Analyse und Anwendung von natürlichen und artifiziellen Stoffwechselwegen zur Verbesserung der photosynthetischen Effizienz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexandra Maier
aus Leverkusen

Düsseldorf, Oktober 2013

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD. Dr. Veronica Maurino
Korreferent: Prof. Dr. Andreas P.M. Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2014

Inhaltsverzeichnis……...I

Abkürzungsverzeichnis……..V

1. Einleitung……1

1.1 Carboxylierung und Decarboxilierung: die Kernmechanismen des pflanzlichen Kohlenstoff- Stoffwechsels……..1

1.2 Der pflanzliche, photosynthetische Kohlenstoff- Stoffwechsel……...1

1.3 Der photorespiratorische Stoffwechselweg höherer Pflanzen……3

1.4 Bedeutung und Nutzen der Photorespiration……5

1.5 Evolutive Anpassung an erhöhte Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre……...6

1.5.1 Der Subtyp der NAD-ME C4 Photosynthese……...8

1.5.2 NAD- abhängiges Malat Enzym……9

1.5.3 Analyse von NAD-ME *knockout*- Mutanten……11

1.6 Der Citrat- Zyklus und seine Rolle in der Pflanzenzelle……....12

1.6.1 Hohe Flexibilität des Citrat- Zyklus……..14

1.6.2 Die Malat Dehydrogenase……15

1.6.3 Charakterisierung von mitochondrialen MDH *knockout*- Mutanten……16

1.7 *Bioengeneering* von Nutzpflanzen zur Verbesserung der photosynthetischen Effizienz……17

1.7.1 C3 Pflanzen sollen C4 Charakteristika erhalten……18

1.7.2 Manipulationen des photorespiratorischen Stoffwechselweges……18

1.8 Vorarbeiten……...20

1.8.1 Biotechnologischer Ansatz zur Erhöhung der Biomasseproduktion……..20

1.8.2 Vorarbeiten zur Etablierung des GMK- Stoffwechselwegs……21

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit……25

2. Material und Methoden……27

2.1 Material……...27

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien……..27

2.1.2 Geräte……27

2.1.3 Liste der verwendeten Oligonukleotide……27

2.2 Methoden zur Pflanzenzucht……..28

2.2.1 Pflanzenmaterial……28

2.2.2 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde……..29

2.2.3 Anzucht von *A. thaliana* im Gewächshaus……30

2.2.4 Anzucht von *A. thaliana* in Klimakammern……..30

2.2.5 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*- Samen……31

2.2.6 Anzucht und Selektion von *A. thaliana* auf Agar- Platten……..31

2.2.7 Probennahme von Pflanzenmaterial……....31

2.2.8 Transformation von *A. thaliana* durch Vakuuminflitration……..31

2.2.9 Selektion transgener *A. thaliana*-Überexpressoren und T-DNA Mutanten……....32

2.2.10 Kreuzen von *A. thaliana*- Pflanzen……..33

2.3 Messungen grundlegender, phänotypischer Charakteristika……33

2.3.1 Frisch- und Trockengewicht……33

2.3.2 Blattrosettendurchmesser……33
2.3.3 Bestimmung der Blattanzahl……..34
2.3.4 Oberflächenmaß der Blattrosette……..34
2.4 Mikrobiologische Methoden……34
2.4.1 Verwendeter *Escherichia coli* Stamm und dessen Anzucht……..34
2.4.2 Herstellung TSS-kompetenter *E.coli*……..35
2.4.3 Transformation TSS-kompetenter *E.coli*……..35
2.4.4 Verwendeter Agrobacterium tumefaciens Stamm und dessen Anzucht……..35
2.4.5 Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*……..36
2.4.6 Elektrotransformation von *A. tumefaciens*……37
2.5 Molekularbiologische Methoden……37
2.5.1 Plasmid-DNA- Isolation aus *E.coli*……37
2.5.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzengewebe……..38
2.5.3 Isolation von RNA aus Pflanzengewebe……..38
2.5.4 DNAse Verdau……39
2.5.5. Elektrophorese von DNA……39
2.5.6 Quantifizierungsmethoden von DNA und RNA……40
2.5.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen……41
2.5.8 Dephosphorylierung von DNA……41
2.5.9 Ligation von DNA Fragmenten……41
2.5.10 Die Polymerase Kettenreaktion……42
2.5.11 Colony- PCR……43
2.5.12 Sequenzierung eines DNA- Abschnitts……..43
2.5.13 cDNA Synthese mittels Reverser Transkription……43
2.5.14 Semi- quantitative PCR……43
2.6 Verwendete Vektoren und deren Herstellung……..44
2.6.1 Verwendete Vektoren……..44
2.6.2 Klonierung der Glykolat Dehydrogenase……..44
2.7 Proteinbiochemie……..44
2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration……..44
2.7.2 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese……..45
2.7.3 Proteingelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue……..46
2.7.4 Messung der NAD- ME Enzymaktivität in Blattextrakten……47
2.7.5 Messung der GlcDH Enzymaktivität in Blattextrakten……48
2.8 Bestimmung photosynthetischer Parameter……49
2.8.1 Bestimmung der CO_2- Assimilationsrate……..49
2.8.2 Puls- Amplituden- Modulations- Fluorometrie……..49
2.9 Messung der Gehalte physiologisch interessanter Substanzen……..49
2.9.1 Chlorophylle und Carotinoide……..49
2.9.2 Bestimmung der löslichen Zucker……..50
2.9.3 Elementar Analyse……51

2.9.4 Umfangreiche Analyse des Primärmetabolismus mittels GC- MS……51
2.9.4.1 Extraktion und Probenvorbereitung……...52
…….2.9.4.2 Gaschromatografie……...52
…….2.9.4.3 Varianten der GC- MS Analyse……..53
2.10 Histologische, histochemische und mikroskopische Methoden……..53
2.10.1 Messung des Blattquerschnitts von Blättern……..53
2.10.2 Handschnitte von Blättern……54
2.11 Statistische Methoden und Berechnungen……54
2.11.1 Standardabweichung……54
2.11.2 Standardfehler……54
2.11.3 Student's t-Test……...55
2.11.4 Erstellung der *Heat Map* ……...55
3. Ergebnisse……..56
3.1 Der chloroplastidäre, katabolische Glykolat Stoffwechselweg……..56
3.1.1 Analyse des Phänotyps und der Biomasseproduktion……56
3.1.2 Analyse der Blattstruktur……..57
3.1.3 Analyse der Blattpigmente……..59
3.1.4 Bestimmung der CO2 Assimilationsraten und wichtiger photosynthetischer…
Eigenschaften der GMK Pflanzen……60
3.1.5 Die Charakteristika des Primärmetabolismus der GMK Pflanzen……62
3.2 Der optimierte Stoffwechselweg……65
3.2.1 Klonierung der Glykolat Dehydrogenase aus *Micromonas sp*. ……66
3.2.2 Etablierung transgener GlcDH Überexpressionslinien……67
3.2.3 Phänotypisierung der transgenen, homozygoten GlcDHm Pflanzen……...69
3.3 Untersuchungen des mitochondrialen Malat Metabolismus in der C3 Modellpflanze *A. thaliana*……73
3.3.1 Isolation von T-DNA Insertionsmutanten und Herstellung von Mehrfachmutanten der Malat- Respiration im Mitochondrium……..73
3.3.1.1 Aktivität des NAD-Malat Enzyms……78
3.3.2 Der Phänotyp der T-DNA Insertionslinien unter Langtagbedingungen……...79
3.3.3 Der Phänotyp der T-DNA Insertionslinien unter Kurztagbedingungen……81
3.3.4 Analyse der Blattpigmente……84
3.3.5 PAM-Fluorometrie zur Bestimmung der Photosynthese- Leistung……...86
3.3.6 Saccharose Fütterung……..87
3.3.7 Die Analyse von Intermediaten des Primärmetabolismus……..89
3.3.7.1 Metabolisches Profil via GC-MS Analyse……..91
4 Diskussion……98
4.1 Anwendung von artifiziellen Stoffwechselwegen zur Verbesserung der photosynthetischen Effizienz……...98
4.1.1 Auswirkungen des chloroplastidären, katabolischen Glykolat Stoffwechselwegs……..98
4.1.1.1 Auswirkungen der erhöhten Assimilationsrate auf den Primärmetabolismus……102

4.1.1.2 Findet Fluss durch den GMK Stoffwechselweg statt?.....103
4.1.1.3 Wachstumsvorteil durch erhöhte Assimilationsrate……...103
4.1.2 Verbesserungen des GMK Stoffwechselwegs……...104
4.1.3 Ausblick und Fazit……...105
4.2 Untersuchungen des Malat Metabolismus in Mitochondrien der C3 Modellpflanze *A. thaliana*……...106
4.2.1 Der lichtabhängige Kurztagphänotyp……106
4.2.2 Was ist die Ursache des lichtabhängigen Phänotyps……107
4.2.3 Veränderungen des Malat- Metabolismus der Mutanten……..110
4.2.4 Mögliche *carbon starvation* in den kombinierten Mehrfachmutanten……..111
4.2.5 Definierte Rolle des NAD-ME……113
4.2.6 Fazit……115
5. Zusammenfassung……..116
6. Appendix……118
6.1 Genkarten……118
6.2 T-DNA Insertionslinien und generierte Kreuzungen……...119
6.3 Genotypisierung der Tripelmutante *mmdh 1 * nad-me 1 .2 * 2.3*……119
6.4 Adulte Pflanzen aus Langtaganzucht……120
6.5 Vergleich von *mmdh 1 * nad-me 2.2 und mmdh 1 * nad-me 2.3*……120
6.6 GC- MS Analyse der T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp……120
7. Abstract……..125
8. Literaturverzeichnis……127
Erklärung……146
9. Formalia und Danksagung……147
9.1 Publikationen und Teilpublikationen……147
9.2 Danksagung……148
Lebenslauf……..149

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
½ MS	halbkonzentriertes MS-Medium
α	alpha
Abb.	Abbildung
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosintriphosphat
BASTA	ein systemisch wirksames Herbizid auf Basis von Glufosinat
Bzw.	beziehungsweise
dest	destilliert
d.h.	das heißt
β	beta
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
Γ	gamma; CO_2 Kompensationspunkt
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CAM	Crassulaceen- Säurestoffwechsel
CaMV	*Cauliflower mosaic virus*
cDNA	*copy*DNA
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Col-0	Columbia Ökotyp v. *Arabidopsis thaliana*
C3	C3 Photosynthese
C4	C4 Photosynthese
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DCIP	Dichlorphenolindophenol
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	*et alii*, lateinisch „und andere“
FAD^+	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidiere Form)
FADH2	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FeS	Eisenschwefel

FG	Frischgewicht
fv	*forward*, vorwärts
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GlcDH	Glykolat Dehydrogenase
GMK	Glykolat Oxidase- Malat Synthase- Katalase Stoffwechselweg
GO	Glykolat Oxidase
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2PO_4	Dihydrogenphosphat
Hac	Essigsäure
HCl	Salzsäure
Kat	Katalase
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	konzentrierte
λ	Lambda
LB	*Left Border*
LB	Luria/Bertani (Medium für Bakterienkultur)
µ	mikro-
µE	µmol (Photonen) m^{-2} s^{-1} (= mikro-Einstein)
µl	mikroliter
M	Molar (mol/l)
m	milli-
m	meter
m	mitochondrial
mA	Milliampere
MDH	Malat Dehydrogenase
ME	Malat Enzym
MES	4-Morpholinoethan-Sulfonsäure
mg	milligramm
ml	milliliter
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
$MnCl^2$	Mangan(II)-chlorid
mol	Mol; Stoffmenge
mRNA	*messenger*RNA
MS	Massenspektroskopie
MS-Medium	Murashige & Skoog-Medium

n	nano
N	Stickstoff
NAD^+	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadeninnukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadeninnukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaOH	Natrium Hydroxid
ng	nanogramm
NH_{4+}	Ammonium
nm	Nanometer
NUE	Stickstoffnutzungseffizienz
O_2	Sauerstoff
OAA	Oxalacetat
ORF	offener Leserahmen
p	piko
PAM	Puls Amplituden Fluorometrie
2- PG	2- Phosphoglykolat
3- PGA	3- Phosphoglycerat
Pi	organisches Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFD	Photonenflussdichte
Pfu	DNA-Polymerase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RB	*Right Border*
rbS3C	kleine RubisCO Untereinheit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomaleRNA
RT	Raumtemperatur
RT	*Retentiontime* – Retentionszeit
RT	Reverse Transkription
RT	*real time*, Echtzeit
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase
rv	*reverse*, rückwärts
s.	siehe
SAP	*Shrimps* Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat

S. lycopersicum	*Solanum lycopersicum*
sq	semi- quantitativ
T1, 2 , 3	transgene Generation 1 , 2 , 3
Taq	DNA-Polymerase
TCA	Citrat- Zyklus
TP	Transitpeptid
TPP	Tetraphenylporphyrin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UN	Vereinte Nationen
UV	Ultraviolett
V	Volumen
vgl.	vergleiche
V_{MAX}	Maximale Geschwindigkeit
v/ v	Volumen pro Volumen
w/ w	Gewicht pro Gewicht
w/ v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
WUE	Wassernutzungseffizienz

1 Einleitung

1.1 Carboxylierung und Decarboxylierung: die Kernmechanismen des pflanzlichen Kohlenstoff-Stoffwechsels

Der Prozess der Photosynthese ist sowohl für das Wachstum und das Überleben der Pflanze, als auch für das Leben auf der Erde generell unentbehrlich. Pflanzen nutzen Photonen, um diese in chemische Energie umzusetzen, welche für die Kohlenstoff-Fixierung genutzt wird. Kohlenstoff ist für die Pflanzen ein Hauptelement, die Pflanzentrockenmasse besteht zu 45% aus Kohlenstoff, welcher mit Hilfe der Photosynthese fixiert wurde (Ho, 1976; Marschner, 1995). Ein Großteil des in Organismen und fossilen Brennträgern gebundenen Kohlenstoffs wurde durch die Carboxylierungsreaktion der Photosynthese assimiliert, anschließend reduziert und in höhermolekulare organische Verbindungen wie Kohlenhydrate, Fette und Proteine integriert. Unter gleichzeitigem Ausstoß von Sauerstoff wird der Kohlenstoff aus der Atmosphäre aufgenommen, so dass pflanzliche Ökosysteme einen großen Beitrag zur Bildung der Atmosphäre und dem globalen Kohlenstoff-Zyklus leisten.
Ein Großteil der Kohlenhydrate, welcher durch die Primärproduktion der Pflanze hergestellt wird, unterliegt in gleichem Maße einem Abbau durch die Respiration, mit dem Ziel gespeicherte Energie für Stoffwechselvorgänge zu gewinnen. In diesem Zusammenhang sind Decarboxylierungsreaktionen, die Kohlenstoff wieder entlassen, ein essentieller Prozess des Katabolismus, in dem Nährstoffe als Energiequelle für biologische Zellen und Organismen dienen.
Im Rahmen der folgenden Dissertation werden Stoffwechselwege der Carboxylierung und Decarboxylierung in Pflanzen näher untersucht.

1.2 Der pflanzliche, photosynthetische Kohlenstoff- Stoffwechsel

Der pflanzliche, photosynthetische Kohlenstoff-Stoffwechsel besteht aus zwei coexistierenden Stoffwechselwegen. Zum einen aus dem photosynthetischen, reduktiven Kohlenstoff-Stoffwechsel, der auch als C3 oder Calvin-Zyklus bekannt ist und der aus Lichtenergie chemische gebundene Energie in Form von Triosephosphaten herstellt (Calvin und Massini, 1952). Zum anderen aus dem photosynthetischen, oxidativen Kohlenstoff-Stoffwechsel, der auch als Photorespiration oder C2 Metabolismus bezeichnet wird (Tolbert, 1997). Beide Stoffwechselwege werden durch das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase (RubisCO) eingeleitet (s. Abb. 1; Tolbert, 1997). Photorespiration findet in allen Organismen mit oxygener Photosynthese statt, da die RubisCO nicht zwischen CO_2 und O_2 diskriminieren kann (Andersson, 2008). Zu den Organismen mit photorespiratorischem Stoffwechsel zählen Cyanobakterien, Algen und

höhere Pflanzen, wobei die Photorespiration unter letzteren ausnahmslos in C3 und auch C4 Pflanzen stattfindet (Tian *et al*., 2006; Eisennhut *et al*., 2008, Bauwe *et al*., 2010 und 2012; Zelitch *et al*., 2009).

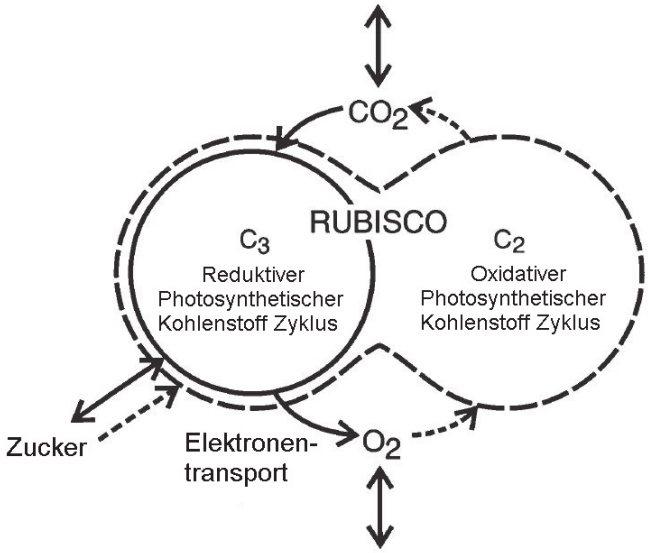

Abbildung 1: Schematische Darstellung des photosynthetischen C2- und des coexistierenden C3- Kohlenstoff-Metabolismus in Pflanzen. Verändert nach Tolbert, 1997.

Das Verhältnis von Carboxylierung zu Oxygenierung der RubisCO ist abhängig von der CO_2 zu O_2 Konzentrationen, der Michaelis-Menten Konstante für diese Gase (K_O und K_C) und der maximalen Geschwindigkeit (V_O und V_C) (Farquar *et al*., 1980). In der Erdatmosphäre mit 21% O_2 und 0,04% CO_2 bei 25°C bindet im Schnitt jedes dritte Mal ein O_2 an das aktive Zentrum der RubisCO (entweder O_2 aus der Atmosphäre oder O_2 welches am Photosystem II gebildet wurde) und somit wird eine Oxygenierung hervorgerufen (Bauwe *et al*., 2012). Etwa 35% aller RubisCO Reaktionen sind demnach Oxygenase Reaktionen mit dem Substrat Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP; Sharkey, 1988). Die Oxygenierung produziert 1 Molekül 3-Phosphoglycerat (3-PGA) und ein Molekül 2-Phosphoglykolat (2-PG). 2-PG geht nicht in den Calvin-Benson- Zyklus ein, es ist für die Pflanzen ein toxisches Metabolit, da es Enzyme des Calvin-Benson- Zyklus hemmt (Anderson, 1971; Kelly und Latzko 1976). Durch den photorespiratorischen Stoffwechselweg wird das 2-PG weiter metabolisiert und somit detoxifiziert, wobei aber Kohlenstoff verloren geht (s. 1.3; Maurino und Peterhänsel, 2010).

Mit zunehmender Temperatur steigt die Konzentration von O_2 an der RubisCO, da die CO_2 Konzentration in einer Lösung mit steigender Temperatur schneller abnimmt als die O_2 Konzentration (Brooks und Farquar, 1985). Demnach begünstigen Wärme und Trockenheit die Oxygenierungsreaktion und unter solchen Bedingungen kann die CO_2 Assimilation (Carboxylierung) daher um bis zu 50% zurückgehen (Leegood *et al*., 1995). Die photosynthetische CO_2 Assimilation bestimmt das Pflanzenwachstum und letztlich den

Ertrag einer Pflanze. Durch den kompetitiven Prozess der beschriebenen Photorespiration ist die CO_2 Assimilation limitierend für die Biomasseproduktion (Kahn, 2007). Daher ist die photosynthetische Effizienz einer der Hauptfaktoren der Pflanze, welcher die Produktivität an Biomasse erhöhen kann, wenn andere Faktoren nicht limitierend sind (von Caemmerer und Evans, 2010). Dies erschließt auch das Interesse an diesem Thema in der folgenden Arbeit.

1.3 Der photorespiratorische Stoffwechselweg höherer Pflanzen

Durch die Oxygenase-Reaktion der RubisCO entsteht ein Moleküle 3-PGA und ein Molekül 2-PG. Es gehen stöchiometrisch gesehen zwei Moleküle 2-PG in den photorespiratorischen Stoffwechselweg ein (Tolbert, 1997). Der Stoffwechselweg ist für die Rückgewinnung von einem Molekül 3-Phosphoglycerat aus zwei entstandenen 2-PG Molekülen zuständig und besteht aus enzymatischen Reaktionen und notwendigen Transportprozessen, die in vier Kompartimenten der Pflanzenzelle, dem Chloroplasten, dem Peroxisom, dem Mitochondrium sowie dem Cytosol stattfinden (s. Abb. 2; Maurino und Peterhänsel, 2010). Zu Beginn wird das 2-PG durch die Phosphoglykolat-Phosphatase dephosphoryliert, wobei ein Molekül Glykolat entsteht (Christeller *et al*., 1978; Schwarte und Bauwe, 2007). Durch einen bisher nicht identifizierten Glykolat/ Glycerat Antiporter wird das Intermediat in das Peroxisom transportiert, wo es von der Glykolat Oxidase (GO) zu Glyoxylat oxidiert wird. Es entsteht dabei Wasserstoffperoxid (H_2O_2; Maurino und Peterhänsel, 2010). Dieses H_2O_2 wird dort durch eine plastidäre Katalase detoxifiziert (Queval *et al*., 2007). Glyoxylat wird im Folgenden durch die Enzymreaktionen, mit der Glutamat: Glyoxylat Aminotransferase, welche Glutamat als Aminodonor benutzt, zu Glycin transaminiert (Liepman und Olsen 2001 und 2003; Igarashi *et al*., 2003 und 2006). Glycin wird ins Mitochondrium transportiert und durch den Multienzymkomplex Glycindecarboxylase (GDC) und die Hydroxymethyl-Transferase 1 (SHMT1) verstoffwechselt, wobei Serin entsteht (Somerville und Ogren, 1981; Voll *et al*., 2006; Engel *et al*., 2007). Im Verlauf dieser Reaktion werden Ammonium und CO_2 freigesetzt, NAD^+ wird zu NADH reduziert, und es entsteht Methylentetrahydrofolat. Das in der mitochondrialen Matrix freigewordene Ammonium wird im Chloroplasten durch den Glutamin-Synthetase/ Ferredoxin-abhängige Glutamat:Oxoglutarat Aminotransferase- Zyklus (GD/ Fd-GOGAT– Zyklus) refixiert (Jamai *et al*., 2009). Der Austausch von Glutamat und 2-Oxoglutarat, welches für den GS/ Fd-GOGAT- Zyklus benötigt wird, findet an der inneren Chloroplastenmembran durch die Dicarboxylat Translokatoren 1 und 2 (DiT1 und DiT2) im Gegentausch mit Malat statt (Weber *et al*., 1995; Taniguchi *et al*., 2002; Renne *et al*., 2003). Die Reassimilation des durch die Photorespiration freigesetzten Ammoniums ist für den Stickstoffhaushalt der Pflanze essentiell (Leegood *et al.,* 1995). Die Reaktionen des GDC- Komplex sind ebenfalls

notwendig für die Pflanze, da die Reaktion über das Methylen-Tetrahydrofolat direkt mit dem 1-Kohlenstoff- Stoffwechsel (1C) verknüpft ist. Dies wird durch die Letalität von *knockout* Mutanten, die in beiden P- Proteinen des Komplexes defekt sind gezeigt (Engel *et al*., 2007). Als Intermediat der Photorespiration wird das von der SHMT1 produzierte Serin in die Peroxisomen transportiert. Dort wird es durch die Serin: Glyoxylat Aminotransferase, die Serin als Aminodonor preferiert, zu Hydroxypyruvat deaminiert (Liepmann und Olsen, 2001) und weiter durch das Enzym Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) 1 (Timm *et a*l., 2008) zu Glycerat reduziert. Diese Reaktion kann durch die HPR2 im Cytosol umgangen werden, indem Hydroxypyruvat ins Cytosol transportiert wird (Timm *et al.,* 2008). Schließlich wird das Glycerat in die Chloroplasten transportiert, wo es durch die Glycerat-Kinase zu 3PGA phosphoryliert wird (Boldt *et al*., 2005) und in den Calvin-Benson Zyklus eingespeist werden kann. Der jüngste für diesen Transportprozess identifizierte Transporter ist ein chloroplastidärer Glycerat/ Glykolat Translokator (PLGG1) (Pick *et al*., 2013).

Zusammenfassend wird durch die Photorespiration die photosynthetische Effizienz erniedrigt, da CO_2 und Ammonium reassimiliert werden müssen, wobei ATP und Reduktionsäquivalente verbraucht werden (Leegood *et al*., 1995).

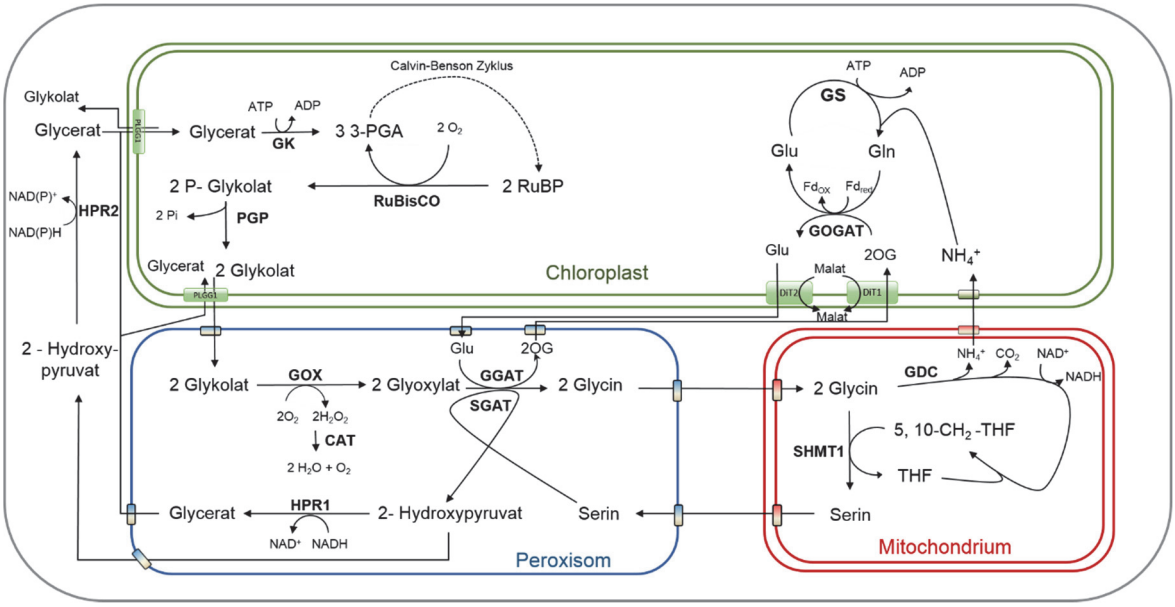

Abbildung 2: Schematische Darstellung des photorespiratorischen Kohlenstoff- und Stickstoff- Zyklus einer C3 Pflanze. Die aufgezeigten Enzyme sind fett gedruckt und heißen wie folgt: PGP: Phosphoglykolat Phosphatase; RubisCO: Ribulose-1,3-Bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase; GOX: Glykolat Oxidase; CAT: Katalase; GGAT: Glutamat-Glyoxylat Aminotransferase; SGAT: Serin-Glutamat Aminotransferase; HPR1: Hydroxypyruvat Reduktase 1; SHMT1: Serine-Hydroxymethyl Transferase 1; HPR2: Hydroxypyruvat Reduktase 2; GDC: Glycin Decarboxylase; GOGAT: Glutamat-Oxoglutarat Aminotransferase; GS: Glutamin Synthetase; GK: Glycerat Kinase. Verändert nach Maurino und Peterhänsel, 2010.

1.4 Bedeutung und Nutzen der Photorespiration

Durch die in 1.3 aufgeführten Verknüpfungspunkte von Photorespiration und Primärmetabolismus wird deutlich, dass die Photorespiration essentiell für die Pflanze ist. 2-PG, das Produkt der Oxygenierungsreaktion der RubisCO, inhibiert Calvin-Benson-Zyklus Enzyme und so könnte im weiteren Verlauf die Photosynthese kollabieren (Anderson 1971; Kelly und Latzko 1967; Bauwe *et al*., 2012). Die Regeneration durch die Photorespiration erlaubt es, dass der Calvin-Benson-Zyklus und dadurch die Photosynthese in einer sauerstoffreichen Umgebung funktionieren (Bauwe *et al*., 2012). Die Hauptaufgabe der Photorespiration besteht darin, ¾ des durch den Eingang in den oxidativen, photosynthetischen Kohlenstoff-Stoffwechsel verlorengegangenen Kohlenstoffs wieder zu regenerieren. Zwei Moleküle 2-PG werden zu einem Molekül CO_2 und einem Molekül 3-PGA verstoffwechselt. Letzteres wird benutzt, um RuBP zu regenerieren, was ohne eine netto Synthese von Triosephosphaten stattfindet (Douce und Neuburger, 1999; Wingler *et al*, 2000). Da im Verlauf Reduktionsäquivalente und ATP verbraucht werden, kann der Stoffwechselweg als Sicherheitsventil überschüssige Energie abgreifen und so vor Photoinhibition schützen (Osmond 1995). Außerdem werden Metabolite hergestellt, wie Glycin und Serin, die im Blatt weitertransportiert werden können (Madore & Grodzinksi, 1984) und in anderen Stoffwechselwegen verwendet werden, wie im Falle von Glycin, welches für die Synthese von Glutathion wichtig ist (Noctor *et al*., 2011). Da Glutathion im Antioxidant- System wirkt, ist die Photorespiration indirekt am Schutz vor photooxidativen und oxidativen Schäden beteiligt (Noctor *et al*., 1998).

Die essentielle Bedeutung des photorespiratorischen Stoffwechselweges konnte besonders deutlich in Experimenten mit *knockout* Pflanzen gezeigt werden, die in Enzymen des Hauptweges defizient waren und alle einen photorespiratorischen Phänotyp aufwiesen. Für ein normales Wachstum dieser Pflanzen wurden nicht-photorespiratorische Konditionen benötigt, d.h. eine hoch-CO_2 Umgebung da diese sonst nicht lebensfähig waren (Somerville & Ogren, 1979; Sommerville 2001; Timm und Bauwe, 2013). Ein weiteres unterstützendes Argumente für eine Notwendigkeit der Photorespiration wurden in der C4 Pflanze *Z. mays* gefunden (Zelitch *et al*., 2009). Hier zeigte eine *GO Antisense*-Pflanze einen photorespiratorischen Phänotyp. Die Notwendigkeit der Photorespiration für alle oxygenen Organismen bestätigte außerdem die Arbeit mit Cyanobakterien (Eisenhut *et al*., 2006). Durch die systematische Inaktivierung von Genen, welche Homologe des pflanzlichen C2-Stoffwechselwegs und Homologe des bakteriellen Glycerat-Stoffwechselwegs darstellten, wurde gezeigt, dass Cyanobakterien zur Verstoffwechslung von 2-PG beide Routen benötigten.

1.5 Evolutive Anpassung an erhöhte Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre

Als Ursprung der Photorespiration wird eine Co-Evolution mit der Photosynthese postuliert, welche vor circa 3,5 Milliarden Jahren in Cyanobakterien begann (Kern *et al*., 2011; Eisenhut *et al*., 2008; Gould *et al*., 2008). Die Evolution der Algen und höheren Pflanzen begann vor rund 1,5 Milliarden Jahren durch die primäre Endocytobiose bei der ein Cyanobakterium durch einen einzelligen, heterotrophen Protisten aufgenommen wurde (Reyes-Prieto *et al*., 2007). Die ursprünglichen Faktoren der Photorespiration der höheren Pflanzen, wie auch die Photosynthese, wurden ebenfalls durch diese Endosymbiose weitergegeben (Eisenhut *et al*., 2008; Kern *et al*., 2011). Die atmosphärische CO_2 Konzentration war vor 3,5 Milliarden Jahren höher als heutzutage, die O_2 Konzentration niedriger und die RubisCO konnte CO_2 saturiert arbeiten (Badger und Price, 2003; Whitney *et al*., 2011). Hierdurch entwickelte sich eine sauerstoffreiche Atmosphäre und die katalytischen Limitierungen der RubisCO wurden dadurch sehr bedeutend (Bauwe *et al*., 2012). Damit einhergehend gab es zwei große evolutive Anpassungsmechanismen an die ansteigenden Sauerstoffkonzentrationen in der Atmosphäre (Price *et al*., 2012). Zum einen verbesserte sich die RubisCO vor allem in Landpflanzen in ihrer CO_2-Affinität und O_2 - Diskriminierung (Badger *et al*., 1998). Ein weiterer Anpassungsmechanismus war die Entwicklung von unterschiedlichen Kohlenstoff- Konzentrierungs- Mechanismen (CCM), um die Carboxylierungs-Reaktion stark zu erhöhen. Dies wurde durch eine Erhöhung des CO_2/ O_2 Verhältnisses am Ort der RubisCO erreicht (Badger *et al*., 1998; Price *et al*., 2008; Kern *et al*., 2012; Raven *et al*., 2008). Das wiederrum erhöht die netto Kohlenstoffassimilation und erniedrigt gleichzeitig die Kosten der Photorespiration. Der Fluss durch den photorespiratorischen Stoffwechselweg wird durch diese Anpassungen nur reduziert, nicht verhindert.

Ein solcher CCM hat sich in Cyanobakterien entwickelt und umfasst eine hochaffine Aufnahme von CO_2 und Bicarbonat. Vorfixiertes Bicarbonat wird durch die Carboanhydrase zu CO_2 umgewandelt, die zusammen mit der RubisCO konzentriert in Carboxysomen vorliegt. Dies ist ein Mikrokompartiment, welches aus einem Polyeder aus Proteinen besteht und in dem sich eine bis 1000-fach höhere CO_2 Konzentration um die RubisCO entwickeln kann (Badger *et al*., 2003; Kaplan und Reinhold 1999; Price *et al*., 2008). Algen hingegen bilden Pyrenoide (Giordano *et al*., 2005). Es handelt sich um elektronen-dichte, semi-kristalline Proteinaggregate in den Chloroplasten, in denen ebenfalls die RubisCO lokalisiert ist, deren Mechanismus noch nicht komplett aufgedeckt wurde (Meyer und Griffiths, 2013).

Eine weitere Art der CCMs ist eine Anpassung an trockene und heiße Standorte von höheren Pflanzen, der Crassulaceen-Säurestoffwechsel (CAM, *crassulaceen acid*

metabolism). Die CAM Photosynthese ist eine Anpassung, die Vorteile durch eine zeitliche Trennung der Kohlenstofffixierung erreicht. Die Vorfixierung von CO_2 in einen C4 Körper, Oxalacetat (OAA), findet während der Nacht statt und funktioniert durch eine nachtaktive PEPCarboxylase, welche mit Bicarbonat und Phosphoenolpyruvat reagiert (Ting, 1985; Lüttge, 2004). Hierbei sind die Stomata der Pflanze geöffnet. Die C4 Säure Malat fungiert als Zwischenspeichermolekül in der Vakuole, was den Säuregehalt der Pflanze ansteigen lässt (Ranson und Thomas; 1960). Tagsüber, also zeitlich getrennt, wird dann Malat decarboxyliert und das CO_2 kann über die RubisCO in den Calvin Zyklus eintreten (Ting, 1985). Die CAM Photosynthese zeichnet sich durch eine drastisch erhöhte Wassernutzungseffizienz aus. Es gibt circa tausend CAM Pflanzen Spezies, in 25-30 Pflanzenfamilien (Kluge und Ting, 1978). Die CAM Pflanzen werden abhängig von ihren Decarboxylasen in Subtypen unterteilt. So gibt es NAD-Malat Enzym (NAD-ME), NADP-Malat Enzym und PEP-Carboxykinase Subtypen der CAM Photosynthese (PEPCK; Hatch *et al*., 1970; Lüttge, 2004).

Ein weiterer Mechanismus der CO_2 Anreicherung hat sich in den C4 Pflanzen entwickelt. Diese Anpassung ist hoch effizient und sehr komplex (Sage, 2004). Hier entwickelten sich biochemische und anatomische Eigenschaften, die mit dem initiierenden Enzym, der Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEP-C) als primäres Carboxylierungsenzym eine CO_2 Pumpe formten (Sage, 2004), welche CO_2 an dem Ort der RubisCO anreichert. Es findet demnach eine räumliche Trennung von CO_2 Vorfixierung (Mesophyll-Zellen) und finaler Fixierung statt (Bündel-Scheide-Zellen). Als Speicher- und Transportmolekül fungieren C4 Säuren, welche decarboxyliert werden. Hierzu wurden drei verschiedene Decarboxylasen (NADP-Malat-Enzym, NAD-ME und PEP-Carboxykinase) identifiziert (Drincovich *et al*., 2011; Maier *et al*., 2011). Die Decarboxylasen und die PEP- Carboxykinase entwickelten sich nicht *de novo*, sie besaßen *housekeeping* Aufgaben im Metabolismus und wurden dann für photosynthetische Aufgaben in der C4 Photosynthese rekrutiert, wobei sie neue Charakteristika entwickelten, die für die Bedürfnisse der C4 Photosynthese passender waren. Diese neuen orthologen C4 Enzyme erlangten veränderte, zell-spezifische Genexpressionen sowie veränderte kinetische Eigenschaften (Aubry *et al*., 2011; Gowik und Westhoff, 2011; Sage, 2004). Das Ziel all dieser Anpassungen war dasselbe, es sollte CO_2 am Ort der RubisCO angereichert werden und zu einer effizienten Kohlenstoff-Fixierung verhelfen. Bisher sind 60 unabhängige Entstehungen der C4 Photosynthese in Angiospermen bekannt (Sage *et al*., 2012). In C4 Pflanzen arbeitet die RubisCO nahe an ihrer maximalen Geschwindigkeit (V_{max}). Die C4 Pflanzen zeichnen sich durch eine erhöhte Assimilationsrate, eine ökonomischere Wassernutzungseffizienz (WUE *water use efficiency*) und verbesserte Stickstoffnutzungseffizienz (NUE *nitrogen use efficiency*) aus (Sage, 2004). Diese Vorteile machen die C4 Photosynthese heute zu einem Gebiet,

welches intensiver Forschung unterliegt. Kürzlich wurde gezeigt, dass sich die Evolution der C4 Photosynthese vorhersagen lässt (Heckmann *et al*., 2013). Biochemische Anpassungen können und konnten evolutiv wiederholt werden, da die evolutive Anpassung in einzelnen Schritten geschieht (Heckmann *et al*., 2013). Aus diesem Grund ist es von großem Interesse die einzelnen Schritte dieser Anpassungen zu verstehen, um sie für mögliche *Bioengineering*- Ziele zu verwenden (s. 1.7.1). So ist ein vorrangiges Ziel der hier vorgestellten Arbeit, grundlegende Mechanismen zur Verbesserung der Kohlenstoff-Fixierung in Pflanzen zu analysieren, und im Speziellen, die Rekrutierung des NAD-Malat Enzyms in die C4 Photosynthese besser zu verstehen (s. 1.9).

1.5.1 Der Subtyp der NAD-ME C4 Photosynthese

Die evolutiven Anpassungen der Enzyme NADP-ME und PEPCK, welche den Subtyp der C4 Photosynthese unterstützen, wurden in den vergangenen Jahren intensiv untersucht (Furumoto *et al*., 1999; Wingler *et al*., 1999; Calsa und Filgueira, 2007; Muhaidat *et al*., 2007; Drincovich *et al*., 2011; Saigo *et al*., 2013). Über die Rekrutierung des NAD-ME in die C4 Photosynthese ist noch nicht viel bekannt, dieser C4 Subtyp ist jedoch von wissenschaftlichen und wirtschaftlichem Interesse, da i) Vertreter des C4 Photosynthese-Subtyps in *C. gynandra* nahe Verwandte der Modellpflanze *A. thaliana* sind (Brown *et al*., 2005) und ii) wirtschaftlich wichtige Nutzpflanzen wie *P. virgatum* unter den Vertretern dieses Subtyps sind (Brutnell, *et al*., 2010).

Der NAD-ME Typ der C4 Photosynthese beinhaltet eine Vorfixierung von HCO_3^- in Form des OAA (Sage, 2004). Diese C4 Säure wird durch eine OAA: Aspartat Aminotransferase (AspAT) die Glutamat als Aminodonor verwendet, zu Aspartat umgewandelt. Aspartat wird zu den Bündelscheidezellen und dort zu den Mitochondrien transportiert. Hier verwandelt die mitochondriale AspAT das Molekül zu OAA zurück. Die mitochondriale Malat Dehydrogenase reduziert OAA zu Malat, welches im entscheidenden enzymatischen Schritt durch das NAD-Malat Enzym oxidativ decarboxyliert wird. Diese Reaktion setzt ein NADH, Pyruvat und ein Molekül CO_2 frei. CO_2 kann in den Calvin Zyklus in den Bündelscheidezellen Chloroplasten eingespeist werden. Pyruvat verlässt das Mitochondrium und wird von der cytosolischen Alanin Aminotransferase (AlaAT) zu Alanin in den Bündelscheidezellen aminiert. Dieses Molekül tritt in die Mesophyllzellen ein und wird dort durch eine AlaAT zu Pyruvat deaminiert. Das Pyruvat ist notwendig, um den Akzeptor PEP zu regenerieren. Wichtig zu erwähnen ist bei diesem C4 Subtyp, dass das Aspartat/ Alanin Shuttle zwischen Mesophyll Zellen und Bündelscheidezellen die Balance der Aminogruppen aufrecht hält (Edwards und Walker, 1983; Sage, 2004).

Die Frage, wie das NAD-ME in die neue photosynthetische Rolle rekrutiert wurde, wird aktuell mit Hilfe der Pflanzengattung Cleome untersucht, da diese Gattung Spezies mit C3

Photosynthese, intermediärer- und C4 Photosynthese besitzt (Brown *et al*., 2005; Marshall *et al*., 2007). Es ist bekannt, dass die C4 Spezies *C. gynandra* keine zusätzlichen homologen NAD-ME- Isoformen entwickelt hat, so dass das NAD-ME mit der ursprünglichen *housekeeping*- Rolle neue Charakteristika entwickelt haben muss, um die C4 photosynthetische Aufgabe des CO_2- Shuttlings zu erfüllen (Maier *et al*., 2011). Zu diesen Entwicklungen gehören Veränderungen in der Expression durch höhere Transkription und zellart-spezifische Expression (Bräutigam *et al*., 2011; Brown *et al*., 2011), sowie regulatorische Veränderungen (Maier *et al*., 2011). Um evolutionäre, regulatorische Veränderungen *in planta* zu verstehen, ist es notwendig die ursprüngliche *housekeeping* Form des NAD-ME molekular zu charakterisieren.

1.5.2 NAD-abhängiges Malat Enzym

In der C4 Photosynthese des NAD-ME Subtyps reichert das NAD-ME im entscheidenden Decarboxylierungsschritt CO_2 am Ort der RubsiCO an, indem L-Malat zu Pyruvat umgesetzt wird (s. 1.5.1; Sage, 2004). Diese Reaktion wird gleichermaßen von dem C3 *housekeeping* NAD-ME und dem C4 NAD-ME durchgeführt. Generell wird in Pflanzen die enzymatische Oxidation von L-Malat zu Pyruvat unter der Freisetzung von CO_2 durch zwei Klassen von Malat Enzymen katalysiert. Zum einen durch die Klasse der NADP-abhängigen Malat Enzyme (NADP-ME, EC 1.1.1.40) und zum anderen durch die NAD^+-abhängigen Malat Enzyme (NAD-ME, 1.1.1.39 oder 1.1.1.38; Tronconi *et al*., 2008). In Pflanzen fungieren diese Enzyme in unterschiedlichen Kompartimenten. Die NADP-MEs sind im Chloroplasten und Cytosol lokalisiert (Gerrard-Wheeler *et al*., 2005; Maier *et al*., 2011), während das NAD-ME nur in Mitochondrien lokalisiert ist (Winning *et al*., 1994).

Das pflanzliche NAD-ME benutzt $MnCl_2$ als divalenten, metallischen Cofaktor und es besitzt photosynthetische und nicht-photosynthetische Rollen. In C3 Pflanzen ist das NAD-ME ein Multimer, welches aus 2 Untereinheiten besteht, einer α- und einer ß-Einheit, beide sind in 65% in ihrer Aminosäuresequenz identisch und sind immunologisch unterschiedlich (vgl. Abb. 3; Long *et al*., 1994). Eine phylogenetische Analyse zeigte, dass die α- und ß Einheiten in 2 unterschiedliche Proteingruppen gruppieren (Abb. 3; Tronconi *et al*., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass alle alternativen Kombinationen der Proteinassemblierung der Untereinheiten *in vivo* aktiv sind (Tronconi *et al*. 2010).

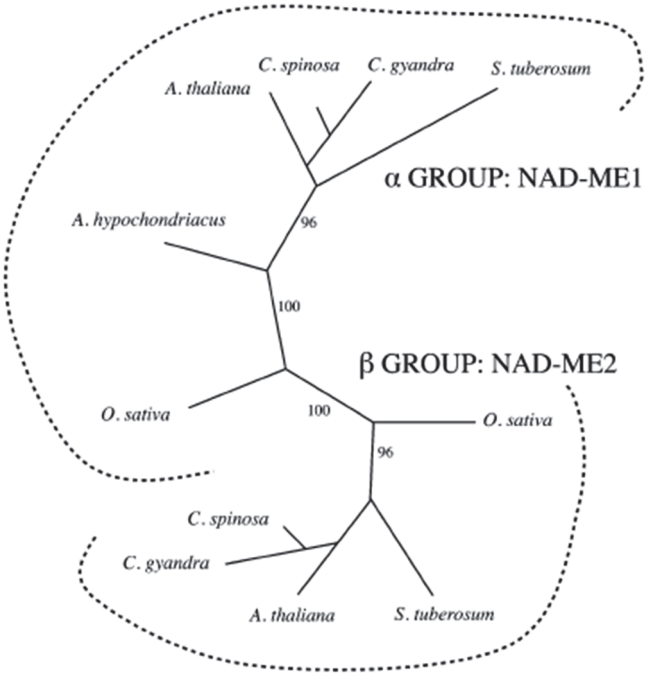

Abbildung 3: Phylogenetischer Verwandtschaftsbaum des NAD-ME in den Organismen *A.thaliana, O.sativa, C.gynandra, C.spinosa, S. tuberosum, A.hypochondriacus*. Entnommen aus Maier *et al*., 2011.

Das NAD-ME weist seine photosynthetische Rolle in bestimmten CAM und C4 Pflanzen auf, indem das NAD-ME durch die Decarboxylierung von Malat CO_2 für den Calvin Zyklus bereit stellt (vgl. 1.5.1; Hatch *et al*., 1975; Artus und Edwards, 1985). In C4 Pflanzen des NAD-ME Subtyps in *C. gynandra* sind die Transkripte des NAD-MEs bis zu 27-fach höher als in der verwandten C3 Pflanze (Bräutigam *et al*., 2011). Es wurden sogar C4 Subtypen mit einer 50-fach erhöhten Enzymaktivität beschrieben (Hatch und Carnal, 1992). Bisher wurden in C4 Pflanzenspezies entweder enzymatische NAD-ME Dimere bestehend aus α- und ß Untereinheiten identifiziert, oder Monomere die nur aus der α Einheit bestehen (Oshugi und Murata, 1980; Murata *et al*., 1989; Long *et al*., 1994). Außerdem wurde eine für die C4 Photosynthese zu erwartende, erhöhte Expression des NAD-ME in den Bündel-Scheide-Zellen von C4 *C. gynandra* bestätigt (Marshall *et al*., 2007).

Die nicht-photosynthetische Rolle des NAD-ME ist eine universelle Rolle in der Respiration von Malat im pflanzlichen Citrat- Zyklus (Grover *et al*., 1981). Durch die Oxidation von Malat kann Pyruvat direkt in den Citrat- Zyklus eingespeist werden. Die Anwesenheit des NAD-ME stellt in pflanzlichen Mitochondrien, im Gegensatz zu anderen Organismen eine Besonderheit dar. Durch die hohen Malat Konzentrationen in Pflanzen ist es naheliegend, dass das Enzym die Aufgabe besitz den Citrat- Zyklus, möglicherweise als zentraler Regulator anaplerotisch zu speisen (Martinoia & Rentsch, 1994; Day und Hanson, 1977; Grover *et al*., 1981). Die genaue physiologische Bedeutung dieser zusätzlichen Einspeisungsmöglichkeit von Pyruvat durch dieses Enzym ist jedoch nicht klar definiert. In

Untersuchungen einer Doppelmutante in *A. thaliana* wurde deutlich, dass das NAD-ME nicht essentiell für das autotrophe Wachstum der Pflanze war, da die Doppelmutante lebensfähig war und keinen organischen Phänotyp zeigte. Es kam jedoch zu Veränderungen in der Verteilung der Metabolite und Aminosäuren des Primärmetabolismus in diesen Mutanten (Tronconi *et al*., 2008). Demnach wurde hier eine Rolle in der Koordination von Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus für das Enzym vermutet (Tronconi *et al*., 2008; Day und Hanson, 1977). Dies könnte in Umständen eines höheren Energiebedarfs wichtig sein, um den Fluss durch den Citrat- Zyklus zu regulieren (Day and Hanson, 1977; Brailsford *et al*., 1986; Hill *et al*., 1994). In Arbeiten mit Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*) wurde die NAD-ME Aktivität über ein Antisense Konstrukt um 40% reduziert. Es konnten keine Veränderung in der Respiration der Kartoffelknollen gemessen werden, jedoch wurde eine leichte Erhöhung im Stärkegehalt der Knollen gefunden, was auf eine definierte organbezogene Rolle in der Kohlenstoff-Verteilung hinweist (Jenner *et al*., 2001).

1.5.3 Analyse von NAD-ME *knockout* Mutanten

A. thaliana besitzt 2 Gene, die für NAD-ME kodieren, der Genlokus At2g13560 kodiert für ein Protein der α-Gruppe mit einer molekularen Masse von 65 kD, und der Lokus At4g00570 kodiert für ein Protein der β-Gruppe mit einer molekularen Masse von 58 kD (Tronconi *et al*., 2008). Beide Gene sind ubiquitär in *A. thaliana* exprimiert (Tronconi *et al*., 2008). Die *knockout* Mutanten der NAD-ME Gene aus *A. thaliana* wurden analysiert und im Falle der *nad-me 1 knockout* Linie sowie der *nad-me 2 knockout* Linie zeigte sich eine Restaktivität der Gesamtaktivität des NAD-ME im Blatt (s. Abb. 4). Dies bestätigte dass die Enzyme *in planta*, basierend auf der Aktivität beider Homodimere aktiv sind. In der *nad-me 1 * 2* Doppelmutante konnte kein starker Phänotyp beobachtet werden, was auf eine metabolische Kompensation des Verlustes schließen lässt und es zeigt, dass das NAD-ME nicht ausschlaggebend für das normale Wachstum ist. Das Malat kann innerhalb des Citrat-Zyklus auch durch die mitochondriale Malat Dehydrogenase (mMDH) metabolisiert werden (Tomaz *et al*., 2011). In Analysen zur Proteinabundanz und Proteinaktivität im Tagesverlauf konnte gezeigt werden, dass das NAD-ME nachts stärker abundant und aktiv ist als am Tag (s. Abb. 4; Tronconi *et al*., 2008).

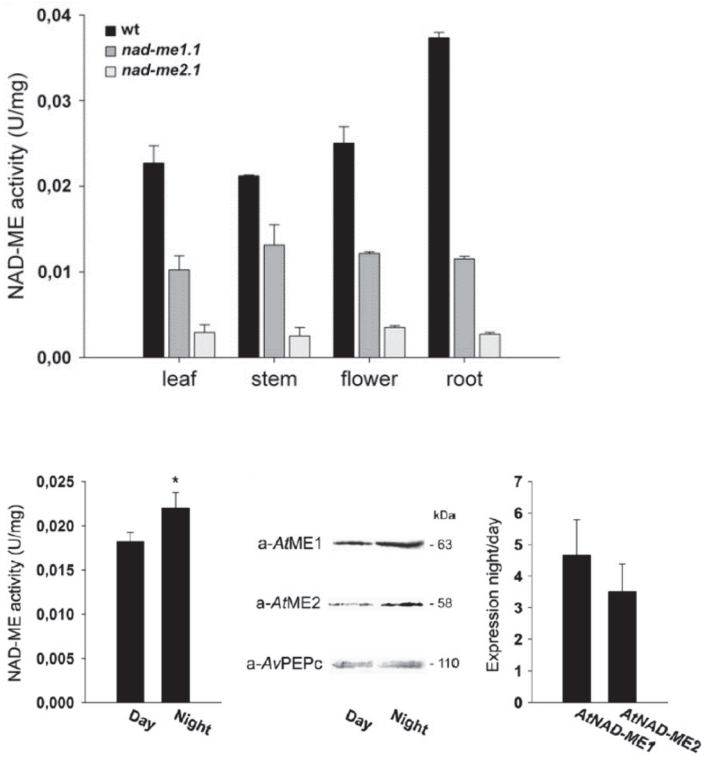

Abbildung 4: Die Aktivität des NAD-Malat Enzyms in U/ mg Protein in Blattextrakten von *A. thaliana* im Vergleich zwischen Col-0, *nad-me 1.1* und *nad-me 2.2* in Bättern, Stengel, Blüte und Wurzel (oben). Vergleich der NAD-ME Aktivität in Blattextrakten bei Tag und Nacht; Vergleich der Proteinabundanz mittels Westernblot nach SDS-Page mit 50µg geladenem Proteinextrakt aus Pflanzen mit Antikörpern für NAD-ME 1, NAD-ME 2 und PEPC; Vergleich der entsprechenden Genexpression mittels RT-PCR (unten). Entnommen aus Tronconi *et al*., 2008.

1.6 Der Citrat- Zyklus und seine Rolle in der Pflanzenzelle

Im Jahre 1937 hatten H. A. Krebs und sein Kollege W. A. Johnson den Ablauf und das Grundkonzept des Citrat- Zyklus, auch als Krebs-Zyklus bekannt erarbeitet (Krebs und Johnson, 1937). Die Grundbeschreibung des Citrat- Zyklus zeigt diesen in allen Lehrbüchern vereinfacht, als Kreislauf von aufeinanderfolgenden Reaktionen, mit der Hauptaufgabe die ATP-Synthese anzutreiben. Organische Kohlenstoffsubstrate werden oxidiert und dadurch Reduktions-äquivalente für die Atmungskette generiert (Taiz & Zeiger 2010, Heldt, 2003).

Die Eingangsreaktion des Citrat- Zyklus ist die Umwandlung von Pyruvat, welches durch den Multienzym-Komplex der Pyruvat Dehydrogenase (PDH- Komplex) oxidiert und decarboxyliert wird (vgl. Abb. 5; Tovar-Mendez *et al*., 2003). Es entstehen NADH, CO_2 und ein Acetat, dass kovalent an Coenzym A (CoA) gebunden wird, so dass daraus ein Molekül Acetyl- CoA entsteht. Der PDH Komplex besteht aus 3 enzymatischen Einheiten E1, E2 und E3 sowie fünf Cofaktoren (TPP, CoA, α-Liponsäure, FAD, NAD) (Luethy *et al*., 1995; Guan *et al*., 1995).

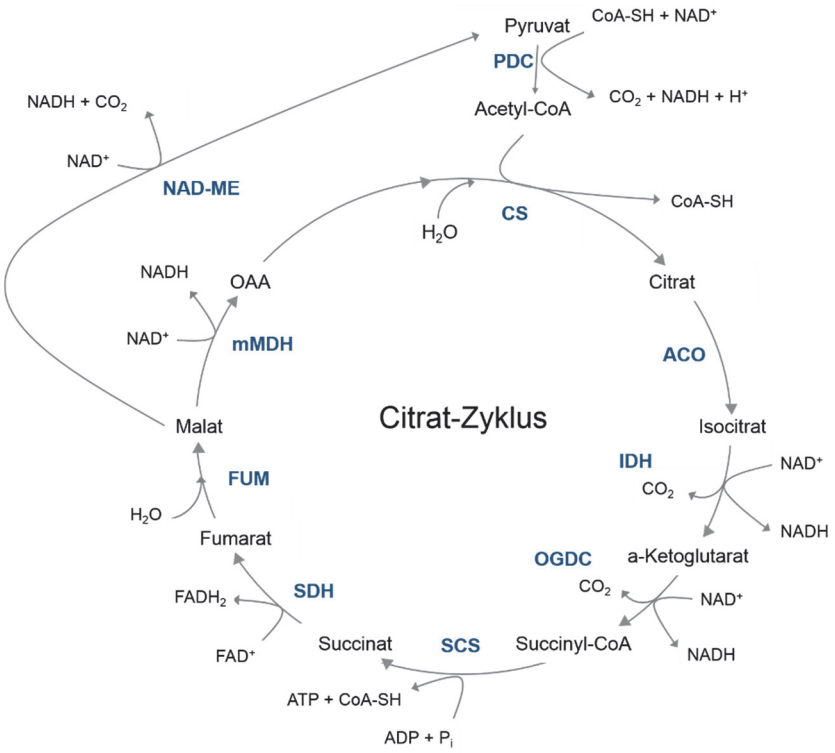

Abbildung 5: Darstellung der Reaktionen des Citrat- Zyklus in Pflanzen. Die Citrat- Zyklus Enzyme sind in blau dargestellt. Abkürzungen: PDC: Pyruvat-Dehydrogenase Komplex, CS: Citrat-Synthase, ACO: Aconitase, IDH: Isocitrat Dehydrogenase, OGDC: (Oxoglutarat Dehydrogenase Komplex) α-Ketoglutarat-Dehydrogenase Komplex, SCS: Succinyl-CoA Synthase, SDH: Succinat Dehydrogenase, FUM: Fumarase, mMDH: mitochondriale Malat-Dehydrogenase, NAD-ME: NAD-abhängiges Malat Enzym. H_2O: Wassermolekül; CO_2: Kohlenstoffdioxidmolekül; H: Wasserstoffatom; NAD: Nicotinamidadenindinukleotid; NADH: reduzierte Form von NAD; ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; CoA-SH: Coenzym A; FAD: Flavinadenindinukleotid; FADH:

Das Acetyl- CoA tritt nun in den eigentlichen Citrat- Zyklus ein, indem es durch die Citrat Synthase unter Hydrolyse irreversibel mit OAA zu einem C-6 Körper, dem Citrat reagiert (La Cognata *et al*.,1996). Das Pyruvat kann auch über das NAD-ME in den Zyklus eingespeist werden. Durch das NAD-ME wird Malat zu Pyruvat umgewandelt, welches dann durch die PDH weiter verarbeitet wird. Durch diese Einschleusung von Kohlenstoffgerüsten in den Zyklus und durch die darauffolgende Produktion von ATP würde das NAD-ME als wichtiger Regulator im Fluss durch den Citrat- Zyklus angesehen (Grover *et al*., 1981). Der nächste Schritt im Citrat- Zyklus ist die reversible Isomerisierung durch die Aconitase, die Citrat zu Isocitrat umwandelt (Lemaitre *et al*., 2007). Die Folgereaktionen sind beide oxidative decarboxylierungs Reaktionen, die jeweils ein NADH produzieren und ein CO_2 entlassen. Die NAD- Isocitrat Dehydrogenase bildet α–Ketoglutarat welches durch einen Multienzymkomplex, den a-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex Succinyl- CoA produziert (Lancien *et al*., 1998; Millar *et al*., 1999). Danach wird durch die Succinyl- CoA Synthase eine Substratphosphorylierung durchgeführt, wobei die energiereiche Thioesterbindung des Succinyl- CoAs gespalten und diese Elektronen zur Bildung von ATP genutzt werden (Palmer und Wedding, 1966). In der Folgereaktion wird durch die Succinat

Dehydrogenase Succinat zu Fumarat oxidiert. Diese Reaktion ist die einzige Enzymreaktion, die nicht in der mitochondrialen Matrix sondern in der mitochondrialen Membran lokalisiert ist (Huang und Millar, 2013). Hierbei wird $FADH_2$ gewonnen und Elektronen auf das Ubichinon der Atmungskette übertragen. Die Fumarase katalysiert anschließend durch Wasseranlagerung die Reaktion von Fumarat zu Malat (Pracharoenwattana *et al*., 2010), welches im letzten Schritt des Zyklus durch die mitochondriale Malat Dehydrogenase zu OAA umgewandelt wird (Gietl, 1992; Tomaz *et al*., 2010). Das Malat kann auch durch das NAD-ME verstoffwechselt werden (s. 1.5.2). Anaplerotische Reaktionen liefern Zwischenprodukte, damit der Citrat- Zyklus nicht zum Erliegen kommt. Auf diese wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

1.6.1 Hohe Flexibilität des Citrat- Zyklus

Neben seiner Aufgabe die ATP-Synthese im Mitochondrium anzutreiben, ist der Citrat-Zyklus ein Teil eines größeren metabolischen Netzwerkes, welches zu einer Vielzahl von Stoffwechselvorgängen im Metabolismus der Pflanze beiträgt. So ist er zum Beispiel ein Knotenpunkt für den Kohlenstoff- und Stickstoff- Metabolismus. Im Citrat- Zyklus werden Kohlenstoffgerüste für eine Vielzahl von synthetischen Prozessen bereitgestellt (Aminosäuren, Lipide, Isoprenoide, Porphyrine) (Sweetlove *et al*., 2010; Taiz Zeiger, 2010). Außerdem besitzt der Citrat- Zyklus Verknüpfungen zur Photosynthese, Photorespiration, zur Antwortreaktion auf oxidativen Stress, zur Regulation des zellulären Redox Potentials und auch zum Ascorbat- Metabolismus (Millar *et al*., 2011; Fernie *et al*., 2004; Sweetlove *et al*., 2010). Ein wichtiger Bestandteil des Zyklus sind die organischen Säuren, hier spielen Intermediate zum Beispiel wichtige Rollen im Glyoxylat- Zyklus, in der GABA Degradation und der Arginin- und Purin- Biosynthese (Plaxton und Podesta, 2006; Fernie und Martinoia, 2009, Sweetlove *et al*., 2010). Zwar galt lange Zeit die allgemeine Annahme, dass der Citrat- Zyklus tagsüber nicht bedeutsam aktiv ist, da die PDH in ihrer Aktivität im Licht bis auf 25% ihrer Aktivität im Dunkeln reduziert ist (Budde und Randall., 1990), doch es wurde gezeigt, dass der Citrat- Zyklus auch in belichteten Blättern wichtige Aufgaben ausführt (Nunes- Nesi *et al*., 2007b; Griffin und Heskel, 2013). Während der Belichtungsphase ist der Citrat- Zyklus ein wichtiger Lieferant an ATP für die Zelle und eine besonders wichtige Eigenschaft des Citrat- Zyklus ist es, Kohlenstoffgerüste, wie α- Ketoglutarat für die Stickstoffassimilation im Chloroplasten bereitzustellen (Kromer, 1995; Hanning und Heldt, 1993; Hodges, 2002).

Eine besondere metabolische Flexibilität besteht in pflanzlichen Mitochondrien für den Metabolismus von PEP und Pyruvat. Durch die Aktivität des NAD-ME wird es ermöglicht Pyruvat durch eine alternative Route ohne PEP aus der Glykolyse einzuspeisen (Artus und Edwards, 1985; Sweetlove *et al*., 2010). Das NAD-ME und die mMDH ermöglichen es dem

Citrat- Zyklus, über die Respiration von Malat alternative Wege ablaufen zu lassen. Malat fungiert als Speicherstoff in der Pflanzenzelle (Fahnenstich, 2007; Zell *et al*., 2010). Es kann in der Vakuole gespeichert und bei Bedarf über Transportsysteme in andere Kompartimente transportiert werden. Weiterhin können OAA und Malat auch im Cytosol aus PEP gebildet werden, wofür die cytosolische PEP-Carboxylase und die cytosolische MDH benötigt werden (Taniguchi *et al*., 2002; Emmerlich *et al*., 2003; Renné *et al*., 2003; Scheibe, 2004; Fernie *et al*., 2004; Fernie und Martinoia, 2009). Den Transport der organischen Säuren über die innere Mitochondrienmembran vermitteln Carrier der mitochondrialen Carrier Familie (MCF; Palmieri *et al*., 2011). Zusammenfassend bedeutet dies, dass Malat aus diversen Quellen in den Citrat- Zyklus eingespeist werden kann.
Der Citrat- Zyklus ist der Knotenpunkt zahlreicher Stoffwechselvorgänge mit der Möglichkeit zur variablen, anaplerotischen Einspeisung von Intermediaten. Dies gibt dem Citrat- Zyklus seine hohe Flexibilität. Des Weiteren ist diese hohe Flexibilität des Zyklus auch gegeben, weil es eine Vielzahl von cytosolischen Umlenkungen gibt. Einige Mutanten des Citrat- Zyklus zeigen einen relativ milden Phänotyp, dies deutet auf Kompensationen aus eben diesen Auslagerungen hin, sowie die Anwesenheit zahlreicher Transportproteine die für diese Aufgaben passend wären (Nunes- Nesi *et al*., 2007b; Sweetlove *et al*., 2010).

1.6.2 Die Malat Dehydrogenase

Die dianionische Form von Apfelsäure in ihrer L- Form ist Malat (bei pH 8 im Chloroplastenstroma; Martinoia und Rentsch, 1994). Malat besitzt als Metabolit von zahlreichen Stoffwechselwegen bedeutende Aufgaben in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle, die beispielsweise NADH Bereitstellung für die Stickstoff Reduktion, eine Unterstützung der Photorespiration, Speichermolekül in der Vakuole und eine Unterstützung der ATP Produktion im Mitochondrium umfassen (Fernie *et al*., 2004). In *A. thaliana* unterliegen Malat und das bereits erwähnte Fumarat täglichen Konzentrationsschwankungen, ähnlich zu denen von Stärke und Zucker (Zell *et al*., 2010). Sie fungieren beide als transiente Kohlenstoff- Speichermoleküle. Neben dem bereits vorgestellten NAD-ME setzt im Mitochondrium auch die MDH enzymatisch um.
In Pflanzen ist die MDH in diversen Isoformen vorhanden (L- Malat NAD- Oxidoreduktase; EC 1.1.1.37). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Malat zu OAA gekoppelt mit der Reduktion von NAD^+. Die MDH Reaktion ist reversibel, die Reaktion zur Reduktion von OAA wird jedoch stark favorisiert (Tomaz *et al*., 2010). Die MDHs sind multimere Enzyme, die aus identischen Untereinheiten bestehen und als Dimere oder Tetramere einer Untereinheit organisiert sind. Sie besitzen ein Molekulargewicht von 30 und 35 kDA (Birktoft *et al*., 1982). Jede Untereinheit fungiert katalytisch unabhängig (McEvily *et al*., 1985). Die Isoformen werden durch verschiedene Gene in der Pflanze kodiert und es konnte gezeigt

werden, dass die Genprodukte auch unterschiedliche kinetische Eigenschaften, physiologische Funktionen, wie auch verschiedene subzellulare Lokalisationen innehaben (Gietl, 1992). In Pflanzen agieren Isoformen des Enzyms in den Mitochondrien, im Chloroplasten, den Peroxisomen, Glyoxysomen und dem Cytosol (Miller *et al*., 1998; Gietl, 1992). Alle Isoformen sind NAD^+ Cofaktor abhängig, während nur die chloroplastidäre Form eine NADP- Abhängigkeit zeigt (Gietl, 1992). Diese Isoform fungiert indirekt in der C3 Photosynthese als Bestandteil des Malat- OAA Shuttels, worüber sie in der Pflanzenzelle interagieren und für die Verteilung von Reduktionsäquivalenten wichtig sind (Gietl, 1992; Kromer, 1995). In den Mitochondrien hat die MDH spezielle Aufgaben. Einerseits besitzt das Enzym die klassische Rolle im Citrat- Zyklus, wobei es OAA regeneriert, indem es Malat oxidiert (Tomaz *et al*. 2010). Zweitens wird vermutet, dass die mMDH in der umgekehrten Reaktion arbeitet, um OAA zu Malat zu reduzieren und dadurch NAD^+ für die mitochondriale Glyzin Decarboxylase bereitzustellen (Journet *et al*., 1981). Drittens ist die mMDH involviert in dem NAD-ME Subtyp der C4 Photosynthese (s. 1.5.1), wobei aus Aspartat Malat generiert werden muss (Hatch und Osmond, 1976).

1.6.3 Charakterisierung von mitochondrialen MDH *knockout* Mutanten

In *A. thaliana* existieren zwei Isoformen der mMDH, beide Enzyme sind ubiquitär exprimiert. Eine dominierende Form, *mMDH 1* (At1g53240) mit neunfach erhöhten Transkript-Level im Vergleich zu der zweiten Form, *mMDH 2* (At3g15020). Die mMDH 1 zeigt neben erhöhten Transkript-Level eine höhere Proteinabundanz in mitochondrialen Extrakten (Millar *et al*., 2001; Lee *et al*., 2008). In Arbeiten von Tomaz und Kollegen wurden *A. thaliana* Einzel- und Doppelmutanten dieser beiden kernkodierten, mitochondrialen MDHs partiell untersucht (Tomaz *et al*., 2010). Es wurde gezeigt, dass nach 30 Zyklen einer semi-quantitativen RT-PCR kein entsprechendes Volllängentranskript in den *knockout* Pflanzen vorhanden war und dass die totale Proteinaktivität aus Blattextrakten in der *mmdh 1* Mutante wie auch in der *mmdh 1 * mmdh 2* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt war (s. Abb. 6).

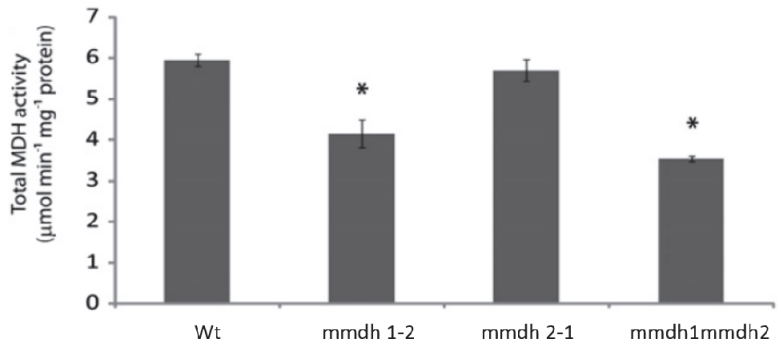

Abbildung 6: Die MDH Gesamtproteinaktivität aus Blattextrakten im Vergleich. Gezeigt sind die Aktivitäten des Wildtyps, der *mmdh 1* und *mmdh 2*, sowie der Doppelmutante *mmdh 1 * mmdh 2* in µmol min^{-1} mg^{-1} Protein. Entnommen aus Tomaz *et al*., 2010.

Die Einzelmutanten zeigten kein auffällig verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen die Doppelmutante kleinere Blattrosetten ausbildet, dies wird vermutlich durch eine erniedrigte CO_2 Assimilationsrate hervorgerufen (s. Abb. 7; vgl. Tomaz *et al*., 2010).

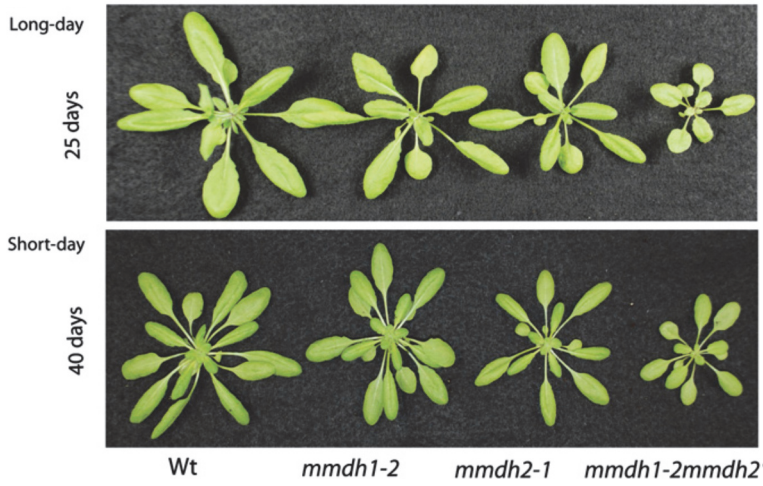

Abbildung 7: Wachstumsvergleich der *mmdh* Einzelmutanten, der Doppelmutante *mmdh 1 * mmdh 2* und Col-0.. Oben: Langtagbedingungen mit 200µE Belichtung; Unten: Kurztagbedingungen mit 250µE Belichtung. Entnommen aus Tomaz *et al*., 2010.

1.7 *Bioengineering* von Nutzpflanzen zur Verbesserung der photosynthetischen Effizienz

Eine effiziente Photosynthese ist ein Interessengebiet des *Bioengineering*. Dies ist auf globale Gründe zurückzuführen. Eine Optimierung der Nutzpflanzenproduktion mit gleichzeitig geringerem Aufwand an Ressourcen ist für die Zukunft der Weltbevölkerung ein unumgängliches Bestreben. Laut der Bevölkerungsprognose der Vereinten Nationen (UN) wird die Weltbevölkerung im Jahr 2050 mehr als neun Milliarden Menschen zählen (UN, 2011). Dies führt nicht nur zu einem höheren Nahrungskonsum, sondern auch zu einem erhöhten Bedarf an Futter, Biomasse für Treibstoff und Industrieprodukten, was eine höhere Produktivität von Nutzpflanzen benötigt (Maurino und Weber, 2013). Nebenbei sinkt die zur Verfügung stehende Acker-Anbaufläche pro Kopf stetig (Maurino und Weber, 2013; http://faostat3.fao.org). So fordern die World Health Organization und der Welthungerindex nach Strategien, um den Bedarf an Nahrung der stetig wachsenden menschlichen Population zu decken (Price, 2012; Welthungerindex, 2012). In den letzten Jahrzenten wurde durch die sogenannte „Grüne Revolution“ im Rahmen von Züchtungsprogrammen eine Erhöhung der Getreideerträge erreicht. Dies geschah durch die Verwendung von Nutzpflanzenarten, welche Hocherträge einbringen (Hibberd *et al*., 2008). Durch diese konventionelle Verbesserung von Nutzpflanzen wachsen die Erträge auf Dauer jedoch nicht im Verhältnis mit dem Weltbevölkerungswachstum an (Fischer und Edmeades, 2010). Daher ist das Bestreben die photosynthetische CO_2 Fixierung durch *Bioengineering*

Strategien zu verbessern, um die Produktion von Nutzpflanzen zu erhöhen besonders aktuell (Hibberd *et al*., 2008; Leegood, 2010; Parry und Reynolds, 2011; Maurino und Weber, 2013). Der prominenteste Ansatzpunkt ist es hierbei, den Limitierungen der RubisCO entgegenzuwirken. CCMs haben in der Evolution bewiesen, dass sie den Verlusteffekten der Photorespiration entgegenwirken können, was zu einer erhöhten Produktivität und photosynthetischen Aktivität von Pflanzen führt. Dies resultiert außerdem in einer verbesserten Stickstoff- und Wassernutzung (Sheehy *et al*., 2006). Aktuell werden drei große, verschiedene *Bioengineering*- Ansätze und Ziele verfolgt. Diese sollen hier kurz erläutert werden: Einerseits sollen i) die Eigenschaften der RubisCO verbessert werden (Parry *et al*., 2003, Portis und Parry, 2007; Whitney *et al*., 2011; Ishikawa *et al*., 2011). Andererseits sollen ii) CO_2 Konzentrationsmechanismen in Nutzpflanzen eingebracht werden und iii) der photorespiratorische Stoffwechselweg selbst manipuliert werden (Maurino und Peterhänsel, 2010).

1.7.1 C3 Pflanzen sollen C4 Charakteristika erhalten

Um das Ziel einer verbesserten photosynthetischen Effizienz in Nutzpflanzen zu erreichen, gibt es Strategien CO_2-Konzentrationsmechanismen, oder Komponenten dieser in Nutzpflanzen einzubringen (Price, 2011, 2012; Zarzycki 2012; Maurino und Weber, 2013) Diesbezüglich sind zwei bedeutende Optimierungsstrategien besonders interessant, einmal das Projekt zur Herstellung von C4 Reis (www.C4rice.irri.org) und außerdem Projekte, die allgemeine C4 Photosynthese Eigenschaften in C3 Nutzpflanzen einbringen sollen wie das Projekt „*C3 to C4*“ (www.C3toC4.org). Ein C4 Reis, ein manipulierter Reis mit C4 Charakteristika und C4 Vorteilen ist das Ziel der Forscher des internationalen „*C4 Rice Consortium*“. Um dies zu erreichen, sollen Genom-, Transkript- und Mutanten-Screen-Daten gesammelt und analysiert werden, um schließlich einen C4 Reis zu entwickeln der einen höheren Ertrag bringt (van Caemmerer *et al*., 2012). Ein ähnliches Bestreben verfolgt das Projekt „C3 to C4“, welches photosynthetische Eigenschaften aus C4 Pflanzen in C4 Nutzpflanzen implementieren möchte, um einen nachhaltig ertragreichen Anbau von Nutzpflanzen zu erreichen.

1.7.2 Manipulationen des photorespiratorischen Stoffwechselweges

Forschung zur Manipulation des photorespiratorischen Stoffwechselweges, wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Ansätzen verfolgt (Kebeish *et al*., 2007; Carvalho *et al*., 2011; Maier *et al*., 2012; Maurino und Peterhänsel, 2012). In einem biotechnologischen Ansatz, wurde der katabolische Glykolat Stoffwechselweg aus *E. coli* transgen in *Arabidopsis* Pflanzen integriert (Kebeish *et al*., 2007). Dieser Stoffwechselweg bestand aus 3 Genen, kodierend für eine Glykolat Dehydrogenase, eine Glyoxylat Carboligase und eine

Tatronicsemialdehyd Reduktase. Im Chloroplasten sollte durch die transgenen Enzyme das in der Photorespiration anfallende Glykolat in Glycerat umgewandelt werden, um dadurch einem Kohlenstoffverlust entgegen zu wirken. Die transgenen Pflanzen, welche nur das erste Enzym aus dem Stoffwechselweg im Chloroplasten exprimierten, wie auch die Pflanzen mit der Expression des kompletten Stoffwechselwegs im Chloroplasten, zeigten eine Erniedrigung der Photorespiration und eine höhere Biomasseproduktion. Allerdings konnte bisher nicht exakt geklärt werden, weshalb dies auch in den Pflanzen der Fall war, welche nur die Glykolat Dehydrogenase exprimierten. In einer zweiten Arbeit wurde Tabak transgen manipuliert, indem ebenfalls Enzyme aus *E.coli* in den Peroxisomen überexprimiert wurden (Carvalho *et al*., 2011). Hier sollte die Reaktion der Aminotransferasen von Glyoxylat zu Glycin umgangen werden, um die energieaufwendige Ammoniumreassimilation des photorespiratorischen Stickstoffzyklus zu umgehen (Keys, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zu Pflanzen mit Stresssymptomen und es kam zu einem Misserfolg die Carboligase zu exprimieren. Zusammenfassend wurde der Stoffwechselweg nicht korrekt und funktionell etabliert. Ein weiterer Ansatz, welcher erfolgreich eine Zunahme an Biomasse erzielen konnte ist der sogenannte GMK-Stoffwechselweg (Maier *et al*., 2012).

Der artifizielle Stoffwechselweg wird im Verlauf dieser Dissertation dargelegt.

1.8 Vorarbeiten

1.8.1 Biotechnologischer Ansatz zur Erhöhung der Biomasseproduktion

Ein biotechnologischer Ansatz mit dem Ziel die Biomasseproduktion von *A. thaliana* zu erhöhen wurde bereits 2009 in dieser Arbeitsgruppe entwickelt (Fahnenstich, 2007; Maurino und Flügge, 2009). In den hier im Folgenden aufgeführten Arbeiten sollte ein kompletter Stoffwechselweg in der C3 Modellpflanze *A. thaliana* modelliert und etabliert werden, der sogenannte Glykolat Oxidase, Malat Synthase, Katalase- Stoffwechselweg (GMK- Stoffwechselweg). Die Grundidee war es, das durch die Stoffwechselvorgänge der Photorespiration gebildete Glykolat komplett im Chloroplasten der Pflanze zu verstoffwechseln, um den Fluss durch den kostenaufwendigen Photorespirationsweg zu reduzieren (s. Abb. 8).

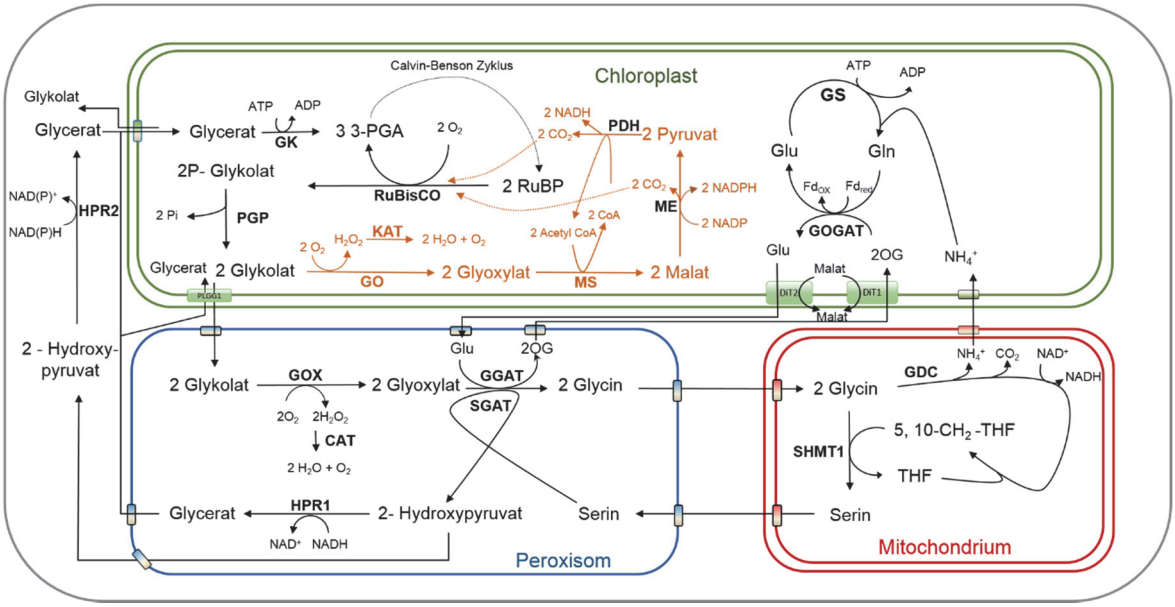

Abbildung 8: Schematische Darstellung des photorespiratorischen Kohlenstoff- und Stickstoff-Zyklus einer C3 Pflanze (in schwarz). Der artifizielle Glykolat-Stoffwechselweg ist in orange dargestellt. Die aufgezeigten Enzyme beider Stoffwechselwege sind folgende: CAT: Katalase; GDC: Glycin Decarboxylase; GGAT: Glutamat-Glyoxylat Aminotransferase; GK: Glycerat Kinase; GO: Glykolat Oxidase; GOGAT: Glutamat-Oxoglutarat Aminotransferase; GS: Glutamin Synthetase; HPR: Hydroxypyruvat Reductase; MDH: NAD-Malat Dehydrogenase; ME: NADP-Malat Enzym; MS: Malat Synthase; PDH: Pyruvat Dehydrogenase; PGP: Phosphoglykolat Phosphatase; SGAT: Serin-Glutamat Aminotransferase; SHMT: Serine-Hydroxymethyl Transferase. Enzyme sind fett geschrieben. Verändert nach Maurino und Peterhänsel, 2010.

Die Oxygenase Reaktion der RubisCO bildet 2-Phosphoglykolat. Dieses wird folgend durch eine Dephosphorylierung zu Glykolat umgewandelt (Christeller *et al*., 1978; Schwarte und Bauwe, 2007), welches das Eingangssubstrat in den neuen, artifiziellen Stoffwechselweg ist. Die Glykolat Oxidase (GO; EC 1.1.3.15) bildet aus Glykolat Glyoxylat, mit der gleichzeitigen Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Im nächsten Schritt wandelt die Malat Synthase (MS; EC 4.1.3.2) das entstandene Glyoxylat zu Malat um, indem sie eine

C2-Einheit des Acetyl-CoAs mit Glyoxylat kondensiert. Malat kann im Chloroplasten weiter verstoffwechselt werden, indem das endogene NADP-Malat Enzym (NADP-ME; EC 1.1.1.40) durch die Decarboxylierungsreaktion Pyruvat, NADPH und CO_2 bildet. Im letzten Schritt des artifiziellen Stoffwechselwegs soll die chloroplastidäre Pyruvat Dehydrogenase (PDH; EC 1.2.1.51) das entstandene Pyruvat in Acetyl-CoA umwandeln, wobei NADH und CO_2 gebildet werden und der Zyklus abgeschlossen wird. Das in der GO Reaktion gebildete H_2O_2 wirkt in hohen Konzentrationen toxisch und wird daher in diesem Stoffwechselweg durch eine Katalase (Kat; EC 1.11.1.6) detoxifiziert.

Zusammenfassend sollten aus diesem Glykolat Stoffwechselweg zwei Moleküle CO_2 sowie Reduktionsäquivalente in Form von NADPH und NADH resultieren (s. Gleichung 3).

Gleichung 3:

Glykolat + O_2 + NAD + NADP → 2 CO_2 + NADH + NADPH + 2H+ + H_2O

Das Ziel dieses biotechnologischen Ansatzes war es Energie einzusparen, dadurch dass Glykolat bereits im Chloroplasten metabolisiert werden sollte. Dies hätte eine lokale Veränderung des CO_2/ O_2 Partialdrucks zur Folge, wodurch eine Verminderung der Oxygenase-Aktivität der RubisCO entstehen könnte, welche der Pflanze zum Aufbau von Biomasse zur Verfügung stehen könnte.

1.8.2 Vorarbeiten zur Etablierung des GMK-Stoffwechselwegs

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden transgene Pflanzen generiert, welche mit den benötigten Enzymen des GMK-Stoffwechselwegs (s. 1.8.1) Schritt für Schritt mit Hilfe von Kerntransformation ausgestattet wurden (Fahnenstich, 2007). Hierzu wurde die Methode der *A. tumefaziens* vermittelten Transformation von Fremd-DNA in das Pflanzen Kerngenom verwendet, wozu zuerst Vektoren mit den jeweilgen Genen hergestellt werden mussten (Clough und Bent, 1998; s. Tabelle 1). Stabile, transgene GO-Linien wurden generiert und auf ihre GO-Aktivität, sowie das einfache, homozygote Vorliegen des neuen Transgens selektiert (Fahnenstich, 2007). Homozygote Pflanzen der 3. Generation (T3) wurden einerseits als Kontrollpflanzen verwendet, andererseits als Donorpflanze für die nächste Transformation mit dem Malat Synthase Vektor benutzt (s. Tabelle 1). Diese Pflanzen wurden auf Funktionalität der Malat Synthase, sowie das homozygote Vorliegen des neuen Gens selektiert und wiederrum als Donorpflanzen für die dritte Transformation mit dem Katalase Vektor verwendet. Parallel wurden die jeweiligen Donorpflanzen weiter angezogen, um einerseits deren Eigenschaften zu analysieren und andererseits die Stabilität der transgenen Genexpression zu beobachten (Fahnenstich *et al*., 2008).

Tabelle 1: Zusammenfassung der erstellten Genkonstrukte zur Transformation von *A. thaliana*. Tabelle entnommen aus Fahnenstich, 2007.

Gen	Herkunft	Promotor	Selektionsmarker	Transitpeptid-Sequenz
GO	*A.thaliana*	CaMV 35S	Kanamyzin	pgm (*A.thaliana*)
MS	*C.pepo*	rbS3C (*S. lycopersicum*)	Hygromyzin	rbS3C (*S. lycopersicum*)
KAT	*E.coli*	rbS3C (*S. lycopersicum*)	Sulfadiazin	rbS3C (*S. lycopersicum*)

Die transgenen Pflanzen- Linien wurden in Vorarbeit von Fahnenstich (Fahnenstich, 2007) transformiert und selektiert. Aus zahlreichen transgenen Linien wurden jeweils diese als Donorlinien ausgesucht, welche eine Insertion des jeweiligen Transgens sowie eine stabile Expression und Enzymaktivität dessen aufwiesen. In Abbildung 9 ist die Expression der Transgene in den zwei GMK Linien GMK 3 und GMK 9 exemplarisch dargestellt. Durch Extraktion der RNA und Umschreibung dieser mittels Reverser Transkriptase in cDNA konnten die Volllängentranskripte der Gene mit der Methode der semi- quantitativen RT-PCR bestätigt werden.

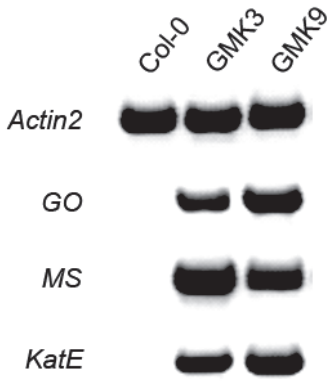

Abbildung 9: Darstellung einer Gelelektrophorese der semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis der Volllängentranskripte von *GO* (1,3kb), MS (1,8kb) und *KAT* (2,4kb) nach 32 PCR-Zyklen. *Aktin II* wurde als Kontrolle für 29 Zyklen mittelst dieser Methode amplifiziert. Graphik wurde entnommen aus Maier *et al*., 2012.

Die darauffolgende Analyse untersuchte die enzymatische Aktivität der Proteine der eingebrachten Transgene. Die Enzymaktivitäten konnten in allen drei Fällen mit spezifischen Enzym-Assays bestätigt werden (s. Abb. 10; Methodik beschrieben in Fahnenstich, 2007). In allen aufgezeigten exemplarischen Linien war die GO Aktivität im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Dies verhielt sich ebenso mit den Malat Synthase Aktivitäten. Die Katalase Aktivitäten waren in den entsprechenden transgenen Linien ebenfalls höher als im Wildtyp.

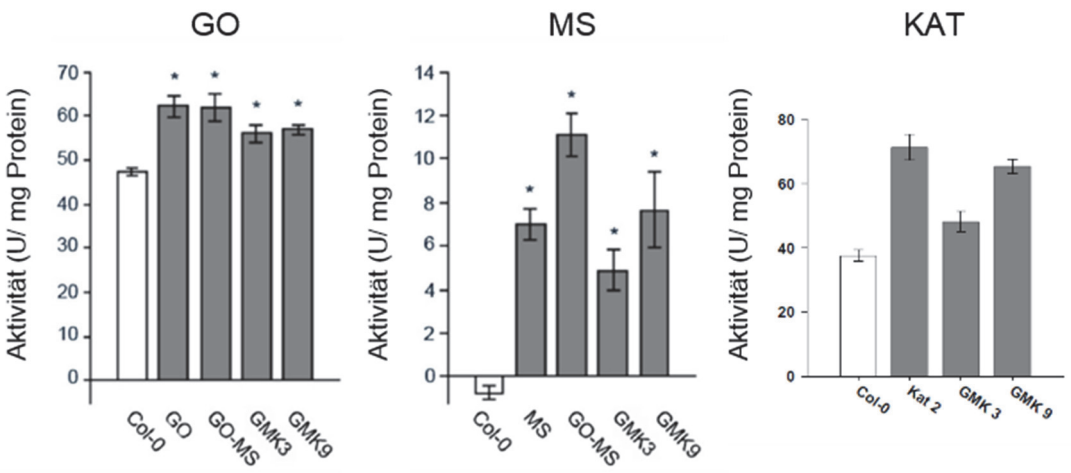

Abbildung 10: Darstellung der gemessenen Enzymaktivitäten von GO, MS und KAT aus Blattextrakten der transgenen Pflanzen und Col-0 als Wildtypkontrolle. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus n=8 für 8a und 8b und n>3 Pflanzen in Units/ mg Gesamtprotein, ± Standardfehler. Einzelgraphen wurden entnommen aus Fahnenstich, 2007 (GO; MS) und Maier, 2006 (KAT).

Von besonderem Interesse waren die phänotypischen Charakteristika in Verbindung mit den Enzymaktivitäten. Die GO Einzelpflanzen zeigten den drastischsten Phänotyp, sie waren kleinwüchsig und gelblich, zeigten eine stark verringerte photosynthetische Effizienz und erhöhte Glyoxylat Level in den Blättern (vgl. Fahnenstich, 2007). Die GO-MS Pflanzen zeigten eine Abschwächung dieses Phänotyps, die Glyoxylat Konzentrationen waren erniedrigt, die Pflanzen waren jedoch immer noch gelblich und kleinwüchsig (s. Abb. 11). Dieser Phänotyp konnte unter hohen CO_2 Konzentrationen gerettet werden. Außerdem zeigten sich in den GO Pflanzen und in den GO-MS Pflanzen hohe Wasserstoffperoxid Konzentrationen (Fahnenstich, 2007, Maier *et al*., 2012). Mit der Transformation der Katalase, welche ein Wasserstoffperoxid detoxifizierendes Enzym darstellt, konnte der hohe H_2O_2 Gehalt in den Blättern der Donorpflanzen und auch der Phänotyp reduziert werden. Die GMK Pflanzen, welche den gesamten Stoffwechselweg exprimierten zeigten in ersten Analyse das Wachstum großer Blattrosetten (s. Abb. 11) und ein höheres Frischgewicht zu Trockengewicht Verhältnis (vgl. Fahnenstich, 2007). Diese für das Projekt vielversprechenden Eigenschaften sollten im Verlauf der hier verfassten Arbeit weiter untersucht werden.

Abbildung 11: Vergleichende Fotographie von Col-0 Pflanzen und transgenen Pflanzenlinien GO-MS, GMK 3 und GMK 9, nach fünf Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen bei 380 ppm CO_2 und 2000 ppm CO_2.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Zukünftig werden höhere Erträge von Nutzpflanzen in der Agrarwirtschaft benötigt. Ein Weg um dies zu gewährleisten ist es, die photosynthetische Effizienz von Nutzpflanzen zu verbessern. Hierzu ist es notwendig, natürliche Anpassungen zu einer verbesserten Kohlenstoff- Fixierung wie bspw. die Anpassung der C4 Photosynthese zu charakterisieren. Die C4 Photosynthese entwickelte sich mehrfach unabhängig voneinander, so dass es von Interesse ist, die für diese Anpassung rekrutierten C3 Enzyme in ihrer Biochemie und Regulation detailliert zu analysieren. Eine weitere Möglichkeit die photosynthetische Effizienz von Nutzpflanzen zu erhöhen bietet die Entwicklung von artifiziellen Stoffwechselwegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher künstliche und natürliche Stoffwechselwege zur Steigerung der photosynthetischen Effizienz untersucht werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Pflanzen mit einem artifiziellen Stoffwechselweg zur chloroplastidären Metabolisierung von Glykolat, den GMK- Stoffwechselweg zu charakterisieren. Dabei war es das Hauptziel, vorausgewählte Pflanzen, welche den gesamten GMK- Stoffwechselweg exprimierten, auf ihren Phänotypen, die photosynthetischen Fähigkeiten wie CO_2 Assimilation, Biomasseproduktion und auf resultierenden Veränderungen des Primärmetabolismus hin zu untersuchen. Ferner sollte getestet werden, ob dieser Stoffwechselweg in Pflanzen optimiert werden kann. Zu diesem Zweck sollte die Glykolat Dehydrogenase aus der Grünalge *Micromonas sp*. kloniert werden und im potentiell verbesserten artifiziellen Stoffwechselweg etabliert werden. Durch dieses Enzym könnten die Limitierungen umgangen werden, die durch die enzymatische H_2O_2 Produktion der Glykolat Oxidase auftreten. Daher war es ein weiteres Ziel zu untersuchen, ob die transgenen, Glykolat Dehydrogenase exprimierenden Pflanzen eine Erhöhung an Biomasseproduktion erreichen können.

Die Untersuchungen an natürlichen Stoffwechselwegen zur Erhöhung der photosynthetischen Effizienz beinhalteten metabolische Analysen des NAD-ME. Dieses Enzym spielt eine Rolle in der mitochondrialen Malat- Respiration von C3 Pflanzen und ist gleichzeitig eine der Decarboxylasen, welche in die C4 Photosynthese rekrutiert wurden um CO_2 an der RubisCO freizusetzen. Das Ziel dieser Arbeit war es hier die Rolle und definierte Regulation des NAD-ME in der C3 Pflanze *A. thaliana* zu analysieren. Dieses Wissen soll für zukünftige Arbeiten mit dem C4 Photosynthese Subtyp des NAD-ME verwendet werden. Malat wirkt in *A. thaliana* als Kohlenstoffspeicher, der in der Nacht in den Citrat- Zyklus durch die mMDH und das NAD-ME eingespeist wird. Aus diesem Grunde sollten aus Einzelmutanten von *NAD-ME 1 und NAD-ME 2* sowie der *mMDH 1*, Kombinationen von Doppelmutanten sowie eine Tripelmutante von *A. thaliana* generiert und untersucht werden. Hier wurde erwartet, dass der Malat Metabolismus großen Störungen in diesen

Mehrfachmutanten unterliegt. Das Sammeln von Informationen über den Phänotyp, die Biomasseproduktion und eine physiologische Charakterisierung hinsichtlich des Primärmetabolismus während einer langen Nacht stand im besonderen Fokus. Das Hauptziel war die Klärung der Frage, ob NAD-ME 1 und NAD-ME 2 unterschiedliche, definierte Aufgaben im mitochondrialen Metabolismus besitzen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA), Duchefa (Haarlem, NL), Sigma-Aldrich (St.Luis, USA), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) verwendet. Biochemikalien und Enzyme, einschließlich der dazugehörigen Puffer stammten von Biomol (Hamburg), Thermo-Scientific (Darmstadt, Schwerte), Roche (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden) und New England Biolabs (Frankfurt/Main).
Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar) bezogen. Verbrauchsmaterial für die Pflanzenanzucht ist gesondert aufgeführt (vgl. 2.2).

2.1.2 Geräte

Die Hersteller und die Typenbezeichnungen der verwendeten Geräte werden unter den jeweiligen Versuchsteilen aufgeführt.

2.1.3 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) und Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Angegeben sind die Bezeichnung und die Nukleotidsequenz in 5´→ 3´Orientierung.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide mit Bezeichnung und Nukleotidsequenz.

Bezeichnung	Sequenz
mMDH 1 -fv	ATGTTCAGATCTATGCTCGTCCGA
mMDH 1 - rv	CTGCAACTGGGACATTTGCCTT
mMDH 1. 2 - rv	GAGTCAAGTTTGCCAACCAGTGA
Sail LB	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTG
Gabi Kat LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC
Kanamyzin - fv	TCCCGCTCAGAAGAACTCGTC
Kanamyzin - rv	GAATGAACTCCAAGACGAGGCAG
mGlcDH - fv	CCTCTAGAGAGGCCTTCCTTAA
mGlcDH 2 - fv	TACTATCGCCGACGCTCCTAGG
mGlcDH -rv	GGTAGACTTAAAGCCCCTAGAG
NAD-ME 2 - fv	GACCTGTGTACAGCAATGTGATC

NAD-ME 2 - rv	TGTCCTCTCCGTGGTGACAAGAC
NAD-ME 1 -fv	ACGATGACGGAGAGAAATCGT
NAD-ME 1 - rv	CTGGACATCATCATTGAACAT
sq-PCR NAD-ME 1 - fv	GGATCCCCCACCATCGTTCATAAA
sq -PCR NAD-ME 1 - rv	GTCGACTTAGTCATCCTTGTAGAC
Sail LB 2	TAGCATCTGAATTTCATAACCAA
Aktin II *A.thaliana* - fv	TGCGACAATGGAACTGGAATG
Aktin II *A.thaliana* - rv	GGATAGCATGTGGAAGTGCATAC
mMDH 2 -fv	ATGTTCCGATCAATGATTGTT
mMDH 2 -rv	GGAACAGTGGAGTTCACAGGG

2.2 Methoden zur Pflanzenzucht

2.2.1 Pflanzenmaterial

Im Verlauf dieser Arbeit wurde mit *A. thaliana* gearbeitet. Als Wildtyp diente *A. thaliana* L. Heynh. cv. Columbia (NASC-Nr. N1093; *A. thaliana*). Weiterhin wurde mit T-DNA Insertionslinien und Überexpressionslinien gearbeitet (s. Tabelle 3 und 4).

In der folgenden Tabelle sind die T-DNA-Insertionslinien, im Fall der SALK-Linien bei SIGnAL (SALK Institute Genomic Analysis Laboratory, http://signal.salk.edu) und im Fall der GABI-Kat-Linien an der Universität Bielefeld (http://www.gabi-kat.de) bestellt, aufgelistet. Die SAIL-Linie wurde über die Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library bezogen (www.tmri.org).

In Tabelle 2 sind die Charakteristika der transgenen *A. thaliana* Pflanzenlinie GMK aufgezeigt, welche drei Transgene im Chloroplasten exprimiert, die entweder artfremd sind oder im wildtypischen Zustand in einem anderen Kompartiment lokalisiert sind.

Tabelle 3: Aufzählung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten T-DNA Insertionslinien. Aufgelistet sind die hier verwendeten Name der Insertionsmutanten sowie der jeweils betroffene Genlokus, Herkunft und Referenzen über Erstpublikationen.

Name der Insertionsmutante	Betroffener Genlokus	T-DNA Insertionslinie	Referenz
nad-me 1.1	At2g13560	SALK_N532088	Tronconi *et al.*, 2008
nad-me 1.2	At2g13560	SAIL_N817272	
nad-me 2.2	At4g00570	SALK_N631720	
nad-me 2.3	At4g00570	SAIL_291_C05	

mmdh 1	At1g53240	GABI_097C10	Tomaz *et al*., 2010
mmdh 2	At3g15020	SALK_126994	
*nad-me 1.2 * 2.3*	s.o.	s.o.	Tronconi *et al*., 2008

Tabelle 4: Herkunft und Erläuterung der einzelnen Überexpressionskonstrukte der GMK Pflanzenlinie. GO: Glykolat Oxidase; MS: Malat Synthase; KAT: Katalase und der GlcDH: Glykolat Dehydrogenase. Alle Konstrukte wurden in den pGreen II kloniert.

2.2.2 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

Gen der Überexpression (Herkunft)	Promotor (Herkunft)	Selektionsmarker	Transitpeptid (Herkunft)	Referenz der transgenen Pflanze
GO (*A. thaliana*), At3g14420	CaMV 35S	Kanamyzin	pgm *(A. thaliana*)	Fahnenstich *et al*., 2008
MS (*C.pepo*), X56948	rbS3C (*S. lycopersicum*)	Hygromyzin	rbS3C (*S. lycopersicum*)	Fahnenstich, 2007
KAT (*E.coli*), M55161	rbS3C (*S. lycopersicum*)	Sulfadiazin	rbS3C (*S. lycopersicum*)	Maier 2006; Fahnenstich 2007;
GlcDH (*Micromona sp*.), XM002506400	rbS3C (*S. lycopersicum*)	Kanamyzin	rbS3C (*S. lycopersicum*)	-

A. thaliana Samen wurden in Plastiktöpfen mit 9 cm Durchmesser ausgesät (Pöppelmann GmbH, Lohne). Die Töpfe enthielten ein Substratgemisch von drei Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz). Zur Brechung der Samenruhe und Synchronisation der Keimung wurde die Aussaat zunächst für drei Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert. Es wurde eine Schutzhaube auf das verwendete Pflanzentray gesetzt, welches nach sieben Tagen abgenommen wurde. Nach etwa zehn Tagen wurden die Pflanzen mit Hilfe einer Pinzette in 77er Multiplatten (Nitsch & Sohn, Kreuztal) oder Einzeltöpfe mit identischem Substrat pikiert. Die Bewässerung der Pflanzen fand ein- bis zweimal pro Woche durch eine Anstauung mit Leitungswasser statt. Nach Abschluß der Blütezeit wurde die Bewässerung eingestellt und die Infloreszenzen wurden in Pergamenttüten eingepackt, um eine

Samenernte ohne Kontaminationen zu gewährleisten. Nach Beendigung der Samenreife konnten die Blütenstiele abgeschnitten werden, die Samen aus den Schoten gelöst und durch wiederholtes Sieben durch ein Sieb (Maschenweite 450 µm) relativ rein gewonnen werden. Die Samen wurden in 2 ml Kunststoffgefäßen mit Schraubdeckel trocken und dunkel gelagert.
Um die S1-Bestimmungen zu erfüllen, wurden die Reste transgener Pflanzen, insbesondere Samen und reproduktive Organe, bei 121°C und 1,2 bar für 40 min autoklaviert.

2.2.3 Anzucht von *A. thaliana* im Gewächshaus

Zur Genotypisierung und Samenvermehrung wurden die Pflanzen im Gewächshaus der Universität zu Köln angezogen. Im Gewächshaus herrschten Langtagbedingungen, dies bedeutet ein Licht/ Dunkel-Rhythmus von 16 h/ 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, befand sich im Durschnitt bei 150 – 200 µmol Photonen$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Durch technische Maßnahmen wie automatische Zusatzbeleuchtung und Abdunkelung, ausgeführt durch die Gärtnereiangestellten, wurde versucht, das Ausmaß dieser Schwankungen gering zu halten.

2.2.4 Anzucht von *A. thaliana* in Klimakammern

Um die Pflanzen in kontrollierten Licht- und Temperaturverhältnissen anzuziehen, wurden die Pflanzen in Klimakammern untergebracht. Dies wurde insbesondere für Phänotypenanalysen und metabolische Analysen benutzt. Hierfür wurden regulierbare Pflanzenkammern verwendet (Mobylux GroBanks, CLF Plant Climatic, Wertingen). Die Temperaturen lagen während der Lichtperiode bei 22°C und während der Nachtperiode bei 18°C. Die Luftfeuchtigkeit wurde konstant bei 60% gehalten. Für die Beleuchtung in den Klimakammern wurde eine Mischung aus Tageslicht-Neonröhren mit verschiedener spektraler Qualitäten verwendet (Tageslicht L58W/11-860, Warmweiss L58W/30, Natura de Luxe L58W/76 und Fluora L58W/77; Osram, München). In diesen Kammern wurden zwei verschiedene Tageslängen bei unterschiedlichen Beleuchtungsstärken appliziert. Die Beleuchtungsstärken sind in den jeweiligen Versuchsteilen angegeben. Für die Tageslänge gilt im Langtag (LT) ein Licht/ Dunkel-Rhythmus von 16 h/ 8 h und im Kurztag (KT) ein Licht/ Dunkel-Rhythmus von 8 h/ 16 h.

2.2.5 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen

Zur Aussaat auf Agarplatten wurden die *A. thaliana* Samen mit Ethanol behandelt, um die Oberfläche zu sterilisieren. Dazu wurden die Samen in einem Eppendorf Reaktionsgefäß 5 min mit 70% EtOH inkubiert, darauffolgend wurde die Flüssigkeit ausgewechselt. Es folgte eine Inkubation in 90% EtOH mit 0,01% Triton X- 100 für 10 min. Zum Abschluss wurde erneut die Flüssigkeit ausgewechselt und die Samen für 5 min in 100% EtOH inkubiert. Anschließend wurden die Samen an der Luft getrocknet. Die gesamte Sterilisation und Lufttrocknung fanden unter einer Sterilbank, mit sterilem Material statt.

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

Sterilisierte Samen (s. 2.2.5) wurden auf Murashige & Skoog (MS)- Agar-Platten ausgelegt und anschließend für drei Tage bei 4°C in Dunkelheit stratifiziert. Daraufhin wurden sie in Klimakammern oder Klimaschränke der Wahl ausgelegt.
Das MS- Medium wurde anschließend für 20 min bei 120°C und 1,2 bar autoklaviert und bei Bedarf Antibiotika oder Metabolite steril filtriert und zugegeben (Hygromycin, 30 µg/ ml Endkonzentration; Saccharose 2% w/ v).
MS- Medium für Agar Platten:

1% (w/v)	Saccharose
0,44% (w/v)	Murashige & Skoog- Salze + Vitamine
0,8% (w/v)	Pflanzenagar (Difco)

2.2.7 Probennahme von Pflanzenmaterial

Blattrosetten im Alter von vier oder fünf Wochen wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen oder Aluminium-Tüten in flüssigem N_2 eingefroren. Anschließend wurden die Proben, wenn nötig bei -80°C gelagert. Die Ernte fand je nach Versuch in Dunkelheit oder nach mindestens 5 h Belichtung statt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem N_2 gemörsert.

2.2.8 Transformation von *A. thaliana* durch Vakuuminfiltration

Die Transformation von *A. thaliana* mit Agrobakterien wurde mit der Blüten-Tauch-Methode durchgeführt („floral dip“; Clough *et al.*, 1998; Desfeux *et al*., 2000). Zuerst wurde eine Agrobakterien Kolonie auf den gewünschten binären Pflanzentransformationsvektor pGreen II (s. Tabelle 2) positiv getestet. Diese Kolonie wurde dann bei 28°C in einer Flüssigkultur mit den notwendigen Antibiotika für die Selektion bis zu einer OD_{600} von 0,8

angezogen. Die Kultur wurde daraufhin bei 2500 x g für 15 min abzentrifugiert und das resultierende Bakterienpellet in dem Infiltrationsmedium resuspendiert.
Blühende *A. thaliana*-Pflanzen, deren Infloreszenzen eine Länge von ca. 5-15 cm erreicht haben, wurden zur Transformation verwendet. Die Schoten wurden manuell entfernt. Diese Pflanzen wurden kopfüber in einem Exsikkator in die Agrobakteriensuspension getaucht, so dass alle verbliebenen Blüten und Blütenknospen untergetaucht waren. Nach dreimaligem Anlegen eines Vakuums für eine Dauer von 5min wurden die Pflanzen aus dem Exsikkator entnommen und unter einer Plastikhaube für die nächsten zwei Tage waagerecht und feucht gehalten. Nach 2-3 Wochen konnten die abgereiften Samen geerntet werden.
Infiltrationsmedium:

5% (w/v)	Saccharose
0,22% (w/v)	Murashige & Skoog (MS)-Salze + Vitamine
1 Tropfen	Tween 20

Der pH wurde mit KOH auf pH 5,6 justiert.

2.2.9 Selektion transgener *A. thaliana*- Überexpressoren und T-DNA Mutanten

Die gewonnen Samen, welche aus den nach 2.2.8 transformierten Blüten gewonnenen wurden, stellten die T1-Generation dar. Je nach Selektionsmarker wurden die Pflanzen auf Erde oder auf Agarplatten ausgesät. Die Überlebenden Pflanzen, die auf Agarplatten angezogen wurden, wurden spätestens nach zwei Wochen auf Erde pikiert. Jede dieser Pflanzen konstituierte eine neue transgene Pflanzenlinie. Die Samen dieser Pflanzen (T2-Generation) wurden einer zweiten Selektionsrunde unterzogen und die resultierenden Pflanzen wurden per Polymerase-Kettenreaktion (PCR, s. 2.5.10) auf die Anwesenheit des Transgens von Interesse getestet. Außerdem wurde von jeder Einzelpflanze das Saatgut gesammelt (T3-Generation) und nur ein Teil dieses zur 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.
Die Genotypisierung von T-DNA Insertionslinien wurde mittels PCR durchgeführt. Die Lage der Oligonukleotide (Primer, s. 2.1.3) auf der genomischen DNA der untersuchten Gene sind im Appendix 6.1 dargestellt. Das angewandte Screeningverfahren basierte auf einem Ausbleiben des wildtypischen PCR Produktes im Falle einer positiven T-DNA Insertion, da die Insertion eine Amplifikation auf Grund der Insertgröße nicht möglich macht. Die Primerkombinationen zur Bestätigung der Insertion hingegen beinhalten einen Primer, der auf der artifiziellen T-DNA und einen, der im jeweiligen Genlokus bindet. Durch die

Verwendung des wildtypischen Primerpaares, kann außerdem auf die Hetero- oder Homozygozität des Genlokus rückgeschlossen werden. In allen homozygoten Linien konnte der jeweilige genomische Hintergrund nachgewiesen werden. Die PCR Produkte aller Mutanten wurden anschließend sequenziert und der Ort der T-DNA Insertion genau verifiziert.

2.2.10 Kreuzen von *A. thaliana*-Pflanzen

Zum Kreuzen wurden homozygote Pflanzen im Alter von 5-6 Wochen verwendet. Zuerst wurden an der Pflanze, die als weibliche Elter diente, alle bereits offenen Blüten und entwickelte Schoten mit einer Feinpinzette unter dem Binokular entfernt, um Selbstung zu verhindern. Dann wurden die Blüten vorsichtig geöffnet, die kurz vor der Öffnung standen. Es wurden vorsichtig alle Blütenorgane außer den Carpellen (Fruchtblätter) entfernt. Von Blüten pollenspendender Pflanzen, des männlichen Elters wurden wiederrum die beiden äußeren Blütenorgane (Kelch- und Kronblätter), sowie die Carpellen von sich frisch geöffneten Blüten entfernt. Dann wurde der Pollen auf den Fruchtknoten der zu befruchtenden weiblichen Elter Pflanze übertragen. Die Pollen mussten auf der Narbe liegen bleiben. Die zum Kreuzen verwendeten Blüten wurden markiert und kurz vor dem Abreifen einzeln eingesammelt und getrocknet. Diese Samen wurden anschließend ausgesät, die Pflanzen nach Abreifen eingetütet und der Genotyp der folgenden Generation (F2) mittels PCR bestimmt.

2.3 Messungen grundlegender, phänotypischer Charakteristika

2.3.1 Frisch- und Trockengewicht

Das Frischgewicht (FG) der Pflanzen wurde bestimmt, indem die komplette Blattrosette einer Pflanze abgeschnitten und gewogen wurde. Nachdem diese Rosette(n) daraufhin drei Tage in einem offenen Gefäß bei 60°C getrocknet wurden, konnte auch deren Trockengewicht (TG) bestimmt werden. Pro untersuchter Pflanzenlinie wurden mehr als n=10 Pflanzen untersucht. In dieser Arbeit wurde das Verhältnis FG / TG angegeben.

2.3.2 Blattrosettendurchmesser

Als Wachstumsparameter wurde die Bestimmung des Blattrosettendurchmessers durchgeführt. Für diese Analyse wurde der jeweils größte zu messende Rosettendurchmesser der einzelnen Pflanzen in [cm] aufgenommen. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen pro Linie betrug n≥10.

2.3.3 Bestimmung der Blattanzahl

Hierzu wurden alle sichtbaren Blätter einer Blattrosette gezählt. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen pro Linie betrug n≥10.

2.3.4 Oberflächenmaß der Blattrosette

Für die Oberflächenbestimmung einer Blattrosette wurde diese auf Klarsichtfolie gelegt, die Blätter gespreizt und der Habitus wurde mit einem Computerprogramm gescannt. Als nächstes wurden die Flächeninhalte der Blattrosetten mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA) bestimmt. Diese Analyse wurde an n≥10 Pflanzen pro Linie durchgeführt.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Verwendeter *Escherichia coli* Stamm und dessen Anzucht

In dieser Arbeit wurde für mikrobiologische Methoden wie Selektion und Vervielfältigung von Plasmiden der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5α verwendet. Diese *E.coli* Bakterien wurden entweder auf LB-Agar Platten oder in LB Flüssigkultur bei einer Wachstumstemperatur von 37°C angezogen. Falls erforderlich, wurden Antibiotika zur Selektion von Resistenzen auf Plasmiden und Vektoren zugegeben. Stammkulturen wurden erstellt, indem 500 µl der Bakterienkultur mit 500 µl 60% Glyzerin versetzt und bei -80°C gelagert wurden.

LB-Medium:

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrat
10 g	NaCl

auffüllen auf 1 l H_2O_{dest}.

LB- Agarplatten:

2 g	Trypton
1 g	Hefeextrat
2 g	NaCl
3 g	Agar

Auffüllen auf Endvolumen von 200 ml H_2O_{dest}.

Die Medien wurden autoklaviert, nach Abkühlen wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben.
Antibiotikakonzentrationen:
50 µg/ ml Endkonzentration Kanamyzin
50 µg/ ml Endkonzentration Carbenicillin

2.4.2 Herstellung TSS- kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung TSS-kompetenter Bakterien des DH5α-Stammes wurden diese in 5 ml LB-Medium (s. 2.4.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator angezogen. Danach wurde 1 ml der Übernachtkultur 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 (OD_{600} = 0,3-0,4). Die Kultur wurde dann für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die Sedimente wurden in 10 ml eisgekühltem TSS-Medium aufgenommen (Chung *et al*., 1989). Der Ansatz wurde 15 min auf Eis gestellt. Dann wurden 50 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

TSS-Medium:

10% (w/v)	Polyethylenglykol 8000
5% (w/v)	Dimethylsulfoxid
20-50 mM	$MgCl_2$
20-50 mM	$MgSO_4$

Der pH wurde mit NaOH auf pH 6,5 justiert und das Medium autoklaviert.

2.4.3 Transformation TSS- kompetenter *E. coli*

Zu 50µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz (s. 2.5.9.) oder 50-200 ng Plasmid-DNA gegeben und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, 1 min auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium (s. 2.4.1) versetzt. Die Kultur wurde für 1 h bei 37°C bei 100 rpm geschüttelt. Dieser Ansatz wurde auf eine LB-Agar-Platte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

2.4.4 Verwendeter *Agrobacterium tumefaciens* Stamm und dessen Anzucht

Agrobacterium tumefaciens (*A.tumefaciens*) des Stamms GV3101 *RifRGmR* wurden mit dem Helferplasmid pSoup (Hellens *et al*. 2000) entweder auf YEB-Platten oder in YEB-Flüssigkultur bei einer Wachstumstemperatur von 29°C angezogen. Falls erforderlich, wurden Antibiotika zur Selektion von Vektoren zugegeben. Stammkulturen wurden erstellt,

indem 500 µl der Bakterienkultur mit 500 µl 60% Glyzerin versetzt und bei -80°C gelagert wurden.

YEB-Medium:

0,5%	(w/v)	Bacto-Pepton
0,5%	(w/v)	Rindfleischextrakt
0,5%	(w/v)	Hefeextrakt
0,05%	(w/v)	$MgSO_4$
(1,5%	(w/v)	Bacto-Agar)

Die Medien wurden autoklaviert, nach Abkühlen wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben.

Antibiotikakonzentrationen:

25 µg/ ml Gentamycin
100 µg/ ml Kanamycin
150 µg/ ml Rifampicin
12 µg/ ml Tetracyclin

2.4.5 Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Zur Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien wurden diese als Vorkultur 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 OD_{600} ca. 0,04-0,08 betrug. Die Agrobakterien wurden dann ca. 4 h bis zu einer Zelldichte von OD_{600} = 0,5 angezogen. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (5 min, 4°C, 2500 x g) und in 40 ml eisgekühltem 1mM HEPES (pH 7,0) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Agrobakterien im gleichen Volumen eisgekühltem 1 mM HEPES (pH 7,0), 10% (v/ v) Glyzerin aufgenommen, wiederum sedimentiert und dann in 2 ml eiskaltem 1 mM HEPES (pH 7,0), 10% (v/ v) Glyzerin resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, für 30 s sedimentiert und in 200-400 µl HEPES/ Glyzerin 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_2PO_4

0,01%	(w/v)	$MgSO_4$
0,0001%	(w/v)	Biotin

2.4.6 Elektrotransformation von *A. tumefaciens*

2 µl DNA (0,5 µg) des zu transformierenden Vektors wurden auf 50 µl gefrorene, kompetente Agrobakterien pipettiert und 2 min auf Eis inkubiert. 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 1ml YEB-Medium versetzt und 2 h bei 28°C unter 100 rpm geschüttelt. Dann wurden die Zellen durch kurze Zentrifugation aufkonzentriert und auf YEB-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausgestrichen, die dann bei 28°C für zwei- drei Tage inkubiert wurden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Plasmid-DNA- Isolation aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Minimaßstab wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt. Hierbei wurden 2 ml Bakterienkultur 90 s bei 8000 rpm abzentrifugiert und das resultierende Pellet wurde in 250 µl Lösung 1 gelöst. Nach der Zugabe von 250 µl Lösung 2 wurden nach Invertieren und 2 min Inkubation bei Raumtemperatur 350 µl Lösung 3 zugegeben und erneut invertiert. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Zellen für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der resultierende Überstand (ca.810 µl) wurde mit 565 µl Isopropanol versetzt und erneut 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen, erneut für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und anschließend an der Luft getrocknet. Dieses Pellet wurde schließlich in 40 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Lösung 1:

2,5 ml	1 M Tris-HCL, pH 8
1 ml	0,5 M EDTA, pH 8
46,5 ml	H_2O_{dest}.

Lösung 2:

5 ml	10% SDS
10 ml	1 M NaOH
500 mg	RNAse (70U / mg)

auffüllen auf 50 ml Endvolumen mit H_2O_{dest}.

Lösung 3:

3 M NaAC, pH 5

2.5.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Um einfach und schnell den Genotyp von T-DNA-Insertionslinien zu bestimmen, wurde genomische DNA mittels PCR-basiertem Verfahren untersucht. Zur Isolation von genomischer DNA wurden ein bis drei Blätter der Pflanze in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer Glaskugel (ø 0,5 cm) und 250µl Extraktionspuffer transferiert. Diese Reaktionsgefäße wurden dann mit Hilfe eines Tissue-Lysers (Quiagen, Hilden) geschüttelt und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher die gelöste DNA enthält, wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zur Fällung mit 500 µl Isopropanol versetzt. Dieser Ansatz wurde geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Gefäße für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das resultierende Pellet wurde an der Luft getrocknet. Zur Resuspension der DNA wurden 80 µl 1 × TE Puffer zugegeben und das Pellet resuspendiert. Diese DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Extraktionspuffer:

0,2 M	Tris-HCL, pH 7,5
0,25 M	NaCl
0,025 M	EDTA
0,5 %	SDS

2.5.3 Isolation von RNA aus Pflanzengewebe

Für die RNA Extraktion aus Pflanzenmaterial wurden 50-100 mg hiervon in ein Reaktionsgefäß abgewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur Extraktion von RNA mit dem Bohrhomogenisator (RW 16, IKA-Werke, Staufen) oder einem Porzellan-Mörser unter Zugabe von 1 ml Z6-Puffer gemörsert. Anschließend wurden 500 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol im Verhältnis 25/ 24/ 1 dazugegeben und geschüttelt. Die Proben wurden nun mit 12000 g bei 4°C für 10 min zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erwirken. Die wässrige Phase mit den enthaltenen Nukleinsäure Molekülen (~ 700 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden 1/ 20 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen 100% Ethanol zu der wässrigen Phase zugegeben und zentrifugiert (4°C, 7500 x g, 5 min). Der Überstand wurde nun entfernt und das gefällte RNA-Pellet zunächst mit 500 µl 3 M DEPC-Wasser-haltiger Natriumacetatlösung (pH 5) und im Anschluss mit DEPC-Wasser-haltigem Ethanol (70%) gewaschen. Das Pellet wurde nun für 30 min an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde schließlich in 50–100 µl DEPC-H_2O resuspendiert.

Der Z6 Puffer (s.u.) muss kräftig gerührt werden, bis die Lösung klar wird, dann wird der pH mit NaOH auf pH 7 justiert und der Puffer autoklaivert.
Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde einerseits eine RNA-Gelelektrophorese wie in 2.5.5 beschrieben durchgeführt und andererseits die Konzentration und Reinheit am Nano Drop bestimmt (s. 2.5.6)

Z6 Puffer (pH 7):

8 M	Guanidiniumhydrochlorid
20 mM	MES
20 mM	EDTA, pH 7
0,7 % (v/ v)	β-Mercaptoethanol (frisch)

DEPC-H_2O:
0,2 % (v/ v) DEPC

2.5.4 DNAse Verdau

Um die noch vorhandene DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau mit einem kommerziellen Kit von Ambion® durchgeführt. Die Durchführung fand nach Empfehlung des Herstellers statt.

Reaktionsansatz:

2 µg	RNA
1,5 µl	10x Puffer
0,8 µl	DNase
15 µl	H_2O_{dest}.

2.5.5 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 10 x Auftragepuffer gegeben wurde, in die zurückgebliebenen Taschen im Gel geladen werden. Zur Größenbestimmung der aufgetragenen DNA-Fragmente wurde zusätzlich in einer eigenen Tasche 2-15 µl 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 cm^2 elektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufrichtung der DNA-Fragmente ist dabei vom (-) zum (+) - Pol der angelegten Gleichspannung. Anschließend wurden die DNA-Banden auf einer UV-Durchlichtapparatur (λ=254 nm) sichtbar gemacht. Über ein angeschlossenes Geldokumentationssystem (Fa. Intas, Göttingen) konnten die Bandenmuster als Foto sowie als Bilddateien (TIFF-Format) archiviert werden.

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

2 M	Tris-HAC, pH 1,5
50 mM	EDTA

1 kb-Ladder:

100 µl	10 × Auftragepuffer
100 µl	1kb Ladder (1 µg/ µl)
800 µl	$H_2O_{dest.}$

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
100 mM	EDTA

Ethidiumbromid-Lösung:

1 % (w/ v) Ethidiumbromid

2.5.6 Quantifizierungsmethoden von DNA und RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl der RNA-Präparation (s. 2.5.3) am Nano-Drop 2000 analysiert (Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific, Schwerte). RNA absorbiert, ebenso wie DNA, UV-Strahlung bei einer Wellenlänge von λ= 260 nm maximal. Aus der Absoprtion von Lösungen bei dieser Wellenlänge können die

Konzentrationen bestimmt werden. Eine Extinktionsdifferenz Δ A_{260}= 0,025 entspricht einer RNA-Konzentration von 1 µg/ ml. Eventuelle Verunreinigungen durch Proteine, Kohlenhydrate und Phenolderivate können durch die parallele Bestimmung der Absorptionen bei λ= 280 nm und λ= 320 nm abgeschätzt werden. Dabei hat reine RNA eine Absorption bei λ= 320 nm gegen 0 tendierend und einen Quotient A_{260}/ A_{280}, der zwischen 1,6 und 1,7 liegt.

2.5.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA kann innerhalb spezifischer palindromischer Sequenzen durch Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Die Spaltung von DNA wurde mit den vom Hersteller New England Biolabs (Frankfurt a. Main) empfohlenen 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.

2.5.8 Dephosphorylierung von DNA

Um linearisierte DNA zu dephosphorylieren wurde 1 U SAP (alkalische Phosphatase) und 1 x Dephosphorylierungspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl zur DNA hinzugefügt. Der Ansatz mit glatt endenden (*blunt-end*) DNA-Fragmenten wurde für 60 min bei 65°C, der Ansatz 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 Wizard PCR Purification Kits (Promega, Mannheim) nach beiliegendem Protokoll gereinigt.

2.5.9 Ligation von DNA Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase verbindet DNA-Fragmente mit 5´-Phosphatgruppen mit solchen, die endständige 3´-OH-Gruppen tragen. 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 und 3:1 gemischt und für einen 20 µl-Ansatz weiterhin 2 µl 10x Ligase-Puffer und 1-2 U T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim) zugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 12°C. Anschließend wurde der Ansatz direkt für die Transformation kompetenter Bakterienzellen verwendet.

2.5.10 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur enzymatischen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen (Saiki *et al*. 1985; Saiki *et al*. 1988). Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf einem sich wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Bindung von spezifischen reziproken Oligonukleotiden an die eingesetzte Matrizen-DNA und anschließender Neusynthese der DNA-Stränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase). 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 der Reaktionsansatz anschließend auf ein Agarose-Gel geladen und die Größe des PCR-Produktes bestimmt. Im Folgenden wird der in dieser Arbeitete standardisierter PCR-Ansatz und das Standardprogramm aufgezeigt, als Taq-Polymerase diente die Go-Taq® (Promega, Mannheim).

Tabelle 5: Zusammensetzung des standardisierten PCR Ansatzes

Matrizen DNA	0,2-1 µg
Vorwärts Primer	0,25µl (µM/ µl)
Rückwärts Primer	0,25µl (µM/ µl)
Taq-Polymerase	0,05 µl
dNTPs	0,25µl (je 10mM)
10 × Puffer	1 ×
H_2O	Endvolumen 20 µl

Tabelle 6: Protokoll der einzelnen Schritte einer standardisierten PCR

1	95°C	5 min	Initiierende Denaturierung
2	95°C	30 s	Denaturierung
3	55°C #	30 s	Anlagerung der Primer
4	72°C	60 s/ kb	Elongation
5	2-4	25-35 × wiederholen	
6	72°C	10 min	Finale Elongation
7	16°C	∞	Ende

= Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide hängt von ihrer Basensequenz ab

2.5.11 Colony- PCR

Um eine schnelle Überprüfung eines transformierten Konstruktes in Bakterienzellen nachzuweisen, wurde die Colony- PCR durchgeführt. Es wurde ein 20 µl Standard- PCR Volumen angesetzt und Einzelkolonien der Selektion mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Die entsprechende PCR Reaktion wurde dann mit 30 Zyklen durchgeführt.

2.5.12 Sequenzierung eines DNA-Abschnitts

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach empfohlenen Angaben bei GATC Biotech AG, Köln durchgeführt (http://www.gatc-biotech.com/nc/de/home.html).

2.5.13 cDNA Synthese mittels Reverser Transkription

Um eine reverse Transkription von RNA durchzuführen wird die Reverse Transkriptase eines retroviralen Enzyms benutzt. Die zuvor extrahierte Pflanzen RNA wird als Matrize für die Neusynthese von komplementärer DNA (cDNA) verwendet. Es werden cDNA-Kopien der Matrizen RNAs erstellt. Für eine Reverse Transkription mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurde zuerst nach 2.5.6 die Konzentration der RNA-Lösung bestimmt und so verdünnt, dass 2 µg RNA umgeschrieben werden konnten. Zu diesem Volumen wurde 1 µl Oligo-dT (0,5 µg/ µl, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) gegeben. Mit H_2O_{dest} wurde auf ein Volumen von 13 µl aufgefüllt, die Mixtur für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5 x First-Strand-Puffer 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 Reaktionsbedingungen waren 60 min auf 42°C. 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 eine PCR verwendet werden.

2.5.14 Semi- quantitative PCR

Diese Methode der PCR ermöglicht eine semi- quantitative, relative Quantifizierung für das Verhältnis des Zielmoleküls zu der Anzahl von endogenen Referenztranskripten. Dafür werden aus der gleichen Nukleinsäureprobe (cDNA Synthese s. 2.5.13) in zwei getrennten PCR-Reaktionen das Ziel und das Referenzgen amplifiziert. In diesen Reaktionen wurden *Primer* eingesetzt, die in der einen Reaktion spezifisch für die cDNA von Interesse sind und in der anderen Reaktion spezifisch für das Referenzgen *Aktin II* (At3g18780) sind. Bei

Bedarf wurde jeweils ein Reaktionsansatz der parallel Amplifiziert wurde, nach einer unterschiedlicher Anzahl von Zyklen gestoppt. Die erhaltenen PCR Produkte wurden auf ein Agarosegel (s.o.) aufgetragen und anhand der resultierenden Bandenstärke die relative Häufigkeit der Ausprägung quantifiziert.

2.6 Verwendete Vektoren und deren Herstellung

2.6.1 Verwendete Vektoren

In dieser Arbeit wurde zur Klonierung von PCR Fragmenten und deren Proliferation der Klonierungsvektor pJET 2.1 (Thermo Scientific) verwendet.
Für die Transformation von Agrobakterien (s. 2.4.6) und damit für die Agrobakterien vermittelte Transformation von Pflanzen wurde ein innerhalb der Arbeitsgruppe modifizierter Pflanzenvektor verwendet, der pGreenII (Hellens *et al*., 2000; Fahnenstich, 2007).

2.6.2 Klonierung der Glykolat Dehydrogenase

Die Glykolat Dehydrogenase wurde aus der Grünalge Micromonas sp. (*mGlcDH*) In Kooperation mit BASF Plant Science (Limburgerhof) extrahiert und mit GeneArt® synthetisiert und Codon optimiert (GeneArt®, LifeTechnologies, Darmstadt). Diese *Coding Sequence* des Gens wurde bereitgestellt und nach Erhalt kontrolliert und sequenziert. Die *Coding Sequence* der *mGlcDH* betrug 2814 Basen. Zur Klonierung in den gewünschten Vektor wurden zwei Restriktionsschnittstellen, AgeI und BamHI am 5‘-Ende bzw. 3‘-Ende verwendet.
Um die Expression und die korrekte subzelluläre Lokalisation des Transgens zu steuern, wurde ein modifizierter pGreen II Vektor hergestellt, der die Promotorsequenz und die Transitpeptidsequenz der kleinen RubisCO Untereinheit (rbS3C, X66072) aus genomischer DNA von *S. lycopersicum* besitzt. Dieses Modul aus Promotorsequenz und Transitpeptidsequenz wurde aus vorherigen Arbeiten verwendet und mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen NotI und AgeI in den gewünschten pGreenII integriert (Fahnenstich, 2007). Die Resistenzkassette des Pflanzenvektors trug das Gen *nos-KAN* für eine Kanamyzin Resistenz.

2.7 Proteinbiochemie

2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration von Proteinen in Lösungen zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) benutzt. Dies wurde mit kommerziell erworbener Roti®Quant Lösung durchgeführt (Roth, Karlsruhr). Das Prinzip der hier zugrunde liegenden Farbreaktion ist, dass das in der Roti®Quant 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 λ= 470 nm, im anionischen Zustand bei λ= 595 nm.
Die Ansätze wurden wie angegeben vorbereitet und deren Absorptionen bei A_{595} nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min bis maximal 1 h bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Photometers bestimmt (NovospecII, GE Healthcare). Als Nullwert diente die Absorption einer Küvette bei λ= 595 nm ohne Protein. Die Eichgerade wurde benutzt um die Proteinkonzentration zu berechnen.

Reaktionsansatz für die Eichgerade:

10 – 200 µl / Konzentrationsreihe	BSA (Bovine Serum Albumin, 0,1 mg/ ml)
10 µl	Extraktionspuffer des Proteins
200 µl	Roti® Quant
jeweils auffüllen auf 1 ml	$H_2O_{dest.}$

Reaktionsansatz der Proteinproben:

10 µl	Proteinprobe
200 µl	Roti® Quant
790 µl	$H_2O_{dest.}$

2.7.2 SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Minigel-Apparatur (2050 Midget, GE Healthcare) hergestellt. Die Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 20µl pro Tasche aufgetragen. In eine Tasche wurde der Molekulargewichtsmarker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) mit 5µl aufgetragen. Dann wurden die Proben 10 min bei 10 mA einlaufen gelassen, 2 min bei 40 mA fokussiert und letztlich 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:

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

Trenngel; 12,5%:

25 % (w/ v)	Trenngelpuffer
42 % (w/ v)	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5: 1)
0,05 % (w/ v)	APS
0,05 % (v/ v)	TEMED

1 × Elektrodenpuffer:

250 mM	Tris-HCL
0,5 % (w/ v)	SDS
1,92 M	Glycin

5 x Probenpuffer:

312,5 mM	Tris-HCL, pH 6,8
50 % (w/ v)	Glycerin
12,5 % (w/ v)	SDS
12,5 % (v/ v)	ß-Mercaptoethanol
25 % (w/ v)	Bromphenolblau

2.7.3 Proteingelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die Proteinfärbung erfolgte modifiziert nach Weber und Osborn (Weber und Osborn, 1969). In der Färbelösung (s.u.) wurde das SDS- Gel mindestens 30 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung transferiert. Hier wurde das Gel solange inkubiert bis es zur Entfärbung des Gelhintergrundes gekommen war und nur die

Proteinbanden zu erkennen waren. Bei Bedarf konnte das gefärbte SDS-Gel gescannt und dadurch dokumentiert werden.

Färbelösung:

0,5% (w/ v)	Coomassie Brilliant Blue R250
40% (w/ v)	Methanol
10% (v/ v)	Essigsäure (99%)

Entfärbelösung:

40% (w/ v)	Methanol
10% (v/ v)	Essigsäure (99%)

2.7.4 Messung der NAD-ME Enzymaktivität in Blattextrakten

Das NAD- abhängige Malat Enzym katalisiert die Decarboxylierung von einem Mol Malat unter gleichzeitiger Oxidation dieses zu einem Mol Pyruvat. Unter Reduktion von einem Mol NAD^+ zu einem Mol NADH wird ein Mol CO_2 freigesetzt. Die Enzymmessung zur Quantifizierung der NAD-ME Aktivität wurde mit Extrakten löslicher Proteine aus Blattextrakten durchgeführt. Es wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Blattmaterial verwendet. Hier wurde ein Verhältnis von 10 µl Puffer pro 10 mg Blattmaterial angestrebt. Die Methode wurde nach dem Protokoll von Tronconi und Kollegen durchgeführt (Tronconi *et al*., 2008).

Zuerst wurde das Blattmaterial in Puffer B aufgenommen und gevortext. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit dem gelösten Protein weiterverwendet. Mit diesem Proteinextrakt konnte nun die Quantifizierung der NAD-ME Aktivität in einer Multiplatte (96 Well- Microplates, Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit einem Endvolumen des Messansatzes von 200 µl durchgeführt werden. Hierfür wurden 10 µl bis 50 µl des Proteinextraktes eingesetzt. Der Assay wurde mit Malat gestartet. Die Reduktion von NAD^+ zu NADH wurde bei λ=340 nm detektiert und in einer Kinetik am Platereader (Synergy HT, Bio-Tek) aufgezeichnet.

Puffer B:

50 mM	MES-NAOH pH 6,5
5 mM	$MnCl_2$
1 mM	EDTA

1 mM	PMSF
10 mM	ß-Mercaptoethanol
0,05 % (v/ v)	Triton X-100
20 % (v/ v)	Glycerol

Messpuffer:

50 mM	MES-NAOH, pH 6,5
4 mM	NAD^+
10 mM	Malat, pH 7
5m M	DTT
10 mM	$MnCl_2$

2.7.5 Messung der GlcDH Enzymaktivität in Blattextrakten

Die Glykolat Dehydrogenase aus Grünalgen setzt Glykolat zu Glyoxylat um. Hierbei wird ein Elektronenakzeptor reduziert, der bisher unbekannt ist (Nelson und Tolbert, 1970). Aus diesem Grund wird für einen Enzymaktivitäts- Messung Dichlorphenolindophenol (DCIP) als künstlicher Elektronenakzeptor verwendet. Eine Änderung der Absorption wird bei λ= 600 nm durchgeführt. Zuerst wird das Blattmaterial der transgenen mGlcDH Pflanzenlinien in flüssigem N_2 gemörsert und mit Extraktionspuffer gelöst (100 µl/ 100mg Blattmaterial). Die Proben werden dann bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand wird für die Enzymaktivitäts- Messung in Multiplatten (96 Well- Microplates, Greiner Bio- One, Frickenhausen) benutzt. Das Endvolumen des Messansatzes betrug 200 µl, wobei 20- 50 µl Proteinextrakt eingesetzt wurden. Der Messansatz wurde angesetzt und die Reaktion mit Glykolat gestartet und am Platereader (Synergy HT, Bio-Tek) in einer Kinetik aufgezeichnet.

Extraktionspuffer:

50 mM	Phosphat Puffer, pH 7,8
5 mM	$MgCl_2$
2 mM	EDTA
1 mM	PMSF
0,05 % (v/ v)	Triton X-100
20 % (v/ v)	Glycerol

Messpuffer:

50 mM	Phosphat Puffer, pH 8,5
0,5 mM	EDTA

5 mM	Malat, pH 7
200 µM	DCIP
5 mM	$MgCl_2$

2.8 Bestimmung photosynthetischer Parameter

2.8.1 Bestimmung der CO_2- Assimilationsrate

Die Gaswechselmessungen an Blättern der GMK Pflanzen wurden in Kolaboration mit dem Labor von Susanne von Caemmerer in Canberra, Australien durchgeführt. Die Pflanzen wurden mit zwei LI-6400 (Li-Cor, Lincoln, USA) in einer Pflanzenkammer (TRIL-1175, Thermoline Scientific Equipment, Smithfield, Australia) platziert. Die Temperatur betrug 25°C. N_2 und O_2 wurden in die benötigte Konzentration durch einen Massenflussmesser (OMEGA, Engineering, Inc., Stanford, USA) gemischt und der Kammer zugeführt. Die Gaswechselmessungen wurden dann bei einer Belichtung von 1000 µE, einer Blatttemperatur von 25°C und einem Wasserdampfdruck zwischen Luft und Blatt von 10 mbar durchgeführt. Die Messung wurde begonnen mit der Messung der CO_2- Assimilation unter ambientem CO_2 Partialdruck von 348 µbar und 21% O_2, mit einer Dauer von 30 min. Der CO_2 Partialdruck wurde dann Schrittweise erniedrigt und der Kompensationspunkt (Γ) wurde über die Steigung der CO_2 Kurve der CO_2 Assimilation berechnet. Die Messung wurde im Folgenden mit niedrigen CO_2 Konzentrationen und sich verändernden Sauerstoffkonzentrationen wiederholt (5, 15, 2, 7, 10 und 30 % O_2).

2.8.2 Puls- Amplituden- Modulations- Fluorometrie

Die dynamischen Kinetik der Chlorophyllfluoreszenz wurden mit Hilfe der Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometrie (PAM) gemessen (Z100 Fluor Cam geschlossen, Photon System Instruments, Brno, Tschechische Republik). Im Verlauf der Messung wurden die Parameter variable Fluoreszenz (Fv), Grundfluoreszenz dunkeladaptierter Blätter (F0) und maximale Fluoreszenz dunkeladaptierter Blättern (Fm) bestimmt (Schreiber et al., 1986). Für diese Messung wurden dunkeladaptierte Blätter von *A. thaliana* Pflanzen, mit einem Alter von vier Wochen verwendet. Nach einer Dunkeladaption von 10 min wurde nach Hersteller Software Fluorcam 7 das Programm „act1“ durchgeführt. Aus den ermittelten Parametern wurde das F_V/ F_m Verhältnis berechnet (Schreiber *et al*., 1986), welches als Indikator für die Intaktheit des Photosystems II angesehen wird.

2.9 Messung der Gehalte physiologisch interessanter Substanzen

2.9.1 Chlorophylle und Carotinoide

Die Pigmentanalyse wurde mit Blättern von Pflanzen mit einem Alter von fünf Wochen durchgeführt. Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill gemörsert und im Dunkeln gehalten. Das gemörserte Material wurde gewogen und die Pigmente mit 80% Aceton gelöst. Dieser Extrakt wurde mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (LiChrospher 100 RP-18 Säule mit 5-bm Partikelgröße, Merck, Darmstadt), wie in Färber *et al*., 1997 beschrieben, analysiert.

2.9.2 Bestimmung der löslichen Zucker

Zur Extraktion der löslichen Zucker und der Stärke aus dem Blatt von *A. thaliana* wurden gefrorene und pulverisierte Proben (50- 100 mg) mit 750 µl 80% Ethanol versetzt, gevortext und 15 min bei 70°C inkubiert. Dann wurden die Proben für 5min bei 14000rpm zentrifugiert und der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Auf das Pellet wurde ein zweites Mal 750 µl Ethanol mit 80% gegeben, wiederrum gevortext und 15 min bei 80°C inkubiert. Die Zentrifugation wurde wie oben wiederholt und der folgende Überstand zu dem ersten pipettiert. Dieser Überstand, der die löslichen Zucker enthielt, wurde in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator (RVC 2-25, Christ, Osterode am Harz) zur Trocknung eingeengt. Die lyophilisierten ethanolischen Extrakte wurden in 500 µl $H_2O_{dest.}$, mit einem Rührspatel manuell resuspendiert und anschließend bei 14000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Parallel wurden die Enzyme der Stärkehydrolyse für 10 min bei 95°C deaktiviert und die Proben ebenfalls, wie oben abzentrifugiert.
Mit diesen Extrakten konnte nun die Quantifizierung der löslichen Zucker durchgeführt werden. Dies wurde in einer Multiplatte (96 Well- Microplates, Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit einem Endvolumen von 200 µl durchgeführt. Es wurden 5 µl der Stärkeextrakte und 50 µl der Zuckerextrakte eingesetzt. In den Multiplatten wurde am Platereader (Synergy HT, Bio-Tek) ein gekoppelter enzymatischer Test durchgeführt (Bergmeyer, 1970; Stitt *et al*., 1989). Diese Methode setzt sukzessiv die Zucker in Glucose-6-Phosphat um, welches schließlich von der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase unter Reduktion von NAD^+ zu NADH (Messbar bei λ= 340 nm) oxidiert wurde (s. Abb. 12).

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 wurde in der Multiplatte mit den einzelnen Proben vereint und eine Bestimmung des Anfangswertes im Plate-Reader durchgeführt (λ=340 nm; Kinetik). Die Platte wurde dann mit Hilfe des metallenen Stempels mit 96 Nadeln mit 1 µl einer Hexokinase Lösung (750U/ ml) beladen (Sonderanfertigung der Werkstatt des botanischen Instituts, Universität zu Köln). So konnte simultan in allen Wells die enzymatische Reaktion gestartet werden und die Multiplatte im Plate Reader weiter analysiert werden. Die Absorption stieg an und erreichte ein Plateau. Jetzt wurde die Messung erneut angehalten und mit Hilfe des metallenen Stempels wurde in jedes Reaktions-Well 1 µl Phoshoglucoisomeraselösung (350 U/ ml) zugegeben und die Messung wurde weitergeführt. Ebenso wurde mit dem letzten Enzym verfahren, hier wurde 1 µl einer Invertaselösung (750000 U/ mg/ ml) zugegeben und die Messung weiter verfolgt.

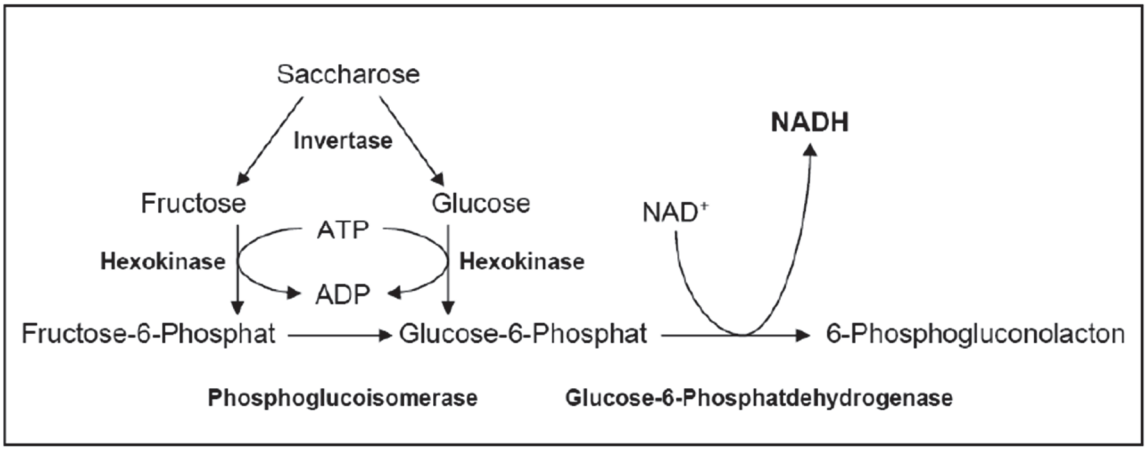

Abbildung 12: Schema der enzymatischen Reaktion zum Nachweis von Saccharose, Fructose und Glucose. Entnommen aus Fahnenstich, 2007.

2.9.3 Elementar Analyse

Die Stabilisotopenverhältnisanalyse ist eine Methode zur präzisen Messung des Konzentrationsverhältnisses zweier stabiler Isotope eines bestimmten chemischen Elements. Mit dieser Methode werden die stabilen Isotope ^{15}N, ^{13}C in Verbindung mit einer Elementaranalyse quantifiziert. Für diese Analyse wurden Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen geerntet und zu einem feinen Pulver in flüssigem Stickstoff gemörsert, anschließend in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator gefriergetrocknet (RVC 2-25, Christ, Osterode am Harz). Mit Hilfe des Isoprime 100 Isotope-Ratio Massenspektrometers, gekoppelt an einen Elementaranalysator (vario ISOTOPE cube, Elementar, Hanau) wurde nach den Anweisungen des Herstellers die Stabilisotopenanalyse durchgeführt.

2.9.4 Umfangreiche Analyse des Primärmetabolismus mittels GC-MS

Für eine Analyse der primären Metabolite wurde eine Methode der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-ToF-MS) verwendet. Die Analysen wurden in zwei verschiedenen Laboren durchgeführt. Zum einen wurden die Messungen im Institut Biochemie der Pflanzen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Weber durchgeführt und zum anderen, in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Fernie, am Max Planck Institut in Golm.

2.9.4.1 Extraktion und Probenvorbereitung

In der Arbeitsgruppe von Dr. Alisdair Fernie wurde die Probenextraktion wie folgt durchgeführt. Die Methode zur Extraktion und Derivatisierung der GC-MS Proben stellt eine leichte Modifikation bereits publizierter Methoden dar (Lisec *et al*., 2006).
Gefrorene Blattproben (50 mg) wurden zuerst mit 1,4 ml Methanol, anschließend mit 60 µl Robitiol-Stocklösung (0,2 mg/ml in H_2O) und 20 µl C13-Sorbitol-Stocklösung (0,2 mg/ml in H_2O), als interne Standards für eine Quantifizierung versetzt. Die Mischung wurde 15min bei 70°C geschwenkt und bei 14000 rpm für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 750 µl Chlorophorm und 1,5 ml H_2O_{dest}. vermischt und für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert um die polare von der apolaren Phase abzutrennen. Anschließend wurde aus der polaren (oberen) Phase 150 µl in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet (Vacuum Concentrator, Thermo Scientific).
Das resultierende Pellet wurde in 40 µl Methoxyaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridine) resuspendiert und für 2 h bei 37°C derivatisiert. Danach wurden 70 µl MSTFA zugegeben (*N*-methyl-N-[trimethylsilyl] trifluoroacetamide), erneut gevortext und für 30 min bei 37°C inkubiert. MSTFA silyliert Carboxyl-, Hydroxyl-, Amin- und Amidgruppen. Durch die Silylierung werden die Siedepunkte der Metabolite abgesenkt, wodurch sie während des GC-Laufs von der Säule eluieren können. Die derivatisierten Proben wurden in Glas Phiolen mit Mikroeinsätzen überführt und mit einem Deckel fest verschlossen (Infochroma AG, Zug, Schweiz). Die Proben waren so bereit zur Messung. Es wurden nie mehr als 24 Proben vorbereitet, da die Proben nach 24 h degenerierten. Es wurde 1 µl dieser Proben für die Injektion verwendet.

2.9.4.2 Gaschromatografie

Das verwendete GC-MS- System war ein Gas-Chromatograph gekoppelt an ein Flugzeitmassenspektrometer (Pegasus III, Leco): Ein Autosampler System injizierte die Proben. Als Trägergas wurde Helium verwendet, welches mit einer konstanten Flussrate von 2 ml/ s zugeführt wurde. Die Gas-Chromatographie wurde in einer 30m DB-35 Säule durchgeführt. Die Injektionstemperatur betrug 230°C, die Temperatur von *transfer-line* und Ionenquelle betrug 250°C. Die Starttemperatur der Säule betrug (85°C) und stieg dann mit einer Rate von 15°C/ min auf 360°C an. Zuerst musste das Lösungsmittel eluieren und nach

180 s wurden am Massenspektrometer 20 Scans pro Sekunde aufgenommen, in einem m/z Bereich von 70-600. Die Chromatogramme und Massenspektren wurden mit Hilfe des Programs Chroma TOF 1.0 (Leco) und TagFinder 4.0 ausgewertet.

2.9.4.3 Varianten der GC-MS Analyse

Im Labor von Prof. Dr. Weber wurde ein leicht verändertes Protokoll zur GC-MS Analyse von Pflanzenmaterial verwendet. Im Folgenden sind Unterschiede zum Verfahren beschrieben in 2.9.4.1 und 2.9.4.2 aufgeführt:
Die Extraktion des Pflanzenmaterials wurden in 2,5 Volumen Methanol, 1 Volumen Chloroform, 15 µl/ 45 ml Ribitol (60 mM) und 1 Volumen H_2O MilliQ aufgenommen. Bei 20,000 g für 2min abzentrifugert und der Überstand (1 ml) wurde weiter verwendet. Dieser wurde mit 5 µl 500 mM Phenylalanin-d5 + Valin-d8 versetzt und Gefriergetrocknet.
Die Folgeschritte wurden mit einem Autosampler und einem Injektionssystem durchgeführt (Gerstel automatic liner exchange system; Gerstel CIS cold injection system, Gerstel, Mühlheim): Es wurden 10 µl Methoxyaminhydrochlorid (20 mg/ ml in Pyridine) zu den Proben zugegeben und der Ansatz 90 min bei 30°C inkubiert. Außerdem wurden 90 µl MSTFA zugegeben. Die Chromatographie wurde mit Hilfe von Agilent 7890A GC durchgeführt. Die Metabolite wurde in einer EI Quelle ionisiert und über TOF-MS detektiert (Waters, Eschborn). Die Datenauswertung wurde mit Hilfe von MassLynx und QuanLynx Software durchgeführt (Waters, Eschborn).

2.10 Histologische, histochemische und mikroskopische Methoden

2.10.1 Messung des Blattquerschnitts von Blättern

Für die Bestimmung der Dicke von *A. thaliana* Blättern wurden 5 Wochen alte Blätter, derselben Position benutzt. Die Dicke sollte mit Hilfe von eingebetteten Blattstreifen analysiert werden. Hierzu wurden das Blatt in Querstreifen geschnitten und für 3 h in 2,5% Glutaraldehyd (v/ v) und 100 mM NaPi (pH 7,2) fixiert und anschließend dreimal mit 100 mM NaPi gewaschen. Die Proben wurden dann durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe dehydriert (jeweils 30 min in 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 2 x 100 %EtOH) und zweimal in für 10 min in Aceton (100%) inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke in ein Aceton/ Araldit Gemisch transferiert (Verhältnis 1:1 (v/ v)) und für 16 h inkubiert. Dann konnte das Aceton verdampfen und die Blattstücke wurden in frisches Araldit überführt, für 3 h inkubiert und dann in frischem Araldit für 24 h bei 65°C polymerisiert. Querschnitte von 2 µm Dicke wurden mit Hilfe eines Rotations-Mikrotom mit einem Glasmesser (Reichert Om

U2, Wien) hergestellt, die dann auf Objektträger aus Glas, mit Gelatine Beschichtet gelegt wurden. Diese Objektträger wurden dann für die Lichtmikroskopische-Untersuchung gefärbt. Hierzu wurde eine Färbelösung aus 0.05% Toluidinblau und 0.1 M NaPi, pH 6.8 hergestellt. Die Färbelösung wurde auf die Objekte getropft, 30 s bei 95°C inkubiert und mit H_2O abgespült. Die Querschnitte wurden an einem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse E800), welches mit einer Digitalkamera ausgestattet war analysiert. Die Dicke des Blattquerschnittes wurde zwischen der Mittelrippe und den ersten beiden Lateralvenen links und rechts davon untersucht. Hierzu wurde mit dem Programm Diskus (Hilgers) gearbeitet. Es wurden ≥ 80 Messungen pro untersuchter Pflanzenlinie an mindestens drei Pflanzen durchgeführt.

2.10.2 Handschnitte von Blättern

Die Handschnitte zur Lichtmikroskopischen Analyse von Blattquerschnitten wurden manuell mit Hilfe einer Rasierklinge an frischen Blättern durchgeführt. Die Schnitte wurden dann in Leitungswasser gelegt und mikroskopisch analysiert wie in 2.10.1 beschrieben.

2.11 Statistische Methoden und Berechnungen

2.11.1 Standardabweichung

Die Standardabweichung (stabw) ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um den ermittelten Mittelwert und wurde nach folgender Formel berechnet:
Formel 1:

$$stabw = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(xi - \bar{x})}{(n-1)}}$$

mit xi= Einzelwert, $\bar{x}$ = Mittelwert und n = Anzahl der Einzelwerte

2.11.2 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.
Formel 2:

$$Standardfehler = \frac{stabw}{\sqrt{n}}$$

mit *stabw*= Standardabweichung (s. 2.11.1) und n = Anzahl der Einzelwerte

2.11.3 Student‘s t-Test

Der t-Test (oder auch Student´s t-Test) wird verwendet, um zu testen, ob zwei Gruppen von Messwerten 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 eine >95%ige Wahrscheinlichkeit für die Verschiedenheit der beiden Wertegruppen gegeben. Der Test wurde 1908 entwickelt von W.S. Gosset unter dem Pseudonym „Student“ veröffentlicht (Gosset 1908).

2.11.4 Erstellung der *Heat Map*

Für eine Gesamtübersicht der GC-MS Daten (aus 2.9) wurde eine *Heat Map* erstellt. Hierzu wurden mit dem natürlichen Logarithmus[2] die relativen Änderungen der Mittelwerte der Metabolite im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Diese Werte werden dann in einer Farbkodierung dargestellt, indem grün niedrigere Werte im Vergleich zum Wildtyp darstellt und rot höhere Werte im Vergleich zum Wildtyp. Die Berechnung und Darstellung wurde mit der Software Microsoft Excel 2013 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Der chloroplastidäre, katabolische Glykolat Stoffwechselweg

Die GMK Linien GMK 3 und GMK 9 wurden für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet. Diese Arbeit konzentrierte sich darauf, die Pflanzenlinien hinsichtlich ihrer Phänotypen im Vergleich zu der einfachen und der zweifachen transgenen Linie GO und GO-MS zu analysieren. Dies sollte mit besonderem Fokus auf die Biomasseproduktion durchgeführt werden.

3.1.1 Analyse des Phänotyps und der Biomasseproduktion

Die unabhängigen, etablierten GMK Pflanzenlinien, welche homozygot für alle drei Transgene waren und diese auch nachweislich exprimierten, wurden in den Vorarbeiten zu dieser Arbeit auf die zwei stärksten Linien GMK 3 und GMK 9 limitiert (vgl. Maier *et al*. 2012; s. 1.8). Diese wurden nun mit besonderem Fokus auf eine Veränderung der Biomasse und einer möglichen Komplementation des kleinwüchsigen, gelblichen Phänotyps der GO und GO-MS Pflanzen phänotypisiert. Unter Kurztagbedingungen wurde optisch eine größere Blattrosette der Linie GMK 3 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Die Parentallinie GO-MS, sowie die Linie GMK 9 wiesen eine kleinere Blattrosette auf (s. Abb. 13). Die Blätter der GMK Linien waren optisch farblich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

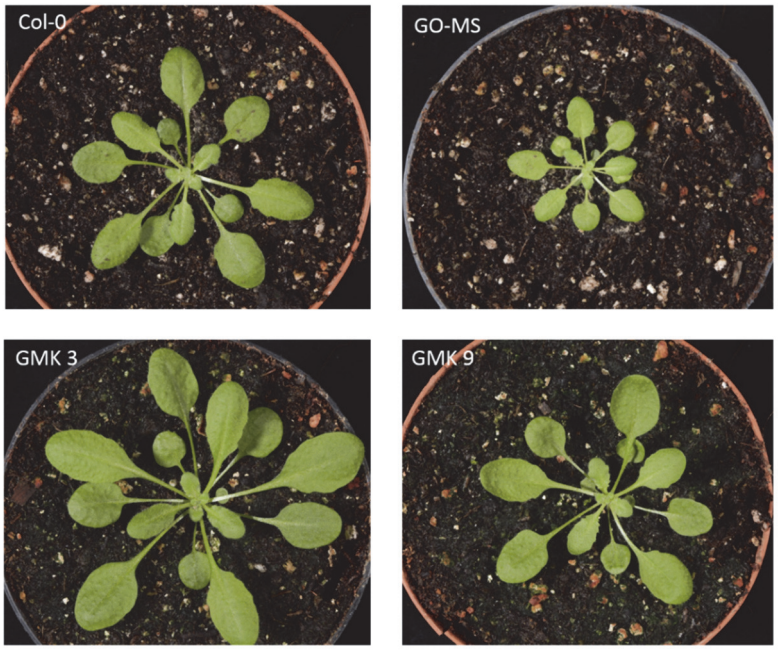

Abbildung 13: Photographische Aufnahmen von repräsentativen Col-0 und GO-MS Pflanzen im Vergleich mit den Linien GMK 3 und GMK 9, welche den gesamten GMK Stoffwechselweg exprimieren. Die Pflanzen wurden vier Wochen bei 130 µE unter Kurztagbedingungen angezogen.

Eine Analyse der Anzahl der Blätter zeigte bei der GMK 3 Linie im Vergleich zum Wildtyp mit 40,9± 2.1 zu 34,7± 1.5 signifikant mehr Blätter. Es wurden außerdem signifikante Erhöhungen des Frischgewichts in der GMK 3 Linie (1,77 g ± 0.19 g) im Vergleich zum Wildtyp (1,38 g ± 0,28 g) ermittelt (s. Tabelle 7). Das Trockengewicht betrug bei den GMK 3 Pflanzen 0,15± 0,02 g im Vergleich zu 0,11± 0,02 g beim Wildtyp. Die GO-MS Donorlinie, wie auch die GMK 9 Linie zeigten in diesen Analysen niedrigere Werte als der Wildtyp (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Wachstumsparameter Anzahl der Blätter (NL), Frischgewicht (FG) und Trockengewicht (TG) von sieben Wochen alten Pflanzen der Linien GO-MS, GMK 3 , GMK 9 und Col-0 im Vergleich. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen mit 100 µE unter 380 ppm CO_2 und 2000 ppm CO_2 angezogen. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler der Pflanzenlinien GO-MS, GMK 3, GMK 9 und Col-0. Es wurden n>10 Pflanzen je Linie analysiert. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test bestimmt (P<0,05). Statistisch signifikante Werte sind fett gedruckt.

		Col-0	**GO-MS**	**GMK 3**	**GMK 9**
NL	380 ppm	34,7± 1,5	33,4± 0,5	**40,9± 2,1**	31,9± 2,5
	2000 ppm	31,0± 0,4	32,0± 0,6	31,1± 0,6	32,1± 0,5
TG (g)	380 ppm	0,11± 0,02	0,07± 0,03	**0,15± 0,02**	0,09± 0,02
	2000 ppm	0,18± 0,02	0,19± 0,08	0,20± 0,08	0,20± 0,06
FG (g)	380 ppm	1,38± 0,28	**0,62± 0,14**	**1,77± 0,19**	0,82± 0,21
	2000 ppm	1,85± 0,16	1,85± 0,08	1,99± 0,84	2,00± 0,59

3.1.2 Analyse der Blattstruktur

In der Blattanatomie zeigten die Pflanzen der GMK 3 Linie Besonderheiten. Neben einer erhöhten Blattanzahl (vgl. Tabelle 7) waren die einzelnen Blätter der Linie GMK 3 morphologisch verändert. Blätter des gleichen Wachstumsstadiums waren breiter als die Blätter des Wildtyps und im Profil weniger gekrümmt (s. Abb. 14).

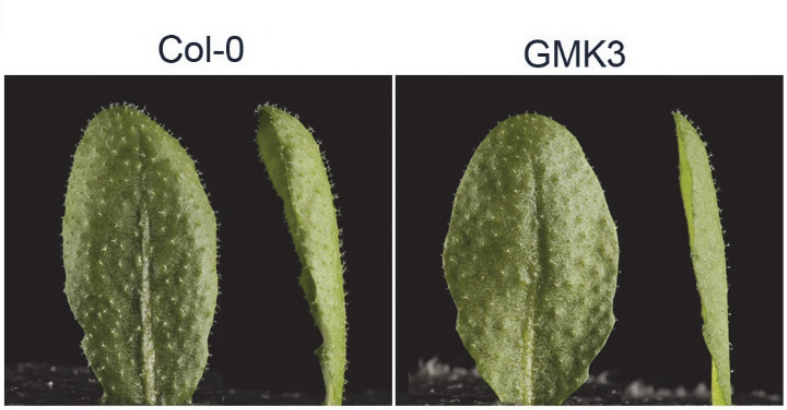

Abbildung 14 Fotographische Dokumentation repräsentativer Blätter von Col-0 und GMK 3 Pflanzen im Vergleich. Das Wachstum der Pflanzen fand fünf Wochen unter Kurztagbedingungen bei einer Belichtung von 130 µE statt.

Diese Beobachtung bestätigte eine Analyse von Blattgewicht pro cm^2 Blattfläche. Die GMK 3 Linie zeigte durchschnittlich ein niedrigeres Gewicht pro cm^2 Blattfläche von 16,4± 0,4 (g/ cm^2) im Vergleich zu 18,9± 0,6 (g/ cm^2) des Wildtyps (vgl. Tabelle 8). Um die Blattdicke zu analysieren, wurden Blätter der GMK 3 Linie und des Wildtyps eingebettet und mittels Dünnschnitten am Mykrotom und lichtmikroskopischer Auswertung gemessen (s. 2.10). Die Blätter der Linie GMK 3 waren signifikant dünner. Der gemittelte Durchmesser der Col-0 Blätter betrug 147,8± 17,6 µm, im Gegensatz zu 183,8± 5,2 µm der Linie GMK 3 (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Daten des Blattgewichts in g/ cm^2 von Col-0 Pflanzen und GMK 3 im Vergleich. Daten der Blattdicke in µm im Vergleich. Für die Analyse des Blattgewichts wurden >20 Blätter des gleichen Entwicklungsstadiums analysiert. Die Blattdicke wurde von je 3 Pflanzen pro Linie mit >100 Einzelnen Messwerten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Signifikante Unterschiede wurden mit Student's t-Test berechnet ($P<0,05$) und fett gedruckt.

	Col-0	**GMK3**
Blattgewicht [g/ cm^2]	18,9± 0,6	**16,4± 0,4**
Blattdicke [µm]	183,8 ± 5,2	**147,8 ± 17,6**

Es konnte auch mit lichtmikroskopischen Aufnahmen mit Handschnitten- Querschnitten von repräsentativen Blättern gezeigt werden, dass die Blätter der Linie GMK 3 dünner waren (s. Abb. 15).

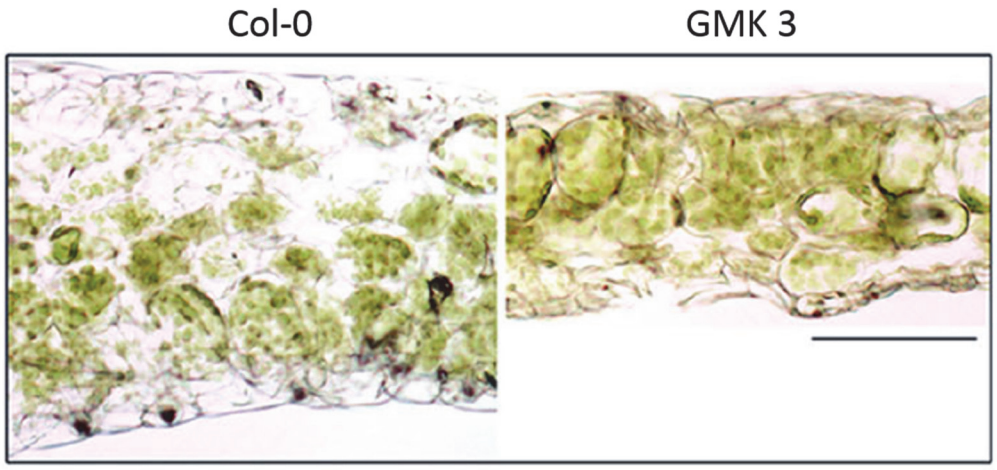

Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von handgefertigten Blattquerschnitten von Col-0 und GMK 3 im Vergleich. Balken: 100 µM

Als weiteren Indikator für die Intaktheit, sowie den Proteinstatus des Blattes wurde ein SDS-Proteingel mit Proteinextrakt aus Blättern angefertigt (s. 2.7). Die über SDS- Page aufgetrennten Proteine der Linie GMK 3 zeigten keine signifikanten Unterschiede im Proteinstatus, dies war deutlich an der großen Untereinheit der RubisCO zu erkennen (vgl. Abb. 16).

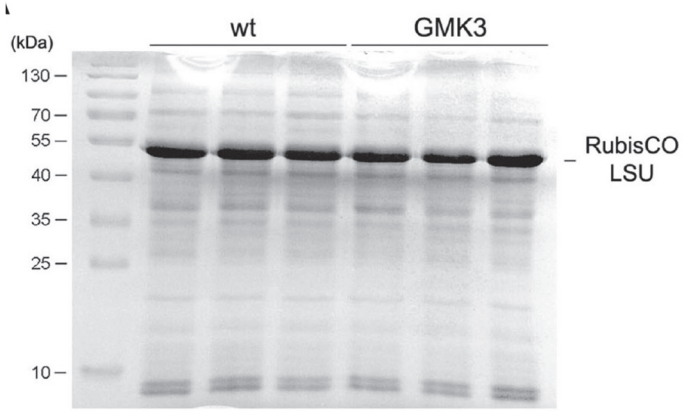

Abbildung 16: SDS-Page aus groben Proteinextrakten aus n= 3 Pflanzen des Wildtyps und GMK 3 Linie gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue, dargestellt in einer schwarz-weiß Fotographie. Es wurden jeweils 20 µg Protein pro Tasche geladen. Links ist der molekulare Größenstandard dargestellt, rechts die Bande große Untereinheit der RubisCO markiert.

3.1.3 Analyse der Blattpigmente

Pigmente sind essentiell für den Ablauf und die Instandhaltung der Photosynthese. Sie wirken einerseits als Chromophore, indem sie das Licht absorbieren, andererseits sind sie bedeutend für den Schutz der Photosysteme, bzw. der Chlorophylle. Mit Hilfe einer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie wurden die Hauptpigmente wie Chlorophylle, Carotine und Xanthophylle analysiert. Im Folgenden wurden die

Konzentrationen der verschiedenen Pigmente der GMK 3 Pflanzen mit denen des Wildtyps verglichen. Mit 19 nmol Chlorophyll pro g Frischgewicht Blattmaterial der GMK 3 Pflanze im Vergleich zu 22 nmol Chlorophyll des Wildtyps war in den transgenen Pflanzen signifikant weniger Chlorophyll vorhanden (s. Tabelle 9). Die Konzentrationen von Neoxanthin, Lutein und ß-Carotin waren ebenfalls signifikant niedriger abundant in der Linie GMK 3.

Tabelle 9: Pigmentkonzentrationen der Col-0 Pflanzen und GMK 3 Pflanzen im Vergleich. Dargestellt in nmol Pigment pro g FW der Pflanzen. Es werden die Mittelwerte ± Standardfehler aus n= 3 Pflanzen angegeben. Fettgedruckte Werte sind signifikante Unterschiede zum Wildtyp (Student's t-Test; P<0,05).

	Col-0 (nmol FG^{-1})	**GMK3 (nmol FG^{-1})**
Chlorophyll	22,0± 1,0	**19,0± 1,0**
Neoxanthin	57,8± 2,6	**44,1± 2,7**
Violaxanthin	45,8± 0,5	42,3± 6,3
Lutein	174,5± 5,9	**126,1± 7,7**
β-Carotin	109,4± 3,1	**98,63± 1,7**

3.1.4 Bestimmung der CO_2 Assimilationsraten und wichtiger photosynthetischer Eigenschaften der GMK Pflanzen

Nachdem Blattcharakteristika wie die Pigmente untersucht wurden, sollten als nächstes die photosynthetischen CO_2 Assimilationsraten der Pflanzen bestimmt werden. In Kooperation mit dem Labor von Susanne von Caemmerer (Canberra, Australien) wurden die im Folgenden aufgeführten Photosyntheseparameter ermittelt. In Tabelle 10 wurden Pflanzen der Linie GMK 3.1 und GMK 3.3 und der Col-0 Kontrollpflanze im Vergleich untersucht. Die Linie GMK 3.1 stellt Vertreter der T1 Generation dar, die GMK 3.3 sind Vertreter der T3 Generation. Neben Parametern der Photosynthese, wie die Leitfähigkeit der Stomata und Anzahl der RubisCO- Bindestellen, die in den GMK Pflanzen leicht erniedrigt waren, wurde auch hier ein signifikant niedrigerer Chlorophyllgehalt in den Pflanzen ermittelt. Das Chlorophyll a zu Chlorophyll b Verhältnis war jedoch in den transgenen Pflanzen nicht gestört, das heißt es bestand ein wildtypisches Verhältnis von Chlorophyll a und b zueinander, was ein Indiz für die Intaktheit der Photosysteme ist. Die CO_2 Assimilationsraten zeigten umgerechnet auf die Blattmasse (g) eine signifikant erhöhte Rate von 0,74± 0,2 µmol CO_2 pro Blattmasse, im Gegensatz zum Wildtyp mit 0,61± 0,03

µmol CO_2 Assimilation. Ein ähnliches Verhältnis zeigte sich auch bei der Berechnung der CO_2 Assimilationsrate pro Mol Chlorophyll. Der Wildtyp assimilierte im Schnitt 27,6± 1,5 µmol CO_2, wohingegen die GMK 3 Linie eine weitaus höhere Assimilationsrate von 38,4± 2,9 besaß (s. Tabelle 10). Die interzellulare CO_2 Konzentration die in diesem Zusammenhang als Indikator für einen operierenden transgenen Stoffwechselweg gelten könnte, zeigte eine Tendenz von erhöhten Werten, welche unter den gegebenen Bedingungen jedoch nicht statistisch signifikant waren. Der CO_2 Kompensationspunkt (Γ) ist der CO_2 Partialdruck, bei dem sich die CO_2 Fixierung der Pflanze und der CO_2 Ausstoß durch Respiration und Photorespiration ausgleichen (Von Caemmerer, 2000). In den durchgeführten Messungen, welche Γ ermitteln, wurden keine Veränderungen zwischen dem Wildtyp und der GMK 3 Linie festgestellt (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Ermittlung photosynthetischer Parameter zur Charakterisierung der CO_2 Assimilationsrate der GMK 3 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler der Pflanzenlinien GMK 3.1, GMK 3.3 und Col-0. Es wurden n>3 Pflanzen analysiert. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test bestimmt (P<0,05). Statistisch signifikante Werte sind fett gedruckt.

	Col-0	**GMK 3.1**	**GMK 3.3**
CO_2 Assimilationsrate, A (µmol * m^{-2} s^{-1})	11,5± 0,28	12,0± 0,46	10,4± 0,56
stomatäre Leitfähigkeit (mol * m^{-2} s^{-1})	0,255± 0,043	0,247± 0,032	0,187± 0,021
interzelluläres CO_2, Ci (µbar)	240± 16	258± 8	252± 5
externes CO_2, Ca (µbar)	347± 1,0	347± 0,6	349± 0,9
Dunkelrespirationsrate, Rd (µmol * m^{-2} s^{-1})	1,89± 0,14	2,09± 0,36	1,91± 0,16
RubisCO (µmol Bindestellen/ m^{-2})	17,66± 0,35	16,35± 1,8	13,3± 1,0
Chlorophyll (µmolm^{-2})	**0,42± 0,02**	**0,31± 0,01**	**0,28± 0,09**
Chlorophyll a/b Verhältnis	3,61± 0,48	3,62± 0,105	3,68± 0,08
Blattmasse pro Fläche, LMA (g * m^{-2})	**18,9± 0,6**	**16,4± 0,4**	**15,4± 0,5**
A (µmol * g^{-1} s^{-1})	**0,61± 0,03**	**0,74± 0,2**	**0,676± 0,03**
A (mmol * mol Chl^{-1} s^{-1})	**27,6± 1,5**	**38,4± 2,9**	**37,0± 1,7**
A [mol (mol RubisCO Bindestellen)$^{-1}$ s^{-1}]	0,65± 0,01	0,754± 0,06	0,79± 0,037

CO_2 Kompensationspunkt, Γ bei 21%(µbar)	42,7± 0,6	43,9± 0,9	44,2± 1,4
Steigung von O_2 in Abhängigkeit von Γ (mbar/ bar)	0,206± 0,02	0,212± 0,03	0,207± 0,03
Schnittstelle der O_2 Abhängigkeit von Γ (µbar)	0,78± 0,17	0,03± 0,14	1,05± 0,54

In Abbildung 17 wird deutlich, dass für die untersuchten GMK Linien, ebenso wie beim Wildtyp unter den gegebenen Bedingungen die lineare Abhängigkeit des Partialdrucks von Sauerstoffs zu Γ besteht (Farquar *et al*., 1980). Hier wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Col-0 und GMK 3 Pflanzen beobachtet (s. Abb. 17).

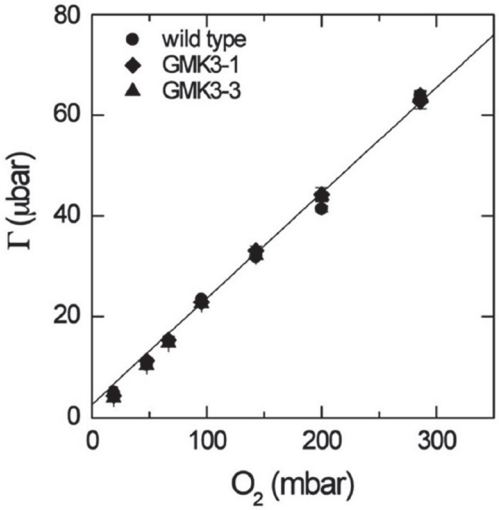

Abbildung 17: Darstellung des ambienten CO_2 Kompensationspunkts (Γ) in Abhängigkeit zum O_2 Partialdruck der Wildtyp und GMK 3 Pflanzen. Die Messungen wurden bei einer Blatttemperatur von 25°C und einer Belichtungsstärke von 1000 µE durchgeführt. Die Steigung und Schnittstelle der Regressionsgrade von Wildtyp, GMK 3.1, GMK 3.3 sind in Tabelle 10 aufgelistet.

3.1.5 Die Charakteristika des Primärmetabolismus der GMK Pflanzen

Die GMK Pflanzen zeigten eine erhöhte CO_2 Assimilation (s. 3.1.4), darauf folgend wurden die Pflanzen auf ihre Fähigkeiten hin untersucht, bestimmte Metabolite des Primärmetabolismus herzustellen. In Vorarbeiten von Fahnenstich (Fahnenstich, 2007) wurde bereits gezeigt, dass die GMK 3 Linie, im Gegensatz zur GMK 9 und Parentallinie, fähig war Stärke im selben Maße wie der Wildtyp zu bilden. In den folgenden Untersuchungen wurden weitere für die Pflanze essentielle Metabolite mittels GC-MS Analyse untersucht. Die analysierten Pflanzen wurden unter Kurztag Bedingungen angezogen, da unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Biomasse beobachtet worden war (vgl. 3.1.1). Nach fünf Wochen Wachstum auf Erde wurden die Proben zur GC- MS

Analyse nach 6 h Belichtung geerntet. In den Konzentrationen der Zucker wie Saccharose, Glucose, Fructose zeigten sich leichte Unterschiede zwischen GMK 3 Linie und dem Wildtyp, jedoch wurden hier keine statistisch signifikanten Werte ermittelt. Raffinose und Glycerol waren jedoch in der GMK 3 Pflanzenlinie signifikant niedriger konzentriert (s. Tabelle 11).

In der weiteren Analyse der Metabolitenpools aus den Blattextrakten zeigte sich eine Konzentrationserhöhung von Citrat- Zyklus Intermediaten wie Citrat, Malat, α-Ketoglutarat und eine Erniedrigung der Konzentration von Fumarat, in signifikanter Bedeutung in den GMK 3 Pflanzen. Die analysierten Aminosäuren zeigten ein spezielles Bild in den GMK 3 Pflanzen: viele Aminosäuren, deren Synthese mit Phosphoglycerat als Substrat beginnt, waren erhöht. Es wurden Akkumulationen von Valin, Leucin, Phenylalanin und Threonin beobachtet. Die in der Synthese vorgeschalteten Aminosäuren Aspartat und Asparagin waren jedoch erniedrigt.

Tabelle 11: Daten der GC-MS Analyse von Blattproben des Wildtyps und der GMK 3 Linie im Vergleich. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen mit einer Belichtung von 100 µE angezogen. Dargestellt sind die Werte aus 2 Replikaten aus Pools von ≥8 Pflanzen als relative Konzentrationen der Metabolite, normiert auf g Frischgewicht und den internen Standard Ribitol. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test bestimmt (P<0,05). Statistisch signifikante Werte sind fett gedruckt.

	Col-0	**GMK 3**
Alanin	18,643± 0,192	16,936± 1,255
Glutamat	30,813± 2,808	31,011± 4,928
Aspartat	10,148± 1,107	**6,549± 1,764**
Threonin	8,584± 0,480	11,06± 2,173
Asparagin	5,363± 0,576	**1,644± 0,781**
Valin	2,467± 0,130	**3,570± 0,132**
Prolin	1,268± 0,596	3,881± 2,422
β- Alanin	0,434± 0,084	0,367± 0,095
Cystein	0,022± 0,014	0,036± 0,008
Tyrosin	0,065± 0,014	0,056± 0,015
Methionin	0,602± 0,023	0,757± 0,168
Lysin	0,657± 0,085	0,736± 0,062
Isoleucin	0,694± 0,040	1,207± 0,492
Leucin	0,421± 0,053	**0,646± 0,110**
Phenylalanin	0,610± 0,031	**1,144± 0,206**
Maltose	2,214± 1,972	5,382± 3,945
Mannose	0,162± 0,021	0,223± 0,041
Lactose	0,074± 0,003	0,073± 0,005
Xylose	0,171± 0,015	0,197± 0,03
Sorbitol	0,317± 0,061	0,231± 0,123
Mannitol	1,837± 0,203	1,6± 0,406

Glucose	34,350± 6,530	26,862± 13
Myoinositol	31,389± 3,792	36,926± 7,585
Fructose	5,915± 1,511	8,047± 3,023
Raffinose	6,479± 0,534	**3,415± 0,925**
Glycerol	9,517± 0,336	**5,614± 0,672**
Saccharose	239,223± 23,471	204,220± 46,941
Oxalate	0,726± 0,070	0,52± 0,139
Succinat	1,653± 0,519	2,723± 1,039
α-Ketoglutarat	0,054± 0,002	**0,139± 0,004**
Glycerat	2,542± 0,368	3,308± 0,736
Gluconat	0,478± 0,023	**0,326± 0,046**
GABA	0,266± 0,054	0,233± 0,109
Hydroxybutyrat	0,142± 0,013	0,043± 0,008
Quinat	0,052± 0,011	0,028± 0,023
Glykolat	4,495± 0,068	**2,708± 0,137**
Shikimat	3,353± 0,396	3,926± 0,792
2-Hydroxyglutarat	0,095± 0,007	**0,171± 0,014**
Phosphorsäure	1,319± 0,045	**0,471± 0,091**
Lactat	10,584± 0,462	**7,479± 0,8**
Maleat	0,717± 0,019	**1,03± 0,039**
Malat	14,611± 1,386	**21,438± 2,771**
Fumarat	179,719± 8,767	**115,055± 17,53**
(Iso)-Citrat	16,439± 1,446	**30,208± 2,981**

Die beiden Aminosäuren Glycin und Serin wurden in einem umfangreicheren Rahmen analysiert. Diese Aminosäuren gelten als Indikator für die Stärke des Kohlenstoff-Flusses durch den photorespiratorischen Stoffwechselweg. In einer Umgebungsluft mit 380 ppm CO_2 und einer Belichtungsstärke von 600 µE zeigten die GMK 3 Pflanzen eine deutliche, signifikante Erniedrigung des Glycin zu Serin Verhältnisses (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Glycin und Serin Konzentrationen gemessen mittels GC-MS Analyse, normiert auf g Frischgewicht und den internen Standard Ribitol. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen und 380 ppm CO_2 sowie 2000 ppm CO_2 angezogen. Eine Messung wurde mit Pflanzen aus 380 ppm CO_2 durchgeführt nachdem diese für 6 h unter Hochlicht (600 µE) inkubiert wurden. Dargestellt ist das Verhältnis von Glycin zu Serin als Mittelwert aus n= 4 Pflanzen ± Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test bestimmt (P<0,05). Statistisch signifikante Werte sind fett gedruckt. Diese Messung wurde entnommen aus Fahnenstich, 2007.

Glycin/ Serin	**Col-0**	**GMK3**
380 ppm CO_2 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}	0,040± 0,001	0,050± 0,011
380 ppm CO_2 600 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}	6,238± 0,206	**1,574± 0,235**
2000 ppm CO_2 100 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}	0,035± 0,001	0,043± 0,004

Eine Elementanalyse zeigt das Verhältnis von Kohlenstoffatomen zu Stickstoffatomen innerhalb des Pflanzenextraktes (s. 2.9.3). In den GMK 3 Pflanzen wurde ein Kohlenstoff zu Stickstoffverhältnis von 6,22± 0,29 ermittelt, welches mit dem Verhältnis des Wildtyps mit 5,97± 0,06 vergleichbar war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die transgenen Pflanzen den Stickstoff- und Aminosäure- Metabolismus ebenso ausbalancieren können wie die wildtypischen Kontrollpflanzen.

3.2 Der optimierte Stoffwechselweg

Das Ziel dieses Ansatzes war es, einen optimierten Stoffwechselweg zur Oxidation von Glykolat in den Chloroplasten von *A. thaliana* zu integrieren. Angelehnt an den GMK Stoffwechselweg (s. 1.8) hat dieses Projekt ebenfalls das Ziel, Pflanzen mit einer erhöhten Biomasse im Vergleich zum Wildtyp zu erzeugen. Im Besonderen soll hier ein artifizieller Stoffwechselweg etabliert werden, der nicht wie im GMK-Ansatz die Glykolat Oxidase als oxidierendes Enzym benutzt. Wie in den Vorarbeiten beschrieben, findet eine Produktion von Wasserstoffperoxid statt, wodurch ein drittes Transgen, das Katalase-Gen notwendig wurde. Dies sind erfolgslimitierende Zustände, da ein drittes Transgen etabliert werden musste, die Zahl der Transgene im Idealfall jedoch niedrig bleiben sollte. In einem optimierten Ansatz soll daher ein anderes Enzym zur Oxidation von Glykolat verwendet werden, dass kein H_2O_2 produziert. Die transgen eingebrachte Enzymreaktion, die entstandenes Glykolat im Plastiden abgreift und verstoffwechselt, soll durch eine Glykolat Dehydrogenase durchgeführt werden. In *A. thaliana* Pflanzen ist kein Enzym mit einer

solchen Eigenschaft beschrieben, in der Arbeitsgruppe Maurino wird jedoch an Vertretern von Glykolat Dehydrogenasen geforscht, um ein passendes Enzym zu identifizieren (Engqvist, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit soll die Glykolat Dehydrogenase aus der Grünalge *Micromonas sp*. isoliert und verwendet werden. Für einen resultierenden, verbesserten Stoffwechselweg sollen demnach nur zwei Transgene, eine Glykolat Dehydrogenase und eine Malat Synthase in die Modellpflanze *A. thaliana* eingebracht werden (s. Abb. 18). Die hier gewählte Klonierungs-Strategie beinhaltet die Transgene schrittweise mittels *A. tumefaciens* vermittelter Kerntransformation in die Pflanze einzubringen (s. 2.2.8). Im Folgenden sollen die transgenen Pflanzenlinien mit dem neuen, sogenannten GlcDH-Stoffwechselweg etabliert und deren Phänotyp untersucht werden.

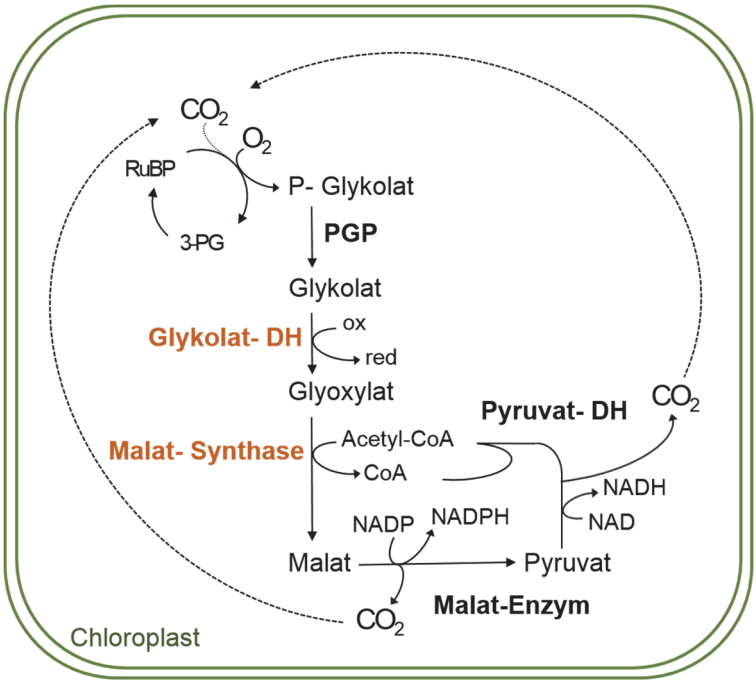

Abbildung 18: Schematische Darstellung des optimierten, artifiziellen GlcDH-Stoffwechselwegs zur Oxidation von Glykolat im Chloroplasten. RuBP: Ribulose-1,5-Bisphosphat; 3-PG: 3-Phosphoglycerat; P-Glykolat: Phosphoglykolat; ox: Oxidationsmittel; red: Reduktionsmittel; DH: Dehydrogenase; CoA: Coenzym A.

3.2.1 Klonierung der Glykolat Dehydrogenase aus *Micromonas sp.*

Ein Enzym, das für den verbesserten Stoffwechselweg geeignet könnte, ist die Glykolat Dehydrogenase aus Vertretern der *Chlorophyta*. Im Genom von Grünalgen liegen Glykolat Dehydrogenasen vor, deren Genprodukte an der Verwertung von Glykolat in der Photorespiration beteiligt sind (Beezley *et al*. 1976; Nelson und Tolbert 1970). Diese Enzyme aus Grünalgen oxidieren Glykolat zu Glyoxylat, wobei der Elektronenakzeptor bisher unbekannt ist (Nelson und Tolbert, 1970). Die Glykolat Dehydrogenase aus der Grünalge *Micromonas sp*. (GlcDHm) wurde bisher in der Literatur nicht direkt beschrieben, die Gensequenz ist trotzdem bekannt und annotiert (*Micromonas sp*.; RCC299;

XM_002506400). Das Enzym besitzt eine Flavin-Mononukleotid (FAD)-Bindedomäne, was auf FAD als funktionellen Cofaktor schließen lässt, sowie eine FAD-Oxidase Domäne und eine Eisen-Schwefel Diclusterdomäne (s. Abb. 19). Für diese Arbeit wurde die kodierende Sequenz (CDS) der Glykolat Dehydrogenase mit Hilfe von Geneart® Codon optimiert und konnte dann in den modifizierten, binären Pflanzenvektor pGreenII transformiert werden (s. Abb. 20). Zur Expression in *A. thaliana* wurde der Promotor der kleinen RubisCO Untereinheit aus *S. lycopersicum*, sowie deren Transitpeptid vor das Gen geschaltet. So wird eine plastidäre Lokalisation und eine lichtgesteuerte Expression gewährleistet (Kuhlemeier *et al*. 1989; Uozumi *et al*. 1994). Als Selektionsmarker wurde Kanamyzin gewählt, da die Malat Synthase Pflanzen, welche aus Vorarbeiten bereitgestellt wurden den Selektionsmarker Hygromyzin benutzten (s. Tabelle 1). Eine *A. tumefaciens* vermittelte stabile Kerntransformation in das Genom von *A. thaliana* wurde angewendet (s. 2.2.8), um die Glykolat Dehydrogenase in den Wildtyp Hintergrund der Columbia-0 Pflanzen, sowie der Malat Synthase Pflanzen zu etablieren (Bechthold *et al*., 1993).

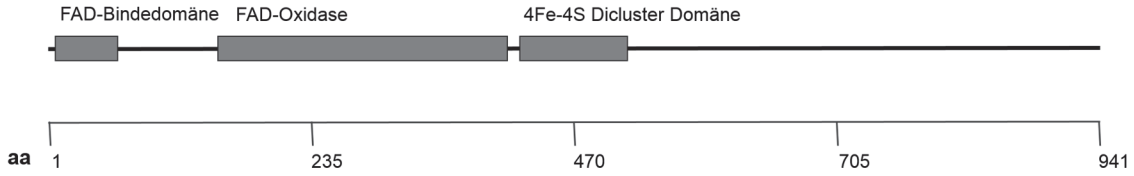

Abbildung 19: Vereinfachte Darstellung der Aminosäure-Sequenz (aa) der Glykolat Dehydrogenase aus *Micromonas sp*. in schwarz; Skala zur Anzahl der Aminosäuren ist als Referenz aufgeführt. Die Sequenz besteht aus insgesamt 941 Aminosäuren. Annotierte Proteindomänen sind mit grauen Boxen markiert und beschriftet.

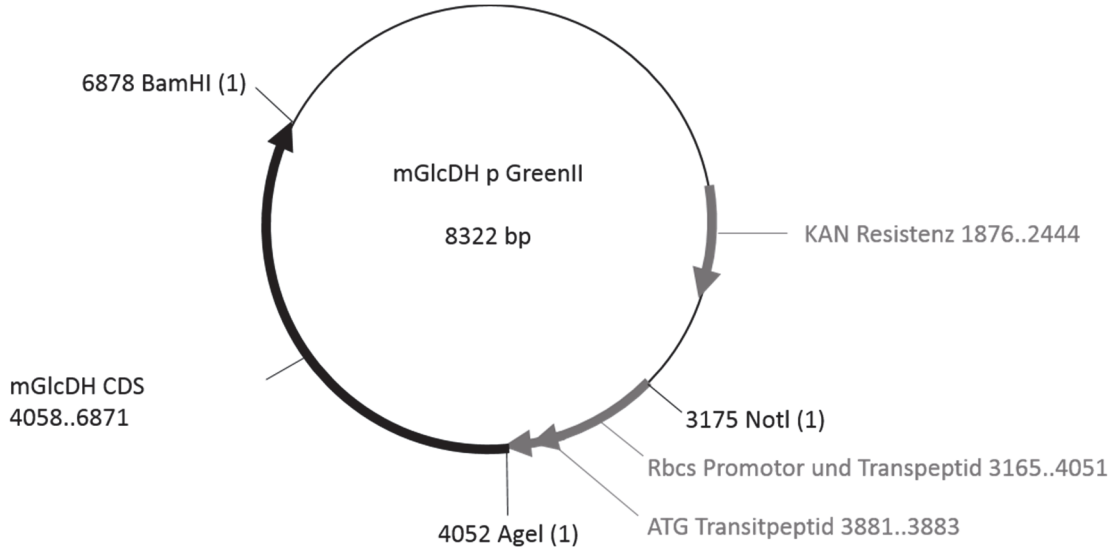

Abbildung 20: Vektorkarte des pGreen II Pflanzenexpressionsvektor. Dargestellt ist die CDS der Glykolat Dehydrogenase aus *Micromonas sp*., sowie Promotor und Transitpeptid aus *S. lycopersicum*, außerdem trägt das Konstrukt eine Kanamyzin (KAN) Resistenzkassette. Dargestellt sind außerdem die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen. Die Gesamtgröße des Vektors beträgt 8322 Nukleotide.

3.2.2 Etablierung transgener GlcDH Überexpressionslinien

Die Insertion der Transgene durch die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation wurde auf genomischer Ebene in den Pflanzen kontrolliert. Wie in 2.2.9 beschrieben, wurden die Folgegenerationen (T1, T2 und T3-Generation) der transformierten Pflanzen über den eingebrachten Selektionsmarker Kanamyzin selektiert und die positiven Pflanzen wurden jeweils in die nächste Generation gebracht. Die selektionierten Pflanzen der T2-Generation wurden zusätzlich erstmals mittels PCR auf das Vorhandensein des Gens der *GlcDHm* (s. PCR 2.5.10) getestet. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.3 aufgeführt. Es wurde ausschließlich mit solchen Pflanzenlinien weitergearbeitet, welche auf die Anwesenheit einer genomischen Integration des jeweiligen Transgens auch mittels PCR positiv getestet wurden. In der T3-Generation wurde außerdem zusätzlich auf Homozygozität des Transgens getestet. Es wurden drei transgene Linien mit Col-0 Hintergrund positiv homozygot auf das Transgen *GclDHm* per Kanamyzin Resistenz getestet. Ebenso wurden drei Linien mit MS Hintergrund per Kanamyzin Resistenz als positiv homozygot für das Transgen identifiziert (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Anzahl und Bezeichnung der auf Kanamyzin-Resistenz selektierten Pflanzenlinien. In jeder Linie wurde das Transgen mit dem Selektionsmarker Kanamyzin selektiert und auf genomischer Ebene bestätigt. MS: Malat Synthase

Genetischer Hintergrund	Bezeichnung der T2 Linien	Bezeichnung der T3 homozygoten Linien
Col-0	2	2.23
	24	24.18/ 24.19/ 24.23
	27	27.19
MS	1	1.23
	5	5.8
	11	11.10

Durch die Extraktion der RNA aus den transgenen Pflanzen und die Umschreibung dieser mittels Reverser Transkriptase in cDNA, konnte eine semi-quantitative PCR durchgeführt werden (s. 2.5.14). In Abbildung 21 sind Amplifikationen von *Aktin II*, hier verwendet als interner Standard zur Kontrolle der cDNA Konzentration, auf einem Agarosegel gezeigt. Danach konnte die Transkription des *GlcDHm* in den Pflanzen untersucht werden. Es wurde ein spezifischer 1418 Basenpaar langer Abschnitt des Gens der *GlcDHm* amplifiziert und mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht (s. Abb. 22).

sq- PCR *Aktin II*

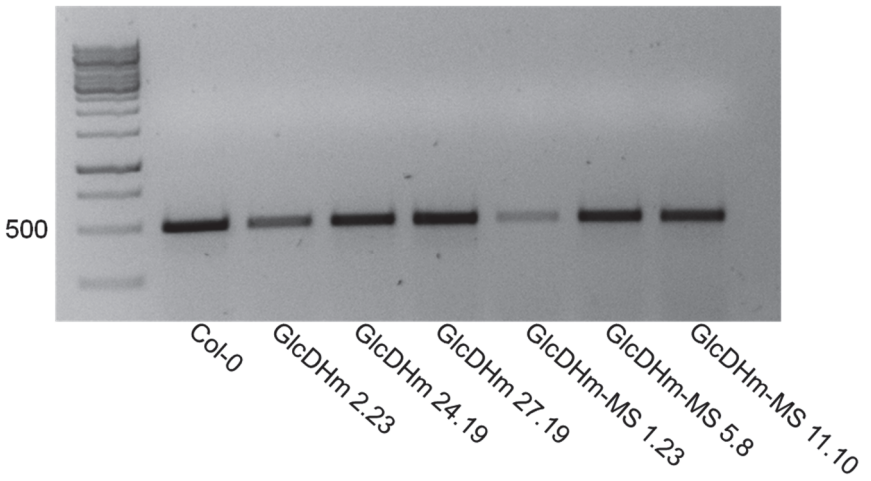

Abbildung 21: Agarosegel der Amplifikation eines 500bp Abschnitts des *Aktin II* Transkripts, mit cDNA der T3 homozygoten, transgenen Linien, sowie Col-0 als Kontrolle. Die Anlagerungs-Temperatur der PCR betrug 55°C, in der gesamten Reaktion wurden 24 Zyklen durchgeführt.

sq- PCR *GlcDHm*

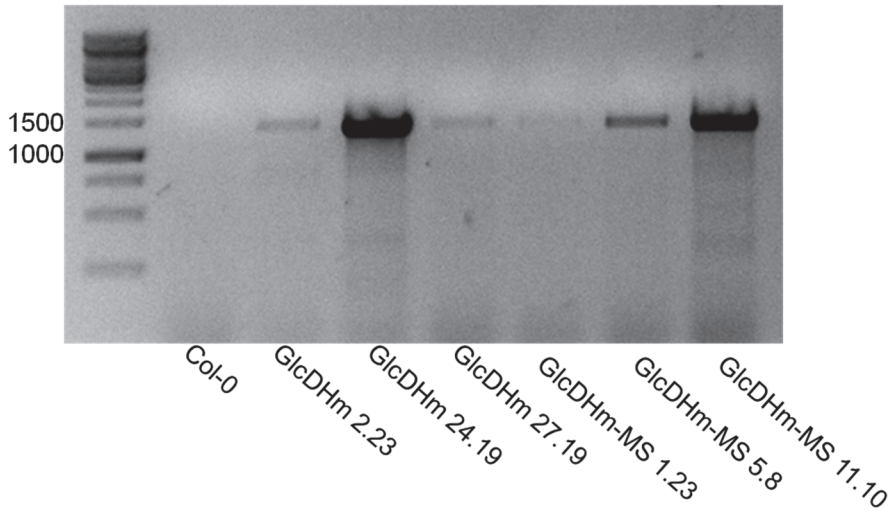

Abbildung 22: Agarosegel der Amplifikation eines 1418 bp Abschnitts des GlcDHm Transkripts, mit cDNA der T3 homozygoten, transgenen Linien sowie Col-0 als Kontrolle. Die Anlagerungs-Temperatur der Primer betrug 60°C, in der gesamten Reaktion wurden 35 Zyklen durchgeführt.

3.2.3 Phänotypisierung der transgenen, homozygoten GlcDHm- Pflanzen

Nach erfolgreicher Selektion der transgenen, homozygoten Linien wurden diese GlcDHm- und GlcDHm-MS Pflanzen unter kontrollierten Langtag- und Kurztagbedingungen angezogen, um deren Phänotyp und die Entwicklung der Linien zu vergleichen. Alle Pflanzen durchlebten einen normalen Lebenszyklus und waren zur Samenbildung fähig. Die phänotypische Erscheinung repräsentativer Pflanzen wurde photographisch dokumentiert (s. Abb. 23 und Abb. 25).

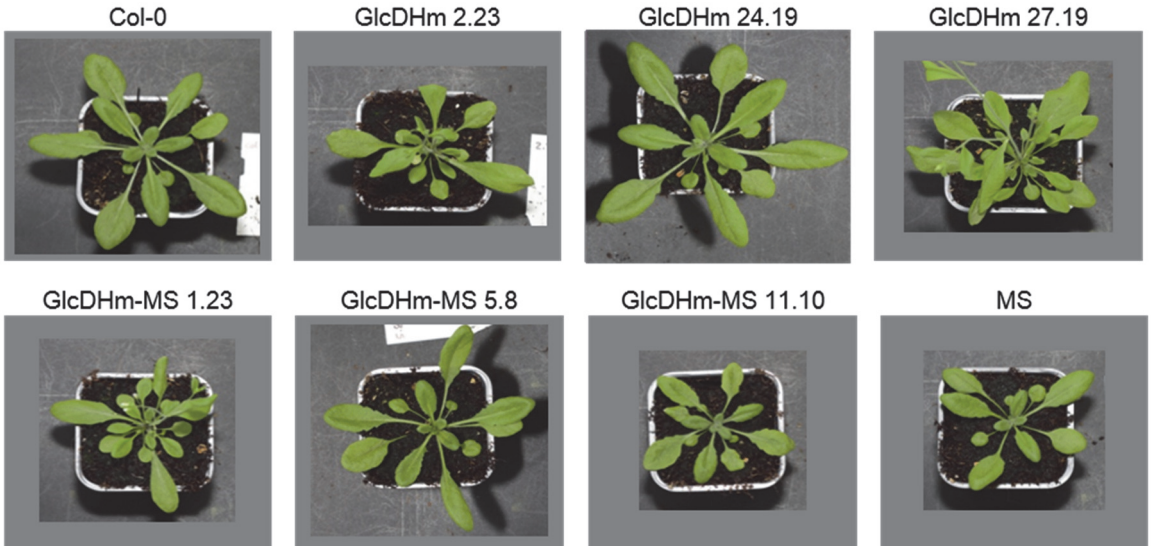

Abbildung 23: Photographische Aufnahme von repräsentativen Pflanzen der homozygoten GlcDH und GlcDH-MS T3 Linien und Kontrollpflanzen im Vergleich. Die Pflanzen wurden fünf Wochen bei 90 µE unter Langtagbedingungen angezogen.

Die Durchmesser der Blattrosetten unter Langtagbedingungen sind in Abbildung 24 gezeigt und waren bei allen Linien signifikant kleiner als der des Wildtyp, beziehungsweise im Falle der Linie GlcDHm 24.19 auf Wildtyplevel.

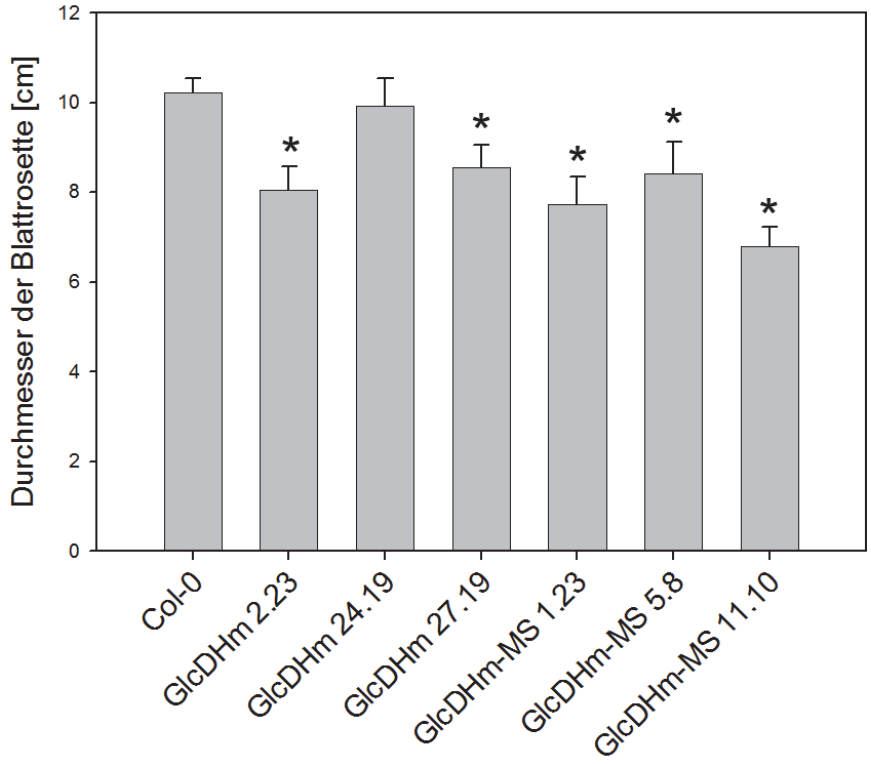

Abbildung 24: Durchmesser der Blattrosetten in [cm] der transgenen T3 Linien und Col-0 im Vergleich. Dargestellt sind Mittelwerte aus n= 12 ± Standardfehler. Eine statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test; ($P<0,05$) durchgeführt und mit * markiert. Die Pflanzen wurden angezogen wie in Abb. 20 erläutert.

Unter Kurztagbedingungen zeigten sich keine signifikanten, phänotypischen Veränderungen zwischen dem Wildtyp und den transgenen GlcDHm und GlcDH- MS Linien (vgl. Abb. 25). Auch die MS Pflanzen zeigen unter Kurztagbedingungen keine signifikanten Veränderungen zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt; Maier *et al*., 2012).

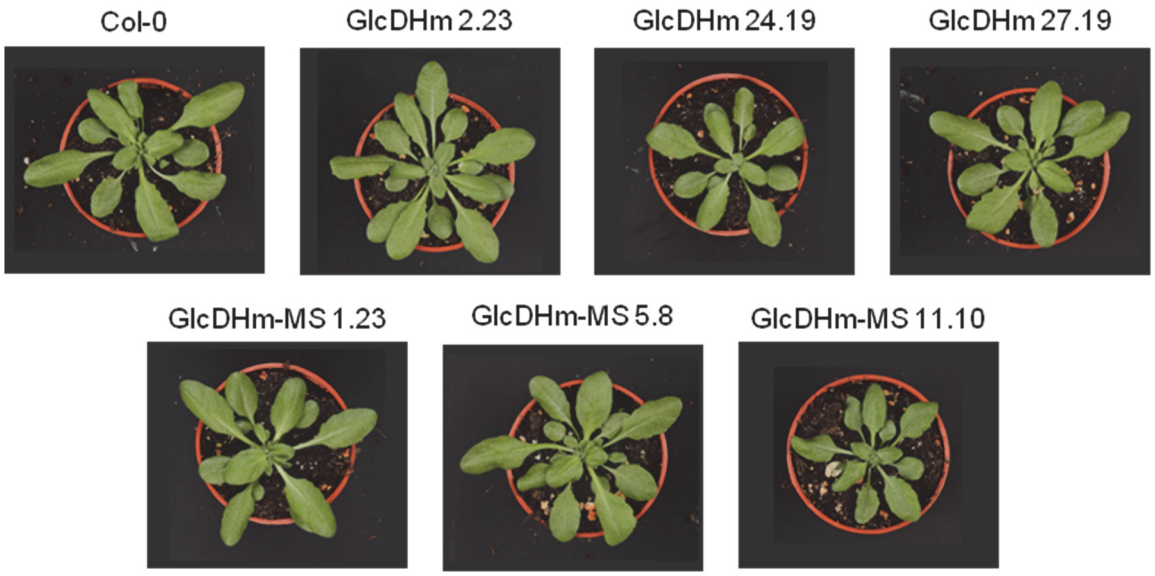

Abbildung 25: Photographische Aufnahme von repräsentativen Pflanzen der homozygoten GlcDH und GlcDH-MS T3 Linien und Col-0 im Vergleich. Die Pflanzen wurden fünf Wochen bei 130 µE unter Kurztagbedingungen angezogen.

Da sich bei den GMK- Pflanzen unter Kurztagbedingungen eine Zunahme an Biomasse gezeigt hatte, wurde eine Frischgewicht- und Trockengewicht- Bestimmung durchgeführt. Auch das Frischgewicht der Pflanzen war unter Kurztagbedingungen leicht verändert (s. Abb. 26). Das Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht war nur in der Linie GlcDHm 2.23 mit einem Verhältnis von 13,4± 0,6 im Gegensatz zum Wildtyp mit 11,1± 0,9 signifikant verändert.

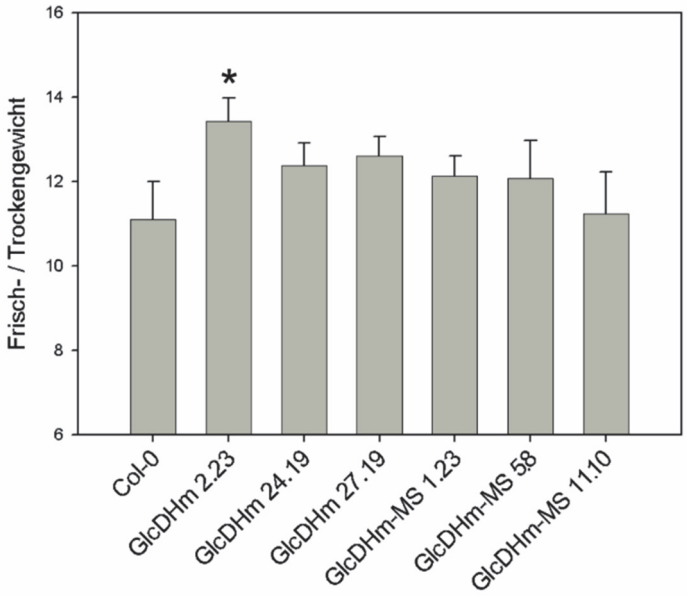

Abbildung 26: Das Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht unter Kurztagbedingungen der transgenen T3 Linien und Col-0 im Vergleich. Anzucht wie in Abb.25.. Dargestellt sind Mittelwerte aus n= 12 ± Standardfehler. Eine statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test (P<0,05) durchgeführt und signifikante Werte mit * markiert.

Als nächstes sollte die Aktivität der GlcDHm untersucht werden. Hierzu wurde der Proteinextrakt aus Blättern der transgenen GlcDHm Linien und des Wildtyps extrahiert und mit dem synthetischen Elektronenakzeptor DCIP auf spezifische Enzymaktivität nach Zugabe von Glykolat bei pH 8 getestet. Dieser Enzymaktivitäts- Assay wurde verändert nach Nelson durchgeführt (Nelson und Tolbert, 1970). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den GlcDHM Linien, den GlcDHm- MS Linien und dem Wildtyp. Sehr auffällig war die starke Aktivität, basierend auf der Reduktion von DCIP im Wildtyp. Dieser Assay muss optimiert werden, um spezifische Aktivitäten zu messen.

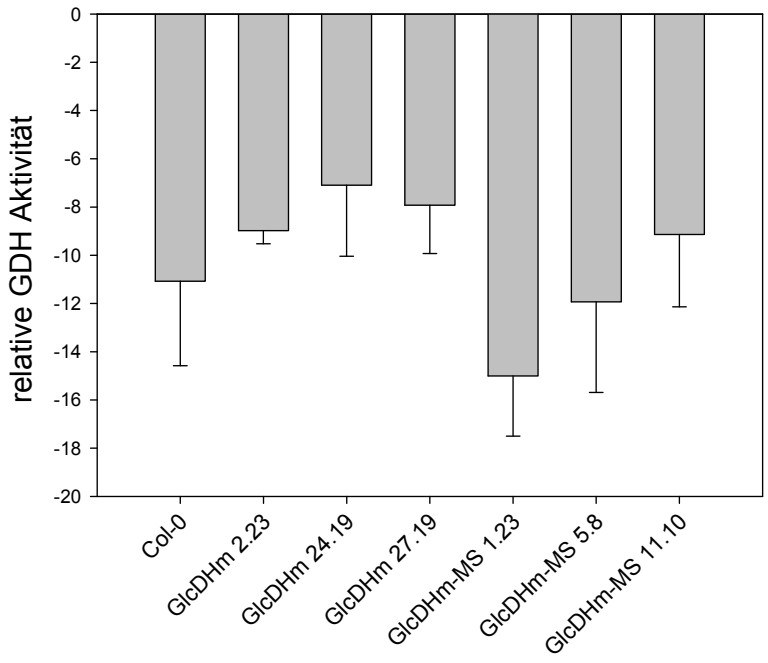

Abbildung 27: Enzymatische Aktivität der GlcDHm im Vergleich zwischen den homozygoten, transgenen Linien der T3 Generation und Col-0. Der Aktivitätsassay wurde mit Proteinextrakten aus Blättern durchgeführt, gemessen wurde eine Abnahme der Absorption bei λ= 600 nm mit DCIP als artifiziellem Elektronenakzeptor und Glykolat als Substrat. Dargestellt sind Mittelwerte aus n= 3 ± Standardabweichung.

3.3 Untersuchung des mitochondrialen Malat Metabolismus in der C3 Modellpflanze *A. thaliana*

In dieser Arbeit sollte der Beitrag von NAD-ME 1 und NAD-ME 2 als *housekeeping* Enzym im Mitochondrium auf das Wachstum und die Entwicklung der C3 Pflanze *A. thaliana* untersucht werden (s. 1.9). Das NAD-ME benutzt Malat als Substrat und wandelt dieses unter Freisetzung von CO_2 und Reduktion von NAD^+ in Pyruvat um. Um die Aufgaben beider NAD-MEs zu definieren, werden im Folgenden *A. thaliana* Mutanten untersucht, die in der Respiration von Malat im Mitochondrium eingeschränkt sind. In diesem Zusammenhang sollen die Auswirkungen der Genverluste von *NAD-ME 1 und NAD-ME 2*, sowie von *mMDH 1* auf den gesamten und den Malat Metabolismus der Pflanzen untersucht werden.

3.3.1 Isolation von T-DNA Insertionsmutanten und Herstellung von Mehrfachmutanten der Malat- Respiration im Mitochondrium

Die Reverse Genetik wird seit vielen Jahren in der Modellpflanze *A. thaliana* verwendet, um Genfunktionen *in planta* zu verstehen. Diese Methode startet mit einer mutierten Gensequenz, um aufzuklären welcher Phänotyp aus dieser Mutation resultiert (Alonso *et al*. 2003). Mit Hilfe von solchen Gen-*knockouts* oder Nullmutationen können die Funktionen eines Genprodukts *in situ* aufgeklärt werden (Krysan *et al*., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit

sollen die Auswirkungen eines veränderten Malat- Stoffwechsels im Mitochondrium untersucht und die Aufgaben von NAD-ME 1 und NAD-ME 2 in diesem Zusammenhang genau definiert werden. Zu diesem Zweck wurde mit T-DNA Insertionsmutanten gearbeitet, die im Mitochondrium Malat nicht weiter verstoffwechseln können. Es wurden die T-DNA Insertionslinien *nad-me 1.1*, *nad-me 1.2*, *nad-me 2.2*, *nad-me 2.3*, *mmdh 1* und *mmdh 2* verwendet (s. 2.2.1). Durch eine T-DNA Insertion wird die Transkription des vollständigen kodierenden Genlokus unterbunden, so dass kein funktionelles Genprodukt entstehen kann. Da die zuständigen Proteine im Mitochondrium, (mMDH und NAD-ME) mit jeweils zwei Genloki kodiert werden ist es möglich, dass funktionelle Redundanz auftritt. Dies bedeutet, dass der Verlust eines Gens nicht in der gewünschten Blockade des Stoffwechselwegs resultiert, da durch die Transkription des zweiten Lokus dieser Verlust funktionell kompensiert werden kann. Die zuständigen Proteine NAD-ME 1 und NAD-ME 2 wiesen diese Redundanz teilweise auf (Tronconi *et al*., 2008). Die mitochondriale MDH 1 hingegen hat eine sieben- fach erhöhte Transkription und auch das Protein ist dominant abundant im Vergleich zu der mitochondrialen MDH 2 (Millar *et al*., 2001; Lee *et al*., 2008). Aus diesen Gründen war das erste Ziel in dieser Arbeit, genetische Kreuzungen der T-DNA Insertionsmutanten der *NAD-ME 1 und NAD-ME 2* und der *mMDH 1* zu generieren, um eine vergleichende Analyse der Genfunktionen durchzuführen. Außerdem war zu erwarten, dass ein Phänotyp durch die Pertubationen des Malat Stoffwechsels in Mehrfachmutanten stärker sein würde. Zuerst führte das genetische Kreuzen zu allen den möglichen Kombinationen von Doppelmutanten, anschließend konnte eine Tripelmutante generiert werden. So entstanden neben den bereits vorhandenen T-DNA Einzelmutanten folgende multiple Mutanten: *mmdh 1* nad-me 1.2, mmdh 1 * nad-me 2.2, mmdh 1 * nad-me 2.3* und *mmdh 1 * nad-me 1.2* 2.3*. Ein bereits vorhandener Selektionsmarker der T-DNA in den Insertionsmutanten konnte zur Selektion der Linien nicht sinnvoll verwendet werden, da Kanamyzin in allen verwendeten Linien wiederholt vorlag. So wurden die gekreuzten Pflanzen mittels PCR basierter Genotypisierung auf Homozygozität der Genorte überprüft (durchgeführt nach 2.5.10; s. Appendix 6.3). Für die Bestätigung der T-DNA Insertion der Einzelmutanten, Doppelmutanten und der Tripelmutante wurde aus 3 Wochen alten Pflanzen genomische DNA extrahiert und in einer PCR-Reaktion mit den angegebenen Primern und Bedingungen getestet (verwendete Primer s. 2.1.3).

Im homozygoten Zustand der gekreuzten Linien musste im Folgenden getestet werden, ob eine Residualtranskription in den T-DNA Linien auftrat und ob es sich demnach um einen *knockout* oder *knockdown* der jeweiligen Gene handelte. Dies wurde mit Hilfe von semi-quantitativer PCR überprüft. Nach der Isolation von RNA und cDNA Synthese (s. 2.5), wurde mit dem Primerpaar für *Aktin II*, *A. thaliana* – fv und *Aktin II A. thaliana* –rv, das Gen *Aktin II* amplifiziert. Dies wurde als interne Referenz für die Güte der cDNA verwendet (s.

Abb. 28). Im Folgenden wurden dann semi-quantitative PCRs für die Gene *NAD-ME 1*, *mMDH 1* sowie *NAD-ME 2* durchgeführt. Das *NAD-ME 1*-Volllängentranskript konnte nur mit der cDNA amplifiziert werden, in deren zugehöriger Pflanzenlinie das Gen *NAD-ME 1* wildtypisch vorlag. In Linien mit einer T-DNA Insertion im Genlokus *NAD-ME 1* konnte kein Transkript detektiert werden (s. Abb. 29). Die Volllängentranskripte der *mMDH1* konnten deutlich mit der cDNA als Template von allen Linien ohne eine T- DNA Insertion in diesem Gen amplifiziert werden. Dort war das Amplifikat bereits nach 25 Zyklen deutlich vorhanden (s. Abb. 30). In Linien mit einer *mdh 1* Insertion waren keine Volllängentranskripte vorhanden, was diese Linien als *knockout*- T-DNA Insertionslinien bestätigte. Die cDNA der verschiedenen Linien besaß nur Transkripte des Gens *NAD-ME 2* in den Linien, in denen keine T-DNA Insertion vorhanden war (s. Abb. 31). Die entsprechenden T-DNA Linien waren demnach alle homozygot.

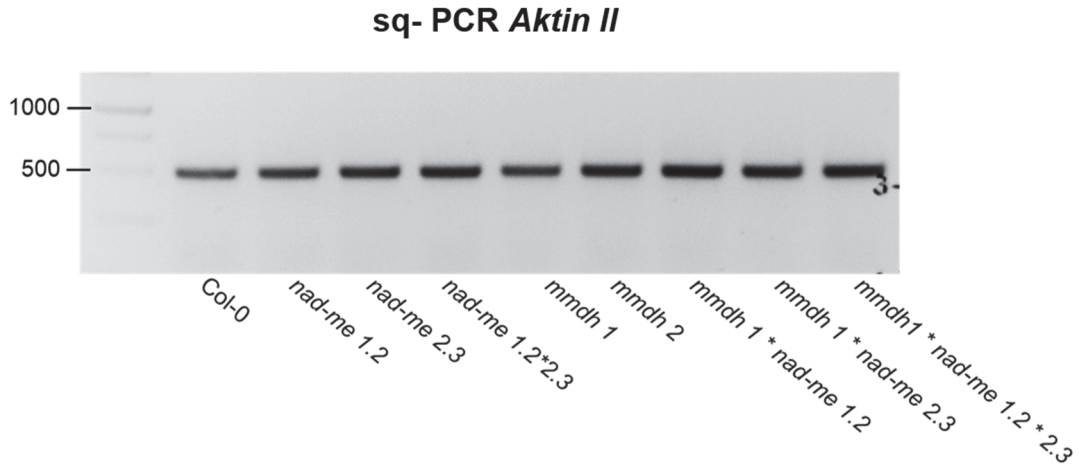

Abbildung 28: Beispielhafte Agarosegelelektrophorese der sq PCR mit dem Primerpaar Aktin II *A. thaliana* –fv und Aktin II *A. thaliana* –rv, zur Amplifikation des Gens *Aktin II*. PCR Bedingungen: 0,30 s Elongation; 55°C Annealing Temperatur; Template cDNA; Zyklen 24.

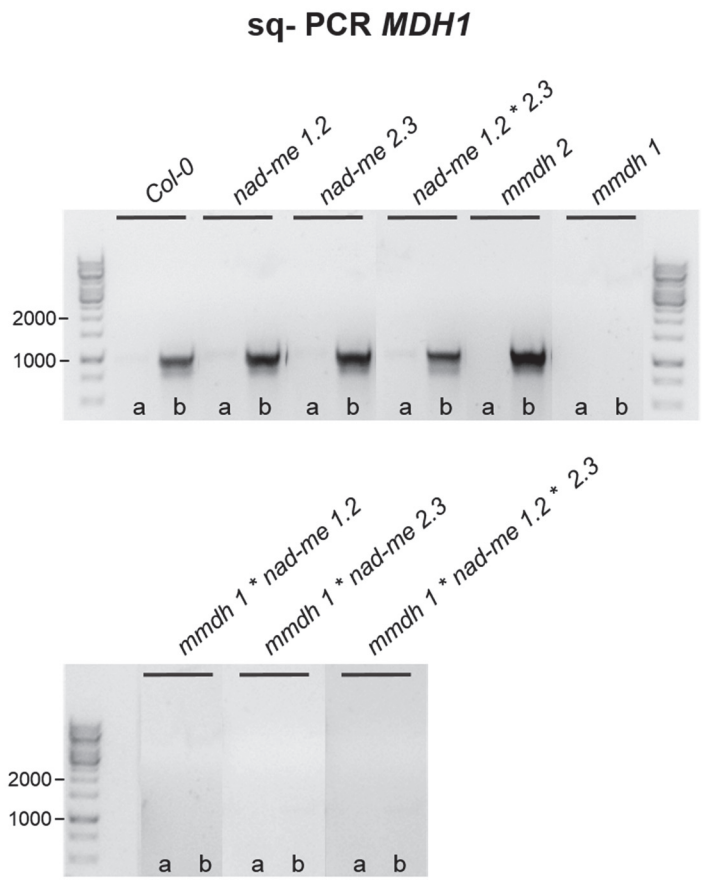

Abbildung 29: Beispielhafte Agarosegelelektrophorese der sq PCR mit dem Primerpaar sq PCR *MDH 1*–fv und sq PCR *MDH 1* –rv, zur Amplifikation des Gens *MDH 1*. Template cDNA; Zyklen 20 (a), 25 (b).

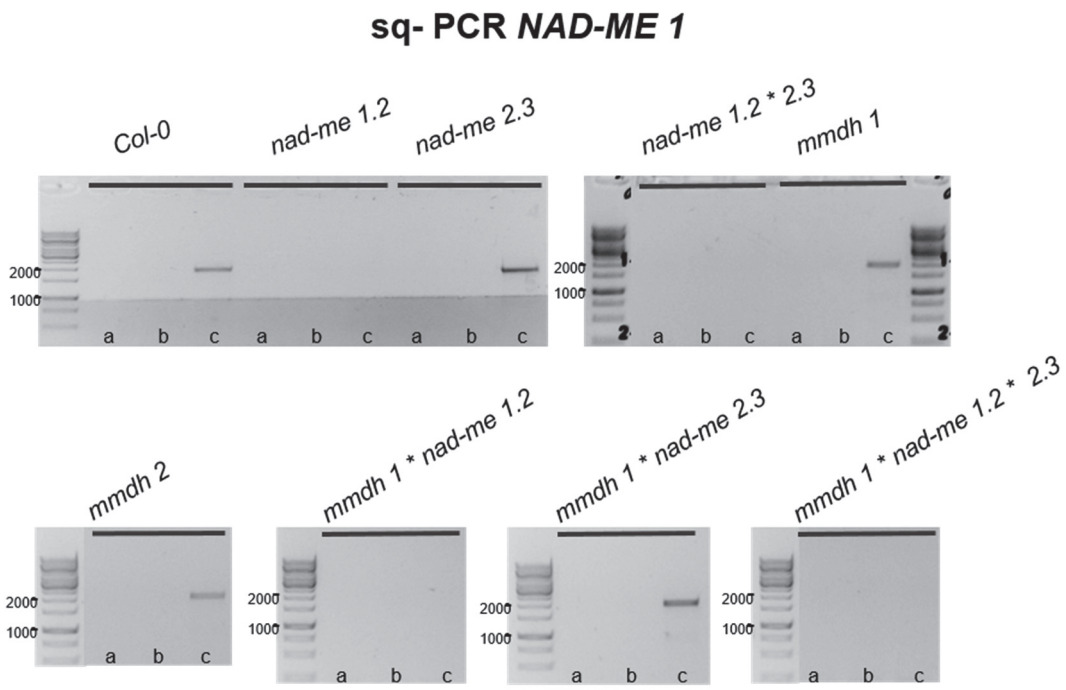

Abbildung 30: Beispielhafte Agarosegelelektrophorese der sq PCR mit dem Primerpaar *NAD-ME 1*–fv und sq PCR *NAD-ME1* –rv, zur Amplifikation des Gens *NAD-ME 1*. Template cDNA; Zyklen 20 (a), 25 (b) , 35 (c).

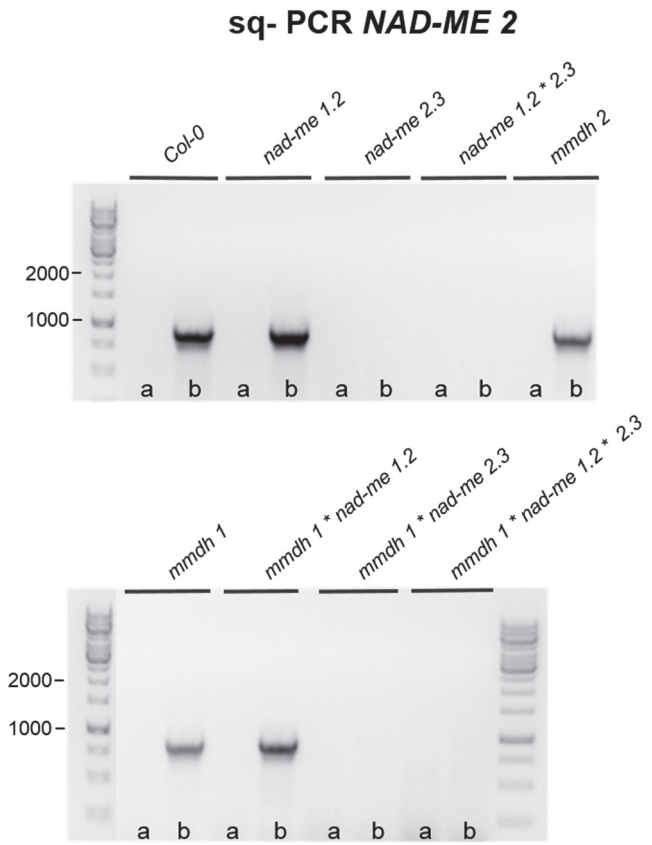

Abbildung 31: Agarosegelelektrophorese der sq PCR mit dem Primerpaar *NAD-ME 2*–fv und sq PCR *NAD-ME 2* –rv, zur Amplifikation des Gens *NAD-ME 2*. Template cDNA; Zyklen 25 (a), 35 (b).

3.3.1.1 Aktivität des NAD-Malat Enzyms

Um die Bedeutung der Genverluste des *NAD-ME 1 und NAD-ME 2* in den korrespondierenden T-DNA *knockout* Linien auf die Gesamtaktivität zu untersuchen, wurde ein Aktivitäts-Assay durchgeführt, der die NAD-ME Aktivität im gesamten Blattextrakt bestimmt (s. 2.7.4). So sollte getestet werden, ob sich das Fehlen der Transkripte von *NAD-ME 1* und *NAD-ME 2* in den verschiedenen *knockout* Linien in einer Veränderung der Enzymaktivität wiederspiegelt und ob das Fehlen eines NAD-ME zu einer Veränderung der Enzymaktivität in den verschiedenen Linien mit verschiedenen Genverlusten führt. Für den Aktivitäts- Assay wurden fünf Wochen alte Pflanzen aus einer Kurztaganzucht verwendet, deren Gesamtprotein extrahiert wurde.

In Abbildung 32 sind die relativen NAD-ME Gesamtaktivitäten im Vergleich zwischen den unterschiedlichen T-DNA Insertionslinien und dem Wildtyp gezeigt. Die relativen Aktivitäten in den beiden Einzelmutanten *nad-me 1.2* und *nad-me 2.3* waren tendenziell erniedrigt, jedoch war eine Restaktivität vorhanden. Die NAD-ME Aktivität in Blattextrakten war in der *nad-me 1.2 * 2.3* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp stark erniedrigt. Ebenso in den anderen beiden Doppelmutanten und der Tripelmutante, jedoch mit hohem Standardfehler. Der Ausfall der Malat Dehydrogenase 1 führte zu einer Erhöhung der NAD-ME Aktivität in der *mdh 1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 32).

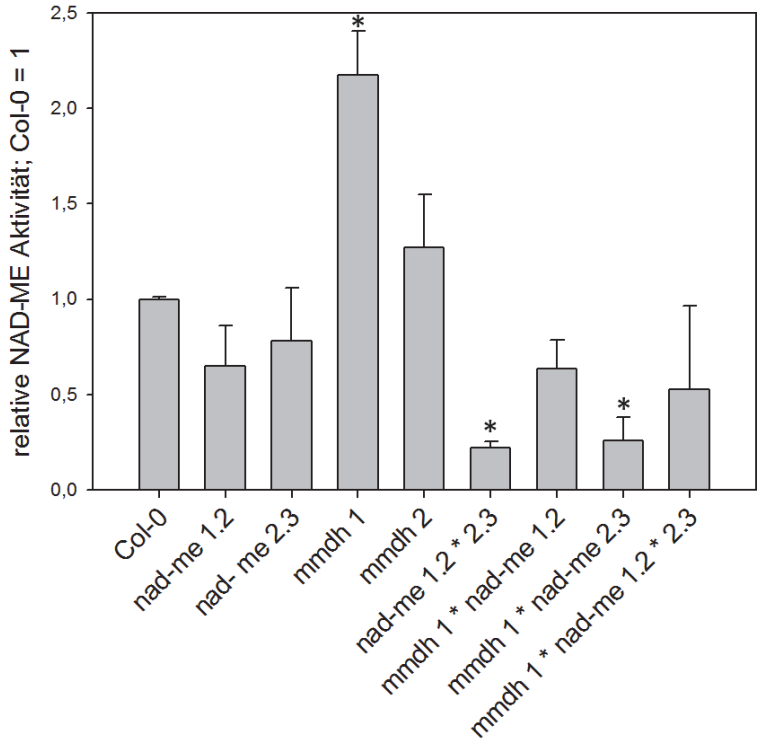

Abbildung 32: Bestimmung der Enzymaktivität des NAD-ME aus Blattextrakten in den T-DNA Insertionsmutanten und Col-0 im Vergleich. Dargestellt sind relative Mittelwerte ± Standardfehler (Col-0= 1), aus n= 3, normiert auf Proteinkonzentration in µg im getesteten Proteinextrakt. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen mit einer Belichtung von 90 µE für fünf Wochen angezogen. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt (P<0,05) und mit * gekennzeichnet.

3.3.2 Der Phänotyp der T-DNA Insertionslinien unter Langtagbedingungen

Die T-DNA Insertionslinien wurden unter Langtagbedingungen mit einem Licht- zu Dunkel-Rhythmus von 16 h/ 8 h angezogen. Hier sollten erste Auswirkungen des Verlustes der Genfunktionen von *NAD-ME 1 und NAD-ME 2*, sowie *MDH 1* besonders in den unterschiedlichen Kombinationen analysiert werden. Die Linien zeigten keine starken Einschränkungen im Wachstum (s. Abb. 33). Alle Linien beendeten den kompletten Lebenszyklus mit der Bildung von Samen (s. Appendix Abb. 48).

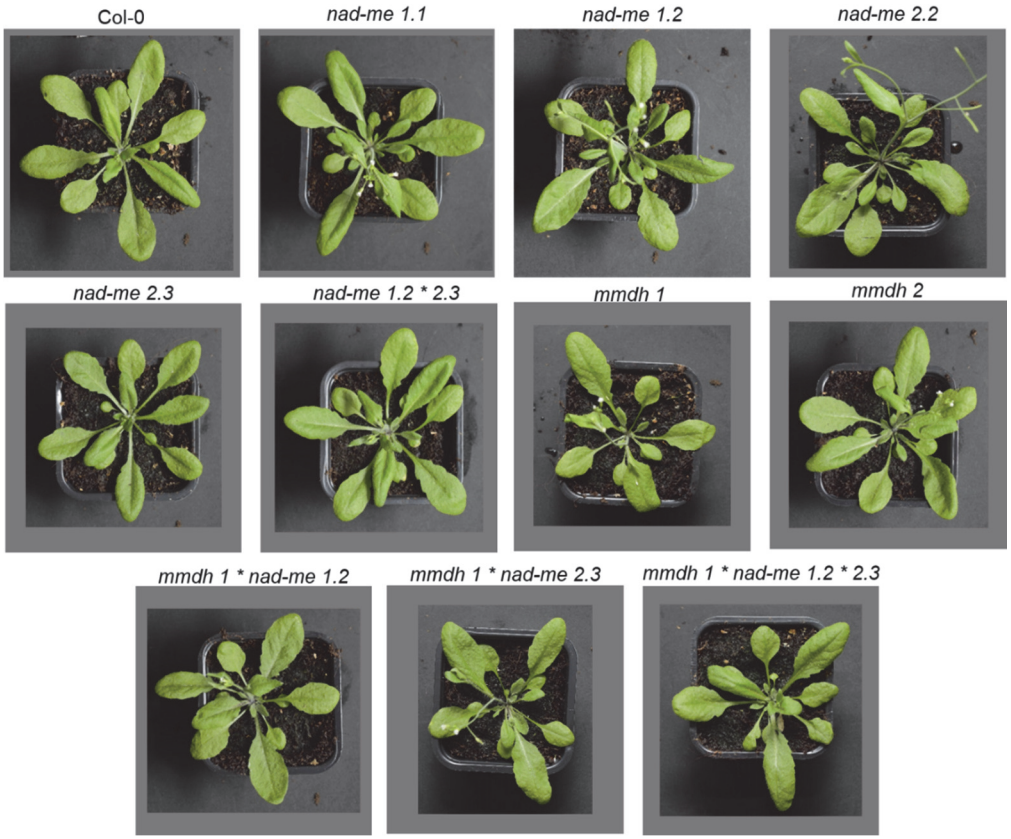

Abbildung 33: Fotographische Darstellung der T-DNA Insertionslinien mit Col-0 im Vergleich. Die Anzucht wurde unter 110 µE Belichtungsstärke und Langtagbedingungen ausgeführt. Das Alter der Pflanzen beträgt fünf Wochen.

Die Blätter aller untersuchten Pflanzenlinien zeigten eine grüne Blattfarbe und entwickelten ähnlich große Blattrosettendurchmesser. Nur die Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3* war im Blattrosettendurchmesser signifikant kleiner als der Wildtyp (s. Abb. 34).

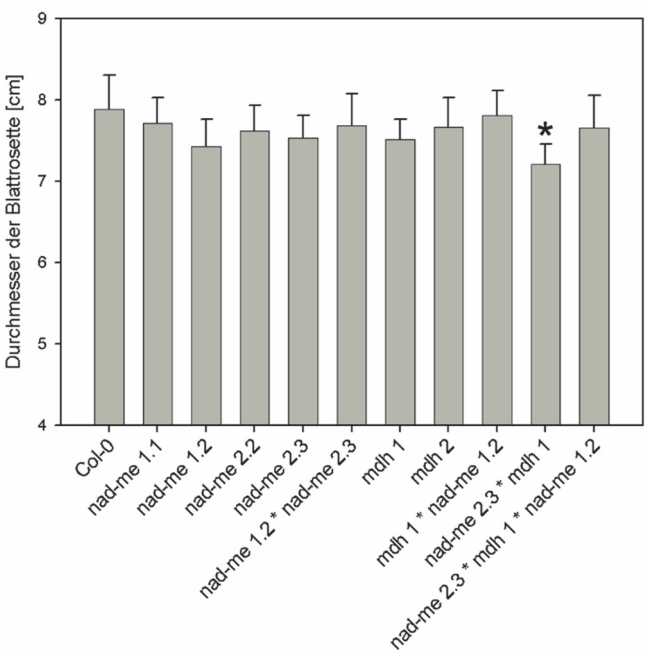

Abbildung 34: Darstellung der Durchmesser der Blattrosette aller T-DNA Insertionslinien und Col-0 im Vergleich. Die Pflanzen wurden nach vier Wochen unter Langtagbedingungen bei 110 µE analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n= 12 Pflanzen ± Standardfehler. Eine statistische Analyse wurde mit Hilfe des Student's t-Tests durchgeführt (P<0,05) und mit * gekennzeichnet.

Ein Indikator für die Biomasse und den Wassergehalt der Pflanze ist das Frischgewicht zu Trockengewicht Verhältnis. In den T-DNA Insertionslinien waren im Durchschnitt viele Tendenzen zu einem geringeren Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Statistisch signifikant war dies jedoch nur bei der *nad-me 1.2 * 2.3* Doppelmutante (s. Abb. 35) Diese Doppelmutante hatte ein Verhältnis von 11,87± 0,70 im Vergleich zum Wildtyp mit 14,17± 1,09.

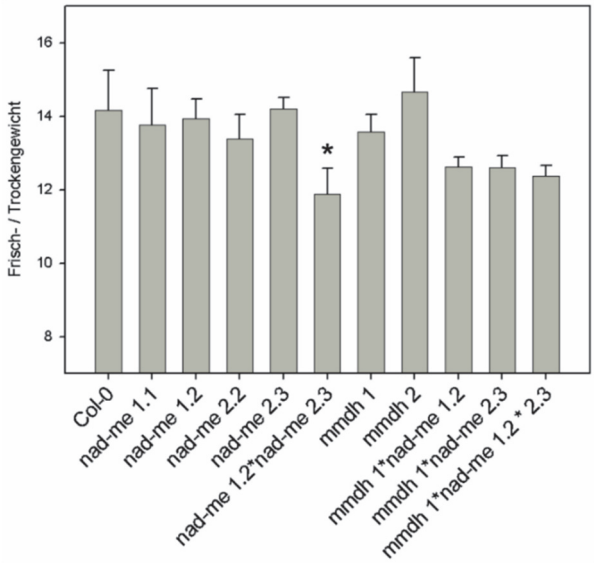

Abbildung 35: Darstellung des Frischgewichts zu Trockengewicht Verhältnisses der Blattrosetten aller T-DNA Insertionslinien und Col-0 im Vergleich. Die Pflanzen wurden nach 4 Wochen unter Langtagbedingungen bei 110 µE analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n= 12 Pflanzen ± Standardfehler. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Student's t-Tests durchgeführt (P<0,05) und mit * gekennzeichnet.

3.3.3 Der Phänotyp der T-DNA Insertionsmutanten unter Kurztagbedingungen

Die T-DNA Insertionsmutanten mit Verlusten der Genfunktionen von *NAD-ME 1 und NAD-ME 2* sowie *mMDH 1* im Mitochondrium haben durch diesen Verlust entscheidende Enzymfunktionen zur Respiration im Mitochondrium verloren. Es ist ein Ziel dieser Arbeit, definierte Aufgaben der einzelnen NAD-MEs zu entschlüsseln. Da die Respiration für die Pflanzen von grundlegender Bedeutung während der Nacht ist, um die Energieversorgung der Zellen zu gewährleisten, könnte vermutlich in folgenden Analysen eine lange Nachtphase von Vorteil sein, um die Rolle der NAD-MEs aufzudecken. Das NAD-ME ist während der Nacht stärker exprimiert als am Tag, könnte demnach wichtiger während der Nacht sein (Tronconi *et al*., 2008). Nachts verbraucht *A. thaliana* ihre Reserven, welche sie tagsüber durch Kohlenstoff- Assimilation aufgebaut hat. Nach den Zuckern und der transienten Stärke sind Malat und Fumarat bedeutende transiente Kohlenstoffspeicher, die ebenfalls zur Energiegewinnung respiriert werden (Zell *et al*., 2010).

Unter den gewählten Kurztagbedingungen von 8h Licht/ 16h Dunkelheit war es demnach besonders Interessant, das phänotypische und metabolische Verhalten der *knockout* Pflanzen durch den gestörten Malat Metabolismus zu analysieren und ganz besonders die Unterschiede zwischen den Kombinationen aus *mmdh 1* und den *nad-me 1* und *nad-me 2* zu finden.

In einer Anzucht unter Kurztagbedingungen und niedriger Photonenflussdichte von 65 µE zeigte sich unter allen Pflanzen die Ausbildung langer Petiolen (s. Abb. 36). Zwischen den Mutanten Linien zeigte sich außerdem ein drastischer Phänotyp. Während alle *nad-me* Einzelmutanten, wie auch die *nad-me* Doppelmutante optisch nicht stark von der Größe des Wildtyps abwichen, ebenso wenig die *mmdh1* und *mmdh 2* Einzelmutanten, so zeigten die gemischten Doppelmutanten ein stark retardiertes Wachstum. Die gekreuzte Linie *mmdh1 * nad-me 1.2* zeigte kleinere Blattrosetten und gelblichere Blätter. Besonders prominent zeigten sich die Kleinwüchsigkeit, sowie die gelblichen Blätter in der *mmdh 1 * nad-me 2.3* Doppelmutante sowie der *mmdh 1* nad-me 1.2 * 2.3* Tripelmutante (s. Abb. 36). Bis auf vereinzelt, eher zufällig auftretende Ausnahmen, stagnierte das Wachstum der Mutanten welche gelbe Blätter besaßen und kleinwüchsig waren.

Die unabhängige T-DNA Insertionslinie *nad- me 2.2* konnte ebenfalls erfolgreich mit der Linie *mmdh 1* gekreuzt werden. Homozygote Vertreter der Linie *mmdh 1 * nad-me 2.2* zeigte optisch einen kleinwüchsigen, gelblichen Phänotyp, ebenso wie die T-DNA Kreuzung *mmdh1 * nad-me 2.3*. Daher wurde nur mit einer der Linien weitergearbeitet (vgl. Appendix Abb. 49).

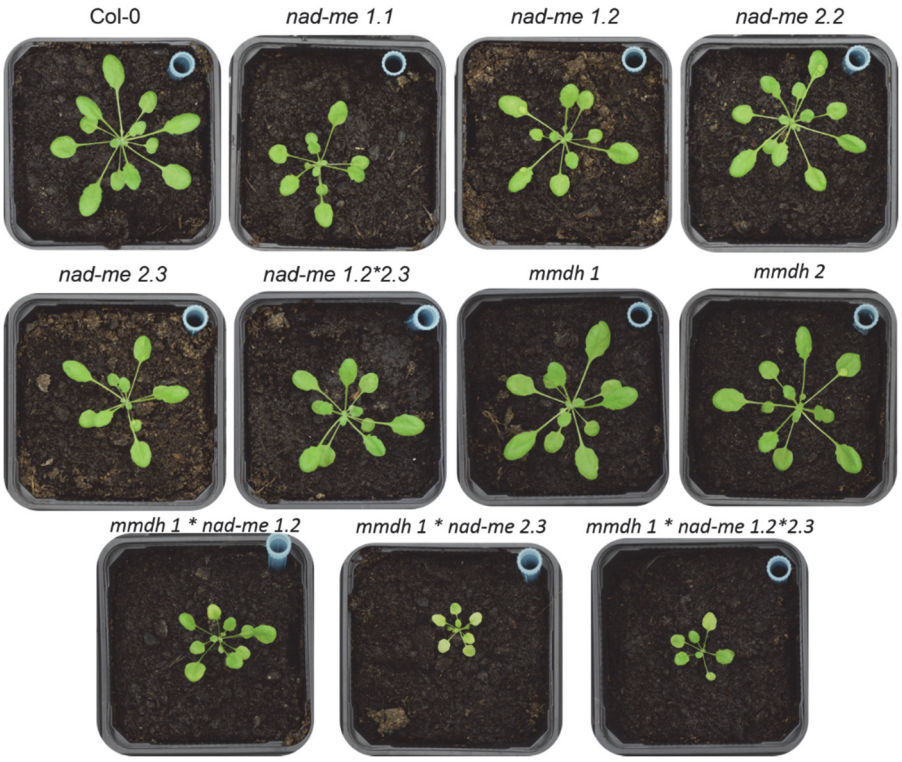

Abbildung 36: Fotographische Darstellung der T-DNA Insertionslinien mit Col-0 im Vergleich. Das Wachstum fand unter Kurztagbedingungen bei einer Belichtung 65 µE statt. Das Alter der Pflanzen beträgt vier Wochen.

Unter Kurztagbedingungen mit einer höheren Belichtungsstärke von 130 µE, veränderte sich das Wachstumsverhalten der Pflanzen (s. Abb. 37). Der gelbliche Phänotyp blieb unter dieser Belichtungsstärke bei den Linien *mmdh 1 * nad-me 1.2* und *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* abgeschwächt, bei der Kreuzung *mmdh 1 * nad-me 2.3* erhalten (s. Abb. 37). Diese Pflanzenlinie zeigte auch bei dieser Lichtstärke gelbliche Blätter und zeigte ein geringeres Wachstum, so dass die Blattrosetten kleiner blieben im Vergleich zu den anderen Linien. Sehr wenige, zufällige Pflanzen wuchsen auf Wildtypgröße heran, diese Pflanzen schienen einen Kompensationsmechanismus auszubilden. Zusammenfassend waren die Tripelmutante und die Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3* waren optisch kleiner, letztere entwickelte gelbe Blätter.

Abbildung 37: Fotographische Darstellung der T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp. Das Wachstum fand unter Kurztagbedingungen bei einer Belichtung von 130 µE statt. Das Alter der Pflanzen beträgt vier Wochen.

Unter diesen Belichtungs- Bedingungen waren ausschließlich die Mutanten *mmdh 1 * nad-me 2.3* und *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* signifikant kleiner als der Wildtyp (s. Abb. 38).

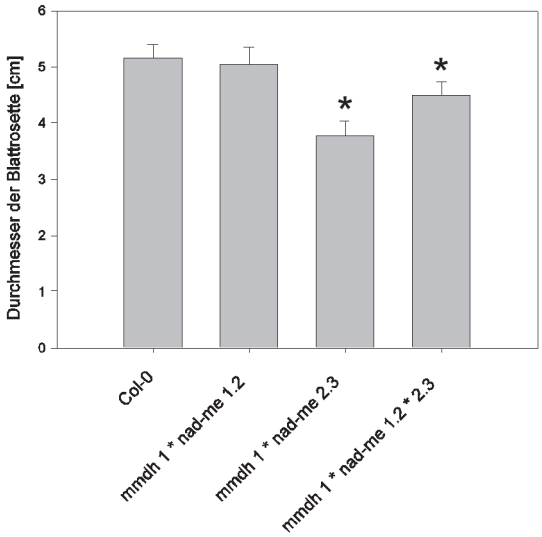

Abbildung 38: Durchmesser der Blattrosette der kombinierten Doppelmutanten, der Tripelmutante und Col-0 im Vergleich. Die Pflanzen wurden nach drei Wochen unter Kurztagbedingungen bei einer Belichtung von 130 µE analysiert. Werte sind Mittelwerte aus n= 12 ± Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Student's t-Test berechnet (P< 0,05) und mit * gekennzeichnet.

3.3.4 Analyse der Blattpigmente

Aufgrund der gelblichen Blätter unter Kurztagbedingungen, war die Pigmentzusammensetzung der T-DNA Insertionslinien als nächstes von Interesse. Eine Analyse der Pigmente mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie, bestätigte den optischen Eindruck der gelblichen Blätter. In allen Linien außer den beiden *nad-me* Einzelmutanten zeigten sich veränderte Chlorophyll a (Chl a) zu Chlorophyll b (Chl b) Verhältnisse (s. Abb. 39). Dieses Verhältnis war in den Linien *mmdh 1 * nad-me 1.2* und *mmdh 1 * nad-me 2.3* im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt und tendenziell ebenfalls sehr niedrig in der Tripelmutante, wobei hier jedoch stärkere Schwankungen in den Werten beobachtet wurden. Das relative Verhältnis von Chl a zu Chl b betrug im Wildtyp 3,48± 0,01 im Gegensatz zu 3,32± 0,02 bei der Linie *mmdh 1 * nad-me 1.2* und 3,3± 0,04 bei der Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3*. Außerdem wurden neben Chlorophyll auch die Konzentrationen der Carotinoide untersucht (s. Tabelle 14).

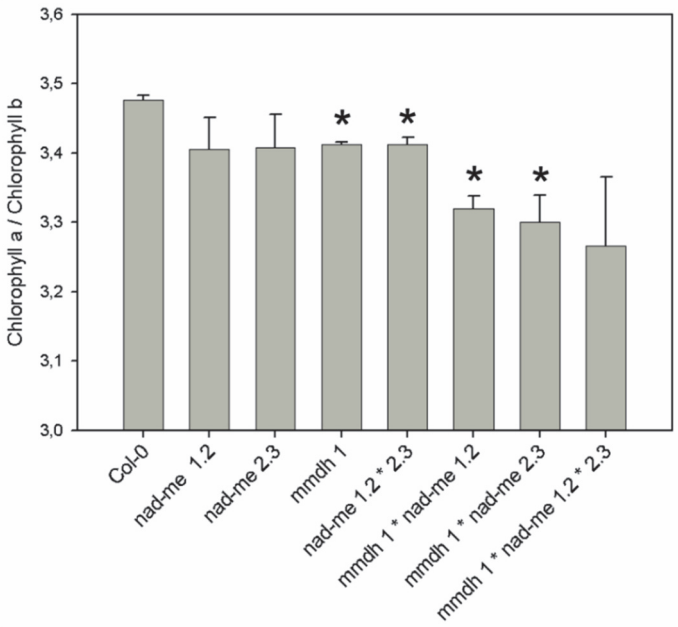

Abbildung 39: Das Verhältnis von Chl a zu Chl b der T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp. Das Blattmaterial wurde nach vier Wochen geerntet, die Pflanzen wurden unter einer Belichtung von 65 µE. Werte sind Mittelwerte aus n= 3 ± Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Student's t-Test berechnet (P<0,05) und mit * gekennzeichnet.

In den verschiedenen Mutanten zeigten sich Tendenzen zu niedrigeren Pigmentgehalten, wobei nur in der Mutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* eine statistisch signifikante Erniedrigung von Violaxhantin gemessen wurde, welche auch tendenziell in der *nad-me 2.3* Einzelmutante erniedrigt war. Besonders auffällig war die Beobachtung, dass in der *mmdh 1 * nad-me 2.3* Doppelmutante erhöhte Werte von Anteraxhantin und Zeaxhantin, 0,095± 0,019 und 0,118± 0,031 im Gegensatz zu 0,020± 0,001 und 0,021 ± 0,003 im Wildtyp gefunden wurden. Beides sind Pigmente der Xhantophylle, welche über den Zeaxanthin-

Zyklus in der nichtphotochemischen Löschung eine wichtige Rolle für die Verminderung von Lichtschäden am Photosyntheseapparat spielen (Demming- Adams und Adams, 1996).

Tabelle 14: Darstellung der Pigmentkonzentrationen aus Blättern der T-DNA Insertionslinien und Col-0 im Vergleich. Die HPLC Analyse wurde normiert auf Pigment pro g Frischgewicht. Es wurden die Mittelwerte und Standardfehler aus n= 3 Pools aus 8 Pflanzen angegeben. Die Pflanzen waren fünf Wochen alt und wurden unter einer Belichtung von 65 µE angezogen. Fettgedruckte Werte sind signifikante Unterschiede zum Wildtyp (Student's t-Test; P<0,05). N: Neoxanthin; V: Violaxanthin; L: Lutein; A: Antheraxanthin; Z: Zeaxanthin; Chl a: Chlorphyll a; Chl b: Chlorophyll b; C: ß-Carotin

	N	**V**	**L**	**A**	**Z**	**Chl b**	**Chl a**	**C**
Col-0	0,97 ± 0,07	0,64 ± 0,04	2,68 ± 0,19	0,020 ± 0,001	0,020 ± 0,003	6,5 ± 0,5	22,6 ± 1,6	1,77 ± 0,12
nad-me 1.2	0,89 ± 0,05	0,56 ± 0,03	2,53 ± 0,19	0,020 ± 0,002	0,020 ± 0,001	6,05 ± 0,35	20,6 ± 0,9	1,7 ± 0,1
nad-me 2.3	0,90 ± 0,02	0,480 ± 0,001	2,50 ± 0,08	0,020 ± 0,001	0,01 ± 0,01	6,13 ± 0,24	20,87 ± 0,87	1,67 ± 0,09
mmdh 1	0,79 ± 0,02	0,55 ± 0,01	2,33 ± 0,06	0,03 ± 0,01	0,020 ± 0,004	5,43 ± 0,11	18,5 ± 0,34	1,48 ± 0,02
nad-me 1.2 * 2.3	0,75 ± 0,03	0,53 ± 0,02	2,12 ± 0,08	0,0200 ± 0,0002	0,02 ± 0,01	5,25 ± 0,18	17,9 ± 0,6	1,41 ± 0,04
mmdh 1 * nad-me 1.2	0,90 ± 0,04	0,57 ± 0,03	2,5 ± 0,1	0,020 ± 0,003	0,020 ± 0,003	6,18 ± 0,25	20,5 ± 0,7	1,6 ± 0,1
mmdh 1 * nad-me2.3	0,83 ± 0,06	**0,48 ± 0,04**	2,41 ± 0,17	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,03	5,57 ± 0,38	18,4 ± 1,3	1,43 ± 0,12
mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3	0,9 ± 0,1	0,60 ± 0,03	2,65 ± 0,11	0,030 ± 0,003	0,03 ± 0,01	6,62 ± 0,18	21,7 ± 1,2	1,7 ± 0,1

3.3.5 PAM- Fluorometrie zur Bestimmung der Photosynthese- Leistung

PAM- Fluorometrie Messungen ermöglichen es durch mit Hilfe der Bestimmung der emitierten Fluoreszenz von Chl a des Photosystems II (PSII), Veränderungen in der Photosynthese- Leistung zu erkennen. Zur Bestimmung der maximalen Quantenausbeute am Photosystem II wurden Induktionskinetiken von Blättern 4 Wochen alter Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, aufgenommen. Daraus konnte das F_V/ F_M Verhältniss berechnet werden, dieses Verhältnis gilt als Indikator für die Intaktheit des Photosystems II. Das F_V/ F_M Verhältnis sollte bestimmt werden, um die Fitness der Photosysteme zu untersuchen und damit Anhaltspunkte über die Photosynthese- Effizienz zu erhalten und zusätzlich mögliche stressbedingte Limitierungen der Photosysteme zu identifizieren.

Das F_V/ F_M Verhältnis von gesunden, wildtypischen Blättern liegt relativ stabil bei 0,8 (Lambers, 2008) Das F_V/ F_M Verhältnis des Wildtyps der unter Kurztagbedingungen angezogen wurde, betrug 0,840± 0,002, was leicht erhöht ist. Die verschiedenen getesteten T-DNA Insertionslinien zeigten innerhalb der Linien *mmdh 1 * nad-me 2.3* mit 0,79± 0,01 und der Linie *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* mit 0,830± 0,006 signifikante Erniedrigungen des F_V/ F_M Verhältnisses im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 40 A). Bei den Pflanzen, welche unter Kurztagbedingungen mit 65 µE Belichtung angezogen wurden, zeigte sich in den eine tendenzielle Erniedrigung des F_V/ F_M Verhältnisses in den Mutanten *mmdh 1 * nad-me 1.2* und der Tripelmutante. Eine signifikante Erniedrigung im F_V/ F_M Verhältnis war bei der Doppelmutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* mit einem Wert von 0,670± 0,001 im Vergleich zum Wert des Wildtyps von 0,825± 0,003 zu beobachten (s. Abb. 40 B). Dies deutet darauf hin, dass die maximale Quantenausbeute am Photosystem II in dieser Doppelmutante großen Limitierungen unterliegt.

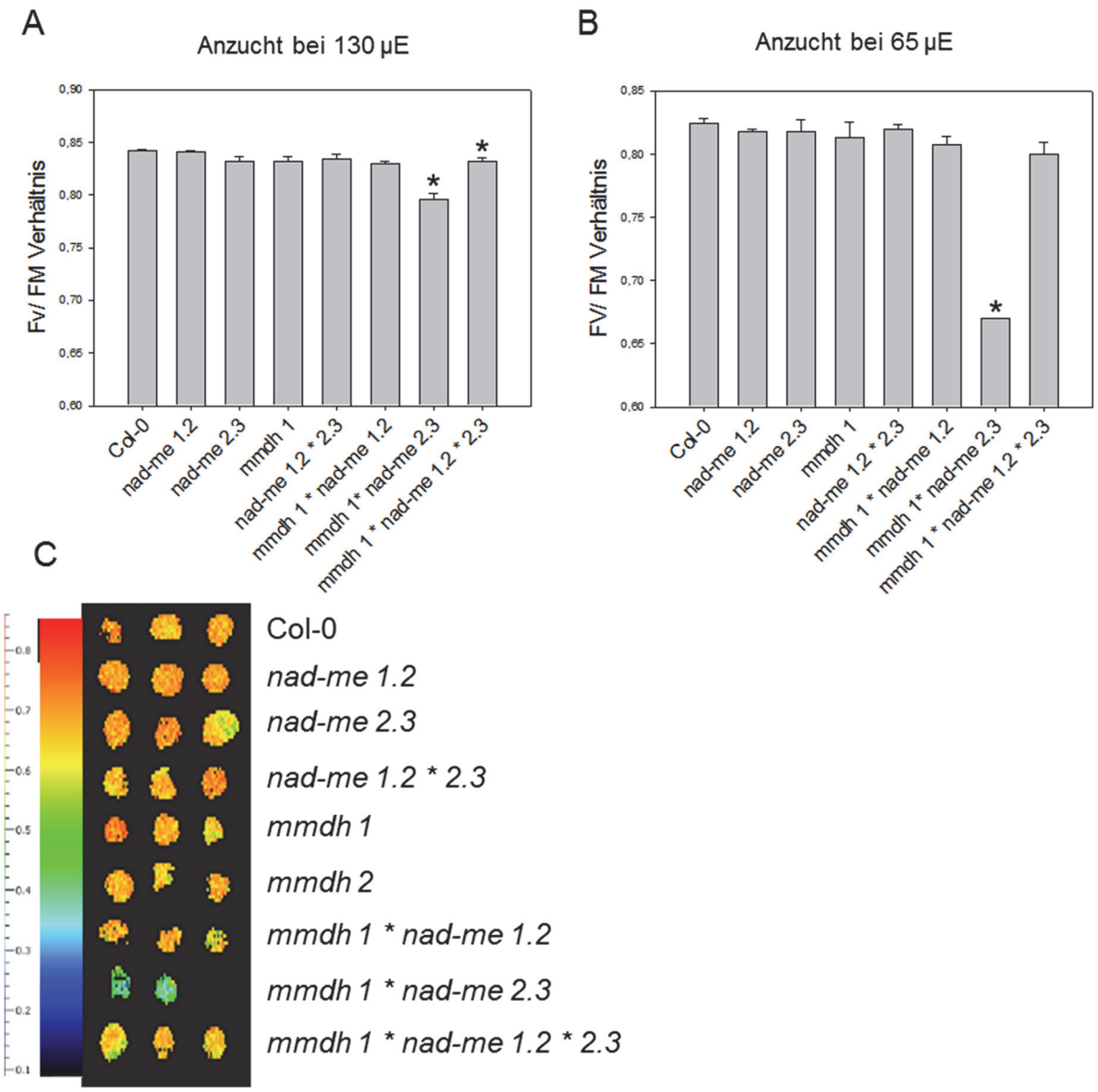

Abbildung 40: Bestimmung des F_V/ F_M Verhältnis von Wildtyp und T-DNA Insertionslinien mit dunkeladaptierten Blättern im Vergleich. Dargestellt ist die PAM-Fluorometrie Messung von jeweils n≥3 Blättern. Statistisch signifikante Werte nach dem Student's t-Test sind mit * markiert. A: Messung mit Blättern aus Kurztaganzucht mit einer Belichtung von 130 µE; B: Messung mit Blättern aus Kurztaganzucht mit einer Belichtung von 65 µE; C: Beispielhafte Darstellung der F_V/ F_M Verhältnisse aufgenommen mit der FluorCam von 40B. Der Farbencode ist links aufgezeigt. In dem leeren Feld der Mutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* konnte kein Fluoreszenz- Signal detektiert werden, hier fand eine Berechnung von n= 2 statt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt (P<0,05).

3.3.6 Saccharose Fütterung

Unter Kurztagbedingungen wurde ein gelblicher, zwergwüchsiger Phänotyp in Mutanten der Gene für *MDH* und des *NAD-ME* in Kombinationen beobachtet. Messungen des Chlorophyllgehaltes in diesen Pflanzen zeigten Erniedrigungen in den photosynthetischen Pigmenten und die Bestimmung der Intaktheit des Photosystems II verstärkte zusätzlich den Hinweise darauf, dass die Mutanten Limitierungen der Photosynthese unterlagen. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe einer Zufütterung untersucht werden, ob mit Hilfe von exogen

aufgenommener Saccharose der Phänotyp kompensiert werden konnte. Dazu wurden wildtypische Pflanzen, *mmdh 1* Mutanten und Mutanten mit den stärksten Phänotypen *mmdh 1 * nad-me 1.2, mmdh 1 * nad-me 2.3*, *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* untersucht und verglichen. Zu diesem Zweck wurden die Pflanzenlinien bei gleichbleibender Lichtstärke unter physiologisch kontrollierten Bedingungen im Kurztag auf Pflanzenagarplatten angezogen, wobei einerseits Saccharose über den Pflanzenagar zugefüttert wurde und in einem parallelen Kontrollansatz keine externe Saccharosezugabe stattfand. Des Weiteren sollte das Pflanzenwachstum in einem frühen Stadium des Keimlings mit den vier Wochen alten Pflanzen verglichen werden. Angenommen Saccharose würde nach der Aufnahme durch die Wurzel effektiv in der Pflanze verteilt, könnte durch die zytosolische Glykolyse, den anschließenden Citrat- Zyklus und die oxidative Phosphorylierung ATP hergestellt werden und die vermuteten Limitierungen der Photosynthese- Kapazitäten könnten möglicherweise mit dieser Energiequelle kompensieren.

Ohne Saccharose Zufütterung wuchsen die Keimlinge aller Linien im Vergleich auf ½ MS-Pflanzenagarplatten langsamer als mit 2 % Zufütterung von Saccharose (s. Abb. 41). Allgemein zeigten sich starke Schwankungen innerhalb der einzelnen homozygoten T-DNA Insertionsmutanten einer Linie. Einige Pflanzen je Linie schafften es, Biomasse zuzulegen, während bei anderen das Wachstum zu stagnieren schien. Diese Schwankungen wurde nicht bei der Wildtyp- Kontrolle beobachtet. Mit exogenem Zucker entwickeln die Pflanzen allgemein größere Blattrosetten. Der Wildtyp und die *mmdh 1* Linie bildeten grüne Blattrosetten aus, wobei die anderen drei getesteten Linien wieder den leicht gelben Phänotyp zeigten, der am stärksten bei der Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3* ausgebildet war. Die Zuckerfütterung von Saccharose rettete diesen Phänotypen unter den gewählten Kurztagbedingungen mit 130 µE Belichtung nicht vollständig. Allerdings erreichten die Linien *mmdh 1 * nad-me 1.2*, *mmdh 1 * nad-me 2.3*, *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* größere Blattrosetten als ohne Zufütterung von Saccharose.

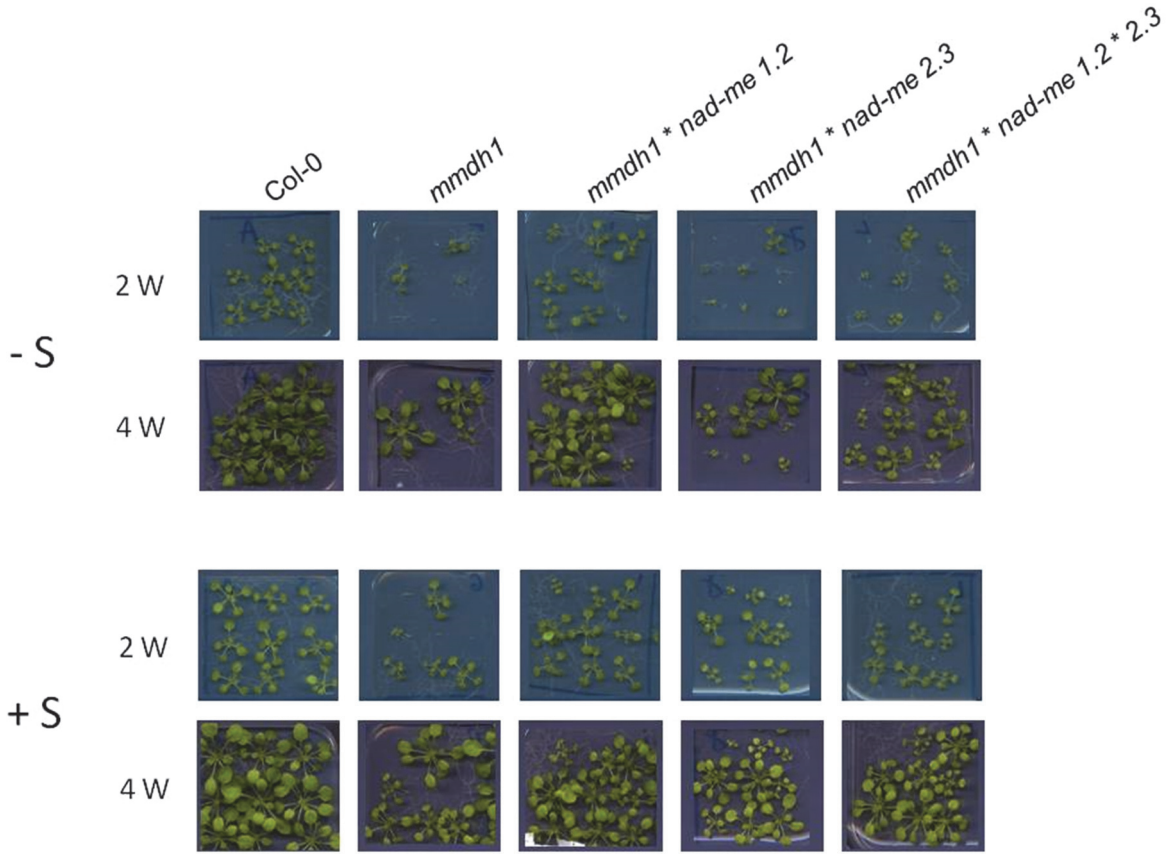

Abbildung 41: Photographische Dokumentation repräsentativer Pflanzenkeimlinge aller T-DNA Insertionslinien und Col-0 auf ½ MS Pflanzenagar (-S) und ½ MS Pflanzenagar mit 2 % Saccharose versetzten (+S). Die Pflanzen wurden nach 2 Wochen (2 W) und 4 Wochen (4 W) Wachstum unter Kurztagbedingungen mit 130 µE Belichtung photographisch dokumentiert.

3.3.7 Die Analyse von Intermediaten des Primärmetabolismus

Unter Kurztagbedingungen mit niedriger Photonenflussdichte von 65 µE zeigten die Doppelmutanten, die einen Verlust an mMDH1 und NAD-ME 1 oder NAD-ME 2 besitzen, phänotypische Veränderungen. Die *knockout* T-DNA- Linien besaßen weniger Chlorophyll, schlechtere photosynthetische Kapazitäten und produzierten weniger Biomasse. Daher war die Bildung, Verwendung und Verteilung der löslichen Photosynthate wie der Carbohydrate, aber auch der Aminosäuren und anderen organischen Säuren von Interesse. Mit deren Analyse, sollte analysiert werden, wie sich die Kohlenstoffversorgung und Verteilung in den T-DNA Linien verhalten, wenn die Malat Respiration im Mitochondrium durch den Ausfall der verschiedenen Gene verändert wird. Außerdem sollten Hinweise darauf erschlossen werden, ob sich der Ausfall der Genprodukte in den unterschiedlich kombinierten Mutanten ebenfalls unterschiedlich auf den Metabolismus auswirkt, d.h. ob im Umkehrschluss den einzelnen Genprodukten differenzierte Aufgaben im Kohlenstoffmetabolismus zugesprochen werden können.

Die löslichen Zucker Glucose, Fructose und Saccharose wurden unter Kurztagbedingungen mit niedrigem Licht in allen Linien synthetisiert. Die Glucose Konzentrationen waren in den Linien *mdh 1*, *mdh 1 * nad-me 1.2* und *mdh 1 * nad-me 2.3* signifikant erhöht. Während der Nacht wurde in allen Linien die Glucose abgebaut, so dass deren Konzentrationen nun geringer waren (s. Abb. 42). Die Fructosekonzentrationen waren am Ende des Tages in allen Linien in einem ähnlichen Bereich mit großen Schwankungen, am Ende der Nacht hatten alle Doppelmutanten bis auf die Mutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* mehr Fructose abgebaut als der Wildtyp, die Konzentrationen erniedrigten sich aber allgemein nur in geringem Maße. Im Falle des Transportzuckers Saccharose hatte sich am Ende des Tages in der Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3* signifikant mehr Zucker angesammelt. Am Ende der Nacht zeigten die Linien *nad- me 1.2 * 2.3*, *mmdh 1 * nad-me 1.2* und *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* eine niedrigere Konzentration als der Wildtyp. Allerdings konnten am Ende der Nacht im Wildtyp und den Einfachmutanten höhere Level an Saccharose und mit größeren Standardfehlern, als am Tag detektiert werden.

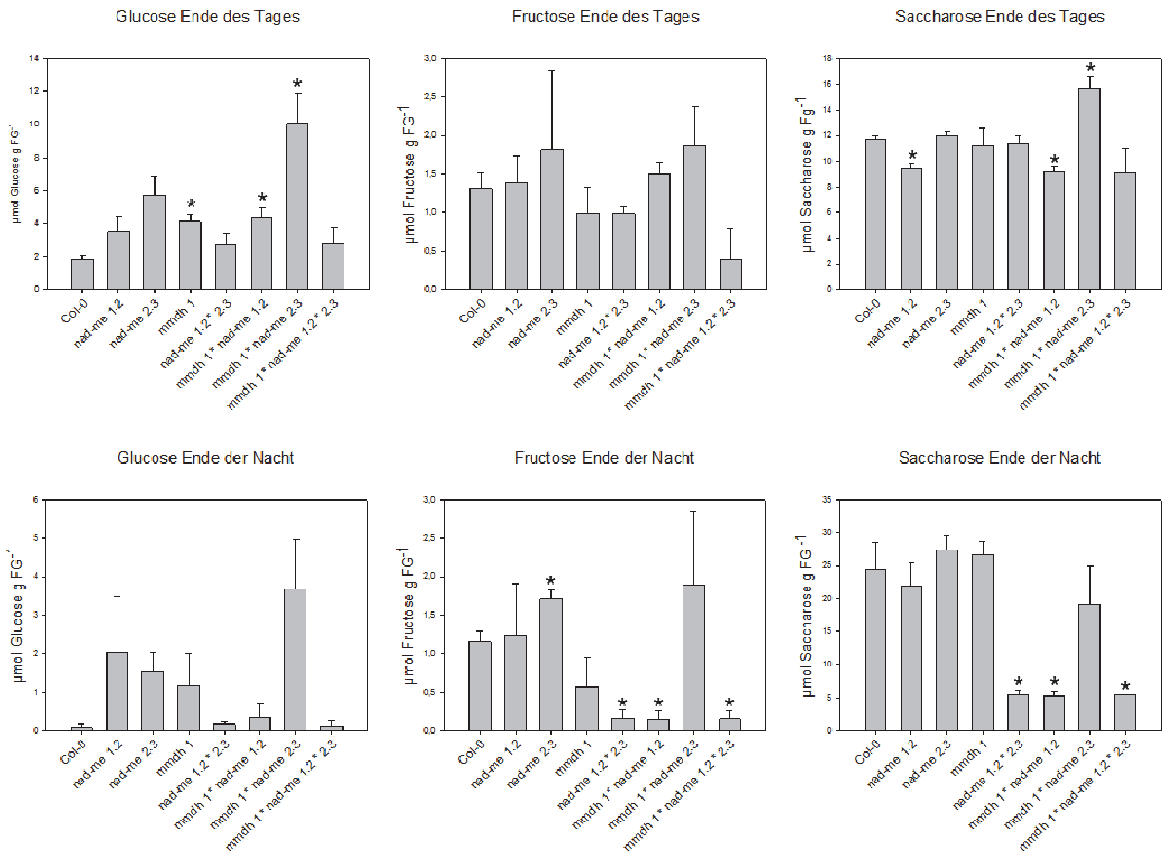

Abbildung 42: Abundanz löslicher Zucker in Blattrosetten der T-DNA Insertionslinien und der Wildtypkontrolle am Ende des Tages (oben) und am Ende der Nacht (unten) in einem Kurztagrhythmus, bei einer Belichtung von 65 µE. Die löslichen Zucker Glucose, Fructose und Saccharose wurden photometrisch analysiert, es wurden n= 3 Pools aus 4 Pflanzen analysiert, dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mit Student's t-Test berechnet (P<0,05) und mit * gekennzeichnet.

3.3.7.1 Metabolisches Profil via GC-MS Analyse

Mit der Intention Informationen über die Verteilungen und das Verhalten im Primärmetabolismus der T-DNA Linien mit gestörtem Malat Metabolismus zu erhalten, sollte ein metabolisches Profil erstellt werden. Hierzu wurden alle Pflanzenlinien unter identischen physiologischen Bedingungen mit einer Belichtung von 65 µE und Kurztag-Rhythmus angezogen und am Ende des Tages sowie am Ende der Nacht geerntet. Mit den Extrakten der Proben wurde eine GC-MS Analyse durchgeführt (s. 2.9.4). So konnten im Anschluss die Verteilungen von Citrat- Zyklus Intermediaten, Carbohydraten, Aminosäuren und anderen organischen Säuren zu den unterschiedlichen Erntezeitpunkten zwischen den verschiedenen Linien verglichen werden. Im Kurztag mit niedriger Belichtungsstärke hatte sich zuvor der prägnanteste Phänotyp der T-DNA Insertionslinien gezeigt, der Limitierungen der Kohlenstoff- Assimilation vermuten ließ. Dadurch wurden in einem metabolischen Profil interessante Veränderungen des Metabolismus, besonders in den Pflanzen- Linien mit starkem Phänotyp unter diesen Anzuchtsbedingungen erwartet.

Wenn nun die Daten der GC-MS Analyse zur Übersicht in der *heat map* betrachtet werden, fällt auf, dass sich zahlreiche Veränderungen in den Metaboliten der T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp ausgebildet haben. Die grüne Farbe zeigt die Intensität einer Erniedrigung der Konzentration von Metaboliten, wohingegen die rote Farbe die Intensität einer Akkumulation von Metaboliten im Vergleich zum Wildtyp darstellt (s. Abb. 43). Auf Grund des Verlustes der Genfunktionen ließen sich farbliche Muster in der *heat map* erkennen.

Am Ende des Tages zeigten die Metabolite des Citrat- Zyklus in den T-DNA Einzelmutanten und keine starken Veränderungen, alle Intermediate waren jedoch weniger Abundant. Die Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3* bildete eine Ausnahme, die Akkumulationen von Pyruvat und Malat aufwies, sowie die Linie *nad-me 1.2 * 2.3*, welche Fumarat und Malat akkumulierte. Die Linien *mmdh 1 * nad-me 1.2* und die Tripelmutante verhielten sich ähnlicher zueinander als zu den Einzelmutanten und der *mmdh 1 * nad-me 2.3* Mutante. Am Ende des Tages akkumulierten in den Mutanten *nad-me 1.2 * 2.3*, *mmdh 1 * nad-me 1.2* und *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* weniger Aminosäuren im Vergleich zu den anderen Linien und zum Wildtyp, wohingegen die Mutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* die stärksten Akkumulationen der analysierten Aminosäuren zeigte. Die Einzelmutanten entwickelten im Aminosäure-Metabolismus ähnliche Tendenzen wie der Wildtyp, nur die Linie *nad-me 2.3* zeigte Tendenzen zu Akkumulation von vielen Aminosäuren. Dieses Bild der Einzelmutanten wiederholte sich auch in der Synthese der Zucker, am Ende des Tages hatten die Einzelmutanten ähnliche Level an Glucose, Fructose, Saccharose, Sorbose und Xylose aufgebaut. Ein interessantes Muster war bei den Zuckern in allen Doppelmutanten und der Tripelmutante zu erkennen, wiederholt mit wenigen Ausnahmen in der Linie *mmdh 1 * nad-*

me 2.3. Es bildeten sich weniger Zucker wie Glucose und Fructose aber dafür konnte eine Zunahme der alkoholischen Zucker beobachtet werden. Auffällig waren auch die Konzentrationen von Glycerat, welches in allen Doppelmutanten stark erniedrigt war.
Am Ende der Nacht zeigte die Mutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* die niedrigsten Konzentrationen von Citrat- Zyklus Intermediaten. Die Aminosäuren waren in allen Linien im Vergleich wenig verändert, nur die Aminosäure Prolin war in den Linien durchgehend höher abundant im Vergleich zum Wildtyp. Die Abundanz des Zuckers Maltose war in allen Mehrfachmutanten erniedrigt, Raffinose und Galactinol zeigten in allen Doppelmutanten und der Tripelmutante starke Zunahmen im Vergleich zum Wildtyp.
Zusammenfassend betrachtet zeigte das metabolische Verhalten der Einzelmutationen keine großen Veränderungen zum Wildtyp. Die gekreuzten Doppelmutanten hingegen, entwickelten größere metabolische Antworten auf den Ausfall von *NAD-ME* und *MDH 1* in den verschiedenen gekreuzten Kombinationen. Die Mutanten *nad-me 1.2 * 2.3*, *mmdh 1 * nad-me 1.2* und die Tripelmutante zeigten mit Ausnahmen ähnliche Verteilungsmuster der Metabolite am Ende des Tages, oft entwickelten sich niedrigere Konzentrationen an Metaboliten als im Wildtyp. Die Mutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* zeigte eine differenzierte und veränderte metabolische Antwort auf den Ausfall von *MDH 1* und des *NAD-ME 2*.
Der Verlust der drei Genfunktionen von *MDH 1* und *NAD-ME 1* und *NAD-ME 2* schien keinen additiven Effekt in der Tripelmutante hervorzurufen, vielmehr wurden differenzierte Effekte in den verschiedene Mehrfachmutanten sichtbar.

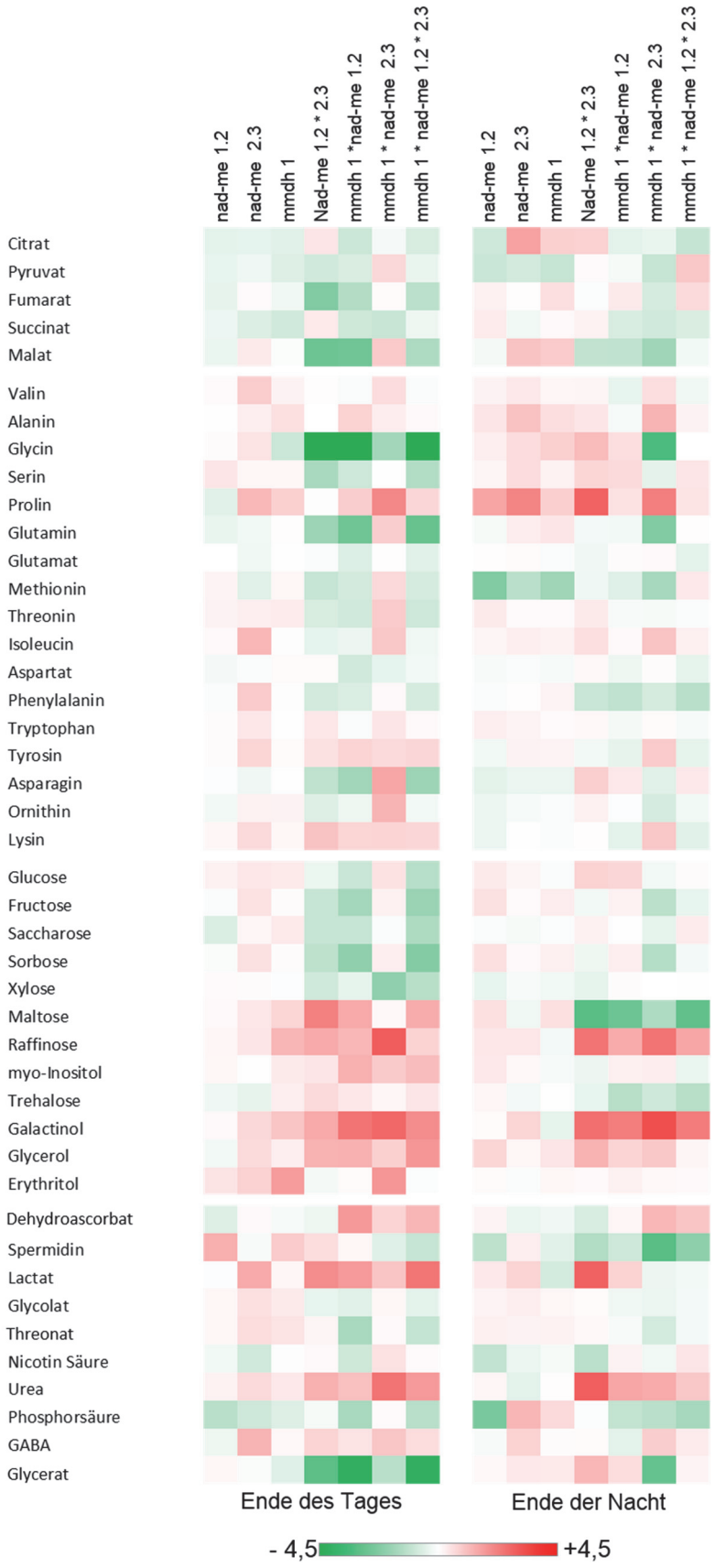

Abbildung 43: *Heat Map* des metabolischen Profils der T-DNA Insertionslinien im Vergleich am Ende des Tages (links) und am Ende der Nacht (rechts). Dargestellt sind logarithmische, relative Änderungen der Mittelwerte der einzelnen Mutanten im Vergleich zu Col-0.

Als nächstes werden wichtige Metabolite des metabolischen Profils quantitativ aufgeführt. In Abbildung 44 sind einzelne Metabolite am Ende des Tages und am Ende der Nacht jeweils in einzelnen Graphen im Vergleich gezeigt.

Am Ende des Tages zeigte Pyruvat im Vergleich zum Wildtyp signifikante Erniedrigungen in der *mmdh 1* Mutante und den Doppelmutanten *mmdh 1 * nad-me 1.2* und *nad-me 1.2 * 2.3*. Malat und Fumarat als weitere Metabolite des Citrat- Zyklus und wichtige Kohlenstoff-Speicher während einer langen Nachtphase waren ebenfalls in den Doppelmutanten und der Tripelmutante erniedrigt, nur in der Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3* waren alle drei Intermediate im Vergleich zum Wildtyp erhöht (s. Abb. 44). Metabolite wie Glycerat, Glycin und Serin, welche als Indikator für den Photosynthese- Fluss und für die Photorespiration gesehen werden können, waren in allen Doppelmutanten und der Tripelmutante signifikant erniedrigt oder zeigten zumindest die Tendenz dazu. Glycin war in der *mmdh 1* Einzelmutante auch signifikant erniedrigt, ansonsten verhielten sich die Einzelmutanten ähnlich zum Wildtyp. Aminosäuren wie Valin, Isoleucin und Tyrosin gelten neben anderen Aminosäuren als Seneszenz- Marker in *A. thaliana* (Fahnenstich, 2007). Valin war in der Doppelmutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* und in der Einzelmutante *nad-me 2.3* am Ende des Tages signifikant erhöht. Die Aminosäure Tyrosin war in allen Doppelmutanten und der Tripelmutante, ausgenommen der *nad-me* Doppelmutante, signifikant erhöht.

Am Ende der Nacht war besonders auffällig, dass drei Seneszenz Marker, Valin, Isoleucin und Tyrosin in der *mmdh 1 * nad-me 2.3* Mutante signifikant erhöht waren. Wohingegen sie in den anderen Doppelmutanten sowie der Tripelmutante erniedrigt waren oder auf Wildtyp-Niveau lagen (s. Abb. 45). In den beiden Einzelmutanten des NAD-ME waren allerdings Isoleucin und Valin signifikant erhöht. Die Citrat- Zyklus Intermediate zeigten im Falle von Pyruvat keine signifikanten Veränderungen zwischen den Linien am Ende der Nacht. Auffällig war die Linie *mmdh 1*, die die von Malat und Fumarat signifikant akkumulierte. Malat war am Ende der Nacht in allen Doppelmutanten- und der Tripelmutanten tendenziell erniedrigt.

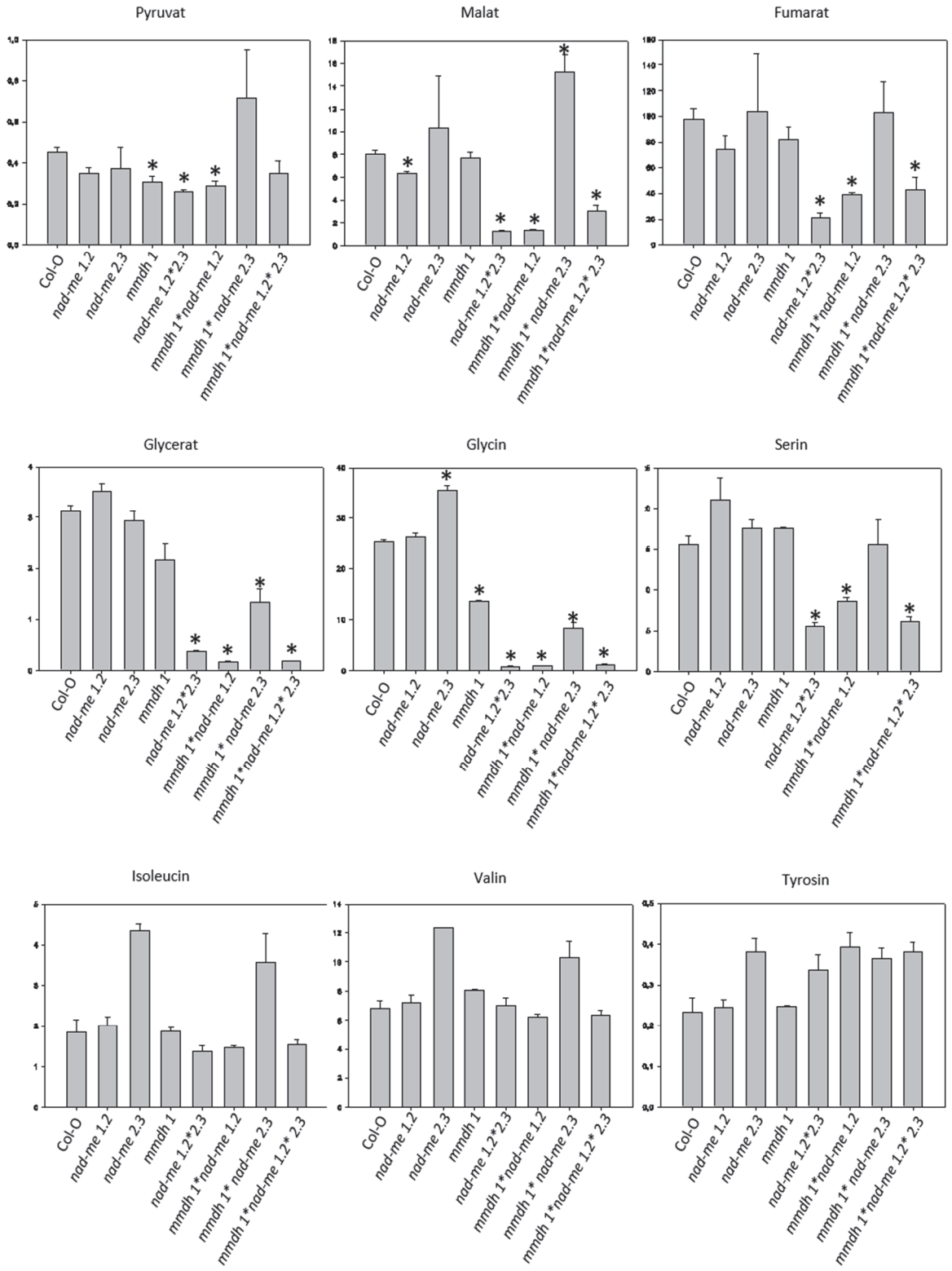

Abbildung 44: Darstellung der GC-MS Daten T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen vier Wochen mit 65 µE angezogen und am Ende des Tages im Licht geerntet. Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus Metaboliten pro g FG von n = 3 Pflanzen ± Standardfehler. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant verändert zum Wildtyp, berechnet nach Student's t-Test ($P<0,05$).

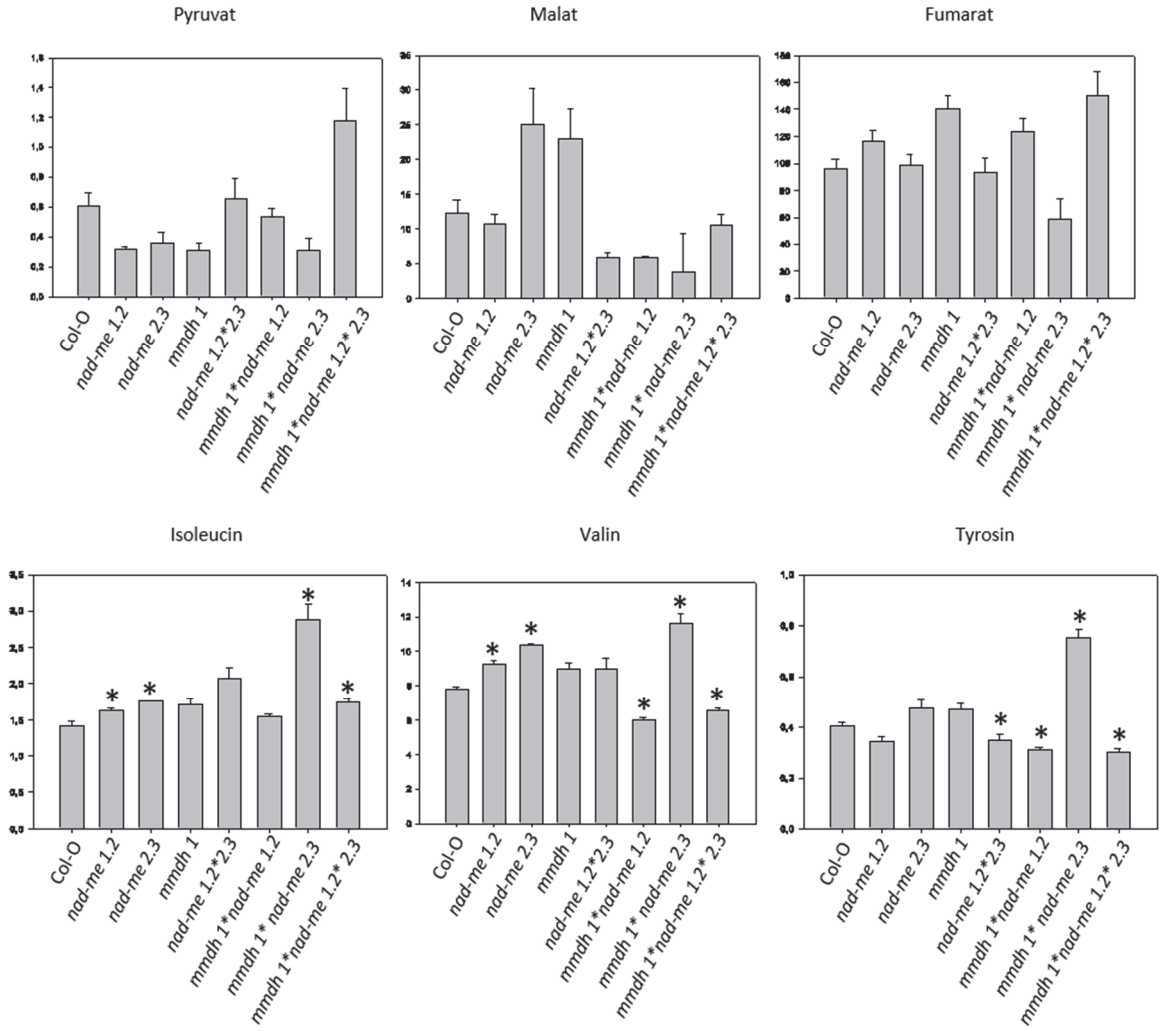

Abbildung 45: Darstellung der GC-MS Daten T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen und einer PFD von 65 µE für vier Wochen angezogen und am Ende der Nacht in Dunkelheit geerntet. Die Säulen entsprechen Mittelwerten pro g FG von n = 3 Pflanzen ± Standardfehler. Die * gekennzeichneten Werte sind signifikant verändert zum Wildtyp, berechnet nach Student's t-Test (P<0,05).

Die nicht- proteinogene Aminosäure γ-Aminobuttersäure (GABA) zeigte in dem durchgeführten Metaboliten Profil Auffälligkeiten in der Einzelmutante *nad-me 2.3* und der Doppelmutante *mmdh 1 * nad-me 2.3*. GABA kann anaplerotisch den Citrat- Zyklus mit Kohlenstoffatomen über den GABA-Shunt speisen (Studart-Guimaraes *et al.*, 2007) und es akkumuliert sehr schnell bei einer Vielzahl von Stressbedingungen (Kinnersley *et al*., 2000). Am Ende des Tages war GABA in der Einzelmutante *nad-me 2.3* signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp und akkumulierte tendenziell mit Schwankungen in allen Doppelmutanten (s. Abb. 46). Am Ende der Nacht waren die GABA Level in der *nad-me 2.3* Linie immer noch tendenziell erhöht und signifikant höher abundant in der *mmdh 1 * nad-me 2.3* Doppelmutante. Eine Auflistung der Konzentrationen aller Metabolite findet sich im Appendix 6.6.

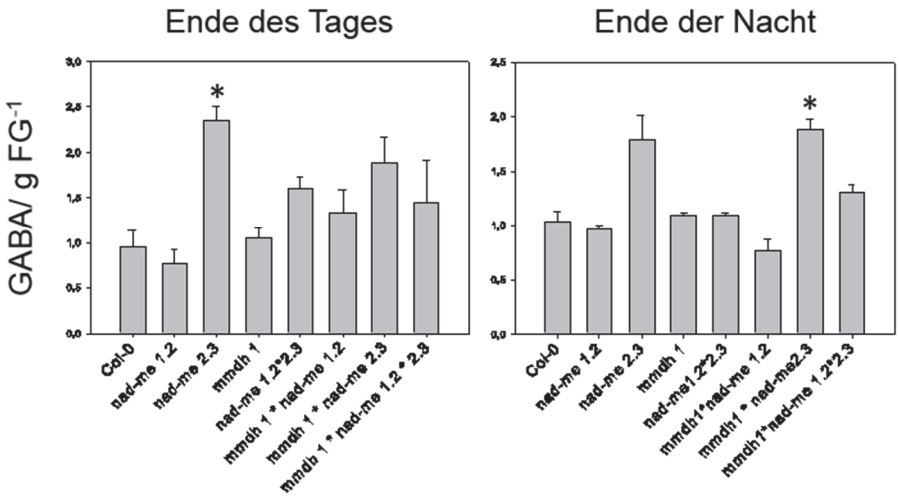

Abbildung 46: Darstellung der γ-Aminobuttersäure Daten der T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen und einer PFD von 65 µE für vier Wochen angezogen und am Ende des Tages (links) und am Ende der Nacht (rechts) im Licht geerntet. Die Säulen entsprechen Mittelwerten pro g FG von n = 3 Pflanzen ± Standardfehler. Die mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant verändert zum Wildtyp, berechnet nach Student's t-Test (P<0,05).

4. Diskussion

4.1 Anwendung von artifiziellen Stoffwechselwegen zur Verbesserung der photosynthetischen Effizienz

4.1.1 Auswirkungen des chloroplastidären, katabolischen Glykolat Stoffwechselwegs

Die RubisCO limitiert die Photosynthese durch die Abhängigkeit von Umweltfaktoren wie Temperatur, Lichtintensität, Stickstoff- Versorgung und atmosphärisches CO_2 (Moore *et al*., 1999; Aranjuelo *et al*., 2011; Seneweera *et al*., 2011). Auf physiologischer Ebene ist dies häufig bedingt durch die Oxygenase Aktivität der RubisCO, welche in ihrer Konsequenz in der Photorespiration zu einem Verlust an Kohlenstoff und Energie führt und somit die Biomasseproduktion der Pflanze einschränkt (Bowes, 1971; Maurino und Peterhänsel, 2010). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde ein artifizieller Stoffwechselweg etabliert, mit dem Ziel die Biomasseproduktion der Modellpflanze *A. thaliana* zu erhöhen (Fahnenstich, 2007; Maier *et al*., 2012). Um dies zu erreichen, sollte durch die Oxygenase Reaktion der RubisCO gebildetes Glykolat als Eingangssubstrat für den artifiziellen Stoffwechselweg dienen. Das Glykolat sollte innerhalb des Chloroplasten komplett verstoffwechselt werden und dort CO_2 und Energie in Form von Reduktionsäquivalenten freisetzen. Mit der Annahme, dass in C3 Pflanzen die photosynthetische CO_2 Assimilation unter atmosphärischen Bedingungen nicht saturiert ist, resultierend aus den Limitierungen der RubisCO (Farquhar und Von Caemmerer, 1982), könnte ein Anstieg der lokalen CO_2 Konzentration am Ort der RubisCO die Carboylierungsrate erhöhen. Dieser Mechanismus hätte eine Parallele zur CO_2- Pumpe von C4 Pflanzen, bei denen ebenfalls CO2 im Chloroplasten angereichert wird (Maier *et al*., 2011).

In den Vorarbeiten war es eine Herausforderung, das durch die Aktivität der transgenen Glykolat Oxidase entstandene Glyoxylat und H_2O_2 zu detoxifizieren. Hierzu wurde nach der Generierung der GO Pflanzen, die Malat Synthase als Glyoxylat verstoffwechselndes Enzym in die Pflanzen eingebracht (Fahnenstich, 2007). Durch die Aktivität dieser transgenen Malat Synthase sanken die Glyoxylat- Level in den Pflanzen. Jedoch blieb ein für das Ziel des Projekts unvorteilhafter, kleinwüchsiger gelblicher Phänotyp bestehen. Durch die Integration der Katalase wurde dieser Phänotyp komplementiert, dieses Enzym H_2O_2 zu H_2O und O_2 umsetzt (Fahnenstich, 2007; Maier *et al*., 2012). Die Auswirkungen des kompletten Stoffwechselweges wurden in dieser Arbeit näher untersucht.

Unter Kurztagbedingungen wurden zwei GMK Linien, welche alle drei Transgene exprimierten, im Vergleich mit der Donor- Linie GO-MS und dem Wildtyp auf ihren Phänotyp und Morphologie hin untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden GMK Linien wurde mit Hilfe der Vorarbeiten getroffen. Hier wurden zuerst wurden homozygoten Pflanzen der Linien GMK 1 und GMK 3 untersucht, sie exprimierten alle Transgene und bildeten größere Blattrosetten ausbildeten als der Wildtyp. Folgegenerationen der Linie GMK 1 waren so groß wie der Wildtyp und bildeten leicht gelbliche Blätter aus. Daraufhin zeigte sich in RT-PCR Analysen, dass die Expression des Gens welches für die Katalase kodierte, eine sehr niedrige Expression des Gens aufwies, was auf einen *silencing*- Effekt hinwies. Daher wurde für weitere Untersuchungen die Linien GMK 3 und GMK 9 ausgewählt. In den Analysen zur Morphologie bildeten die GO-MS Linien eine kleinere Blattrosette mit gelblichen Blättern. Im Gegensatz dazu, waren die Blattrosetten Linien GMK 3 und GMK 9 grün und so groß wie die Col-0 Kontrollpflanzen, im Falle von GMK 3 sogar größer und mit einer höheren Anzahl von Blättern bestückt. Der Phänotyp der GO-MS Pflanze wurde komplementiert und die GMK 3 Linie zeigte sogar eine Verbesserung des Wachstums und somit der Produktion von Biomasse. Die Blattrosetten der GMK 3 Pflanzen zeigten ein höheres Frisch- und Trockengewicht von 28% und 36% im Vergleich zum Wildtyp, was zeigte dass mehr Biomasse pro Pflanze aufgebaut worden war (s. 3.1). Dies führte zu der Vermutung, dass die Pflanzen eine verbesserte Assimilationsrate durch den integrierten Stoffwechselweg, der CO_2 freisetzten sollte, besaß. Die Pflanzen bauten demnach mehr Biomasse auf, durch eine erhöhte Anzahl an Blättern, die einzelnen Blätter waren aber dünner. Dies wurde neben einer Zunahme an Biomasse ebenfalls in den Arbeiten von Kebeish *et al*. (2007) beobachtet, in diesem Fall allerdings auch in den Pflanzen, die nur das erste Enzym des dort etablierten Stoffwechselwegs exprimierten, die Glykolat Dehydrogenase (Kebeish *et al*., 2007). Durch die Übereinstimmung dieses Phänotyps, kann dies möglicherweise durch ein oder mehrere Signale durch einen veränderten Energiestatus in den Pflanzen erklärt werden. Hierzu müsste vor allem die Blatt-Ultrastruktur weiter untersucht werden, um die Morphologie genauer zu definieren. Ein Hinweis könnte jedoch eine Arbeit mit Weizen (*T. aestivum*) geben, in dieser Untersuchung waren die Blätter des Weizens verlängert unter einer Anzucht mit hoch-CO_2 Konzentrationen (Seneweera und Conroy, 2004). Die Autoren ermittelten eine Vergrößerung der Blattfläche um 18% und vermuten, dass mehr lösliche Carbohydrate zu den Orten des Wachstums transportiert werden können.

In der GMK 9 Linie wurde der GO-MS Phänotyp ebenfalls komplementiert, die Wachstumsverbesserungen erreichten das Wildtyp- Niveau. Die GMK 9 Linie zeigte eine Kompensation auf Wildtyp Level aber keine weitere zusätzliche Ausbildung an Biomasse. Hier wurden in den Vorarbeiten unterschiedliche Enzymaktivitäten Level detektiert. Dies

könnte abhängig von dem Ort der Integration des Transgens in das Genom der Pflanzen sein, das die *A. tumefaziens* vermittelte Transformation zufällig geschieht (Bundock, 1996). Die hier untersuchten Linien besaßen nur eine Integration ins Genom der Transgene. So kann sich die einzelne Aktivität in den verschiedenen Transformanden- Linien stark unterscheiden und es kommt auf das Zusammenspiel aller nötigen transgenen Enzymaktivitäten sowie andere pleiotropische Effekte an, ob der Stoffwechselweg seine optimale Ausprägung erreicht.

Um nun die Ursache der Zunahme an Biomasse in den Linien im Vergleich zur GO-MS Linie zu untersuchen, wurde die Morphologie der photosynthetisch aktiven Blätter genauer untersucht. Die Morphologie der Blätter war verändert, der Durchmesser war dünner als der des Wildtyps und es wurde weniger Gewicht pro Fläche gemessen. Um genaue Informationen über den Blattstatus zu erhalten, wurde mit Blattextrakten durch Gelelektrophorese der Proteinstatus untersucht und die Pflanzen zeigten keine Unterschiede z.B. in der Abundanz der RubisCO Untereinheiten. Eine Quantifizierung der Blattpigmente wurde durchgeführt, um sich dem Gesamtbild der photosynthetischen Charakteristika zu machen, da die Pigmente ausschlaggebend sind für den Ablauf und die Instandhaltung der Photosynthese (Green und Dunford, 1996). Neben einer Reduktion von Xhantophyllen und Carotinen pro g Blattmaterial, war auch die Gesamtchlorophyll Konzentration im Blatt erniedrigt. Allerdings war das Verhältnis von Chl a zu Chl b nicht gestört. Dies zusammengefasst, lässt darauf schließen, dass die Fähigkeit zur Photosynthese, vor allem der Status der RubisCO gegeben sind und die Charakteristika der Photosynthese wurden im Folgenden Quantifiziert.

Durch nähere Analysen sollte nun der Kern der Photosynthese, die Kohlenstoff-Assimilation untersucht werden. Die CO_2 Assimilationsrate war in den GMK 3 Pflanzen erhöht, mit signifikanten Werten bei der CO_2 Assimilation pro Mol Chlorophyll und ebenfalls pro Blattfläche. Dies zeigte, dass die GMK 3 Pflanzen eine bessere photosynthetische Effizienz als der Wildtyp besitzen. Die Bestimmung des CO_2 Kompensationspunktes Γ sollte Hinweise darüber geben, ob in den GMK 3 Pflanzen eine veränderte, möglicherweise verbesserte katalytische Aktivität der RubisCO stattfand. Γ ist der CO_2 Partialdruck, bei dem sich die CO_2 Fixierung und der CO_2 Ausstoß durch Photorespiration und Respiration ausgleichen, der hauptsächlich durch die kinetischen Eigenschaften der RubisCO bestimmt ist. Γ liegt in C3 Pflanzen zwischen 40- und 50 ppm CO_2 (Tolbert *et al*., 1995), während Pflanzen mit einer C4 Photosynthese, die wenig Photorespiration durchführt, einen stark erniedrigten Γ von ca. 2 ppm CO_2 aufweisen (Tolbert, 1997). Daher wird diese Bestimmung oft verwendet um C4 Spezies zu identifizieren (Hola-day und Chollet,1983; Ku *et al*.,1991; Madhavan *et al*.,1996). In den GMK 3 Pflanzen gab es keine Unterschiede in Γ im Vergleich zum Wildtyp. So dass man davon ausgehen kann, dass keine großen Veränderungen in

der CO_2 Aufnahme und/ oder Ausstoß im Vergleich zum Wildtyp stattfanden, also keine bedeutenden Veränderung der katalytischen Aktivitäten der RubisCO stattfanden. Diese Messung könnte jedoch durch die Respiration am Tag, eine Verbesserung maskieren (Farquar *et al*., 1980). Die Bestimmung von Γ^* wäre eine weitere Methode, welche die Photorespiration, daher die Oxygenierungsaktivität der RubisCO ermittelt. Die Messungen der intrazellulären CO_2 Konzentration (C_i) zeigten keine signifikanten Erhöhungen von CO_2 im Chloroplasten, aber eine Tendenz dazu. Dies ist eine mögliche Auswirkung durch die Freisetzung der Verstoffwechselung von Glykolat im Chloroplasten in den GMK 3 Pflanzen. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Messungen aus der Arbeit von Kebeish *et al*. (2007), die ebenfalls keine Veränderung in Γ detektierten, jedoch eine Erniedrigung des Γ^* ermittelten (Kebeish *et al*., 2007). Die Abhängigkeit des Kompensationspunktes von der Sauerstoff Konzentration ist linear (Farquar *et al*., 1980) und zeigt keine Abweichungen zwischen GMK 3 Pflanzen und Col-0. Diese Abhängigkeit ist hauptsächlich bestimmt durch das Verhältnis von der Respiration des Tages (R_d) zu der maximalen RubisCO Aktivität (V_{max}; Peisker, 1974; Farquar *et al*., 1980). Dies zeigt nun weiterführend, dass es keine Unterschiede in dem Verhältnis von R_d und V_{max} zischen den Pflanzen gibt, was die Aussagen des ermittelten Γ bestätigt. Diese beiden ermittelten C3 Photosynthese Charakteristika geben Hinweise darauf, dass die RubisCO zu dem gemessenen Zeitpunkt nicht mit großem Unterschied in den beiden Linien arbeitet.

Das könnte der Fall sein, weil möglicherweise nicht genug oder nur wenig Glykolat durch den neu integrierten Stoffwechselweg metabolisiert wird. Das wiederrum könnte verschiedene Gründe haben: Entweder, der Stoffwechselweg greift Glykolat ab und metabolisiert dieses nicht ausreichend weiter, so dass der Stoffwechselweg das Intermediat nicht komplett verarbeitet. Möglicherweise wird das Malat aus dem Chloroplasten transportiert z.B. durch das Malat- Ventil (Scheibe, 2004). Hierfür wären die erhöhten Malat Level, die während des Tages gemessen wurden ein Indiz. Des Weiteren sollten die Aktivitäten der endogenen Enzyme NADP- ME und PDH überprüft werden, ob diese in den transgenen Pflanzen erhöht sind, denn es wäre denkbar dass eine Veränderung der Malat Konzentration die Expression von diesen Enzymen moduliert.

Es wäre auch denkbar, dass zu Beginn der Photosynthesephase in atmosphärischer Luft im normalen Maße Oxygenierungsreaktionen stattfinden, diese aber dann durch den GMK Stoffwechselweg sukzessiv CO_2 freisetzten, was wiederrum kompetitiv die folgenden Oxygenierungsreaktionen verhindert, so dass sich das System nach unbestimmter Zeit auf eine Homeostase einpendelt. Um dies zu überprüfen, sollten Assimilations- Bestimmungen und beispielsweise Γ^*- Bestimmungen über den Tag durchgeführt werden, aber auch unter photorespiratorischen Bedingungen ermittelt werden. Dies wäre von Interesse weiter zu

überprüfen, was durch metabolische Fluss Analysen mit radioaktiv markierten Isotopen von CO_2 und O_2 beobachtet werden könnte (bspw. Fernie *et al*., 2005).

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Pflanzen mehr Biomasse aufbauen und eine erhöhte Kohlenstoff- Assimilationsrate aufwiesen. Dies bestätigt die vorangegangene Annahme, dass die C3 Photosynthese nicht gesättigt ist und eine Erhöhung von Biomasse durch eine erhöhte photosynthetische Effizienz erreicht werden kann.

4.1.1.1 Auswirkungen der erhöhten Assimilationsrate auf den Primärmetabolismus

Um die Auswirkungen des artifiziellen Stoffwechselweges und der dadurch resultierenden erhöhten Assimilationsrate zu untersuchen wurde ein metabolisches Profil der GMK 3 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erstellt. Es war durch Vorarbeiten bekannt, dass diese Linie das Vermögen hatte Stärke während des Tages zu akkumulieren (Fahnenstich, 2007). Die Photosynthate wie Glucose und andere Zucker zeigten keine signifikanten Veränderungen zum Wildtyp, bis auf den alkoholischen Zucker Glycerol und den Zucker Raffinose, die beide erniedrigt waren. Die TCA- Zyklus Intermediate waren erhöht, bis auf Fumarat. Dies könnte auf erhöhte Konzentrationen von PEP, OAA und Pyruvat hinweisen, die einen höheren Fluss durch den Citrat- Zyklus antreiben. Eine indirekte Bestätigung auf einen höheren Fluss durch Stoffwechselwege die über PEP und Pyruvat laufen, könnte die Akkumulation von Aminosäuren in der GMK 3 Pflanzenlinie, die aus PEP und Pyruvat gebildet werden sein. Diese Intermediate liefern Kohlenstoffgerüste für die für die Aminosäuresynthese verwendet werden, zum Beispiel zur Synthese von aromatischen Aminosäuren über den Shikimat- Weg (Herrmann und Weaver, 1999). In diesem Zusammenhang liegen signifikante Akkumulationen von Leucin, Phenylalanin, Valin und α-Ketoglutarat vor. Ein höherer Fluss durch den Calvin-Zyklus könnte in mehr Energie in Form von PEP und Pyruvat führen, die sich dann in die Synthese von diesen Aminosäuren auswirkt. Dies wiederrum lässt Rückschlüsse darauf zu, dass eine erhöhte photosynthetische Effizienz mehr Energie generiert, die in Form von Pyruvat und PEP geleitet wird.

Zusammenfassend schien es keine Störungen im Kohlenstoff und Stickstoff-Gleichgewicht der Pflanzen zu geben unter atmosphärischen Bedingungen zu geben, was auch durch die Element- Analyse gezeigt wurde. Interessanterweise zeigte sich eine Veränderung des Flusses von PEP, Pyruvat und OAA, der in einer Akkumulation von Aminosäuren endetet, wohingegen die Zucker als Photosynthate nicht bedeutend verändert waren.

4.1.1.2 Findet Fluss durch den GMK Stoffwechselweg statt?

Wie in 4.1.1.1 bereits diskutiert, muss bewiesen werden, dass Fluss durch den GMK-Stoffwechselweg stattfindet. Daher werden im Folgenden Indizien für einen Fluss aufgeführt.

Die Aktivitäten der transgenen Enzyme wurden in Vorabreiten zu dieser Arbeit gemessen und bestätigt (Maier, 2006; Fahnenstich, 2007). Dadurch, dass die GO Pflanzen erhöhte Level an Glyoxylat und H_2O_2 aufwiesen, wurde bestätigt, dass das erste Enzym des GMK Stoffwechselwegs Glykolat im Chloroplasten metabolisiert. Die additive Verbesserung des GO Phänotypen, der durch die schädigenden Effekte von Glyoxylat und H_2O_2 entsteht, mit Hilfe der Integration von der Malat Synthase und anschließend der Katalase bestätigt die Verstoffwechselung des jeweiligen Substrates, Glyoxylat durch die Malat Synthase und Wasserstoffperoxid durch die Katalase. Diese Metabolite wurden auch in den Vorarbeiten quantifiziert und zeigten die erwartete Erniedrigung (Fahnenstich, 2007). Die GMK 3 Pflanzen zeigten auch in den GC-MS Analysen signifikant erniedrigte Konzentrationen von Glykolat. Unterstützend zeigen die GMK 3 Pflanzen keine Verfärbung und keine Ausbleichung der Blätter unter Hochlichtbedingungen, also photorespiratorischen Bedingungen, im Gegensatz zu den GO und den GO-MS Pflanzen. Dies sind die ersten Indizien dafür, dass der Stoffwechselweg *in planta* funktionell ist.

Wie sich die Stärke des Flusses durch den GMK Stoffwechselweg regelt, ist abhängig von der Oxygenase Aktivität der RubisCO. Dies bestätigte eine Anzucht mit hoch- CO_2 Bedingungen, d.h. nicht- photorespiratorischen Bedingungen, zeigten alle Pflanzen ein normales Wachstum und keine phänotypischen Veränderungen. Darauf bezogen, ist ein starkes Indiz für einen Fluss durch den GMK- Stoffwechselweg die Quantifizierung von Glyzin und Serin als Marker der Photorespiration. Diese beiden Aminosäuren waren in den GMK 3 Pflanzen unter photorespiratorischen Bedingungen erniedrigt.

Eine detaillierte Analyse wäre hier interessant um den Fluss von Glykolat durch den GMK-Stoffwechselweg zu bestätigen. Wildtypische und GMK3 Pflanzen müssten im Vergleich in unterschiedlichen CO_2-Konzentrationen werden und die Intermediate innerhalb verschiedener Zeitpunkte des Chloroplasten verglichen werden. Es sollte dann die Konzentrationen von Glykolat und Glyoxylat, sowie die weiteren Intermediate des Stoffwechselwegs analysiert werden. Hierzu würde sich beispielsweise eine Methode zur Analyse des Metabolitenstatus in den verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle anbieten (Krüger *et al*., 2011).

4.1.1.3 Wachstumsvorteil durch erhöhte Assimilationsrate

Nach unseren Annahmen führt der Verlauf des GMK- Stoffwechselwegs zu einer positiven Energiebilanz für die Pflanze. Es wird im Vergleich zu einem Durchlauf durch den

photorespiratorischen Stoffwechselweg, in dem GMK Weg 1,5 ATP eingespart und ein NADPH/ NADH zusätzlich zur Verfügung stehen (vgl. Maier *et al*., 2012).
Hierdurch könnte Energie im Chloroplasten eingespart werden, da NADPH im Chloroplasten beispielsweise am Photosystem I gebildet wird, oder durch den oxidativen Pentose- Phosphat- Stoffwechselweg (Kruger und van Schaewen, 2003). Für den Fall eines auftretenden Energie- Ungleichgewichts zwischen ATP und NADPH im Chloroplasten könnte überschüssiges NADPH durch das Malat-Ventil in Form von Malat aus dem Chloroplasten transportieren werden um die Energie beispielsweise im Mitochondrium zu verwenden (Scheibe, 1991; Scheibe, 2004). Es scheint jedoch keine Hinweise für Probleme im Redox- Gleichgewicht der GMK 3 Pflanzen zu geben. Es wäre interessant die Größe des Pyridin Nukleotid Pools zu bestimmen, um Hinweise für einen positiven Energie- Status der Pflanzen zu erhalten. Die erhöhte Biomasse der GMK 3 Pflanzen lässt darauf schließen, dass die Pflanzen mehr Blattmaterial aufbauen können, dadurch dass sie einen Energie-Vorteil, bzw. einen Vorteil durch eine gute Kohlenstoff- Verfügbarkeit durch erhöhte Assimilationsraten besitzen.

4.1.2 Verbesserungen des GMK Stoffwechselwegs

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der GMK- Stoffwechselweg optimiert werden, um ihn für Nutzpflanzen anwendbarer zu gestalten. Die aufgezeigten Limitierungen, die durch die Reaktion der GO in Form von H_2O_2 entstehen, sollten verhindert werden. Es sollte ein Enzym identifiziert und verwendet werden, welches Glykolat verstoffwechseln kann. Der enzymatische Abbau von Glykolat ist als essentieller Teil des photorespiratorischen Stoffwechselweges in allen photosynthetischen Organismen vorhanden und verstoffwechselnde Enzyme gehören in diesen Organismen zu zwei phylogenetisch verschiedenen Enzymgruppen. In Cyanobakterien und Algen der Chlorophyta wird Glykolat durch Glykolat Dehydrogenasen (GlcDH) oxidiert (Nelson und Tolbert, 1970; Tolbert, 1974; Eisenhut *et al*., 2006), wohingegen Grünalgen der Charophyta sowie Landpflanzen Glykolat Oxidasen besitzen. Es wurde nach einer GlcDH gesucht, die für eine Verbesserung des GMK Stoffwechselweges passend wäre. Arbeiten basierend auf einer Suche nach einer passenden GlcDH in der Arbeitsgruppe Maurino zeigten, dass eine zuvor postulierte GlcDH aus *A. thaliana* und zwei weitere homologe Gene aus *A. thaliana* nicht die passenden Charakteristika für den GlcDH- Stoffwechselweg aufweisen (Bari *et al*., 2004; Niessen *et al*., 2007; Enquvist, 2010). In Cyanobakterien sind drei Gene für eine GlcDH beschrieben, die einzeln Aktivität zeigen, es ist jedoch nicht geklärt, ob das Enzym ein Heteromer ist (Eisenhut *et al*., 2006 und 2008). Diese Enzyme wurden demnach nicht in Betracht gezogen. Da die Vertreter der GlcDH der Chlorophyta als Enzyme mit einer Untereinheit identifiziert wurden, wurden diese für die Optimierung des GMK- Stoffwechselwegs

gewählt. In dieser Arbeit wurde die *coding sequence* aus *Micromonas sp*. kloniert und mittels *A. tumefaziens* vermittelter Transformation stabil in das Genom von *A. thaliana* Pflanzen integriert (Col-0 und GO-MS Hintergrund). Die Pflanzen, welche das Transgen in der T3 Generation homozygot vorliegen hatten und das Transkript des *GlcDHm* Gens nachweislich exprimierten, zeigten keine Veränderungen zum Wildtyp. Die Linie GlcDHm 2.23 hatten unter Kurztagbedingungen eine Zunahme an Biomasse entwickelt. Nicht aber die drei selektierten Linien der GlcDHm im Hintergrund der MS Überexpression.

Ein Problem in der Interpretation dieser Ergebnisse ist es, dass bisher noch keine Aktivität der GlcDH in Blattextrakten nachgewiesen werden konnte. Versuche zur Aktivitätsbestimmung waren bisher nicht reproduzierbar und heterologe Aufreinigungen um das Enzym näher zu charakterisieren waren erfolglos (Stabel, 2012; Maurino und Kuhn, persönliche Kommunikation). Enzymatische Messungen mit der GlcDH aus *Chlamydomonas* wurden von Tolbert und Kollegen durchgeführt, hier wurden zellfreie Extrakte aus den Algen hergestellt (Nelson und Tolbert, 1970). Es wurde keine oxidase Aktivität detektiert, die GlcDH Aktivität konnte nur mit Hilfe des künstlichen Elektronenakzeptors DCIP durchgeführt werden, da der *in vivo* Akzeptor des Enzyms bis heute unbekannt ist. Der Elektronenakzeptor der GlcDH aus *Micromonas* ist bisher ebenfalls nicht bekannt. Das Enzym besitzt eine FAD Bindedomäne sowie ein 4Fe-4S – Cluster, was Hinweise auf mögliche Elektronenprozesse gibt. Zu den nächsten wichtigen Aufgaben gehört hier, die Aktivität der GlcDH aus *Micromonas* in einem optimierten Mess-System zu analysieren. Weiterhin muss die Lokalisation und die Integrität des Enzyms im Chloroplasten bestätigt werden, beispielsweise mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und einer Anreicherung von Chloroplasten. Anschließend muss ähnlich wie in 4.1.1.2 getestet werden, ob ein Fluss durch den neu generierten Stoffwechselweg stattfindet.

4.1.3 Ausblick und Fazit

Der artifizielle Ansatz zur Erhöhung der Biomasseproduktion durch eine Verstoffwechselung von Glykolat im Chloroplasten in *A. thaliana* war erfolgreich. Die generierten transgenen Pflanzen zeigten eine erhöhte Photosynthese Effizienz in Form von erhöhter Kohlenstoff- Assimilation. Diese Arbeit ist eine Bestätigung dafür (*proof of concept*), dass artifizielle Stoffwechselwege eine Möglichkeit darstellen, um die Biomasse von Pflanzen zu erhöhen, bei denen in der modernen Agrarkultur Wasser, Licht und Nährstoffe vorhanden sind, und hauptsächlich die Kohlenstoff Assimilation limitierend ist. Für die zukünftigen Bedürfnisse der Menschheit ist es wünschenswert, einen erhöhten Ertrag an Nutzpflanzen zu generieren. Dafür können die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse genutzt und weiterentwickelt werden.

Trotz alledem müssen die genauen molekularen Mechanismen des GMK-Stoffwechselwegs weiter aufgedeckt werden. Das Hauptinteresse besteht jedoch darin, mögliche Enzyme zu charakterisieren und deren Anwendbarkeit für einen verbesserten Stoffwechselweg zu überprüfen, wie beispielsweise die GlcDHs aus den Chlorophyta. Es müssen auch alternativen für artifizielle Wege Bedacht werden. In einer großen *in silico* Analyse wurden beispielsweise eine alternative für einen künstlicher Stoffwechselweg beschrieben, der mit Hilfe des Enzyms Phosphoenolpyruvat- Carboxylase Kohlenstoff fixieren könnte und nach den mathematischen Vorhersagen drei- bis viermal schneller als der Calvin- Zyklus arbeiten könnte (Bar– Even *et al*., 2010). Solche alternativen könnten in Zukunft ebenfalls getestet werden, um einen höheren Betrag bei Pflanzen zu erreichen.

4.2 Untersuchungen des Malat Metabolismus in Mitochondrien der C3 Modellpflanzen *A. thaliana*

4.2.1 Der lichtabhängige Kurztagphänotyp

Das NAD-ME liegt in zwei Isoformen im Mitochondrium von C3 Pflanzen vor (Tronconi *et al*., 2008). Das NAD-ME agiert im Citrat- Zyklus in der Respiration von Malat. Untersuchungen an der Modellpflanze *A. thaliana* konnten einen Überblick über das NAD-ME liefern, jedoch keine direkten Aufgaben der Einzelnen Enzyme NAD-ME 1 und NAD-ME 2 festlegen. Der Phänotyp der *knockout* Mutanten von *nad-me 1*, *nad-me 2* und *nad-me 1 * 2* zeigte keine Veränderungen des Pflanzenwachstums, wies die Doppelmutante einen metabolischen Phänotyp auf, der auf eine Rolle in der Stickstoff- und Kohlenstoffverteilung hindeutete (Tronconi *et al*., 2008; Grover *et al*., 1981). *In vitro* Analysen zeigten eindeutig, dass die Enzyme interessanterweise in drei verschiedenen Kombinationen assemblieren können, die alle funktionell sind und zusätzlich unterschiedlichen Regulationen unterworfen sind (Tronconi *et al*., 2010). Die Untersuchungen in dieser Arbeit hatten das Ziel, den Beitrag von NAD-ME 1 und NAD-ME 2 zur Entwicklung und Wachstum der Pflanze genauer zu definieren. Es wurde die Strategie gewählt, den Malat Metabolismus im Mitochondrium beeinträchtigend zu verändern, indem über Kreuzungen der Einzel- und Doppelmutante des *NAD-ME*s in den Hintergrund einer Malat- Dehydrogenase suffizienten Mutante (*mmdh 1*), die Ausprägungen der Genverluste deutlich verstärkt werden. Es wurden die Einzelmutanten, Kombinationen von gemischten Doppelmutanten und die Tripelmutante analysiert. Die etablierten Pflanzenlinien waren alle Homozygot für die jeweiligen Genverluste und zeigten keine Residualtranskripte, waren demnach *knockout* Mutanten.

Unter Langtagbedingungen entwickelten sich alle Pflanzenlinien wie der Wildtyp, vollendeten Ihren Lebenszyklus und bildeten Samen. Demnach schien unter Langtagbedingungen der Verlust der Genfunktionen, auch in den Doppelmutanten und der Tripelmutante keine schweren Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum und die Entwicklung zu haben. Dies könnte durch Kompensationsmechanismen erklärt werden, die vielschichtig sein können und auf die noch eingegangen wird (Sweetlove *et al*., 2010).
Das Wachstum der verschiedenen *knockout* Mutanten zeigte unter Kurztagbedingungen und niedriger Photonenflussdichte in bestimmten Linien einen starken Phänotyp. Die Pflanzen der kombinierten Linien *mmdh 1 * nad-me 1.2*, *mmdh 1 * nad-me 2.3* und *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* waren kleinwüchsig, wiesen sehr früh in der Entwicklung gelbe Blätter auf und stellten das Wachstum nach kurzer Zeit ein. Chlorophyll war in diesen Mutanten erniedrigt und es zeigten sich niedrigere Verhältnisse von F_V/ F_M die auf eine Reduzierung der Photosynthese schließen lassen, da die Intaktheit des Photosystems II eingeschränkt war (Krause *et al*., 1991). Dies blieb in allen anderen Einzelmutanten und Doppelmutanten aus (vgl. 3.3). Dieser Phänotyp war in der Doppelmutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* besonders stark ausgeprägt. Bei einer Belichtung von 130 µE zeigten sich auf Erde im Vergleich zwischen den Linien der ausgeprägteste Phänotyp, da die anderen *mmdh 1* Mehrfachmutanten *mmdh 1 * nad-me 1.2* und die Tripelmutante unter dieser Photonenflussdichte einen abgemilderten Phänotyp im Vergleich zu der Anzucht 65 µE zeigten.
Aus diesem Grund ist der auftretende Phänotyp hier abhängig von der Dauer der Lichtperiode und wird durch eine niedrige Lichtintensität verstärkt.

4.2.2 Was ist die Ursache des lichtabhängigen Phänotyps

Ein solcher lichtperiodenabhängiger, gelblicher, kleinwüchsiger Phänotyp lässt verschiedene Ursachen vermuten. Zuerst könnte eine Verminderung der Chlorophylle, daher der Chlorophyll- Biosynthese vermutet werden. Nicht nur, weil die Pigmentmoleküle das Licht einfangen und so notwendig für die Photosynthese und dadurch auch für das Wachstum der Pflanzen sind (Ludwig *et al*., 2009). Auch weil ungebundenes, freies Chlorophyll und viele Auf- und Abbaustufen phototoxisch sind und Triplettstadien im Licht ausbilden, die wiederum zu hoch reaktiven und zellschädigenden Singulett-Sauerstoffradikalen führen, was eine Gelbfärbung ebenfalls erklären könnte (Tanaka und Tanaka 2007; Ludwig *et al*., 2009). Da die untersuchten Mutanten unter höheren Photonenflussdichten Chlorophyll bilden, fällt ein Defekt in der Chlorophyll- Biosynthese als direkte Ursache für den Phänotyp aus. In Verbindung mit einer Schädigung der Photosynthese-Maschinerie und der gesamten Zelle könnte die Kleinwüchsigkeit und Gelbfärbung der Blätter Ansammlungen von Reaktiven Sauerstoff- Spezies (ROS) und

toxischen Intermediaten zusammenhängen, wie dies bspw. in Mutanten einer Überexpression der Glykolat Oxidase beobachtet wurde (Fahnenstich, 2007). Zu diesem Kontext passend wurde eine und Akkumulation von Dehydroascorbat am Ende des Tages beobachtet, welches wie Glutathion und Ascorbat beteiligt ist in ROS-Entgiftungsmechanismen (Dalton *et al*., 1986; Nunes- Nesi *et al*., 2008).

In einer Veröffentlichung über *knockout* Pflanzen der plastidären ATP/ ADP Transporter wurde ebenfalls über einen kleinwüchsigen, gelben Phänotyp unter Kurztagbedingungen und niedrigem Licht berichtet (Reinhold *et al*., 2007). Diese Pflanzen erzeugten unter Lichteinfluss H_2O_2 und es akkumulierte das phototoxische Protoporphyrin IX, was zu photooxidativen Schädigungen führte. Als Erklärung wurde hier der fehlende ATP- Import in den Chloroplasten während der Nacht diskutiert, somit hatten die Pflanzen nachts ein Energie Problem. Ob dies in den hier beobachteten Phänotypen ebenfalls eine Erklärung sein könnte, wird im Folgenden weiter erörtert und ob mögliche ROS Primäreffekte oder sekundäre Effekte des beobachteten Phänotypen sind, muss genau überprüft werden.

Der beobachtete Phänotyp lässt zumindest eindeutig auf eine Limitierung oder einen Verlust der photosynthetischen Effizienz schließen, da das Wachstum eingeschränkt ist und die Blätter weniger Chlorophyll ausbilden. In allen Mehrfachmutanten wurde während des Tages geringere Konzentrationen von Glycerat festgestellt, was auf einen niedrigeren Photosynthese Effizienz schließen lässt, gekoppelt mit den ermittelten, niedrigeren Chlorophyll a/ b und niedrigen F_V/ F_M Verhältnissen. Die Abundanz von Glycin und Serin als Indikatoren für die Photorespiration, was ebenfalls mit RubisCO Aktivität verknüpft ist, waren ebenfalls erniedrigt. Um Rückschlüsse auf die Bedeutung der Photosynthese an diesem Phänotyp ziehen zu können, wurde eine Zuckerfütterung durchgeführt. Da mit Hilfe von C14- markierter Saccharose gezeigt werden konnte, dass *A. thaliana* auch im adulten Stadium in der Lage ist, exogene Saccharose durch die Wurzel aufzunehmen und in der Pflanze zu verteilen (Furuichi *et al*. 2001), soll dies eine Methode sein, einen Phänotyp mit limitierter Photosynthese zu retten. Die Saccharose kann über die Glycolyse in Pyruvat umgewandelt werden und den Citrat- Zyklus speisen, so dass die Photosynthese an Bedeutung für die Energieversorgung verliert. Nachdem alle T-DNA Insertionsmutanten auf ½ MS- Agarplatten ohne Zucker gekeimt waren, erreichten alle Pflanzen das autotrophe Stadium, aber bereits hier stellten einige Pflanzen das Wachstum wieder ein. Generell sind junge Blätter in ihrer Ernährungsweise zunächst noch heterotroph und importieren Saccharose (Shao *et al*. 2004). Erst nach Durchleben einer sehr komplexen Phase, die als „*sink-to-source*"-Transition bezeichnet wird, beginnen diese Blätter mit der autotrophen Versorgung über Photosynthese (Turgeon 1989). Es scheint so, als ob die meisten Pflanzen der Linie *mmdh 1 * nad-me 2.3* und einige der Mutanten *mmdh 1 * nad-me 1.2* und der Tripelmutante beim Übergang dieser Stadien bereits großen Energie- Limitierungen

unterliegen (auf Erde aber auch auf 1/ 2 MS – Agarplatten). Wenige hingegen schafften es, ihre Probleme zu kompensieren und wuchsen, meist langsam, weiter. Dies schien einem Fitnessfaktor zu unterliegen, und könnte mit Anpassungsmechanismen an niedriges Licht „ *low light acclimation*“ zusammenhängen (Bailey *et al*., 2001). Der Mechanismus muss noch geklärt werden.

Mit einer Zufütterung von Sachharose, produzierten die Pflanzen mehr Biomasse, dies war durch eine höhere Anzahl und Entwicklung von größeren Blättern sichtbar. Das Wachstum war jedoch sehr langsam und die gelbe Farbe in den Blättern blieb abgeschwächt erhalten (vgl. Abb. 41). So konnte eine Zufütterung mit Saccharose den Phänotyp teilweise kompensieren. Dies verstärkt die Abhängigkeit des Phänotypen von der Photosynthese Leistung. Wie bereits erwähnt konnte der kleinwüchsige, gelbe Phänotyp unter langen Belichtungsperioden (16 h Licht/ 8 h Dunkel) kompensiert werden. Da unter wildtypischen Bedingungen in einer langen Lichtperiode mehr Photosynthese stattfindet, demnach mehr Kohlenstoffassimilierung (wenn keine anderen Faktor limitierend sind) und auch mehr Energiegewinn in Form von Reduktionsäquivalenten, was hier durch die Zuckerfütterung imitiert wird, wird im Folgenden eine Erklärung der Ursachen des beobachteten Phänotyps auf Probleme mit dem Kohlenstoff- oder -Energiehaushalt zurückgeführt. Diese Annahme wird durch folgende Beobachtungen bekräftigt: In publizierten Arbeiten wurden weitere Mutanten in andern Citrat- Zyklus Enzymen untersucht. In der Arbeit von Imsande *et al*. (2001) wurden spontane Null-Mutationen der *mMDH 1* in der Sojabohne (*G. max*) beschrieben. Hier war ausschließlich die mMDH 2 Isoform aktiv und es wurde ein gelblicher Blattphänotyp beobachtet. Der Mechanismus ist noch nicht geklärt. Mit der Expression eines Antisense- Fragments der *mMDH* wurde in Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum*) das mMDH Protein in Mitochondrien in seiner Abundanz erniedrigt (Nunes-Nesi *et al*., 2005). Die gesamte zelluläre MDH Abundanz lag bei ca. 60%, was einen positiven Effekt auf die photosynthetische Aktivität, die CO_2 Assimilationsrate und das Gesamttrockengewicht. Unter Kurztagbedingungen waren die Pflanzen klein und es wurde vermutet, dass dies den Effekt einer gestörten Photosynthese- Leistung darstellt (Nunes-Nesi *et al*., 2005; 2008). Zusätzlich wurde in diesen Pflanzen eine erniedrigte respiratorische Rate festgestellt (van der Merwe *et al.*, 2009). Dies unterstützt die Annahme, dass der Phänotyp aus erniedrigter Photosynthese- Rate resultiert. Diese Beobachtungen betrafen alle die MDH 1. Die *mmdh 1* Einzelmutanten zeigten in *A. thaliana* jedoch nicht diesen Phänotypen. Die mMDH-Doppelmutante hingegen war in *A. thaliana* ebenfalls kleinwüchsigen (Tomaz *et al*., 2010). Dies wurde unter Kurztag- und Langtagbedingungen beobachtet, die Färbung der Blätter war nicht verändert. Hier wurde eine Erhöhung der Respiration im Rahmen von höherer CO_2 Ausstoß bei Belichtung gemessen und daraus resultierende Erniedrigung der Kohlenstoff- Assimilation ermittelt.

Diese Überlegungen unterstützen, dass die mitochondriale Respiration und die Photosynthese eng miteinander verbunden sind und mehr sogar erforderlich für die Instandhaltung der Photosynthese, besonders bei hohen Photosyntheseraten (Nunes-Nesi *et al*., 2011; Padmasree *et al*., 2002).

In den hier generierten Pflanzen müssen als nächstes Respirationsparameter wie der Respiratorische Quotient (RQ) bestimmt werden, der aussagen darüber gibt, welche Energiequelle in der Pflanze respiriert wird und die Malat- abhängige Respiration von isolierten Mitochdondrien sollte bestimmt werden, um einen Eindruck über die Fähigkeiten der jeweiligen Mitochondrien zur Respiration von Malat zu erhalten. Der beobachtete Phänotyp könnte demnach seine Ursache in einer veränderten Respiration haben, die in Limitierungen der Photosyntheserate resultiert.

4.2.3 Veränderungen des Malat- Metabolismus der Mutanten

Der Genverlust von *mMDH 1* und *NAD-ME* im Mitochondrium ist direkt verbunden mit einer Veränderung des Malat Stoffwechsels im Citrat- Zyklus. Unter Kurztagbedingungen und niedrig Licht ist Malat in diesen Mutanten am Ende des Tages überall erniedrigt, nur in den Mutanten *nad-me 2.3* und *mmdh 1 * nad-me 2.3* höher konzentriert als der Wildtyp. Allgemein ist der Fluss durch den Citrat- Zyklus am Tage mit wenigen Ausnahmen niedriger als im Wildtyp. Am Ende der Nacht ist Malat, Citrat und Succinat in allen Mehrfachmutanten niedriger konzentriert. Der Citrat- Zyklus ist demnach in den Mutanten gestört oder heruntergefahren. Als nächstes soll der Fluss durch den Citrat- Zyklus mit radioaktiv markierten Intermediaten, vor allem mit Malat, in den verschiedenen Mutanten bestimmt werden.

Die Pflanzen haben unter Langtagbedingungen wie beschrieben, keine Veränderungen in den Blättern und der Biomasseproduktion. Dies lässt auf zahlreiche Kompensationsmechanismen schließen. Einerseits können in den Einzelmutanten die jeweils andere Isoform im Mitochondrium die ausgefallene Metabolisierung von Malat zumindest teilweise übernehmen, wie auch das andere Enzym, entweder MDH oder NAD-ME, wie es die Arbeiten von Tronconi *et al*. (2008) und Tomaz *et al*. (2010) zeigten. Beispielsweise wurde eine starke Induktion der MDH Aktivität im Gesamtblattextrakt der *nad-me* Doppelmutante beobachtet. Hier müssen ebenfalls Daten erhoben werden, die auch die MDH- Aktivität im Blatt quantifizieren. Des Weiteren können Auslagerungen der Malat Metabolisierung in andere Kompartimente, höchstwahrscheinlich ins Cytosol stattfinden. Im Cytosol können Malat und Oxalacetat zu PEP und Pyruvat umgewandelt werden. Hier sind drei Isoformen des cytosolischen NADP-ME vorhanden sowie die cytosolische PEP Carboxylase (Chollet *et al*., 2003; Maier *et al*., 2011). Transporter der mitochondrialen Carrier Familie sorgen für einen Austransport aus dem Mitochondrium,

außerdem kann Malat aus der Vakuole bereitgestellt werden (s. 1.1.6; Emmerlich *et al*., 2003).

Um dies im Detail zu klären, ist es von großer Wichtigkeit als nächstes Enzymaktivitätsmessungen der MDH im gesamten Blatt, im Mitochondrium und NAD-ME Aktivitäten im Mitochondrium und NADP-ME Aktivitäten im gesamten Blatt unter Kurztag und Langtagbedingungen zu ermitteln. Die Aktivitäten im Tages- und Nachtverlauf sind in diesem Zusammenhang ebenfalls von großem Interesse. Einerseits ist gezeigt worden, dass die mMDH tagsüber durch licht induziert wird (Price *et al*., 2004) und NAD-ME während der Nacht wichtiger ist (Tronconi *et al*., 2008). Andererseits wurde eine höhere NADP-ME Aktivität während der Nacht in der *nad-me* Doppelmutante beobachtet (Tronconi *et al*., 2008). Quantitative RT-PCR ist ebenfalls ein Versuch der in diesem Kontext Aufschluss geben würde, ob der Verlust bestimmter Gene, die Transkription Anderer hochreguliert und so zu Kompensationsmechanismen führt.

Der Malat Metabolismus in der Pflanzenzelle hat zahlreiche bedeutende Aufgaben. Aufgaben die hier von Interesse erscheinen sind die Speicherung von Kohlenstoffen in Form der C4- Säure in der Vakuole, außerdem in der Verteilung von Redoxsubstraten und die Bereitstellung und Umwandlung von Substraten für die Respiration im Dunkeln aus angelegten Pools (in Form von Pyruvat, Malat und Fumarat). In diesem Hintergrund kann eine Störung der Respiration von Malat weitreichende Folgen auf den gesamten Metabolismus haben.

In den Mutanten mit Phänotypausprägung wurden in zahlreichen Aminosäuren und transienten Zuckern, wie aber auch in Citrat- Zyklus Intermediaten niedrigere Konzentrationen festgestellt. Dies lässt generell eine schlechtere oder zumindest veränderte Kohlenstoff Versorgung in den Pflanzen schließen. Daher muss eine verminderte Kohlenstoff- Versorgung in Betracht gezogen werden.

4.2.4 Mögliche *carbon starvation* in den kombinierten Mehrfachmutanten

In einer langen Nacht sind die Kohlenstoff/ Energiespeicher die am Tag aufgebaut wurden für die Pflanze zur Versorgung über die Glycolyse und oder Respiration entscheidend. Das wichtigste Kohlenhydrat mit zentraler Rolle im pflanzlichen Metabolismus und zur Energiegewinnung ist in diesem Zusammenhang die Stärke (Zeeman *et al*. 2007). Es wurde gezeigt, dass nach circa acht Stunden die Stärke bis auf einen Restgehalt von 5-10% weitestgehend aufgebraucht wird (Gibon *et al*. 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass neben den transienten Pools von Zuckern und Stärke die C4 Säuren Malat und Fumarat bedeutende Kohlenstoffspeicher für eine Energiegewinnung in der Nacht sind (Fahnenstich *et al*., 2007; Zell *et al*., 2010).

Anhand von Beobachtungen in dieser Arbeit und durch übereinstimmende Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Maurino (Zell *et al*., 2010), bleibt eine weitere Hypothese für den beobachteten Phänotyp der Mehrfachmutanten zu erörtern. Der beobachtete, Kurztag- und lichtabhängige Phänotyp könnte durch einen Mangel an Kohlenstoffgerüsten hervorgerufen werden (*carbon starvation*). Da der in den Mehrfachmutanten beobachtete Phänotyp stark an den beschriebenen Phänotyp von NADP-ME aus *Z. mays* erinnert, lokalisiert in den Chloroplasten von *A*. *thaliana* (Maurino *et al*., 1996; Fahnenstich *et al*., 2007). Die Pflanzen zeigten ebenfalls gelbe Blätter, erniedrigte photosynthetische Effizienz und wenig Biomasseproduktion unter Kurztagbedingungen mit wenig Licht. Hier waren durch die Aktivität des NADP-ME die Level von Malat und Fumarat erniedrigt und es wurde nach einer langen Nacht eine *carbon starvation* festgestellt.

Die enzymatisch ermittelten Zucker Konzentrationen zeigten in allen Mehrfachmutanten signifikante Erniedrigungen in den Konzentrationen am Ende der Nacht, in dem Falle von *mmdh 1 * nad-me 2.3* war die Tendenz eher in den GC-MS Daten ersichtlich. Dies könnten Hinweise auf eine Kohlenstoff Mangel während der langen Nachtperiode darstellen. Die Konzentrationen von Malat und Fumarat waren in der stärksten Mutante *mmdh 1 * nad-me 2.3* am Ende der Nacht erniedrigt im Vergleich zum Wildtyp. In den beiden Mutanten *mmdh 1 * nad-me 1.2* und *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* war Malat erniedrigt und Fumarat tendenziell erhöht. Einen Hinweis über den Stärkeabbau in den Mutanten könnte über den Gehalt an Maltose ersichtlich werden. Am Ende der Nacht ist der Gehalt an Maltose in allen Doppel- und Tripelmutanten niedriger als im Wildtyp, in den Einzelmutanten ist die Konzentration am Ende der Nacht nicht verändert. Maltose ist ein Abbauprodukt von transitorischer Stärke (Lu *et al*., 2005). Dies könnte bedeuten, dass alle Stärke, wenn Sie denn gespeichert wird, komplett abgebaut wird während der Nacht.

Ein Kohlenstoff Mangel könnte in den generierten Pflanzen problematische Veränderungen führen. Wenn unter niedrigen Photonenflussdichten weniger Energie produziert wird durch niedrigere Photosynthese Raten, hat die Pflanze nachts weniger Reserven aus denen sie schöpfen kann. Wenn weniger Pyruvat oder Malat Einspeisungen in den Citrat- Zyklus stattfinden, und der Zyklus nicht ausreichend aufgefüllt wird, wird resultierend weniger ATP an durch oxidative Phosphorylierung hergestellt und es gibt allgemein weniger Kohlenstoffgerüste als Vorläufer für alle wichtigen ablaufenden Stoffwechselwege. Dies resultiert in weniger Wachstum.

Wenn nicht genügend Kohlenstoffgerüste zur Verfügung stehen, könnten die Chloroplasten zunehmend der Photoinhibition unterliegen. Abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze, akkumulieren Reduktionsäquivalente im Chloroplasten Stroma, da sie durch die photochemischen Reaktionen gebildet werden. Diese Verursachen eine Überreduktion der photosynthetischen Elektronen Kette und die resultierende Bildung von Reaktiven

Sauerstoff Spezies führen zu Photoinhibition. Unter anderen Prozessen ist das Malat Ventil unterstützend für die ATP/ ADP, NAD(P)H/ NAD(P) und den zellulären pH Homöostase in der Pflanzenzelle, das ist unabdingbar für die geregelten Ablauf aller Funktionen in der Zelle (Dutilleul *et al*., 2003). Das Malat Ventil exportiert einen Überschuss an Reduktionsäquivalenten aus dem Chloroplasten und hält so die ATP Produktion aufrecht, da es so die Balance zwischen ATP/ NADPH aufrechterhält (Backhausen *et al*., 1998; Scheibe, 2004; Scheibe *et al*., 2005). Diese in Form von Malat ausgeleiteten Reduktionsäquivalente können neben anderen Möglichkeiten auch im Mitochondrium weiterverwertet werden (Noctor *et al*., 2007), das wiederrum kann Photoinhibition verhindern und einen Ablauf der Photosynthese gewährleisten. Da möglicherweise das Malat- Ventil in den untersuchten Pflanzen auf Grund der fehlenden Kohlenstoffgerüste nicht komplett funktionstüchtig ist, könnte dies ein Grund für den beobachteten Phänotyp sein.

Ein weiterer Hinweis auf eine *carbon starvation* in den T-DNA Mehrfachmutanten mit dem ausgeprägten Phänotyp könnten Hinweise auf Seneszenz sein. Der Mangel an Kohlenstoffgerüsten leitet Seneszenz ein (Hensel *et al*. 1993; Quirino *et al*. 2000; Fujiki *et al*. 2001; Lam *et al*. 2001). Hinweise auf Seneszenz liefern die gelbe Blattfarbe der Mutanten aber auch die Gehalte an seneszenz-assoziierten Aminosäuren (Diaz *et al*. 2005; Zell *et al*., 2010). In allen Mutanten wurde am Ende der Nacht Akkumulationen von Isoleucin im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Die *mmdh 1 * nad-me 2.3* Mutante akkumulierte außerdem Valin und Tyrosin am Ende der Nacht in besonders hohen Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnten Hinweise auf ein Einsetzen der Seneszenz sein. Falls diese Pflanzenlinie bereits der Seneszenz unterworfen ist, könnte dies auch eine Erklärung für einen veränderten Stoffwechsel im Vergleich zu den anderen gemischten Doppelmutanten und der Tripelmutante sein. Ausgehend von einem einsetzen der Seneszenz könnte eine Chlorose der Grund für die bleichen Blätter sein (Hanaoka *et al*., 2002).

4.2.5 Definierte Rollen des NAD-ME

Ein Phänotyp wurde in diesem Ansatz unter den Bedingungen sichtbar, da zwei Isoformen, eine der mMDH und eine des NAD-MEs ausgeschaltet waren. Erst unter diesen Umständen wurde ein Effekt der Genverluste deutlich sichtbar, während die Einzelmutanten keine phänotypischen Effekte zeigten. Dies bestätigt, dass das NAD-ME allgemein *in planta* notwendig ist für eine Unterstützung der Malat Verarbeitung der MDH 1, und auch wichtig ist für eine Übernahme der Verarbeitung bei einem Verlust von *MDH 1*, da die mMDH 2 diese Aufgaben augenscheinlich nicht alleine bewältigen kann. Da diese Beobachtungen nur in einer langen Nacht mit niedriger Belichtung am Tage stattfanden, ist es weiter von

Interesse, die Rolle von NAD-ME nachts zu untersuchen, da es dort mehr Bedeutung haben könnte als die MDH.

Der Genverlust von *NAD-ME 1* und *NAD-ME 2* zeigte in Einzelmutanten und der Doppelmutante keinen optischen Phänotyp (Tronconi *et al*., 2008). Es wurden Veränderungen von Metaboliten des Primärmetabolismus beobachtet. In kombinierten Kreuzungen dieser Gene im *mmdh 1 knockout* Hintergrund wurde unter Kurztagbedingungen ein Phänotyp sichtbar. Dieser Phänotyp war nicht gleichstark ausgeprägt zwischen *mmdh 1 * nad-me 1.2* und *mmdh 1 * nad-me 2.3* und nicht additiv in der Tripelmutante *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3*. Dies ist der wichtigste Hinweis darauf, dass die Genprodukte von *NAD-ME 1 und NAD-ME 2* unterschiedliche Aufgaben *in planta* besitzen. Dies bestätigt die *in vitro* Arbeiten und Beobachtungen von Tronconi *et al*. (2008 und 2010) und Kollegen, die gezeigt haben, dass die Enzyme auch als Homomere aktiv sind und in einzelnen Geweben als Homomer alleine fungieren. Die hier erhobenen Daten, wie bspw. die Beobachtung, dass die Tripelmutante und die Mutante *mmdh 1 * nad-me 1.2* eine ähnlichere Antwort auf die jeweils vorliegenden Genverlust auf metabolischer Ebene und phänotypischer Ebene zeigen, lässt den Schluss zu, dass bei einem Verlust des *NAD-ME 1* andere oder mehr Kompensationsmechanismen hervorgerufen werden als bei einem Ausfall von *NAD-ME 2.* Der kombinierte Genverlust von *NAD-ME 2* und *MDH 1* scheint schwerwiegender zu sein, da die Pflanzen vermutlich in eine verfrühte Seneszenz eingehen. In diesen Pflanzen ist das *NAD-ME 1* Genprodukt vorhanden, was diese Hypothese unterstützt.

Dies könnte weiterführend bedeuten, dass das *NAD-ME 1* in aktiver Form ein Signal gibt, dass sich auf die Expression der anderen Malat respirierenden Enzyme im Cytosol oder Chloroplasten auswirkt. Wenn dann die Verarbeitung von Malat im Mitochondrium zusätzlich durch den Verlust der *MDH 1* stark verändert oder beeinträchtigt ist und das *NAD-ME 1* außerdem kein Signal sendet, könnten daraufhin Kompensationsmechanismen entwickelt werden. Diese Hypothese benötigt zahlreicher weiterer Überprüfungen. Außerdem müsste ein Retrogrades Signal vom Mitochondrium zum Nucleus identifiziert werden oder es müsste sich ein Signal auf die Aktivität der anderen Enzyme z.B. im Cytosol auswirken. Es gibt Redox Signale die als mögliche retrograde Signale zwischen Mitochondrium und Nucleus diskutiert werden (Rhoads und Subbaiah, 2007), Auswirkungen auf die Aktivitäten von Enzymen könnte auch einer Redox- Regulation unterliegen.

Um die Hypothese zu testen, wären zuerst die bereits angesprochenen Transkript-Quantifizierungen in den unterschiedlichen Mutanten zu unterschiedlichen Tages- und Nacht- Zeitpunkten nötig, sowie Aktivitätsmessungen der NADP-MEs und der MDHs. Weiterhin wäre es auch denkbar, eine Analyse von möglichen Transkriptionsfaktoren

durchzuführen. Es sind Transkriptregulationen des NAD- Malat Enzyms in C4 Pflanzen bekannt, so dass es mögliche Ansatzpunkte gäbe (Brown *et al*., 2011).

4.2.6 Fazit

Die Generierung von mit den multiplen Mutanten des Malat Metabolismus haben im Vergleich zu den Einfachmutanten und dem Wildtyp generell große Veränderungen in Entwicklung und Wachstum der Pflanzen hervorgerufen. Im Falle der Einzelmutationen gibt es genügend Kapazitäten für die Pflanze den Malat Stoffwechselweg auszulagern oder umzulagern, bzw. andere Malat respirierende Isoformen im Mitochondrium können die Säure weiter verstoffwechseln. Unter Kurztagbedingungen und niedriger Belichtung Im Falle der Multiplen Mutanten treten weitaus größere Veränderungen im Citrat- Zyklus und allgemein im Metabolismus auf, was als *carbon starvation* interpretiert werden könnte. Dies wirkt sich auf die Photosynthese Leistung, möglicherweise den Energiestatus und resultierend auf das Wachstum der Pflanzen aus, die ein Wachstums Defizit zeigen. Die Arbeit hat bestätigt, dass der Citrat- Zyklus verschiedene Möglichkeiten zu Kompensationsmechanismen besitzt. Weiterhin hat diese Arbeit bestätigt, dass Malat ein wichtiger Kohlenstoffspeicher für eine Versorgung von *A. thaliana* während der Nacht ist (Fahnenstich *et al*., 2007; Zell *et al*., 2010).

Auffällig ist hier, dass die Doppelmutanten und die Tripelmutante keinen additiven Effekt zeigen, sondern unterschiedliche metabolische Antworten auf die unterschiedlichen Kombinationen von Genverlusten zeigen und möglicherweise schon verfrühter Seneszenz unterliegen. Demnach wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die homologen Protein NAD-ME 1 und NAD-ME 2 in der Pflanze unterschiedliche Rollen ausführen. Diese Aufgaben könnten sich möglicherweise auf eine regulatorische Rolle beziehen, die die Aktivität anderer Enzyme und damit den Fluss von Kohlenstoff durch den Citrat- Zyklus reguliert.

Hier muss noch detailliert weitergearbeitet werden, um diese genau zu entschlüsseln. Dies birgt im Hintergrund einer Manipulation der C4 Photosynthese wichtige Informationen, die geklärt werden müssen, um die Rekrutierung des NAD-MEs in die C4 Photosynthese zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Es ist von globalem Interesse die Erträge von Nutzpflanzen zu erhöhen. Um dies zu gewährleisten, gibt es aktuell verschiedene Forschungsansätze. Zum einen werden evolutive Anpassungen wie die C4 Photosynthese, welche die photosynthetische Effizienz von Pflanzen erhöht, genauer untersucht. Zum anderen werden biotechnologische Ansätze von artifiziellen Stoffwechselwegen zur Verbesserung der Erträge angewandt und erprobt.

Diesbezüglich wurde in der vorliegenden Dissertation ein artifizieller Stoffwechselweg in *A. thaliana* untersucht. Dieser hatte zum Ziel, mehr Biomasseproduktion hervorzurufen indem Glykolat im Chloroplasten verstoffwechselt werden sollte. Mit Hilfe der Umsetzung von Glykolat sollte der energieaufwendige, photorespiratorische Stoffwechselweg reduziert werden. In Vorarbeiten wurden transgene GMK- Pflanzen etabliert, die mit Hilfe von Transitpeptiden, vorgeschaltet vor dem jeweiligen Transgen, die Glykolat Oxidase, die Malat Synthase und die Katalase im Chloroplasten exprimierten. Die GMK- Pflanzen wurden in dieser Arbeit analysiert und es zeigte sich, dass der biotechnologische Ansatz erfolgreich war. Die analysierten Pflanzen bildeten größere Blattrosetten aus, hatten eine erhöhte CO_2 Assimilation und eine damit einhergehende, erhöhte Biomasseproduktion im Vergleich zum Wildtyp. Weiterhin wurden Hinweise aufgezeigt, die auf einen erniedrigten Fluss durch den photorespiratorischen Stoffwechselweg und eine chloroplastidäre Metabolisierung des Glykolats hindeuteten. Die Kapazitäten des Primärmetabolismus waren meist auf wildtypischem Niveau, es zeigte sich jedoch eine Erhöhung der Aminosäuren welche aus PEP und Pyruvat gebildet wurden. Des Weiteren wurden morphologische Veränderungen an den Blättern der Pflanzen untersucht, deren Ursprung noch genauer untersucht werden muss.

Parallel dazu wurde eine Möglichkeit untersucht, den GMK- Stoffwechselweg zu optimieren. In diesem Ansatz wurde eine Glykolat Dehydrogenase aus der Grünalge *Micromonas sp*. kloniert und stabil mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation in wildtypische Pflanzen und Malat Synthase überexprimierende *A. thaliana* Pflanzen eingebracht. Die Pflanzen in denen das Transgen homozygot vorlag wurden selektiert, die Transkription des Transgens wurde bestätigt und die T3- Pflanzen phänotypisiert. Die mGlcDH und mGlcDH-MS Pflanzen zeigten keine Verbesserungen im Aufbau von Biomasse, allerdings wurde die Aktivität der mGlcDH noch nicht bestätigt. In diesem Zusammenhang muss weiter untersucht werden, ob das relativ große Enzym aus *Micromonas sp*. eine korrekte Faltung im Chloroplasten von *A. thaliana* eingeht. Auf biochemischer Ebene muss der benötigte *in vivo* Elektronenakzeptor für die Umsetzung des Substrats identifiziert werden, damit die mGlcDH Aktivität geprüft werden kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten definierte, physiologische Rollen und Regulationen des NAD-ME 1 und NAD-ME 2 im Mitochondrium von *A. thaliana* aufgedeckt und untersucht werden. Das NAD- Malat Enzym war im Rahmen dieser Arbeit von Interesse, da es neben seinen *housekeeping* Funktionen in C3 Pflanzen im Verlauf der Evolution mehrmals unabhängig in die C4 Photosynthese rekrutiert wurde. Vor dem Hintergrund einer biotechnologischen Verbesserung von Nutzpflanzen durch die Integration von C4 Eigenschaften ist es daher notwendig die *housekeeping* Rolle des NAD-ME und die Regulationen der Enzymaktivität in den C3 Pflanzen besser zu verstehen. Bisherige Forschung zeigte, dass die NAD-ME 1 und NAD-ME 2 *in vitro* unterschiedlichen Regulationen und unterschiedlichen kinetischen Charakteristiken unterliegen. Um dies *in planta* zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *knockout* Mutanten des mitochondrialen Malat Metabolismus generiert und analysiert. Die Einzelmutanten von *NAD-ME*, *nad-me 1.2* und *NAD-ME 2*, *nad-me 2.2* und *nad-me 2.3* sowie die Einzelmutante des *mMDH 1*, *mmdh 1* wurden in verschiedenen Kombinationen gekreuzt, um den mitochondrialen Malat Metabolismus zu beeinträchtigen. Die daraus resultierenden Doppelmutanten *mmdh 1 * nad-me 1.2, mmdh 1 * nad-me 2.3*, die bereits etablierte Doppelmutante *nad-me 1.2 * 2.3* und die generierte Tripelmutante wurden dann phänotypisiert. Die kombinierten Mutanten *mmdh 1 * nad-me 1.2*, *mmdh 1 **nad-me 2.3 und die Tripelmutante *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* zeigten einen lichtabhängigen Phänotyp unter Kurztagbedingungen und niedriger Belichtungsstärke. Diese Pflanzen waren kleiner, mit gelblichen Blättern, niedrigeren Chlorophyll Konzentrationen und zeigten erniedrigte F_V/F_M Verhältnisse im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmutanten. Ein erstes metabolisches Profil zeigte in diesen kombinierten Mehrfachmutanten Veränderungen der Aminosäuren, Citrat- Zyklus Intermediaten und Zuckern. Diese metabolischen und phänotypischen Veränderungen deuteten auf einen Mangel an Kohlenstoff, resultierend aus dem veränderten Malat Metabolismus hin. Dies könnte auch zu einer verfrühten Seneszenz führen, speziell in der *mmdh 1 * nad-me 2.3* Mutante.

Des Weiteren zeigten die Antworten auf die Genverluste in den verschiedenen *knockout* Linien metabolische Unterschiede und keine additiven Effekte in der Tripelmutante. Dies ließ vermuten, dass die beiden Enzyme NAD-ME 1 und NAD-ME 2 spezifische Rollen in der Pflanze, besonders in einer langen Nacht einnehmen. Diese könnten spezifische, regulatorische Aufgaben sein, die die Aktivitäten anderer Enzyme und damit den Fluss von Kohlenstoff im Mitochondrium regulieren.

6. Appendix

6.1 Genkarten

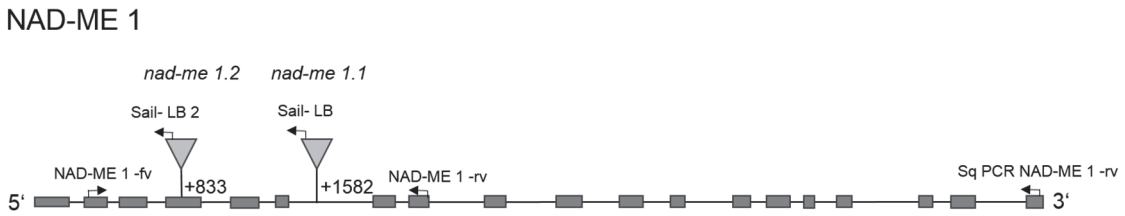

Abbildung 46 a: Übersicht über die Genstruktur von *NAD-ME 1* (At2g13560) und die Positionen der T-DNA Insertionen. Der auf Chromosom 2 liegende NAD-ME Lokus weist eine Größe von 5014 Basenpaaren (bp) auf, bestehend aus 19 Exons. Die cDNA Sequenz beträgt 1872 bp. Die T-DNA Insertionen der *nad-me 1.1*, bzw. der *nad-me 1.2* Linie finden sich in Intron 6 und Exon 4.

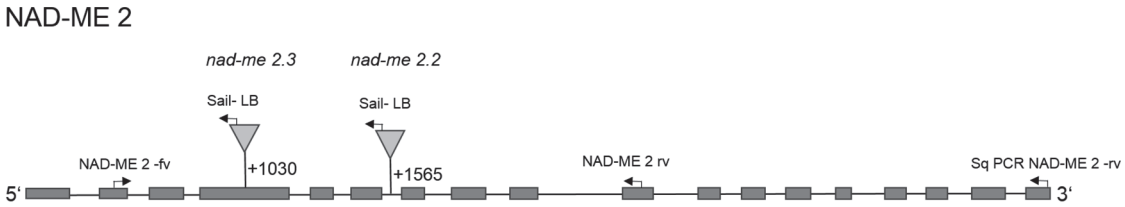

Abbildung 46 b: Übersicht über die Genstruktur von *NAD-ME 2* (At4g00570) und die Positionen der T-DNA Insertionen. Der auf Chromosom 4 liegende NAD-ME Lokus weist eine Größe von 3660 bp auf, bestehend aus 18 Exons. Die cDNA besteht aus 1824 bp. Die T-DNA Insertionen der *nad-me 2.2*, bzw. der *nad-me 2.3* Linie finden sich in Intron 6 und Exon 4.

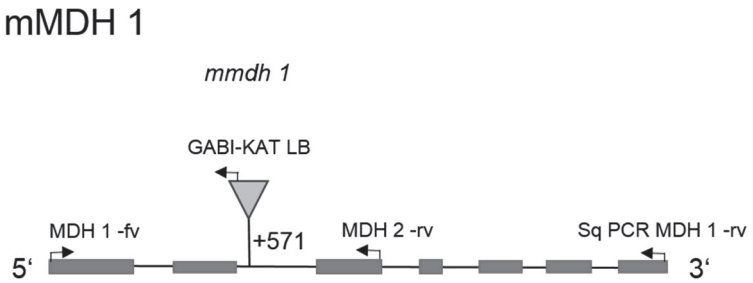

Abbildung 46 c: Übersicht über die Genstruktur von mMDH 1 (At1g53240) und die Positionen der T-DNA Insertion. Der auf Chromosom 1 liegende MDH Lokus weist eine Größe von 1837 bp auf, bestehend aus 7 Exons. Die cDNA besteht aus 1026 bp. Die T-DNA Insertion der *mmdh 1* Linie findet sich in Intron 2.

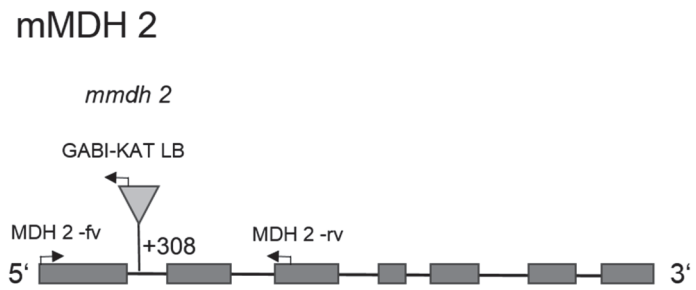

Abbildung 46 d: Übersicht über die Genstruktur von mMDH 2 (At3g15020) und die Positionen der T-DNA Insertion. Der auf Chromosom 3 liegende MDH Lokus weist eine Größe von 1802 bp auf, bestehend aus 7 Exons. Die cDNA besteht aus 1026 bp. Die T-DNA Insertion der *mmdh 2* Linie findet sich in Intron 1.

6.2 T-DNA Insertionslinien und generierte Kreuzungen

Tabelle 15: Aufzählung der isolierten Einzelmutanten und der durch genomisches Kreuzen erzeugten Doppel- und Tripelmutanten aus T-DNA Insertionslinien. Aufgelistet sind die Namen der Insertionsmutanten, sowie der betroffene Genlokus.

	Name der Insertionsmutante	Betroffener Genlokus
Einzelmutante	*nad-me 1.1*	At2g13560
	nad-me 1.2	At2g13560
	nad-me 2.2	At4g00570
	nad-me 2.3	At4g00570
	mmdh 1	At1g53240
	mmdh 2	At3g15020
Doppelmutante	*nad-me 1.2 * 2.3*	s.o.
	*mmdh 1 * nad-me 1.2*	s.o.
	*mmdh 1 * nad-me 2.3*	s.o.
	*mmdh 1 * mmdh 2*	s.o.
Tripelmutante	*mmdh 1* nad-me 1.2 * 2.3*	s.o.

6.3 Genotypisierung der Tripelmutante *mmdh 1 * nad-me 1.2 * nad-me 2.3*

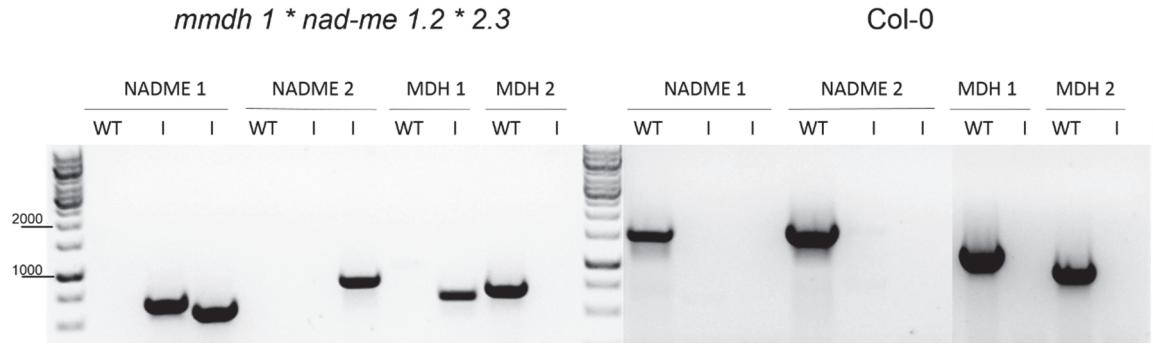

Abbildung 47: Beispielhafte Agarosegelelektrophorese der PCR Amplifikationen zur Genotypisierung der Tripelmutante *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3*. Gezeigt sind die Amplifikate für das Wildtyp Allel (WT) sowie das Amplifikat mit T-DNA Insertionen (I), von *NAD-ME 1*, *NAD-ME 2*, *mMDH 1* und *mMDH 2*. Die Tripelmutante ist für alle drei T-DNA Insertionen homozygot. Rechts ist die Wildtyp Kontrolle dargestellt.

6.4 Adulte Pflanzen aus Langtaganzucht

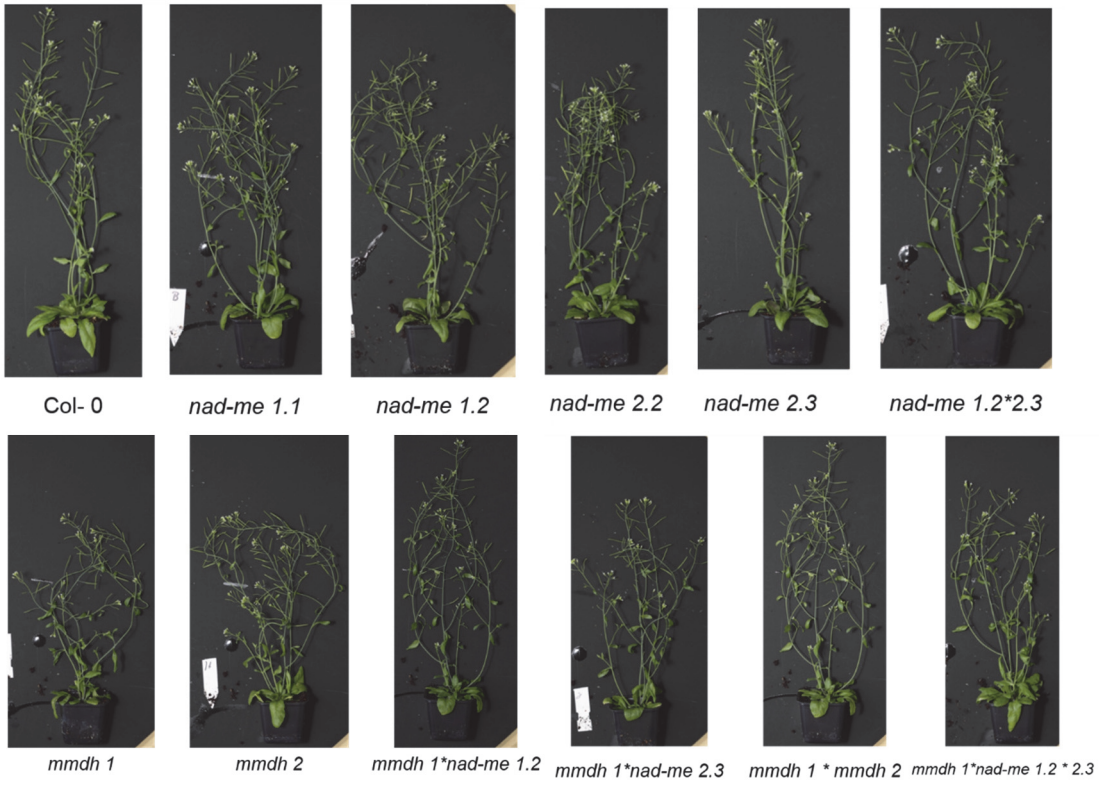

Abbildung 48: Photographische Dokumentation adulter T-DNA Insertionslinien und Col-0 im Vergleich. Die Pflanzen wurden unter 130 µE Belichtung unter Langtagbedingungen angewachsen.

6.5 Vergleich von *mmdh 1 * nad-me 2.2* und *mmdh 1 * nad-me 2.3*

Abbildung 49: Vergleich von Col-0 und den unabhängigen T-DNA Insertionslinien *mmdh 1 * nad-me 2.3* und *mmdh 1 * nad-me 2.2* unter Kurztaganzucht mit 65 µE Belichtung nach drei Wochen Wachstum.

6.6 GC-MS Analyse der T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp

Tabelle 16:GC-MS Analyse der T-DNA Insertionslinien und Col.0 im Vergleich. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n= 3 am Ende des Tages und Ende der Nacht aus einer Kurztaganzucht mit 65 µE Belichtung.

Ende des Tages

	Col-0	***nad-me 1.2***	***nad-me 2.3***	***mmdh 1***	***nad-me 1.2 * 2.3***	***mmdh 1 * nad-me 1.2***	***mmdh 1 * nad-me 2.3***	***mmdh1 * nad-me 1.2 * 2.3***
Glycerat	3,11 ± 0,13	3,51 ± 0,15	2,94 ± 0,18	2,15 ± 0,32	**0,38 ± 0,02**	**0,17 ± 0,01**	1,66 ± 0,33	**0,17 ± 0,00**
Citrat	4,08 ± 1,41	2,97 ± 1,25	3,07 ± 1,59	2,86 ± 0,55	5,55 ± 2,40	2,20 ± 0,27	3,49 ± 0,86	2,54 ± 0,42
Pyruvat	0,45 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,37 ± 0,10	**0,31 ± 0,03**	**0,26 ± 0,01**	**0,29 ± 0,02**	1,16 ± 0,05	0,35 ± 0,06
Fumarat	97,62 ± 8,27	74,33 ± 10,69	104,01 ± 44,16	81,65 ± 9,99	**20,88** ± 3,83	**39,22** ± 1,45	138,14 ± 31,65	**43,08 ± 9,56**
Succinat	0,38 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,25 ± 0,07	**0,22** ± 0,01	0,49 ± 0,05	**0,21** ± 0,01	**0,22** ± 0,03	0,31 ± 0,04
Malat	8,02 ± 0,32	**6,35 ± 0,20**	10,31 ± 4,57	7,72 ± 0,47	**1,26 ± 0,13**	**1,34 ± 0,09**	**16,71 ± 2,18**	**3,01 ± 0,51**
Glycin	0,58 ± 0,09	0,78 ± 0,03	0,97 ± 0,14	0,40 ± 0,00	**0,03 ± 0,00**	**0,03 ± 0,00**	**0,21 ± 0,07**	**0,04 ± 0,00**
Valin	6,78 ± 0,54	7,24 ± 0,46	**12,36 ± 0,01**	8,03 ± 0,11	7,00 ± 0,53	6,25 ± 0,12	9,01 ± 2,08	6,37 ± 0,29
Isoleucin	1,84 ± 0,32	2,01 ± 0,22	**4,35 ± 0,17**	1,87 ± 0,10	1,39 ± 0,13	1,46 ± 0,06	2,56 ± 1,23	1,54 ± 0,13
Glycin	25,31 ± 0,28	26,31 ± 0,57	**35,53 ± 0,92**	**13,58 ± 0,15**	**0,92 ± 0,09**	**0,99 ± 0,04**	**8,73 ± 2,41**	**1,12 ± 0,18**
Prolin	34,46 ± 7,60	24,20 ± 3,14	**80,59 ± 6,12**	60,46 ± 7,67	35,18 ± 14,44	62,23 ± 11,22	**233,76 ± 14,50**	55,83 ± 14,18
Alanin	35,75 ± 6,63	35,54 ± 3,60	44,26 ± 8,09	52,00 ± 2,63	36,18 ± 5,02	60,55 ± 7,17	52,29 ± 5,51	39,25 ± 10,15
Serin	15,58 ± 0,96	21,03 ± 2,70	17,52 ± 1,05	17,47 ± 0,13	**5,52 ± 0,50**	**8,59 ± 0,48**	20,92 ± 1,85	**6,17 ± 0,58**
Threonin	18,16 ± 1,93	21,46 ± 2,28	22,61 ± 0,81	22,94 ± 0,72	11,39 ± 1,27	**10,46 ± 0,53**	28,01 ± 9,91	**9,99 ± 0,95**
Aspartat	6,57 ± 0,24	5,81 ± 0,02	6,26 ± 1,73	6,95 ± 0,24	6,97 ± 0,55	**3,79 ± 0,34**	5,28 ± 0,34	**5,64 ± 0,13**
Methionin	0,60 ± 0,07	0,70 ± 0,14	0,42 ± 0,05	0,67 ± 0,12	**0,31 ± 0,03**	0,36 ± 0,04	**1,34 ± 0,03**	0,37 ± 0,02
Glutamin	14,81 ± 2,57	11,47 ± 2,43	12,48 ± 7,19	15,35 ± 2,24	**4,41 ± 0,86**	**2,45 ± 0,70**	34,54 ± 4,82	**2,16 ± 0,77**
Glutamat	11,87 ± 1,82	11,90 ± 2,08	9,89 ± 4,47	11,76 ± 0,14	11,38 ± 0,63	8,02 ± 1,53	15,65 ± 1,19	8,37 ± 3,14
Phenylalanin	1,24 ± 0,16	1,17 ± 0,10	**2,30 ± 0,13**	1,26 ± 0,06	0,73 ± 0,05	0,81 ± 0,06	1,11 ± 0,12	0,76 ± 0,08
Asparagin	1,59 ± 0,49	1,57 ± 0,39	1,34 ± 0,70	1,59 ± 0,21	0,74 ± 0,12	0,50 ± 0,04	5,02 ± 1,54	0,48 ± 0,08
Ornithin	0,56 ± 0,03	0,48 ± 0,03	0,66 ± 0,25	0,65 ± 0,03	**0,37** ± 0,03	0,45 ± 0,01	0,75 ± 0,86	0,48 ± 0,02
Lysin	0,56 ± 0,09	0,64 ± 0,05	0,88 ± 0,06	0,64 ± 0,01	**1,16 ± 0,13**	**0,94 ± 0,06**	0,81 ± 0,23	0,91 ± 0,13
Tryptophan	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,00	**0,13 ± 0,01**	0,09 ± 0,00	**0,15 ± 0,00**	0,11 ± 0,01
Tyrosin	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,25 ± 0,00	0,34 ± 0,04	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,02

Ende des Tages

	Col-0	***nad-me 1.2***	***nad-me 2.3***	***mmdh 1***	***nad-me 1.2 * 2.3***	***mmdh1 * nad-me 1.2***	***mmdh 1 * nad-me 2.3***	***mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3***
Glycerol	1,03 ± 0,02	0,89 ± 0,10	1,59 ± 0,68	1,28 ± 0,20	2,59 ± 0,41	**2,63 ± 0,12**	1,77 ± 0,27	3,67 ± 0,22
Erythritol	0,27 ± 0,02	**0,38 ± 0,01**	0,48 ± 0,10	0,92 ± 0,22	0,24 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,30 ± 0,69	0,27 ± 0,00
Xylose	0,57 ± 0,04	0,61 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,33 ± 0,16	0,43 ± 0,22	**0,00 ± 0,10**	0,24 ± 0,24
Fructose	0,66 ± 0,02	0,63 ± 0,06	0,94 ± 0,10	0,69 ± 0,07	**0,34 ± 0,01**	**0,22 ± 0,03**	1,00 ± 0,06	**0,19 ± 0,03**
Sorbose	0,37 ± 0,01	0,35 ± 0,04	0,53 ± 0,09	0,38 ± 0,05	**0,17 ± 0,01**	**0,09 ± 0,01**	**0,57 ± 0,04**	**0,08 ± 0,02**
Glucose	16,77 ± 2,21	20,30 ± 2,14	22,25 ± 1,18	21,87 ± 2,66	13,30 ± 1,71	8,83 ± 0,52	**32,65 ± 2,78**	**7,03 ± 1,44**
myo-Inositol	12,90 ± 0,76	14,44 ± 1,55	12,87 ± 0,40	16,53 ± 1,39	17,40 ± 3,11	**33,46 ± 3,69**	**38,30 ± 4,24**	28,31 ± 4,98
Saccharose	46,27 ± 2,02	30,40 ± 15,26	52,48 ± 1,93	**60,06 ± 1,39**	**23,58 ± 4,36**	**23,56 ± 2,36**	46,03 ± 6,57	**17,26 ± 3,02**
Maltose	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,02	**0,13 ± 0,01**	**0,37 ± 0,02**	**0,22 ± 0,00**	0,09 ± 0,04	**0,21 ± 0,01**
Trehalose	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,01	**0,15 ± 0,01**	0,24 ± 0,02	0,30 ± 0,05	0,26 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,26 ± 0,02
Galactinol	0,98 ± 0,12	1,06 ± 0,09	**1,56 ± 0,15**	**1,94 ± 0,07**	**2,74 ± 0,38**	**5,46 ± 0,24**	**11,82 ± 0,30**	**3,97 ± 0,34**
Raffinose	1,22 ± 0,19	1,38 ± 0,10	1,64 ± 0,27	**2,92 ± 0,09**	3,41 ± 0,77	**2,88 ± 0,20**	**17,21 ± 0,35**	**2,08 ± 0,12**
Dehydroascorbat	0,68 ± 0,18	0,46 ± 0,12	0,73 ± 0,15	0,61 ± 0,18	0,54 ± 0,07	**2,35 ± 0,23**	1,84 ± 0,20	1,62 ± 0,41
Spermidin	0,49 ± 0,08	**1,28 ± 0,15**	0,45 ± 0,13	**0,91 ± 0,06**	0,74 ± 0,28	0,55 ± 0,13	0,42 ± 0,07	0,25 ± 0,12
Lactat	1,01 ± 0,36	0,99 ± 0,32	2,81 ± 1,61	1,14 ± 0,29	4,10 ± 1,04	**3,45 ± 0,55**	1,56 ± 0,84	**5,58 ± 0,55**
Glycolat	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,31 ± 0,06	**0,28 ± 0,01**	0,17 ± 0,02	**0,15 ± 0,00**	0,23 ± 0,02	**0,16 ± 0,00**
Threonat	1,34 ± 0,15	1,51 ± 0,16	2,03 ± 0,79	1,86 ± 0,13	1,54 ± 0,24	**0,47 ± 0,04**	1,17 ± 0,12	**0,66 ± 0,06**
Nicotin Säure	0,55 ± 0,20	0,47 ± 0,12	0,32 ± 0,03	0,56 ± 0,20	0,60 ± 0,21	0,31 ± 0,07	0,61 ± 0,13	0,59 ± 0,12
Urea	0,22 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,35 ± 0,15	0,29 ± 0,02	**0,57 ± 0,02**	**0,47 ± 0,04**	0,50 ± 1,10	**0,75 ± 0,06**
Phosphorsäure	1,67 ± 0,88	0,72 ± 0,38	0,93 ± 0,69	1,13 ± 0,28	1,49 ± 0,53	0,59 ± 0,07	1,65 ± 1,12	0,71 ± 0,24
GABA	0,95 ± 0,19	0,77 ± 0,15	**2,35 ± 0,15**	1,06 ± 0,10	1,61 ± 0,12	1,34 ± 0,25	1,36 ± 0,29	1,44 ± 0,47

Ende der Nacht

	Col-0	***nad-me 1.2***	***nad-me 2.3***	***mmdh 1***	***nad-me 1.2 * 2.3***	***mmdh 1 * nad-me 1.2***	***mmdh 1 * nad-me 2.3***	***mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3***
Glycerat	1,52 ± 0,08	1,69 ± 0,17	**2,01 ± 0,02**	**1,98 ± 0,03**	3,62 ± 0,38	2,29 ± 0,22	0,22 ± 0,51	1,77 ± 0,09
Citrat	3,25 ± 2,00	1,80 ± 3,03	10,06 ± 2,82	5,66 ± 4,10	5,64 ± 1,53	2,37 ± 0,92	2,53 ± 1,08	1,64 ± 0,08
Pyruvat	0,60 ± 0,09	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,07	0,30 ± 0,05	0,65 ± 0,14	0,54 ± 0,06	0,31 ± 0,08	1,18 ± 0,21
Fumarat	96,14 ± 6,92	115,93 ± 8,50	98,61 ± 8,11	**140,78 ± 10,00**	92,81 ± 11,20	123,62 ± 9,56	58,84 ± 15,08	150,41 ± 17,38
Succinat	0,36 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,31 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,44 ± 0,06	**0,23 ± 0,01**	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,04
Malat	12,33 ± 1,91	10,80 ± 1,20	25,09 ± 5,04	**23,00 ± 4,29**	**5,85 ± 0,74**	5,84 ± 0,32	3,83 ± 5,63	10,45 ± 1,56
Glycin	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,08	0,35 ± 0,04	0,30 ± 0,07	0,53 ± 0,06	0,36 ± 0,03	0,03 ± 0,09	0,23 ± 0,02
Valin	7,84 ± 0,08	**9,28 ± 0,18**	**10,35 ± 0,13**	8,96 ± 0,36	9,00 ± 0,63	**6,00 ± 0,13**	**11,61 ± 0,58**	**6,55 ± 0,18**
Isoleucin	1,42 ± 0,05	**1,63 ± 0,04**	**1,76 ± 0,01**	1,70 ± 0,09	2,08 ± 0,14	1,55 ± 0,02	**2,88 ± 0,23**	**1,74 ± 0,05**
Glycin	8,06 ± 0,62	9,98 ± 2,74	12,23 ± 1,25	14,14 ± 2,78	18,19 ± 2,06	12,00 ± 0,85	0,85 ± 3,01	8,06 ± 1,12
Prolin	20,77 ± 3,13	**63,20 ± 1,70**	92,95 ± 12,43	36,76 ± 6,45	148,11 ± 30,93	29,53 ± 1,32	99,85 ± 31,49	28,59 ± 6,29
Alanin	35,33 ± 2,19	**48,34 ± 2,48**	**72,78 ± 5,15**	**52,59 ± 2,00**	**47,67 ± 2,14**	31,75 ± 3,46	**87,30 ± 8,20**	**41,76 ± 1,66**
Serin	13,62 ± 0,41	**15,60 ± 0,31**	20,77 ± 1,43	16,26 ± 1,43	22,23 ± 1,97	21,21 ± 1,67	10,04 ± 4,39	18,50 ± 0,95
Threonin	19,60 ± 0,36	**25,28 ± 0,26**	21,01 ± 1,60	20,93 ± 1,87	25,19 ± 1,05	17,89 ± 1,24	17,41 ± 2,31	18,82 ± 0,54
Aspartat	6,32 ± 1,01	5,78 ± 0,56	5,92 ± 0,16	5,69 ± 0,90	7,01 ± 0,77	5,15 ± 0,11	6,59 ± 1,01	4,72 ± 0,51
Methionin	0,98 ± 0,28	0,20 ± 0,32	0,43 ± 0,21	0,30 ± 0,35	0,82 ± 0,07	0,68 ± 0,11	0,34 ± 0,28	1,29 ± 0,30
Glutamin	18,30 ± 2,77	16,38 ± 0,41	22,99 ± 3,19	24,59 ± 6,25	15,91 ± 2,20	15,83 ± 1,63	3,85 ± 12,65	18,81 ± 5,83
Glutamat	15,18 ± 2,81	15,59 ± 1,11	16,08 ± 2,04	14,54 ± 4,03	12,78 ± 1,93	15,75 ± 0,71	16,49 ± 3,10	11,05 ± 1,53
Phenylalanin	2,25 ± 0,11	2,14 ± 0,13	2,33 ± 0,09	2,60 ± 0,14	**1,18 ± 0,09**	**1,05 ± 0,03**	1,35 ± 0,63	**0,96 ± 0,08**
Asparagin	1,58 ± 0,44	1,14 ± 0,08	1,23 ± 0,15	1,23 ± 0,36	2,82 ± 0,54	2,07 ± 0,33	1,12 ± 0,41	2,08 ± 0,35
Ornithin	0,78 ± 0,14	0,61 ± 0,02	0,70 ± 0,05	0,74 ± 0,07	0,95 ± 0,10	0,77 ± 0,04	0,48 ± 0,25	0,66 ± 0,09
Lysin	0,81 ± 0,09	0,64 ± 0,01	0,80 ± 0,05	0,78 ± 0,07	0,84 ± 0,08	0,60 ± 0,02	1,58 ± 0,16	0,57 ± 0,01
Tryptophan	0,13 ± 0,00	0,16 ± 0,01	**0,15 ± 0,00**	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,00	**0,11 ± 0,00**	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Tyrosin	0,40 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,47 ± 0,02	**0,35 ± 0,02**	**0,31 ± 0,01**	**0,75 ± 0,04**	**0,30 ± 0,02**
Glycerol	0,92 ± 0,07	**1,51 ± 0,08**	1,04 ± 0,10	1,27 ± 0,12	2,33 ± 0,33	1,56 ± 3,52	**1,78 ± 0,19**	1,07 ± 0,57

Ende der Nacht

	Col-0	***nad-me 1.2***	***nad-me 2.3***	***mmdh 1***	***nad-me 1.2 * 2.3***	***mmdh 1 * nad-me 1.2***	***mmdh 1 * nad-me 2.3***	***mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3***
Erythritol	0,27 ± 0,01	**0,29 ± 0,00**	0,26 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,02	**0,33 ± 0,01**	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,01
Xylose	0,78 ± 0,01	**0,60 ± 0,00**	**0,71 ± 0,01**	**0,66 ± 0,02**	0,58 ± 0,19	0,81 ± 0,02	0,00 ± 0,26	0,76 ± 0,03
Fructose	0,72 ± 0,06	1,03 ± 0,09	0,76 ± 0,09	0,89 ± 0,13	0,62 ± 0,05	0,85 ± 0,02	0,32 ± 0,54	**0,55 ± 0,03**
Sorbose	0,36 ± 0,02	0,52 ± 0,05	0,39 ± 0,06	0,44 ± 0,06	**0,29 ± 0,02**	**0,44 ± 0,01**	0,15 ± 0,30	0,31 ± 0,03
Glucose	12,65 ± 1,04	16,27 ± 2,27	14,56 ± 2,36	11,79 ± 1,88	21,66 ± 2,99	**20,53 ± 1,03**	10,84 ± 4,72	13,15 ± 0,73
myo-Inositol	24,42 ± 0,70	**31,97 ± 1,78**	27,26 ± 2,36	21,95 ± 1,57	**19,43 ± 0,88**	29,73 ± 2,13	30,76 ± 1,65	19,29 ± 2,13
Saccharose	45,84 ± 3,46	42,79 ± 0,87	40,80 ± 1,36	44,42 ± 2,80	55,09 ± 2,41	45,69 ± 2,16	34,45 ± 5,35	58,25 ± 6,19
Maltose	0,58 ± 0,03	**0,84 ± 0,06**	0,48 ± 0,06	0,84 ± 0,11	**0,07 ± 0,00**	**0,09 ± 0,05**	0,21 ± 0,25	**0,08 ± 0,02**
Trehalose	0,65 ± 0,02	0,74 ± 0,07	0,56 ± 0,04	0,65 ± 0,01	0,50 ± 0,09	**0,27 ± 0,01**	0,36 ± 0,13	**0,27 ± 0,01**
Galactinol	0,59 ± 0,11	0,62 ± 0,09	0,96 ± 0,09	0,44 ± 0,06	**3,48 ± 0,65**	**2,90 ± 0,42**	5,76 ± 1,59	**2,93 ± 0,12**
Raffinose	1,02 ± 0,15	1,36 ± 0,15	1,37 ± 0,16	0,89 ± 0,17	**5,80 ± 0,21**	**2,79 ± 0,24**	5,77 ± 1,46	**3,02 ± 0,30**
Dehydroascorbat	0,96 ± 0,29	1,12 ± 0,22	0,76 ± 0,15	0,80 ± 0,12	0,60 ± 0,26	1,10 ± 0,24	2,28 ± 0,28	1,91 ± 0,43
Spermidin	1,58 ± 0,13	0,71 ± 0,34	1,95 ± 0,47	1,13 ± 0,28	**0,62 ± 0,22**	**0,87 ± 0,18**	0,18 ± 0,65	**0,39 ± 0,03**
Lactat	1,13 ± 0,32	1,50 ± 0,32	1,92 ± 0,31	0,68 ± 0,36	8,13 ± 2,08	1,92 ± 0,22	0,90 ± 0,10	0,98 ± 1,70
Glycolat	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,04	0,20 ± 0,02
Threonat	1,14 ± 0,12	1,39 ± 0,04	1,35 ± 0,07	1,36 ± 0,09	1,26 ± 0,15	1,04 ± 0,17	0,68 ± 0,19	0,99 ± 0,24
Nicotin Säure	0,50 ± 0,08	0,24 ± 0,07	0,39 ± 0,22	0,44 ± 0,28	0,22 ± 0,18	0,59 ± 0,03	0,42 ± 0,06	0,68 ± 0,42
Urea	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,20 ± 0,07	1,46 ± 0,35	**0,57 ± 0,06**	0,53 ± 0,12	0,37 ± 0,10
Phosphorsäure	1,63 ± 1,35	0,31 ± 1,01	3,88 ± 1,17	2,55 ± 1,68	1,59 ± 0,42	0,79 ± 0,43	0,71 ± 1,07	0,56 ± 0,05
GABA	1,04 ± 0,10	0,96 ± 0,03	1,78 ± 0,23	1,09 ± 0,02	1,10 ± 0,02	0,76 ± 0,11	**1,87 ± 0,11**	1,31 ± 0,06

7. Abstract

It is of global interest to improve the yield of crop plants. Different approaches are currently in progress to achieve this. On the one hand, evolutionary adaptions like C4 photosynthesis, which improve photosynthetic efficiency in plants are studied in detail. On the other hand, biotechnological approaches based on artificial metabolic pathways to improve crop yield are applied and approved.

In the following work an artificial metabolic pathway in *A. thaliana* was established. The aim of this approach was to metabolise glycolate inside the Chloroplast to improve plant biomass. By completely oxidising glycolate the energy consuming flux through the photorespiratory pathway should be reduced. In preliminary work transgenic GMK plants were established, harbouring transgenic expression of Glycolate Oxidase, Malate Synthase and Catalase, with upstream transitpeptides for chloroplastidial localization. The GMK pathway was analysed in this work and it was shown that the GMK plants improved biomass production and photosynthetic efficiency. The GMK plants developed bigger leaf rosettes, showed higher CO_2 assimilation rates and resulting from this produced more biomass compared to wildtype plants. In addition there was evidence for a lower flux through the photorespiratory pathway and a chloroplastidial respiration of glycolate which needs more proofs. The capacity of the primary metabolism in the GMK plants was on wildtype level, but there was an accumulation of aminoacids derived from PEP and pyruvate. Moreover morphological changes in the leaves were analysed what needs more investigation to be explained.
In parallel an approach was performed which aimed to improve the GMK pathway. In this approach Glycolate Dehydrogenase from the greenalgae *Micromonas sp*. was cloned and further transformed into wildtype and Malate Synthase overexpressing plants via *A. tumefaciens* shuttled, stable genomic transformation. Homozygous plants harbouring the transgene were selected, the transcription was confirmed and the T3 generation was phenotyped. Transgenic mGlcDH and mGlcDH-MS plants showed no improvement in biomass production in comparison to the wildtype plants. In this regard correct protein folding of the transgenic enzyme from *Micromonas sp*. must be issued. Furthermore the *in vivo* electron acceptor of this enzyme needs to be identified to prove enzyme activity.

In the second part of this work defined physiological roles and regulations of NAD-ME 1 and NAD-ME 2 in the mitochondria of *A. thaliana* should be elucidated. NAD-ME was of interest for this work because beneath its housekeeping roles in C3 metabolism, the enzyme was recruited independently during evolution into C4 photosynthesis several

times. In the background of biotechnological improvements of crop plants via integration of C4 traits, it is essential to learn more about the housekeeping role of NAD-ME and the regulation of enzyme activity in C3 plants. To elucidate the *in planta* function knockout mutants of the malate metabolism were generated. Single knockout mutants of *NAD-ME 1*, *nad-me 1.2* and *NAD-ME 2*, *nad-me 2.2* and *nad-me 2.3* as well as of *mMDH 1 mmdh 1* were crossed in all possible combinations, to impair mitochondrial malate metabolism. Resulting double mutants *mmdh 1 * nad-me 1.2*; *mmdh 1 * nad-me 2.3*, established double mutant nad-me 1.2 * 2.3 and the generated triplemutant *mmdh 1 * nad-me 1.2 * 2.3* were phenotyped. The combined knockout mutants *mmdh 1 * nad- me 1.2*, *mmdh 1 * nad-me 2.3* and the triplemutant showed a light regime dependent phenotype under shortday conditions. The plants were smaller, with yellowish leaves, lower chlorophyll contents and lower F_V/ F_M ratios in comparison to the single mutants and the wildtype. A first metabolic profile of the combined double mutants and the triple mutant displayed changes in amino acid content, TCA- cycle intermediates and sugars. These metabolic and phenotypic changes point at carbon starvation as a result of changes in the malate metabolism, which could also lead to early senescence especially in the *mmdh 1 * nad-me 2.3* mutant.

Moreover losses of gene function in the knockout plants showed differential effects that were not additive in the triplemutant. This leads to the assumption that both, NAD-ME 1 and NAD-ME 2 fulfil specific roles in the plant, especially in a long night. These functions could be specific, regulatory traits that influence other enzymes to regulate the flux of carbon through the mitochondrium.

8. Literaturverzeichnis

Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk et al. (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." Science. **301**: 653-657.

Anderson, L.E. (1971). Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphate isomerases. Biochim. Biophys. Acta **235**: 237–244.

Andersson, I. (2008). Catalysis and regulation in Rubisco. J. Exp. Bot. **59**: 1555–1568.

Aranjuelo, I., Cabrera-Bosquet, L., Morcuende, R., Avice, J.C., Nogués, S., Araus, J.L., Martínez-Carrasco, R., and Pérez, P. (2011a). Does ear C sink strength contribute to overcoming photosynthetic acclimation of wheat plants exposed to elevated CO2? J. Exp. Bot. **62**: 3957–69.

Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avice, J.C., and Nogués, S. (2011b). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (Medicago sativa L.). J. Exp. Bot. **62**: 111–23.

Artus, N.N. and Edwards, G.E. (1985). NAD-malic enzyme from plants. FEBS Lett. **182**: 225–233.

Aubry, S., Brown, N.J., and Hibberd, J.M. (2011). The role of proteins in C(3) plants prior to their recruitment into the C(4) pathway. J. Exp. Bot. **62**: 3049–59.

Backhausen, J.E., Emmerlich, A., Holtgrefe, S., Horton, P., Nast, G., Rogers, J.J.M., Müller-Röber, B., and Scheibe, R. (1998). Transgenic potato plants with altered expression levels of chloroplast NADP-malate dehydrogenase: interactions between photosynthetic electron transport and malate metabolism in leaves and in isolated intact chloroplasts. Planta **207**: 105–114.

Badger, M.R. (2003). CO2 concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. J. Exp. Bot. **54**: 609–622.

Badger, M.R., Andrews, T.J., Whitney, S.M., Ludwig, M., Yellowlees, D.C., Leggat, W., and Price, G.D. (1998). The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO 2 -concentrating mechanisms in algae. Can. J. Bot. **76**: 1052–1071.

Bailey, S., Walters, R.G., Jansson, S., and Horton, P. (2001). Acclimation of Arabidopsis thaliana to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. Planta **213**: 794–801.

Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N.E., and Milo, R. (2010). Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. Proc. Natl. Acad. Sci.

Bari, R., Kebeish, R., Kalamajka, R., Rademacher, T., and Peterhänsel, C. (2004). A glycolate dehydrogenase in the mitochondria of Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot. **55**: 623–30.

Bauwe, H., Hagemann, M., and Fernie, A.R. (2010). Photorespiration: players, partners and origin. Trends Plant Sci. **15**: 330–336.

Bauwe, H., Hagemann, M., Kern, R., and Timm, S. (2012). Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. Curr. Opin. Plant Biol. **15**: 1–7.

Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. C R Acad Sci Ser III Sci Vie **316**: 1194–1199.

Beezley, B.B., Gruber, P.J., and Frederick, S.U.E.E. (1976). Cytochemical Localization of Glycolate Dehydrogenase in Mitochondria of Chlamydomonas1. 315–319.

Bergmeyer, H. U. (1970). Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, New York, Verlag Chemie.

Birktoft, J.J., Fernley, R.T., Bradshaw, R. a, and Banaszak, L.J. (1982). Amino acid sequence homology among the 2-hydroxy acid dehydrogenases: mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases form a homologous system with lactate dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **79**: 6166–70.

Boldt, R., Edner, C., Kolukisaoglu, U., Hagemann, M., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Morgenthal, K., and 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**: 2413–20.

Bowes G., Ogren W.L., Hageman R.H. (1971) Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. Biochem Biophys Res Commun. **45**: 716–722.

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**: 248–254.

Brailsford, M., Thompson, G., Kaderbhai, N., and Beechey, R.B. (1986). Pyruvate metabolism in castor-bean mitochondria. Biochem. J. **239**: 355–61.

Bräutigam, A. , Kajala, K., Wullenweber, J., Sommer, M., Gagneul, D., Weber, K. L., Carr, K. M., Gowik, U., Maß, J., Lercher, M.J., Westhoff, P., Hibberd, J. M., Weber, A. P. M (2011). An mRNA blueprint for C4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C3 and C4 species. Plant Physiol. **155**: 142–56.

Brooks, A. and Farquhar, G.D. (1985). Effect of temperature on the CO2/O2 specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Planta **165**: 397–406.

Brown, N.J., Newell, C. a, Stanley, S., Chen, J.E., Perrin, a J., Kajala, K., and Hibberd, J.M. (2011). Independent and Parallel Recruitment of Preexisting Mechanisms Underlying C(4) Photosynthesis. Science (80). **331**: 1436–1439.

Brown, N.J., Parsley, K., and Hibberd, J.M. (2005). The future of C4 research--maize, Flaveria or Cleome? Trends Plant Sci. **10**: 215–21.

Brown R.H. (1998). Agronomic Implications of C4 Photosynthesis, in C4 Plant Biology, Academic Press.

Brutnell, T.P., Wang, L., Swartwood, K., Goldschmidt, A., Jackson, D., Zhu, X.-G., Kellogg, E., and Van Eck, J. (2010). Setaria viridis: a model for C4 photosynthesis. Plant Cell **22**: 2537–44.

Budde, R.J. and Randall, D.D. (1990). Pea leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex is inactivated in vivo in a light-dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**: 673–6.

Bundock, P. (1996). Integration of Agrobacterium tumefaciens T-DNA in the Saccharomyces cerevisiae genome by illegitimate recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 15272–15275.

Von Caemmerer, S. and Evans, J.R. (2010). Enhancing C3 photosynthesis. Plant Physiol. **154**: 589–592.

Von Caemmerer, S., Quick, W.P., and Furbank, R.T. (2012). The development of C_4rice: current progress and future challenges. Science **336**: 1671–2.

Von Caemmerer S. (2000). Biochemical Models of Leaf Photosynthesis; CSIRO.

Calsa, T. and 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**: 745–62.

Calvin, M. and Massini, P. (1952). The path of carbon in photosynthesis. Experientia **8**: 445–457.

Carvalho, J. de F.C., Madgwick, P.J., Powers, S.J., Keys, A.J., Lea, P.J., and Parry, M.A.J. (2011). An engineered pathway for glyoxylate metabolism in tobacco plants aimed to avoid the release of ammonia in photorespiration. BMC Biotechnol. **11**: 111.

Chollet R., Vidal J., O'Leary M.H. (1996). Phosphoenolpyruvate Carboxylase: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. **47**:273-298.

Christeller, J. and W. Laing (2005). Plant serine proteinase inhibitors. Protein Pept. Lett **12**: 439–447.

Christeller, J.T. and Tolbert, N.E. (1978). Phosphoglycolate phosphatase. Effect of cation and pH on activity. J. Biol. Chem. **253**: 1786–90.

Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **86**: 2172–2175.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J. **16**: 735–743.

La Cognata, U., Landschutze, V., Willmitzer, L., and Muller-Rober, B. (1996). Structure and Expression of Mitochondrial Citrate Synthases from Higher Plants. Plant Cell Physiol. **37**: 1022–1029.

Dalton, D. a, Russell, S. a, Hanus, F.J., Pascoe, G. a, and Evans, H.J. (1986). Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **83**: 3811–5.

Day, D. and Hanson, J. (1977). Pyruvate and malate transport and oxidation in corn mitochondria. Plant Physiol.: 630–635.

Demmig-Adams, B. and Adams, W.W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. Trends Plant Sci. **1**: 21–26.

Desfeux, C., Clough, S.J., and Bent, A.F. (2000). Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. Plant Physiol. **123**: 895–904.

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.

Douce, R. and Neuburger, M. (1999). Biochemical dissection of photorespiration. Curr. Opin. Plant Biol. **2**: 214–222.

Drincovich, M.F., Lara, M. V, Andreo, C.S., and Maurino, V.G. (2011). C4 Decarboxylases: Different Solutions for the Same Biochemical Problem, the Provision of CO2 to Rubisco in the Bundle Sheath Cells. In C4 Photosynthesis and Related CO2 Concentrating Mechanisms, pp. 277–300.

Dutilleul, C. (2003). Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation. Plant Cell Online **15**: 1212–1226.

Edwards, G. and Walker, D.A. (1983). C3, C4: Mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis.

Eisenhut, M., Kahlon, S., Hasse, D., Ewald, R., Lieman-Hurwitz, J., Ogawa, T., Ruth, W., Bauwe, H., Kaplan, A., and Hagemann, M. (2006). The plant-like C2 glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. Plant Physiol. **142**: 333–342.

Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A., and Hagemann, M. (2008). The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**: 17199–204.

Emmerlich, V., Linka, N., Reinhold, T., Hurth, M. a, Traub, M., Martinoia, E., and 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**: 11122–11126.

Engel, N., van den Daele, K., Kolukisaoglu, U., Morgenthal, K., Weckwerth, W., Pärnik, T., Keerberg, O., and Bauwe, H. (2007). Deletion of glycine decarboxylase in Arabidopsis is lethal under nonphotorespiratory conditions. Plant Physiol. **144**: 1328–35.

Enquvist M. (2010). Characterization of three 2-hydroxy-acid dehydrogenases in the context of a biotechnological approach to short-circuit photorespiration; Botansiches Institut, Universität zu Köln; Dissertation.

Fahnenstich, H., Saigo, M., Niessen, M., Zanor, M.I., Andreo, C.S., Fernie, A.R., Drincovich, M.F., Flügge, U.-I., and 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**: 640–52.

Fahnenstich, H., Scarpeci, T.E., Valle, E.M., Flügge, U.-I., and Maurino, V.G. (2008). Generation of hydrogen peroxide in chloroplasts of Arabidopsis overexpressing glycolate oxidase as an inducible system to study oxidative stress. Plant Physiol. **148**: 719–29.

Fahnenstich H. (2007). Biotechnologische Ansätze zur Reduktion photorespiratorischer Verluste in *A. thaliana*. Botanisches Institut, Universität zu Köln; Dissertation.

Farquhar, G.D., Caemmerer, S., and Berry, J.A. (1980). A biochemical model of photosynthetic CO2 assimilation in leaves of C3 species. Planta **149**: 78–90.

Farquhar, G.D. and Von Caemmerer, S. (1982). Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In Encyclopedia of plant physiology, pp. 549–587.

Farquhar, G.D. and Sharkey, T.D. (1982). Stomatal Conductance and Photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. **33**: 317–345.

Fernie, A.R., Carrari, F., and Sweetlove, L.J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. Curr. Opin. Plant Biol. **7**: 254–61.

Fernie, A.R., Geigenberger, P., and Stitt, M. (2005). Flux an important, but neglected, component of functional genomics. Curr. Opin. Plant Biol. **8**: 174–182.

Fernie, A.R. and Martinoia, E. (2009). Malate. Jack of all trades or master of a few? Phytochemistry **70**: 828–32.

Fischer, R.A. and Edmeades, G.O. (2010). Breeding and Cereal Yield Progress. Crop Sci. **50**: S–85–S–98.

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.

Furuichi, T., I. C. Mori, K. Takahashi and S. Muto (2001). "Sugar-induced increase in cytosolic Ca2+ in Arabidopsis thaliana whole plants." Plant and Cell Physiology. **42**: 1149-1155.

Furumoto, T., Hata, S., and Izui, K. (1999). cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme. Plant Mol. Biol. **41**: 301–311.

Gibon, Y., Pyl, E.-T., Sulpice, R., Lunn, J.E., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. (2009). Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when Arabidopsis is grown in very short photoperiods. Plant. Cell Environ. **32**: 859–74.

Gietl, C. (1992a). Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. Biochim. Biophys. Acta **1100**: 217–34.

Gietl, C. (1992b). Partitioning of Malate Dehydrogenase Isoenzymes into Glyoxysomes, Mitochondria, and Chloroplasts. Plant Physiol. **100**: 557–559.

Giordano, M., Beardall, J., and Raven, J.A. (2005). CO2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. Annu. Rev. Plant Biol. **56**: 99–131.

Gould, S.B., Waller, R.F., and McFadden, G.I. (2008). Plastid evolution. Annu. Rev. Plant Biol. **59**: 491–517.

Gowik, U. and Westhoff, P. (2011). The path from C3 to C4 photosynthesis. Plant Physiol. **155**: 56–63.

Gosset, W. S. (1908). The probable error of a mean. Biometrika **6**: 1-25.

Green, B.R. and Durnford, D.G. (1996). The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**: 685–714.

Griffin, K.L. and Heskel, M. (2013). Breaking the cycle: how light, CO2 and O2 affect plant respiration. Plant. Cell Environ. **36**: 498–500.

Grover S.D., Canellas P.F., Wedding R.T. (1981) Purification of NAD malic enzyme from potato and investigation of some physiological and kinetic properties. Arch Biochem Biophys **209**: 396–407.

Guan Y., Rawsthorne S., Scofield G., Shaw P., Doonan J. (1995). Cloning and characterization of a dihy-drolipoamide acetyltransferase (E2) subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. **270**:5412–17

Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., and Ohsumi, Y. (2002). Leaf Senescence and Starvation-Induced Chlorosis Are Accelerated by the Disruption of an Arabidopsis Autophagy Gene 1. Plant Physiol. **129**: 1181–1193.

Hanning, I. and Heldt, H.W. (1993). On the Function of Mitochondrial Metabolism during Photosynthesis in Spinach (Spinacia oleracea L.) Leaves (Partitioning between Respiration and Export of Redox Equivalents and Precursors for Nitrate Assimilation Products). Plant Physiol. **103**: 1147–1154.

Hans, B.Y., Krebs, A., and Johnson, W.A. (1937). METABOLISM OF KETONIC ACIDS IN ANIMAL TISSUES. 645–660.

Hatch, M., Kagawa, T., and Craig, S. (1975). Subdivision of C 4 -Pathway Species Based on Differing C 4 Acid Decarboxylating Systems and Ultrastructural Features. Aust. J. Plant Physiol. **2**: 111.

Hatch, M.D. (1970). Chemical energy costs for CO2 fixation by plants with differing photosynthetic pathways. In Prediction and Measurement of Photosynthetic Productivity. Proceedings of the IBP/PP Technical Meeting, Trebon, 14-21 September 1969, pp. 215–220.

Hatch M., Osmond C. (1976) Transport in Plants III. Springer, Berlin

Hatch, M.D.; Carnal, N.W. (1992). Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration; H. Lambers and L.H.W. van der Plas. The Hague: SPB Academic Publishing; pp. 135-148.

Heckmann, D., Schulze, S., Denton, A., Gowik, U., Westhoff, P., Weber, A.P.M., and Lercher, M.J. (2013). Predicting C4 photosynthesis evolution: modular, individually adaptive steps on a Mount Fuji fitness landscape. Cell **153**: 1579–88.

Heldt H.W. (2003). Pflanzenbiochemie. Speltrum Akademischer Verlag.

Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. Plant Mol. Biol. **42**: 819–832.

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**: 553-564.

Herrmann, K.M. and Weaver, L.M. (1999). THE SHIKIMATE PATHWAY. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50**: 473–503.

Hibberd, J.M., Sheehy, J.E., and Langdale, J. a (2008). Using C4 photosynthesis to increase the yield of rice-rationale and feasibility. Curr. Opin. Plant Biol. **11**: 228–31.

Hill, S., Bryce, J., and Leaver, C. (1994). Pyruvate metabolism in mitochondria from cucumber cotyledons during early seedling development. J. Exp. Bot. **45**: 1489–1491.

Ho, L.C. (1976). Variation in the Carbon/Dry Matter Ratio in Plant Material. Ann. Bot. **40**: 163–165.

Hodges, M. (2002). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. J. Exp. Bot. **53**: 905–16.

Holaday, A.S., Lee, K.W., and Chollet, R. (1984). C3?C4 Intermediate species in the genus Flaveria: leaf anatomy, ultrastructure, and the effect of O2 on the CO2 compensation concentration. Planta **160**: 25–32.

Huang, S. and Millar, a H. (2013). Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. Curr. Opin. Plant Biol. **16**: 344–9.

Hurth, M.A., Suh, S.J., Kretzschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E., and Neuhaus, H.E. (2005). Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. Plant Physiol. **137**: 901–10.

Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Ohsumi, C. (2003). Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis. Plant J. **33**: 975–987.

Igarashi, D., Tsuchida, H., Miyao, M., and Ohsumi, C. (2006). Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. Plant Physiol. **142**: 901–10.

Imsande, J., Pittig, J., and Palmer, R. (2001). Independent spontaneous mitochondrial malate dehydrogenase null mutants in soybean are the result of deletions. J. … **1**: 333–338.

Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S., Miyake, C., and Fukayama, H. (2011). Functional incorporation of sorghum small subunit increases the catalytic turnover rate of Rubisco in transgenic rice. Plant Physiol. **156**: 1603–11.

Jamai, A., Salomé, P. a, Schilling, S.H., Weber, A.P.M., and McClung, C.R. (2009). Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. Plant Cell **21**: 595–606.

Jenner, H.L., Winning, B.M., Millar, a H., Tomlinson, K.L., Leaver, C.J., and Hill, S. a (2001). NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. Plant Physiol. **126**: 1139–49.

Journet E.P., Neuburger M., Douce R. (1981) Role of glutamate-oxaloacetate transaminase and malate dehydrogenase in the regeneration of NAD for glycine oxidation by spinach leaf mitochondria. Plant Physiol. **67**: 467–469

Kahn, M. S. (2007). Engineering photorespiration in chloroplasts: a novel strategy for increasing biomass production. Trends in biotechnology. **10**: 437-440.

Kaplan A. and Reinhold L. (2003). CO_2 concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.**50**: 539-570.

Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H.-J., Rosenkranz, R., Stäbler, N., Schönfeld, B., Kreuzaler, F., and Peterhänsel, C. (2007). Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana. Nat. Biotechnol. **25**: 593–599.

Kelly, G.J. and Latzko, E. (1976). Inhibition of spinach-leaf phosphofructokinase by 2-phosphoglycollate. FEBS Lett. **68**: 55–58.

Kern, R., Bauwe, H., and Hagemann, M. (2011). Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. Photosynth. Res. **109**: 103–114.

Keys, A.J. (2006). The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C3 higher plants. Photosynth. Res. **87**: 165–75.

Kinnersley, A.M. and Turano, F.J. (2000). Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. **19**: 479–509.

Kluge M., **Ting I.P.** (1978). Crassulacean acid metabolism. Analysis of an ecological adaption. Springer Verlag. P. 209.

Krause, G.H. and Weis, E. (1991). Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**: 313–349.

Krebs, H.A. and Johnson, W.A. (1937). Metabolism of ketonic acids in animal tissues. Biochem. J. **31**: 645–60.

Kromer, S. (1995). Respiration during photosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol.: 45–70.

Krueger, S., Giavalisco, P., Krall, L., Steinhauser, M.-C., Büssis, D., Usadel, B., Flügge, U.-I., Fernie, A.R., Willmitzer, L., and Steinhauser, D. (2011). A topological map of the compartmentalized Arabidopsis thaliana leaf metabolome. PLoS One **6**: e17806.

Kruger, N.J. and von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. Curr. Opin. Plant Biol. **6**: 236–246.

Krysan, P. H., J. C. Young, F. Tax and M. R. Sussman (1996). "Identification of transferred DNA insertions within Arabidopsis genes involved in signal transduction and ion transport." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **93**: 8145-8150.

Ku, M.S., Kano-Murakami, Y., and Matsuoka, M. (1996). Evolution and expression of C4 photosynthesis genes. Plant Physiol. **111**: 949–57.

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 **(4):** 471-478.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680–685.

Lam, E., Kato, N. und Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. Nature. **411**: 848-853.

Lambers H., Chapin F.S., Pons T.L. (2008). Plant Physiological Ecology 2nd Edition; 2008 Springer Science + Business Media.

Lancien, M., Gadal, P., and Hodges, M. (1998). Molecular characterization of higher plant NAD-dependent isocitrate dehydrogenase: evidence for a heteromeric structure by the complementation of yeast mutants. Plant J. **16**: 325–333.

Lee C.P., Eubel H., O'Toole N., Millar A.H. (2008) Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic Arabidopsis metabolism. Mol Cell Proteomics. **7**: 1297–1316

Leegood, R.C., Evans, J.R., and Furbank, R.T. (2010). Food security requires genetic advances to increase farm yields. Nature **464**: 831.

Leegood, R.C., Lea, P.J., Adcock, M.D., and Hausler, R.E. (1995). The regulation and control of photorespiration. J. Exp. Bot. **46**: 1397–1414.

Lemaitre, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Flesch, V., Bismuth, E., Fernie, A.R., and Hodges, M. (2007). NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of Arabidopsis suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. Plant Physiol. **144**: 1546–58.

Liepman, A.H. and Olsen, L.J. (2003). Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of Arabidopsis. Plant Physiol. **131**: 215–27.

Liepman, A.H. and Olsen, L.J. (2001). Peroxisomal alanine : glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in Arabidopsis thaliana. Plant J. **25**: 487–498.

Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., and Fernie, A.R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nat. Protoc. **1**: 387–96.

Long, J., Wang, J., and Berry, J. (1994). Cloning and analysis of the C4 photosynthetic NAD-dependent malic enzyme of amaranth mitochondria. J. Biol. Chem. **269**: 2827–2833.

Lu, Y., Gehan, J.P., and Sharkey, T.D. (2005). Daylength and Circadian Effects on Starch Degradation and Maltose Metabolism 1. Plant Physiol. **138**: 2280–2291.

Ludwig, B., Barros, T., and Kühlbrandt, W. (2009). Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. **1787**: 753–772.

Luethy, M.H., Miernyk, J. a, and Randall, D.D. (1995). The mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex: nucleotide and deduced amino-acid sequences of a cDNA encoding the Arabidopsis thaliana E1 alpha-subunit. Gene **164**: 251–4.

Lüttge E, U. (2004). Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). Ann. Bot. **93**: 629–652.

Madhavan S., Andreo C. S., Maurino V.M.,O'Leary M. H. (1996). In Situ Localization of Nadp-Malic Enzyme in Bundle Sheath Cells and Leaf Carbon Isotope Fractionation in Two C_4 Grasses International Journal of Plant Sciences. 157: 118-122.

Madore, M. and Grodzinski, B. (1984). Effect of Oxygen Concentration on C-Photoassimilate Transport from Leaves of Salvia splendens L. Plant Physiol. **76**: 782–6.

Maier, A., Fahnenstich, H., von Caemmerer, S., Engqvist, M.K.M., Weber, A.P.M., Flügge, U.-I., and Maurino, V.G. (2012). Transgenic Introduction of a Glycolate Oxidative Cycle into A. thaliana Chloroplasts Leads to Growth Improvement. Front. Plant Sci. **3**: 38.

Maier, A., Zell, M.B., and Maurino, V.G. (2011). Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C(4) and C(3) photosynthesis. J. Exp. Bot. **62**: 3061–9.

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, 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.

Marschner P. (2012). Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd Edition; Elsevier Ltd.

Marshall, D.M., Muhaidat, R., Brown, N.J., Liu, Z., Stanley, S., Griffiths, H., Sage, R.F., and Hibberd, J.M. (2007). Cleome, a genus closely related to Arabidopsis, contains species spanning a developmental progression from C(3) to C(4) photosynthesis. Plant J. **51**: 886–96.

Martinoia, E. and Rentsch, D. (1994). Malate Compartmentation-Responses to a Complex Metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **45**: 447–467.

Maurino, V.G., Drincovich, M.F., and Andreo, C.S. (1996). NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. Biochem. Mol. Biol. Int. **38**: 239–50.

Maurino, V.G. and Peterhansel, C. (2010). Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. Curr. Opin. Plant Biol. **13**: 249–56.

Maurino, V.G. and Weber, A.P.M. (2013). Engineering photosynthesis in plants and synthetic microorganisms. J. Exp. Bot. **64**: 743–51.

Maurino und Flügge (2009). Pub. No.: WO/2009/103782. Means for improving agrobiological traits in a plant by providing a plant cell comprising in ist chloroplasts enzymatic activities for converting glycolate into malate.

McEvily, A.J., Flint, A.J., and Harrison, J.H. (1985). Concomitant purification of three porcine heart mitochondrial enzymes: Citrate synthase, aspartate aminotransferase, and malate dehydrogenase. Anal. Biochem. **144**: 159–164.

Van der Merwe, M.J., Osorio, S., Moritz, T., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A.R. (2009). Decreased mitochondrial activities of malate dehydrogenase and fumarase in tomato

lead to altered root growth and architecture via diverse mechanisms. Plant Physiol. **149**: 653–69:

Meyer, M. and Griffiths, H. (2013). Origins and diversity of eukaryotic CO2-concentrating mechanisms: lessons for the future. J. Exp. Bot. **64**: 769–86.

Millar, H., Hill, S. and Leaver, C.J. (1999). Plant mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex: purification and characterization in potato. Biochem. J. **343 Pt 2**: 327–34.

Millar A.H., Sweetlove L.J., Giege´ P., Leaver C.J. (2001) Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. Plant Physiol. **127**: 1711–1727

Millar, H., Whelan, J., Soole, K.L., and Day, D. (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. Annu. Rev. Plant Biol. **62**: 79–104.

Miller, S., Driscoll, B., and Gregerson, R. (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. Plant Journal. **15**: 173–184.

Mitchell, P.L. and Sheehy, J.E. (2006). Supercharging rice photosynthesis to increase yield. New Phytol. **171**: 688–93.

Moore, B.D., Cheng, S.-H., Sims, D., and Seemann, J.R. (1999). The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO 2. Plant, Cell Environ. **22**: 567–582.

Muhaidat, R., Sage, R.F., and Dengler, N.G. (2007). Diversity of Kranz anatomy and biochemistry in C4 eudicots. Am. J. Bot. **94**: 362–81.

Murata, T., Ohsugi, R., Matsuoka, M., and Nakamoto, H. (1989). Purification and Characterization of NAD Malic Enzyme from Leaves of Eleusine coracana and Panicum dichotomiflorum. Plant Physiol. **89**: 316–324.

Nelson, E.B. and Tolbert, N.E. (1970). Glycolate dehydrogenase in green algae. Arch. Biochem. Biophys. **141**: 102–110.

Niessen, M., Thiruveedhi, K., Rosenkranz, R., Kebeish, R., Hirsch, H.-J., Kreuzaler, F., and Peterhänsel, C. (2007). Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants. J. Exp. Bot. **58**: 2709–15.

Noctor, G., Arisi, a.-C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., and Foyer, C.H. (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. J. Exp. Bot. **49**: 623–647.

Noctor, G., De Paepe, R., and Foyer, C.H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. Trends Plant Sci. **12**: 125–34.

Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., and Foyer, C.H. (2011). Glutathione. Arabidopsis Book **9**: e0142.

Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., and Fernie, A.R. (2011). Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. Plant Physiol. **155**: 101–7.

Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., and Fernie, A.R. (2007a). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. Plant J. **50**: 1093–106.

Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A.M.O., Loureiro, M.E., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., and Fernie, A.R. (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. Plant Physiol. **137**: 611–22.

Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Gibon, Y., and Fernie, A.R. (2008). The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. J. Exp. Bot. **59**: 1675–84.

Nunes-Nesi, A., Sweetlove, L.J., and Fernie, A.R. (2007b). Operation and function of the tricarboxylic acid cycle in the illuminated leaf. Physiol. Plant. **129**: 45–56.

Ohsugi, R. and Murata, T. (1980). Leaf anatomy, post-illumination CO2 burst and NAD-malic enzyme activity of Panicum dichotomiflorum. Plant Cell Physiol. **21**: 1329–1333.

Osmond, C.B. and Grace, S.C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? J. Exp. Bot. **46**: 1351–1362.

Padmasree, K., Padmavathi, L., and Raghavendra, A.S. (2002). Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.

Palmer, J.M. and Wedding, R.T. (1966). Purification and properties of succinyl-CoA synthetase from Jerusalem artichoke mitochondria. Biochim. Biophys. Acta - Enzymol. Biol. Oxid. **113**: 167–174.

Palmieri, F., Pierri, C.L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A.R. (2011). Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. Plant J. **66**: 161–81.

Parry, M. and Reynolds, M. (2011). Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. J. Exp. Bot. **62**: 453–67.

Parry, M.A.J. (2003). Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. J. Exp. Bot. **54**: 1321–1333.

Peisker, M. (1976). Ein Modell der Sauerstoffabhängigkeit des photosynthetischen CO2-Gaswechsels von C3-Pflanzen. Die Kult. **24**: 221–235.

Pick, T. and Bräutigam, A. (2013). PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. Proc. … **110**: 3185–90.

Plaxton, W.C. and Podestá, F.E. (2006). The Functional Organization and Control of Plant Respiration. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. **25**: 159–198.

Portis, A.R. and Parry, M.A.J. (2007). Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. Photosynth. Res. **94**: 121–43.

Pracharoenwattana, I., Zhou, W., Keech, O., Francisco, P.B., Udomchalothorn, T., Tschoep, H., Stitt, M., Gibon, Y., and Smith, S.M. (2010). Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. Plant J. **62**: 785–95.

Price, D.C. *et al.* (2012). Cyanophora paradoxa Genome Elucidates Origin of Photosynthesis in Algae and Plants. Science (80). **335**: 843–847.

Price, G.D. (2011). Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO2 concentrating mechanism. Photosynth. Res. **109**: 47–57.

Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J., and Long, B.M. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO2-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. J. Exp. Bot. **59**: 1441–61.

Price J., Laxmi A., St Martin S.K., Jang J.C. (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. Plant Cell. **16**: 2128–2150.

Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoeberichts, F.A., Vandorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F., and 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 cel. Plant J. **52**: 640–57.

Quirino, B. F., Noh, Y.-S., Himelblau, E. und Amasino, R. M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. Trends in Plant Science. **5**: 278-282.

Ranson, S.L. and Thomas, M. (1960). Crassulacean Acid Metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. **11**: 81–110.

Raven, J. a, Cockell, C.S., and De La Rocha, C.L. (2008). The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **363**: 2641–50.

Reinhold, T., Alawady, A., Grimm, B., Beran, K.C., Jahns, P., Conrath, U., Bauer, J., Reiser, J., Melzer, M., Jeblick, W., and Neuhaus, H.E. (2007). Limitation of nocturnal import of ATP into Arabidopsis chloroplasts leads to photooxidative damage. Plant J. **50**: 293–304.

Renné, P., Dreßen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Flügge, U.-I., Westhoff, P., and Weber, A.P.M. (2003). The Arabidopsis mutant dct is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. Plant J. **35**: 316–331.

Reyes-Prieto, A., Weber, A.P.M., and Bhattacharya, D. (2007). The origin and establishment of the plastid in algae and plants. Annu. Rev. Genet. **41**: 147–68.

Rhoads, D.M. and Subbaiah, C.C. (2007). Mitochondrial retrograde regulation in plants. Mitochondrion **7**: 177–94.

Sage, R. (2004). The evolution of C4 photosynthesis. New Phytol.: 341–370.

Sage, R.F., Sage, T.L., and Kocacinar, F. (2012). Photorespiration and the Evolution of C4 Photosynthesis.

Saigo, M., Tronconi, M., and Wheeler, M. (2013). Biochemical approaches to C4 photosynthesis evolution studies: the case of malic enzymes decarboxylases. Photosynth. Res.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., and Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. **239**: 487–491.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. **230**: 1350–1354.

Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. Physiol. Plant. **120**: 21–26.

Scheibe, R. (1991). Redox-Modulation of Chloroplast Enzymes : A Common Principle for Individual Control. Plant Physiol. **96**: 1–3.

Scheibe, R., Backhausen, J.E., Emmerlich, V., and Holtgrefe, S. (2005). Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. J. Exp. Bot. **56**: 1481–9.

Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. **10**: 51–62.

Schwarte, S. and Bauwe, H. (2007). Identification of the photorespiratory 2-phosphoglycolate phosphatase, PGLP1, in Arabidopsis. Plant Physiol. **144**: 1580–1586.

Seneweera, S., Makino, A., Hirotsu, N., Norton, R., and Suzuki, Y. (2011). New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO2: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. Environ. Exp. Bot. **71**: 128–136.

Seneweera, S.P. and Conroy, J.P. (2005). Enhanced leaf elongation rates of wheat at elevated CO2: is it related to carbon and nitrogen dynamics within the growing leaf blade? Environ. Exp. Bot. **54**: 174–181.

Shao, M., Zheng, H., Hu, Y., Liu, D., Jang, J.-C., Ma, H., and Huang, H. (2004). The GAOLAOZHUANGREN1 gene encodes a putative glycosyltransferase that is critical

for normal development and carbohydrate metabolism. Plant Cell Physiol. **45**: 1453–60.

Sharkey, T.D. (1988). Estimating the Rate of Photorespiration in Leaves. Physiol. Plant. **73**: 146–152.

Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, G.D., and Singsaas, E.L. (2007). Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C(3) leaves. Plant. Cell Environ. **30**: 1035–40.

Sharkey, T.D., Stitt, M., Heineke, D., Gerhardt, R., Raschke, K., and Heldt, H.W. (1986). Limitation of Photosynthesis by Carbon Metabolism : II. O2-Insensitive CO2 Uptake Results from Limitation Of Triose Phosphate Utilization. Plant Physiol. **81**: 1123–1129.

Sheehy, J., Ferrer, A., Mitchell, P., Elmido-Mabilangan, A., Pablico, P., and Dionora, M. (2007). How the rice crop works and why it needs a new engine. In Charting New Pathways to C4 Rice, pp. 3–26.

Somerville, C.R. (2001). An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. Plant Physiol. **125**: 20–4.

Somerville, C.R. and Ogren, W.L. (1979). A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of Arabidopsis. Nature **280**: 833–836.

Somerville, C.R. and Ogren, W.L. (1981). Photorespiration-deficient Mutants of Arabidopsis thaliana Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity. Plant Physiol. **67**: 666–671.

Stabel R. (2012). Etablierung eines Glykolat-Abbauweges in Chloroplasten von *A. thaliana*. Botanisches Institut, Heinrich- Heine Universität Düsseldorf.

Stitt, M., Lilley, R.M., Gerhardt, R., and Heldt, H.W. (1989). [32] Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. Methods Enzymol. **174**: 518–552.

Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R., Heldt, H. W., Fleischer S. Becca, F. (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. Methods in Enzymology, Academic Press. **174:** 518-552.

Studart-Guimarães, C., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B., and Fernie, A.R. (2007). Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. Plant Physiol. **145**: 626–39.

Sweetlove, L.J., Beard, K.F.M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., and Ratcliffe, R.G. (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. Trends Plant Sci. **15**: 462–70.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2006). Plant Physiology.

Tanaka, R. and Tanaka, A. (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. Annu. Rev. Plant Biol. **58**: 321–46.

Taniguchi, M. (2002). Identifying and Characterizing Plastidic 2-Oxoglutarate/Malate and Dicarboxylate Transporters in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. **43**: 706–717.

Tian, B., Wang, Y., Zhu, Y., Lu, X., Huang, K., Shao, N., and Beck, C.F. (2006). Synthesis of the photorespiratory key enzyme serine: glyoxylate aminotransferase in C. reinhardtii is modulated by the light regime and cytokinin. Physiol. Plant. **127**: 571–582.

Timm, S. and Bauwe, H. (2013). The variety of photorespiratory phenotypes - employing the current status for future research directions on photorespiration. Plant Biol. (Stuttg). **15**: 737–47.

Timm, S., Nunes-Nesi, A., Pärnik, T., Morgenthal, K., Wienkoop, S., Keerberg, O., Weckwerth, W., Kleczkowski, L.A., Fernie, A.R., and Bauwe, H. (2008). A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in Arabidopsis. Plant Cell **20**: 2848–2859.

Ting, I.P. (1985). Crassulacean Acid Metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. **36**: 81–110.

Tolbert, N. (1997). The C2 oxidative photosynthetic carbon cycle. Annu. Rev. Plant Biol.: 1–25.

Tolbert, N.E., Benker, C., and Beck, E. (1995). The oxygen and carbon dioxide compensation points of C3 plants: possible role in regulating atmospheric oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92**: 11230–3.

Tomaz, T., Bagard, M., Pracharoenwattana, I., Lindén, P., Lee, C.P., Carroll, A.J., Ströher, E., Smith, S.M., Gardeström, P., and Millar, a H. (2010). Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in Arabidopsis. Plant Physiol. **154**: 1143–57.

Tovar-Mendez, A., Miernyk, J. a., and Randall, D.D. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. Eur. J. Biochem. **270**: 1043–1049.

Tronconi, M. a, Fahnenstich, H., Gerrard Weehler, M.C., Andreo, C.S., Flügge, U.-I., Drincovich, M.F., and Maurino, V.G. (2008). Arabidopsis NAD-malic enzyme functions as a homodimer and heterodimer and has a major impact on nocturnal metabolism. Plant Physiol. **146**: 1540–52.

Tronconi, M. a, Maurino, V.G., Andreo, C.S., and Drincovich, M.F. (2010). Three different and tissue-specific NAD-malic enzymes generated by alternative subunit association in Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. **285**: 11870–9.

Turgeon, R. (1989). The Sink-Source Transition in Leaves. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**: 119–138.

UN (2013). World population projected to reach 9.6 billion by 2050.UN report. June 16, 2013.

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. **1**: 55-62.

Voll, L.M., Jamai, A., Renné, P., Voll, H., McClung, C.R., and Weber, A.P.M. (2006). The photorespiratory Arabidopsis shm1 mutant is deficient in SHM1. Plant Physiol. **140**: 59–66.

Weber, A., Menzlaff, E., Arbinger, B., Gutensohn, M., Eckerskorn, C., and Fluegge, 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**: 2621–2627.

Weber, K. and Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations Sulf ate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis * by Dodecyl. J. Biol. Chem. **244**: 4406–4412.

Welthungerindex (2012). Herausforderung Hunger: Ernährung sichern, wenn Land,

Wasser und Energie knapp werden.

Wheeler, M. and Tronconi, M. (2005). A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of Arabidopsis. Plant … **139**: 39–51.

Whitney, S., Houtz, R., and Alonso, H. (2011). Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO2-sequestering enzyme, Rubisco. Plant Physiol. **155**: 27–35.

Wingler, a, Lea, P.J., Quick, W.P., and Leegood, R.C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **355**: 1517–29.

Wingler, a, Walker, R., Chen, Z., and Leegood, R. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the decarboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. Plant Physiol. **120**: 539–46.

Winning, B., Bourguignon, J., and Leaver, C. (1994). Plant mitochondrial NAD+-dependent malic enzyme. cDNA cloning, deduced primary structure of the 59- and 62-kDa subunits, import, gene complexity and expression analysis. J. Biol. Chem. **269**: 4780–4786.

Zarzycki, T., Ponce Dentinho, T., Kaiser, M., Edwards-Jones, G., Ressurreição, A., Santos, R., and Gibbons, J. (2012). Towards an ecosystem approach for understanding public values concerning marine biodiversity loss. Mar. Ecol. Prog. Ser. **467**: 15–28.

Zeeman, S.C., Kossmann, J., and Smith, A.M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. Annu. Rev. Plant Biol. **61**: 209–34.

Zelitch, I., Schultes, N.P., Peterson, R.B., Brown, P., and Brutnell, T.P. (2009). High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. Plant Physiol. **149**: 195–204.

Zell, M.B., Fahnenstich, H., Maier, A., Saigo, M., Voznesenskaya, E. V, Edwards, G.E., Andreo, C., Schleifenbaum, F., Zell, C., Drincovich, M.F., and Maurino, V.G. (2010). Analysis of Arabidopsis with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. Plant Physiol. **152**: 1251–62.

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Alexandra Maier

9. Formalia und Danksagung

9.1 Publikationen und Teilpublikationen

Zell, M.B., Fahnenstich, H., Maier, A., Saigo, M., Voznesenskaya, E. V, Edwards, G.E., Andreo, C., Schleifenbaum, F., Zell, C., Drincovich, M.F., and Maurino, V.G. (2010). Analysis of Arabidopsis with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. Plant Physiol. **152**: 1251–62.

Maier, A., Zell, M.B., and Maurino, V.G. (2011). Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C(4) and C(3) photosynthesis. J. Exp. Bot. **62**: 3061–9.

Maier, A., Fahnenstich, H., von Caemmerer, S., Engqvist, M.K.M., Weber, A.P.M., Flügge, U.-I., and Maurino, V.G. (2012). Transgenic Introduction of a Glycolate Oxidative Cycle into A. thaliana Chloroplasts Leads to Growth Improvement. Front. Plant Sci. **3**: 38.

9.2 Danksagung

Ich danke…

Frau PD Dr. Veronica G. Maurino für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit, für Ihr Vertrauen und all Ihre Unterstützung in den letzten Jahren, sowie für die zahlreichen, spannenden Möglichkeiten Kongresse und unsere Kooperationspartner zu besuchen.

Herrn Prof. Dr. Andreas P.M Weber für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens, sowie für die wisseschaftliche Diskussionsbereitschaft und vor allem für die Integration unserer Arbeitsgruppe in sein Labor.

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge für die Unterstützung, Förderung und Diskussionsbereitschaft während der letzten Jahre.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Maurino, Flügge und Weber für die freundliche Zusammenarbeit.
Ganz besonderer Dank gilt hier Annemarie, Dorien, Judith, Nils, Kirsten, Anke, Jessica, Holger, Martin, die von Anfang an fröhlich und unterstützend an meiner Seite standen.

Alexandra Florian, Marc Scheuer, Katrin Weber, Stefanie Schulze, Dr. Markus Gierth und der AG Jahns für sehr freundliche und kompetente technische Hilfe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Alexandra Maier
Geburtsdatum:	15.12.1982
Geburtsort:	Leverkusen, Deutschland
Familienstand:	Ledig
Anschrift:	Am Knechtsgraben 4 51379 Leverkusen

Promotion

seit 11/ 2008 — Promotionsstudentin am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie in der Arbeitsgruppe Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, der Universität Düsseldorf. Betreuung: PD Dr. Veronica Maurino. Thema der Promotion: "Analyse und Anwendung von natürlichen und artifiziellen Stoffwechselwegen zur Verbesserung der photosynthetischen Effizienz".

Studium

10/ 2006- 10/ 2008 — Studium zum Master of Science in Biology, Universität zu Köln.
Gesamtnote: 1,8
Master-Thesis verfasst bei BayerCrop Science, Research & Development Fungicides, Monheim. Thema: "Regulation of deoxynivalenol biosynthesis in *Fusarium graminearum*".

10/ 2003- 10/ 2006 — Studium zum Bachelor of Science in Biology, Universität zu Köln.
Gesamtnote: 2,6
Bachelor-Thesis verfasst am Lehrstuhl II des Botanischen Instituts der Universität zu Köln. Betreuung: PD Dr. Veronica Maurino/ Prof. U.I. Flügge. Thema: "Ein neuer Ansatz zur Reduzierung photorespiratorischer Verluste: Physiologische Charakterisierung von Arabidopsis thaliana- Linien, die einen neuen Stoffwechselweg zur Reduzierung von Glykolat im Chloroplasten exprimieren".