165**.
- Chang, Y. Y., Wang, A. Y. und Cronan, J. E., Jr. (1993).** "Molecular cloning, DNA sequencing, and biochemical analyses of *Escherichia coli* glyoxylate carboligase. An enzyme of the acetohydroxy acid synthase-pyruvate oxidase family." *J Biol Chem* 268(6): **3911-9**.
- Chastain, C. J. und Ogren, W. L. (1985).** "Photorespiration-Induced Reduction of Ribulose Bisphosphate Carboxylase Activation Level." *Plant Physiol* 77: **851-856**.

- Chastain, C. J. und Ogren, W. L. (1989).** "Glyoxylate Inhibition of Ribulosebiphosphate Carboxylase/Oxygenase Activation State in vivo." *Plant Cell Physiol* 30(7): **937-944**.
- Cheng, Y. und Long, M. (2007).** "A cytosolic NADP-malic enzyme gene from rice (*Oryza sativa* L.) confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*." *Biotechnol Lett* 29(7): **1129-34**.
- Chia, D. W., Yoder, T. J., Reiter, W. D. und Gibson, S. I. (2000).** "Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species." *Planta* 211(5): **743-51**.
- Chung, C. T. und Miller, R. H. (1993).** "Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells." *Methods Enzymol* 218: **621-7**.
- Cloney, L. P., Bekkaoui, D. R. und Hemmingsen, S. M. (1993).** "Co-expression of plastid chaperonin genes and a synthetic plant Rubisco operon in *Escherichia coli*." *Plant Molecular Biology* 23(6): **1285-1290**.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J. und Udvardi, M. K. (2004).** "Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*." *Plant J* 39(4): **487-512**.
- Cook, C. M., Mulligan, R. M. und Tolbert, N. E. (1985).** "Inhibition and stimulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by glyoxylate." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240(1): **392-401**.
- Cornah, J. E., Germain, V., Ward, J. L., Beale, M. H. und Smith, S. M. (2004).** "Lipid utilization, gluconeogenesis, and seedling growth in *Arabidopsis* mutants lacking the glyoxylate cycle enzyme malate synthase." *J Biol Chem* 279(41): **42916-23**.
- Cruz, J. A., Avenson, T. J., Kanazawa, A., Takizawa, K., Edwards, G. E. und Kramer, D. M. (2005).** "Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection." *J Exp Bot* 56(411): **395-406**.
- Cushman, J. C. und Bohnert, H. J. (1999).** "CRASSULACEAN ACID METABOLISM: Molecular Genetics." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): **305-332**.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K. und Mittler, R. (2005).** "Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*." *Plant Cell* 17(1): **268-81**.
- DeJong, R. J., Miller, L. M., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Kumar, S. und Barillas-Mury, C. (2007).** "Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7): **2121-6**.
- Desikan, R., Neill, S. J. und Hancock, J. T. (2000).** "Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*." *Free Radic Biol Med* 28(5): **773-8**.

- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J. T. und Neill, S. J. (1998).** "Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures." *Biochem J* 330 (Pt 1): **115-20**.
- Desikan, R., S, A. H.-M., Hancock, J. T. und Neill, S. J. (2001).** "Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress." *Plant Physiol* 127(1): **159-72**.
- Detarsio, E., Wheeler, M. C., Campos Bermudez, V. A., Andreo, C. S. und Drincovich, M. F. (2003).** "Maize C4 NADP-malic enzyme. Expression in Escherichia coli and characterization of site-directed mutants at the putative nucleoside-binding sites." *J Biol Chem* 278(16): **13757-64**.
- Diaz, C., Purdy, S., Christ, A., Morot-Gaudry, J. F., Wingler, A. und Masclaux-Daubresse, C. (2005).** "Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach." *Plant Physiol* 138(2): **898-908**.
- Dietz, K.-J., Jacob, S., Oelze, M.-L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N., Baier, M. und Finkemeier, I. (2006).** "The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism." *J. Exp. Bot.* 57(8): **1697-1709**.
- Dietz, K. J. (2003).** "Plant peroxiredoxins." *Annu Rev Plant Biol* 54: **93-107**.
- Diner, B. A. und Rappaport, F. (2002).** "STRUCTURE, DYNAMICS, AND ENERGETICS OF THE PRIMARY PHOTOCHEMISTRY OF PHOTOSYSTEM II OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS." *Annual Review of Plant Biology* 53(1): **551-580**.
- Dodd, A. N., Borland, A. M., Haslam, R. P., Griffiths, H. und Maxwell, K. (2002).** "Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic." *J. Exp. Bot.* 53(369): **569-580**.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. und Rebeille, F. (2001).** "The glycine decarboxylase system: a fascinating complex." *Trends in Plant Science* 6(4): **167-176**.
- Douce, R. und Neuburger, M. (1999).** "Biochemical dissection of photorespiration." *Current Opinion in Plant Biology* 2(3): **214-222**.
- Drincovich, M. F., Casati, P. und Andreo, C. S. (2001).** "NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways." *FEBS Lett* 490(1-2): **1-6**.
- Edwards, G. E., Franceschi, V. R. und Voznesenskaya, E. V. (2004).** "SINGLE-CELL C4 PHOTOSYNTHESIS VERSUS THE DUAL-CELL (KRANZ) PARADIGM." *Annual Review of Plant Biology* 55(1): **173-196**.
- Eisenhut, M., Kahlon, S., Hasse, D., Ewald, R., Lieman-Hurwitz, J., Ogawa, T., Ruth, W., Bauwe, H., Kaplan, A. und Hagemann, M. (2006).** "The Plant-Like C2 Glycolate Cycle and the Bacterial-Like Glycerate Pathway Cooperate in Phosphoglycolate Metabolism in Cyanobacteria." *Plant Physiol.* 142(1): **333-342**.

- Emmerlich, V., Linka, N., Reinhold, T., Hurth, M. A., Traub, M., Martinoia, E. und Neuhaus, H. E. (2003).** "The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): **11122-6**.
- Engel, N., van den Daele, K., Kolukisaoglu, U., Morgenthal, K., Weckwerth, W., Parnik, T., Keerberg, O. und Bauwe, H. (2007).** "Deletion of Glycine Decarboxylase in Arabidopsis Is Lethal under Nonphotorespiratory Conditions." *Plant Physiol.* 144(3): **1328-1335**.
- Fahnenstich, H. (2004).** Charakterisierung des GOX-Phänotyps im Kontext eines Ansatzes zur Manipulation der Photorespiration. Botanisches Institut. Köln, Universität zu Köln. Diplom-Arbeit.
- Fahnenstich, H., Saigo, M., Niessen, M., Zanon, M. I., Andreo, C. S., Fernie, A. R., Drincovich, M. F., Flügge, U. I. und Maurino, V. G. (2007).** "Alteration of Organic Acid Metabolism in Arabidopsis Overexpressing the Maize C4-NADP-malic Enzyme Causes Accelerated Senescence during Extended Darkness." *Plant Physiol* 145(3): **640-652**.
- Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R. und Hubick, K. T. (1989).** "Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis." *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40: **503-537**.
- Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G. und Kruger, N. J. (2001).** "Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells." *Planta* 212(2): **250-63**.
- Fey, V., Wagner, R., Brautigam, K. und Pfannschmidt, T. (2005).** "Photosynthetic redox control of nuclear gene expression." *J Exp Bot* 56(416): **1491-8**.
- Feyziev, Y. M., Yoneda, D., Yoshii, T., Katsuta, N., Kawamori, A. und Watanabe, Y. (2000).** "Formate-induced inhibition of the water-oxidizing complex of photosystem II studied by EPR." *Biochemistry* 39(13): **3848-55**.
- Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R. N. und Willmitzer, L. (2000).** "Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry." *Anal. Chem.* 72: **3573-3580**.
- Fiore, C., Trezeguet, V., Le Saux, A., Roux, P., Schwimmer, C., Dianoux, A. C., Noel, F., Lauquin, G. J., Brandolin, G. und Vignais, P. V. (1998).** "The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects." *Biochimie* 80(2): **137-50**.
- Fontaine, V., Hartwell, J., Jenkins, G. I. und Nimmo, H. G. (2002).** "*Arabidopsis thaliana* contains two phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes with different expression patterns." *Plant Cell Environ* 25: **115-122**.
- Foyer, C. H. und Noctor, G. (2000).** "Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling." *New Phytologist* 146(3): **359-388**.

- Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I. und Watanabe, A. (2001).** "Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars." *Physiol Plant* 111(3): **345-352**.
- Fukao, Y., Hayashi, M. und Nishimura, M. (2002).** "Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in greening cotyledons of *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* 43(7): **689-96**.
- Fukayama, H., Hatch, M., Tamai, T., Tsuchida, H., Sudoh, S., Furbank, R. und Miyao, M. (2003).** "Activity regulation and physiological impacts of maize C4-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants." *Photosynthesis Research* 77(2): **227-239**.
- Furbank, R. T., Agostino, A. und Hatch, M. D. (1990).** "C4 acid decarboxylation and photosynthesis in bundle sheath cells of NAD-malic enzyme-type C4 plants: mechanism and the role of malate and orthophosphate." *Arch Biochem Biophys* 276(2): **374-81**.
- Galmes, J., Flexas, J., Keys, A. J., Cifre, J., Mitchell, R. A. C., Madgwick, P. J., Haslam, R. P., Medrano, H. und Parry, M. A. J. (2005).** "Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves." *Plant, Cell & Environment* 28(5): **571-579**.
- Geigenberger, P., Kolbe, A. und Tiessen, A. (2005).** "Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars." *J Exp Bot* 56(416): **1469-79**.
- Geiger, D. R. und Servaites, J. C. (1994).** "Diurnal Regulation of Photosynthetic Carbon Metabolism in C3 Plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45(1): **235-256**.
- Genty, B., Briantais, J. M. und Baker, N. R. (1989).** "The relationship between the quantum yield of photosynthetic transport and quenching of chlorophyll fluorescence." *Biochim. Biophys. Acta* 990: **87-92**.
- Gerrard-Wheeler, M. C., Tronconi, M. A., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Flügge, U. I. und Maurino, V. G. (2005).** "A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 139(1): **39-51**.
- Gillon, J. S. und Griffiths, H. (1997).** "The influence of (photo)respiration on carbon isotope discrimination in plants." *Plant, Cell & Environment* 20(10): **1217-1230**.
- Gilmore, A. M. (1997).** "Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves." *Physiologia Plantarum* 99(1): **197-209**.
- Giordano, M., Beardall, J. und Raven, J. A. (2005).** "CO₂ CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution." *Annual Review of Plant Biology* 56(1): **99-131**.
- Givan, C. V. und Kleczkowski, L. A. (1992).** "The Enzymic Reduction of Glyoxylate and Hydroxypyruvate in Leaves of Higher Plants." *Plant Physiol* 100(2): **552-556**.

- Gosset, W. S. (1908).** "The probable error of a mean." *Biometrika* 6: **1-25**.
- Gotto, A. M. und Kornberg, H. L. (1961).** "The metabolism of C₂ compounds in micro-organisms. 7. Preparation and properties of crystalline tartronic semialdehyde reductase." *Biochem J* 81: **273-84**.
- Gout, E., Bligny, R., Pascal, N. und Douce, R. (1993).** "¹³C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells." *J Biol Chem* 268(6): **3986-92**.
- Goyal, A. und Tolbert, N. E. (1996).** "Association of glycolate oxidation with photosynthetic electron transport in plant and algal chloroplasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(8): **3319-3324**.
- Graan, T. und Ort, D. R. (1984).** "Quantitation of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts." *J Biol Chem* 259(22): **14003-10**.
- Grodzinski, B. (1979).** "A Study of Formate Production and Oxidation in Leaf Peroxisomes during Photorespiration." *Plant Physiol.* 63(2): **289-293**.
- Gupta, A. S., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burke, J. J. und Allen, R. D. (1993).** "Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): **1629-33**.
- Gupta, N. K. und Vennesland, B. (1964).** "Glyoxylate Carboligase of *Escherichia Coli*: a Flavoprotein." *J Biol Chem* 239: **3787-9**.
- Halliwell, B. (2006).** "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." *Plant Physiol* 141(2): **312-22**.
- Hanson, A. D. und Roje, S. (2001).** "ONE-CARBON METABOLISM IN HIGHER PLANTS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52(1): **119-137**.
- Hatch, M. D. (1987).** "C₄ photosynthesis: A unique bend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure." *Biochim Biophys Acta* 895: **8-16**.
- Häusler, R. E., Bailey, K. J., Lea, P. J. und Leegood, R. C. (1996).** "Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase." *Planta* 200(4): **388-396**.
- Häusler, R. E., Hirsch, H. J., Kreuzaler, F. und Peterhänsel, C. (2002).** "Overexpression of C(4)-cycle enzymes in transgenic C(3) plants: a biotechnological approach to improve C(3)-photosynthesis." *J Exp Bot* 53(369): **591-607**.
- Häusler, R. E., Kleines, M., Uhrig, H., Hirsch, H. und Smets, H. (1999).** "Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum* lowers the CO₂ compensation point ([IMAGE]*) and enhances dark and light respiration in transgenic potato." *J. Exp. Bot.* 50(336): **1231-1242**.

- Häusler, R. E., Rademacher, T., Li, J., Lipka, V., Fischer, K. L., Schubert, S., Kreuzaler, F. und Hirsch, H. J. (2001).** "Single and double overexpression of C(4)-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants." *J Exp Bot* 52(362): **1785-803**.
- Häusler, R. E., Schlieben, N. H., Nicolay, P., Fischer, K., Fischer, K. L. und Flügge, U. I. (2000).** "Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). I. Comparative physiological analysis of tobacco plants with antisense repression and overexpression of the triose phosphate/phosphate translocator." *Planta* 210(3): **371-82**.
- Heiber, I., Stroher, E., Ratz, B., Busse, I., Kahmann, U., Bevan, M. W., Dietz, K. J. und Baier, M. (2007).** "The redox imbalanced mutants of *Arabidopsis* differentiate signaling pathways for redox regulation of chloroplast antioxidant enzymes." *Plant Physiol* 143(4): **1774-88**.
- Heldt, H. W. (2003).** *Pflanzenbiochemie*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. und Mullineaux, P. M. (2000).** "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." *Plant Mol Biol* 42(6): **819-32**.
- Hendriks, J. H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M. und Geigenberger, P. (2003).** "ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species." *Plant Physiol* 133(2): **838-49**.
- Hensel, L. L., Grbic, V., Baumgarten, D. A. und Bleecker, A. B. (1993).** "Developmental and Age-Related Processes That Influence the Longevity and Senescence of Photosynthetic Tissues in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 5(5): **553-564**.
- Hoffmann, A., Hammes, E., Plieth, C., Desel, C., Sattelmacher, B. und Hansen, U. P. (2005).** "Effect of CO₂ supply on formation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*." *Protoplasma* 227(1): **3-9**.
- Holmstrom, K. O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T. E. und Welin, B. (2000).** "Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine." *J Exp Bot* 51(343): **177-85**.
- Horng, J. T., Behari, R., Burke, L. E. und Baker, A. (1995).** "Investigation of the energy requirement and targeting signal for the import of glycolate oxidase into glyoxysomes." *Eur J Biochem* 230(1): **157-63**.
- Horton, P., Ruban, A. V. und Walters, R. G. (1996).** "REGULATION OF LIGHT HARVESTING IN GREEN PLANTS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47(1): **655-684**.
- Howitz, K. T. und McCarty, R. E. (1985).** "Substrate specificity of the pea chloroplast glycolate transporter." *Biochemistry* 24(14): **3645-3650**.

- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P. und Zhang, L. (2005).** "Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant." *J Exp Bot* 56(422): **3041-9**.
- Hubbard, B. K., Koch, M., Palmer, D. R., Babbitt, P. C. und Gerlt, J. A. (1998).** "Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: characterization of the (D)-glucarate/galactarate catabolic pathway in Escherichia coli." *Biochemistry* 37(41): **14369-75**.
- Igamberdiev, A., Mikkelsen, T., Ambus, P., Bauwe, H., Lea, P. und Gardeström, P. (2004).** "Photorespiration Contributes to Stomatal Regulation and Carbon Isotope Fractionation: A Study with Barley, Potato and Arabidopsis Plants Deficient in Glycine Decarboxylase." *Photosynthesis Research* 81(2): **139-152**.
- Igamberdiev, A. U. (1989).** "Pathways of Glycolate Conversion in Plants." *Biol. Rundschau* 27: **137-144**.
- Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., Lea, P. J. und Gardestrom, P. (2001).** "The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase." *Physiologia Plantarum* 111(4): **427-438**.
- Igamberdiev, A. U., Ivlev, A. A., Bykova, N. V., Threlkeld, C. N., Lea, P. J. und Gardestrom, P. (2001).** "Decarboxylation of glycine contributes to carbon isotope fractionation in photosynthetic organisms." *Photosynth Res* 67(3): **177-84**.
- Igamberdiev, A. U. und Kleczkowski, L. A. (2006).** "Equilibration of adenylates in the mitochondrial intermembrane space maintains respiration and regulates cytosolic metabolism." *J Exp Bot* 57(10): **2133-41**.
- Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. und Ohsumi, C. (2003).** "Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis." *Plant J* 33(6): **975-87**.
- Ishizaki, K., Larson, T. R., Schauer, N., Fernie, A. R., Graham, I. A. und Leaver, C. J. (2005).** "The critical role of Arabidopsis electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation." *Plant Cell* 17(9): **2587-600**.
- Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T. R., Graham, I. A., Fernie, A. R. und Leaver, C. J. (2006).** "The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness." *Plant J* 47(5): **751-60**.
- Ivlev, A. A., Bykova, N. V. und Igamberdiev, A. U. (1996).** "Fractionation of carbon (¹³C/¹²C) isotopes in glycine decarboxylase reaction." *FEBS Letters* 386(2-3): **174-176**.
- Jensen, P. E., Bassi, R., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C. und Scheller, H. V. (2007).** "Structure, function and regulation

- of plant photosystem I." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767(5): **335-352**.
- Jiao, D., Huang, X., Li, X., Chi, W., Kuang, T., Zhang, Q., Ku, M. und Cho, D. (2002)**. "Photosynthetic characteristics and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C4 photosynthesis enzymes." *Photosynthesis Research* 72(1): **85-93**.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A. und Sevilla, F. (1997)**. "Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves." *Plant Physiol.* 114(1): **275-284**.
- Jordan, D. B. und Ogren, W. L. (1984)**. "The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase." *Planta* 161(4): **308-313**.
- Kaiser, W. M. (1976)**. "The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts." *Biochim Biophys Acta* 440: **476-482**.
- Kaiser, W. M. (1979)**. "Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide." *Planta* 145: **377-382**.
- Kalt, W., Osmond, C. B. und Siedow, J. N. (1990)**. "Malate Metabolism in the Dark After CO₂ Fixation in the Crassulacean Plant *Kalanchoe tubiflora*." *Plant Physiol* 94(2): **826-832**.
- Kaplan, A. und Reinhold, L. (1999)**. "CO₂ CONCENTRATING MECHANISMS IN PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): **539-570**.
- Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. und Mullineaux, P. M. (1997)**. "Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress." *Plant Cell* 9(4): **627-40**.
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H. J., Rosenkranz, R., Stabler, N., Schonfeld, B., Kreuzaler, F. und Peterhänsel, C. (2007)**. "Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*." *Nat Biotechnol* 25(5): **593-9**.
- Kimura, M., Yoshizumi, T., Manabe, K., Yamamoto, Y. Y. und Matsui, M. (2001)**. "Arabidopsis transcriptional regulation by light stress via hydrogen peroxide-dependent and -independent pathways." *Genes Cells* 6(7): **607-17**.
- Kisaki, T. und Tolbert, N. E. (1969)**. "Glycolate and Glyoxylate Metabolism by Isolated Peroxisomes or Chloroplasts." *Plant Physiol* 44(2): **242-250**.
- Kliebenstein, D. J., Monde, R. A. und Last, R. L. (1998)**. "Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization." *Plant Physiol* 118(2): **637-50**.

- Knowles, V. L., McHugh, S. G., Hu, Z., Dennis, D. T., Miki, B. L. und Plaxton, W. C. (1998).** "Altered growth of transgenic tobacco lacking leaf cytosolic pyruvate kinase." *Plant Physiol* 116(1): **45-51**.
- Kohn, L. E. (1968).** "Tartaric acid metabolism. 8. Crystalline tartronic semialdehyde reductase." *J Biol Chem* 243(17): **4426-33**.
- Kornberg, H. L. und Sadler, J. R. (1961).** "The metabolism of C₂-compounds in micro-organisms. VIII. A dicarboxylic acid cycle as a route for the oxidation of glycollate by *Escherichia coli*." *Biochem J* 81: **503-13**.
- Kotchoni, S. O., Kuhns, C., Ditzer, A., Kirch, H.-H. und Bartels, D. (2006).** "Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress." *Plant, Cell & Environment* 29(6): **1033-1048**.
- Kozaki, A. und Takeba, G. (1996).** "Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation." *Nature* 384(6609): **557-560**.
- Krause, G. H. a. W., E. (1991).** "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics." *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: **313-349**.
- Krömer, S. und Heldt, H. W. (1991).** "Respiration of pea leaf mitochondria and redox transfer between the mitochondrial and extramitochondrial compartment." *Biochim Biophys Acta* 1057: **42-50**.
- Kruse, E., Mock, H. P. und Grimm, B. (1995).** "Reduction of coproporphyrinogen oxidase level by antisense RNA synthesis leads to deregulated gene expression of plastid proteins and affects the oxidative defense system. ." *EMBO J.* 14: **3712-3720**.
- Ku, M. S., Agarie, S., Nomura, M., Fukayama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, M. und Matsuoka, M. (1999).** "High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants." *Nat Biotechnol* 17(1): **76-80**.
- Ku, S. B. und Edwards, G. E. (1977).** "Oxygen inhibition of photosynthesis. I. Temperature dependence and relation to O₂/CO₂ solubility ratio." *Plant Physiol* 59: **986-990**.
- Kuhlemeier, C., Strittmatter, G., Ward, K. und Chua, N. H. (1989).** "The Pea *rbcS-3A* Promoter Mediates Light Responsiveness but not Organ Specificity." *Plant Cell* 1(4): **471-478**.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem. Biophys. Methods* 10(3-4): **203-209**.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): **680-5**.

- Laloi, C., Apel, K. und Danon, A. (2004).** "Reactive oxygen signalling: the latest news." *Curr Opin Plant Biol* 7(3): **323-8**.
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I. und Apel, K. (2007).** "Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(2): **672-677**.
- Lam, E., Kato, N. und Lawton, M. (2001).** "Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response." *Nature* 411(6839): **848-853**.
- Lance, C. und Rustin, P. (1984).** "The central role of malate in plant metabolism." *Pysiol. Veg.* 22: **625-641**.
- Landry, L. G., Chapple, C. C. und Last, R. L. (1995).** "Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage." *Plant Physiol* 109(4): **1159-66**.
- Lange, H., Shropshire, W. und Mohr, H. (1971).** "An Analysis of Phytochrome-mediated Anthocyanin Synthesis." *Plant Physiol* 47(5): **649-655**.
- Laporte, M. M., Shen, B. und Tarczynski, M. C. (2002).** "Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function." *J Exp Bot* 53(369): **699-705**.
- Lara, M. V., Casati, P. und Andreo, C. S. (2002).** "CO₂-concentrating mechanisms in *Egeria densa*, a submersed aquatic plant." *Physiol Plant* 115(4): **487-495**.
- Lawson, T., Bryant, B., Lefebvre, S., Lloyd, J. C. und Raines, C. A. (2006).** "Decreased SBPase activity alters growth and development in transgenic tobacco plants." *Plant Cell Environ* 29(1): **48-58**.
- Leegood, R. C. (2002).** "C₄ photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C₃ plants." *J Exp Bot* 53(369): **581-90**.
- Leegood, R. C., Lea, P. J., Adcok, M. D. und Häusler, R. E. (1995).** "The regulation and control of photorespiration." *J. Exp. Bot.* 46: **1397-1414**.
- Lim, P. O., Kim, H. J. und Nam, H. G. (2007).** "Leaf senescence." *Annu Rev Plant Biol* 58: **115-36**.
- Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. und Preiss, J. (1988).** "Isolation and Characterization of a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Lacking ADPglucose Pyrophosphorylase Activity." *Plant Physiol* 86(4): **1131-1135**.
- Lindqvist, Y. und Branden, C. I. (1989).** "The active site of spinach glycolate oxidase." *J Biol Chem* 264(6): **3624-8**.
- Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Kidron, H., Piippo, M., Battchikova, N., Suorsa, M., Rintamaki, E., Salminen, T. A., Aro, E. M. und Mulo, P. (2007).** "Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP+-

- oxidoreductase using knock-out mutants of Arabidopsis." *Plant J* 49(6): **1041-52**.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. und Whittier, R. F. (1995)**. "Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR." *Plant J* 8(3): **457-63**.
- Lorimer, G. H. (1981)**. "The Carboxylation and Oxygenation of Ribulose 1,5-Bisphosphate: The Primary Events in Photosynthesis and Photorespiration." *Annual Review of Plant Physiology* 32(1): **349-382**.
- Ma, S., Gong, Q. und Bohnert, H. J. (2006)**. "Dissecting salt stress pathways." *J Exp Bot* 57(5): **1097-107**.
- Madhavan, S., Treichel, I. und O'Leary, M. H. (1991)**. "Effects of relative humidity on carbon isotope fractionation in plants." *Bot. Acta* 104: **292-294**.
- Maier, A. (2006)**. Ein neuer Ansatz zur Reduzierung photorespiratorischer Verluste: Physiologische Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Linien, die einen neuen Stoffwechselweg zur Reduzierung von Glykolat im Chloroplasten exprimieren. Botanisches Institut. Köln, Universität zu Köln. Bachelor-Arbeit.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982)**. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Martinoia, E. und Rentsch, D. (1994)**. "Malate Compartmentation-Responses to a Complex Metabolism." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45(1): **447-467**.
- Matsuoka, M., Furbank, R. T., Fukayama, H. und Miyao, M. (2001)**. "MOLECULAR ENGINEERING OF C4 PHOTOSYNTHESIS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52(1): **297-314**.
- Maurino, V. G., Saigo, M., Andreo, C. S. und Drincovich, M. F. (2001)**. "Non-photosynthetic 'malic enzyme' from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers." *Plant Mol Biol* 45(4): **409-20**.
- McClung, C. R. (1997)**. "Regulation of catalases in Arabidopsis." *Free Radic Biol Med* 23(3): **489-96**.
- Meyerowitz, E. M. (1987)**. "Arabidopsis Thaliana." *Annual Review of Genetics* 21(1): **93-111**.
- Miller, G., Suzuki, N., Rizhsky, L., Hegie, A., Koussevitzky, S. und Mittler, R. (2007)**. "Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses." *Plant Physiol* 144(4): **1777-85**.
- Mittler, R. (2002)**. "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance." *Trends Plant Sci* 7(9): **405-10**.

- Mittler, R. und Berkowitz, G. (2001).** "Hydrogen peroxide, a messenger with too many roles?" Redox Report 6: **69-72**.
- Miyagawa, Y., Tamoi, M. und Shigeoka, S. (2001).** "Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth." Nat Biotech 19(10): **965-969**.
- Miyao, M. (2003).** "Molecular evolution and genetic engineering of C4 photosynthetic enzymes." J Exp Bot 54(381): **179-89**.
- Miziorko, H. M. und Lorimer, G. H. (1983).** "Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase." Annual Review of Biochemistry 52(1): **507-535**.
- Mock, H. P. und Grimm, B. (1997).** "Reduction of Uroporphyrinogen Decarboxylase by Antisense RNA Expression Affects Activities of Other Enzymes Involved in Tetrapyrrole Biosynthesis and Leads to Light-Dependent Necrosis." Plant Physiol. 113(4): **1101-1112**.
- Mori, H., Takeda-Yoshikawa, Y., Hara-Nishimura, I. und Nishimura, M. (1991).** "Pumpkin malate synthase. Cloning and sequencing of the cDNA and northern blot analysis." Eur J Biochem 197(2): **331-6**.
- Muhaidat, R., Sage, R. F. und Dengler, N. G. (2007).** "Diversity of Kranz anatomy and biochemistry in C4 eudicots." Am. J. Bot. 94(3): **362-381**.
- Mulligan, R. M., Wilson, B. und Tolbert, N. E. (1983).** "Effects of Glyoxylate on Photosynthesis by Intact Chloroplasts." Plant Physiol 72(2): **415-419**.
- Mullineaux, P. M. und Rausch, T. (2005).** "Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression." Photosynth Res 86(3): **459-74**.
- Munns, R. (2002).** "Comparative physiology of salt and water stress." Plant Cell Environ 25(2): **239-250**.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. und Allakhverdiev, S. I. (2007).** "Photoinhibition of photosystem II under environmental stress." Biochim Biophys Acta 1767(6): **414-21**.
- Nakano, Y. und Asada, K. (1981).** "Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts." Plant & Cell Physiol. 22(5): **867-880**.
- Nelson, N. und Yocum, C. F. (2006).** "STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYSTEMS I AND II." Annual Review of Plant Biology 57(1): **521-565**.
- Ngo, T. T. und Lenhoff, H. M. (1980).** "A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions." Anal Biochem 105(2): **389-97**.
- Niessen, M. (2006).** Einfluss der Photoperiode auf den Phänotyp von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen, die ein plastidäres C₄-NADP-Malat-Enzym überexprimieren. Botanisches Institut. Köln, Universität zu Köln. Bachelor-Arbeit.

- Niessen, M., Thiruveedhi, K., Rosenkranz, R., Kebeish, R., Hirsch, H.-J., Kreuzaler, F. und Peterhänsel, C. (2007).** "Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants." *J. Exp. Bot.* 58(10): **2709-2715**.
- Nimmo, H. G. (2003).** "Control of the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants." *Arch Biochem Biophys* 414(2): **189-96**.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. und Murata, N. (2006).** "A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II." *Biochim Biophys Acta* 1757(7): **742-9**.
- Njau, R. K., Herndon, C. A. und Hawes, J. W. (2000).** "Novel beta -hydroxyacid dehydrogenases in *Escherichia coli* and *Haemophilus influenzae*." *J Biol Chem* 275(49): **38780-6**.
- Noctor, G. (2006).** "Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples." *Plant Cell Environ* 29(3): **409-25**.
- Noctor, G., Dutilleul, C., De Paepe, R. und Foyer, C. H. (2004).** "Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism." *J Exp Bot* 55(394): **49-57**.
- Noctor, G. und Foyer, C. H. (1998).** "ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49(1): **249-279**.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. und Foyer, C. H. (2002).** "Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?" *Ann Bot (Lond)* 89 Spec No: **841-50**.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. und Foyer, C. H. (2000).** "Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1402): **1465-75**.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J. und Fernie, A. R. (2007).** "Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function." *Plant J* 50(6): **1093-106**.
- O'Leary, M. H. (1989).** "Multiple Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions." *Annual Review of Biochemistry* 58(1): **377-401**.
- Ogren, W. L. (1984).** "Photorespiration: Pathways, Regulation, and Modification." *Annual Review of Plant Physiology* 35(1): **415-442**.
- Ogren, W. L. (2003).** "Affixing the O to Rubisco: discovering the source of photorespiratory glycolate and its regulation." *Photosynth Res* 76(1-3): **53-63**.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Yamanaka, A. und Sagisaka, S. (1991).** "Abrupt Increase in the Level of Hydrogen Peroxide in Leaves of Winter Wheat Is Caused by Cold Treatment." *Plant Physiol* 97(3): **1265-1267**.

- Oliver, D. J. und Zelitch, I. (1977).** "Increasing photosynthesis by inhibiting photorespiration with glyoxylate." *Science* 196(4297): **1450-1451**.
- Olson, B. J., Skavdahl, M., Ramberg, H., Osterman, J. C. und Markwell, J. (2000).** "Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization and possible targeting to the chloroplast." *Plant Sci* 159(2): **205-212**.
- Padmasree, K., Padmavathi, L. und Raghavendra, A. S. (2002).** "Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37(2): **71-119**.
- Parry, M. A., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A., Madgwick, P. J. und Keys, A. J. (2003).** "Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation." *J Exp Bot* 54(386): **1321-33**.
- Parys, E. und Jastrzebski, H. (2006).** "Light-enhanced dark respiration in leaves, isolated cells and protoplasts of various types of C4 plants." *Journal of Plant Physiology* 163(6): **638-647**.
- Penfield, S., Graham, S. und Graham, I. A. (2005).** "Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: *Arabidopsis* as a model system." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 2): **380-3**.
- Pfeiffer, S. und Krupinska, K. (2005).** "New insights in thylakoid membrane organization." *Plant Cell Physiol* 46(9): **1443-51**.
- Piao, H. L., Lim, J. H., Kim, S. J., Cheong, G. W. und Hwang, I. (2001).** "Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis*." *Plant J* 27(4): **305-14**.
- Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M. und Mittler, R. (2003).** "Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants." *Plant J* 34(2): **187-203**.
- Potters, G., Horemans, N., Bellone, S., Caubergs, R. J., Trost, P., Guisez, Y. und Asard, H. (2004).** "Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism." *Plant Physiol* 134(4): **1479-87**.
- Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E. und Smith, S. M. (2005).** "*Arabidopsis* peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination." *Plant Cell* 17(7): **2037-48**.
- Preiss, J. (1982).** "Regulation of the Biosynthesis and Degradation of Starch." *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 33: **431-454**.
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoeberichts, F. A., Vandorpe, M., Gakiere, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F. und Noctor, G. (2007).** "Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator

- of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death." *Plant J*.
- Quirino, B. F., Noh, Y.-S., Himelblau, E. und Amasino, R. M. (2000).** "Molecular aspects of leaf senescence." *Trends in Plant Science* 5(7): **278-282**.
- Raghavendra, A. S., Reumann, S. und Heldt, H. W. (1998).** "Participation of mitochondrial metabolism in photorespiration. Reconstituted system of peroxisomes and mitochondria from spinach leaves." *Plant Physiol* 116(4): **1333-7**.
- Raines, C. A. (2003).** "The Calvin cycle revisited." *Photosynth Res* 75(1): **1-10**.
- Raines, C. A. (2006).** "Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C₃ carbon fixation cycle." *Plant Cell Environ* 29(3): **331-9**.
- Read, B. A. und Tabita, F. R. (1994).** "High Substrate Specificity Factor Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Eukaryotic Marine Algae and Properties of Recombinant Cyanobacterial Rubisco Containing "Algal" Residue Modifications." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 312(1): **210-218**.
- Reddy, M. M., Vani, T. und Raghavendra, A. S. (1991).** "Light-Enhanced Dark Respiration in Mesophyll Protoplasts from Leaves of Pea." *Plant Physiol* 96: **1368-1371**.
- Reinhold, T., Alawady, A., Grimm, B., Beran, K. C., Jahns, P., Conrath, U., Bauer, J., Reiser, J., Melzer, M., Jeblick, W. und Neuhaus, H. E. (2007).** "Limitation of nocturnal import of ATP into Arabidopsis chloroplasts leads to photooxidative damage." *Plant J* 50(2): **293-304**.
- Reiser, J., Linka, N., Lemke, L., Jeblick, W. und Neuhaus, H. E. (2004).** "Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from Arabidopsis." *Plant Physiol* 136(3): **3524-36**.
- Renné, P., Dressen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Flügge, U. I., Westhoff, P. und Weber, A. P. (2003).** "The Arabidopsis mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2." *Plant J* 35(3): **316-31**.
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J. E., Rodermeil, S., Inze, D. und Mittler, R. (2002).** "Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase." *Plant J* 32(3): **329-42**.
- Rizhsky, L., Liang, H. und Mittler, R. (2003).** "The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress." *J Biol Chem* 278(40): **38921-5**.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N. und Willmitzer, L. (2000).** "Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry." *Plant J* 23(1): **131-42**.

- Rolland, F., Moore, B. und Sheen, J. (2002).** "Sugar sensing and signaling in plants." *Plant Cell* 14 Suppl: **S185-205.**
- Rolland, F. und Sheen, J. (2005).** "Sugar sensing and signalling networks in plants." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 1): **269-71.**
- Rothermel, B. A. und Nelson, T. (1989).** "Primary structure of the maize NADP-dependent malic enzyme." *J Biol Chem* 264(33): **19587-92.**
- Rozak, P. R., Seiser, R. M., Wacholtz, W. F. und Wise, R. R. (2002).** "Rapid, reversible alterations in spinach thylakoid appression upon changes in light intensity." *Plant, Cell and Environment* 25: **421-429.**
- Sage, R. F., Percy, R. W. und Seemann, J. R. (1987).** "The Nitrogen Use Efficiency of C(3) and C(4) Plants : III. Leaf Nitrogen Effects on the Activity of Carboxylating Enzymes in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.)." *Plant Physiol* 85(2): **355-359.**
- Saigo, M., Bologna, F. P., Maurino, V. G., Detarsio, E., Andreo, C. S. und Drincovich, M. F. (2004).** "Maize recombinant non-C4 NADP-malic enzyme: a novel dimeric malic enzyme with high specific activity." *Plant Mol Biol* 55(1): **97-107.**
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988).** "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): **487-91.**
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985).** "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): **1350-4.**
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E. F. (1989).** *Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): **5463-7.**
- Scheibe, R. (2004).** "Malate valves to balance cellular energy supply." *Physiol Plant* 120(1): **21-26.**
- Schneiderei, J., Häusler, R. E., Fiene, G., Kaiser, W. M. und Weber, A. P. (2006).** "Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism." *Plant J* 45(2): **206-24.**
- Schreiber, U., Schliwa, U. und Bilger, W. (1986).** "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer." *Photosynthesis Research* 10(1): **51-62.**

- Schulze-Siebert, D., Heineke, D., Scharf, H. und Schultz, G. (1984).** "Pyruvate-Derived Amino Acids in Spinach Chloroplasts : Synthesis and Regulation during Photosynthetic Carbon Metabolism." *Plant Physiol* 76(2): **465-471**.
- Schulze, W., Stitt, M., Schulze, E. D., Neuhaus, H. E. und Fichtner, K. (1991).** "A Quantification of the Significance of Assimilatory Starch for Growth of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh." *Plant Physiol* 95(3): **890-895**.
- Schürmann, P. und Jacquot, J. P. (2000).** "PLANT THIOREDOXIN SYSTEMS REVISITED." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51(1): **371-400**.
- Schweer, H. (1982).** "Gas chromatography-mass spectrometry of aldoses as o-methoxime, o- 2-methyl-2-propoxime and o-n-butoxime pertriflouroacetyl derivatives on OV-225 with methylpropane-4 as ionization agent." *J. Chromatogr.* 236: **355-360**.
- Sharkey, T. D. (1988).** "Estimating the rate of photorespiration in leaves." *Physiologia Plantarum* 73(1): **147-152**.
- Shikanai, T., Takeda, T., Yamauchi, H., Sano, S., Tomizawa, K. I., Yokota, A. und Shigeoka, S. (1998).** "Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts." *FEBS Lett* 428(1-2): **47-51**.
- Shingles, R., Woodrow, L. und Grodzinski, B. (1984).** "Effects of Glycolate Pathway Intermediates on Glycine Decarboxylation and Serine Synthesis in Pea (*Pisum sativum* L.)." *Plant Physiol* 74(3): **705-710**.
- Smirnoff, N. (2000).** "Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1402): **1455-64**.
- Somerville, C. R. (1986).** "Analysis of Photosynthesis with Mutants of Higher Plants and Algae." *Annual Review of Plant Physiology* 37(1): **467-506**.
- Somerville, C. R. (2001).** "An early *Arabidopsis* demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration." *Plant Physiol* 125(1): **20-4**.
- Somerville, C. R. und Ogren, W. L. (1979).** "A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*." *Nature* 280: **833-836**.
- Somerville, C. R. und Ogren, W. L. (1980).** "Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity." *Nature* 286: **257-259**.
- Somerville, C. R. und Ogren, W. L. (1980).** "Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(5): **2684-2687**.
- Somerville, C. R. und Ogren, W. L. (1981).** "Photorespiration-deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana* Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity." *Plant Physiol* 67(4): **666-671**.

- Somerville, C. R., Portis, A. R. und Ogren, W. L. (1982).** "A Mutant of *Arabidopsis thaliana* Which Lacks Activation of RuBP Carboxylase In Vivo." *Plant Physiol* 70(2): **381-387**.
- Somerville, S. C. und Ogren, W. L. (1983).** "An *Arabidopsis thaliana* mutant defective in chloroplast dicarboxylate transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(5): **1290-1294**.
- Southern, E. M. (1975).** "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* 98(3): **503-17**.
- Spreitzer, R. J. (2003).** "Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414(2): **141-149**.
- Spreitzer, R. J. und Salvucci, M. E. (2002).** "RUBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme." *Annual Review of Plant Biology* 53(1): **449-475**.
- Spurr, A. R. (1969).** "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy." *J Ultrastruct Res* 26(1): **31-43**.
- Stenberg, K., Clausen, T., Lindqvist, Y. und Macheroux, P. (1995).** "Involvement of Tyr24 and Trp108 in substrate binding and substrate specificity of glycolate oxidase." *Eur J Biochem* 228(2): **408-16**.
- Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R., Heldt, H. W. und Sidney Fleischer and Becca, F. (1989).** [32] Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology*, Academic Press. **Volume 174: 518-552**.
- Studart-Guimaraes, C., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B. und Fernie, A. R. (2007).** "Reduced Expression of Succinyl CoA Ligase can be Compensated for by an Upregulation of the {gamma}-amino-butyrate (GABA) Shunt in Illuminated Tomato Leaves." *Plant Physiol*.
- Sullivan, S., Shenton, M. und Nimmo, H. G. (2005).** "Organ specificity in the circadian control of plant gene expression." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): **943-4**.
- Taiz, L. und Zeiger, E. (2000).** *Physiologie der Pflanzen*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Takeuchi, Y., Akagi, H., Kamasawa, N., Osumi, M. und Honda, H. (2000).** "Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme." *Planta* 211(2): **265-74**.
- Tamoi, M., Nagaoka, M., Miyagawa, Y. und Shigeoka, S. (2006).** "Contribution of Fructose-1,6-bisphosphatase and Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the Photosynthetic Rate and Carbon Flow in the Calvin Cycle in Transgenic Plants." *Plant Cell Physiol*. 47(3): **380-390**.

- Tan, S., Evans, R. und Singh, B. (2006).** "Herbicide inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops." *Amino Acids* 30(2): **195-204**.
- Tanaka, R. und Tanaka, A. (2007).** "Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants." *Annual Review of Plant Biology* 58(1): **321-346**.
- Taniguchi, M., Taniguchi, Y., Kawasaki, M., Takeda, S., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Miyake, H. und Sugiyama, T. (2002).** "Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* 43(7): **706-17**.
- Tolbert, N. E. (1997).** "The C₂ Oxidative Photosynthetic Carbon Cycle." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: **1-25**.
- Tsuchida, H., Tamai, T., Fukayama, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Nishizawa, Y., Lee, B. H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M. S., Matsuoka, M. und Miyao, M. (2001).** "High level expression of C₄-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C₃ plant, rice." *Plant Cell Physiol* 42(2): **138-45**.
- Uemura, K., Anwaruzzaman, Miyachi, S. und Yokota, A. (1997).** "Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Thermophilic Red Algae with a Strong Specificity for CO₂ Fixation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233(2): **568-571**.
- Uozumi, N., Inoue, Y., Yamazaki, K. und Kobayashi, T. (1994).** "Light activation of expression associated with the tomato *rbcS* promoter in transformed tobacco cell line BY-2." *J Biotechnol* 36(1): **55-62**.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H. K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D. und Van Breusegem, F. (2004).** "Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 39(1): **45-58**.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inze, D. und Van Breusegem, F. (2005).** "Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis." *Plant Physiol* 139(2): **806-21**.
- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G. und Foyer, C. H. (2001).** "Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system." *Plant Physiol* 127(2): **426-35**.
- Voll, L., Häusler, R. E., Hecker, R., Weber, A., Weissenböck, G., Fiene, G., Waffenschmidt, S. und Flüge, U. I. (2003).** "The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway." *Plant J* 36(3): **301-17**.
- Voll, L. M., Jamai, A., Renne, P., Voll, H., McClung, C. R. und Weber, A. P. M. (2006).** "The Photorespiratory *Arabidopsis shm1* Mutant Is Deficient in SHM1." *Plant Physiol.* 140(1): **59-66**.

- von Ossowski, I., Mulvey, M. R., Leco, P. A., Borys, A. und Loewen, P. C. (1991).** "Nucleotide sequence of *Escherichia coli* katE, which encodes catalase HPII." *J. Bacteriol.* 173(2): **514-520**.
- Weber, A., Menzlaff, E., Arbinger, B., Gutensohn, M., Eckerskorn, C. und Flügge, U. I. (1995).** "The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelope membranes: molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells." *Biochemistry* 34(8): **2621-7**.
- Weber, A. P. M., Schwacke, R. und Flügge, U.-I. (2005).** "SOLUTE TRANSPORTERS OF THE PLASTID ENVELOPE MEMBRANE." *Annual Review of Plant Biology* 56(1): **133-164**.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969).** "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* 244(16): **4406-12**.
- Weise, S. E., Schrader, S. M., Kleinbeck, K. R. und Sharkey, T. D. (2006).** "Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch." *Plant Physiol* 141(3): **879-86**.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A. und Smirnoff, N. (1998).** "The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants." *Nature* 393(6683): **365-9**.
- Whitney, S. M. und Andrews, T. J. (2003).** "Photosynthesis and growth of tobacco with a substituted bacterial Rubisco mirror the properties of the introduced enzyme." *Plant Physiol* 133(1): **287-94**.
- Whitney, S. M., Baldet, P., Hudson, G. S. und Andrews, T. J. (2001).** "Form I Rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts." *Plant J* 26(5): **535-47**.
- Whitney, S. M., von Caemmerer, S., Hudson, G. S. und Andrews, T. J. (1999).** "Directed mutation of the Rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth." *Plant Physiol* 121(2): **579-88**.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., VanMontagu, M., Inze, D. und VanCamp, W. (1997).** "Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants." *EMBO J.* 16: **4806-4816**.
- Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P. und Leegood, R. C. (2000).** "Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1402): **1517-29**.
- Wingler, A., Walker, R. P., Chen, Z.-H. und Leegood, R. C. (1999).** "Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Is Involved in the Decarboxylation of Aspartate in the Bundle Sheath of Maize." *Plant Physiol.* 120(2): **539-546**.
- Woodrow, I. E. und Berry, J. A. (1988).** "Enzymatic Regulation of Photosynthetic CO₂ Fixation in C₃ Plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39(1): **533-594**.

- Xiong, L. und Zhu, J.-K. (2002).** "Salt Tolerance." The Arabidopsis Book.
- Yamaguchi, K. und Nishimura, M. (2000).** "Reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation." *Plant Cell Physiol* 41(12): **1397-406**.
- Yang, X., Liang, Z., Wen, X. und Lu, C. (2007).** "Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants." *Plant Molecular Biology* Epub-ahead of print.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M. und Smith, A. M. (2007).** "The diurnal metabolism of leaf starch." *Biochem J* 401(1): **13-28**.
- Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G. und Zentgraf, U. (2006).** "Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." *Plant Cell Environ* 29(6): **1049-60**.

6. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------------|--|----|
| Abbildung 1: | Der photorespiratorische Stoffwechselweg | 5 |
| Abbildung 2: | Die beiden vorgeschlagenen Stoffwechselwege zur Verminderung photorespiratorischer Verluste GTT und GMM im Vergleich. In grüner Farbe markiert sind die Enzyme, die notwendigerweise transgen in die Pflanzen eingebracht werden müssen..... | 11 |
| Abbildung 3: | Erstellung des modifizierten pGreenII-Vektors. | 35 |
| Abbildung 4: | Schema der enzymatischen Reaktionen beim Nachweis von Saccharose, Fructose und Glucose..... | 56 |
| Abbildung 5: | Darstellungen der gemessenen GO-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen. | 74 |
| Abbildung 6: | Darstellungen der gemessenen MS-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen. | 76 |
| Abbildung 7: | Darstellungen der gemessenen ME-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen. | 78 |
| Abbildung 8: | Darstellungen der gemessenen TSS-TSR-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen GTT Pflanzen. | 79 |
| Abbildung 9: | Darstellungen der gemessenen Katalase-Aktivitäten in Blattextrakten von Wildtyp-(Col-0) und transgenen Pflanzen. | 81 |
| Abbildung 10: | 4 Wochen alte, im Langtag (Gewächshaus) gewachsene Col-0 und GO Pflanzen im Vergleich | 82 |
| Abbildung 11: | Vergleich der Rosettendurchmesser fünf Wochen alter GO und Col-0 Pflanzen, die ab einem Alter von 15 Tagen einerseits im Gewächshaus bei 380 ppm CO ₂ und andererseits in der CO ₂ -Kammer (Langtag, 70 µE) bei 4000 ppm CO ₂ angezogen wurde. | 83 |
| Abbildung 12: | Vergleich der Gehalte von Glyoxylat (A) und H ₂ O ₂ (B) in Blattextrakten von fünf Wochen alten GO und Col-0 Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus). | 84 |
| Abbildung 13: | Photosynthetische Elektronentransportraten fünf Wochen alter GO und Col-0 Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) während einer Lichtreihe.. .. | 85 |
| Abbildung 14: | Zwei Wochen alte, im Langtag (Gewächshaus) gewachsene, Col-0, GO 5 und GO-TSS 21+74 Pflanzen im Vergleich. | 88 |
| Abbildung 15: | Vier Wochen alte Col-0, GO-TSS und TSS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich..... | 88 |
| Abbildung 16: | Vergleich der Blätter von Col-0 und GO-TSS Pflanzen aus dem Gewächshaus in einem Alter von 5 Wochen. | 88 |
| Abbildung 17: | 5 Wochen alte, ab einem Alter von zwei Wochen in der Klimakammer (Langtag, 50µE) gewachsene, Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen im Vergleich. | 89 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| Abbildung 18: | Fünf Wochen alte GO und GO-MS Pflanzen, die in einer Klimakammer (120 μ E, Kurztag) gewachsen waren, im Vergleich. | 90 |
| Abbildung 19: | Col-0 und GO Pflanzen, die im Alter von 4 Wochen aus dem Gewächshaus in Hochlichtbedingungen (600 μ E, 16:8 h Licht/Dunkel) transferiert wurden, fotografiert im Abstand von jeweils etwa einer Woche. | 91 |
| Abbildung 20: | Col-0, GO, GO-TSS und TSS Pflanzen im Alter von fünf Wochen, die teils vollständig im Gewächshaus, teils seit 10 Tagen bei 600 μ E (16:8 h Licht/Dunkel) angezogen wurden. | 92 |
| Abbildung 21: | Vergleich von Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen, die unter verschiedenen Lichtintensitäten angezogen wurden und mit Hochlicht behandelt wurden. Alle Lichtintensitäten wurden unter Langtagbedingungen in Klimakammern eingestellt. | 93 |
| Abbildung 22: | Anthocyangehalte in Blattextrakten von Col-0, GO, GO-MS und MS Pflanzen, die bis zu einem Alter von 4 Wochen bei 30 μ E angezogen (Langtag) und dann auf 600 μ E Hochlicht transferiert wurden (s. Abb. 21). | 93 |
| Abbildung 23: | Glyoxylat-Gehalte von 5 Wochen alten Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen aus dem Gewächshaus im Vergleich. | 95 |
| Abbildung 24: | Glyoxylat-Gehalte 5 Wochen alter Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) und nach 6 h Hochlichtbehandlung bei 600 μ E im Vergleich. | 95 |
| Abbildung 25: | H ₂ O ₂ -Gehalte 5 Wochen alter Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) und nach 6 h Hochlichtbehandlung bei 600 μ E im Vergleich. | 96 |
| Abbildung 26: | Natives Gel, gefärbt für SOD-Aktivität mit Proteinextrakten aus fünf Wochen alten Col-0 und GO-Pflanzen aus dem Langtag (60 μ E), die 6 h mit 200 μ E Hochlicht behandelt worden sind. | 97 |
| Abbildung 27: | F _V /F _M -Verhältnisse von Col-0, GO, MS und GO-MS Pflanzen, die bei 30 μ E im Langtag angezogen wurden und denselben Pflanzen nach 6 h Hochlicht von 600 μ E im Vergleich. | 98 |
| Abbildung 28: | Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) fünf Wochen alter Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen aus dem Gewächshaus während einer Lichtreihe. | 99 |
| Abbildung 29: | Stärkegehalte von 5 Wochen alten Col-0, GO, TSS und GO-TSS Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich. | 100 |
| Abbildung 30: | Fünf Wochen alte Col-0, GO und GTT Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich. | 101 |
| Abbildung 31: | Sechs Wochen alte Col-0, GO und GTT Pflanzen aus dem Kurztag (75 μ E). | 102 |
| Abbildung 32: | Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) fünf Wochen alter Col-0, GO und GTT Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) während einer Lichtreihe. | 102 |
| Abbildung 33: | F _V /F _M -Verhältnisse von Col-0, GO, und GTT Pflanzen, die bei 75 μ E im Langtag angezogen wurden und denselben Pflanzen nach 6 h Hochlicht mit 600 μ E im Vergleich. | 103 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| Abbildung 34: | Fünf Wochen alte Col-0, GO und GMM Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich..... | 104 |
| Abbildung 35: | Rosettendurchmesser der Col-0, GO und GMM Pflanzen im Verlauf der Pflanzenentwicklung im Langtag (Gewächshaus) im Vergleich. | 105 |
| Abbildung 36: | Sechs Wochen alte Col-0, GO und GMM Pflanzen, die ab einem Alter von 14 Tagen im Kurztag (75 μ E) gewachsen waren..... | 106 |
| Abbildung 37: | Frischgewicht 7 Wochen alter Col-0, GO und GMM Pflanzen, die ab einem Alter von 14 Tagen im Kurztag (75 μ E) gewachsen waren, im Vergleich. | 106 |
| Abbildung 38: | Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) fünf Wochen alter Col-0, GO und GMM Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) während einer Lichtreihe. | 107 |
| Abbildung 39: | F_V/F_M -Verhältnisse von Col-0, GO, und GMM Pflanzen, die bei 75 μ E im Langtag angezogen wurden und von denselben Pflanzen nach 6 h Hochlicht bei 600 μ E im Vergleich. | 108 |
| Abbildung 40: | Stärkegehalt von fünf Wochen alten Col-0 und GMM Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) im Vergleich. | 108 |
| Abbildung 41: | 33 Tage alte Col-0, GO, GMM und GMMK Pflanzen aus verschiedenen Anzuchtbedingungen im Vergleich. LT = Langtag (50 μ E), KT = Kurztag (70 μ E), HL = Pflanzen aus LT, die seit neun Tagen unter 600 μ E Hochlicht angezogen wurden. | 111 |
| Abbildung 42: | Photosynthetische Elektronentransportraten fünf Wochen alter Col-0, GO, GMM und GMMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) | 112 |
| Abbildung 43: | Sechs Wochen alte Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die bei 120 μ E im Kurztag gewachsen waren. | 113 |
| Abbildung 44: | Sieben Wochen alte Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die bei einer CO ₂ -Konzentration von 2000 \pm 200ppm CO ₂ (Kurztag, 120 μ E) gewachsen waren. | 113 |
| Abbildung 45: | Stärkefärbung von Blättern von Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die im Kurztag bei 120 μ E unter zwei verschiedenen CO ₂ -Konzentrationen gewachsen waren. Die Probenahme fand am Ende der Lichtperiode statt. | 114 |
| Abbildung 46: | (A) Trockengewicht von sechs Wochen alten und (B) Blattanzahl von acht Wochen alten Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μ E). | 115 |
| Abbildung 47: | Photosynthetische Elektronentransportraten sechs Wochen alter Col-0, GO und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μ E)..... | 116 |
| Abbildung 48: | Kohlenstoffisotopenverhältnis $\delta^{13}C$ in Promille (‰) von acht Wochen alten Col-0 und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μ E) bei (A) 380 ppm CO ₂ und (B) 2000 ppm CO ₂ | 117 |
| Abbildung 49: | Col-0, GO, MS, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus), die in einem Alter von fünf Wochen auf 600 μ E Hochlicht transferiert und nach sechs Tagen fotografiert wurden..... | 118 |
| Abbildung 50: | Stärkefärbung von Blättern von Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus), die in einem Alter von fünf Wochen auf | |

| | |
|---|-----|
| 600 μ E Hochlicht transferiert und nach sechs Tagen am Ende der Lichtperiode gefärbt wurden. | 119 |
| Abbildung 51: (A) Glyoxylat- und (B) H_2O_2 -Gehalte fünf Wochen alter Col-0, GO, MS, GO-MS und GMK Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) und nach 6 h Hochlichtbehandlung bei 600 μ E im Vergleich. | 119 |
| Abbildung 52: Immunolokalisation von C_4 -NADP-Malat-Enzym in fixierten mikroskopischen Schnitten von Col-0 und ME 5 Blättern. Die Immunopräzipitate sind als schwarze Punkte zu sehen, die Chloroplasten erscheinen rot (Fahnenstich et al. 2007). Der schwarze Balken entspricht 5 μ m. | 125 |
| Abbildung 53: Col-0 und ME Pflanzen, die in vier Wochen lang im Langtag (LT, 70 μ E) oder fünf Wochen im Kurztag (KT, 70 μ E) gewachsen waren im Vergleich. | 126 |
| Abbildung 54: (A) Chlorophyll A zu B Verhältnis, (B) Verhältnis von Frischgewicht zu Fläche und (C) Blattdicke von Col-0 und ME Pflanzen aus dem Kurztag (70 μ E) und Langtag (70 μ E) im Vergleich. | 127 |
| Abbildung 55: (A) Mikroskopische Aufnahmen von fixierten Blattquerschnitten und (B) EM-Bilder der Chloroplasten von Col-0 und ME 5 aus dem Kurztag (70 μ E) im Vergleich (Niessen 2006). | 128 |
| Abbildung 56: Photosynthetische Elektronentransportraten (ETR) von Col-0 und ME Pflanzen, die vier Wochen im Langtag (70 μ E) bzw. fünf Wochen im Kurztag (70 μ E) gewachsen waren. | 129 |
| Abbildung 57: F_V/F_M -Verhältnisse von Col-0 und ME Pflanzen aus Kurz- und Langtag (je 70 μ E), die in 600 μ E Hochlicht überführt und daraufhin jeden Tag gemessen wurden. | 130 |
| Abbildung 58: 14 Wochen alte, im Kurztag bei 30 μ E gewachsene Col-0 und ME Pflanzen. | 131 |
| Abbildung 59: Vergleich verschiedener Eigenschaften der Col-0 und ME Pflanzen im Kurztag unter verschiedenen Beleuchtungsstärken: (A)+(B) Frischgewicht, (C)+(D) Trockengewicht, (E) Verhältnis von Frisch- zu Trockengewicht und (F) das F_V / F_M Verhältnis. | 131 |
| Abbildung 60: Die Aktivitäten der plastidären Pyruvat- und Phosphoglyzeratkinase von Col-0 und ME Pflanzen unter verschiedenen Lichtstärken und Tageslängen im Vergleich. | 133 |
| Abbildung 61: Banden der Gelelektrophoresen von semiquantitativen RT-PCRs. Gezeigt sind die Banden der Amplifikation der cDNAs von NTT 1 & 2 und von Actin 2 aus Blatt-cDNA von Col-0 (\rightarrow 0) und ME Pflanzen (\rightarrow 2, 4, 5). | 133 |
| Abbildung 62: Das ATP zu ADP Verhältnis in Blattextrakten von vier Wochen alten Col-0 und ME Pflanzen aus dem Langtag bzw. fünf Wochen alten Pflanzen aus dem Kurztag. | 134 |
| Abbildung 63: Verlauf der Stärkegehalte von vier bzw. fünf Wochen alten Col-0 und ME Pflanzen aus dem Lang- bzw. Kurztag (70 μ E) während eines Tagesganges im Vergleich. | 135 |
| Abbildung 64: Gaschromatogramm eines GC/MS Laufes, Probe von Col-0 am Ende der Lichtperiode | 136 |

- Abbildung 65:** Ergebnisse der GC/MS-Analysen von Blattextrakten von vier Wochen alten Col-0 und ME Pflanzen aus dem Langtag (70 μ E). Zur besseren Übersichtlichkeit werden nur die Ergebnisse von Col-0 (gefüllte Kreise) und ME 4 (offene Kreise) wiedergegeben. Ein * markiert ME 4-Werte, die signifikant ($p < 0,05$) von denen des Wildtyps unterschiedlich sind, der schwarze Balken zeigt die Dunkelperiode an.137
- Abbildung 66:** Im Langtag (70 μ E) gewachsene Col-0 und ME Pflanzen, die ab einem Alter von 30 Tagen für vier Tage ohne Licht inkubiert wurden..... 140
- Abbildung 67:** Verschiedene seneszenz-assoziierte Parameter, gemessen an Col-0 und ME Pflanzen aus dem Langtag(70 μ E), die im Alter von 30 Tagen in die Dunkelheit überführt wurden. (A) Chlorophyllgehalt bezogen auf Frischgewicht, (B) FV/FM Verhältnis, (C) Proteingehalt bezogen auf Frischgewicht, (D) Fotos von der 54 kDa Bande der RubisCO in SDS-Gelen, beladen mit Proteinextrakten aus Blättern und gefärbt mit Coomassie Blue; (E) Fotos: *in situ*-Färbung von Zelltodereignissen in Blättern von Col-0 (jeweils links) und ME Pflanzen zu den unten angegebenen Tagen in Dunkelheit; Diagramm: Quantifizierung von Zelltodereignissen in Blattextrakten..... 141
- Abbildung 68:** Verlauf des Stärke- und Saccharosegehaltes in Col-0 und ME Pflanzen während der Dunkelinkubation (schraffierter Bereich). Die Pflanzen waren zu Beginn des Experiments 30 Tage alt und im Langtag (70 μ E) gewachsen.....143
- Abbildung 69:** Ergebnisse der GC/MS-Analysen von Blattextrakten von Col-0 und ME Pflanzen aus dem Dauerdunkel nach Langtag (70 μ E). Der besseren Übersichtlichkeit halber werden nur die Ergebnisse von Col-0 (gefüllte Kreise) und ME 4 (offene Kreise) wiedergegeben. Ein * markiert ME 4-Werte, die signifikant ($p < 0,05$) von denen des Wildtyps unterschiedlich sind. 144
- Abbildung 70:** Col-0 und ME Pflanzen, die nach drei Wochen Wachstum auf MS-Agar auf Whatman-Papier, getränkt mit verschiedenen Lösungen, transferiert und dann drei Tage im Dunkeln inkubiert wurden.146
- Abbildung 71:** GC/MS Ergebnisse der Proben von Col-0 und ME Pflanzen, die, versorgt mit Wasser oder 1% Glukose, drei Tage im Dunkeln inkubiert waren (Fahnenstich et al. 2007).147
- Abbildung 72:** Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Pflanzen aus dem Langtag (Gewächshaus) in einem Alter von 30 Tagen im Vergleich.149
- Abbildung 73:** Col-0, TSR, TSS und TSS-TSR Pflanzen, die ab einem Alter von 4 Wochen für 14 Tage unter Hochlichtbedingungen (600 μ E, Langtag) wuchsen. 150
- Abbildung 74:** 40 Tage alte, im Langtag (Gewächshaus) gewachsene, Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Pflanzen, die ab sieben Tagen vor diesen Aufnahmen mit Salzlösungen verschiedener Konzentration gegossen wurden, im Vergleich..... 151
- Abbildung 75:** Drei Tage alte Col-0 und TSS-TSR Pflanzen bei der Keimung auf MS-Agar zu dem 100 mM NaCl hinzugefügt wurden..... 152
- Abbildung 76:** Anteil der gekeimten Col-0, TSR, TSS und TSS-TSR Samen an der ausgesäten Gesamtmenge drei bis sieben Tage nach der Aussaat auf MS-Agar-Platten mit 100 oder 150 mM NaCl..... 152
- Abbildung 77:** Col-0, TSS, TSR und TSS-TSR Pflanzen, die seit 18 Tagen, ab einem Alter von 24 Tagen, in der Kühlkammer inkubiert wurden im Vergleich..... 154

7. Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Tabelle 1: | Zusammenfassung der erstellten Konstrukte zur Transformation von <i>A. thaliana</i> | 36 |
| Tabelle 2: | Liste der verschiedenen Pflanzenlinien und deren Herstellung..... | 37 |
| Tabelle 3: | Ergebnisse der Southern-Blot-Experimente: Anzahl der Transgeninsertionen auf genomischer Ebene in den transgenen Linien. Fett gedruckt sind die Linien, die Ausgangspunkt für weitere Kreuzungen oder Transformationen (2.6.2) waren; n. b. steht für nicht bestimmt..... | 71 |
| Tabelle 4: | Zeitlicher Verlauf des Anteils blühender Pflanzen an der Gesamtpopulation der jeweiligen GO und Col-0 Linien im Gewächshaus..... | 83 |
| Tabelle 5: | Zeitlicher Verlauf des Anteils blühender Pflanzen an der Gesamtpopulation der jeweiligen GMM und Col-0 Linien im Gewächshaus | 105 |
| Tabelle 6: | Photosynthetische Elektronentransportraten von sechs Wochen alten Col-0, GO 5, und GMK Pflanzen aus dem Kurztag (120 μ E) bei PFD = 600 μ E.. .. | 116 |
| Tabelle 7: | Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der GC/MS-Analyse von Blattextrakten von Col-0, MS, Kat, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die unter 30 μ E (Langtag) angezogen wurden und dann im Alter von fünf Wochen einerseits unter diesen Bedingungen, andererseits nach 6 h 600 μ E Starklicht beprobt wurden. | 120 |
| Tabelle 8: | Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der GC/MS-Analyse von Blattextrakten von Col-0, GO, GO-MS und GMK Pflanzen, die unter 120 μ E (Kurztag) bei einer CO ₂ -Konzentration von 2000 \pm 200 ppm angezogen wurden und im Alter von acht Wochen am Ende der Lichtperiode beprobt wurden. | 124 |
| Tabelle 9: | Anteil [%] der Thylakoide mit x gestapelten Grana an der Gesamtmenge untersuchter Thylakoide von im Kurztag (70 μ E) gewachsenen Col-0 und ME 5 Pflanzen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n \geq 6..... | 128 |
| Tabelle 10: | Die Gehalte von Malat und Fumarat in den Pflanzen der ME Linien bei verschiedenen Tageslängen und Beleuchtungsstärken am Ende der Licht- und Dunkelperiode. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Linien (ME 2,4 und 5 \rightarrow n \geq 12) als prozentualer Anteil am jeweiligen Wildtypwert..... | 139 |
| Tabelle 11: | Anteil (in %) der nicht gekeimten Col-0, TSR, TSS und TSS-TSR Samen an der Gesamtmenge nach der Aussaat auf MS-Agar-Platten mit 100 oder 150 mM NaCl. | 153 |

8. Kurzzusammenfassung & Abstract

8.1 Kurzzusammenfassung

Die Photorespiration führt in C₃-Pflanzen zu einem Verlust von Energie, Reduktionskraft und fixiertem Kohlenstoff und ist bedingt durch die katalytischen Eigenschaften der RubisCO. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, zwei alternative katabolische Stoffwechselwege für Glykolat in den Chloroplasten der C₃-Pflanze *A. thaliana* zu etablieren. Die daraus folgende lokale CO₂-Konzentrationserhöhung sollte die Photorespiration an sich und die photorespiratorischen Verluste reduzieren und zu Pflanzen mit besseren Wachstumseigenschaften führen. Das Startenzym Glykolat-Oxidase (GO) war in beiden Stoffwechselwegen identisch, aber das von ihm neben Glyoxylat produzierte H₂O₂ führte zu so starken Schädigungen an GO-exprimierenden Pflanzen, dass die zusätzliche Einführung einer Katalase nötig wurde. Letztlich führte aber die Modifikation eines der vorgeschlagenen Wege bestehend aus der Glykolat-Oxidase, Malat-Synthase und Katalase zum Erfolg. Die Pflanzen, die diesen Weg in ihren Plastiden exprimierten, wuchsen größer als der Wildtyp, zeigten eine höhere photosynthetische Effizienz und litten nicht mehr unter dem schädigenden Einfluss des H₂O₂.

Bei dem Versuch, diese Stoffwechselwege zu etablieren, wurden viele verschiedene Pflanzenlinien, die teilweise interessante und aussagekräftige Phänotypen aufwiesen erzeugt und analysiert. So förderte die Untersuchung des Lichtmengen-abhängigen Phänotyps der NADP-Malat-Enzym-Pflanzen neue Erkenntnisse über eine Rolle von Malat und Fumarat im Licht/Dunkel-Metabolismus und als mögliche Signalmoleküle des Kohlenstoffstatus zu Tage (Fahnenstich et al. 2007). Andererseits wurden durch die kombinierte plastidäre Expression der Tartronat-Semialdehyd-Synthase und der Tartronat-Semialdehyd-Reduktase Pflanzen erzeugt, die offensichtlich eine höhere Salz- und Kältetoleranz als der Wildtyp aufwiesen, wobei die Ursache für dieses Phänomen noch nicht abschließend geklärt werden konnte.

8.2 Abstract

Photorespiration is caused by the catalytic properties of RubisCO and leads inevitably to a loss of energy, reducing power and fixed carbon in C₃ plants. In this work two alternative glycolate catabolic pathways capable of reducing those losses and photorespiration itself by increasing local CO₂ concentration should be introduced into plastids of the C₃ plant *A. thaliana*. The starting enzyme glycolate oxidase (GO) was identical for both proposed pathways. Unfortunately, the H₂O₂ produced by the action of the GO lead to severe deteriorations in GO expressing plants and rendered the introduction of an additional catalase necessary. Finally, a modification of one of the proposed pathways consisting of a glycolate oxidase, a malate synthase and a catalase has proved successful. Plants expressing this pathway presented enhanced biomass accumulation and displayed a higher photosynthetic efficiency than the wild-type. Furthermore they did not suffer from the adverse effects of H₂O₂ anymore.

During the establishment of these pathways several transgenic lines have been generated and examined, in part showing very interesting and meaningful phenotypes. The investigation of the light-amount-dependent phenotype of the NADP-malic-enzyme expressing plants lead to new insights on the role of malate and fumarate in light/dark-metabolism and as possible signal molecules of the carbon status (Fahnenstich et al. 2007). Additionally the plastidic expression of tartronic-semialdehyde synthase together with tartronic-semialdehyde reductase yielded plants that displayed a higher degree of salt- and cold tolerance compared to the wild-type – a phenomenon which remains elusive.

9. Danksagungen & Formalia

9.1 Danksagungen

Am Ende dieser Arbeit möchte ich noch all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge danke ich für die Möglichkeit, an einem so interessanten und letztlich ertragreichen Projekt mitzuarbeiten und für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen und administrativen Problemen.

Frau Prof. Dr. S. Waffenschmidt bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und für einige zu Beginn dieser Arbeit durchgeführte HPLC-Analysen, die leider nicht mehr in diese Arbeit aufgenommen werden konnten.

Bei Frau Prof. Dr. K. Schnetz bedanke ich mich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Verónica G. Maurino, die mich über die ganze Zeit dieser Arbeit motiviert hat und mir immer hochkompetent und zuverlässig mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne ihre Initiative wären auch die vielen Erfahrungen und guten Bekanntschaften, die ich in Argentinien sammeln durfte, nicht möglich gewesen.

Herzlichen Dank auch an Dr. Rainer E. Häusler und Dr. Frank Ludewig, die beide immer ein offenes Ohr für wissenschaftliche Diskussionen hatten und freundlicherweise auch bei der Korrektur dieser Arbeit behilflich waren.

Ich bedanke mich bei den Kollegen am Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos der Universidad Nacional de Rosario in Argentinien, ganz besonders bei Carlos S. Andreo, Maria F. Drincovich, Mariana Saigo, Enrique Detarsio, Damián Saavedra, Federico Bologna und Rodrigo D'Andrea für die überaus freundliche Art, mit der sie mich aufgenommen haben und die schöne und interessante Zeit, die wir miteinander verbracht haben.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiter der Versuchswerkstatt des botanischen Instituts, allen voran Leo und Markus, die durch ihre tatkräftige Mithilfe viel zu der erfolgreichen Durchführung der Experimente in dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch den „Mädels“, unseren aktuellen und ehemaligen studentischen Hilfskräften, ganz besonders Alexandra Maier und Michaela Niessen, aber auch Julia Radzwill, und Julia Zielinski und den Technischen Angestellten Claudia Nothelle und Ulrike Hebbeker, ohne deren Hilfe der hinter dieser Arbeit stehende Aufwand nicht zu bewältigen gewesen wäre.

Dr. Alisdair R. Fernie und Dr. María Ines vom MPI Golm danke ich für die Messungen und Diskussionen zum ME-Paper.

Ich bedanke mich auch bei Siggie Werth für die vielen schönen und professionellen Fotos und bei den Mitarbeitern der Gärtnerei für die gute Pflege meiner Pflanzen

Ein herzliches Dankeschön geht auch an „die Jungs“, Christian Greiten, Hans Henning Kunz, Dr. Frank Ludewig, Dr. Markus Gierth und Martin Engqvist für die netten Runden beim Feierabendbier und viel Spaß und Unterhaltung in- und außerhalb der Universität.

Den Sekretärinnen Frau Lorbeer und Frau Schwanitz danke ich für die Sorgfalt, mit der sie die administrativen Vorgänge bearbeitet haben.

Dr. Rainer Schwacke danke ich für die unkomplizierte und schnelle Hilfe bei der Auswahl und Bestellung eines neuen Computers.

Ein großes Dankeschön geht natürlich auch an die übrigen Mitglieder der Arbeitsgruppe Flügge Bettina Berger, Anke Hüser, Diana Hille, Iris Schmitz, Tanja Löttgert, Kirsten Bell, Pia Staehr, Veena Prabhakar, Ruslan Yatusevich, Sonja Hetfeld, Jessica Schmitz, Martina Zell, Daniel Marquardt und Andre Guballa für ein angenehmes Arbeitsklima und anregende Unterhaltungen im Kaffeeraum.

Besonderer Dank geht dabei an Inga Rollwitz für die Pflege unserer Fussballtipprunde.

Ich danke auch den ehemaligen Mitglieder der AG Flüge Rainer Waadt, Dr. Michael Eicks, Dr. Lars Voll, PD Dr. Karsten Fischer, Dr. Silke Knappe, Wjekoslaw Beljo, Dr. Patrycja Niewiadomski und Katrin Fischer für positive Einflüsse verschiedenster Art auf diese Arbeit.

Ganz besonders herzlicher Dank geht an Steffi, für ihre ausdauernde Unterstützung und für die vielen schönen Stunden, die mir geholfen haben, die Arbeit nicht zu wichtig zu nehmen. Danke!

9.2 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I- Flügge betreut worden.

Holger Fahnenstich

9.3 Publikationen und Tagungsbeiträge

9.3.1 Teilpublikationen

Fahnenstich, H., Saigo, M., Niessen, M., Zanon, M. I., Andreo, C. S., Fernie, A. R., Drincovich, M. F., Flügge, U. I. und Maurino, V. G. (2007). "Alteration of Organic Acid Metabolism in Arabidopsis Overexpressing the Maize C₄-NADP-malic Enzyme Causes Accelerated Senescence during Extended Darkness." *Plant Physiol* 145(3): **640-652.**

Maurino, V. G., Fahnenstich, H. and Flügge, U.-I. (2004) Re-cycling of glycolate in C₃-chloroplasts: effects of the overexpression of Glycolate oxidase in plastids of *Arabidopsis thaliana*. 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Cracow, Poland. Acta Physiologiae Plantarum. 26 (3), 106.

Fahnenstich, H., Saigo, M., Niessen, M., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2007) Malate and fumarate emerge as key players in primary metabolism: *Arabidopsis thaliana* overexpressing C₄-NADP-ME offer a way to manipulate the levels of malate and to analyse the physiological consequences. 14th international Congress of photosynthesis. Glasgow, Scotland. Photosynthesis Research 91, 247.

Saigo, M., D'Andrea, R., Fahnenstich, H., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Maurino, V. G. (2005) Metabolic changes induced by high NADP-malic enzyme activity in *Arabidopsis thaliana*. PABMB Congress y XLI Reunión Anual de la SAIB. Pinamar, Argentina. Biocell (2005) 29, 177

9.3.2 Tagungsbeiträge

1. **Fahnenstich, H., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2004)** Approaches to re-cycle glycolate inside C₃-chloroplasts: Effects of the expression of glycolate oxidase in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. Botanikertagung 2004, Braunschweig, Deutschland.

2. **Fahnenstich, H., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2004)** A Biotechnological Approach to Reduce Photorespiratory Losses. Agricultural Biotechnology International Conference (ABIC 2004). Köln, Deutschland.
3. **Maurino, V. G., Fahnenstich, H. and Flügge, U.-I. (2004)** Re-cycling of glycolate in C₃-chloroplasts: effects of the overexpression of Glycolate oxidase in plastids of *Arabidopsis thaliana*. 14th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Krakau, Polen.
4. **Maurino, V. G., Fahnenstich, H., Flügge, U.-I. (2004)** A biotechnological approach to reduce photorespiratory losses. Effects of the expression of Glycolate oxidase in plastids of *Arabidopsis thaliana*. 15th international Conference on Arabidopsis Research. Berlin, Deutschland.
5. **Fahnenstich, H., Maurino, V. G., Flügge, U.-I. (2005)** Consequences of the expression of Glycolate oxidase in plastids of *A. thaliana* in the context of a biotechnological approach to reduce photorespiratory losses. XVII International Botanical Congress, Wien, Österreich.
6. **Fahnenstich, H., Häusler, R. E., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2005)** A biotechnological approach to improve the efficiency of CO₂ assimilation: re-cycling of glycolate in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. XVII International Botanical Congress, Wien, Österreich.
7. **Saigo, M., D'Andrea, R., Fahnenstich, H., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Maurino, V. G. (2005)** Metabolic changes induced by high NADP-malic enzyme activity in *Arabidopsis thaliana*. PABMB Congress y XLI Reunión Anual de la SAIB. Pinamar, Argentinien.
8. **Maurino, V. G., Saigo, M., Fahnenstich, H., Zanor, M. I., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Fernie, A. R., Flügge, U.-I. (2006)** Effect of the expression of NADP-Malic Enzyme in plastids of *Arabidopsis thaliana* in the context of a biotechnological approach to enhance CO₂ assimilation. 3rd International

Symposium "Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism" of the Collaborative Research Center SFB 429, Potsdam, Deutschland.

9. **Saigo, M., Fahnenstich, H., Niessen, M., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2006)** High level of NADP-Malic Enzyme in plastids reduces prolonged darkness tolerance in *A. thaliana*. XLII Reunión Anual de la SAIB. Rosario, Argentina.

10. **Fahnenstich, H., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2007)** Die Expression eines C₄-NADP-Malat Enzyms in den Plastiden von *Arabidopsis thaliana* führt zu einer beschleunigten dunkel-induzierten Seneszenz. 20. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen. Dabringhausen, Deutschland.

11. **Fahnenstich, H., Saigo, M., Niessen, M., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2007)** Malate and fumarate emerge as key players in primary metabolism: *Arabidopsis thaliana* overexpressing C₄-NADP-ME offer a way to manipulate the levels of malate and to analyse the physiological consequences. 14th international Congress of photosynthesis. Glasgow, Schottland.

12. **Maurino, V. G., Fahnenstich, H., Saigo, M., Drincovich, M. F., Flügge, U.-I., (2007)** Biotechnological approaches to improve C₄-photosynthesis: establishment of a complete glycolate pathway in C₃ chloroplasts and overexpression of C₄ single enzymes in *A. thaliana*. C₄ and CAM satellite Congress from the 14th International Congress of photosynthesis. Cambridge, Großbritannien

13. **Fahnenstich, H., Saigo, M., Drincovich, M. F., Flügge, U.-I., Maurino, V. G. (2007)** Accelerated starvation in *A. thaliana* overexpressing the maize C₄-NADP-malic enzyme. How important are malate and fumarate beyond primary metabolism? Botanikertagung 2007, Hamburg, Deutschland.

9.4 Lebenslauf

Holger Fahnenstich

Venloer Strasse 510, 50825 Köln

Telefon 0221-4535524

E-Mail: Holger.Fahnenstich@Uni-Koeln.de

Geburtsdatum: 19.06.1978

Geburtsort: Meppen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984-1988 Grundschule Schöninghsdorf

1988-1990 Johannesschule Meppen

1990-1997 Windthorst-Gymnasium Meppen, Abschluß: Abitur (Note 1,9)

Zivildienst:

07/1997 - 07/1998 Zivildienst beim Paritätischen Wohlfahrtsverband Meppen

Studium:

10/1998 – 01/2004 Diplomstudium Biologie an der Universität zu Köln

Hauptfach: Botanik

Nebenfächer: Genetik, Biochemie

Diplomarbeit in der AG Prof. Dr. U.-I. Flügge mit dem Thema
"Charakterisierung des GOX-Phänotyps im Kontext eines
Ansatzes zur Manipulation der Photorespiration"

Gesamtnote: 1,0

Promotion:

seit 04/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft / Wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Bot. Inst., AG Flügge und Promotion