

# **“Optimierung der Photosynthese von C<sub>3</sub>-Pflanzen: C<sub>4</sub>-ähnlicher Zyklus und chloroplastidärer Bypass“**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Master of Science  
Matthias Buntru

aus Überlingen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2012

Berichter:    Universitätsprofessor Dr.rer.nat. Björn Usadel  
                  Universitätsprofessor Dr.rer.nat. Christoph Peterhänsel  
                  Universitätsprofessor em. Dr.rer.nat. Fritz Kreuzaler

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Photosynthese .....	3
1.1.1 C <sub>3</sub> -Photosynthese .....	5
1.1.2 Photorespiration .....	6
1.1.3 C <sub>4</sub> -Photosynthese .....	10
1.1.4 „Single Cell“-C <sub>4</sub> -Photosynthese .....	13
1.1.5 CAM-Photosynthese .....	15
1.1.6 Ansätze zur Verbesserung der Photosynthese in C <sub>3</sub> -Pflanzen .....	17
1.2 Ziel der Arbeit .....	26
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1 Material .....	28
2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.2 Apparaturen, Geräte und Zubehör .....	28
2.1.3 Lösungen, Puffer und Medien .....	30
2.1.4 Größenstandards für Gelelektrophorese .....	30
2.1.5 Verwendete Reaktionskits .....	30
2.1.6 Enzyme .....	31
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide .....	32
2.1.8 Verwendete Plasmide .....	35
2.1.9 Pflanzenmaterial und Anzucht .....	55
2.1.10 Bakterienkulturen .....	56
2.1.11 Verwendete Internetdatenbanken und Computerprogramme .....	58
2.2 Methoden .....	59
2.2.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	59
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	61
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	62
2.2.4 cDNA-Synthese .....	64
2.2.5 Real-Time-PCR .....	65

2.2.6 Sequenzierung .....	65
2.2.7 Restriktion von DNA .....	65
2.2.8 Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden .....	66
2.2.9 „Blunting“ von DNA mit 5'- oder 3'-überhängenden Enden .....	67
2.2.10 Ligations-Reaktion .....	67
2.2.11 TOPO TA <sup>®</sup> Klonierung .....	68
2.2.12 Gateway Klonierung .....	68
2.2.13 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	69
2.2.14 Präparation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	69
2.2.15 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	69
2.2.16 Präparation elektrokompenter Agrobakterien .....	70
2.2.17 Transformation elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen .....	70
2.2.18 Stabile Transformation von <i>N. tabacum</i> .....	70
2.2.19 Transiente Transformation von <i>N. tabacum</i> .....	72
2.2.20 Transiente Transformation mittels Partikelkanone .....	73
2.2.21 Protein-Lokalisationsanalysen .....	74
2.2.22 Isolation von Protoplasten .....	74
2.2.23 In vitro Translation und in vitro Import .....	75
2.2.24 Analyse von Metaboliten .....	76
2.2.25 Enzymatische Nachweise von Metaboliten .....	77
2.2.26 Metabolitmessung per LC-MS .....	82
2.2.27 Elementar-Analyse .....	82
2.2.28 Bestimmung des <sup>13</sup> C zu <sup>12</sup> C-Verhältnisses .....	83
2.2.29 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	83
2.2.30 Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	84
2.2.31 Bestimmung chloroplastidärer Pigmente .....	91
2.2.32 Ammonia Release Assay .....	92
2.2.33 Messung photosynthetischer Parameter .....	93
2.2.34 Pflanzenanzucht unter erniedrigten CO <sub>2</sub> -Bedingungen .....	94
2.2.35 Bestimmung der Blattfläche .....	95
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>96</b>
3.1 Etablierung des MultiRound-Gateways-Systems .....	97

3.1.1 Konstruktion der Entry-Vektoren.....	98
3.1.2 Konstruktion der Destination-Vektoren .....	99
3.1.3 MultiRound-Gateway-Rekombination .....	100
3.2 Putativer C <sub>4</sub> -Zyklus in <i>N. tabacum</i> .....	102
3.2.1 Oac1-Lokalisationsanalyse.....	104
3.2.2 Konstruktion der Gateway-Plasmide .....	108
3.2.3 Transformation der Destination-Plasmide in Agrobakterien .....	114
3.2.4 Transiente Expression der C <sub>4</sub> -Gene in Tabak .....	116
3.2.5 Stabile Expression der C <sub>4</sub> -Gene in Tabak (T <sub>0</sub> -Generation).....	119
3.2.6 Bestimmung der C <sub>4</sub> -Enzymaktivitäten in Tabak (T <sub>0</sub> -Generation) .....	122
3.2.7 Expression der C <sub>4</sub> -Gene in Tabak (T <sub>1</sub> -Generation).....	125
3.2.8 Bestimmung der C <sub>4</sub> -Enzymaktivitäten in Tabak (T <sub>1</sub> -Generation) .....	127
3.2.9 Phänotypische Effekte der Transgenexpression.....	130
3.2.10 Auswirkungen der Transgenexpression auf die Expression von Endogenen .....	132
3.2.11 Elementar-Analyse .....	135
3.2.12 Kohlenstoff-Isotopen-Verhältnis.....	138
3.2.13 Bestimmung chloroplastidärer Pigmente .....	139
3.2.14 Bestimmung von Trockensubstanz und Wassergehalt.....	140
3.2.15 Bestimmung der Ammoniak-Freisetzung durch Photorespiration.....	141
3.2.16 Bestimmung des apparenten CO <sub>2</sub> -Kompensationspunktes .....	143
3.2.17 Bestimmung der O <sub>2</sub> -Inhibierung .....	144
3.2.18 Wachstum unter niedrigen CO <sub>2</sub> -Konzentrationen.....	145
3.2.19 Veränderungen im Metabolismus .....	147
3.2.20 Erhöhung der PEPC-Aktivität.....	152
3.3 Transgener chloroplastidärer photorespiratorischer Bypass .....	154
3.3.1 Test der Promotoren und Transitpeptide aus <i>Z. mays</i> .....	155
3.3.2 Konstruktion des Destination-Plasmids .....	157
3.3.3 Stabile Expression der GT-DEF-Gene in Reis.....	159
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>161</b>
4.1 Einbringen multipler Gene in Pflanzen .....	161
4.2 Design der MultiRound-Gateway-Vektoren bzw. der Multigen-Konstrukte.....	166
4.2.1 Entry- und Destinationvektoren .....	166

4.2.2	Verwendete Promotoren und Anordnung der Expressionskassetten .....	168
4.3	C <sub>4</sub> -ähnlicher Zyklus in C <sub>3</sub> -Pflanzen .....	170
4.3.1	Die Bifunktionalität der RUBISCO .....	170
4.3.2	Wahl der Enzyme und Transporter für Etablierung eines C <sub>4</sub> -ähnlichen Zyklus in Tabak .....	173
4.3.3	Chloroplastidäre Lokalisation der C <sub>4</sub> -Enzyme .....	184
4.3.4	CO <sub>2</sub> -Konzentrierung durch die putativen C <sub>4</sub> -Zyklen? .....	185
4.3.5	Auswirkungen der erhöhten C <sub>4</sub> -Enzymaktivitäten .....	189
4.3.6	Ausblick .....	194
<b>5</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>196</b>
5.1	Abbildungsverzeichnis .....	196
5.2	Tabellenverzeichnis .....	197
5.3	Formelverzeichnis .....	199
5.4	Abkürzungsverzeichnis .....	200
5.5	Literaturverzeichnis .....	204
5.6	Lebenslauf .....	237
5.7	Danksagung .....	238
5.8	Erklärung .....	239

## Zusammenfassung

Die meisten agronomischen Eigenschaften in der Natur sind polygen und beruhen auf komplexen metabolischen und regulatorischen Wegen. Eine gentechnische Veränderung dieser Merkmale oder das Einbringen neuer Wege erfordern die Übertragung multipler Gene ins pflanzliche Genom. Die hierfür bisher meist verwendeten Strategien wie Retransformation, Cotransformation und Kreuzung leiden alle unter gewissen Mängeln wie hohem Zeitaufwand oder der Integration multipler Kopien (Dafny-Yelin und Tzfira, 2007; Naqvi *et al.*, 2010). Die Übertragung der Gene als ein einzelnes Multigenkonstrukt bietet hier deutliche Vorteile. Bisher existieren allerdings nur wenige effektive Methoden, mit denen sich effektiv solche Multigen-Konstrukte herstellen und anschließend in Pflanzen übertragen lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Gateway-basierte Methode etabliert werden, welche die Fusion multipler Fragmente erlaubt. Das System besteht aus einem Gateway-kompatiblen Destination-Vektor und zwei speziellen Entry-Vektoren mit attR-Kassetten, welche von hierzu inkompatiblen attL-Sequenzen flankiert werden. Durch abwechselnde Verwendung der beiden Entry-Vektoren können in mehreren LR-Reaktionen multiple Transgene in den Destination-Vektor rekombiniert werden. Konstrukte mit 7 Genexpressionskassetten konnten erfolgreich mittels Agrobakterien in Tabak transformiert werden. Per biolistischer Transformation wurde ein Konstrukt mit 5 Genexpressionskassetten in Reis eingebracht.

Auf Grund der Bifunktionalität der RUBISCO, dem Schlüsselenzym der Photosynthese, wird in den Chloroplasten höherer Pflanzen neben der Carboxylierung auch die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat katalysiert (Bowes *et al.*, 1971). Das dabei gebildete toxische Glykolat ist für die Pflanze unverwertbar (Zelitch *et al.*, 2008) und muss in der Photorespiration metabolisiert werden. Die Umsetzung des Glykolats verbraucht nicht nur ATP und Reduktionsäquivalente, sondern führt auch zu einem Verlust von 25% des in diesem Metabolit fixierten Kohlenstoffs. Für C<sub>3</sub>-Pflanzen bedeutet die Photorespiration eine wesentliche Verminderung der Photosyntheseeffizienz. Hingegen können C<sub>4</sub>-Pflanzen durch ihren CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus die Oxygenase-Aktivität der RUBISCO stark reduzieren.

Unter Verwendung der MultiRound-Gateway-Technologie konnten Tabakpflanzen erzeugt werden, welche die heterologen Enzyme für einen „Single Cell“-C<sub>4</sub>-Zyklus

nach dem Vorbild von *Hydrilla verticillata* exprimierten. Neben einem C<sub>4</sub>-Zyklus vom NADP-ME-Typ, wurden ein NAD-ME- sowie ein PCK-Typ konstruiert. Es konnten jedoch keine Belege für eine CO<sub>2</sub>-Konzentrierung innerhalb der Chloroplasten gefunden werden. Die heterologe Expression der beiden Malatenzyme (NADP-HvMe und NAD-EcMe) wirkte sich stark auf das Wachstum aus. Je höher die ME-Aktivitäten waren, umso langsamer wuchsen die Pflanzen. Allen Typen gemein war ein höherer Stickstoffgehalt, welcher in einem niedrigeren C/N-Verhältnis resultierte.

Ebenfalls mit Hilfe der MultiRound-Gatewaytechnologie konnten Reispflanzen mit einem photorespiratorischen Bypass erzeugt werden. Der Bypass beruht auf dem katabolischen Glykolat-Stoffwechselweg aus *E. coli* und sorgt für eine Umsetzung des Glykolats in den Chloroplasten. Dadurch soll die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Nähe von RUBISCO erhöht und die Photorespiration folglich unterdrückt werden. In *Arabidopsis* führte dies zu vielversprechenden Ergebnissen (Kebeish *et al.*, 2007). Die Expression aller hierfür benötigten Gene (*TSR*, *GCL*, *glcD*, *glcE*, *glcF*) konnte auf RNA-Ebene nachgewiesen werden.

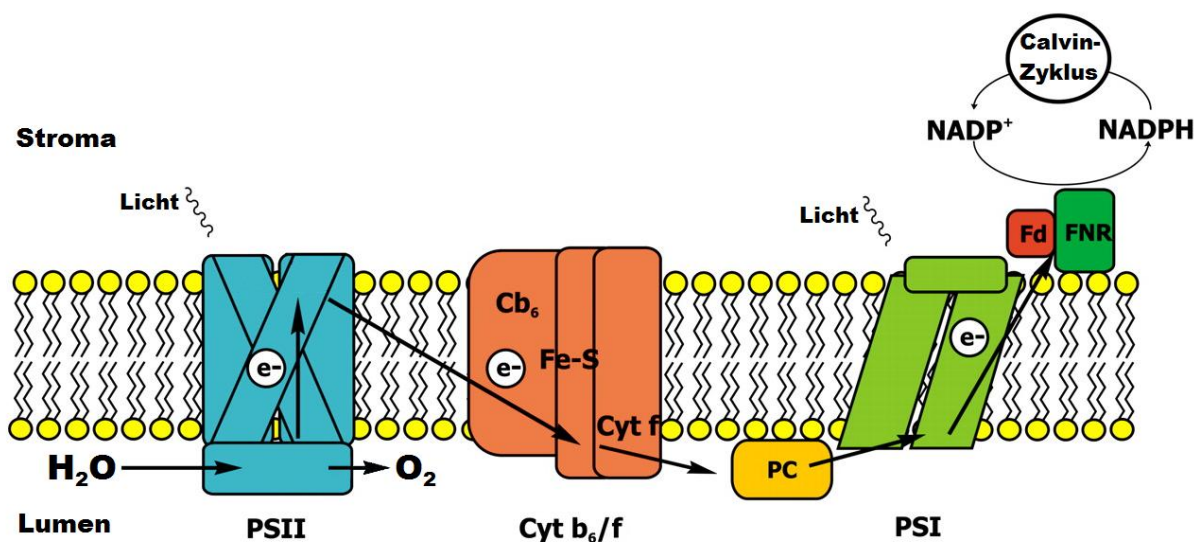
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die MultiRound-Gatewaytechnologie sehr gut zur Herstellung von Multigenkonstrukten eignet und der konstruierte Destinationvektor sowohl durch Agrobakterien als auch biolistisch effizient in Pflanzen übertragen werden kann. Die erzeugten Tabakpflanzen können als Ausgangsbasis für die weiteren Versuche zur Etablierung eines „Single Cell“-C<sub>4</sub>-Zyklus dienen. Bei einem besser aufeinander abgestimmten Verhältnis der Enzymaktivitäten könnten möglicherweise die negativen Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum, die durch hohe ME-Aktivitäten auftraten, vermieden werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Photosynthese

Photosynthetische Organismen verwenden Licht-Energie, um energiereiche organische Moleküle zu produzieren. Da diese Moleküle die Energie und Bausteine sowohl für nicht-photosynthetische als auch für photosynthetische Organismen zur Verfügung stellen, hängt praktisch alles Leben auf der Erde von Photosynthese ab. Pflanzen, Algen und viele photosynthetische Bakterien wandeln Kohlenstoffdioxid und Wasser zu Kohlenhydraten um und setzen dabei molekularen Sauerstoff frei. Dieser wird sowohl von Pflanzen als auch von Tieren zur aeroben Atmung verwendet. Während Sauerstoff ständig durch Atmung und nicht-biologische Prozesse aus der Luft entfernt wird, ist Photosynthese der einzige Prozess, der Sauerstoff hinzufügt.

In höheren Pflanzen und Algen findet die Photosynthese in den Chloroplasten statt. Sie kann in zwei getrennte Reaktionsfolgen gegliedert werden: Die Lichtreaktionen, in denen Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt wird, und die Dunkelreaktionen, in denen diese chemische Energie verwendet wird, um Kohlenstoffdioxid zu organischen Verbindungen zu reduzieren. Die Lichtreaktionen finden an speziellen inneren Membranen der Chloroplasten, den Thylakoiden statt (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Thylakoidmembran in Chloroplasten**

Am Photosystem II (PSII) wird in einem als Photolyse bezeichneten Prozess Wasser gespalten. Die dabei freigesetzten Elektronen werden über mehrere membrangebundene Transporter schließlich durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR) auf NADP<sup>+</sup> übertragen. Der Elektronen-Akzeptor Ferredoxin am Photosystem I (PSI) dient dabei als starkes Reduktionsmittel. Das dabei gewonnene NADPH geht zur Synthese von Kohlenhydraten in Calvin-Zyklus ein. Die Pfeile kennzeichnen den Fluss der

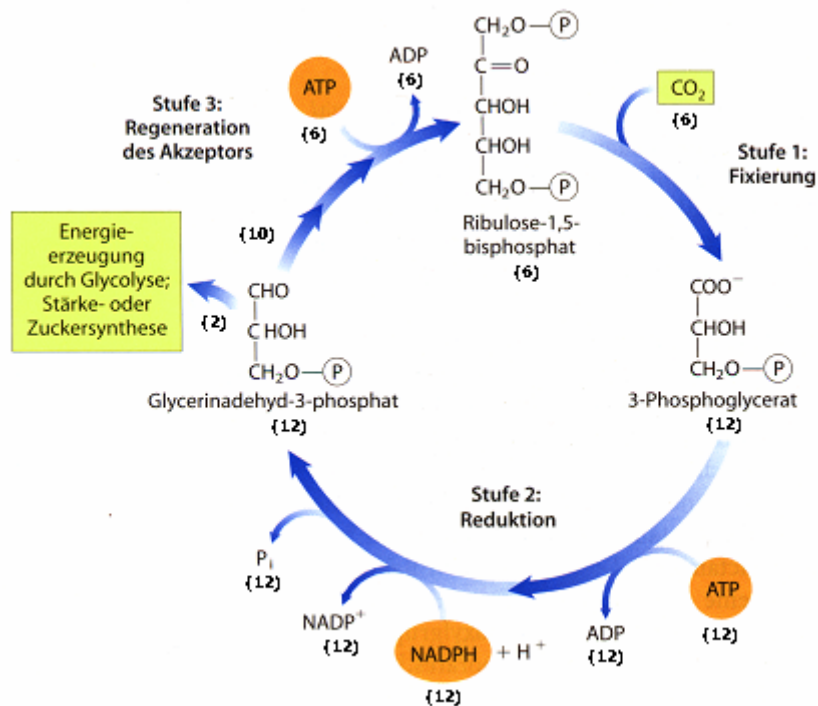


Elektronen. Fd: Ferredoxin; Cyt  $b_6/f$ : Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex; PC: Plastocyanin (verändert nach Rinalducci *et al.*, 2008).

Hier wird die Lichtenergie von zwei unterschiedlichen funktionellen Einheiten, dem Photosystem I (PSI) und dem Photosystem II (PSII) umgesetzt. Diese bestehen aus verschiedenen Chlorophyll-Protein-Komplexen, welche Licht unterschiedlicher Wellenlänge absorbieren. Während das Chlorophyll von PSI langwelliges Licht ( $>700$  nm) absorbiert, absorbiert das Chlorophyll von PSII kurzwelliges Licht ( $< 680$  nm). Die absorbierte Energie treibt die Übertragung der aus der Spaltung von Wasser stammenden Elektronen zwischen den membrangebundenen Transportern Plastochinon, Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex und Plastocyanin an, welche als Elektronendonatoren bzw. Elektronenakzeptoren wirken. Am Ende der Elektronentransportkette werden die Elektronen durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase auf  $\text{NADP}^+$  übertragen, welches dadurch zu NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) reduziert wird. Außerdem wird ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut, welcher über die ATP-Synthase für die Synthese von ATP (Adenosintriphosphat) aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt wird (Taiz und Zeiger, 2001). Diese chemische Energie wird in den Dunkelreaktionen, welche im Stroma der Chloroplasten ablaufen, zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung und Reduktion anorganischen Kohlenstoffs zur Synthese energiereicher organischer Kohlenstoffverbindungen genutzt (Lawlor, 2001). Für höhere Pflanzen sind drei biochemische Wege zur Primärfixierung des Kohlenstoffs bekannt: der  $\text{C}_3$ -, der  $\text{C}_4$ - und der CAM- (crassulacean acid metabolism) Weg. Gemeinsam ist diesen drei Typen die Assimilation von  $\text{CO}_2$  zu Kohlenhydraten über den Calvin-Zyklus (Taiz und Zeiger, 2001). Die Schlüsselrolle bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung spielt das Enzym Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RUBISCO, EC 4.1.1.39), welches den ersten Schritt der  $\text{CO}_2$ -Reduktion im Calvin-Zyklus katalysiert. Dabei reagiert ein Molekül  $\text{CO}_2$  mit der  $\text{C}_5$ -Verbindung Ribulose-1,5-Bisphosphat, wodurch ein instabiles  $\text{C}_6$ -Zwischenprodukt entsteht, das umgehend in zwei Moleküle der  $\text{C}_3$ -Verbindung 3-Phosphoglycerat (3-PGA) zerfällt. Im zweiten Schritt wird 3-PGA durch ATP, welches während den Lichtreaktionen gebildet wurde, zu 1,3-Bisphosphoglycerat phosphoryliert und anschließend zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) reduziert. G3P kann zur Energiegewinnung in der Glykolyse, zur Synthese von Kohlenhydraten oder zur Regeneration von Ribulose-1,5-Bisphosphat verwendet werden.

### 1.1.1 C<sub>3</sub>-Photosynthese

Die meisten Pflanzen, darunter viele Produzenten von Grundnahrungsmitteln wie Weizen, Kartoffeln und Reis assimilieren Kohlenstoff über den C<sub>3</sub>-Weg (Ku *et al.*, 1996). Da das erste Produkt der CO<sub>2</sub>-Fixierung, 3-Phosphoglycerat, eine Kohlenstoffverbindung mit drei C-Atomen ist, werden sie als C<sub>3</sub>-Pflanzen bezeichnet. Dieses wird durch die Carboxylase-Aktivität von RUBISCO im Calvin-Zyklus gebildet (Calvin, 1989), welcher sich aus insgesamt drei Teilreaktionen zusammensetzt, die in Abbildung 1.2 dargestellt sind.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung Calvin-Zyklus**

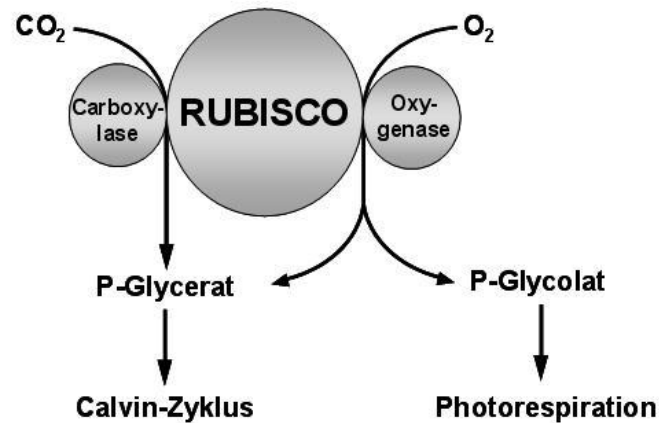
Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der jeweiligen Moleküle an. Zur Bildung von zwei Molekülen G3P müssen sechs Moleküle CO<sub>2</sub> fixiert werden. Dabei werden 18 Moleküle ATP und 12 Moleküle NADPH aus den Lichtreaktionen der Photosynthese verbraucht. Der Calvin-Zyklus lässt sich in drei Stufen einteilen: (1) Fixierung: Carboxylierung von RuBP durch RUBISCO und Hydrolyse des Produktes zu zwei Molekülen 3-PGA. (2) Reduktion: Phosphorylierung von 3-PGA zu 1,3-Diphosphoglycerat und Reduzierung zu G3P. (3) Regeneration des Akzeptors: 10 Moleküle G3P werden in mehreren Reaktionsschritten zu 6 Molekülen Ribulose-5-Phosphat umgewandelt, welches unter weiterem ATP-Verbrauch zu RuBP phosphoryliert wird. 2 Moleküle G3P werden zur Energieerzeugung durch Glykolyse oder zur Stärke- und Zucker-Synthese verwendet. (Die Abbildung wurde verändert nach Lehninger Biochemie, 3. Auflage 2001)

### 1.1.2 Photorespiration

Das für die CO<sub>2</sub>-Fixierung verantwortliche Enzym RUBISCO besitzt neben der Carboxylase- auch eine Oxygenase-Aktivität (Abbildung 1.3) (Bowes *et al.*, 1971; Portis und Parry, 2007). Zwar bevorzugt RUBISCO CO<sub>2</sub> gegenüber O<sub>2</sub>, da aber die Konzentration von O<sub>2</sub> in der Atmosphäre viel höher ist als die von CO<sub>2</sub>, wird unter Standardbedingungen ein Molekül O<sub>2</sub> pro drei Molekülen CO<sub>2</sub> fixiert (Sharkey *et al.*, 2001). Durch Oxygenierung von RuBP entsteht neben Phosphoglycerat das für die Pflanze toxische Phosphoglykolat, welches im Rahmen der Photorespiration metabolisiert werden muss (Tolbert, 1997; Sharkey, 2001) (Abbildung 1.4). Dieser Prozess ist jedoch energieaufwändig und bedingt den Verlust von reduziertem Kohlenstoff in Form von CO<sub>2</sub>. Folglich hemmt die Photorespiration die Photosynthese durch drei Mechanismen: sie beeinträchtigt die CO<sub>2</sub>-Fixierung durch RUBISCO, verbraucht Energie, welche sonst für die photosynthetische Kohlenstoff-Reduktion verwendet werden könnte und führt zur Freisetzung von CO<sub>2</sub> aus zuvor fixiertem Kohlenstoff (Sharkey, 1988).

Bei großer Hitze und Trockenheit tritt der Effekt der Photorespiration verstärkt auf, was hauptsächlich auf drei Gründe zurückzuführen ist:

1. Die Spezifität der RUBISCO für CO<sub>2</sub> relativ zu O<sub>2</sub> nimmt mit steigender Temperatur ab (Ku and Edwards, 1977a; Jordan and Ogren, 1984; Brooks and Farquhar, 1985).
2. Die Löslichkeit von CO<sub>2</sub> nimmt mit steigender Temperatur stärker ab als die von O<sub>2</sub> (Ku und Edwards, 1977b).
3. Bei limitierter Wasserversorgung schließen Pflanzen ihre Stomata, um ein Austrocknen durch zu hohen Wasserverlust zu verhindern. Aufgrund des fehlenden Gasaustausches nimmt die CO<sub>2</sub>-Konzentration um die RUBISCO herum schnell ab während O<sub>2</sub> im Überschuss vorhanden ist (Lawlor and Fock, 1977; Cornic and Briantais, 1991). Dies begünstigt die Oxygenase- gegenüber der Carboxylase-Reaktion.

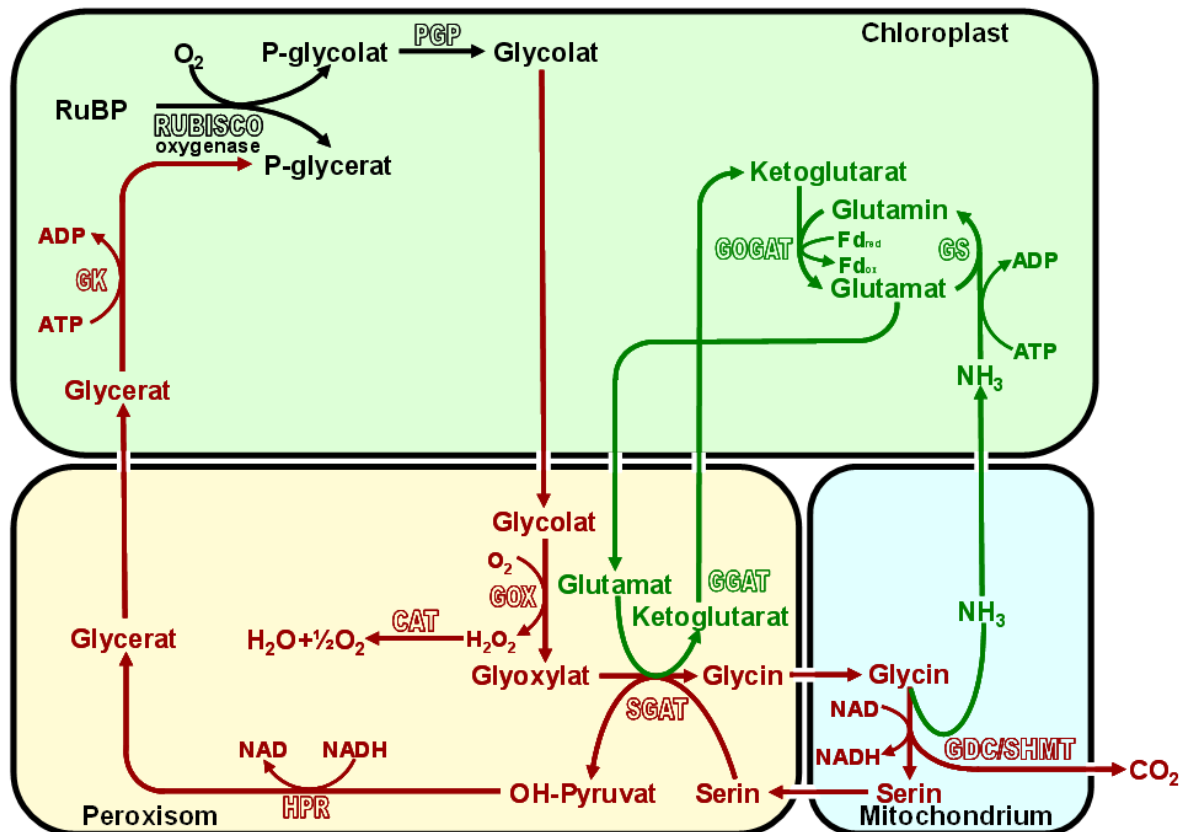


**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Doppelfunktion von RUBISCO**

RUBISCO besitzt neben Carboxylase- auch Oxygenase-Aktivität. Im Falle der Reaktion von Ribulose-1,5-Bisphosphat mit  $\text{CO}_2$  entstehen zwei Moleküle Phosphoglycerat, die im Calvin-Zyklus zu Kohlenhydraten umgesetzt werden. Wenn stattdessen  $\text{O}_2$  fixiert wird, entsteht nur ein Molekül Phosphoglycerat und ein Molekül Phosphoglycolat, welches im Rahmen der Photorespiration metabolisiert wird. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Christoph Peterhänsel zur Verfügung gestellt)

### 1.1.2.1 Der Photorespirations-Weg in $\text{C}_3$ -Pflanzen

Die Photorespiration findet in höheren Pflanzen in drei Zellorganellen statt: den Chloroplasten, den Peroxisomen und den Mitochondrien. Dabei wird aus zwei Molekülen Phosphoglycolat ein Molekül Phosphoglycerat regeneriert, welches dann in den Calvin-Zyklus eingeht (Abbildung 1.4) (Übersicht siehe Foyer *et al.*, 2009; Bauwe *et al.* 2010, Peterhänsel und Maurino, 2010).



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Photorespiration in C<sub>3</sub>-Pflanzen**

RUBISCO besitzt neben der Carboxylase- auch Oxygenase-Aktivität. Die Oxygenierung von Ribulose-1,5-Bisphosphat führt zu einem Molekül 3-Phosphoglycerat (P-Glycerat), welches in den Calvin Zyklus eingeht, und einem Molekül 2-Phosphoglykolat (P-Glykolat), das im Rahmen der Photorespiration zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt wird. Aus zwei Molekülen P-Glykolat wird in einer Reihe von Reaktionen, welche in den drei Zellorganellen Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien ablaufen, ein Molekül P-Glycerat regeneriert. Dabei werden CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> freigesetzt. Während das CO<sub>2</sub> in die Atmosphäre verloren geht, kann NH<sub>3</sub> in den Chloroplasten refixiert werden.

**RUBISCO:** Ribulose-1,5-Bisphosphate-Carboxylase/Oxygenase; **PGP:** Phosphoglykolat-Phosphatase; **GOX:** Glykolat-Oxidase; **CAT:** Katalase; **SGAT:** Serin:Glyoxylat-Aminotransferase; **GGAT:** Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase; **GDC:** Glycin-Decarboxylase; **SHMT:** Serin-Hydroxymethyl-Transferase; **HPR:** Hydroxypyruvat-Reduktase; **GK:** Glycerat-Kinase; **GS:** Glutamin-Synthetase; **GOGAT:** Glutamat-Synthase. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Christoph Peterhänsel zur Verfügung gestellt)

Noch in den Chloroplasten wird das durch die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat entstandene Phosphoglykolat durch die Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP) zu Glykolat dephosphoryliert (Lawlor, 2001). Dieses wird dann in die Peroxisomen transportiert und durch die Glykolat-Oxidase (GOX) zu Glyoxylat oxidiert. Dabei entsteht das Zellgift Wasserstoffperoxid, welches unmittelbar nach seiner Entstehung durch das Enzym Katalase (CAT) zerlegt wird. Das gebildete Glyoxylat wird dann durch zwei simultane Reaktionen, welche im Verhältnis 1:1 ablaufen, zur Aminosäure Glycin umgesetzt (Heldt, 1997). Zum einen katalysiert das Enzym Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase (GGAT) den Transfer einer Aminogruppe von Glu-

tamat auf Glyoxylat, zum anderen ist auch eine Transaminierung durch eine Serin:Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT) möglich. Das Glycin gelangt in die Mitochondrien, wo zwei Moleküle der Aminosäure durch die Glycin-Decarboxylase (GDC) und die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (SHMT) unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  zu einem Molekül Serin umgesetzt werden (Sharkey, 2001). Während das freigesetzte  $\text{CO}_2$  verloren geht, kann  $\text{NH}_3$  nach Diffusion in die Chloroplasten durch die Glutamin-Synthetase, welche die ATP-abhängige Umwandlung von Glutamat zu Glutamin katalysiert, refixiert werden (Migge *et al.*, 1997; Ireland und Lea 1998). Das in den Mitochondrien gebildete Serin wird in die Peroxisomen exportiert. Hier ist es an der Transaminierung von Glyoxylat durch das Enzym Serin:Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT) beteiligt, wodurch Glycin und Hydroxypyruvat entsteht. Das Glycin gelangt wie zuvor beschrieben in die Mitochondrien, das Hydroxypyruvat wird in den Peroxisomen unter Verbrauch von NADH durch das Enzym Hydroxypyruvat-Reduktase zu Glycerat reduziert. Dieses wird in die Chloroplasten exportiert und unter ATP-Verbrauch durch die Glycerat-Kinase (GK) zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt. 3-Phosphoglycerat geht dann in den Calvin-Zyklus ein und kann entweder zur Synthese von Kohlenhydraten oder zur Regeneration des Akzeptors Ribulose-1,5-Biphosphat verwendet werden.

### 1.1.2.2 Bedeutung der Photorespiration für $\text{C}_3$ -Pflanzen

Die Oxygenierung von Ribulose-1,5-Biphosphat durch RUBISCO beziehungsweise der Metabolismus von P-Glykolat im Rahmen der Photorespiration ist für  $\text{C}_3$ -Pflanzen eine verlustreiche Reaktion, da die Oxygenierung mit der Carboxylierung konkurriert und die Wiedergewinnung des Kohlenstoffs aus P-Glykolat ATP und Reduktionsäquivalente verbraucht (Sage, 1999). Die  $\text{CO}_2$ -Freisetzung in den Mitochondrien während der Photorespiration führt zu einem Verlust von 25% des Kohlenstoffs in P-Glykolat. Außerdem muss das freigesetzte  $\text{NH}_3$  unter Energieaufwand in den Chloroplasten refixiert werden (Reumann und Weber, 2006; Foyer *et al.*, 2009; Bauwe *et al.*, 2010). Obwohl die Photorespiration große Verluste bedeutet, ist sie für die Pflanze notwendig. Versuche die Photorespiration durch Mutationen zu unterbinden führten unter atmosphärischen Bedingungen zu letalen Pflanzen oder Pflanzen mit vermindertem Wachstum (Somerville und Ogren, 1982; Jordan und Ogren, 1984; Ogren, 1984; Somerville, 2001). Neben dem Abbau des toxischen P-Glykolats und der

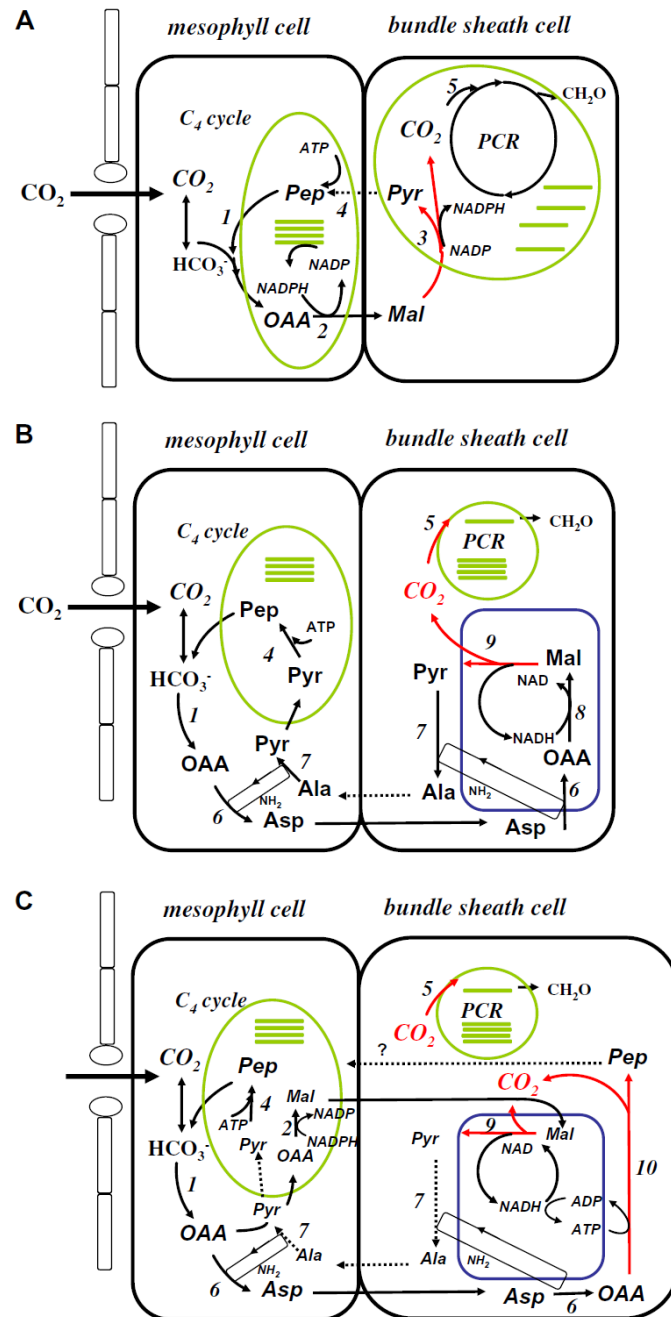
Wiedergewinnung von dreiviertel des Kohlenstoffs dient sie als Schutz vor zu hohen Lichtintensitäten, da überschüssige photochemische Energie effektiv abgebaut wird. Außerdem versorgt sie die Pflanze mit den Aminosäuren Glycin und Serin, welche für die Proteinsynthese verwendet werden können (Kozaki und Takeba, 1996; Douce und Neuburger, 1999; Sharkey, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass es in Pflanzen womöglich andere Mechanismen gibt, welche diese beiden Funktionen noch besser erfüllen können als die Photorespiration (Sharkey, 2001). Unter anderem wird vermutet, dass ein Mechanismus über Zeaxanthin, welches eine Rolle bei der Umwandlung von Licht in Wärme spielt, viel mehr überschüssige Lichtenergie abbauen kann. Obwohl diese beiden Funktionen der Photorespiration für die Pflanze hilfreich sein können, ist sie insgesamt doch schädlich.

### 1.1.3 C<sub>4</sub>-Photosynthese

Etwa 7500 von 250000 höheren Pflanzenarten, wie zum Beispiel Mais und Hirse, verwenden den C<sub>4</sub>-Weg. Hier wird CO<sub>2</sub> durch das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) vorfixiert, wobei die C<sub>4</sub>-Verbindung Oxalacetat entsteht, welche den C<sub>4</sub>-Pflanzen ihren Namen gab. Ein weiteres Merkmal von C<sub>4</sub>-Pflanzen ist die besondere Blattanatomie mit zwei verschiedenen photosynthetischen Zelltypen, den Mesophyllzellen und den Leitbündelscheidenzellen. Sie wird auch als Kranzanatomie bezeichnet, da die Mesophyllzellen nicht gleichmäßig im Blatt verteilt, sondern kranzartig um die Bündelscheidenzellen angeordnet sind, welche ihrerseits um die Leitbündel herum liegen. Die beiden Zelltypen sind durch viele Plasmodesmen miteinander verbunden, da zwischen ihnen ein intensiver Stoffaustausch stattfindet (Hatch, 1992).

Es gibt verschiedene Typen von C<sub>4</sub>-Pflanzen. Die PEPC-katalysierte Vorfixierung von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, welches durch die Hydratisierung von CO<sub>2</sub> entsteht, ist aber allen gemein. Die Hydratisierung von CO<sub>2</sub> wird durch das Enzym Carboanhydrase (CA) katalysiert. Das gebildete HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> wird dann im Zytoplasma der Mesophyllzellen, welche kein RUBISCO enthalten, durch PEPC mit Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Oxalacetat (OAA) umgesetzt. Abhängig vom späteren Decarboxylierungstyp wird das Oxalacetat entweder wie in Abbildung 1.5 dargestellt in den Chloroplasten der Mesophyllzellen durch die NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase (MDH) zu Malat reduziert oder im

Cytosol durch die Aspartat-Aminotransferase zu Aspartat transaminiert (Hatch, 1997; Leegood, 1997; Furbank, 2011).



**Abbildung 1.5: Verschiedene Typen der C<sub>4</sub>-Photosynthese**

Dargestellt ist die C<sub>4</sub> Photosynthese nach dem NADP-ME- (A), NAD-ME- (B) und PEPCK-Typ (C). Abkürzungen der Metabolite: Pep: Phosphoenolpyruvat; OAA: Oxalacetat; Asp: Aspartat; Ala: Alanin; Pyr: Pyruvat; Mal: Malat. Chloroplasten und Thylakoide sind grün gefärbt, Mitochondrien blau, und die Decarboxylierungs-Reaktionen rot. Die Enzyme in den Stoffwechselwegen sind folgendermaßen nummeriert: (1) Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; (2) NADPH-Malat-Dehydrogenase; (3) NADP-Malat-Enzym; (4) Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase; (5) RUBISCO; (6) Aspartat-Aminotransferase; (7)



Alanin-Aminotransferase; (8) NAD-Malat-Dehydrogenase; (9) NAD-Malat-Enzym; (10) Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Furbank, 2011).

Nach Diffusion in die Leitbündelscheidenzellen erfolgt eine Decarboxylierung der C<sub>4</sub>-Säuren von Malat zu Pyruvat und CO<sub>2</sub> in den Chloroplasten durch das NADP-abhängige Malat-Enzym (NADP-ME-Typ) beziehungsweise nach Umwandlung des Aspartats über Oxalacetat in Malat in den Mitochondrien durch das NAD-abhängige Malat-Enzym (NAD-ME-Typ). Beim dritten Typ erfolgt nach Umwandlung zu Oxalacetat eine Decarboxylierung zu Phosphoenolpyruvat im Cytosol durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK-Typ). Die Mitochondrien sind sowohl beim NAD-ME- als auch beim PEPCK-Typ am Decarboxylierungsprozess über das NAD-abhängige Malat-Enzym beteiligt. Allerdings wird beim PEPCK-Typ der Großteil des Oxalacetats durch die PEPCK zu Phosphoenolpyruvat umgesetzt, während das NAD-Malat-Enzym zur Bereitstellung von NADH zur Erzeugung von ATP via oxidative Phosphorylierung dient, um die PEPCK-Reaktion anzutreiben. Vermutlich spielt das NAD-Malat-Enzym auch bei der Ausbalancierung der Aminogruppen zwischen den Kompartimenten eine Rolle, in dem Alanin in die Mesophyllzellen zurücktransportiert wird (Furbank, 2011).

Das in den Bündelscheidenzellen freigesetzte CO<sub>2</sub> wird dann wie in C<sub>3</sub>-Pflanzen durch RUBISCO fixiert und im Calvin-Zyklus in Kohlenhydrate umgewandelt. Das in der Decarboxylierungs-Reaktion entstandene Pyruvat (Pyr) wird in den Mesophyllzellen für die Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptors Phosphoenolpyruvat benötigt. Beim NADP-ME-Typ wird das Pyruvat wieder in die Chloroplasten der Mesophyllzellen transportiert, wo eine Phosphorylierung zu Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK) erfolgt. Durch einen PEP/Phosphat-Translokator (PPT) gelangt PEP wieder in das Cytosol. Beim NAD-ME-Typ und teilweise auch beim PEPCK-Typ erfolgt der Rücktransport des Akzeptormoleküls in Form von Alanin. Der Zyklus aus CO<sub>2</sub>-Fixierung durch PEPC, die Reduzierung des Reaktionsproduktes Oxalacetat zu Malat, sowie die Regeneration von PEP aus Pyruvat wird auch als Hatch-Slack-Zyklus bezeichnet. Durch die räumliche Trennung von CO<sub>2</sub>-Fixierung und Decarboxylierung wird in der Nähe von RUBISCO eine bis zu 10-fach höhere CO<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zur Umgebungsluft erreicht, was zu einer Unterdrückung der Oxygenase-Reaktion und damit auch der Photorespiration führt (Ku *et al.*, 1996; Carmo-Silva *et al.*, 2008; Furbank, 2011).

C<sub>4</sub>-Pflanzen haben gegenüber C<sub>3</sub>-Pflanzen eine Reihe von Vorteilen wie eine hohe Photosyntheseleistung sowie eine ökonomischere Nutzung von Stickstoff und Wasser. Durch den CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus benötigen C<sub>4</sub>-Pflanzen weniger des stickstoffreichen Enzyms RUBISCO. Während RUBISCO 30 bis 60% des löslichen Proteins in den Blättern von C<sub>3</sub>-Pflanzen ausmacht, sind es in C<sub>4</sub>-Pflanzen nur 5-20%. In C<sub>3</sub>-Pflanzen sind damit 15-30% des Gesamtstickstoffs in RUBISCO gebunden. Hingegen sind es in der C<sub>4</sub>-Pflanze Mais nur etwa 6,5% (Sage, 1987). Außerdem müssen C<sub>4</sub>-Pflanzen für die gleiche Photosyntheserate ihre Stomata weniger weit öffnen als C<sub>3</sub>-Pflanzen, wodurch der Wasserverlust durch Transpiration reduziert wird.

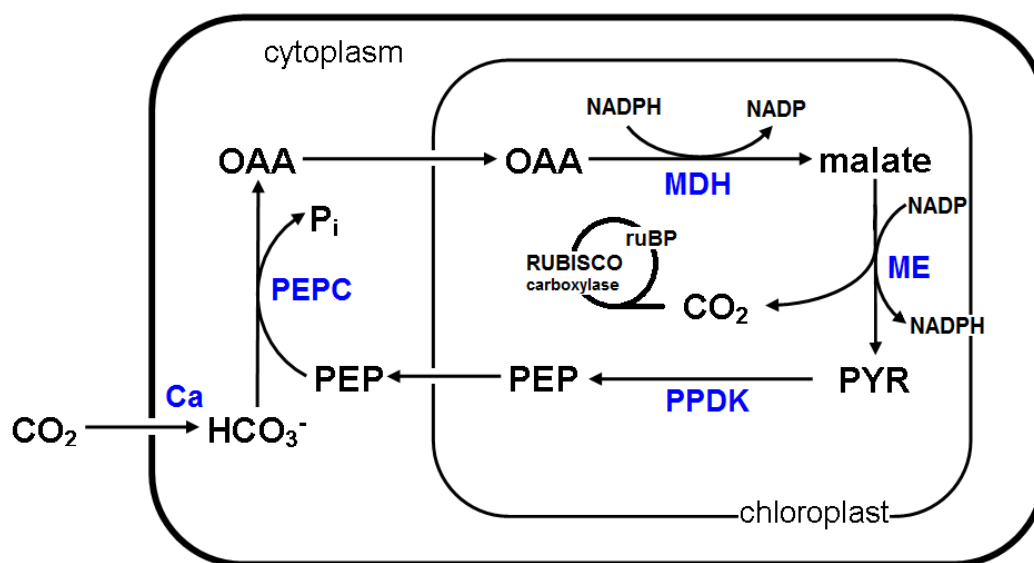
Da die Photorespiration mit steigender Temperatur zunimmt, sind C<sub>4</sub>-Pflanzen besser an heiße und trockene klimatische Bedingungen angepasst als C<sub>3</sub>-Pflanzen. Allerdings haben C<sub>4</sub>-Pflanzen einen höheren Energie-Bedarf, da für die Regeneration des Akzeptormoleküls PEP pro fixiertes Molekül CO<sub>2</sub> ein (PCK-Typ) oder zwei Moleküle ATP (NADP-ME- und NAD-ME-Typ) verbraucht werden. Der erhöhte Energieaufwand lohnt sich somit nur an Orten, an denen verstärkt Photorespiration auftritt. In humiden gemäßigten Breiten lohnt sich der Mehraufwand zumindest unter natürlichen Bedingungen nicht. Hier dominieren C<sub>3</sub>-Pflanzen (Ehleringer und Bjorkman, 1977; Taiz und Zeiger, 2001).

#### 1.1.4 „Single Cell“-C<sub>4</sub>-Photosynthese

Die meisten terrestrischen C<sub>4</sub>-Pflanzen weisen die unter 1.1.3 beschriebene Kranz-Anatomie auf, welche eine räumliche Trennung von C<sub>4</sub>- und Calvin-Zyklus gewährleistet, um eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebung von RUBISCO zu erreichen. In den letzten Jahren wurden aber auch mehrere aquatische und terrestrische Pflanzen mit C<sub>4</sub>-Photosynthese ohne Kranz-Anatomie beschrieben (Voznesenskaya *et al.*, 2001, 2002; Bowes *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2004; Akhani *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010).

Im Fall der submersen Wasserpflanze *Hydrilla verticillata* passen sich die Blätter durch ein Umschalten von C<sub>3</sub>- auf C<sub>4</sub>-Photosynthese an abnehmende CO<sub>2</sub>-Konzentrationen an (Holaday *et al.*, 1983; Magnin *et al.*, 1997). Im C<sub>4</sub>-Zustand wird anorganischer Kohlenstoff in Form von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zuerst durch eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase fixiert (Abbildung 1.6). Das hierbei gebildete Oxalacetat

wird in die Chloroplasten transportiert und mittels einer Malat-Dehydrogenase zu Malat umgesetzt. Dieses wird anschließend durch ein NADP-abhängiges Malat-Enzym decarboxyliert (Salvucci und Bowes, 1981; Magnin *et al.*, 1997), wodurch eine 40-fache Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Chloroplasten erreicht wird (Reiskind *et al.*, 1997). Der  $\text{CO}_2$ -Kompensationspunkt liegt bei *Hydrilla verticillata* mit ca.  $15 \mu\text{l CO}_2/\text{L}$ , deutlich unter dem für  $\text{C}_3$ -Pflanzen ( $45\text{-}50 \mu\text{l CO}_2/\text{L}$ ), aber höher als bei  $\text{C}_4$ -Pflanzen ( $0\text{-}2 \mu\text{l CO}_2/\text{L}$ ) (Magnin *et al.*, 1997). Sinnloses Durchlaufen des Zyklus wird in diesem System durch eine intrazelluläre Trennung der anfänglichen Carboxylierung und nachfolgender Decarboxylierung in Cytosol und Chloroplasten vermindert.



**Abbildung 1.6:** „Single Cell“- $\text{C}_4$ -Photosynthese in *Hydrilla verticillata*

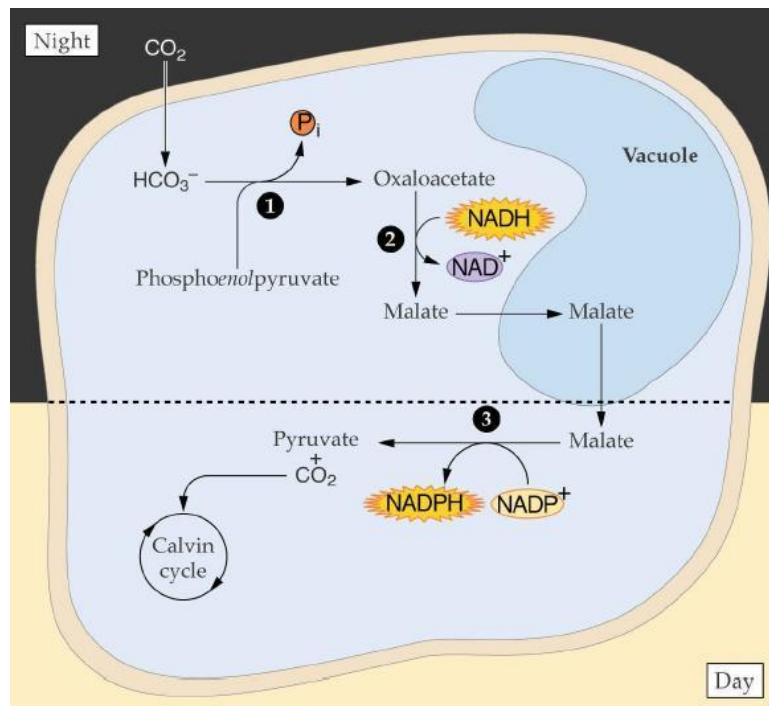
Dargestellt ist das vermutete  $\text{C}_4$ -System in *Hydrilla verticillata* und die Lokalisation der wichtigsten Enzyme. Anorganischer Kohlenstoff wird nach Hydratisierung durch eine Carboanhydrase (CA) in Form von  $\text{HCO}_3^-$  durch eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) mit Phosphoenolpyruvat (PEP) als Akzeptor zu Oxalacetat (OAA) fixiert. Dieses wird nach Transport in die Chloroplasten durch eine Malat-Dehydrogenase (MDH) zu Malat umgesetzt, welches durch ein NADP-abhängiges Malat-Enzym (ME) zu Pyruvat (PYR) decarboxyliert wird. Eine Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK) katalysiert anschließend die Umwandlung des Pyruvats zu Phosphoenolpyruvat (PEP), welches nach Transport ins Cytosol wieder für einen neuen Zyklus zur Verfügung steht.

Bei den Landpflanzen wurden kürzlich drei Arten aus der Familie der *Chenopodiaceae* beschrieben, welche eine „Single-Cell“- $\text{C}_4$ -Photosynthese betreiben (Voznesenskaya *et al.*, 2001, 2002, 2005; Chuong *et al.*, 2006). Sie besitzen zwei biochemisch und morphologisch unterschiedliche Sorten von Chloroplasten, die zwischen zwei cytoplasmatischen Bereichen innerhalb einer Zelle räumlich getrennt sind. In *Sueda aralocaspica* (früher *Borszczowia aralocaspica*) sind die beiden Chloroplasten-

arten in verlängerten Chlorenchymzellen proximal bzw. distal bezüglich der intern lokalisierten Blattadern und dem wasserspeichernden Gewebe angeordnet. *Bienertia cycloptera* und *Bienertia sinuspersici* zeigen hingegen eine noch einzigartigere Zellmorphologie. Während sich die eine Chloroplastenart an den Rändern der Zelle verteilt, konzentriert sich die andere zusammen mit Mitochondrien und Peroxisomen in der Mitte der Zelle. Die beiden Kompartimente werden räumlich durch eine große Vakuole getrennt, welche vermutlich als eine Diffusionsbarriere fungiert um den  $\text{CO}_2$ -Ausstrom aus dem inneren Kompartiment nach der Decarboxylierung zu verlangsamen (Edwards *et al.*, 2007). Über dünne cytoplasmatische Kanäle, welche die Vakuole durchspannen, sind die Kompartimente miteinander verbunden (Voznesenskaya *et al.*, 2005; Chuong *et al.*, 2006).

### 1.1.5 CAM-Photosynthese

CAM-Pflanzen (crassulacean acid metabolism), welche ebenfalls eine Anpassung an trockene klimatische Bedingungen zeigen, nutzen eine andere Strategie zur  $\text{CO}_2$ -Konzentrierung. Im Gegensatz zu  $\text{C}_4$ -Pflanzen sind  $\text{CO}_2$ -Fixierung und Carboxylierung nicht räumlich, sondern zeitlich getrennt und laufen innerhalb einer Zelle ab (Osmond, 1978; Spalding *et al.*, 1979). Nachts, wenn die Temperaturen und somit die Verdunstungsrate niedriger sind, sind die Stomata der Pflanzen geöffnet und  $\text{HCO}_3^-$  wird durch PEPC im Cytosol vorfixiert (Cushman und Bohnert, 1997; Cushman, 2001). Das entstehende Malat, welches sich während der Nacht in den Vakuolen anreichert, wird dann am nächsten Tag bei geschlossenen Stomata durch das cytosolische NADP-ME zu Pyruvat decarboxyliert (Abbildung 1.7). Weitere Möglichkeiten sind eine Decarboxylierung durch das mitochondriale NAD-ME oder die cytosolische PEPC. Während das Pyruvat vom Cytosol in die Chloroplasten zur PPDK-katalysierten Regeneration des  $\text{HCO}_3^-$ -Akzeptors Phosphoenolpyruvat transportiert wird, geht das freigesetzte  $\text{CO}_2$  über RUBISCO in den Calvin-Zyklus zur Kohlenhydrat-Synthese ein. Durch die zeitliche Trennung der beiden Vorgänge wird der Wasserverlust effizient reduziert und eine hohe  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Nähe von RUBISCO erreicht, wodurch die Photorespiration unterdrückt wird.



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des CAM-Weges**

Nachts öffnen CAM-Pflanzen ihre Stomata und fixieren das einströmende  $\text{CO}_2$  in Form von  $\text{HCO}_3^-$  durch PEPC (1). Das entstehende Oxalacetat wird durch die MDH (2) zu Malat reduziert und in den Vakuolen gespeichert. Tagsüber schließen die CAM-Pflanzen ihre Stomata um Wasserverlust zu verhindern und decarboxylieren das gespeicherte Malat durch NADP-ME (3) zu Pyruvat. Das dabei freigesetzte  $\text{CO}_2$  geht dann zur Kohlenhydrat-Synthese in den Calvin-Zyklus ein (Buchanan *et al.*, 2000).

Die Regulation des CAM-Weges erfolgt durch mehrere Faktoren. Unter anderem durch eine Metabolit-vermittelte sowie posttranslationale Regulation von PEPC. Malat und Oxalacetat sind Inhibitoren der PEPC. Tagsüber, wenn die Konzentration der beiden Stoffe hoch ist, erfolgt dadurch eine Hemmung der  $\text{CO}_2$ -Fixierung durch PEPC. Stattdessen ist die RUBISCO aktiv und speist das aus der Spaltung von Malat freigesetzte  $\text{CO}_2$  in den Calvin-Zyklus ein. Das freigesetzte  $\text{CO}_2$  fördert außerdem das Schließen der Stomata. Im Dunkeln ist die RUBISCO-Aktivität gehemmt, die PEPC-Aktivität hingegen erhöht. Während PEPC tagsüber in dimerer Form vorliegt, welche durch Malat gehemmt wird, liegt das Enzym nachts als durch Malat nicht hemmbares Tetramer vor, welches durch PEP stabilisiert wird (Jiao und Chollet, 1991). Die PPDK-Aktivität ist reversibel licht-abhängig reguliert und erfolgt durch reversible Phosphorylierung. Bei Licht ist die PPDK aktiviert, das heißt dephosphoryliert, während sie bei Dunkelheit inaktiv ist, das heißt phosphoryliert (Hatch und Slack, 1968; Aoyagi und Bassham, 1984; Burnell und Hatch, 1985; Matsuoka *et al.*, 1993; Chastain *et al.*, 2002). Außerdem tritt bei Kälte eine reversible PPDK-Inaktivierung auf. Der Grund dafür ist eine Dissoziation der aktiven tetramere Form

zu nicht aktiven Dimeren und Monomeren, welche sich bei Erwärmung wieder zum aktiven Enzym verbinden können (Hatch, 1979; Naidu *et al.*, 2003)

Bei einigen CAM-Pflanzen hängt die Nutzung des CAM-Weges von den Umweltbedingungen am Standort ab, unter gemäßigten Bedingungen können sie auch C<sub>3</sub>-Photosynthese betreiben. Für diese Pflanzen wie zum Beispiel *Mesembryanthemum crystallinum* ist der CAM-Weg eine fakultative Eigenschaft (Winter und Holtum, 2007). Experimentell kann die Umschaltung durch Erhöhung des NaCl-Gehalts des Nährmediums erreicht werden (Winter und von Willert, 1972).

### 1.1.6 Ansätze zur Verbesserung der Photosynthese in C<sub>3</sub>-Pflanzen

Die Limitierung der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Assimilation in C<sub>3</sub>-Pflanzen ist in heißen, trockenen Umgebungen hauptsächlich auf die RUBISCO zurückzuführen, da die Verfügbarkeit an CO<sub>2</sub> begrenzt ist und die Photorespiration zunimmt (Jordan und Ogren, 1984; Ogren, 1984; Brooks und Farquhar, 1985; Sharkey, 1988). In der Evolution haben sich CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismen wie der C<sub>4</sub>- und der CAM-Weg entwickelt, um dieses Problem zu umgehen. In Cyanobakterien und Algen sind weitere Mechanismen entstanden (Badger und Price, 2003). Die Verwendung von Membrantransportern und der Carboanhydrase ermöglichen hier die aktive Konzentrierung von anorganischem Kohlenstoff um die RUBISCO.

Durch Übertragung von C<sub>4</sub>-Enzymen oder Membrantransportern wird versucht die Photorespiration auch in C<sub>3</sub>-Pflanzen zu verringern. Andere Ansätze sind zum Beispiel die Erhöhung der Spezifität der RUBISCO, die Manipulation der Enzyme der Photorespiration oder die Erhöhung der regenerativen Kapazität des C<sub>3</sub>-Zyklus. Unter sättigenden CO<sub>2</sub>-Bedingungen begrenzt nicht die RUBISCO die Photosynthese, sondern die Kapazität des C<sub>3</sub>-Zyklus zur Regeneration von Ribulosebisphosphat (RuBP) (Raines, 2003).

#### 1.1.6.1 Einbringen von CO<sub>2</sub>-Konzentrierungs-Mechanismen

Das Gleichgewicht von Carboxylase- und Oxygenase-Aktivität hängt vor allem vom Verhältnis von CO<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub> in der Umgebung von RUBISCO ab. Daher gibt es verschiedene Unternehmungen die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Nähe der RUBISCO zu erhöhen, um so die Oxygenase-Reaktion und damit die Photorespiration zu unter-

drücken. Ansätze sind zum Beispiel der Transfer der Gene des C<sub>4</sub>-Zyklus oder des CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus aus Cyanobakterien. Bei einem weiteren Ansatz wurden die Enzyme des bakteriellen Glykolat-Weges eingebracht, wodurch ein chloroplastidärer Bypass in den Chloroplasten geschaffen wird (Peterhänsel und Maurino, 2011).

#### 1.1.6.1.1 Expression von C<sub>4</sub>-Enzymen in C<sub>3</sub>-Pflanzen

Nach der Entdeckung des C<sub>4</sub>-Weges wurde zuerst durch konventionelle Züchtung versucht die C<sub>4</sub>-Eigenschaften auf C<sub>3</sub>-Pflanzen zu übertragen, was sich aber nicht als erfolgreich erwies. Daher ging man dazu über einzelne Gene, welche für die Enzyme des C<sub>4</sub>-Weges codieren, in C<sub>3</sub>-Pflanzen einzubringen (Häusler *et al.*, 2002; Leegood, 2002; Miyao, 2003) (Tabelle 1.1). Die Mais-Gene für die C<sub>4</sub>-Enzyme PEPC, PPDK und NADP-ME wurden in transgenem Reis in hohen Leveln exprimiert (Ku *et al.*, 1999, 2001; Takeuchi *et al.*, 2000; Fukayama *et al.*, 2001, 2003). Allerdings führte dies zu keinen signifikanten Veränderungen der Photosyntheseeigenschaften. Das Wachstum wurde durch die Überexpression von PEPC, PPDK und NADP-MDH ebenfalls nicht signifikant beeinflusst, während hohe NADP-ME-Level eine starke Wachstumshemmung und Blattchlorose zur Folge hatten (Takeuchi *et al.*, 2000; Tsuchida, 2001). In transgenen Kartoffeln mit überexprimierter bakterieller PEPC aus *Corynebacterium glutanicum* und NADP-ME aus *Flaveria pringlei* wurde eine Verringerung des Elektronenbedarfs (e/A) für die CO<sub>2</sub>-Fixierung bei höheren Temperaturen sowie eine Erniedrigung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes beobachtet, was auf eine reduzierte Photorespiration hindeutet. Außerdem zeigten die Pflanzen sowohl im Hel- len als auch im Dunkeln eine erhöhte Respiration (Lipka *et al.*, 1999; Häusler *et al.*, 1999, 2001). Aus dem C<sub>4</sub>-Gras *Urochloa panicoides* wurde die PEPC in Reis-Chloroplasten exprimiert, wodurch mehr Kohlenstoff in die C<sub>4</sub>-Säuren wie Malat und Oxalacetat geleitet wurde. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Photosyntheserate und dem CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt zwischen transgenen Linien und Kontrollpflanzen (Suzuki *et al.*, 2000). Die gemeinsame Expression der C<sub>4</sub>-spezifischen PEPC und PPDK aus Mais, der NADPH-MDH aus Sorghum sowie des C<sub>3</sub>-spezischen NADP-ME aus Reis führte zu geringfügig höheren CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten als in Vergleichspflanzen, aber auch zu einer leichten Wachstumshemmung (Taniguchi *et al.*, 2008).

Untersuchungen von Fukayama *et al.* (2003, 2006) ergaben, dass die Regulation der C<sub>4</sub>-Enzyme in C<sub>3</sub>-Pflanzen nicht immer in der gewünschten Richtung erfolgt. So wurde die PEPC aus Mais in Reis zwar ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert, aber in umgekehrter Weise als in C<sub>4</sub>-Blättern. Die Mais-PEPC wurde wie das endogene Reisenzym nachts phosphoryliert und tagsüber dephosphoryliert. Hingegen wurde die PPDK aus Mais in Reis auf die gleiche Weise reguliert wie in C<sub>4</sub>-Blättern (Fukayama *et al.*, 2001; Taniguchi, 2008).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist C<sub>4</sub>-Enzyme in C<sub>3</sub>-Pflanzen einzubringen und dass es dadurch zu Veränderungen des Kohlenstoffflusses kommen kann. Interessanterweise kann aber die Expression desselben Enzyms in verschiedenen Arten zu ganz unterschiedlichen Konsequenzen führen. Die Installation eines funktionierenden C<sub>4</sub>-Zyklus in C<sub>3</sub>-Pflanzen ist bisher noch nicht gelungen.

**Tabelle 1.1: Auswirkungen der Expression von C<sub>4</sub>-Enzymen in C<sub>3</sub>-Pflanzen**

Enzym	Promotor	Transf. Pflanze	Höchste Aktivität <sup>a)</sup>	Physiologische Effekte	Effekte auf Wachstum	Referenzen
PEPC ( <i>Z. mays</i> )	PEPC ( <i>Z. mays</i> )	Reis	110x	Erhöhte lichtgesättigte Photosynthese, Abnahme der O <sub>2</sub> -Hemmung	nicht bestimmt	Ku <i>et al.</i> , 1999
PEPC ( <i>S. tuberosum</i> )	35S (CaMV)	Kartoffel	2,8x	Erhöhter Kohlenstofffluss in Aminosäuren, Stimulation des endogenen NADP-ME	Stauchung der Internodien	Häusler <i>et al.</i> , 2001
PEPC ( <i>Z. mays</i> )	Cab ( <i>N. plumbaginifolia</i> )	Tabak	2,2x	höherer Säuregehalt in Blättern, niedrigere RUBISCO-Aktivität, niedrigere Photosyntheserate	langsamer	Hudspeth <i>et al.</i> , 1992
	35S (CaMV)		2,4x	niedrigerer Chlorophyllgehalt	langsamer	Kogami <i>et al.</i> , 1994
PPDK ( <i>M. crystallinum</i> )	35S (CaMV)	Tabak	1,6x	kein Effekt	kein Effekt	Sheriff <i>et al.</i> , 1998
PPDK ( <i>Z. mays</i> )	RbcS ( <i>A. thaliana</i> )	Arabidopsis	2,4x	keine Veränderungen der Aktivitäten von RUBISCO, PEPC und NADP,	nicht bestimmt	Ishimaru <i>et al.</i> , 1997
	35S (CaMV)		4,0x	keine Beeinflussung photosynthetischer Parameter		
PPDK ( <i>Z. mays</i> )	enh. 35S (CaMV)	Kartoffel	5,4x	weniger Pyruvat, mehr Malat	kein Effekt	Ishimaru <i>et al.</i> , 1998
PPDK ( <i>Z. mays</i> )	PPDK ( <i>Z. mays</i> )	Reis	40x	Photosynthese unterdrückt, erhöhte Respiration, Funktion der Stomata verändert	kein Effekt	Fukayama <i>et al.</i> , 2002
NADP-MDH ( <i>S. vulgare</i> )	35S (CaMV)	Tabak	3,0x	mehr Malat	nicht bestimmt	Gallardo <i>et al.</i> , 1995
cAsp-AT <sup>b)</sup> ( <i>P. miliaceum</i> )	35S (CaMV)	Tabak	3,1x	PEPC und mAsp-AT erhöht	nicht bestimmt	Sentoku <i>et al.</i> , 2000
	Asp-AT ( <i>P. miliaceum</i> )	Reis	20x	nicht bestimmt	nicht bestimmt	Matsuoka, 2001
mAsp-AT <sup>c)</sup> ( <i>P. miliaceum</i> )	35S (CaMV)	Tabak	3,5x	PEPC erhöht	nicht bestimmt	Sentoku <i>et al.</i> , 2000
NADP-ME ( <i>F. pringlei</i> )	35S (CaMV)	Kartoffel	7,1x	leicht kleinerer C <sub>i</sub> durch geringere Öffnung der Stomata	nicht bestimmt	Lipka <i>et al.</i> , 1999



<b>NADP-ME</b> <b>(O. sativa)</b>	Cab ( <i>O. sativa</i> )	Reis	5x	kein Effekt	kein Effekt	Tsuchida <i>et al.</i> , 2001
<b>NADP-ME</b> <b>(Z. mays)</b>	Cab ( <i>O. sativa</i> )	Reis	30x	Chlorose, niedrigere CO <sub>2</sub> -Assimilation	gehemmt	Tsuchida <i>et al.</i> , 2001
<b>NADP-ME</b> <b>(Z. mays)</b>	Cab ( <i>O. sativa</i> )	Reis	70x	abnormale Chloroplasten, niedrigerer Chlorophyllgehalt, geringere PSII-Aktivität	gehemmt	Takeuchi <i>et al.</i> , 2000
<b>PEPCK</b> <b>(U. panicoides)</b>	PEPC ( <i>Z. mays</i> ) PPDK ( <i>Z. mays</i> )	Reis	0,5x <sup>d)</sup> 0,5x <sup>d)</sup>	höherer CO <sub>2</sub> -Fluss in C <sub>4</sub> -Säuren, keine Veränderung von Photosyntheserate, CO <sub>2</sub> -Kompensationspunkt und Chlorophyllgehalt	kein Effekt	Suzuki <i>et al.</i> , 2000
<b>PEPCK</b> <b>(S. meliloti)</b>	35S (CaMV)	Tabak	35x <sup>e)</sup>	kein Effekt	kein Effekt	Häusler <i>et al.</i> , 2001
<b>PEPC</b> <b>(C. glutamicum)</b>	35S (CaMV)	Kartoffel		Verringerung des Elektronenbedarfs bei höheren Temperaturen	nicht bestimmt	(Lipka <i>et al.</i> , 1999; Häusler <i>et al.</i> , 1999, 2001)
<b>NADP-ME</b> <b>(F. pringlei)</b>	35S (CaMV)			Erniedrigung des CO <sub>2</sub> -Kompensationspunktes erhöhte Respiration im Hellen und im Dunkeln		
<b>PEPC, PPK</b> <b>(Z. mays)</b> <b>NADP-MDH</b> <b>(S. bicolor)</b> <b>NADP-ME</b> <b>(O. sativa)</b>	PEPC, PPK ( <i>Z. mays</i> ) Cab ( <i>O. sativa</i> ) Cab ( <i>O. sativa</i> )	Reis		geringfügige höhere CO <sub>2</sub> -Assimilationsratens	leichte Wachstumshemmung	Taniguchi <i>et al.</i> (2008)

<sup>a)</sup> höchste Enzymaktivität in transgenen Pflanzen der T<sub>0</sub>-Generation gegenüber Kontrollpflanzen

<sup>b)</sup> cytosolische Aspartat-Aminotransferase aus Mesophyllzellen von *Panicum miliaceum*

<sup>c)</sup> mitochondriale Aspartat-Aminotransferase aus Bündelscheidenzellen von *Panicum miliaceum*

<sup>d)</sup> höchste Enzymaktivität in transgenen Pflanzen der T<sub>1</sub>-Generation relativ zu Blättern von *U. panicoides*

<sup>e)</sup> Bestimmung der Enzymaktivität in isolierten Chloroplasten

### 1.1.6.1.2 Expression von *ictB* aus Cyanobakterien in C<sub>3</sub>-Pflanzen

Cyanobakterien haben einen eigenen CO<sub>2</sub>-Konzentrierungs-Mechanismus (CCM) entwickelt, um sich an die veränderten Umweltbedingungen vor etwa 350 Mio. Jahren anzupassen, als die CO<sub>2</sub>-Konzentration deutlich abfiel und die O<sub>2</sub>-Konzentration anstieg (Berner, 1990, 2006). Der CCM bewirkt einen aktiven Transport von anorganischem Kohlenstoff in Form von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und CO<sub>2</sub> in die Zelle, um die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebung der RUBISCO zu erhöhen und dadurch die Oxygenase-Aktivität zu unterdrücken. Die Untersuchung von Cyanobakterien-Mutanten (*Synechococcus* PC7942), die besonders viel CO<sub>2</sub> benötigten, zeigte, dass *ictB* an der CO<sub>2</sub>-Konzentrierung in diesem Organismus beteiligt ist. Seine genaue Funktion ist bisher allerdings nicht bekannt (Bonfil *et al.*, 1998; Amoroso *et al.*, 2003). Die Expression von *ictB* in Arabidopsis und Tabak führte zu Pflanzen mit signifikant höheren Photosyntheseraten unter limitierenden, aber nicht unter sättigenden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (Lieman-Hurwitz *et al.*, 2003). Bei trockenen Bedingungen wuchsen transgene Arabidopsis-Pflanzen deutlich schneller als Kontrollpflanzen und wiesen am Ende ein höheres Trockengewicht auf. Die Erniedrigung des CO<sub>2</sub>-

Kompensationspunktes in diesen Pflanzen lässt vermuten, dass die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebung von RUBISCO höher war.

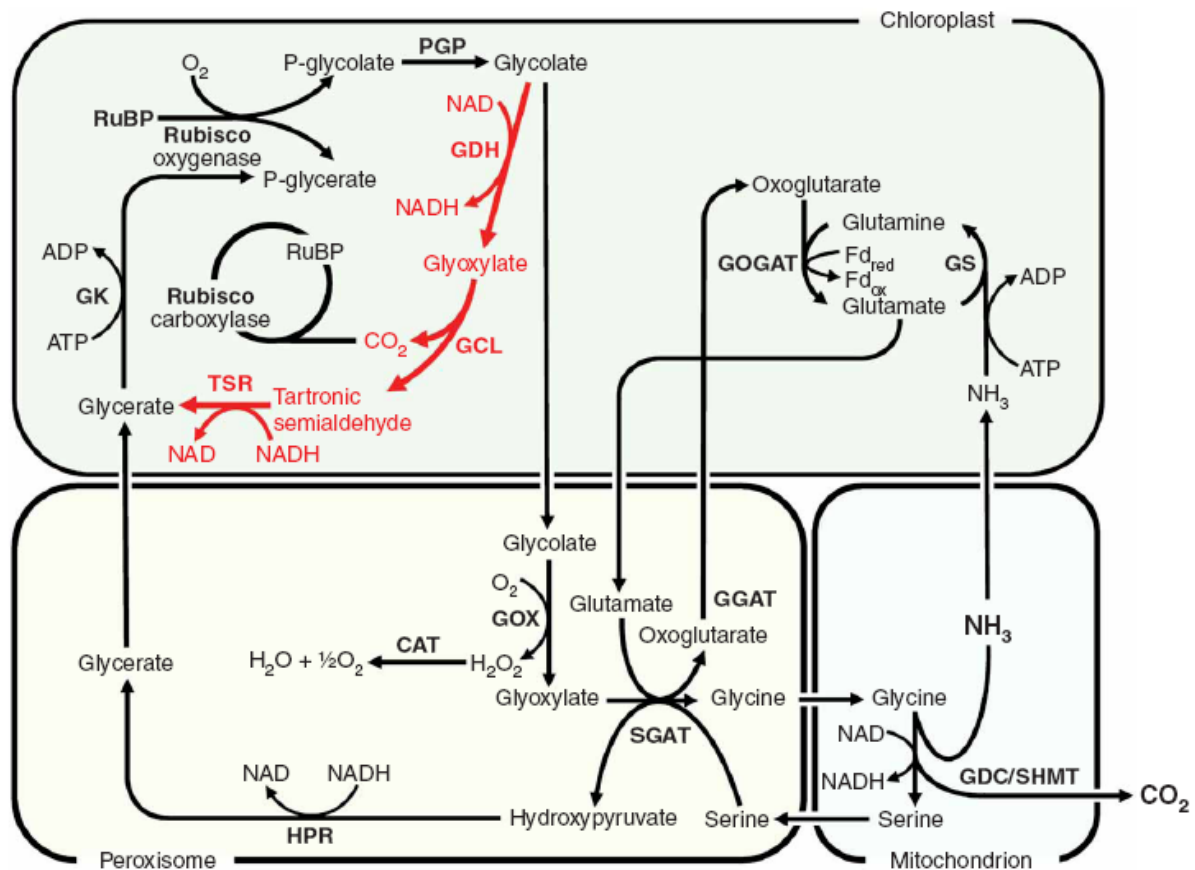
### 1.1.6.1.3 Expression des bakteriellen Glykolat-Weges in C<sub>3</sub>-Pflanzen

Viele Bakterien haben Stoffwechselwege für die Metabolisierung von Glykolat, dem Primärprodukt der Oxygenase-Aktivität von RUBISCO, entwickelt. Für *Escherichia coli* wurde der Stoffwechselweg (Glycerat-Weg) im Detail beschrieben (Kornberg und Sadler, 1961; Hansen und Hayashi, 1962; Lord, 1972; Pellicer *et al.*, 1996). *E. coli* kann auf Glykolat als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen. Zuerst wird das Glykolat durch einen Multiproteinkomplex namens Glykolat-Dehydrogenase (GDH) auf eine sauerstoffunabhängige Art unter Nutzung organischer Co-Faktoren zu Glyoxylat oxidiert. Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten, welche durch die drei verschiedenen ORFs *glcD*, *glcE* und *glcF* im *glc*-Operon von *E. coli* codiert werden (Lord, 1972; Pellicer *et al.*, 1996). Im nächsten Schritt werden zwei Moleküle Glyoxylat unter CO<sub>2</sub>-Freisetzung durch das Enzym Glyoxylat-Carboligase (GCL) zu Tartronat-Semialdehyd verbunden (Chang *et al.*, 1993). Tartronat-Semialdehyd wird dann durch die Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR) zu Glycerat umgesetzt und anschließend durch die Glycerat-Kinase (GK) phosphoryliert (Gotto und Kornberg, 1961). Ein ähnlicher Weg kommt in einigen Grünalgen und Cyanobakterien als ein photorespiratorischer Zyklus zum Einsatz (Nelson und Tolbert, 1970; Ramazanov und Cardenas, 1992). In diesem Fall wird die Glykolat-Oxidation durch eine Glykolat-Dehydrogenase, welche in den Mitochondrien lokalisiert ist, katalysiert. Auch dieses Enzym ist nicht sauerstoffabhängig und verwendet stattdessen organische Elektronenakzeptoren wie NAD. Der weitere Metabolismus des Glyoxylats scheint auf dem gleichen Weg wie in den Peroxisomen höherer Pflanzen abzulaufen (Stabenau *et al.*, 1984; Igamberdiev und Lea, 2002).

Durch Einführung des Glycerat-Weges aus *E. coli* in die Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* kann die Photosyntheseeffizienz und die Biomasseproduktion gesteigert werden (Kebeish *et al.*, 2007; Leegood, 2007). Der biochemische Weg besteht aus den drei Enzymen Glykolat-Dehydrogenase (GDH), Glyoxylat-Carboligase (GCL) und Tartronat-Semialdehyd-Reduktase (TSR) und führt zur direkten Umsetzung des durch die Oxygenase-Aktivität von RUBISCO gebildeten Glykolats zu Glycerat inner-

halb der Chloroplasten (Abbildung 1.8). Dadurch wird der Fluss der photorespiratorischen Metabolite durch Peroxisomen und Mitochondrien reduziert. Das im Zuge der Umwandlung des Glykolats freigesetzte  $\text{CO}_2$  erhöht außerdem die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Nähe von RUBISCO, was zu einer Reduzierung der Oxygenase-Aktivität und damit auch der Photorespiration führt. Die Photorespiration wird bei diesem Ansatz toleriert, aber die Produkte dieser Reaktion werden in einen Weg abgeleitet, der weniger Energie verbraucht. Formell ist der bakterielle Glycerat-Weg auch ein photorespiratorischer Weg, da er ebenso zur  $\text{CO}_2$ -Freisetzung führt und von der  $\text{O}_2$ -Fixierung durch RUBISCO abhängt.

Die Methode hat jedoch drei große potentielle Vorteile gegenüber dem endogenen photorespiratorischen Weg. Erstens führt der bakterielle Weg nicht zur Freisetzung von  $\text{NH}_3$ , welches unter Verbrauch von Energie und Reduktionsäquivalenten refixiert werden muss. Stattdessen produziert der Weg sogar Reduktionsäquivalente. Zweitens verbraucht der Weg kein ATP, was ein Vorteil gegenüber  $\text{C}_4$ -artigen Wegen darstellt, wo ATP für die Regeneration des  $\text{CO}_2$ -Akzeptor-Moleküls verwendet wird. Diese Vorteile sind wahrscheinlich vor allem bei schlechten Lichtbedingungen von Bedeutung, wenn die Energie für die Photosynthese begrenzt ist. Und drittens konzentriert der bakterielle Glycerat-Weg  $\text{CO}_2$  in den Chloroplasten, da die photorespiratorische  $\text{CO}_2$ -Freisetzung von den Mitochondrien in die Chloroplasten verlagert wird.



**Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des photorespiratorischen Weges (schwarz) in C<sub>3</sub>-Pflanzen und der vorgeschlagene Weg (rot) für die Umsetzung des Glykolats zu Glycerat**

Die Oxygenase-Aktivität der RUBISCO führt zur Bildung von P-Glycerat und P-Glykolat. P-Glykolat wird durch PGP zu Glykolat dephosphoryliert, welches durch GDH zu Glyoxylat oxidiert wird. Zwei Moleküle Glyoxylat werden unter CO<sub>2</sub>-Freisetzung durch GCL zu Tartronic-Semialdehyd umgesetzt. Tartronic-Semialdehyd wird dann durch TSR zu Glycerat reduziert, welches nach Phosphorylierung durch GK zur Kohlenhydrat-Synthese in Calvin-Zyklus eingetribt. PGP = Phosphoglykolat-Phosphatase; GDH = Glykolat-Dehydrogenase; GCL = Glyoxylat-Carboligase; TSR = Tartronic-Semialdehyd-Reduktase; GK = Glycerat-Kinase; die photorespiratorischen Enzyme sind in 1.1.2.1 erklärt (Kebeish *et al.*, 2007).

### 1.1.6.2 Einbringen einer „verbesserten“ RUBISCO

Die RUBISCO in höheren Pflanzen besteht aus 8 großen, chloroplastencodierten und 8 kleinen, kerncodierten Untereinheiten (UE). Die große UE enthält dabei alle für ihre katalytische Funktion notwendigen Informationen. Aus diesem Grund konzentrierten sich die Ansätze, eine RUBISCO mit erhöhter Spezifität für CO<sub>2</sub> gegenüber O<sub>2</sub> zu schaffen, auf diese UE. Jedoch führten alle Versuche die RUBISCO gentechnisch durch ortsspezifische (Spreitzer und Salvucci, 2002; Andersson und Taylor, 2003; Parry *et al.*, 2003) oder zufällige Mutagenese wie DNA-Shuffling und „beschleunigte Evolution“ (Stemmer, 1994; Matsumura *et al.*, 2005) zu verändern bisher

nicht zu einer verbesserten RUBISCO, teilweise sogar zu einem noch ineffizienteren Enzym.

Ein anderer Ansatz eine verbesserte RUBISCO zu finden ist die Untersuchung des Enzyms aus verschiedenen Arten, welche natürliche Unterschiede in ihren katalytischen Eigenschaften zeigen. So wurde zum Beispiel in Rotalgen eine RUBISCO mit bis zu dreifach höherer Spezifität im Vergleich zu der aus Kulturpflanzen gefunden (Read und Tabita, 1994; Uemura *et al.*, 1997). Versuche die RUBISCO aus der Rotalge *Galdieria partita* in Tabak einzubringen führten allerdings nicht zu einem aktiven Enzym (Whitney *et al.*, 2001), da sich die Untereinheiten nicht richtig zusammensetzten. Nach Cloney *et al.* (1993) ist dies wahrscheinlich auf das Fehlen dafür benötigter plastidärer Chaperonine zurückzuführen.

Im Gegensatz zur RUBISCO aus Rotalgen wurden in höheren Pflanzen geringere Unterschiede bezüglich der Spezifität gefunden. Allerdings weisen die RUBISCOs von Pflanzen aus heißen, trockenen oder salzigen Umgebungen eine etwas höhere Spezifität auf und unterscheiden sich auch bezüglich ihrer katalytischen Aktivität und ihrem Temperaturverhalten (Sage, 2002; Galmes *et al.*, 2005). Ein Transfer der RUBISCO aus diesen Arten in Kulturpflanzen könnte zu einer höheren CO<sub>2</sub>-Assimilation führen. Nach den Vorhersagemodellen von von Caemmerer (2000) könnte durch eine in Tabak eingebrachte RUBISCO aus *Limonium gibertii* eine um 29% höhere Nettophotosyntheserate erreicht werden. Die erfolgreiche Expression der großen und kleinen Untereinheit von RUBISCO als Fusionsprotein, welches sich zum aktiven Holoenzym zusammenlagerte, zeigt, dass der Transfer einer fremden RUBISCO eine mögliche Strategie zur Optimierung des C<sub>3</sub>-Zyklus darstellt (Whitney und Sharwood, 2007; Whitney *et al.*, 2011).

### **1.1.6.3 Manipulation der Aktivierung der RUBISCO**

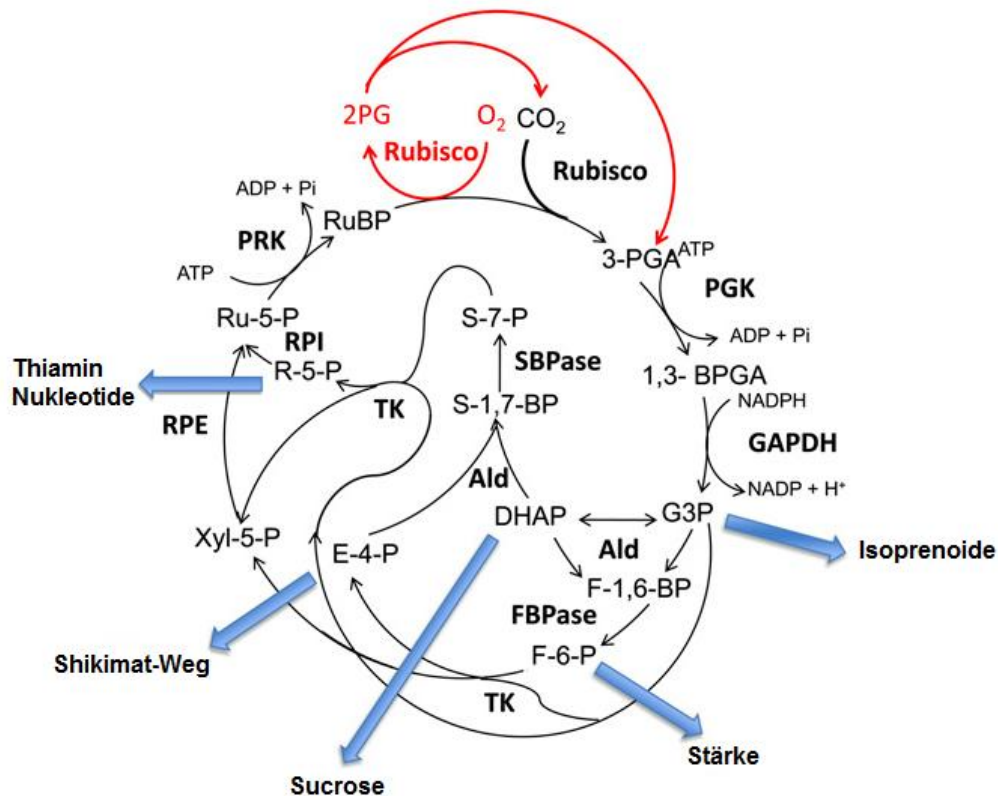
Temperaturen über 30°C führen zu einer Hemmung der Photosynthese durch eine reversible Abnahme der Aktivierung der RUBISCO (Kobza und Edwards, 1987; Robinson und Portis, 1988). Der Aktivierungszustand der RUBISCO hängt von der RUBISCO-Aktivase ab, welche bei Temperaturen über 30°C instabil ist (Eckardt und Portis, 1997; Salvucci *et al.*, 2001). Nach Salvucci und Crafts-Brandner (2004) ist die RUBISCO-Aktivase daher für die reversible, temperatur-abhängige Abnahme des Aktivierungszustands der RUBISCO verantwortlich. Die Einführung einer thermos-

tabilen RUBISCO-Aktivase in eine Arabidopsis Mutante mit deletierter Aktivase führte zu höheren Photosyntheseraten sowie mehr Biomasse und Samen im Vergleich zu Kontrollpflanzen, welche die Wildtyp-Aktivase exprimierten (Kurek *et al.*, 2007).

#### **1.1.6.4 Erhöhung der regenerativen Kapazität des Calvin-Zyklus**

An der Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptors RuBP sind acht Enzyme beteiligt (Abbildung 1.9). Mit Hilfe von entsprechenden Antisense Pflanzen konnten die drei Enzyme Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase), Transketolase (TK) und Aldolase als mögliche Ziele für die Erhöhung der Regenerationskapazität des C<sub>3</sub>-Zyklus identifiziert werden (Harrison *et al.*, 1998; Haake *et al.*, 1998; Henkes *et al.*, 2001; Raines, 2003). Und tatsächlich konnten durch die Überexpression einer bifunktionalen SBPase/FBPase aus Cyanobakterien beziehungsweise einer pflanzlichen SBPase in Tabak 6 bis 12% höhere Photosyntheseraten und bis zu 30% mehr Biomasse erreicht werden (Miyagawa *et al.*, 2001; Lefebvre *et al.*, 2005). Die Pflanzen wiesen außerdem eine größere Blattfläche und höhere Wachstumsrate während der frühen Entwicklungsphase auf (Lefebvre *et al.*, 2005). In Reis führte die Erhöhung der SBPase-Aktivität unter normalen Bedingungen nicht zu einer Steigerung der Photosynthese oder des Wachstums. Allerdings zeigten die Pflanzen unter Salzstress höhere Photosyntheseraten (Feng *et al.*, 2007a, 2007b).

Die Überexpression einer plastidären Transketolase führte hingegen zu keiner Erhöhung der Photosyntheserate. Die Pflanzen zeigten sogar vermindertes Wachstum und einen chlorotischen Phänotyp, was vermutlich auf ein gestörtes Gleichgewicht des Kohlenstoffexports aus dem Calvin-Zyklus zurückzuführen ist (Raines, 2011).



**Abbildung 1.9: Calvin-Zyklus**

Die Carboxylierungs-Reaktion von RUBISCO mit Ribulosebisphosphat (RuBP) als CO<sub>2</sub>-Akzeptor führt zu zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat (3-PGA). Anschließend folgt die reduktive Phase des Zyklus mit der Phosphorylierung des 3-PGA durch Phosphoglycerat-Kinase (PGK) zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPGA) und dessen Reduktion zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) durch Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Das G3P geht katalysiert durch eine Aldolase und entweder Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) oder Sedoheptulose-Bisphosphatase (SBPase) in die regenerative Phase des Zyklus ein. Fruktose-6-Phosphat (F-6-P) und Sedoheptulose-7-Phosphat (S-7-P) werden dann in durch Transketolase, Ribose-5-Phosphat (R-5-P)-Isomerase (RPI) und Ribulose-5-Phosphat (Ru-5-P)-Epimerase (RPE) katalysierten Reaktionen für die Produktion von Ru-5-P verwendet. Im letzten Schritt wird Ru-5-P katalysiert durch Ru-5-P-Kinase (PRK) zu RuBP umgesetzt. Die Oxygenase-Aktivität der RUBISCO führt zu je einem Molekül 3-PGA und 2-Phosphoglycerat (2PG). Je zwei Moleküle 2PG werden in der Photorespiration (in rot dargestellt) zu je einem Molekül 3-PGA und CO<sub>2</sub> umgewandelt. Die fünf Abzweigungspunkte aus dem Zyklus sind durch blaue Pfeile dargestellt. DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; E-4-P: Erythrose-4-Phosphat, Xyl-5-P: Xylulose-5-Phosphat (verändert nach Raines, 2011).

## 1.2 Ziel der Arbeit

Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung einer Technik zur Herstellung und Transformation von Multigen-Konstrukten sowie die Optimierung der CO<sub>2</sub>-Fixierung von C<sub>3</sub>-Pflanzen.

Die meisten agronomischen Eigenschaften in der Natur sind polygen und beruhen auf komplexen metabolischen und regulatorischen Wegen, welche mehrere Gene oder Genkomplexe umfassen. Eine Veränderung dieser Eigenschaften oder die

Übertragung neuer Wege erfordern die Integration multipler Transgene in das pflanzliche Genom. Da bisher nur wenige Methoden existieren, mit denen sich effektiv solche Multigen-Konstrukte herstellen und anschließend in Pflanzen übertragen lassen, sollte im ersten Teil der Arbeit eine entsprechende Technik etabliert werden. Die Methode beruht auf einem Gateway-basierten Vektor-System, welches die Fusion multipler Fragmente ermöglicht.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die CO<sub>2</sub>-Fixierung von C<sub>3</sub>-Pflanzen optimiert werden. Die Oxygenase-Aktivität der RUBISCO führt zur Oxidation von RuBP und so zur Bildung von Phosphoglycerat sowie Phosphoglykolat. Während das Phosphoglycerat direkt zur Synthese von Kohlenhydraten in den Benson-Calvin-Zyklus eingehen kann, muss das Phosphoglykolat zur Regeneration von Phosphoglycerat in der Photorespiration metabolisiert werden. Im Zuge dieses Weges wird in den Mitochondrien CO<sub>2</sub> freigesetzt, was zu einem Verlust von etwa 25% des im Phosphoglykolat gebundenen Kohlenstoffs führt (Leegood *et al.*, 1995). Durch zwei verschiedene Ansätze sollte daher versucht werden, die Photorespiration zu unterdrücken. Zum einen sollte ein „single cell“-C<sub>4</sub>-Mechanismus nach dem Vorbild *H. verticillata* in der C<sub>3</sub>-Pflanze Tabak installiert werden. Zum anderen sollte mit der Einführung des Glykolat-Weges aus *E. coli* in Reis eine direkte Umsetzung des Phosphoglykolats in den Chloroplasten erreicht werden. Beide Wege sollen zu einer Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebung der RUBISCO und dadurch zu einer Hemmung der Oxygenase-Aktivität führen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten allgemeinen Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), BioRad Laboratories GmbH (München), Boehringer Roche (Mannheim), Carl Rot GmbH (Karlsruhe), Invitex (Berlin), Invitrogen (Leck, NL), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), VWR (Darmstadt), Metabion (Martinsried), New England BioLabs (Frankfurt), PeqLab (Erlangen), Pharmacia (Freiburg), Promega (Madison, USA), QIAGEN (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen).

Die allgemeinen Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Applied Biosystems (Darmstadt), Beckman Coulter (Fullerton, USA), Biometra (Göttingen), BioRad Laboratories GmbH (München), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Heraeus (Osterode), Herolab (Wiesloch), Hettich Zentrifugen (Tuttlingen), Millipore (Eschborn), MWG Biotech (München), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg), Schott Glaswerke (Mainz), Sorvall (Bad Homburg), Wissenschaftliche Technische Werkstätten (Weilheim), Whatman (Maidstone, GB).

#### 2.1.2 Apparaturen, Geräte und Zubehör

Die verwendeten Geräte und das entsprechende Zubehör sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und Zubehör

Gerät und Zubehör	Hersteller
<b>Elektroporation</b>	
Gene Pulser™	BioRad Laboratories GmbH (München)
<b>Fotodokumentation</b>	
Herolab UVT-20 M	Herolab (Wiesloch)
<b>Gelelektrophorese-Apparaturen</b>	

Agarosegel-Apparaturen	Wissenschaftliche Werkstätten RWTH (Aachen)
<b>pH-Meter</b>	
WTW pH	Wissenschaftliche Technische Werkstätten (Weilheim)
<b>Photometer</b>	
SmartSpec Plus Spectrophotometer	BioRad Laboratories GmbH (München)
Einwegküvetten	Sarstedt (Nürnberg)
Quarzküvetten Suprasil® 104.002B-QS	Hellma (Müllheim)
<b>Real-Time-PCR System</b>	
ABI Prism® 7300	Applied Biosystems (Darmstadt)
ABI Prism® 7300 SDS Software	Applied Biosystems (Darmstadt)
<b>Thermocycler und Thermoblöcke</b>	
Biometra T personal	Biometra (Göttingen)
MWG Primus 96 plus	MWG Biotech (München)
PeqLab Primus 96 advance	PeqLab (Erlangen)
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems (Darmstadt)
<b>Zentrifugen und Rotoren</b>	
Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Megafuge 3.0R	Heraeus (Osterode)
Mikro 22	Hettich (Tuttlingen)
Sorvall RC 5 B Plus	Sorvall (Bad Homburg)
Rotor HFA 22.50	Heraeus (Osterode)
Optima L-100XP	Beckman-Coulter (Fullerton, USA)
Rotor SW 41 Ti	Beckman-Coulter (Fullerton, USA)
SpeedVac Savant	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<b>Photosynthesemessgerät</b>	
Licor Li-6400	Licor Biosciences (Lincoln, USA)

**ELISA-Reader**

BioTek ELx808

BioTek (Vermont, USA)

**Mikroskop**

Leica TCS SP

Leica (Wetzlar)

**2.1.3 Lösungen, Puffer und Medien**

Die meisten Lösungen, Puffer und Medien wurden wie von Sambrook und Russel, 2001 beschrieben hergestellt. Der pH-Wert wurde mit 1 M und 5 M NaOH, 1 M und 5 M KOH oder 1 M und 37%iger (v/v) HCl eingestellt. Die Sterilisation aller Lösungen, Puffer und Medien wurde durch Autoklavieren (20 min, 120 °C, 1 bar) oder für temperaturempfindliche Lösungen durch Filtration durch einen 0,2 µm Filter erreicht. Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, Puffer und Medien sind jeweils in der Beschreibung der verschiedenen Methoden aufgeführt.

**2.1.4 Größenstandards für Gelelektrophorese**

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Größenstandards für die Gelelektrophorese sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tabelle 2.2: Verwendete Größenstandards für die Gelelektrophorese**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
λ-DNA / PstI	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
1000 bp Marker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
100 bp Marker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
50 bp marker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

**2.1.5 Verwendete Reaktionskits**

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurden mehrere Reaktionskits verschiedener Hersteller benutzt. Die genauen Bezeichnungen, Hersteller und Verwendungszwecke sind Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Tabelle 2.3: Verwendete Reaktionskits

Name	Hersteller	Verwendungszweck
Invisorb <sup>®</sup> Spin PCRapace Kit	Invitek (Berlin)	Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten
Invisorb <sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit	Invitek (Berlin)	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen
QIAEX II <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid-Kit	Macherey-Nagel (Düren)	Isolierung von Plasmiden
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen (Leck, NL)	Subklonierung von PCR-Produkten
Gateway <sup>®</sup> LR Clonase <sup>®</sup> II Enzyme Mix	Invitrogen (Leck, NL)	MultiRound-Gateway-Klonierung
Platinum <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG with Rox	Invitrogen (Leck, NL)	Real-Time qPCR

### 2.1.6 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.4 angegeben.

Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme

Name	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt)
GoTaq-Polymerase	Promega (Mannheim)
Phire-Polymerase	Finnzymes/Fisher Scientific (Schwerte)
Phusion-Polymerase	Finnzymes/Fisher Scientific (Schwerte)
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Desoxyribonuklease I, RNase frei	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV-RT)	Promega (Mannheim)
Restriktionsenzyme, diverse	MBI Fermentas (St. Leon-Rot) New England Biolabs (Frankfurt)

## 2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Die in der Arbeit für Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide (Metabion, Martinsried) sind in den Tabelle 2.5 angegeben.

**Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide**

Die Zahlen geben die Nummern in der Instituts-Primerliste an.

Real-Time-PCR	Sequenz	Verwendungszweck
584_Actin2 Fw	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	Kontrolle der Actin2-Expression
585_Actin2 Rev	GGTGCAACGACCTTAATCTTCAT	
4506_PPT_RT_R	GACCACCACACGCTTCACAC	Kontrolle der PPT-Expression
4507_PPT_RT_F	CACTCTGCTTCCACGCATACC	
4510_Oac1_RT_R	AGCGTTACACCTTCGATTC	Kontrolle der Oac1-Expression
4511_Oac1_RT_F	TAGGTGTTGCCGTCGTTATG	
4512_ppdk_RT_F	GTCGTGCAGCAAATCCTAGC	Kontrolle der PPKD-Expression
4513_ppdk_RT_R	CCTTGCGATAGGAACCCTAAATGG	
4514_mdh_Sorgh_RT_R	TGGGCAACGCATTTCTTCTCAG	Kontrolle der SbMdh -Expression
4515_mdh_Sorgh_RT_F	GGGTGATGGTGATTACGAACTAGC	
4516_hvMe_RT_F	CGGCTTGGCCTTGTCTATGTC	Kontrolle der HvMe-Expression
4517_hvMe_RT_R	GCCCTTCTCGAAGTTCTCCTC	
4520_peps_RT_F	ACTGCTGTGCATGGCTATCC	Kontrolle der PEPS-Expression
4521_peps_RT_R	CATCAACCATGCGGCAAAGTC	
4522_mdh_E.coli_RT_R	GCCTTCAACGTAGGCACATTC	Kontrolle der EcMdh-Expression
4523_mdh_E.coli_RT_F	GTCTGCAACCCTGTCTATGG	
4524_Me_E.coli_RT_F	GCGTCACGTATCACCGATGAG	Kontrolle der EcMe-Expression
4525_Me_E.coli_RT_R	CAGTTCCGGCAGTACCATACC	
4526_PCK_RT_F	GATCATCGACGCCATCCACTC	Kontrolle der PCK-Expression
4527_PCK_RT_R	CCTTGTCGGTCCAGGTGTTG	
4546_stppc_RT_F_new	CCAGGCATTGCTGCATTGTTC	Kontrolle der stppc-Expression
4547_stppc_RT_R_new	GGAGGCTCTTTGTCTCCTCATAAC	
4571_FbCa_RT_F_neu	GACCCAGTCCTCAATGAAGTC	Kontrolle der FbCa-Expression
4572_FbCa_RT_R_neu	GCATCTCAAGGTGGAGCAGATAG	
4677_Nt_Actin9_F	CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA	Kontrolle der Actin9-Expression
4678_Nt_Actin9_R	AGGACCTCAGGACAACGGAAACG	
4695_FeSOD_RT2_F	GGCCTGGCTTGCATACAAAC	Kontrolle der FeSOD-Expression
4696_FeSOD_RT2_R	TCCCAAACGTGCATGGTGAG	
4697_ME1RTF	AGGACAGGAATATGCCGAAC	Kontrolle der NtNADP-ME1-Expression
4698_ME1RTR	CTAGTTCCGTACTTTGCAAGG	
4699_ME2RTF	TGGGCAGGAATACTATGACTTC	Kontrolle der NtNADP-ME2-Expression
4700_ME2RTR	GAGTGGTACCATATTTAGCCAAC	
4715_Ntppc_RT3_F	CCCGGTATTGCAGCTTTGTATG	Kontrolle der NtPEPC-Expression
4716_Ntppc_RT3_R	GAGGCTCCTTGTCTCCTCGTAG	

4717_ME2RTF_neu	TGGCTGCTCAAGTAACTGAGGAAC	Kontrolle der NtNADP-ME2-Expression
4718_ME2RTR_neu	GAGACGTGTTGCCACAACAAG	
1408_GCL_taqman-FW1	TATCGGGTACCGGTAGTCGTGGA	Kontrolle der GCL-Expression
1409_GCL-taqman-REV1	CAGGTTTCAGTCGGTGCGTCCG	
1410_TSR-taqman- FW1	TGCGCTGAACCTGCCAAACTGC	Kontrolle der TSR-Expression
1411_TSR-taqman-REV1	CGAGGGCCAGTTTATGGTTAGCCA	
1414_GlcE-taqman FW1	ATGCGACCCGCTTTAGTGCCGG	Kontrolle der GlcE-Expression
1415_GlcE taqman-REV1	ACATGCGACCGGGTTAAACACGC	
1416_GlcD-taqman-FW	CGATGAAATCACGACCTTCCATGCGG	Kontrolle der GlcD-Expression
1417_GlcD-taqman-REV1	TGCACATGCATGGCACCAAAATTCAGC	
1418_GlcF-taqman FW1	GCACGCCAGCTGCGGGATAACA	Kontrolle der GlcF-Expression
1419_GlcF-taqman-REV1	ATCCAGTGACGCACAGAGGTACGA	

### Klonierung

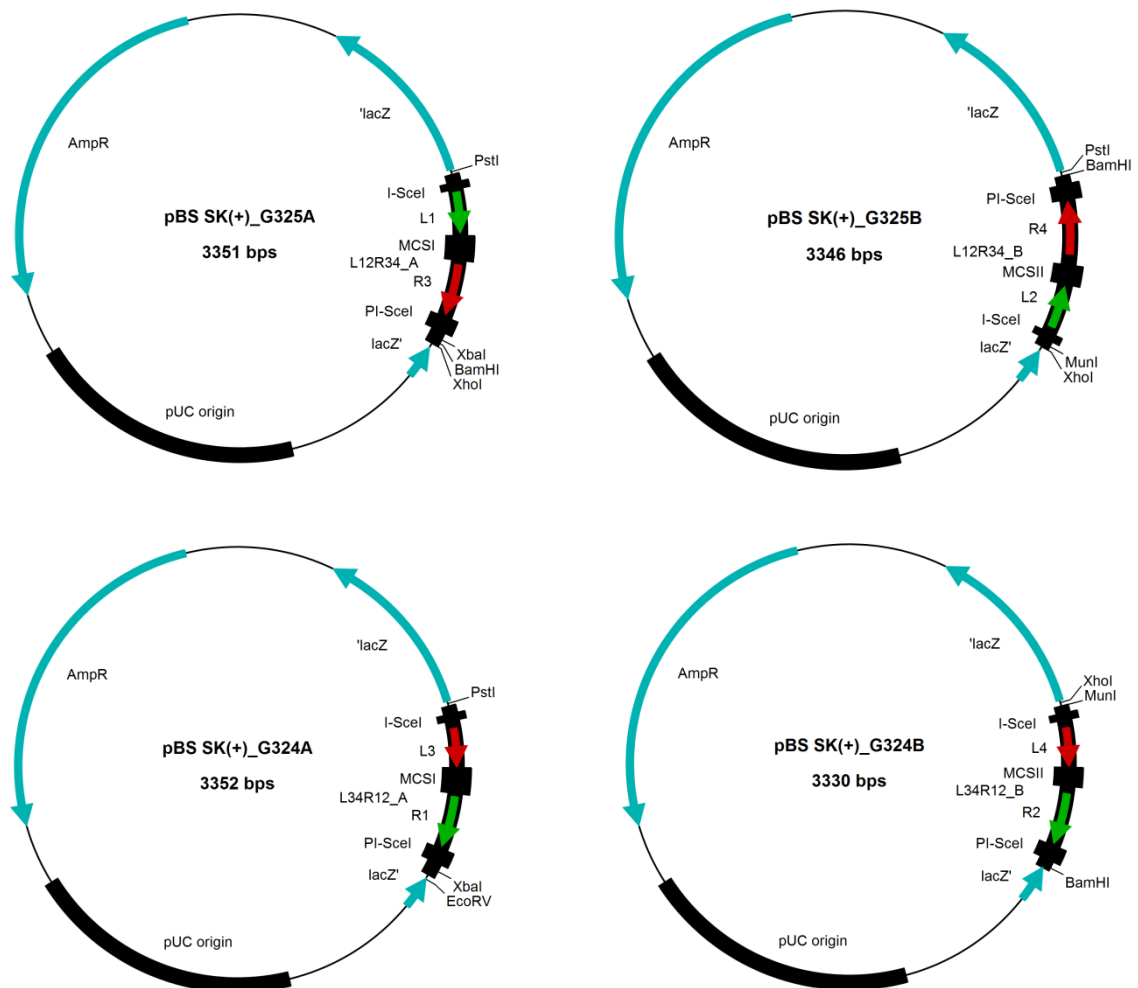
3269_pWBV8_SpecR_XbaI_F	CCTCTAGACCAAGAGCTTGTCTGGGAAGATTGAAC	Amplifikation von SpecR ( <i>aadA</i> )
3270_pWBV8_SpecR_BamHI_R	GAGGATCCATGCCATCGCAAGTACGAGGCTTAGAAC	
3476_AmpR+ori_MunI_F	GTACCAATTGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGG	Amplifikation von pUC origin und AmpR ( <i>bla</i> )
3477_AmpR+ori_PstI_R	CTGACTGCAGCGGGGAAATGTGCGCGGAAC	
3271_pEG301_CmR_XbaI_F	CCTCTAGATTAGGCACCCAGGCTTTACAC	Amplifikation von CmR ( <i>cat</i> )
3272_pEG301_CmR_XbaI_R	GGTCTAGATCAATAAACCGGGCGACCTCAG	
4122_pUC324/325_MCS_F	AAGCTTAGGCCTGTCGACATTAGCGGCGCGCCACAGAA TTCATCAGGTACCGATATCGGCCGGCC	Annealing für iMCS
4123_pUC324/325_MCS_R	AGCTGGCCGGCCGATATCGGTACCTGATGAATTCTGTG GCGCGCCGCTAATGTCGACAGGCCTAAGCTTCCGG	
3239_pEG301_R12_CmR_ccdB_AscI_F	CAGGCGCGCCACGTCTTGCGCACTGATTTG	Amplifikation von Gatewaykassette R12_CmR_ccdB
3240_pEG301_R12_CmR_ccdB_FseI_R	GAGGCCGGCCATCGTATGGGTACACCACTTTG	
4257_35S_PPT_pA35S_AscI_F	GGTCATGGCGCGCCCGGTCTCAGAAG	Amplifikation von PPT-Expressionskassette
4258_35S_PPT_pA35S_FseI_R	CGACTAGGCCGGCCGGTCACTGGATTTTG	
4085_LeRbcS_GCL_Bsal_F	CCTGGTGGTCTCACGCGTACAAGCTTGCAAGTAATAAA CCATATGATTG	Amplifikation PPK- und PCK-Expressionskassette
4086_LeRbcS_GCL_Bsal_R	GCTCTGGGTCTCGTCGACGCGGGCGCGTACATCTTG	
4260_TB3_AfIII_F	GGAGATCTTAAGCTGTCCCTGTTATGGAGTAATCG	Amplifikation von TB3 aus Lambda-DNA
4382_TB3_AfIII_R	GCAGTTCTTAAGCTTGCTCAAATGCTGCATTGATAC	
4309_FbCA_NcoI_F	GGAGTACCATGGGAAGTAAATCATATGATGAG	Amplifikation von FbCa
4310_FbCA_AscI_R	CCTGATGGCGCGCCTTATGCCCGGTAGTAGGTG	
4283_peps_Eco31I_F	CCTGGTGGTCTCACGCGTTAGTTGCATGTCCAACAATG GCTCGTCAC	Amplifikation von PEPS mit 3'g7-Terminations-/Polyadenylierungsregion
4086_LeRbcS_GCL_Bsal_R	GCTCTGGGTCTCGTCGACGCGGGCGCGTACATCTTG	
4098_cTP_PPT_MunI_F	CCTGGTCAATTGTCAACACAACATATACAAAACAAACGA ATC	Amplifikation von PPT-cTP
4099_cTP_PPT_NheI_R	GCTCTCGCTAGCCGTAGCTGCAGTTTTGAAG	
4100_Oac1_SpeI_F	CCTGGAAGTATGTCATCTGACAACTCTAAACAAG	Amplifikation von Oac1
4101_Oac1_NcoI_R	GCTCTGCCATGGGTTCCATAACGACGGCAACAC	
3227_TSR_AscI_F	CTGGCGCGCCAAATTCTATTAAAC	Amplifikation von TSR-Expressionskassette
3228_TSR_Acc65I_R	CAGGTACCGCCTCGTAGCTGAGG	
3229_GCL_AscI_F	GAGGCGCGCCAAACTTAAAAGTACAAATG	Amplifikation von GCL-Expressionskassette
3230_GCL_SalI_R	CAGTCGACCGGCCCCCTAAGCTCCAATCAC	
3231_GlcD_AscI_F	CAGGCGCGCCCTAGACAGTATAACAACAG	Amplifikation von glcD-

3232_GlcD_Acc65I_R	CAGGTACCGGCCCGATCCTAGCGACATG	Expressionskassette
3233_GlcE_AscI_F	GTGGCGCGCCGAGCTCCCTTTAATC	Amplifikation von glcE- Expressionskassette
3234_GlcE_Sall_R	GTGTGACCCGGCCGATCTCAAAGCATAGGAAAGG	
3235_GlcF_AscI_F	GAGGCGCGCCGTTTGTGCAGC	Amplifikation von glcF- Expressionskassette
3236_GlcF_Acc65I_R	GAGGTACCGGCCGGTCACTGGATTTTGG	
3243_Lambda_TB1_HindIII_F	GCAAGCTTTGTGTCAGGTTACCAACTACTAAG	Amplifikation von TB1 aus Lambda-DNA
3244_Lambda_TB1_Sall_R	GTGTGCACTATGCCAGCACGAACATTC	
3245_Lambda_TB2_HindIII_R	CCTCGCAATCCAGTGCAAAG	Amplifikation von TB2 aus Lambda-DNA
3246_Lambda_TB2_Sall_F	GAGTCGACATGTTCGTGTGGGCATAG	
4172_eGFP_MluI_F	GGTCACACGCGTTGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Amplifikation von eGFP
4173_eGFP_BamHI_R	GCACATGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	
4174_GlcD_eGFP_MluI_F	GGTCACACGCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Amplifikation von eGFP
4173_eGFP_BamHI_R	GCACATGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	
4175_cTP_eGFP_MluI_F	GGTCACACGCGTTAGGTGCATGGTGAGCAAGGGCGAG GAG	Amplifikation von eGFP
4176_cTP_eGFP_XbaI_R	GCACATTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	
<b>Kolonie-PCR</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendungszweck</b>
3472_PPT_F	ACATGAGCCTCGGGAAAGTCT	Kolonie-PCR auf PPT
865_pA35S	GCTCAACACATGAGCGAAACC	
4255_stppc_seq_F2	GTCTGAACTCAGTGGCAAGAGAC	Kolonie-PCR auf stppc
4225_stppc_AscI_R	CCATGTGGCGCGCCTAACCGGTGTCTGCATTCCAG	
3971_Oac1_R_XbaI	CCATCAGTCTAGATTAATTATGGCCTAAAACCTCTCGAC	Kolonie-PCR auf Oac1
4100_Oac1_SpeI_F	CCTGGAAGTATGTCATCTGACAACTCTAAACAAG	
4048_PPDK_F_Bpil+PagI	GGACCAGAAGACCTCATGATGAGTTCGTTGTCTGTTGA AG	Kolonie-PCR auf PPDK
4052_PPDK_R	CAGCAGTGAGATCGGTGTGCGAGATG	
4281_mdh_sorgh_NcoI_F	GCTGATCCATGGGCCTCTCAACGGCTTAC	Kolonie-PCR auf SbMdh
4282_mdh_sorgh_BamHI_R	CCAGTTGGATCCCCTAAACTACACTTCTCCCGGTAGC	
3545_hvME_Seq1_F	GCTTGTTGCGCAGTGCATTC	Kolonie-PCR auf HvMe
3546_hvME_Seq2_R	CAAAGGACTCGCCTTCACAG	
4309_FbCA_NcoI_F	GGAGTACCATGGGAAGTAAATCATATGATGAG	Kolonie-PCR auf FbCa
4310_FbCA_AscI_R	CCTGATGGCGCGCCTTATGCCCGGTAGTAGGTG	
3874_3_peps_SE_F	GAAACCGTGCCTCACGCGTTCAGGTCATGGAG	Kolonie-PCR auf PEPS
4284_peps_Eco31I_R	GGTCCAGGTCTCACGCGTTATTTCTTCAGTTCAGCCAG GCTTAACC	
3978_mdh_F	GCTGACACGCGTTAGGTGCATGAAAGTCGCAGTCCTC	Kolonie-PCR auf EcMdh
3979_mdh_R	CCATCGTCTAGATTACTTATTAACGAACTCTTCGCCAG	
4256_Me_seq_F	GATTGTGGTACTGACGGTGAAC	Kolonie-PCR auf EcMe
4223_Me_XbaI_R	GCTCTGTCTAGATTAGATGGAGGTACGGCGGTAGTC	
4233_PCK_Eco31I(MluI)_F	CCTGGTGGTCTCACGCGTTAGGTGCATGGCATC	Kolonie-PCR auf PCK
4234_PCK_Eco31I(MluI)_R	GGTCCAGGTCTCACGCGTCAGAAGTTGGGGCCTGCGG CAAG	

## 2.1.8 Verwendete Plasmide

### 2.1.8.1 Entry-Plasmide für Gateway-Rekombination

Die Regionen mit den Attachment sites (L1/2/3/4 bzw. R1/2/3/4) wurden von der Firma Eurofins Medigenomix (Ebersberg) synthetisiert und in den Plasmiden pBS SK(+)\_G325A, pBS SK(+)\_G325B, pBS SK(+)\_G324A sowie pBS SK(+)\_G324B zur Verfügung gestellt (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Plasmide mit den synthetisierten Attachment sites**

L12R34\_A/B und L34R12\_A/B: synthetisierte Regionen mit den Attachment sites L1/2/3/4 bzw. R1/2/3/4; AmpR:  $\beta$ -Laktamase (*bla*) als Selektionsmarker in *E. coli*; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; lacZ:  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase; I-SceI und PI-SceI: Erkennungssequenzen für Homing Endonukleasen; MCS I und MCS II: Multiple Cloning Sites.

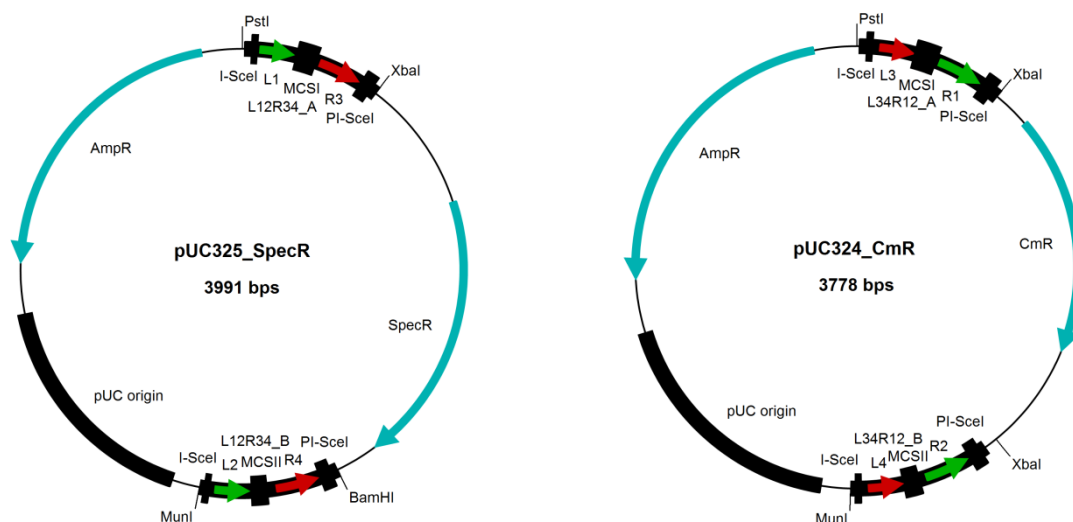
Die folgenden Plasmide wurden als Entry-Plasmide für die MultiRound Gateway Klonierung verwendet (Abbildung 2.2). pUC325\_SpecR wurde erhalten, indem das

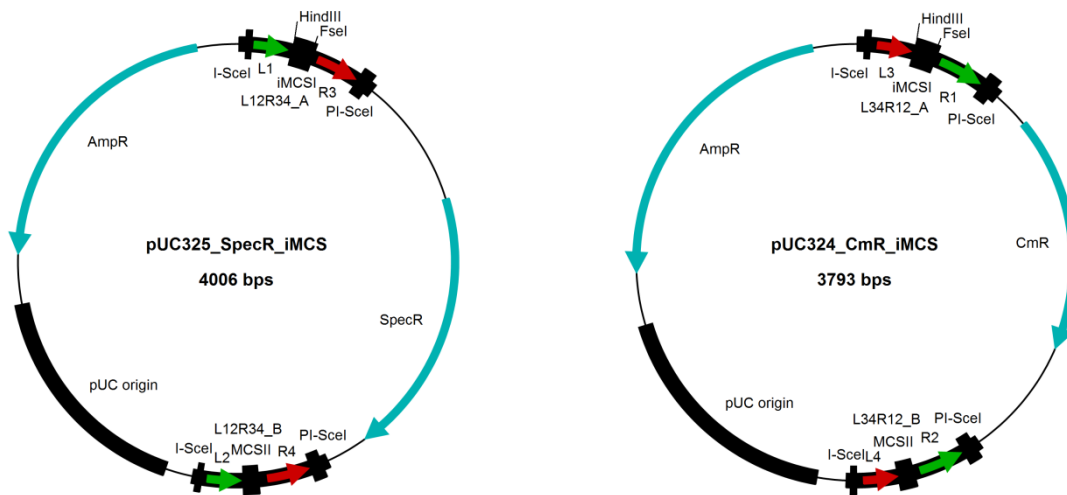


Spectinomycin-Resistenzgen *aadA* (Spectinomycin/Streptomycin-Nukleotidyltransferase) mit den Primer 3269 und 3270 per PCR aus dem Vektor pWBVec8 amplifiziert und in die Schnittstellen *XbaI* und *BamHI* des Vektors pBS SK(+)\_G325A ligiert wurde. Außerdem wurde die Region mit den Attachment sites L2 und R4 aus dem Vektor pBS SK(+)\_G325B über *BamHI* und *XhoI* kloniert. Um unerwünschte Schnittstellen im *lacZ*-Gen ( $\alpha$ -Fragment) des pBS-Plasmids zu entfernen, wurde das Backbone des Plasmids ausgetauscht. Hierzu wurde die Region mit dem pUC origin und  $\beta$ -Laktamase-Gen aus dem Vektor pBS KS(+) mit den Primer 3476 und 3477 mittels PCR amplifiziert und in die Schnittstellen *MunI* und *PstI* ligiert.

Für pUC324\_CmR wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *cat* (Chloramphenicol-Acetyltransferase) aus dem Vektor pEG301 mit Hilfe der Primer 3271 und 3272 durch PCR amplifiziert und in die *XbaI*-Schnittstelle von pBS SK(+)\_G324A ligiert. Des Weiteren wurde die Region mit den Attachment sites L4 und R2 mit *BamHI* und *XhoI* aus dem Vektor pBS SK(+)\_G324B ausgeschnitten und „blunt end“ in die *EcoRV*-Schnittstelle kloniert. Analog zu pUC325\_SpecR wurde das Backbone des Entry-Plasmids ausgetauscht.

Bei den Entry-Plasmiden pUC325\_SpecR\_iMCS und pUC\_324\_CmR\_iMCS wurde die Multiple Cloning Site gegen eine invertierte Version ausgetauscht. Hierzu wurde die entsprechende Sequenz als Oligonukleotide (4122 und 4123) synthetisiert und nach Annealing über die Schnittstellen *HindIII* und *FseI* integriert.



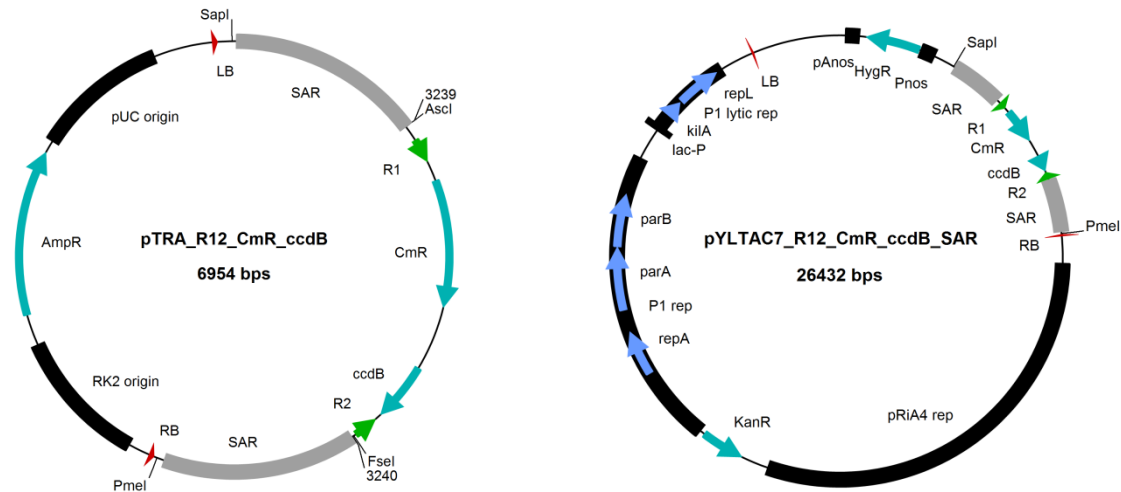


### Abbildung 2.2: Entry-Plasmide für Gateway-Rekombination

L12R34\_A/B und L34R12\_A/B: synthetisierte Regionen mit den Attachment sites L1/2/3/4 bzw. R1/2/3/4; AmpR:  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*) als Selektionsmarker in *E. coli*; CmR: Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*) als Selektionsmarker in *E. coli*; SpecR: Spectinomycin/Streptomycin-Nukleotidyltransferase-Gen (*aadA*) als Selektionsmarker in *E. coli*; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; lacZ:  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase; I-SceI und PI-SceI: Erkennungssequenzen für Homing Endonukleasen; MCS I und MCS II: Multiple Cloning Sites, iMCS I: invertierte MCS I.

### 2.1.8.2 Destination-Plasmide für Gateway-Rekombination

Es wurden zwei verschiedene Destination-Vektoren konstruiert (Abbildung 2.3). Für den ersten Vektor pTRA\_R12\_CmR\_ccdB wurde die Gateway-Kassette mit den Attachment sites R1 und R2 sowie den Selektionsmarkern CmR und *ccdB* aus dem pEarleyGate Vektor pEG301 (Arabidopsis Biological Resource Center, Columbus, USA) mittels PCR amplifiziert (Primer 3239 und 3240) und in die Schnittstellen *Ascl* und *FseI* des Vektors pTRA-c (freundlicherweise von Dr. Thomas Rademacher, Institut für Biologie I, RWTH Aachen zur Verfügung gestellt) ligiert. Der zweite Destination-Vektor pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB wurde erhalten, indem die Gateway-Kassette zusammen mit den SAR-Elementen mit *SapI* und *PmeI* aus pTRA\_R12\_CmR\_ccdB ausgeschnitten und nach Auffüllen des *SapI*-Endes in die *PmeI*-Schnittstelle von pYLTA7 (RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan) ligiert wurde.



**Abbildung 2.3: Destination-Vektoren für Gateway-Rekombination**

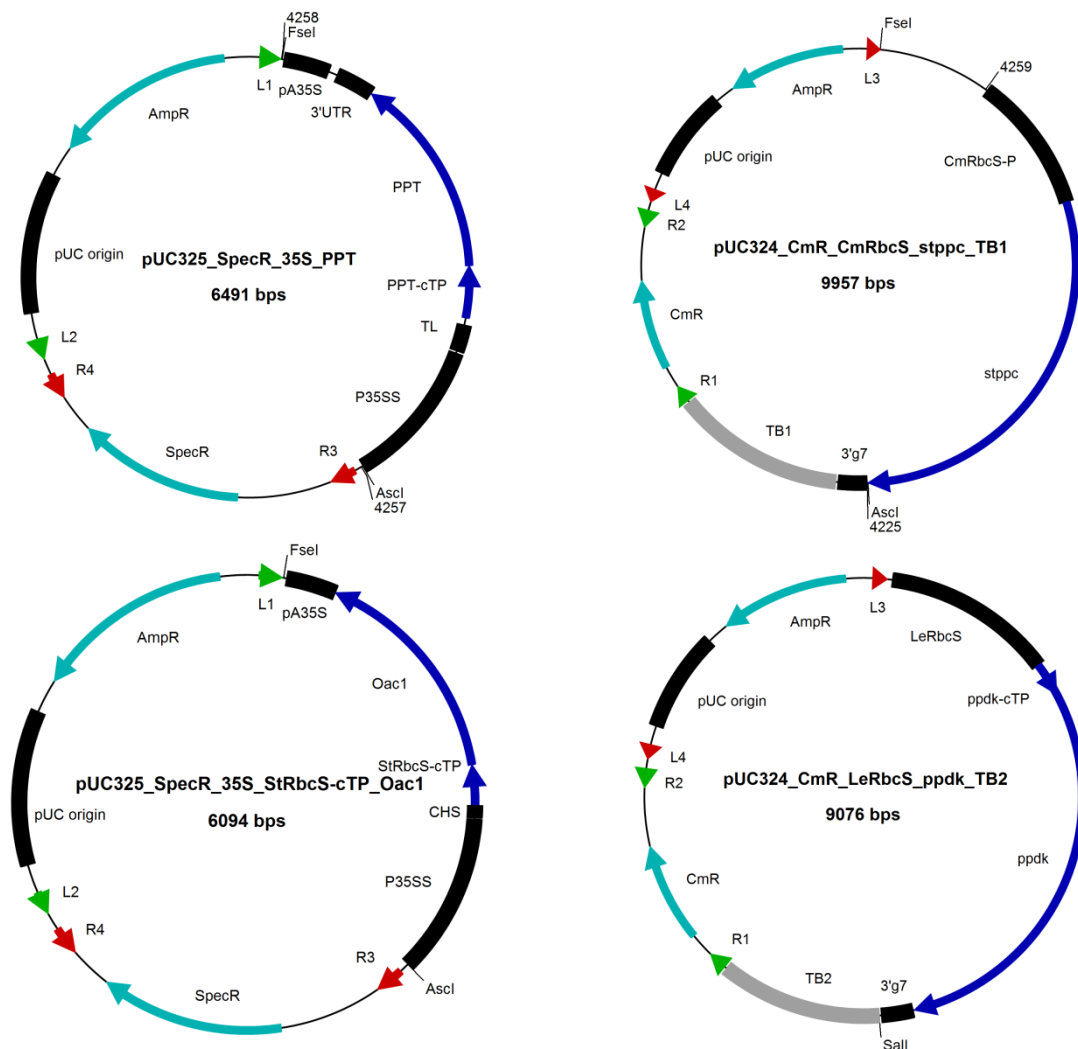
R1 und R2: Attachment sites; AmpR:  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*) als Selektionsmarker in Bakterien (vermittelt Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, z.B. Ampicillin); *ccdB*: letales Gen für negative Selektion in *E. coli*; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; RK2 origin: Replikationsursprung für Vektor in Agrobakterien; SAR: Scaffold attachment region; LB/RB: linke/rechte Border des Nopalini-Ti-Plasmids pTiT37; pRiA4 rep: „single-copy“ Replikationsursprung aus *A. rhizogenes* für Replikation des Vektors in Agrobakterien; P1 rep: „single-copy“ Replikationsursprung aus Phage P1 für Replikation des Vektors in *E. coli*; P1 lytic rep: induzierbares lytisches Replikon aus Phage P1 für Replikation des Vektors in *E. coli* mit höheren Kopiezahlen; lac-P: Laktose-Promotor; KanR: Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*neoII*) als Selektionsmarker in Bakterien (vermittelt Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika, z.B. Kanamycin); HygR: Hygromycin B Phosphotransferase-Gen (*hph*) als Selektionsmarker in transgenen Pflanzen; Pnos: Promotor des Nopalini-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*; pAnos: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Nopalini-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*.

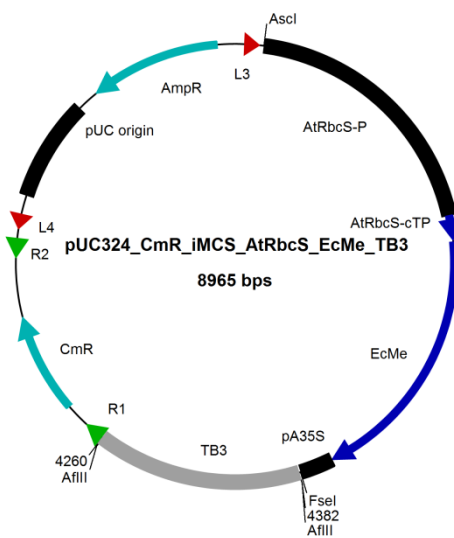
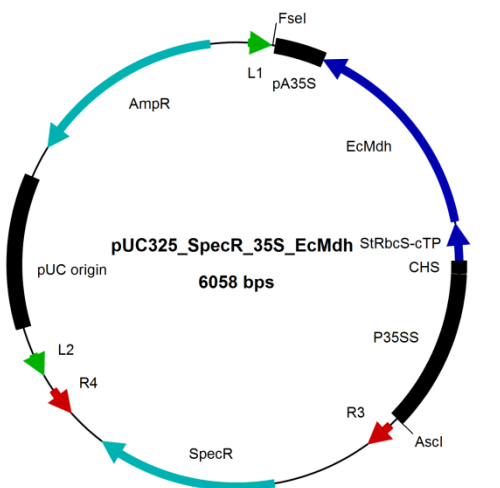
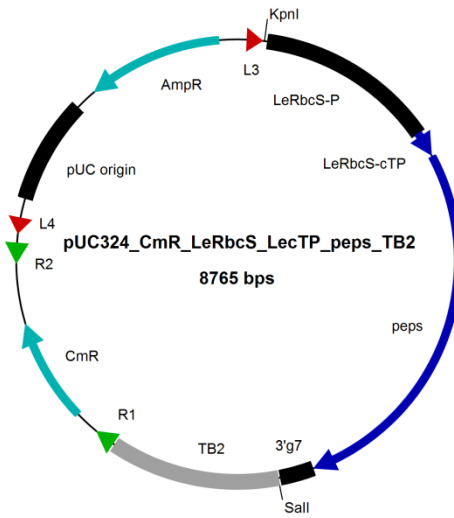
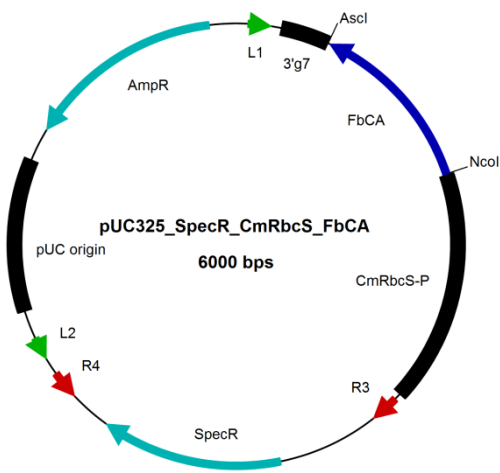
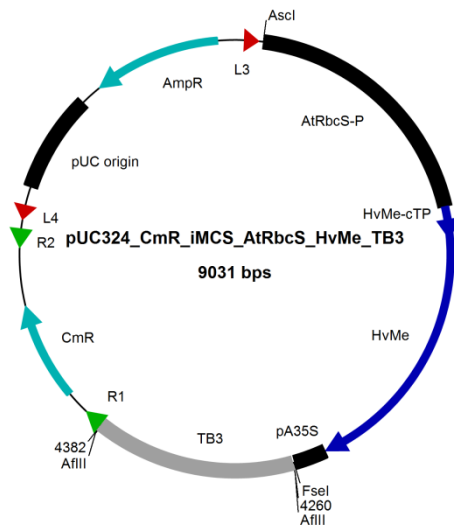
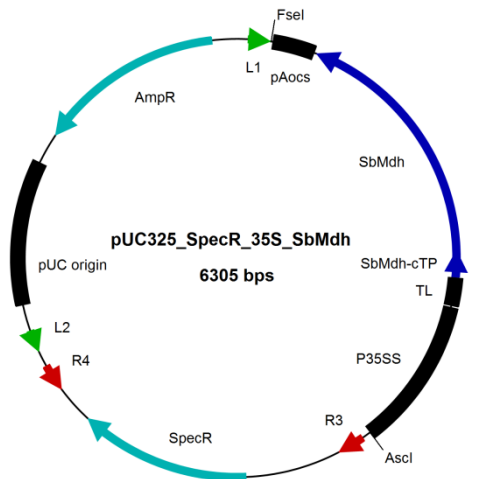
### 2.1.8.3 Entry-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen

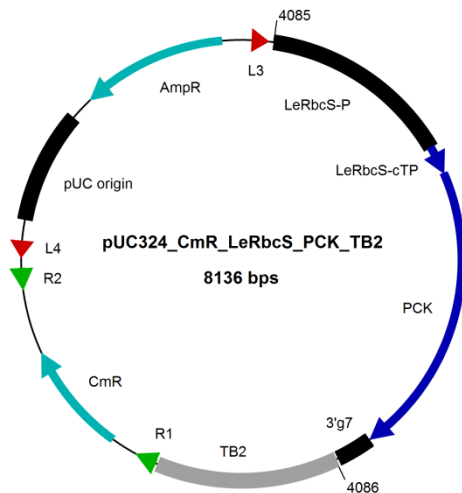
Die Entry-Plasmide mit den C<sub>4</sub>-Genen (Abbildung 2.4) wurden mit Hilfe verschiedener Klonierungstechniken konstruiert. Das Plasmid pUC325\_SpecR\_35S\_PPT wurde durch Ligation der PPT-Expressionskassette mit 35SS-Promotor und pA35S-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz in die Schnittstellen *Ascl* und *FseI* des Entry-Vektors pUC325\_SpecR erhalten. Hierfür wurde die PPT-Expressionskassette durch PCR amplifiziert (Primer 4257 und 4258). Als Template diente das Plasmid Spk\_PPT. Für den Vektor pUC324\_CmRbcS\_stppc\_TB1 wurde das stppc-Gen zusammen mit dem CmRbcS-Promotor aus dem Plasmid pTRAK\_CmRbcS\_stppc mit den Enzymen *FseI* und *Ascl* ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pUC324\_CmRbcS\_GCL\_TB1 ligiert. Die Oac1-Expressionskassette mit 35SS-Promotor und pA35S-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz wurde mit den Enzymen *Ascl* und *FseI* aus dem Plasmid pTRAK\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1 ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pUC325\_SpecR ligiert,

wodurch pUC325\_SpecR\_StRbcS-cTP\_Oac1 erhalten wurde. Die PPK-Expressions-kassette mit LeRbcS-Promotor und 3'g7-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz wurde mittels PCR aus dem Plasmid pTRAK\_LeRbcS\_ppdk amplifiziert (Primer 4085 und 4086) und in die Schnittstellen *Ascl* und *SaII* des Vektors pUC324\_CmR\_ZmRbcS\_GlcE\_TB2 ligiert. Dies ergab den Vektor pUC324\_CmR\_LeRbcS\_ppdk\_TB2. Das Plasmid pUC325\_SpecR\_35S\_SbMdh wurde erhalten, indem die SbMdh-Expressions-kassette mit 35SS-Promotor und pAocs-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz mit den Enzymen *Ascl* und *FseI* aus pTRAK\_35S\_SbMdh ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pUC325\_SpecR ligiert wurde. Für den Vektor pUC324\_CmR\_iMCS\_AtRbcS\_HvMe\_TB3 wurde die HvMe-Expressions-kassette mit AtRbcS-Promotor und pA35S-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz mit den Enzymen *Ascl* und *FseI* aus pTRAK\_AtRbcS\_HvMe ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pUC324\_CmR\_iMCS ligiert. Außerdem wurde der Transkriptionsblocker TB3 mittels PCR aus Lambda-DNA amplifiziert (Primer 4260 und 4382) und in die *AflI*-Schnittstelle des Vektors kloniert. Das FbCA-Gen wurde mittels PCR aus pTRAPT\_35S\_FbCA amplifiziert (Primer 4309 und 4310) und in die Schnittstellen *NcoI* und *Ascl* des Vektors pUC325\_SpecR\_CmRbcS\_TSR ligiert. Das peps-Gen wurde zusammen mit der 3'g7-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz mittels PCR aus pTRAK\_CmRbcS\_peps\_3'g7 (freundlicherweise von Pratibha Kamble, Institut für Biologie I, RWTH Aachen zur Verfügung gestellt) amplifiziert (Primer 4283 und 4086) und in die Schnittstellen *MluI* und *SaII* des Vektors pUC324\_CmR\_LeRbcS\_GCL\_TB1 ligiert. Anschließend wurde die PEPS-Expressions-kassette mit LeRbcS-Promotor und 3'g7-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz mit den Enzymen *KpnI* und *SaII* aus dem erhaltenen Vektor pUC324\_CmR\_LeRbcS\_peps\_TB1 ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pUC324\_CmR\_LeRbcS\_ppdk\_TB2 ligiert. Dadurch wurde der Vektor pUC324\_CmR\_LeRbcS\_peps\_TB2 erhalten. Das Plasmid pUC325\_SpecR\_35S\_EcMdh ergab sich durch Ausschneiden der EcMdh-Expressions-kassette mit 35SS-Promotor und pA35S-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz aus pTRAK\_35S\_EcMdh mit den Enzymen *Ascl* sowie *FseI* und anschließender Ligation in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pUC325\_SpecR. Für den Vektor pUC324\_CmR\_iMCS\_AtRbcS\_EcMe\_TB3 wurde

die EcMe-Expressionskassette mit AtRbcS-Promotor und pA35S-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz mit den Enzymen *Ascl* und *Fsel* aus pTRAK\_AtRbcS\_EcMe ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pUC324\_CmR\_iMCS ligiert. Außerdem wurde analog zu pUC324\_CmR\_AtRbcS\_HvMe\_TB3 der Transkriptionsblocker TB3 in die *AflI*-Schnittstelle des Vektors kloniert. Die PCK-Expressionskassette mit LeRbcS-Promotor und 3'g7-Polyadenylierungs-/Terminationssequenz wurde mittels PCR aus dem Plasmid pTRAK\_LeRbcS\_PCK amplifiziert (Primer 4085 und 4086) und in die Schnittstellen *Ascl* und *Sall* des Vektors pUC324\_CmR\_ZmRbcS\_GlcE\_TB2 ligiert. Dies ergab den Vektor pUC324\_CmR\_LeRbcS\_PCK\_TB2.







**Abbildung 2.4: Entry-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen**

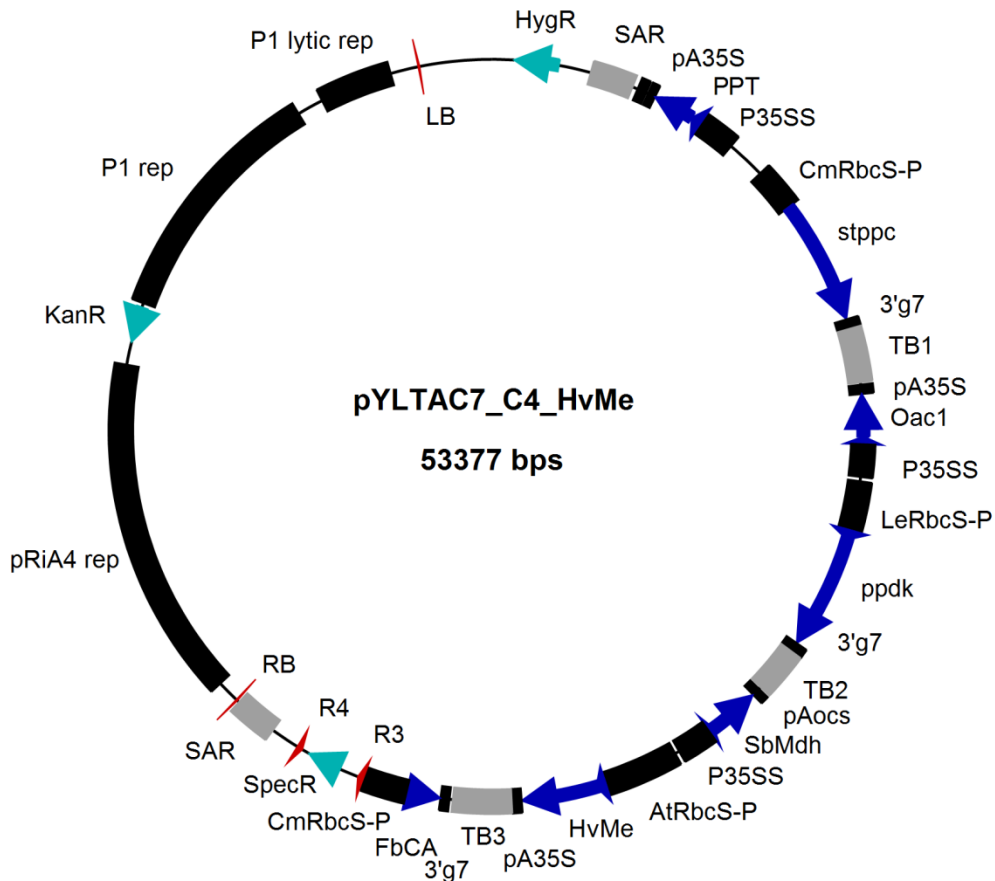
L1/2/3/4 und R1/2/3/4: Attachment sites; AmpR:  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*) als Selektionsmarker in Bakterien (vermittelt Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, z.B. Ampicillin); CmR: Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*) als Selektionsmarker in *E. coli*; SpecR: Spectinomycin/Streptomycin-Nukleotidyltransferase-Gen (*aadA*) als Selektionsmarker in *E. coli*; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; TB1/2/3: AT-reiche Sequenzen aus Lambdaphage als Transkriptions-Blocker; PPT und PPT-cTP: Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator inklusive Transitpeptid aus *B. oleracea* var. *botrytis* L.; stppc: modifizierte Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *S. tuberosum*; Oac1: Oxalacetat-Translokator aus *S. cerevisiae*; ppdk und ppdk-cTP: Pyruvathosphatkinase inklusive Transitpeptid aus *F. trinervia*; SbMdh und SbMdh-cTP: Malatdehydrogenase inklusive Transitpeptid aus *S. bicolor*; HvMe und HvMe-cTP: Malat-Enzym inklusive Transitpeptid aus *H. verticillata*; FbCA: Carboanhydrase aus *F. bidentis*; peps: Phosphoenolpyruvat-Synthase aus *E. coli*; EcMdh: Malatdehydrogenase aus *E. coli*; EcMe: Malat-Enzym aus *E. coli*; PCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *U. panicoides*; CmRbcS-P und CmRbcS-cTP: Promotorsequenz bzw. Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *Chrysanthemum*; LeRbcS-P und LeRbcS-cTP: Promotorsequenz bzw. Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. lycopersicum*; AtRbcS-P und AtRbcS-cTP: Promotorsequenz bzw. Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *A. thaliana*; P35SS: Promotorsequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus; StRbcS-cTP: Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. tuberosum*; CHS: 5'untranslatierte Region des Chalcon-Synthase-Gens; TL: 5'untranslatierte Region aus *Tobacco etch virus*; pA35S: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus; 3'g7: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz von Gen 7 aus *A. tumefaciens*; pAocs: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Octopin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*.

### 2.1.8.4 Destination-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen

Die Plasmide pYLTA7\_C4\_HvMe (Abbildung 2.5), pYLTA7\_C4\_Me (Abbildung 2.6) und pYLTA7\_C4\_PCK (Abbildung 2.7) wurden durch MultiRound-Gateway-Rekombination erhalten. Für die drei Vektoren wurden sukzessive folgende Entry-Plasmide in das Destination-Plasmid pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR rekombiniert:

- I. pYLTA7\_C4\_HvMe
  - 1) pUC325\_SpecR\_35S\_PPT
  - 2) pUC324\_CmR\_CmRbcS\_stppc\_TB1
  - 3) pUC325\_SpecR\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1

- 4) pUC324\_CmR\_LeRbcS\_ppdk\_TB2
- 5) pUC325\_SpecR\_35S\_SbMdh
- 6) pUC324\_CmR\_AtRbcS\_HvMe\_TB3
- 7) pUC325\_SpecR\_CmRbcS\_FbCA



**Abbildung 2.5: pYLTA7\_C4\_HvMe**

Die Orientierung der Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet. PPT: Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator aus *B. oleracea* var. *botrytis* L.; stppc: modifizierte Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *S. tuberosum*; Oac1: Oxalacetat-Translokator aus *S. cerevisiae*; ppdk: Pyruvatorthophosphatdikinase aus *F. trinervia*; SbMdh: Malatdehydrogenase aus *S. bicolor*; HvMe: Malat-Enzym aus *H. verticillata*; FbCA: Carboanhydrase aus *F. bidentis*.

Andere wichtige Regionen des Plasmids siehe Destination-Plasmid pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR und Entry-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen.

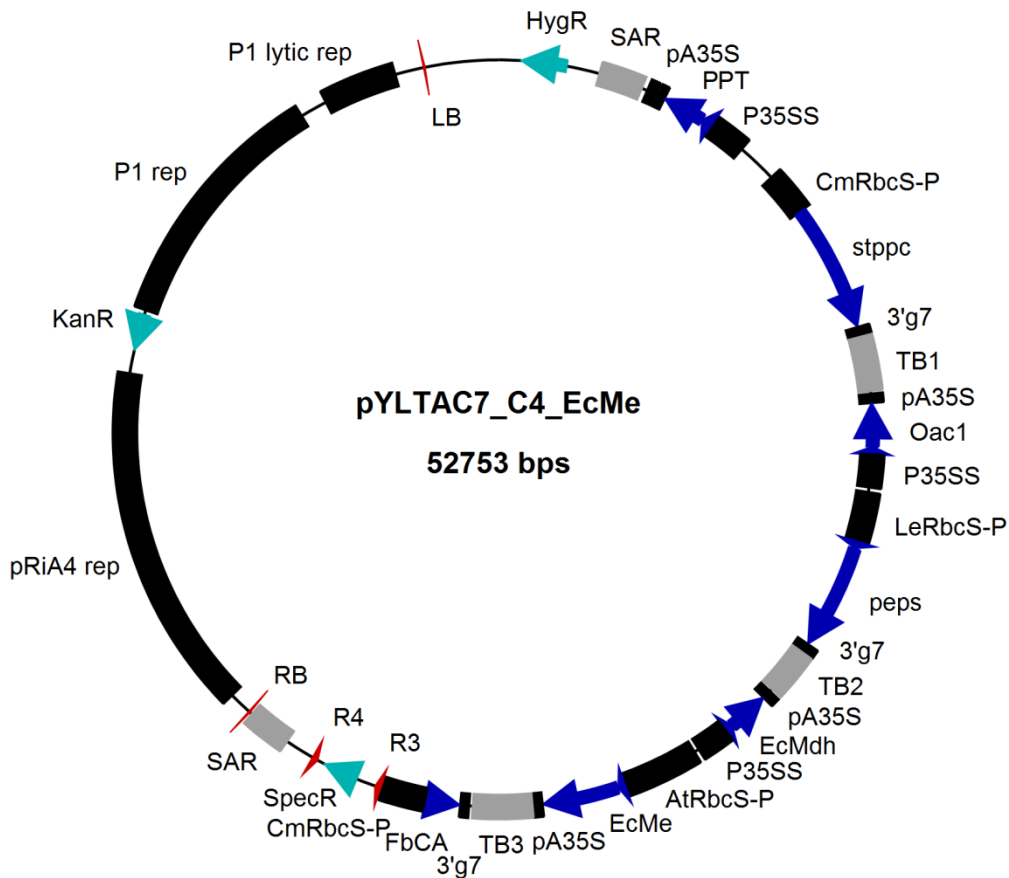
II. pYLTA7\_C4\_Me

- 1) pUC325\_SpecR\_35S\_PPT
- 2) pUC324\_CmR\_CmRbcS\_stppc\_TB1
- 3) pUC325\_SpecR\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1
- 4) pUC324\_CmR\_LeRbcS\_peps\_TB2
- 5) pUC325\_SpecR\_35S\_EcMdh



6) pUC324\_CmR\_AtRbcS\_EcMe\_TB3

7) pUC325\_SpecR\_CmRbcS\_FbCA



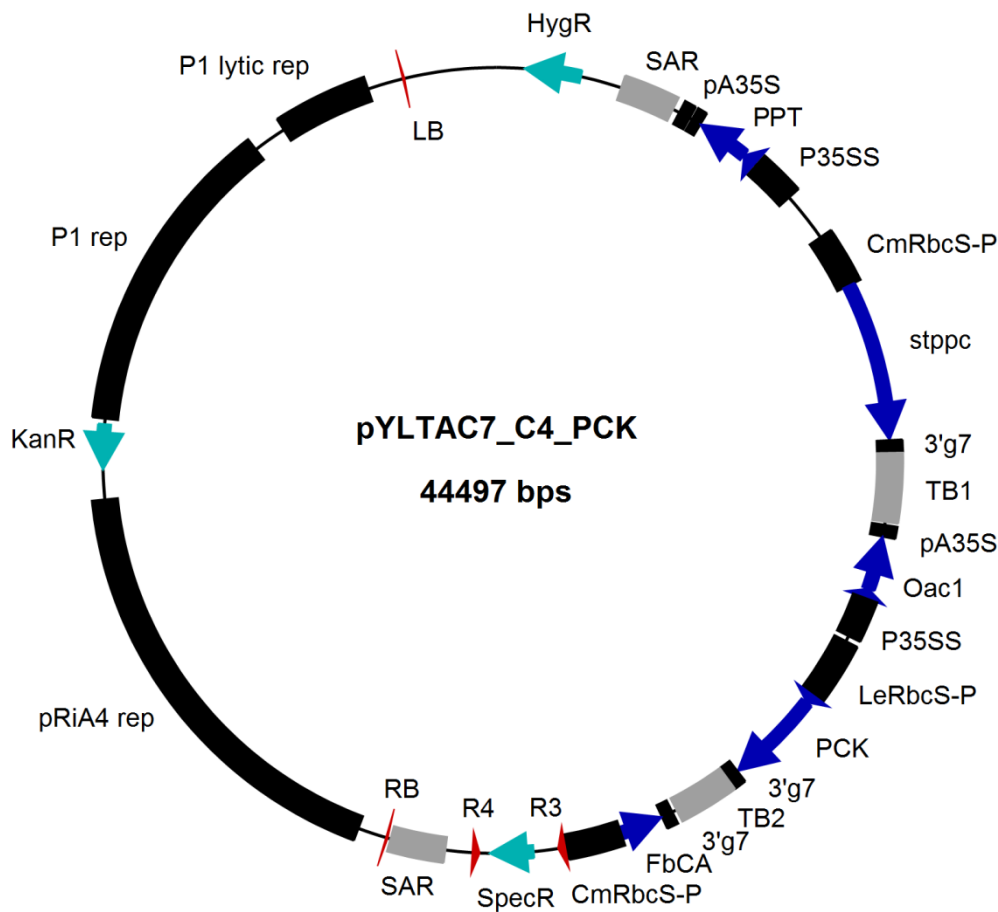
### Abbildung 2.6: pYLTA7\_C4\_EcMe

Die Orientierung der Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet. PPT: Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator aus *B. oleracea* var. *botrytis* L.; stppc: modifizierte Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *S. tuberosum*; Oac1: Oxalacetat-Translokator aus *S. cerevisiae*; peps: Phosphoenolpyruvat-Synthase aus *E. coli*; EcMdh: Malatdehydrogenase aus *E. coli*; EcMe: Malat-Enzym aus *E. coli*; FbCA: Carboanhydrase aus *F. bidentis*.

Andere wichtige Regionen des Plasmids siehe Destination-Plasmid pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR und Entry-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen.

### III. pYLTA7\_C4\_PCK

- 1) pUC325\_SpecR\_35S\_PPT
- 2) pUC324\_CmR\_CmRbcS\_stppc\_TB1
- 3) pUC325\_SpecR\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1
- 4) pUC324\_CmR\_LeRbcS\_PCK\_TB2
- 5) pUC325\_SpecR\_CmRbcS\_FbCA



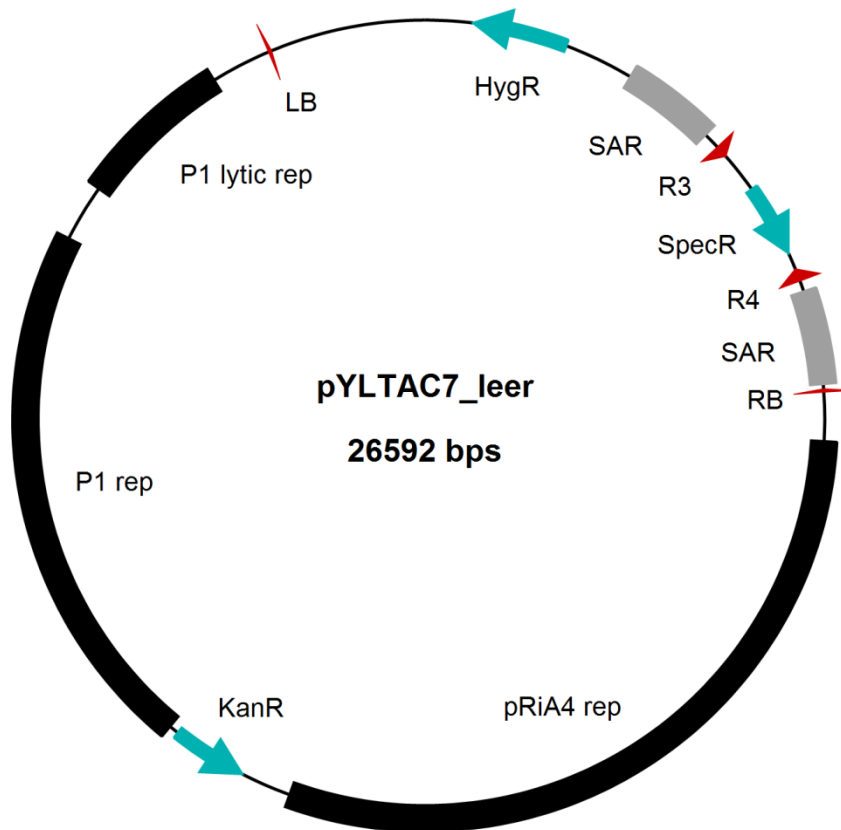
### Abbildung 2.7: pYL TAC7\_C4\_PCK

Die Orientierung der Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet. PPT: Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator aus *B. oleracea* var. *botrytis* L.; stppc: modifizierte Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *S. tuberosum*; Oac1: Oxalacetat-Translokator aus *S. cerevisiae*; PCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase aus *U. panicoides*; FbCA: Carboanhydrase aus *F. bidentis*.

Andere wichtige Regionen des Plasmids siehe Destination-Plasmid pYL TAC7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR und Entry-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen.

### 2.1.8.5 Leeres Destination-Plasmid

Das Plasmid pYL TAC7\_leer (Abbildung 2.8) wurde durch Gateway-Rekombination des leeren Entry-Vektors pUC325\_SpecR in den Destination-Vektor pYL TAC7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR erhalten.



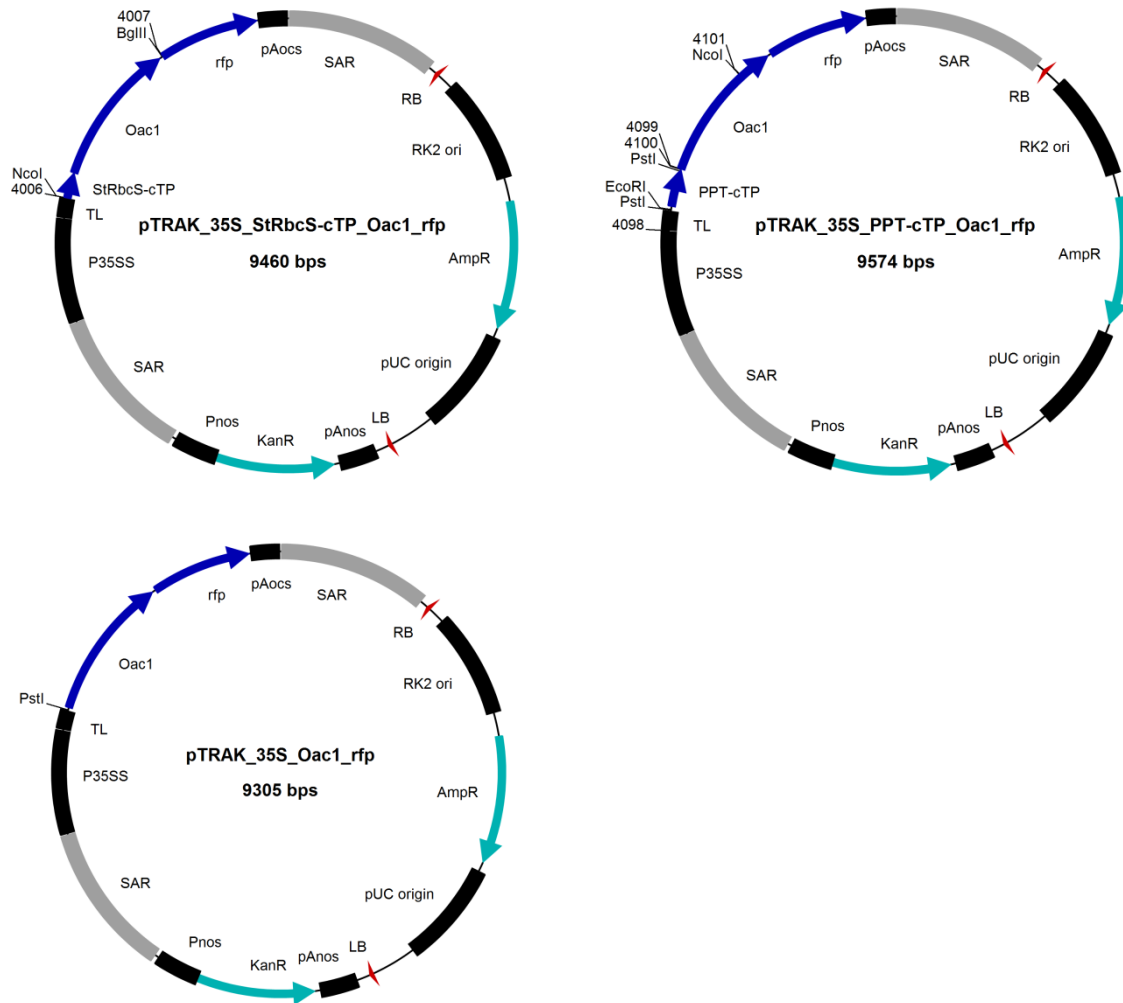
**Abbildung 2.8: pYL7AC7\_leer**

R3 und R4: Attachment sites; SpecR: Spectinomycin/Streptomycin-Nukleotidyltransferase-Gen (*aadA*) als Selektionsmarker in *E. coli*.

Andere wichtige Regionen des Plasmids siehe Destination-Plasmid pYL7AC7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR.

### 2.1.8.6 Plasmide für Oac1-Lokalisationsanalysen

Die folgenden Plasmide wurden für die Oac1-Lokalisationsanalysen verwendet. Während die RFP-Plasmide (Abbildung 2.9) zum Nachweis der Protein-Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie dienen, wurden die pCR2.1-TOPO-Vektoren (Abbildung 2.10) für den *in vitro* Import-Assay benötigt. Dank eines T7-Promotors kann die integrierte Sequenz *in vitro* transkribiert werden. Die erhaltene mRNA kann dann in einem weiteren Schritt *in vitro* translatiert werden.

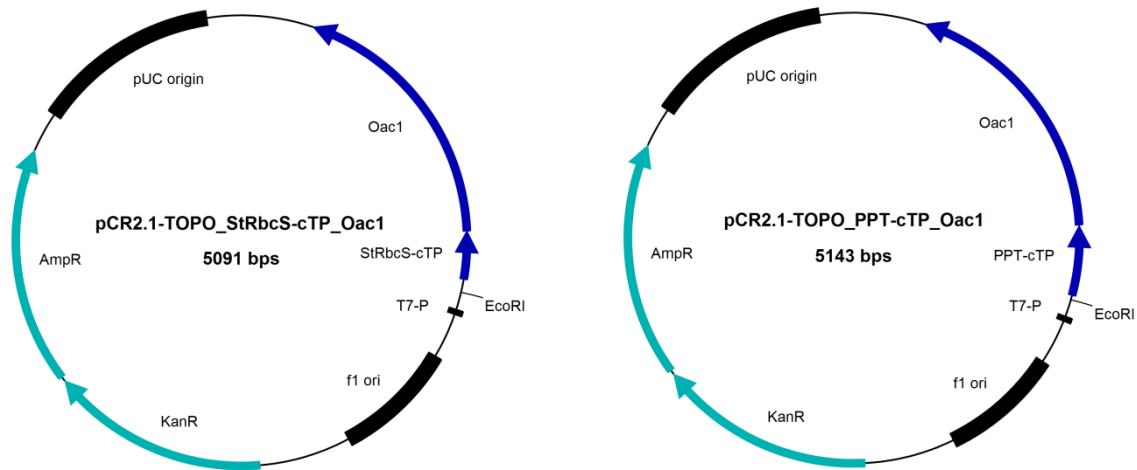


**Abbildung 2.9: RFP-Plasmide**

AmpR:  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*) als Selektionsmarker in Bakterien; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; RK2 ori: Replikationsursprung für Vektor in Agrobakterien; SAR: Scaffold attachment region; LB/RB: linke/rechte Border des Nopalin-Ti-Plasmids pTiT37; KanR: Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*npfII*) als Selektionsmarker in Bakterien; Pnos: Promotor des Nopalin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*; pAnos: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Nopalin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*; Oac1: Oxalacetat-Translokator aus *S. cerevisiae*; P35SS: Promotorsequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus; TL: 5'untranslatierte Region aus *Tobacco etch virus*; StRbcS-cTP: Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. tuberosum*; PPT-cTP: Transitpeptid des Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators aus *B. oleracea var. botrytis* L., pAocs: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Octopin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*.

Für den Vektor pTRAK\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1\_rfp wurde das Fragment aus StRbcS-Transitpeptid und Oac1 mittels PCR amplifiziert (Primer 4006 und 4007) und in die Schnittstellen *NcoI* und *BglII* des Vektors pTRAK\_cTP\_SBpase\_his\_DsRED synthetic-(wobbeled)2 ligiert. Das Plasmid pTRAK\_35S\_PPT-cTP\_Oac1\_rfp wurde durch Ausschneiden von Oac1 inklusive PPT-Transitpeptid mit den Enzymen *EcoRI* und *NcoI* aus pTRAK\_35S\_PPT-cTP\_Oac1 und anschließender Ligation in pTRAK\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1\_rfp erhalten. Zuvor war das Plasmid

pTRAK\_35S\_PPT-cTP\_Oac1 konstruiert worden, indem die beiden PCR-Fragmente PPT-cTP und Oac1 in die Schnittstellen *EcoRI* und *NcoI* des Vektors pTRAK\_35S\_PPT-cTP\_Oac1 ligiert wurde. Für die Amplifikation von PPT-cTP aus dem Vektor Spk\_PPT und Oac1 aus dem Vektor pTRAK\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1 wurden die Primerpaare 4098 und 4099 bzw. 4100 und 4101 verwendet. Für pTRAK\_35S\_Oac1\_rfp wurde das PPT-Transitpeptid mit Hilfe des Enzyms *PstI* ausgeschnitten und der Vektor anschließend religiert.



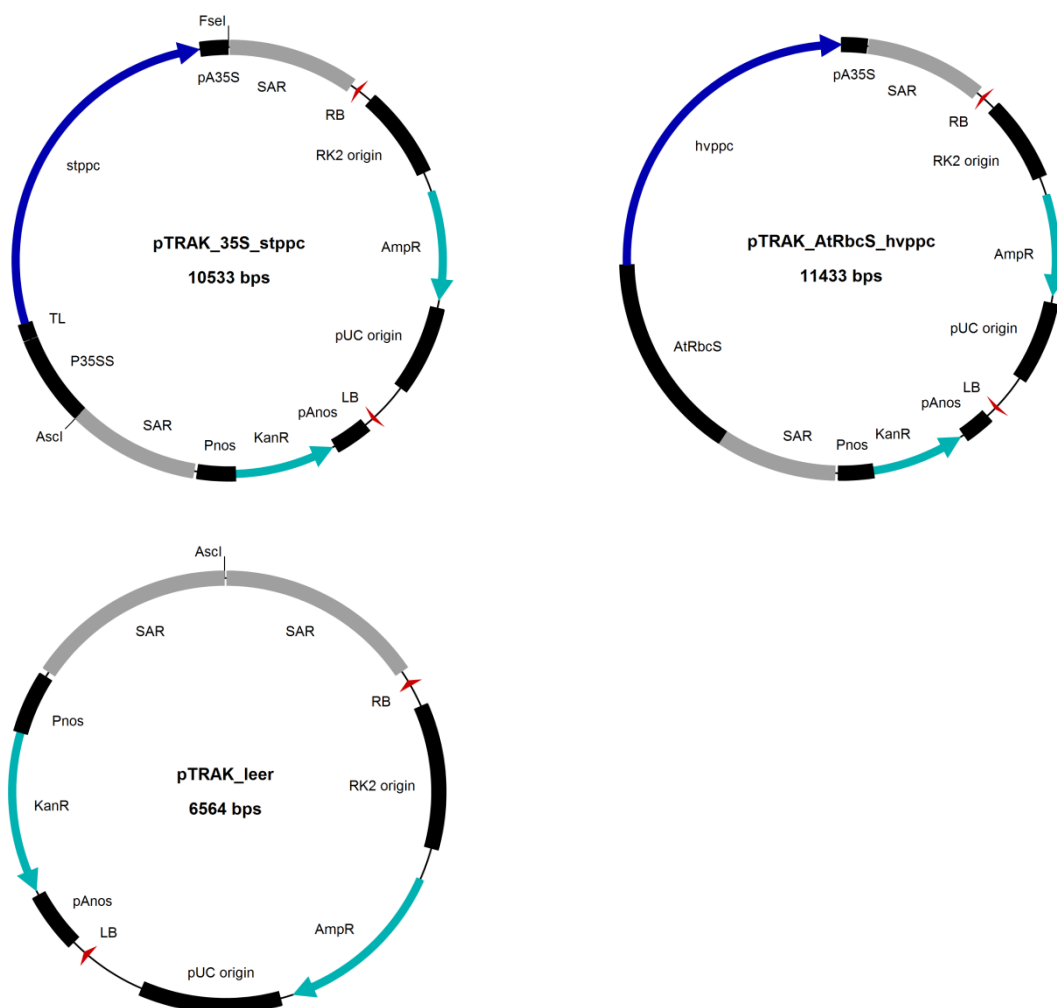
**Abbildung 2.10: pCR2.1-TOPO-Plasmide für in vitro Import-Assay**

AmpR:  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*) als Selektionsmarker in *E. coli*; KanR: Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*neoI*) als Selektionsmarker in *E. coli*; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; RK2 ori: Replikationsursprung für Vektor in Agrobakterien; T7-P: Promotor aus T7-Phage für Expression in *E. coli*; Oac1: Oxalacetat-Translokator aus *S. cerevisiae*; StRbcS-cTP: Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. tuberosum*; PPT-cTP: Transitpeptid des Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokators aus *B. oleracea var. botrytis* L.; f1 ori: Replikationsursprung aus F1-Phage für einzelsträngige Replikation.

Zur Konstruktion von pCR2.1-TOPO\_StRbcS-cTP\_Oac1 wurde das Oac1-Gen zusammen mit dem StRbcS-Transitpeptid aus dem Plasmid pTRAK\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1 mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* ausgeschnitten und in die Schnittstellen *EcoRI* und *SpeI* (kompatible Enden zu *XbaI*) des Vektors pCR2.1-TOPO\_slr1515 ligiert. Für den Vektor pCR\_2.1-TOPO\_PPT-cTP\_Oac1 wurde das Oac1-Gen inklusive TPT-Transitpeptid aus dem Plasmid pTRAK\_35S\_PPT-cTP\_Oac1 mit denselben Enzymen ausgeschnitten und ebenfalls in den Vektor pCR2.1-TOPO\_slr1515 kloniert.

### 2.1.8.7 Plasmide zur Erhöhung der PEPC-Aktivität

Mit Hilfe der in Abbildung 2.11 dargestellten Plasmide sollte die PEPC-Aktivität in den transgenen Tabakpflanzen mit den putativen  $C_4$ -Zyklen weiter erhöht werden. Der Vektor pTRAK\_35S\_stppc wurde erhalten, indem das Plasmid pTRAPT\_stppc (freundlicherweise von Dr. Thomas Rademacher, Institut für Biologie I, RWTH Aachen zur Verfügung gestellt) mit den Enzymen *Ascl* sowie *Fsel* verdaut wurde und das Fragment aus 35SS-Promotor, *stppc*-Gen und pA35S-Polyadenylierungs-/Terminationsregion in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pTRAK\_35S\_EcMdh kloniert wurde. Der Leervektor pTRAK\_leer wurde durch Entfernen der EcMdh-Expressionskassette aus dem Plasmid pTRAK\_35S\_EcMdh erhalten. Hierzu wurde das Plasmid mit den Enzymen *Ascl* sowie *Fsel* verdaut und nach Auffüllen der Enden mit T4-DNA-Polymerase religiert. Der Vektor pTRAK\_AtRbcS\_hvppc wurde freundlicherweise von Pratibha Kamble (Institut für Biologie I, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.

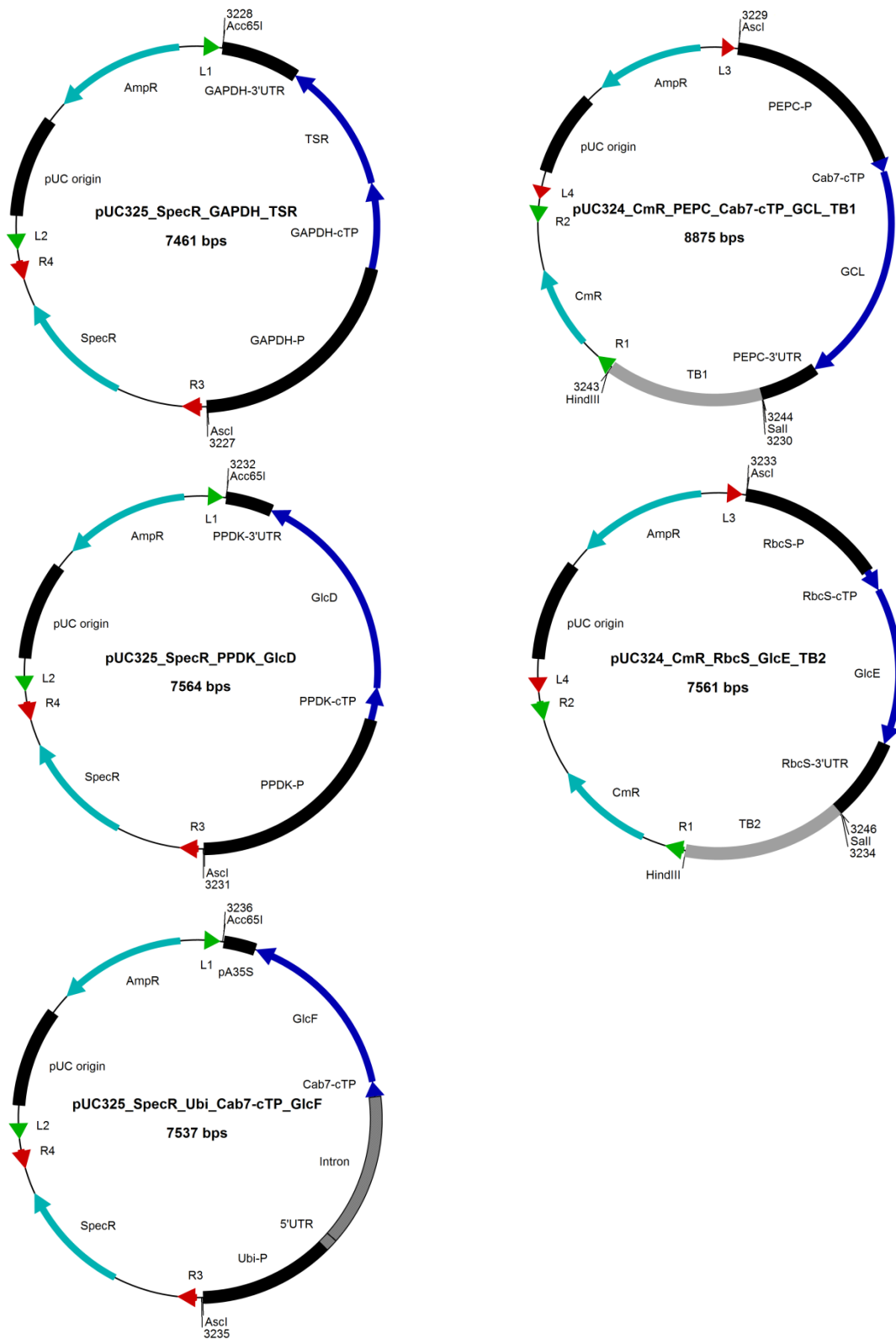


**Abbildung 2.11: Plasmide zur Erhöhung der PEPC-Aktivität**

AmpR:  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*) als Selektionsmarker in *E. coli*; KanR: Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*npfII*) als Selektionsmarker in *E. coli*; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; RK2 origin: Replikationsursprung für Vektor in Agrobakterien; AtRbcS-P: Promotorsequenz der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *A. thaliana*; P35SS: Promotorsequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus; TL: 5'untranslatierte Region aus *Tobacco etch virus*; pA35S: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus.

**2.1.8.8 Entry-Plasmide mit Genen für Glykolat-Weg aus *E. coli***

Für die Konstruktion der Entry-Plasmiden mit den Genen (*tsr*, *gcl*, *glcD*, *glcE*, *glcF*) für den Glykolat-Weg aus *E. coli* wurden die Expressionskassetten mittels PCR amplifiziert und in die Entry-Plasmide pUC325\_SpecR bzw. pUC324\_CmR kloniert. Als Template dienten die pTRAux-Plasmide GAPDH\_TSR, PEPC\_Cab7-cTP\_GCL, PPDK\_GlcD, RbcS\_GlcE und Ubi\_Cab7-cTP\_GlcF, welche bereits in der Diplomarbeit (Matthias Buntru, Institut für Biologie I, RWTH Aachen, 2008) konstruiert wurden. Die zur Amplifikation der Expressionskassetten verwendeten Primerpaare waren für GAPDH\_TSR 3227/28, für PEPC\_Cab7-cTP\_GCL 3229/30, für PPDK\_GlcD 3231/32, für RbcS\_GlcE 3233/34 und für Ubi\_Cab7-cTP\_GlcF 3235/36. Anschließend wurden die PCR-Produkte GAPDH\_TSR, PPDK\_GlcD und Ubi\_Cab7-cTP\_GlcF in die Schnittstellen *Ascl* und *Acc65I* des Entry-Vektors pUC325\_SpecR ligiert, wodurch die Plasmide pUC325\_SpecR\_GAPDH\_TSR, pUC325\_SpecR\_PPDK\_GlcD und pUC325\_SpecR\_Ubi\_Cab7-cTP\_GlcF erhalten wurden (Abbildung 2.12). Die PCR-Produkte PEPC\_Cab7-cTP\_GCL und RbcS\_GlcE wurden in die Schnittstellen *Ascl* und *SaII* des Entry-Vektors pUC324\_CmR ligiert. Außerdem wurden als Transkriptions-Blocker AT-reiche Sequenzen aus dem Lambdaphagen in die Schnittstellen *SaII* und *HindIII* kloniert. Zur Amplifikation dieser Sequenzen mittels PCR wurden die Primerpaare 3243/44 (TB1) und 3245/46 (TB2) verwendet. Dies ergab die Plasmide pUC324\_CmR\_PEPC\_Cab7-cTP\_GCL\_TB1 und pUC324\_CmR\_RbcS\_GlcE\_TB2 (Abbildung 2.12).



**Abbildung 2.12: Entry-Plasmide mit Genen für Glykolat-Weg aus *E. coli***

L1/2/3/4 und R1/2/3/4: Attachment sites; AmpR:  $\beta$ -Laktamase-Gen (*bla*) als Selektionsmarker in Bakterien; CmR: Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*) als Selektionsmarker in *E. coli*; SpecR: Spectinomycin/Streptomycin-Nukleotidyltransferase-Gen (*aadA*) als Selektionsmarker in *E. coli*; pUC origin: Replikationsursprung für Vektor in *E. coli*; TB1/2: AT-reiche Sequenzen aus Lambdaphage als Transkriptions-Blocker; TSR: Tartronat-Semialdehyd-Reduktase aus *E. coli*; GCL: Glyoxylat-Carboligase aus *E. coli*; GlcD, GlcE und GlcF: Untereinheiten der Glykolat-Dehydrogenase aus *E. coli*; GAPDH-P, GAPDH-cTP und GAPDH-3'UTR: Promotor, Transitpeptid und 3'UTR der Glycerinaldehyd-

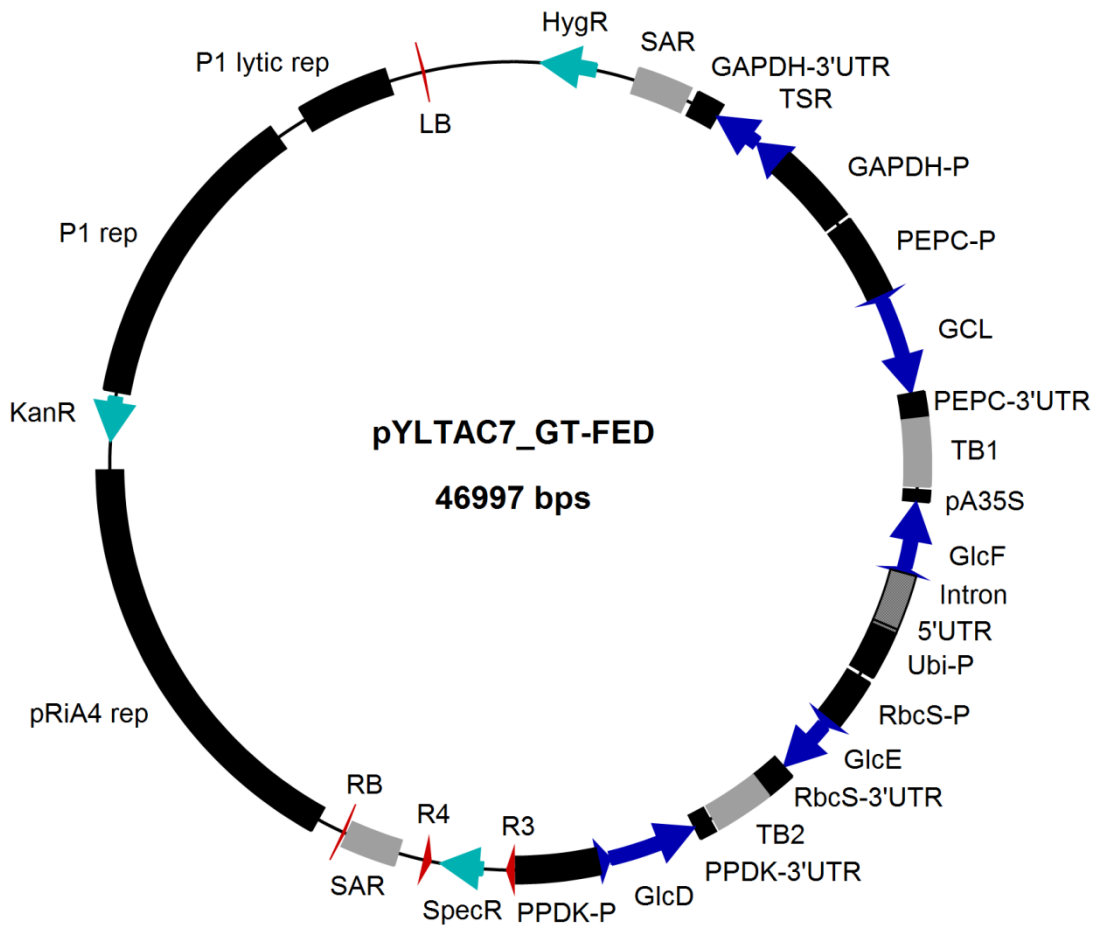


3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Z. mays*; PEPC-P und PEPC-3'UTR: Promotor und 3'UTR der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *Z. mays*; PPK-P, PPK-cTP und PPK-3'UTR: Promotor, Transitpeptid und 3'UTR der Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase aus *Z. mays*; RbcS-P, RbcS-cTP und RbcS-3'UTR: Promotor, Transitpeptid und 3'UTR der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *Z. mays*; Ubi-P: Ubiquitin-Promotor aus *Z. mays*; pA35S: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus; Cab7-cTP: Transitpeptid des Chlorophyll-a/b-Bindeproteins 7.

### 2.1.8.9 Destination-Plasmid mit Genen für Glykolat-Weg

Das Plasmid pYLTA7\_FED (Abbildung 2.13) wurde durch MultiRound-Gateway-Rekombination erhalten. Dabei wurden sukzessive folgende Entry-Plasmide in das Destination-Plasmid pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR rekombiniert:

- 1) pUC325\_SpecR\_GAPDH\_TSR
- 2) pUC324\_CmR\_PEPC\_Cab7-cTP\_GCL\_TB1
- 3) pUC325\_SpecR\_Ubi\_Cab7-cTP\_GlcF
- 4) pUC324\_CmR\_RbcS\_GlcE\_TB2
- 5) pUC325\_SpecR\_PPK\_GlcD



**Abbildung 2.13: Destination-Plasmid mit Genen für Glykolat-Weg aus *E. coli***

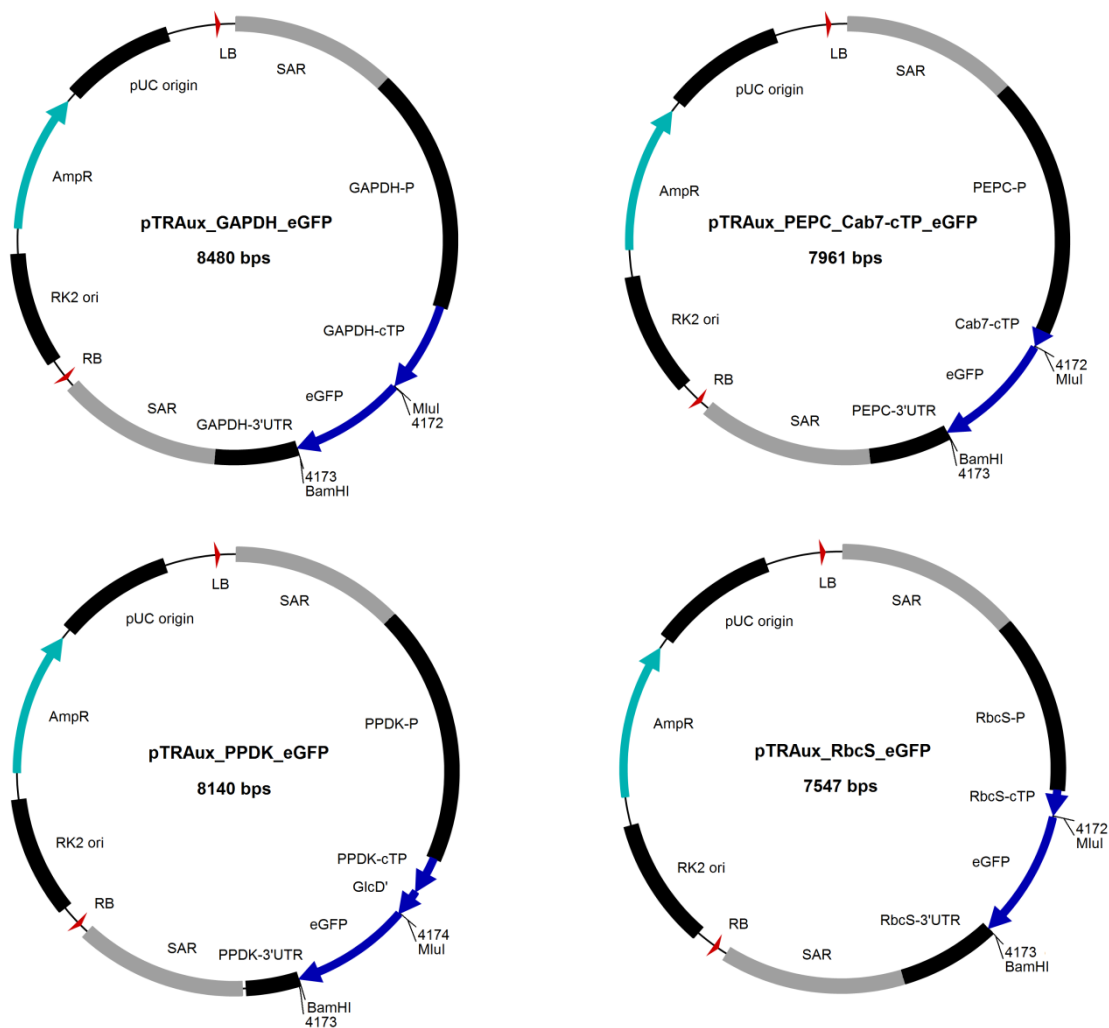
Die Orientierung der Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet. TSR: Tartronat-Semialdehyd-Reduktase aus *E. coli*; GCL: Glyoxylat-Carboligase aus *E. coli*; GlcD, GlcE und GlcF: Untereinheiten der Glykolat-Dehydrogenase aus *E. coli*;

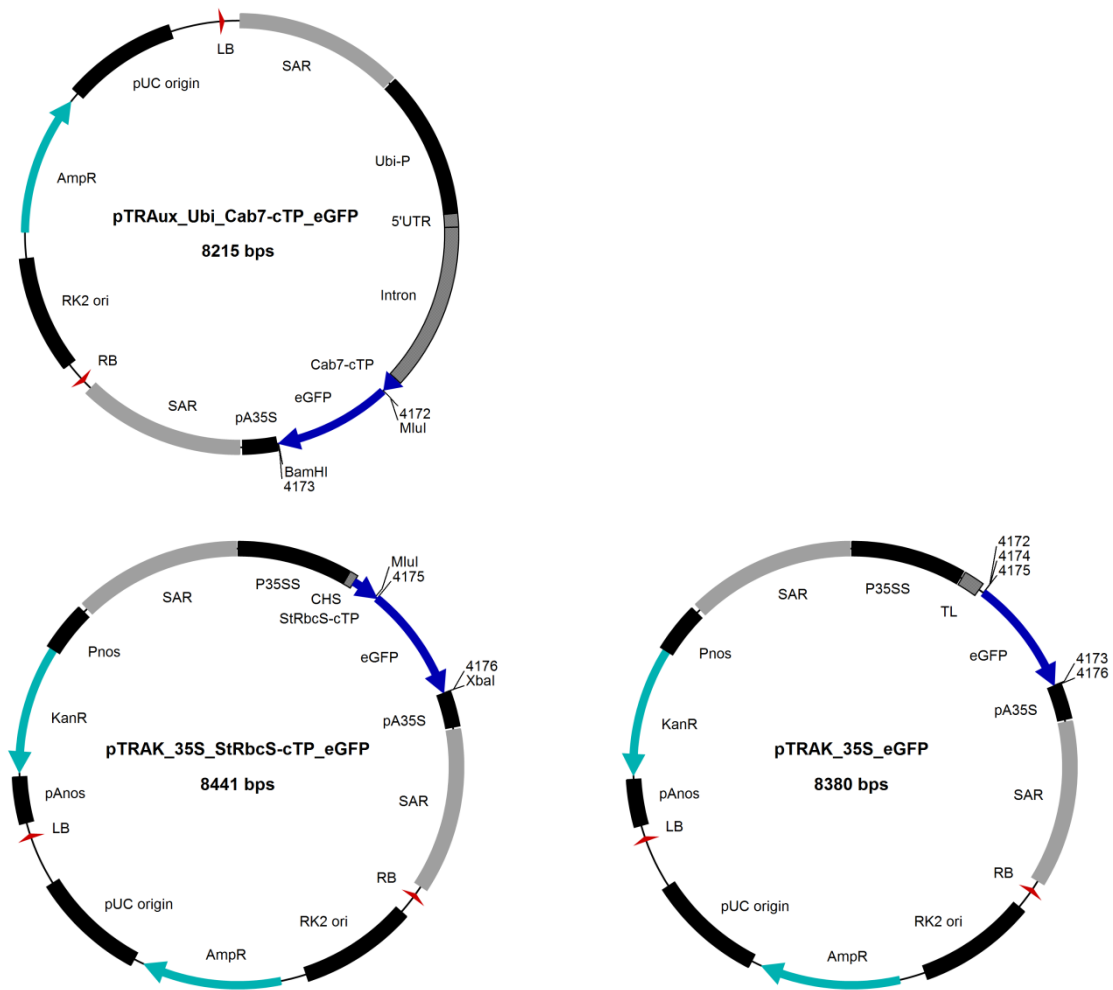
Andere wichtige Regionen des Plasmids siehe Destination-Plasmid pYL7AC7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR und Entry-Plasmide mit Genen für Glykolat-Weg aus *E. coli*.

### 2.1.8.10 eGFP-Plasmide zur Kontrolle der Transitpeptide aus *Z. mays*

Zur Konstruktion der eGFP-Plasmide, welche zur Kontrolle der Transitpeptide aus *Z. mays* dienen sollten, wurde das eGFP-Gen mittels PCR amplifiziert und anstelle von TSR, GCL, glcD, glcE und glcF in die pTRAux-Plasmide GAPDH\_TSR, PEPC\_Cab7-cTP\_GCL, PPDK\_GlcD, RbcS\_GlcE und Ubi\_Cab7-cTP\_GlcF kloniert (Abbildung 2.14). Als Template zur Amplifikation von eGFP diente das Plasmid pTRAK\_35S\_eGFP, welches freundlicherweise vom Institut für Biologie III der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt wurde. Für die Plasmide pTRAux\_GAPDH\_eGFP, pTRAux\_PEPC\_Cab7-cTP\_eGFP\_TB1, pTRAux\_RbcS\_eGFP und pTRAux\_Ubi\_Cab7-cTP\_eGFP wurde das Fluoreszenzgen mit dem Primerpaar

4172/73 amplifiziert und in die Schnittstellen *Mlu*I und *Bam*HI der entsprechenden Vektoren ligiert. Bei der Klonierung von pTRAux\_PPDK\_eGFP wurde das Primerpaar 4173/74 zur Amplifikation von eGFP verwendet. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls in die Schnittstellen *Mlu*I und *Bam*HI des Vektors pTRAux\_PPDK\_GlcD ligiert, wobei das 5'Ende von *glcD* erhalten blieb. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid pTRAK\_35S\_StRbcS-cTP\_eGFP konstruiert. Hierfür wurde das Fluoreszenzgen mit Hilfe des Primerpaares 4175/76 amplifiziert und in die Schnittstellen *Mlu*I und *Xba*I des Vektors pTRAK\_35S\_StRbcS-cTP\_Oac1 ligiert.





**Abbildung 2.14: eGFP-Plasmide zur Kontrolle der Transitpeptide aus *Z. mays***

Die Orientierung des eGFP-Gens ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. eGFP: verbessertes grün fluoreszierendes Protein.

Andere wichtige Regionen der Plasmide siehe Entry-Plasmide mit Genen für Glykolat-Weg aus *E. coli*.

### 2.1.9 Pflanzenmaterial und Anzucht

Für alle Arbeiten wurden Tabakpflanzen vom Typ *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 verwendet.

Für nicht sterile Kulturen wurden die Samen zur Keimung auf Vermehrungserde (Typ VM, Werkverband, Sinntal-Jossa) ausgelegt. Nach etwa zwei Wochen wurden die Pflanzen in Einheitserde Typ ED73 umgesetzt. Das bei den Pflanzenanalysen angegebene Alter bezieht sich jeweils auf die vergangene Zeit nach dem Pikieren.

Für sterile Kulturen wurden die Samen mit 70% und 96% Ethanol sterilisiert und anschließend auf MS-Medium (Tabelle 2.6) in sterilen Weck-Gläsern ausgelegt.

Die Anzucht erfolgte unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) bei einer photosynthetisch aktiven Photonen-Fluss-Dichte (PAR) von ca. 160  $\mu\text{mol}$  Photonen pro  $\text{m}^2$  und s. Die Tagestemperatur lag dabei bei ca. 26°C und die Nachttemperatur bei ca. 20°C.

**Tabelle 2.6: Murashige und Skoog (MS) Medium**

Komponente	Endkonzentration
MS-Salz mit MES und Vitaminen	4,4 g/l
Sucrose	20,0 g/l
Thiamin-HCl	0,2 mg/l
Pflanzenagar	0,8% (w/v)
pH mit NaOH auf 5,8 einstellen	

## 2.1.10 Bakterienkulturen

### 2.1.10.1 *Escherichia coli*-Kulturen

Zur Vermehrung und Isolierung von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  mit F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17( $r_K^- m_K^+$ ),  $\lambda^-$  bei chemischen Transformationen bzw. der *E. coli*-Stamm TOP10 mit F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1  $\lambda^-$  bei Elektroporationen verwendet. Aufgrund eines modifizierten Rekombinationssystems (*recA1*) und dem Fehlen der Endonuklease (*endA1*) können diese Stämme für Klonierungen eingesetzt werden.

Kulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$  oder TOP10 wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Platten (Tabelle 2.7) angezogen.

Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C.

**Tabelle 2.7: Luria Bertani (LB) Medium**

Komponente	Endkonzentration
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1% (w/v)

Trypton	1% (w/v)
ggf. Agar	1,5% (w/v)

### 2.1.10.2 *Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen

Zur transienten und stabilen Transformation von *N. tabacum* wurden die *A. tumefaciens*-Stämme GV3101::pMP90RK und AGL1 benutzt. GV3101 trägt das Ti-Plasmid pMP90RK, das sowohl die *vir*-Region als auch die Gene für die beiden Resistenzen gegen Gentamycin und Kanamycin enthält. Die Resistenz gegen Rifampicin ist genomisch kodiert. AGL1 trägt das hypervirulente Ti-Plasmid pTiBo542. Chromosomal codiert AGL1 für Resistenzen gegen Rifampicin und Carbenicillin. Außerdem wurde mit dem *A. tumefaciens* Stamm GV2260 gearbeitet. Er trägt das Ti-Plasmid pGV2260, welches die *vir*-Gene und eine Carbenicillin-Resistenz trägt. Chromosomal besitzt dieser Stamm ein Resistenzgen gegen Rifampicin. GV3101 kann z.B. für die Transformation von Plasmiden mit Carbenicillin-Resistenz verwendet werden, GV2260 und AGL1 z.B. für Plasmide mit Kanamycin-Resistenz.

Für Kulturen von GV3101 und GV2260 wurde YEB-Medium (Tabelle 2.8), für Kulturen von AGL1 LB-Medium (Tabelle 2.7) oder GYPC-Medium (Tabelle 2.9) verwendet. Zur Selektion wurden für GV3101 Carbenicillin (100 mg/l), Kanamycin (50 mg/l) und Rifampicin (25 mg/l), für GV2260 Carbenicillin (50 mg/ml), Kanamycin (15 mg/ml) und Rifampicin (25 mg/ml) bzw. für AGL1 Carbenicillin (50 mg/l) und Kanamycin (15 mg/l) zugesetzt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C.

**Tabelle 2.8: YEB-Medium**

Komponente	Endkonzentration
Nutrient Broth	0,8% (w/v)
Hefeextrakt	0,1% (w/v)
Sucrose	1,5% (w/v)
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
ggf. Agar	1,5% (w/v)
pH mit NaOH auf 7,4 einstellen	

Tabelle 2.9: GYPC-Medium

Komponente	Endkonzentration
Hefeextrakt	0,2%
Glukose	0,2%
Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5	15 mM
salzfreie Casaminosäuren	0,2%
Carbenicillin	100mg/l

### 2.1.11 Verwendete Internetdatenbanken und Computerprogramme

Die in dieser Arbeit verwendeten Internetdatenbanken, Onlineprogramme und Computerprogramme sind in Tabelle 2.10 bzw. Tabelle 2.11 angegeben. Alle Internetadressen beziehen sich auf den Stand von Dezember 2011.

Tabelle 2.10: Verwendete Computerprogramme

Name	Hersteller	Verwendungszweck
SECentral CloneManager <sup>®</sup> 8.10	Scientific and Educational Software	Darstellung von Plasmiden, Simulation von Klonierungsschritten, Primerdesign
Enhance Plasmid Map Enhancer <sup>®</sup> 3.1	Scientific and Educational Software	Erstellung von Plasmidkarten
Chromas <sup>®</sup> 2.31	Technelysium Pty. Ltd	Darstellung und Überarbeitung von Sequenzdaten
EndNote X5	Thomson	Literaturverwaltung

Tabelle 2.11: Verwendete Internetdatenbanken und Onlineprogramme

Name	Internetadresse	Verwendungszweck
Oligonucleotide Properties Calculator	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>	Primerdesign
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Analyse von Sequenzdaten, Homologien
NCBI Entrez PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Literaturrecherche
HighWire Press	<a href="http://highwire.stanford.edu/">http://highwire.stanford.edu/</a>	Literaturrecherche

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit einem Plasmid-Minipräparationskit (Tabelle x) oder ohne Säulen für die sehr großen Gateway-Plasmide (> 30 kb) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Durchführung der Plasmid-Minipräparation mittels Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA ohne Säulen wurden zweimal 2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* mit 13000xg für 30 s abzentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 250 µl Puffer PI (Tabelle 2.12) resuspendiert. Durch Zugabe des alkalischen SDS-haltigen Puffers PII (Tabelle 2.13) und Inkubation für 5min bei RT wurden die Bakterien lysiert. Die Zugabe des Kaliumacetat-haltigen Puffers PIII (Tabelle 2.14) bewirkte eine Neutralisation des Lysats, wodurch chromosomale DNA und Zelltrümmer präzipitieren und abgetrennt werden können. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Proben mit 14000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Durch Zugabe von 4 µl RNase (10µg/µl) und Inkubation bei 37°C für 15 min wurden RNA-Kontaminationen entfernt. Danach wurde die Lösung zur Fällung der Plasmid-DNA mit 1 Vol Isopropanol versetzt und vorsichtig gemischt. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Proben mit 14000xg für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch einmal mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach möglichst vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet kurz getrocknet und dann in 50-100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

**Tabelle 2.12: Puffer PI für Plasmidisolation**

Komponente	Endkonzentration
Tris-HCl pH8	25 mM
Glucose	50 mM
EDTA	10 mM

**Tabelle 2.13: Puffer PII für Plasmidisolation**

Komponente	Endkonzentration
Tris-HCl pH8	25 mM



NaOH	200 mM
SDS	1% w/v

**Tabelle 2.14: Puffer PIII für Plasmidisolierung**

Komponente	Endkonzentration
Kaliumacetat	3 M
Ameisensäure	1,8 M

### 2.2.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem PCR-Aufreinigungs-Kit Invisorb<sup>®</sup> Spin PCRapid Kit (Invitex, Berlin).

Dabei werden DNA-Moleküle aufgrund ihres polyanionischen Charakters in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an eine Anionenaustauscher-Matrix (Kieselgel) gebunden. Proteine werden durch Waschen der Matrix mit entsprechenden Puffern entfernt. Die PCR-Fragmente werden mit einem Puffer niedriger Ionenstärke von der Säule eluiert, während kleine Oligonukleotide (Primer) und dNTPs nahezu irreversibel gebunden bleiben.

Die Durchführung der Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt nach Herstellerangaben.

### 2.2.1.3 Aufreinigung aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit (Invitex, Berlin) nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.1.4 Kombinierte Isolierung von DNA und RNA

Zur Isolierung von DNA und RNA wurden ca. 20 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mit Hilfe von Glasperlen ( $d \approx 1,5$  mm) fein gemörsert. Dann wurde das Zellmaterial durch Vortexen in 500  $\mu$ l DNA/RNA-Extraktionspuffer (Tabelle 2.15) homogenisiert. Anschließend wurden 500  $\mu$ l wassergesättigtes Phenol hinzugegeben und durch Vortexen sowie 15 min Schütteln homogenisiert. Durch anschließende Zentrifugation mit 14000xg bei RT für 10 min kommt es zur Phasentrennung. 300  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Nuk-

leinsäuren mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M, pH5,2) und 2 Volumen 96%igem (v/v) Ethanol versetzt. Nach 20-minütiger Zentrifugation mit 14000xg bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit einem geeigneten Volumen 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation mit 14000xg bei für 10 min wird der Überstand möglichst vollständig entfernt. Anschließend wird das Pellet getrocknet und in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

**Tabelle 2.15: DNA/RNA-Extraktionspuffer**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris-HCl pH 7,6	0,05 M
SDS	0,5 % (v/v)

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Agarose ist ein Polymer aus glykosidisch verknüpften D-Galaktose- und 3,6-Anhydro-Galaktose-Einheiten. Nukleinsäuren sind bedingt durch Phosphate negativ geladen und wandern im Agarosegel von der Kathode (-) zur Anode (+). Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülmasse und Struktur der Nukleinsäuren, der Porengröße der Matrix sowie der angelegten Spannung und der Ionenstärke des Puffers ab.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Kontrolle der DNA- und RNA-Isolierung (2.2.1.4), der Kontrolle der PCR (2.2.3), der Kontrolle von Restriktionsenzymsspaltung (2.2.7) und der Auftrennung verschiedener Fragmente aus einem DNA-Gemisch durchgeführt. Entsprechend dem Verwendungszweck wurden Gele mit 0,5-2% Agarose verwendet. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurden 0,2 % (v/v) Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuremoleküle und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 302$  nm. Die Auswertung erfolgt über ein Photodokumentationssystem.

Die auspolymerisierten Gele wurden in entsprechende Laufkammern gelegt und vollständig mit 1x TAE-Puffer (Tabelle 2.16) bedeckt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit Ladepuffer versehen. Zur Abschätzung von Größe und Konzentration der aufgetrennten Fragmente wurden zusätzlich Marker (Tabelle 2.2) auf-

getragen. Je nach Größe des Gels erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 5-10 V/cm für 30-60 min.

**Tabelle 2.16: 50xTris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)**

Komponente	Endkonzentration
Tris, pH 8,0	2 M
Eisessig	5% (v/v)
EDTA pH 8,0	50 mM

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation und Modifikation einer Ziel-DNA-Sequenz, welche durch bekannte Sequenzen flankiert wird. Zwei synthetische Oligonukleotide, welche zum (+)- bzw. (-)-Strang dieser Sequenzen komplementär sind dienen dabei als Primer. Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA binden diese Primer an ihren Gegenstrang. Durch die Katalyse einer thermostabilen *Taq*-Polymerase werden zwischen den Primer neue (+)- und (-)-Strang-Fragmente synthetisiert, welche ihrerseits wieder als Matrize dienen können. Die Wiederholung der Schritte aus Denaturierung, Primerbindung und Elongation führt theoretisch zu einem exponentiellen Anstieg der Menge des Ziel-DNA-Fragments. In der Praxis liegt die Effektivität pro Zyklus allerdings nur bei ca. 85%. Diese Prozentzahl ist durch die Zunahme von inhibierenden Einflüssen im Verlauf der PCR begründet, wie z.B. eine abnehmende Aktivität der Polymerase.

Neben den Primer werden für die PCR dNTPs (2'-desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphate) und  $Mg^{2+}$  als Substrat bzw. Co-Faktor der Polymerase benötigt. Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tabelle 2.17 aufgeführt.

**Tabelle 2.17: Standard PCR-Ansatz**

Komponente	Endkonzentration
PCR-Puffer	1x
dNTP-Mix	200 $\mu$ M
Primer 1	0,2 $\mu$ M
Primer 2	0,2 $\mu$ M

DNA-Polymerase	0,02 U/μl
Matrize	0,2 pg - 2 ng/μl
H <sub>2</sub> O	ad 25 μl

Je nach Verwendungszweck wurden unterschiedliche Polymerasen eingesetzt (Tabelle x). Für Klonierungen wurde die Phusion-Polymerase und für Kolonie-PCRs je nach Organismus die GoTaq-Polymerase (*E. coli*) bzw. Phire-Polymerase (*A. tumefaciens*) verwendet. Die PCR-Analyse isolierter DNA aus transgenen Pflanzen erfolgte ebenfalls mit Hilfe der GoTaq-Polymerase.

Die PCRs wurden mit den unter **Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und Zubehör** Tabelle 2.1 genannten Thermocyclern durchgeführt. Die Annealing-Temperatur wurde dabei mit Hilfe des in Tabelle 2.10 aufgeführten SECentral CloneManager<sup>®</sup> 8.10 bestimmt. Die Länge der Elongationsphase richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Stückes und der verwendeten Polymerase. Typische Thermocycler-Programme für die eingesetzten Polymerasen sind in Tabelle 2.18, Tabelle 2.19 und Tabelle 2.20 dargestellt.

**Tabelle 2.18: Standard-PCR-Programm für Phusion-Polymerase**

98°C	2 min	
98°C	10 sec	
60-72°C	20 sec	35x
72°C	15-30 s/kb	
72°C	10 min	
4°C	∞	

**Tabelle 2.19: Standard PCR-Programm für GoTaq-Polymerase**

95°C	2 min	
95°C	30 sec	
55-65°C	30 sec	35x
72°C	1 min/kb	
72°C	5 min	
4°C	∞	

**Tabelle 2.20: Standard-PCR-Programm für Phire-Polymerase**

98°C	2 min	
98°C	10 sec	
60-72°C	10 sec	35x
72°C	15-30s/kb	

72°C	1 min
4°C	∞

### 2.2.4 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese (complementary DNA) wird eine RNA-Matrize durch ein spezifisches Enzym (Reverse Transkriptase) in einen zu ihr komplementären DNA-Strang umgeschrieben.

Um die DNA aus den Proben zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde ein Reaktionsansatz gemäß Tabelle 2.21 hergestellt, für 30 min bei 37°C inkubiert und dann das Enzym für 15 min bei 70°C inaktiviert.

Die so vorbereiteten Proben wurden dann mit 50 pmol eines Random Nonamer Primers (Tabelle 2.22) gemischt, zur Anlagerung des Primers 5 min bei 70°C inkubiert und dann direkt auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wurden neben den Ansätzen mit der Reversen Transkriptase auch Kontrollansätze ohne Enzym gemacht, um etwaige Kontaminationen mit DNA später detektieren zu können. Davon wurden je 7 µl zu den 13 µl der vorbereiteten RNA-Proben gegeben. Anschließend wurden die Ansätze nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert und das Enzym für 10 min bei 70°C inaktiviert.

**Tabelle 2.21: DNase-Verdau**

Komponente	Endkonzentration
DNaseI	1 U
DNaseI-Puffer	1x
RNA	1-5 µg
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

**Tabelle 2.22: Reverse Transkription**

Komponente	Endkonzentration
dNTP-Mix	20 nmol
MMLV-Puffer	1x

---

MMLV-RT	200 U
H <sub>2</sub> O	ad 7 µl

---

### 2.2.5 Real-Time-PCR

Die Real-Time quantitative PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der Produkte nach jedem Zyklus. Hierzu wird der Fluoreszenzfarbstoff Sybr<sup>®</sup>Green I genutzt, dessen Fluoreszenz durch Einlagerung in doppelsträngige DNA ansteigt. Durch eine entsprechende PCR-Maschine kann dies detektiert und mit der dazugehörigen Software dargestellt werden. In den frühen PCR-Zyklen findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Mit zunehmender Zyklenzahl nehmen aber inhibitorische Einflüsse zu, wodurch die Reaktion in einen linearen Bereich übergeht.

Für die Berechnungen wird der so genannte  $c_T$ -Wert benutzt. Er beschreibt die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant vom Hintergrund abhebt. Der  $c_T$ -Wert ist umgekehrt proportional zur Menge der eingesetzten Matrize. Durch Vergleich mit  $c_T$ -Werten von Standardreihen bekannter Matrizenkonzentrationen kann die Ausgangskonzentration der untersuchten Matrize berechnet werden. Die Reaktion wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem Platinum<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup>Green qPCR SuperMix-UDG with Rox (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug allerdings nur 20 µl.

### 2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) von Jost Muth und Kollegen am Institut für Molekulare Biotechnologie (RWTH Aachen) durchgeführt. Für die Reaktion wurden der Applied Biosystems 3700 DNA Analyzer und „Big-Dye<sup>™</sup> cyclesequencing terminator“-Komponenten verwendet.

Zur Vorbereitung wurden 140-160 ng Plasmid-DNA pro kb mit 20 pmol des gewünschten Primers in 30 µl H<sub>2</sub>O dest. gemischt.

### 2.2.7 Restriktion von DNA

Die Analyse von Plasmiden oder die Gewinnung bestimmter DNA-Fragmente für Klonierungen erfordert die Spaltung der DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Die verwendeten Enzyme gehören zu den Typ II-Restriktionsenzymen, die doppelsträngige DNA an bekannten Stellen, meist direkt in oder in der Nähe der Erkennungssequenz schneiden.

Standardmäßig wurde 1 Unit des Enzyms mit 1 µg DNA und dem entsprechenden Puffer (1x) gemischt und für mindestens 45 min bei 37°C inkubiert. Eine Inaktivierung fand durch Erhitzen auf die vom Hersteller angegebene spezifische Inaktivierungstemperatur statt.

Beim Verdau von PCR-Produkten muss zudem die Schneide-Effizienz der Enzyme an DNA-Enden beachtet werden. Für Restriktionsenzyme von Fermentas (St. Leon-Rot) kann die Effizienz unter <http://www.fermentas.com/techinfo/re/restrdigpcrrii.htm> eingesehen werden.

### 2.2.8 Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden

Phosphatasen können Phosphatgruppen von verschiedenen Arten von Molekülen entfernen. Die in dieser Arbeit verwendete Antarctic Phosphatase katalysiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA. Durch die Phosphatase-Behandlung von Fragmenten fehlt das von der Ligase benötigte 5'-Phosphoryl-Ende und die Fragmente können nicht mehr mit sich selbst ligieren. Diese Eigenschaft kann verwendet werden, um den Vektor-Hintergrund bei Klonierungen zu reduzieren. Ein Standardansatz für die Dephosphorylierung ist in Tabelle 2.23 dargestellt. Bei 5'-Überhängen oder „blunt-ends“ wurde der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert, bei 3'-Überhängen für 60 min. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 65°C für 5 min inaktiviert.

**Tabelle 2.23: Standardansatz für die Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden**

Komponente	Endkonzentration
DNA	1-5 µg
Antarctic Buffer	1x
Antarctic Phosphatase	5 U
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

### 2.2.9 „Blunting“ von DNA mit 5'- oder 3'-überhängenden Enden

Das Glätten von DNA-Fragmenten findet bei Klonierungen Verwendung, wenn die zu ligierenden Fragmentenden nicht kompatibel sind. Hierfür können die T4 DNA-Polymerase aus dem T4-Phagen oder das Klenow-Fragment der Polymerase I aus *E. coli* verwendet werden. Die beiden Enzyme besitzen eine 5'-3'-Polymerase- und eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch können sie sowohl den Einbau von Nucleotiden bei 5'Überhängen als auch den Abbau von 3'-Überhängen zur Bildung glatter Enden katalysieren.

Für die in dieser Arbeit eingesetzte T4 DNA-Polymerase sieht ein Standardansatz wie in Tabelle 2.24 dargestellt aus. Der Ansatz wurde für 15 min bei 12 °C inkubiert und das Enzym anschließend bei 75°C für 10 min inaktiviert.

**Tabelle 2.24: Standardansatz für „Blunting“ von DNA-Enden**

Komponente	Endkonzentration
DNA	1 µg
dNTP	2 mM
T4 DNA-Polymerase	1 U
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

### 2.2.10 Ligations-Reaktion

Ligationen wurden nach folgendem Schema (Tabelle 2.25) durchgeführt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Abtrennung der Ligase und des Ligationspuffers wurden die Ansätze vor der Transformation über eine Säule (Invisorb<sup>®</sup> Spin PCRapace Kit, Invitex, Berlin) gereinigt.

**Tabelle 2.25: Ligationsansatz**

Komponente	Endkonzentration
Vektor:Insert	1:6
T4-Ligase	5U
T4-Ligase-Puffer	1x
H <sub>2</sub> O	ad 10µl

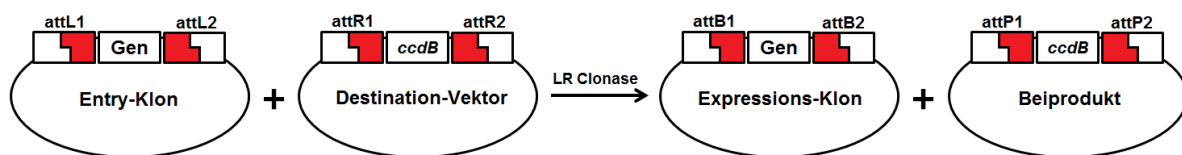


### 2.2.11 TOPO TA<sup>®</sup> Klonierung

Die Klonierung mittels des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Tabelle 2.3) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.12 Gateway Klonierung

Die Gateway-Technologie basiert auf der ortsspezifischen Rekombination des Lambdaphagen in *E. coli* (Hartley *et al.*, 2000). Im kommerziell von Invitrogen (Leck, NL) entwickelten Gateway-System flankieren je zwei att-Sites (für die LR-Reaktion attL1 und attL2 bzw. attR1 und attR2) die Sequenzen, welche transferiert werden sollen. Dadurch kann ein gewünschtes Gen aus einem Entry-Klon in einen Destination-Vektor rekombiniert werden. Die Rekombination verläuft gerichtet. Die Spezifität wird durch zehn Nukleotide in der Kernregion der att-Sites gewährleistet. Abbildung 2.15 zeigt die LR-Reaktion, während der die attL-Sites mit den attR-Sites rekombinieren, wodurch attB- und attP-Sites entstehen. Die BP-Reaktion läuft in die umgekehrte Richtung und führt zu attL- und attR-Sites.



**Abbildung 2.15: Gateway LR-Reaktion**

Gateway LR-Reaktion bei der ein gewünschtes Gen (flankiert von attL-Sites) in einen Destination-Vektor mit attR-Sites transferiert wird. Die Reaktion der attL-Sites mit den attR-Sites führt zu attB- bzw. attP-Sites. Das letale *ccdB*-Gen ermöglicht eine negative Selektion gegen das unerwünschte Beiprodukt.

Die Gateway Klonierung wurde mit dem Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>®</sup> II Enzyme Mix (Tabelle 2.3) nach Herstellerangaben durchgeführt. Ein Standardansatz ist in Tabelle 2.26 dargestellt. Es wurden äquimolare Mengen an Entry- und Destination-Vektor eingesetzt.

**Tabelle 2.26: Standardansatz für Gateway-Rekombination**

Komponente	Rekombination	Kontrolle
Entry-Vektor	50 ng	50 ng
Destination-Vektor	200-400 ng	200-400 ng
TE-Puffer pH 8,0	ad 4 µl	ad 5 µl

---

LR Clonase	1 µl	
------------	------	--

=> Inkubation bei 25°C für 2-4 h		
----------------------------------	--	--

Proteinase K	1 µl	1 µl
--------------	------	------

=> Inkubation bei 37°C für 10 min		
-----------------------------------	--	--

---

### 2.2.13 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Hitzeschock-Transformation wurden 40 µl chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 10 bis 100 ng Plasmid zugegeben. Nach Inkubation des Ansatzes für 20 min auf Eis wurde für 120 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium gemischt und unter Schütteln für 45-60 min bei 37°C regeneriert. Anschließend wurden 100 µl auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.2.14 Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (TOP10) wurden als Vorkultur 5 ml LB-Medium (Tabelle 2.7) inklusive 20 mg/l Streptomycin mit einigen Einzelkulturen angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Als Hauptkultur wurden damit 500 ml LB-Medium inklusive 20 mg/ml Streptomycin angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD600 von 0,8 bis 1,0 inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur für 20 min auf Eis abgekühlt und dann mit 4500xg für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet sukzessive mit 500 ml, 300 ml und 30 ml 10% Glycerin gewaschen. Schließlich wurde das Pellet in 1 ml 10% Glycerin resuspendiert. Davon wurden Aliquots zu je 50 µl zuerst in Stickstoff und dann bei -80°C bis zur Transformation eingefroren.

### 2.2.15 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurde elektrokompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 bis 100 ng Plasmid versetzt. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurde der Ansatz in eine Elektroporations-Küvette überführt und ein elektrischer Puls (2,5 kV) angelegt. Es wurde 1 ml LB-Medium (Tabelle 2.7) zugegeben und die Zellen wurden nach Überführung in ein steriles Reaktionsgefäß für 45-60 min bei 37°C zur Regene-

ration inkubiert. Anschließend wurden 100 µl auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### **2.2.16 Präparation elektrokompetenter Agrobakterien**

Für die Präparation elektrokompetenter Agrobakterien wurde für AGL1 GYPC-Medium (Tabelle 2.9) und für GV3101 sowie GV2260 LB-Medium (Tabelle 2.7) verwendet.

Als Vorkultur wurden 50 ml Medium mit mehreren Einzelkolonien angeimpft. Nach Inkubation bei 28°C für einen Tag wurden damit 250 ml Medium als Hauptkultur angeimpft. Diese wurde für einen weiteren Tag bei 28°C inkubiert. Die Kultur wurde mit 4000xg für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde sukzessive mit 240 ml, 120 ml und zweimal 80 ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet noch einmal mit 40 ml 10% Glycerin gewaschen und zum Schluss in 600 µl 10% Glycerin resuspendiert. Davon wurden dann Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

### **2.2.17 Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen**

Zur Transformation wurden elektrokompetente *A. tumefaciens*-Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 0,2-1,0 µg Plasmid wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert, der Ansatz in eine Elektroporations-Küvette überführt und ein elektrischer Puls (2,2 kV) angelegt. Es wurde 1 ml LB-Medium (Tabelle 2.7) zugegeben und die Zellen wurden nach Überführung in ein steriles Reaktionsgefäß für 3-4 Stunden bei 28°C zur Regeneration inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen auf LB- (AGL1) bzw. YEB-Platten (GV3101) mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 28°C für mindestens 3 Tage inkubiert.

### **2.2.18 Stabile Transformation von *N. tabacum***

Die stabile Transformation von *N. tabacum* wurde nach De Block (1988) und Dietze *et al.* (1995) durchgeführt. Dazu mussten zuerst die Agrobakterien mit den entsprechenden Vektoren (2.1.8) transformiert werden.

Zur Vorbereitung der Agrobakterien wurde eine positive Einzelkolonie in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf vier LB- (AGL1) bzw. YEB-Agarplatten (GV3101)

ausplattiert. Diese wurden für mindestens drei Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Spatel von den Platten gekratzt und in 200 ml YEB-Induktionsmedium (Tabelle 2.27) resuspendiert. Dabei wurde so viel Zellmaterial eingesetzt, dass eine OD<sub>600</sub> von 0,5-1 erreicht wurde. Die Kultur wurde dann über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4800xg bei 4°C für 20 min wurde die Kultur pelletiert und das entstehende Pellet in so viel Infiltrationsmedium (Tabelle 2.28) resuspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> von ungefähr 1,0 erhalten wurde.

**Tabelle 2.27: YEB-Induktionsmedium (pH 5,6)**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
Nutrient Broth	0,8% (w/v)
Hefeextrakt	0,1% (w/v)
Sucrose	0,5% (w/v)
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
MES pH 5,6	10 mM
Acetosyringon	20 µM
Carbenicillin	50 mg/l
Kanamycin	15 mg/l

**Tabelle 2.28: Infiltrationsmedium (pH 5,6)**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
Sucrose	2% (w/v)
MS-Salz (Basal Salt Mixture)	0,43% (w/v)
MES pH 5,6	10 mM
Acetosyringon	200 µM

Blätter von steril in Weckgläsern angezogenen Tabakpflanzen wurden mit dem Skalpell in kleine Stücke geschnitten (ca. 0,5-1 cm<sup>2</sup>) und in der Agrobakteriensuspension für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Blattstücke bei 23-25°C für 2 Tage im Dunkeln auf feuchtem Whatmanpapier in Petrischalen inkubiert. Die Blattstücke wurden in sterilem Wasser mit 200 mg/ml Cefotaxim gewaschen, auf MSII-Platten (Tabelle 2.29) übertragen und dann bei 23-25°C und 16 Stunden Lichtperiode zur Kallusbildung inkubiert. Alle 2-3 Wochen wurden die Kalli auf frische MSII-Platten umgesetzt. Nach 4-5 Wochen konnten die ersten Triebe von den Kalli

abgeschnitten und zur Wurzelbildung in MSIII-Medium (Tabelle 2.30) übertragen werden. Nach Inkubation für etwa 2 Wochen bei 23-25°C und 16 Stunden Lichtperiode wurden die Pflanzen in Erde umgesetzt.

**Tabelle 2.29: MSII-Medium**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
MS-Medium mit Pflanzenagar	
BAP (6-Benzylaminopurin)	1 mg/l
NAA (1-Naphtalinessigsäure)	0,1 mg/l
Hygromycin/Kanamycin	50/100 mg/l
Cefotaxim	200 mg/l

**Tabelle 2.30: MSIII-Medium**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
MS-Medium mit Pflanzenagar	
Hygromycin/Kanamycin	50/100 mg/l
Cefotaxim	200 mg/l

### 2.2.19 Transiente Transformation von *N. tabacum*

Für die transiente Transformation wurden die Agrobakterien gleich vorbereitet wie für die stabile Transformation. Allerdings wurde die OD600 nach Resuspendieren des Bakterienpellets in Infiltrationsmedium auf ungefähr 1,5 eingestellt und die Kultur danach für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Transformation per Spritzen- oder Vakuuminfiltration durchgeführt. Bei der Spritzeninfiltration wurde die Blattunterseiten intakter Tabakpflanzen mit einer 2 ml Spritze leicht angeritzt und die Bakteriensuspension durch sanften Druck in die Interzellularräume der Blätter gepresst. Bei der Vakuuminfiltration wurden die Blätter durch mehrmaliges Anlegen von Vakuum für 1-2 min in einer Saugflasche infiltriert. Danach wurden die Pflanzen bzw. Blätter bei 23-25°C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Vor der Analyse wurde dann noch eine Inkubation bei 23-25°C und 16 Stunden Lichtperiode für 1-2 Tage durchgeführt.

### **2.2.20 Transiente Transformation mittels Partikelkanone**

Bei dieser Methode wird die DNA an winzige Gold oder Wolfram-Partikel gebunden und anschließend mit hohem Gasdruck in pflanzliches Gewebe oder einzelne Pflanzenzellen „geschossen“. Die beschleunigten Partikel durchdringen die Zellwände und -membranen und werden im Zellinnern abgebremst. Die DNA löst sich ab und kann in die pflanzliche DNA integriert werden.

Für die transiente Transformation von Wasserlinsen (*Lemna minor L.*) wurde die Partikelkanone verwendet. Hierfür mussten zuerst Goldpartikel vorbereitet und anschließend mit Plasmid-DNA beschichtet werden.

#### **2.2.20.1 Vorbereitung der Goldpartikel**

Zur Vorbereitung der Goldpartikel (Durchmesser 1,5-3  $\mu\text{m}$ ) wurden 50 mg in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  durch 2 bis 3 minütiges Vortexen und eine einminütige Behandlung im Ultraschallbad resuspendiert. Danach wurden die Partikel kurz herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Vorgang wurde noch einmal mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und dann zur Sterilisierung mit 1 ml 96% Ethanol wiederholt. Schließlich wurden die Partikel in 1 ml sterilem 50% Glycerin aufgenommen.

#### **2.2.20.2 Beschichten der Goldpartikel**

Für die Beschichtung wurden 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und unter Vortexen mit 50  $\mu\text{l}$  der vorbehandelten Goldpartikel gemischt. Unter Vortexen wurden 5x10  $\mu\text{l}$  eiskaltes 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  hinzugegeben und für weitere 3 min gevortext. Anschließend wurden wieder unter Vortexen 4x5  $\mu\text{l}$  eiskaltes 0,1 M Spermidin hinzupipettiert und nochmal für 3 min gevortext. Die Partikel wurden kurz herunterzentrifugiert und zuerst in 140  $\mu\text{l}$  70% Ethanol und dann in 140  $\mu\text{l}$  96% Ethanol durch Vortexen resuspendiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation wird das Pellet in 48  $\mu\text{l}$  96% Ethanol durch Vortexen resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert.

#### **2.2.20.3 Schießen mit der Partikelkanone**

Die beschichteten Goldpartikel wurden nochmal gevortext und direkt danach wurden 6  $\mu\text{l}$  davon gleichmäßig auf das Patronennetz pipettiert. Nach kurzem Trocknen wur-

de die Patrone verschlossen und in die entsprechende Halterung gedreht. Die zu transformierenden Blätter wurden etwa 30 cm von der Patrone entfernt auf einer Wasseragar-Platte (Tabelle 2.31) positioniert. Etwa in der Mitte zwischen Patrone und Wasseragar-Platte wurde die Netzplatte angebracht. Die Kammer wurde mit einer Plexiglasplatte verschlossen und der Druck auf etwa 900 mbar verringert. Mit einem Druck von 6 bar wurden dann die Goldpartikel auf die Blätter geschossen.

**Tabelle 2.31: Wasseragar**

Komponente	Endkonzentration
Pflanzenagar	0,8%
H <sub>2</sub> O	

### 2.2.21 Protein-Lokalisationsanalysen

Die Kopplung von Fluorophoren an Proteine ermöglicht es, deren Lokalisation mikroskopisch zu untersuchen. Um die Fusionen zwischen den gewünschten Proteinen und den Fluoreszenz-Proteinen zu erhalten, werden die entsprechenden DNA-Sequenzen in Plasmiden fusioniert. Anschließend werden Pflanzen mit diesen Plasmiden mittels Agrobakterien oder Genkanone transformiert. Nach der Expression kann die Lokalisation der Fusionsproteine analysiert werden.

### 2.2.22 Isolation von Protoplasten

Ganze Blätter eignen sich auf Grund ihrer Struktur nur schlecht für mikroskopische Untersuchungen. Neben der Möglichkeit sehr feine Schnitte anzufertigen bieten sich Protoplasten zur Analyse an. Diese gewinnt man, indem man die Zellwände durch Zellulasen und Pektinasen abbaut.

Zur Herstellung der Protoplasten wurde das Blattmaterial zuerst fein zerschnitten und dann mit Protoplastierungspuffer (Tabelle 2.32) vakuumfiltriert. Die Suspension wurde bei 26-30°C unter Licht für 1-2 Stunden inkubiert und anschließend über ein 100 µm Nylonsieb gefiltert, um nicht protoplastierte Rückstände abzutrennen. Zur Aufreinigung wurde die Protoplastensuspension mit einem halben Volumen Linsmeier/Skoog-Medium (Tabelle 2.32) gemischt und mit 500xg für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in Linsmeier/Skoog-Medium resuspendiert. Die Qualität und Quantität der Protoplasten wurde mikroskopisch bestimmt.

Tabelle 2.32: Puffer und Medien für die Protoplastenisolierung

Komponente	Endkonzentration
<b>SMC-Puffer</b>	
Sorbitol	0,5 M
MES	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
mit NaOH/HCl auf pH 5,8	
<b>Protoplastierungspuffer</b>	
Rohament CL	3% (v/v)
Rohament PL	2% (v/v)
Mazeroenzym	0,12% (v/v)
in SMC-Puffer	
<b>Linsmeier/Skoog-Medium</b>	
MS-Salz	0,36% (v/v)
NaCl	0,27 M
mit NaOH/HCl auf pH 5,8	

### 2.2.23 In vitro Translation und in vitro Import

Mit Hilfe der in vitro Translation können aus mRNA-Molekülen im Reaktionsgefäß Proteine synthetisiert werden. Hierfür werden so genannte in vitro Translationssysteme (z. B. Weizenkeimlysat) verwendet, welche die nötigen Enzyme, tRNA-Moleküle und Aminosäuren enthalten, so dass es nach Zugabe der mRNA zur Proteinsynthese kommt. Die Zugabe radioaktiv markierter Bausteine (z.B. <sup>35</sup>S-Methionin) ermöglicht einen späteren Nachweis der Translationsprodukte.

Durch in vitro Import des radioaktiv markierten Proteins in isolierte Kompartimente wie Chloroplasten oder Mitochondrien kann dessen Lokalisation bestimmt werden. Die Methode erlaubt nicht nur Aussagen darüber, ob das Protein in das Kompartiment importiert wird, sondern auch, ob es in der Membran oder im Stroma lokalisiert ist. Nach der Import-Reaktion sorgt eine Behandlung mit Thermolysin für den Abbau nicht importierter Proteine. Importierte Proteine sind vor dem Abbau durch das Enzym geschützt. Durch Aufschluss der Chloroplasten und anschließender Zentrifugation



erfolgt eine Auftrennung in Membran (Pellet) und Stromafraktion (Überstand). Mit Hilfe einer SDS-PAGE der aufgeschlossenen Chloroplasten kann außerdem die korrekte Prozessierung des Proteins überprüft werden. Die Isolation der Chloroplasten erfolgte nach Aronsson und Jarvis (2002), der *in vitro* Import nach Benz *et al.* (2009). Die *in vitro* Translation und der *in vitro* Import wurden freundlicherweise von Dr. Bettina Bölter (Institut für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt.

### 2.2.24 Analyse von Metaboliten

Pflanzen können ihren Stoffwechsel sehr flexibel an wechselnde Bedingungen anpassen. So wirken sich Belichtungsstärke, Nährstoffversorgung und Temperatur direkt auf die Metabolitzusammensetzung aus. Zudem unterliegen die einzelnen Metabolite im Tagesverlauf hohen Schwankungen. Für vergleichende Studien von Pflanzeninhaltsstoffen war es daher wichtig, dass das Pflanzenmaterial unter identischen Bedingungen gewonnen wurde. Standardmäßig wurden für die Analysen Blattscheiben des dritten Blattes von oben verwendet. Die Ernte erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach ca. 4 h Belichtung.

#### 2.2.24.1 Extraktion löslicher Metabolite I

Metabolite für enzymatische Nachweise und die Bestimmung per GC-MS wurden nach diesem Protokoll isoliert.

Blattscheiben von jeweils ca. 60 mg wurden unter Stickstoff fein gemörsert. Anschließend wurde das Blattmaterial in 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer (Tabelle 2.33, für GC-MS mit  $^{13}\text{C}$ -Sorbitol als interner Standard) durch Vortexen und Schütteln bei 4°C für 10 min resuspendiert. Nach Zentrifugieren mit 14000xg für 2 min wurden 800  $\mu\text{l}$  des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gemischt. Zur Phasentrennung wurde erneut mit 14000xg für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden 400  $\mu\text{l}$  des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe einer SpeedVac getrocknet. Vor der Analyse wurden die Pellets in einem geeigneten Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert.

**Tabelle 2.33: Metabolit-Extraktionspuffer**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
-------------------	-------------------------

---

Methanol	55,6% (v/v)
Chloroform	22,2% (v/v)
H <sub>2</sub> O	22,2% (v/v)
<sup>13</sup> C-Sorbitol	0,2 mg/ml

---

#### **2.2.24.2 Extraktion löslicher Metabolite II**

Dieses Protokoll wurde für die Isolierung von Metaboliten verwendet, welche mittels LC-MS bestimmt werden sollten.

Blattscheiben von jeweils ca. 60 mg wurden unter Stickstoff fein gemörsert und anschließend in 400 µl TE-Puffer (pH 7,0) und 400 µl reinem, eiskaltem Methanol durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 800 µl eiskaltem Chloroform wurden die Proben für 1 Stunde bei -20°C in einem Überkopfschüttler geschüttelt. Zur Phasentrennung wurden die Proben mit 14000xg bei -20°C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl des Überstandes abgenommen und durch einen Filter (0,2 µm) filtriert.

#### **2.2.24.3 Extraktion nicht löslicher Metabolite**

Diese Extraktionsmethode wurde für die enzymatische Stärkebestimmung verwendet.

Für die Extraktion nicht löslicher Metabolite wurden Blattscheiben von ca. 60 mg ausgestanzt und dreimal mit 1 ml heißem Ethanol extrahiert. Anschließend wurde die ausgekochte Blattscheibe mit 250 µl 2 M KOH versetzt und mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert. Nach Zugabe weiterer 250 µl 2 M KOH wurden die Proben 45 min bei 95°C inkubiert und dann 5 min mit 14000xg zentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden mit 1100 µl 1 M Essigsäure gemischt.

#### **2.2.25 Enzymatische Nachweise von Metaboliten**

Die für die Messung der Metabolite benötigten Extrakte wurden wie unter 2.2.24 isoliert und für die Messungen verwendet.

Soweit nicht anders angegeben wurden die Konzentrationen nach der Formel 2.1 berechnet.

$$c \left( \frac{\text{mol}}{\text{g}} \right) = \frac{\Delta E \cdot V_K \cdot V_E}{V_P \cdot A \cdot \epsilon \cdot d}$$

**Formel 2.1: Berechnung der Metabolitkonzentrationen**

Abkürzungen:  $\Delta E = E_1 - E_0$  bzw.  $E_2 - E_1$ ,  $V_K$ : Volumen der Reaktionslösung (0,2 ml),  $V_E$ : Gesamtvolumen des Metabolitextraktes (0,25 ml),  $V_P$ : Volumen des Metabolitextraktes in der Reaktion (0,01 oder 0,03 ml),  $A$ : Fläche der Blattscheibe (2,27 cm<sup>2</sup>),  $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient (NADH/NADPH = 6220 bzw. 6310 l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>),  $d$ : Schichtdicke (0,6 cm).

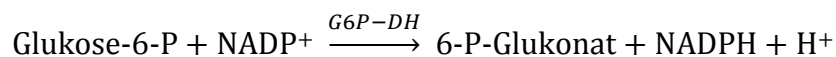
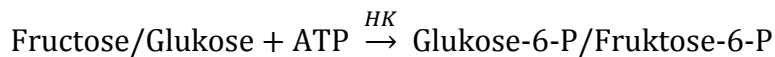
**2.2.25.1 Bestimmung des Glukose- und Fruktose-Gehaltes**

Je 10 µl der Metabolitextrakte wurden mit 190 µl Glucose/Fruktose-Reaktionspuffer (Tabelle 2.34) in eine ELISA-Platte gemischt und die Basis-Extinktion  $E_0$  bei 340 nm und 30°C gemessen. Anschließend wurden 0,7 U einer Enzymmischung mit Hexokinase (HK) und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) hinzugegeben. Nach erneutem Mischen wurde eine Inkubation bei 30°C durchgeführt bis ein konstanter Wert  $E_1$  erhalten wurde. Dann wurden 1,75 U Phosphogluko-Isomerase (PGI) hinzugeben und nach erneuter Inkubation bei 30°C bis zum Erreichen konstanter Extinktionswerte der  $E_2$ -Wert gemessen. Die Messung basiert auf den unter Formel x angegebenen Reaktionen.

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach der Formel 2.2.

**Tabelle 2.34: Glukose/Fruktose-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Triethanolamin pH 7,6	150 mM
NADP	0,25 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
ATP	2,5 mM

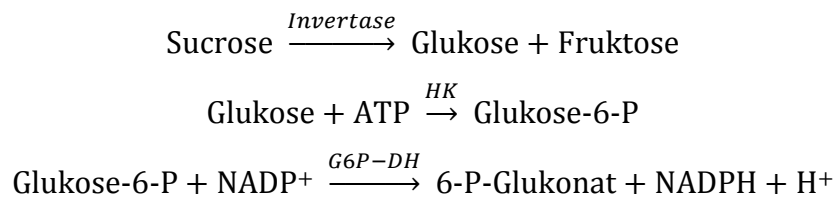
**Formel 2.2: Schematischer Reaktionsablauf der Glukose/Fruktose-Messung**

### 2.2.25.2 Bestimmung des Sucrose-Gehaltes

Je 50 µl Metabolitextrakt wurden mit 50 µl Citrat-NaOH-Puffer (Tabelle 2.35) und 2 U Invertase für 1 h bei 30°C inkubiert. Davon wurden je 10 µl mit 190 µl Glucose/Fructose-Reaktionspuffer (Tabelle 2.34) in einer ELISA-Platte gemischt und die Basis-Extinktion  $E_0$  bei 340 nm und 30°C gemessen. Anschließend wurden 0,7 U einer Enzymmischung mit Hexokinase (HK) und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) hinzugegeben. Nach erneutem Mischen wurde eine Inkubation bei 30°C durchgeführt bis ein konstanter Wert  $E_1$  erhalten wurde. Die Messung basiert auf den unter Formel 2.3 angegebenen Reaktionen.

Tabelle 2.35: Citrat-NaOH-Puffer

Komponente	Endkonzentration
Citrat-NaOH pH 4,6	100 mM



Formel 2.3: Schematischer Reaktionsablauf der Sucrose-Messung

### 2.2.25.3 Bestimmung des Stärke-Gehaltes

Von den Extrakten aus 2.2.24.3 wurden je 100 µl mit 400 µl 50 mM Natrium-Acetat (pH 4,8), 1 U Amyloglucosidase und 2 U  $\alpha$ -Amylase gemischt und für 15 Stunden bei 50°C inkubiert, um die Stärke in Glukose umzuwandeln. Danach wurden die Proben für 5 min mit 14000xg zentrifugiert. Vom Überstand wurden dann 10 µl für den Glukose-Assay eingesetzt (wie unter 2.2.25.1 aber ohne PGI).

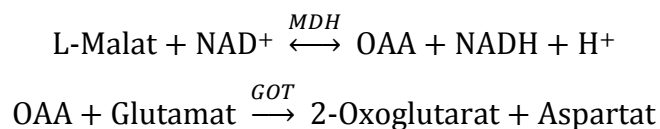
### 2.2.25.4 Bestimmung des Malat-Gehaltes

Die Bestimmung des Malat-Gehaltes erfolgte mittels Malatdehydrogenase (MDH), die beim Umsatz von L-Malat zu Oxalacetat äquimolare Mengen NADH bildet. Glutamat-

Oxalacetat-Transaminase (GOT) entfernt Oxalacetat permanent aus der Reaktion, was den quantitativen Umsatz von Malat ermöglicht. 10 µl Extrakt wurden mit 190 µl Malat-Reaktionspuffer (Tabelle 2.36) in einer ELISA-Platte gemischt und die Ausgangsextinktion  $E_0$  bei 340 nm und 30°C bestimmt. Nach Zugabe von 24 U MDH wurde eine Inkubation bei 30°C durchgeführt, bis konstante Extinktionswerte  $E_1$  erhalten wurden. Die Messung basiert auf den unter Formel 2.4 angegebenen Reaktionen.

**Tabelle 2.36: Puffer für Malat-Bestimmung**

Komponente	Endkonzentration
<b>Malat-Reaktionspuffer</b>	
GlyGly-Puffer pH 10,0	1x
NAD	3,5 mM
GOT	1 U/ml
<b>GlyGly-Puffer (pH 10,0)</b>	
Glycylglycin	600 mM
L-Glutamat	100 mM



**Formel 2.4: Schematischer Reaktionsablauf der Malat-Messung**

### 2.2.25.5 Bestimmung des Gehaltes an Pyruvat und PEP

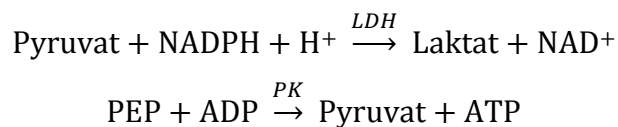
Der Gehalt an Pyruvat und PEP wurde in einer kombinierten Reaktion bestimmt. Während Pyruvat direkt in einer NADH-abhängigen Reaktion durch eine Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat umgesetzt werden kann, steht PEP erst nach Zugabe einer Pyruvat-Kinase (PK) als Pyruvat für die Reaktion zur Verfügung.

Je 30 µl Extrakt wurden mit 170 µl Pyruvat/PEP-Reaktionspuffer (Tabelle 2.37) in einer ELISA-Platte gemischt und die Basisextinktion  $E_0$  bei 340 nm und 30°C bestimmt. Nach Zugabe von 5,5 U LDH wurde eine Inkubation bei 30°C durchgeführt, bis konstante Extinktionswerte  $E_1$  erhalten wurden. Dann wurden 4 U PK hinzugeben und nach erneuter Inkubation bei 30°C bis zum Erreichen konstanter Extinktionswer-

te der  $E_2$ -Wert gemessen. Die Messung basiert auf den unter Formel 2.5 angegebenen Reaktionen.

**Tabelle 2.37: Pyruvat/PEP-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Hepes-NaOH pH 7,5	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
ADP	1 mM
NADH	0,2 mM



**Formel 2.5: Schematischer Reaktionsablauf der Pyruvat- und PEP-Messung**

### 2.2.25.6 Bestimmung des Gehaltes an freien Aminosäuren

Die Bestimmung des Gehaltes an freien Aminosäuren erfolgte mit Ninhydrin, welches in saurer Lösung mit Aminogruppen reagiert und einen charakteristischen Farbstoff bildet.

Je 20  $\mu\text{l}$  des Metabolitextraktes wurden mit 80  $\mu\text{l}$  Essigsäure und 200  $\mu\text{l}$  Aminosäuren-Reaktionspuffer (Tabelle 2.38) durch Vortexen gemischt. Nach Inkubation für 10 min bei 80°C wurde die Extinktion von 200  $\mu\text{l}$  in einer ELISA-Platte bei 506 nm und 30°C gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand einer L-Asparaginsäure-Standardreihe.

**Tabelle 2.38: Aminosäuren-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Ethanol (96%)	80 ml
H <sub>2</sub> O	20 ml
Essigsäure	10 ml
Ninhydrin	0,4 g
CdCl <sub>2</sub>	1,0 g

### 2.2.26 Metabolitmessung per LC-MS

Neben der enzymatischen Bestimmung wurden Metabolitmessungen mittels Flüssigchromatographie mit nachfolgender Massenspektrometrie (LC-MS) durchgeführt. Während durch die Flüssigchromatographie eine zeitliche Auftrennung und Quantifizierung der Komponenten erreicht wird, ermöglicht das Massenspektrometer anschließend eine Detektion und Identifizierung der Komponenten anhand ihrer spezifischen Massen.

Die LC-MS-Analysen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Marco Oldiges am Institut für Bio- und Geowissenschaften am Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

### 2.2.27 Elementar-Analyse

Mit Hilfe der CHNS-Analytik lassen sich die in Verbindungen enthaltenen Nichtmetalle Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel feststellen. Man unterscheidet dabei zwischen der bloßen Bestimmung der Bestandteile (qualitative Elementaranalyse) und der Bestimmung des prozentualen Massenanteils der enthaltenen Elemente (quantitative Elementaranalyse).

Die zu messende Probe wird mit einer Waage exakt eingewogen und anschließend bei hohen Temperaturen (maximal 1800 °C) mit reinem Sauerstoff katalytisch verbrannt. Die dabei gebildeten Verbrennungsgase werden mit Hilfe eines Trägergases (meist reines Helium) über einen ca. 600 - 900 °C heißen Kupfer- oder Wolframkontakt geleitet um im Gasstrom enthaltene Stickoxide ( $\text{NO}_x$ ) vollständig zu molekularem Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) zu reduzieren. Danach werden die gasförmigen Endprodukte  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  und  $\text{SO}_2$  in spezifischen Trennsäulen oder gaschromatographisch separiert und nacheinander einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor zugeführt und quantifiziert. Als Standard dient Acetanilid ( $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$ ), welches die theoretische Zusammensetzung 10,363% N, 71,090% C, 6,711% H und 11,837% O aufweist.

Blattscheiben von je 120 mg wurde in  $\text{N}_2$  eingefroren und in einer Lyophylle für ca. 24 Stunden vollständig getrocknet. Die folgende Elementaranalyse wurde dann freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Weber am Institut für Biochemie der Pflanzen an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

### 2.2.28 Bestimmung des $^{13}\text{C}$ zu $^{12}\text{C}$ -Verhältnisses

Die Bestimmung des  $^{13}\text{C}$  zu  $^{12}\text{C}$ -Verhältnisses erfolgte mit Hilfe eines an den Elementar-Analysator gekoppelten Isotopenverhältnis-Massenspektrometers (IRMS). Durchgeführt wurden die Analysen freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Weber am Institut für Biochemie der Pflanzen an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf.

Das Isotopenverhältnis  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  wird als Abweichung von einem Arbeitsstandard ( $\text{CO}_2$ -Referenzgas) ausgedrückt, der zuvor an einem internationalen Standard kalibriert wurde. Diese Abweichung des  $^{13}\text{C}$ -Verhältnisses ( $\delta^{13}\text{C}$ ) wird dann in Promille angegeben. Im Verhältnis zum Arbeitsstandard werden die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte wie in Formel 2.6 gezeigt ausgedrückt.

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{Probe/Ref}}/\text{‰} = \frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{Ref}}}{R_{\text{Ref}}} * 1000$$

**Formel 2.6: Berechnung der Abweichung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Verhältnisses vom Arbeitsstandard**

Dabei bezeichnen  $R_{\text{Probe}}$  und  $R_{\text{Ref}}$  jeweils die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse der Proben bzw. des als Referenzgas verwendeten Kohlendioxids.

### 2.2.29 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach dem Prinzip von Bradford (1976) bestimmt. Der Test beruht auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine in saurer Lösung. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein direktes Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein geeignetes Volumen der zu messenden Probe mit 300  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz (Tabelle 2.39) gemischt und nach 10 min Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich mit Werten einer BSA-Standardreihe wurde dann die Proteinkonzentration bestimmt.

**Tabelle 2.39: Bradford-Reagenz**

Komponente	Endkonzentration
Coomassie brilliant blue G-250	100 mg/l



Ethanol (96%)	50 ml/l
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%)	100 ml/l
H <sub>2</sub> O	ad 1l

### 2.2.30 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten basierte mit Ausnahme der Carboanhydrase auf der Extinktionsänderung der Proben durch NADH/NADPH-Oxidation bzw. NAD/NADP-Reduktion, welche spektralphotometrisch im ELISA-Reader verfolgt wurde. Bei Enzymen, die selbst nicht NAD(H)- oder NADP(H) abhängig sind, wurden mit entsprechenden Enzymen gekoppelte Reaktionen verwendet. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ist ein direktes Maß für die Enzymaktivität. Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität in mU pro mg Protein erfolgte dann nach der Formel 2.7.

$$\text{spezifische Aktivität} \left( \frac{mU}{mg} \right) = \frac{\Delta E \cdot V_K \cdot 1000}{V_P \cdot c_P \cdot \epsilon \cdot d}$$

#### Formel 2.7: Berechnung der spezifischen Enzymaktivität

Abkürzungen:  $\Delta E$ : maximale Extinktionsänderung pro min,  $V_K$ : Volumen der Reaktionslösung (0,3 ml),  $V_P$ : Volumen der Probe (0,015 oder 0,030 ml),  $c_P$ : Proteinkonzentration des Extraktes (mg/ml),  $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient (NADH/NADPH = 6220 bzw. 6310 l<sup>\*</sup>mol<sup>-1</sup>\*cm<sup>-1</sup>),  $d$ : Schichtdicke (0,8 cm).

Standardmäßig wurden für die Enzymtests Blattscheiben des dritten Blattes von oben verwendet. Die Ernte erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach ca. 4 h Belichtung.

#### 2.2.30.1 Extraktionspuffer I

Dieser Extraktionspuffer (Tabelle 2.40) wurde für die Aktivitätsbestimmung der Enzyme PEPC, ME und MDH verwendet.

Blattscheiben von ca. 60 mg wurden in je 250  $\mu$ l Extraktionspuffer mit einem motorgetriebenen Edelstahlpistill aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation mit 14000xg für 5 min bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Vermessung auf Eis gelagert.

Tabelle 2.40: Extraktionspuffer I

Komponente	Endkonzentration
Hepes-NaOH pH 8,0	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	5 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	20 %
Chymostatin	0,01 mg/ml
PefablocSC	0,5 mM

### 2.2.30.2 Extraktionspuffer II

Die Extraktion für die Aktivitätsbestimmung der Enzyme PPDK und PEPS erfolgte mit diesen beiden Puffern (Tabelle 2.41 und Tabelle 2.42).

Blattscheiben von 60 mg wurden in je 250 µl Extraktionspuffer IIB mit einem motorgetriebenen Edelstahlpistill aufgeschlossen. Anschließend wurden je 950 µl Extraktionspuffer IIA hinzugegeben und gut gemischt. Nach Zentrifugation mit 14000xg für 15 min bei 4°C wurden je 800 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Proteinfällung wurden je 0,312 g fein gemörstertes Ammoniumsulfat hinzugegeben. Die Proben wurden dann gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation mit 14000xg für 10 min bei 4°C wurde das Pellet in je 100 µl Extraktionspuffer IIA resuspendiert und bis zur Vermessung auf Eis gelagert.

Tabelle 2.41: Extraktionspuffer IIA

Komponente	Endkonzentration
Hepes-KOH pH 8,0	50 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
EDTA	1 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 mM
Glycerin	20 %

Tabelle 2.42: Extraktionspuffer IIB

Komponente	Endkonzentration
Puffer A	
DTT	5 mM

Pyruvat	5 mM
PefablocSC	1 mM
PolyclarAT	2 %
Chymostatin	0,005 mg/ml

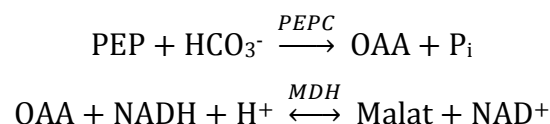
### 2.2.30.3 Bestimmung der PEPC-Aktivität

PEPC (EC 4.1.1.31) katalysiert die irreversible Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Oxalacetat (OAA). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in einer mit Malatdehydrogenase (MDH) gekoppelten Reaktion, bei der OAA unter Oxidation von NADH zu Malat reduziert wird (Formel 2.8). Die PEPC-Aktivität in den Extrakten wurde unter optimalen Bedingungen (pH 8,0; 2,5 mM PEP) ermittelt (Li *et al.*, 1996). Glukose-6-P wirkt als Stimulator des Enzyms.

Je 15 µl Probe wurden in einer ELISA-Platte auf Eis vorgelegt. Nach Zugabe von je 285 µl PEPC-Reaktionspuffer (Tabelle 2.43) wurde die Extinktionsänderung bei 30°C für 30 min gemessen. Als Kontrollen dienten Parallelansätze ohne PEP.

**Tabelle 2.43: PEPC-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Hepes-KOH pH8,0	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1 mM
Glycerin	20 %
Glukose-6-P	1 mM
NADH	0,2 mM
MDH	6 U/ml
PEP	2,5 mM



**Formel 2.8: Reaktionsschema zur Bestimmung der PEPC-Aktivität**

### 2.2.30.4 Bestimmung der NADP-ME-Aktivität

Das NADP-abhängige Malat-Enzym (EC 1.1.1.40) katalysiert unter NADP-Reduktion die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat (Formel 2.9). Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach Häusler *et al.* (1987).

Je 15 µl Probe wurden in einer ELISA-Platte auf Eis vorgelegt. Nach Zugabe von je 285 µl NADP-ME-Reaktionspuffer (Tabelle 2.44) wurde die Extinktionsänderung bei 30°C für 30 min gemessen. Als Kontrollen dienten Parallelansätze ohne Malat.

**Tabelle 2.44: NADP-ME-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Tricin-NaOH	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
NADP	0,6 mM
Malat	25 mM



**Formel 2.9: Reaktionsschema zur Bestimmung der NADP-ME-Aktivität**

### 2.2.30.5 Bestimmung der NAD-ME-Aktivität

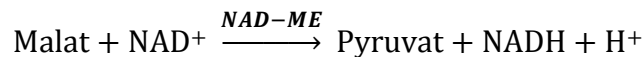
Das NAD-abhängige Malat-Enzym (EC 1.1.1.38) katalysiert unter NAD-Reduktion die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat (Formel 2.10). Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach Bologna *et al.* (2007). Aspartat dient dabei als Aktivator des Enzyms.

Je 10 µl Probe wurden in einer ELISA-Platte auf Eis vorgelegt. Nach Zugabe von je 290 µl NAD-ME-Reaktionspuffer (Tabelle 2.45) wurde die Extinktionsänderung bei 30°C für 30 min gemessen. Als Kontrollen dienten Parallelansätze ohne Malat.

**Tabelle 2.45: NAD-ME-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Tris-HCl	50 mM
MnCl <sub>2</sub>	10 mM
NAD	0,5 mM
Aspartat	2 mM

Malat	10 mM
-------	-------



Formel 2.10: Reaktionsschema zur Bestimmung der NAD-ME-Aktivität

### 2.2.30.6 Bestimmung der NADP-MDH-Aktivität

Die NADP-abhängige Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.82) katalysiert unter NADPH-Oxidation die reversible Reduktion von OAA zu Malat (Formel 2.11). Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach Ashton und Hatch (1983). Um störende ME-Aktivitäten zu unterdrücken enthält der Reaktionspuffer EDTA. Dieses bindet zweiwertige Kationen ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ), welche das ME als Cofaktor benötigt.

Vor der Enzymmessung wurden die Proben mit 50 mM DTT versetzt und für 30 min bei RT inkubiert, um die MDH zu aktivieren. Anschließend wurden je 6  $\mu\text{l}$  Probe in einer ELISA-Platte vorgelegt. Nach Zugabe von je 294  $\mu\text{l}$  NADP-MDH-Reaktionspuffer (Tabelle 2.46) wurde die Extinktionsänderung bei 30°C für 30 min gemessen. Als Kontrollen dienten Parallelansätze ohne OAA.

Tabelle 2.46: NADP-MDH-Reaktionspuffer

Komponente	Endkonzentration
Tricin-KOH pH 8,3	100 mM
KCl	70 mM
NADPH	0,2 mM
EDTA	1 mM
DTT	20 mM
OAA	2,5 mM



Formel 2.11: Reaktionsschema zur Bestimmung der NADP-MDH-Aktivität

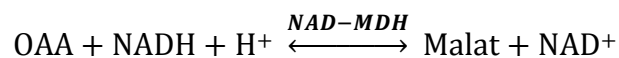
### 2.2.30.7 Bestimmung der NAD-MDH-Aktivität

Die NAD-abhängige Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) katalysiert unter NADH-Oxidation die reversible Reduktion von OAA zu Malat (Formel 2.12). Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach Sutherland und McAllister-Henn (1985). Um störende ME-Aktivitäten zu unterdrücken enthält der Reaktionspuffer EDTA. Dieses bindet zweiwertige Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ), welche das ME als Cofaktor benötigt.

Je 6  $\mu$ l Probe wurden in einer ELISA-Platte auf Eis vorgelegt. Nach Zugabe von je 294  $\mu$ l NAD-MDH-Reaktionspuffer (Tabelle 2.47) wurde die Extinktionsänderung bei 30°C für 30 min gemessen. Als Kontrolle dienten Parallelansätze ohne Malat.

**Tabelle 2.47: NAD-MDH-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Tris-HCl	50 mM
NAD	5 mM
EDTA	5 mM
Malat	25 mM



**Formel 2.12: Reaktionsschema zur Bestimmung der NAD-MDH-Aktivität**

### 2.2.30.8 Bestimmung der PPDK-Aktivität

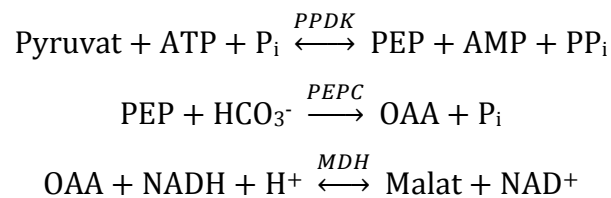
Die PPDK (EC 2.7.9.1) katalysiert die Bildung von PEP aus Pyruvat, ATP und Orthophosphat. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in einer mit PEPC und MDH gekoppelten Reaktion nach Ashton *et al.* (1990). Hierbei wird das entstehende PEP zunächst zu OAA und anschließend unter NADH-Oxidation zu Malat umgesetzt (Formel 2.13).

Je 30  $\mu$ l Probe wurden in einer ELISA-Platte auf Eis vorgelegt. Nach Zugabe von je 270  $\mu$ l PPDK-Reaktionspuffer (Tabelle 2.48) wurde die Extinktionsänderung bei 30°C für 30 min gemessen. Als Kontrollen dienten Parallelansätze ohne Pyruvat oder ohne ATP.

**Tabelle 2.48: PPDK-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Hepes-KOH pH 8,0	25 mM

MgSO <sub>4</sub>	10 mM
DTT	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
Glukose-6-P	2 mM
ATP	1 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mM
NADH	0,2 mM
PEPC	0,25 U/ml
MDH	1 U/ml
Pyruvat	1 mM



**Formel 2.13: Reaktionsschema zur Bestimmung der PPDK-Aktivität**

### 2.2.30.9 Bestimmung der PEPS-Aktivität

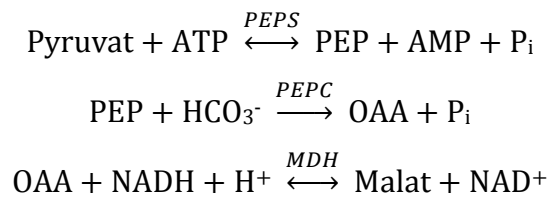
Die PEPS (EC 2.7.9.2) katalysiert die Bildung von PEP aus Pyruvat und ATP, benötigt im Gegensatz zu PPDK aber kein Orthophosphat für diese Reaktion. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie bei der PPDK in einer mit PEPC und MDH gekoppelten Reaktion (Formel 2.14).

Je 30 µl Probe wurden in einer ELISA-Platte auf Eis vorgelegt. Nach Zugabe von je 270 µl PPDK-Reaktionspuffer (Tabelle 2.49) wurde die Extinktionsänderung bei 30°C für 30 min gemessen. Als Kontrollen dienten Parallelansätze ohne Pyruvat oder ohne ATP.

**Tabelle 2.49: PEPS-Reaktionspuffer**

Komponente	Endkonzentration
Hepes-KOH pH 8,0	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
Glukose-6-P	2 mM
ATP	1 mM
NADH	0,2 mM
PEPC	0,25 U/ml
MDH	1 U/ml
Pyruvat	1 mM



**Formel 2.14: Reaktionsschema zur Bestimmung der PEPS-Aktivität**

### 2.2.31 Bestimmung chloroplastidärer Pigmente

Die Messung des Gehaltes an chloroplastidären Pigmenten erfolgte nach Nybom (1955) sowie Rau und Senger (1965).

Jeweils etwa 60 mg Blattmaterial wurden unter Stickstoff gemörsert und zur Extraktion mit 400 µl 80% Aceton für 1 Stunde bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei 18000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden dann noch zweimal mit je 400 µl 80% Aceton extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden 1:10 mit 80% Aceton verdünnt und im Photometer vermessen. Chlorophyll a hat ein Absorptionsmaximum bei 663 nm, Chlorophyll b bei 645 nm und Carotinoide absorbieren bei 440 nm. Diese drei Wellenlängen wurden photometrisch gemessen und in Konzentrationen umgerechnet (Formel 2.15).

$$\begin{aligned}
 c(\mu\text{g/ml})[\text{Chlorophyll a}] &= 9,78 \cdot E_{663} - 0,99 \cdot E_{645} \\
 c(\mu\text{g/ml})[\text{Chlorophyll b}] &= 21,4 \cdot E_{663} - 4,65 \cdot E_{645} \\
 c(\mu\text{g/ml})[\text{Carotinoide}] &= 4,69 \cdot E_{440} - 0,268 \cdot (20,2 \cdot E_{645} + 8,02 \cdot E_{663})
 \end{aligned}$$

**Formel 2.15: Berechnung chloroplastidärer Pigmente**



### 2.2.32 Ammonia Release Assay

Der Ammonia Release Assay wurde wie von Gaunt *et al.* (1998) beschrieben durchgeführt. Blattscheiben von 8 mg wurden in jeweils 200 µl Inkubationsmedium (Tabelle 2.50) in einer ELISA-Platte mit 100 PAR für 6 Stunden bei 26°C inkubiert. Als Nullwert diente Inkubationsmedium ohne Blattscheibe. Anschließend wurden je 20 µl in eine neue ELISA-Platte überführt, zuerst mit 100 µl Reagenz I (Tabelle 2.51) und dann mit 100 µl Reagenz II (Tabelle 2.52) gemischt. Nach Inkubation für 15 min bei 37°C im Dunkeln folgte eine weitere Inkubation bei RT für 15 min. Enthaltene Ammonium-Ionen führten zu einer grünen bis blauen Farbe, was photometrisch bei 655 nm quantitativ erfasst werden konnte. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte dann anhand eines Ammoniumstandards (NH<sub>4</sub>Cl).

**Tabelle 2.50: Ammonia Release Assay Inkubations-Medium**

Komponente	Endkonzentration
Kaliumphosphat-Puffer pH 5.8	50 mM
Sucrose	2%
Tween20	0,1%
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0,1 mg/l
Phosphinothricin	25 mg/l

**Tabelle 2.51: Ammonia Release Assay Reagenz I**

Komponente	Endkonzentration
Natriumsalicylat	0,21 M
Trinatriumcitrat	0,085 mol/l
Natriumtartrat	25 g/l
Natriumnitroprussid	0,4 mM

**Tabelle 2.52: Ammonia Release Assay Reagenz II**

Komponente	Endkonzentration
NaOH	0,75 mol/l

---

 Natriumdichlorisocyanurat 2,3 mM
 

---

### 2.2.33 Messung photosynthetischer Parameter

Alle photosynthetischen Parameter wurden mit dem Licor Li-6400 gemessen. Für die Messungen wurde die zugehörige Blattkammer 6400-40 LCF (leaf chamber fluorometer) mit angeschlossenem Infrarot-Gasanalysator verwendet. Die genauen Einstellungen für die gemessenen photosynthetischen Parameter sind den nachfolgenden Beschreibungen zu entnehmen.

#### 2.2.33.1 Messung der Sauerstoffinhibierung

Die Sauerstoffinhibierung stellt einen Parameter für das Verhältnis von CO<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub> in der Umgebung von RUBISCO dar. Die Messung der Sauerstoffinhibierung wurde bei einer Temperatur von 27°C, einer Flussrate von 200 μmol\*s<sup>-1</sup> und einer Photonenflussdichte (PFD) von 1000 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> durchgeführt. Der Blauanteil des Lichtes lag bei 10% und die Luftfeuchte bei ca. 70%. Für die Messung wurden fertig gekaufte Gasgemische mit 2% bzw. 21% Sauerstoff, 400 ppm CO<sub>2</sub> und Stickstoff verwendet. Vor dem Start der Messung wurde eine Adaptionphase für ca. 30 min durchgeführt, bis die stomatäre Leitfähigkeit einen konstanten Wert aufwies. Danach fand die Messung über 60 min statt, wie in Tabelle 2.53 dargestellt. Die Berechnung der Sauerstoffinhibierung erfolgte dann nach Formel 2.16.

**Tabelle 2.53: Messprotokoll für die Sauerstoffinhibierung**

Messdauer	Datenpunktaufnahme	Gasgemisch
30 min	alle 30 s	21% O <sub>2</sub>
30 min	alle 30 s	2% O <sub>2</sub>

$$O_2\text{-Inhibition}(\%) = \frac{A_{2\%} - A_{21\%}}{A_{2\%}} * 100\%$$

**Formel 2.16: Berechnung der Sauerstoffinhibierung**

### 2.2.33.2 Messung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes

Der CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt beschreibt diejenige CO<sub>2</sub>-Konzentration, bei der die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Aufnahme gleich der respiratorischen CO<sub>2</sub>-Abgabe (Photorespiration und Respiration) ist. Er stellt einen Parameter dafür dar, wie effizient Pflanzen CO<sub>2</sub> nutzen können. Die Messung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes wurde bei einer Temperatur von 27°C, einer Flussrate von 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$  und einer Photonendichtedichte (PFD) von 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durchgeführt. Der Blauanteil des Lichtes lag bei 10% und die Luftfeuchte bei ca. 70%. Nach einer Adaptionsphase für ca. 30 min (bis die stomatare Leitfähigkeit einen konstanten Wert aufwies) wurde unter diesen Bedingungen dann die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate (A) im Abstand von 5-6 min bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ( $C_a$ : atmosphärische CO<sub>2</sub>-Konzentration: 400, 300, 200, 150, 100, 80, 65, 45 ppm CO<sub>2</sub>) gemessen. Der Schnittpunkt der daraus erhaltenen A/C<sub>i</sub>-Linie (C<sub>i</sub>: interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentration) mit der X-Achse ergibt dann den CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt.

### 2.2.34 Pflanzenanzucht unter erniedrigten CO<sub>2</sub>-Bedingungen

C<sub>4</sub>-Pflanzen sind den meisten C<sub>3</sub>-Pflanzen vor allem dann überlegen, wenn die klimatischen Bedingungen das Auftreten der Photorespiration begünstigen. Um zu untersuchen, ob der eingebrachte putative C<sub>4</sub>-Zyklus unter solchen Bedingungen einen Vorteil bringt, wurden die Pflanzen in einer Klimakammer mit kontrollierter Gasatmosphäre (100 ppm CO<sub>2</sub>) angezogen. Eine Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration wurde erreicht, indem die zugeführte Luft über ein CO<sub>2</sub>-Bindemittel (Natronkalk) geleitet wurde.

Die Anzucht erfolgte unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) bei ca. 140 PAR. Die Tagestemperatur lag dabei bei ca. 25°C und die Nachttemperatur bei 16-20°C. Die Luftfeuchtigkeit betrug 60%.

Diese Versuche konnten freundlicherweise im Institut für Pflanzenwissenschaften am Forschungszentrum Jülich durchgeführt werden.

### **2.2.35 Bestimmung der Blattfläche**

Zur Bestimmung der Blattfläche wurden Länge und Breite aller Blätter einer Pflanze gemessen. Mittels folgender Formel wurde dann ihre Fläche bestimmt (Mokhtarpour *et al.*, 2010):

$$A_{\text{Blatt}} = 0,75 \times \text{Länge} \times \text{Breite}$$

Aus den Flächen der einzelnen Blätter ergab sich die Gesamtblattfläche einer Pflanze.

### 3 Ergebnisse

Bisher beschränkte sich die biotechnologische Optimierung verschiedener Pflanzenarten größtenteils auf die Einführung eines einzelnen neuen Merkmals in das pflanzliche Genom. Allerdings beruhen viele agronomische Merkmale auf komplexen Interaktionen zwischen mehreren Proteinen. Die biotechnologische Verbesserung bestimmter Pflanzenarten erfordert daher die Übertragung und die Expression kompletter metabolischer Wege (Halpin *et al.*, 2001; Daniell und Dhingra, 2002; Lyznik und Dress, 2008; Naqvi *et al.*, 2010). Die wichtigsten Strategien zur Übertragung multipler Gene in Pflanzen sind Retransformation, Cotransformation, Kreuzung sowie die Transformation von Multigenkonstrukten (Dafny-Yelin und Tzfira, 2007; Naqvi *et al.*, 2010). Obwohl Retransformation, Cotransformation und Kreuzung erfolgreich zur Erzeugung multigener transgener Pflanzen verwendet wurden, leiden sie alle unter gewissen Mängeln (Dafny-Yelin und Tzfira, 2007; Naqvi *et al.*, 2010). Retransformation und Kreuzung sind zum Beispiel sehr zeitaufwändig und erfordern die Verwendung unterschiedlicher Selektionsmarker für jede Runde. Die Cotransformation führt oft zur Integration multipler Kopien und kann in komplexen Integrationsmustern resultieren, was die kommerzielle Nutzung erschwert. Die Übertragung der Gene als ein einzelnes Multigenkonstrukt hat hier deutliche Vorteile. Auch wenn Multigenkonstrukte in mehreren Studien erfolgreich zum Einsatz kamen (Bohmert *et al.*, 2000, 2002; Wu *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2007; Fujisawa *et al.*, 2009), bleibt die Herstellung solcher Konstrukte schwierig und ist mit den herkömmlichen Klonierungsmethoden manchmal nahezu unmöglich (Dafny-Yelin und Tzfira, 2007; Naqvi *et al.*, 2010).

Im ersten Teil der Arbeit sollte daher eine Methode etabliert werden, mit der sich effektiv solche Multigen-Konstrukte herstellen und anschließend in Pflanzen übertragen lassen. Die Methode beruht auf einem Gateway-basierten Vektor-System, welches die Fusion multipler Fragmente ermöglicht. Das System besteht aus einem Gateway-kompatiblen Destination-Vektor und zwei speziellen Entry-Vektoren mit attR-Kassetten, welche von hierzu inkompatiblen attL-Sequenzen flankiert werden. Durch abwechselnde Verwendung der beiden Entry-Vektoren können in mehreren LR-Rektionen multiple Transgene in den Destination-Vektor rekombiniert werden. Bei dem konstruierten Destination-Vektor handelt es sich um einen Shuttle-Vektor für *E. coli* und *A. tumefaciens*. Dadurch kann das Multigen-Konstrukt anschließend entwe-

der durch Agrobakterium-vermittelte oder biolistische Transformation in Pflanzen übertragen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Photosynthese von C<sub>3</sub>-Pflanzen optimiert werden, in welchen CO<sub>2</sub> direkt durch die RUBISCO fixiert wird. Neben der Carboxylierung katalysiert RUBISCO auch die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP). Das hierbei gebildete 2-Phosphoglykolat muss in der Photorespiration metabolisiert werden, was zu einem Verlust an CO<sub>2</sub> führt. Das Recycling des 2-Phosphoglykolats zu 3-Phosphoglycerat ist nicht nur eine verlustreiche Reaktion, es benötigt auch 16 Enzyme und mehr als 6 Translokatoren, welche sich über Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen verteilen (Leegood *et al.*, 1995). Die CO<sub>2</sub>-Freisetzung in den Mitochondrien während der Photorespiration führt zu einem Verlust von 25% des im 2-Phosphoglykolat gebundenen Kohlenstoffs. Außerdem wird im Zuge der Photorespiration NH<sub>3</sub> freigesetzt, welches unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten refixiert werden muss. Der Verlust an CO<sub>2</sub> während der Photorespiration ist darauf zurückzuführen, dass die CO<sub>2</sub>-Freisetzung und die CO<sub>2</sub>-Fixierung getrennt in zwei verschiedenen Kompartimenten ablaufen.

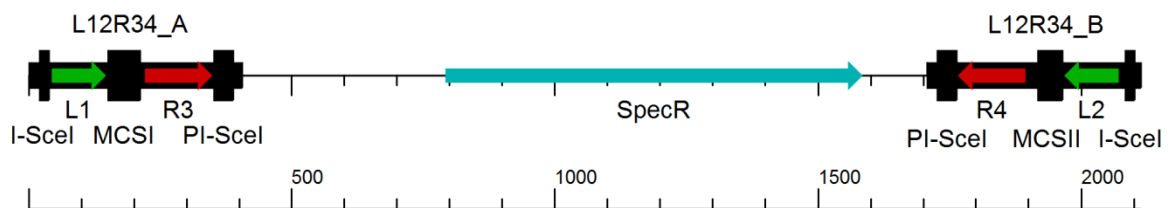
Durch zwei verschiedene Ansätze sollte versucht werden, die Photorespiration in den C<sub>3</sub>-Pflanzen Tabak und Reis zu unterdrücken. Im ersten Ansatz wurde versucht analog zu *H. verticillata* ein „Single Cell“-C<sub>4</sub>-Mechanismus in Tabak zu installieren. Für die Herstellung der hierfür benötigten Multigen-Konstrukte fand die im ersten Teil der Arbeit etablierte MultiRound-Gateway-Technologie Verwendung.

### 3.1 Etablierung des MultiRound-Gateways-Systems

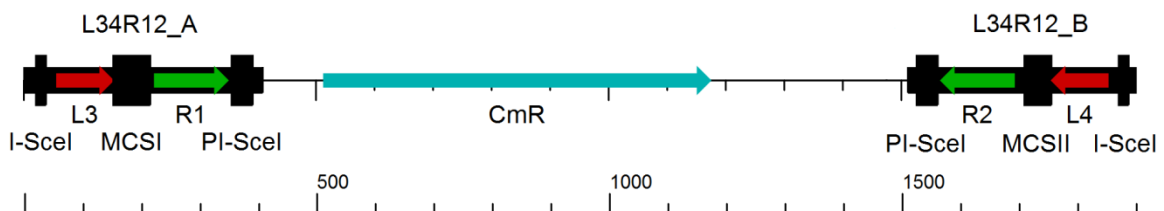
Die im Zuge dieser Arbeit etablierte MultiRound-Gateway-Methode ist eine Weiterentwicklung des Systems von Chen *et al.* (2006). Neben zwei verschiedenen Entry-Vektoren wurde ein Destination-Vektor konstruiert, der stabil große DNA-Fragmente in *E. coli* und *A. tumefaciens* tragen kann. Zudem besitzt er die cis-wirkenden Sequenzen, welche für den durch Agrobakterien vermittelten Transfer in Pflanzen benötigt werden.

### 3.1.1 Konstruktion der Entry-Vektoren

Die Attachment-Sites L1/2/3/4 und R1/2/3/4 wurden entsprechend den Sequenzen aus der Arbeit von Chen *et al.* (2006) gewählt und wie in Abbildung 3.1 dargestellt angeordnet. Zwischen den Attachment-Sites L1 und R3 bzw. L3 und R1 dient eine Multiple Cloning Site (MCSI) zur Integration der Fragmente oder Expressionskassetten, welche in den Destination-Vektor rekombiniert werden sollen. Eine zweite Multiple Cloning Site (MCSII) zwischen R4 und L2 bzw. R2 und L4 erlaubt die Integration eines zweiten Fragmentes, das anschließend simultan rekombiniert werden kann. Durch zwei Erkennungssequenzen für die Homing Endonuklease I-SceI können die Entry-Vektoren linearisiert und das Vektor-Rückgrat entfernt werden. Dies verhindert eine Co-Transformation von Entry- und Destination-Vektoren in dieselbe *E. coli*-Zelle, was die Klonierungs-Effizienz reduzieren würde. Erkennungssequenzen für die Homing Endonuklease PI-SceI ermöglichen eine Linearisierung des Destination-Vektors, was die Rekombinationseffizienz verbessern soll. Die Verwendung der Homing Endonuklease Schnittstellen hat den Vorteil, dass sie nur extrem selten in natürlichen Sequenzen vorkommen.



**L12R34\_SpecR (2113 bp)**



**L34R12\_CmR (1900 bp)**

**Abbildung 3.1: Design der Entry-Vektoren für MultiRound-Gateway-Rekombination**

Dargestellt sind die für die Gateway-Rekombination wichtigen Regionen der Entry-Vektoren. Schwarz gekennzeichnet sind die synthetisierten Fragmente mit den Attachment-Sites L1/2/3/4 und R1/2/3/4, den Multiple Cloning Sites (MCSI und MCSII) sowie den Erkennungssequenzen für die Homing Endonukleasen I-SceI und PI-SceI. Die beiden Selektionsmarker SpecR und CmR dienen zur Selektion der Klone nach erfolgreicher Rekombination.

Die Fragmente mit den Attachment Sites L1/2 und R3/4 für Entry-Vektor 1 bzw. L3/4 und R1/2 für Entry-Vektor 2, den MCSI und II sowie den Erkennungssequenzen für die Homing Endonukleasen I-SceI und PI-SceI wurden von der Firma Eurofins Medigenomix (Ebersberg) synthetisiert. Anschließend sollten die beiden positiven Selektionsmarker SpecR und CmR zwischen die Attachment Sites R3 und R4 bzw. R1 und R2 kloniert werden. Da laut dieser Firma aufgrund hoher Homologien der Attachment Sites keine zusammenhängende Synthese der Fragmente L12R34 für Entry-Vektor 1 bzw. L34R12 für Entry-Vektor 2 möglich war, wurde die Synthese in jeweils zwei Abschnitte (L12R34A und B bzw. L34R12A und B) aufgeteilt, welche in vier Bluescript-Plasmiden zur Verfügung gestellt wurden. Anschließend wurden zuerst die Sequenzen der Selektionsmarker SpecR und CmR in die Plasmide mit den A-Fragmenten kloniert. Dadurch wurde ein größerer Abstand zu den Attachment Sites der B-Fragmente geschaffen, welche nachfolgend kloniert werden konnten. Im letzten Schritt wurden die nicht mehr benötigten LacZ-Sequenzen aus den Bluescript-Plasmiden entfernt, um möglichst viele singuläre Schnittstellen in den Multiple Cloning Sites zu haben. Die Zwischenschritte der Klonierungen wurden durch Restriktionsverdau überprüft. Die endgültigen Entry-Vektoren pUC325\_SpecR sowie pUC324\_CmR wurden zudem sequenziert.

### 3.1.2 Konstruktion der Destination-Vektoren

Der Destination-Vektor für die MultiRound-Gateway-Rekombination muss mehrere Anforderungen erfüllen. Neben der Kompatibilität zu den Entry-Vektoren muss er in der Lage sein, stabil große DNA-Fragmente in *E. coli* und *A. tumefaciens* zu tragen. Außerdem muss er die cis-Elemente LB (left border) und RB (right border) besitzen, welche für den durch Agrobakterien vermittelten Transfer in Pflanzen benötigt werden. Diese signalisieren den Vir-Proteinen den Anfang und das Ende der T-DNA und sind daher essentiell für deren Übertragung. Des Weiteren soll der Vektor durch SAR-Elemente, welche Positionseffekte reduzieren können (Grosveld *et al.*, 1987; Stief *et al.*, 1989; Bonifer *et al.*, 1990), eine stabile Expression der übertragenen Transgene gewährleisten.

Zwei verschiedene Destination-Vektoren wurden konstruiert und auf ihre Eignung hin getestet. Als Basis für den ersten Vektor pTRA\_R12\_CmR\_ccdB diente das Plasmid

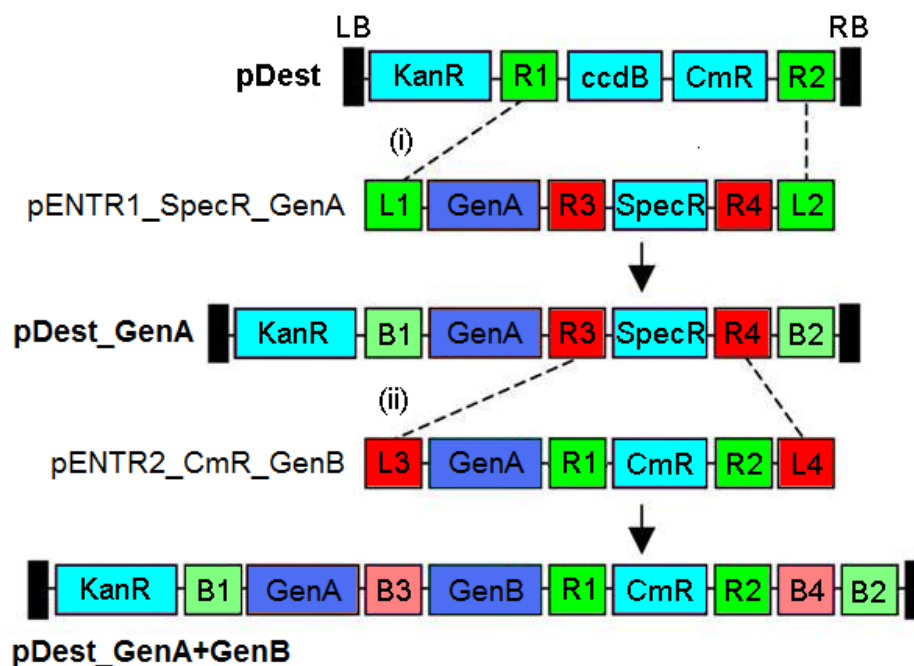


pTRA-c. Dieses besitzt einen high copy Origin für *E. coli* (pUC origin) sowie einen Broad Host Origin (RK2) für die Replikation in *A. tumefaciens* mit niedrigen Kopiezahl. Außerdem enthält es die cis-Elemente LB und RB sowie zwei SAR-Elemente. Somit musste nur noch die Gateway-Kassette mit den Attachment-Sites R1 und R2 sowie den beiden Selektionsmarkern CmR und ccdB zwischen die beiden SAR-Elementen kloniert werden. Die Gateway-Kassette wurde hierfür mittels PCR aus dem Plasmid pEarleyGate amplifiziert. Das Ergebnis der Klonierung wurde anschließend durch Restriktionsverdau sowie Sequenzierung überprüft. Als Basis für den zweiten Vektor diente der TAC-Vektor (transformation-competent artificial chromosome) pYLTA7. Dieser enthält für die Replikation in *E. coli* das P1-Replikon und das lytische P1-Replikon aus dem P1-Phagen. Während ersteres ein single copy origin ist, führt das lytische Replikon, welches unter der Kontrolle des *lac*-Promotors steht, zu höheren Kopiezahl. Für die Replikation in *A. tumefaciens* besitzt der Vektor das single copy replicon des Ri-Plasmids (root-inducing) von *Agrobacterium rhizogenes*. Außerdem enthält es die cis-Elemente LB und RB sowie ein Hygromycin-Resistenz-Gen zur Selektion transgener Pflanzen. In dieses Plasmid mussten neben der Gateway-Kassette auch die SAR-Elemente integriert werden. Zu diesem Zweck wurde die Gateway-Kassette samt den flankierenden SAR-Elementen aus dem ersten Destination-Vektor pTRA\_R12\_CmR\_ccdB ausgeschnitten und in das Plasmid pYLTA7 ligiert. Anschließend wurde die Klonierung durch Restriktionsverdau sowie Sequenzierung der Übergänge überprüft.

### 3.1.3 MultiRound-Gateway-Rekombination

Für die MultiRound-Gateway-Rekombination wurde der zuvor konstruierte Destination-Vektor pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR sowie die beiden Entry-Vektoren pUC325\_SpecR und pUC324\_CmR verwendet. Das Prinzip der MultiRound-Gateway-Technologie ist in Abbildung 3.2 dargestellt, welche die ersten beiden Runden der LR-Rekombination zeigt. Die erste Rekombinationsrunde wird mit dem Destination-Vektor pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR und dem ersten Entry-Vektor pUC325\_SpecR\_GenA mit integrierter Genexpressionskassette durchgeführt. Nach Transformation in *E. coli* TOP10 überleben ausschließlich Klone mit dem rekombinanten Destination-Plasmid pYLTA7\_GenA die doppelte Selektion auf Kanamycin- und Spectinomycin-Agarplatten. Transformanten welche den parentalen Destination-

Vektor enthalten überleben die Selektion auf Spectinomycin nicht. Hingegen überleben Klone mit dem parentalen Entry-Vektor pUC325\_SpecR\_GenA oder dem Beiprodukt die Selektion auf Kanamycin nicht. Die zweite Rekombinationsrunde findet zwischen dem zuvor erhaltenen Destination-Plasmid pYLTA7\_GenA und dem zweiten Entry-Vektor pUC324\_CmR\_GenB statt. Klone mit dem rekombinanten Destination-Plasmid pYLTA7\_GenA\_GenB überleben die doppelte Selektion auf Kanamycin und Chloramphenicol, wohingegen Transformanden mit dem parentalen Vektor pYLTA7\_GenA die Chloramphenicol-Behandlung nicht überleben. Ferner überleben Klone mit dem parentalen Entry-Vektor pUC324\_CmR\_GenB oder dem Beiprodukt die Selektion auf Kanamycin nicht. Durch abwechselnde Verwendung der beiden Entry-Vektoren mit weiteren Zielgenen lassen sich multiple Runden von LR-Rekombinationen durchführen. Im Prinzip kann die Prozedur unendlich oft wiederholt werden, in der Praxis wird sie jedoch durch die Klonierungskapazität des Destination-Vektors begrenzt.



**Abbildung 3.2: MultiRound-Gateway**

Die erste Gateway-Rekombination zwischen attL1/2 des Entry-Vektors pENTR1\_GenA und attR1/2 des Destination-Vektors pDEST führt zum Austausch der Resistenz-Marker CmR und SpecR sowie zur Integration von GenA und attR3/4 in pDEST. In der zweiten Runde der Gateway-Rekombination zwischen attL3/4 des Entry-Vektors pENTR2\_GenB und attR3/4 des erhaltenen Destination-Vektors pDEST\_GenA werden die Resistenz-Marker SpecR und CmR zurückgetauscht sowie GenB und attR1/2 in pDEST\_GenA integriert. Hierdurch wird das Destination-Plasmid pDEST\_GenA\_GenB mit den beiden Genen A und B erhalten, in welches durch abwechselnde Verwendung der beiden Entry-Vektoren noch weitere Gene rekombiniert werden können.

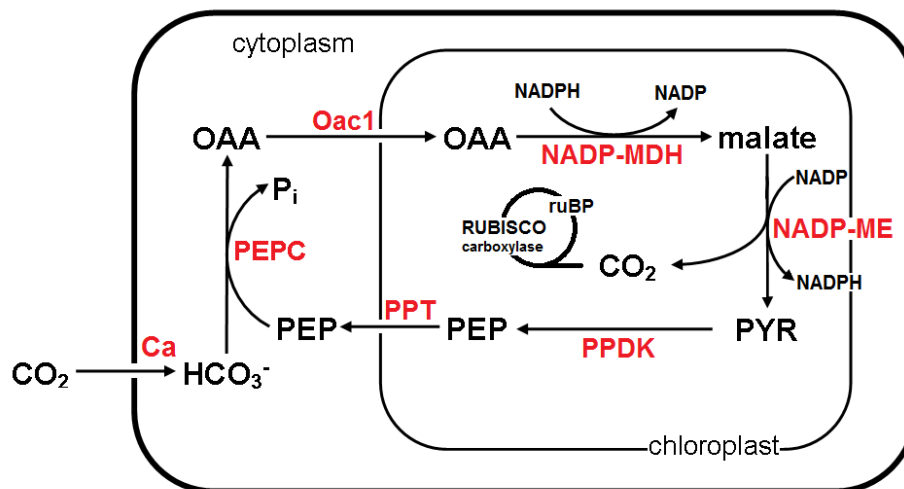
Bei Versuchen mit dem zuerst konstruierten Destination-Vektor pTRA\_R12\_CmR\_ccdB, welcher ein high copy origin für *E. coli* trägt und eine Klonierungskapazität von etwa 15 kb besitzt (Preston, 2003), zeigte sich, dass nur in den ersten beiden Runden der Gateway-Rekombination richtige Klone erhalten werden konnten. Mit dem Vektor pYL7AC7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR, dessen Klonierungskapazität bei über 100 kb liegt (Liu *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2003), wurden auch nach sieben Rekombinationsrunden fast ausschließlich richtige Klone erhalten. Ob die Replikation des Vektors über das P1 Replikon (single copy) oder das mit IPTG induzierte lytische P1 Replikon (low copy) ablief spielte dabei keine Rolle. Vereinzelt auftretende falsche Klone waren auf Co-Transformationen von Destination- und Entry-Vektoren zurückzuführen. Dies ließ sich durch vorhergehende Linearisierung der Entry-Vektoren aber effizient verhindern. Die Überprüfung der Klone fand jeweils durch Restriktionsverdau der isolierten Plasmide statt.

### 3.2 Putativer C<sub>4</sub>-Zyklus in *N. tabacum*

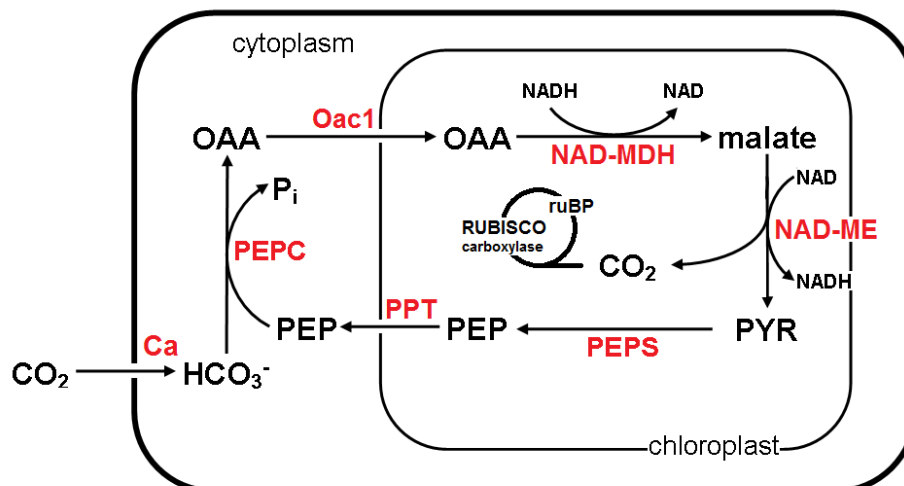
Nach dem Vorbild von *H. verticillata* sollte ein „Single Cell“-C<sub>4</sub>-Mechanismus in Tabak installiert werden, um die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Nähe von RUBISCO zu erhöhen. Die zu testende Hypothese war, ob dadurch die Photorespiration unterdrückt und somit eine Verbesserung der CO<sub>2</sub>-Fixierung erreicht wird. Hierfür wurden drei verschiedene putative C<sub>4</sub>-Zyklen konstruiert (Abbildung 3.3) und in Tabak eingebracht. Während die Vorfixierung des CO<sub>2</sub> über Carboanhydrase (FbCa aus *F. bidentis*) und PEPC (stppc, modifizierte PEPC aus *S. tuberosum*) sowie der Import des gebildeten Oxalacetats in die Chloroplasten (Oac1-Translokator aus *S. cerevisiae*) bei allen drei Zyklen gleich abläuft, unterscheiden sie sich in der Art der Decarboxylierung der C<sub>4</sub>-Säuren in den Chloroplasten. Bei den ersten beiden Zyklen wird das importierte Oxalacetat durch eine NADP- (SbMdh aus *S. bicolor*) bzw. NAD-abhängige MDH (EcMdh aus *E. coli*) zu Malat reduziert und anschließend durch ein NADP- (HvMe aus *H. verticillata*) bzw. NAD-abhängiges ME (EcMe aus *E. coli*) decarboxyliert. Das hierbei gebildete Pyruvat wird durch eine PPK (F. trinervia) bzw. PEPS (*E. coli*) zu Phosphoenolpyruvat phosphoryliert und steht nach Export durch einen Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT aus *B. oleraceae var. botrytis* L.) wieder als Akzeptor für die PEPC zur Verfügung. Beim dritten Zyklus wird das OAA direkt

durch eine PCK (*U. panicoides*) zu PEP decarboxyliert und danach ebenfalls über den PPT exportiert. Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Typen von C<sub>4</sub>-Pflanzen, wo die Decarboxlierung nur beim NADP-ME-Typ in den Chloroplasten abläuft (siehe 1.1.3), wurde diese Reaktion beim NAD-ME- und PCK-Typ ebenfalls in die Chloroplasten verlagert. Abbildung 3.3 zeigt die vorhergesagten verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismen.

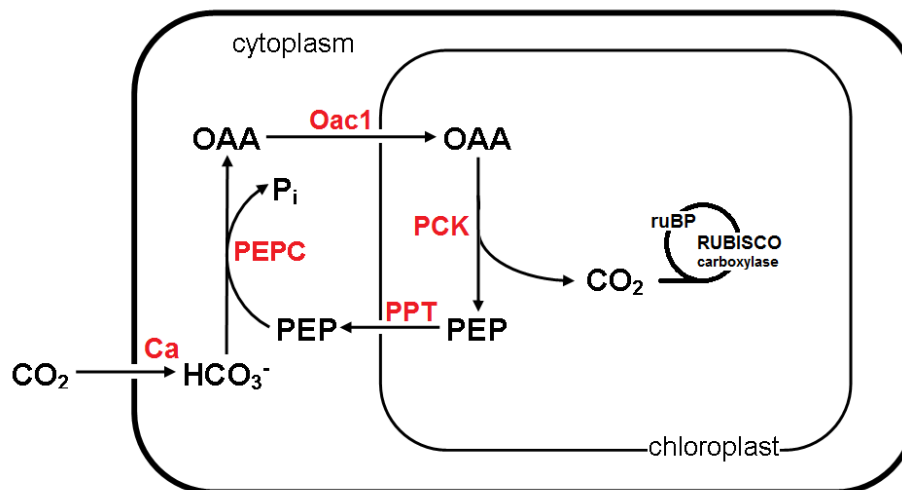
### 1) NADP-ME-Typ



### 2) NAD-ME-Typ



### 3) PCK-Typ



**Abbildung 3.3: „Single-Cell“-C<sub>4</sub>-ähnlicher Zyklus in *N. tabacum***

Dargestellt sind die vorhergesagten C<sub>4</sub>-ähnlichen Zyklen in *N. tabacum* vom NADP-ME-Typ (1), NAD-ME-Typ (2) und PCK-Typ (3). Anorganischer Kohlenstoff wird nach Hydratisierung durch eine Carboanhydrase (Ca aus *F. bidentis*) in Form von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> durch eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC, modifiziert aus *S. tuberosum*) mit Phosphoenolpyruvat (PEP) als Akzeptor zu Oxalacetat (OAA) fixiert. Dieses wird nach Transport über einen Oxalacetat-Translokator (Oac1 aus *S. cerevisiae*) in die Chloroplasten durch eine NADP- bzw. NAD-abhängige Malat-Dehydrogenase (MDH aus *S. bicolor* bzw. *E. coli*) zu Malat umgesetzt, welches durch ein NADP- bzw. NAD abhängiges Malat-Enzym (ME aus *H. verticillata* bzw. *E. coli*) zu Pyruvat (PYR) decarboxyliert wird. Eine Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK aus *F. trinervia*) bzw. Phosphoenolsynthase (PEPS aus *E. coli*) katalysiert anschließend die Umwandlung des Pyruvats zu Phosphoenolpyruvat (PEP), welches nach Transport über einen Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT aus *B. oleraceae* var. *botrytis* L.) ins Cytosol wieder für einen neuen Zyklus zur Verfügung steht. Beim PCK-Typ wird das OAA direkt durch eine Pyruvat-Carboxikinase (PCK aus *U. panicoides*) zu PEP decarboxyliert und danach ebenfalls über PPT exportiert.

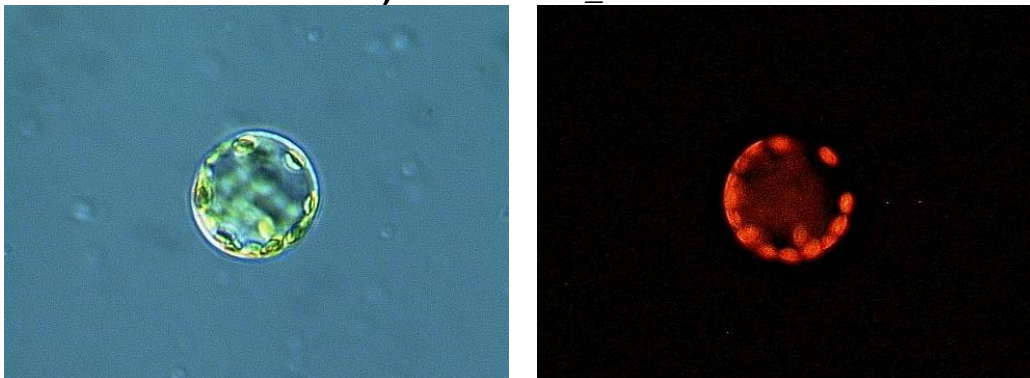
#### 3.2.1 Oac1-Lokalisationsanalyse

Der für die verschiedenen C<sub>4</sub>-Zyklen verwendete Oxalacetat-Translokator Oac1 stammt aus *S. cerevisiae* und ist hier in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Neben Oxalacetat transportiert er Malonat, Sulfat und Thiosulfat. Er katalysiert sowohl den unidirektionalen Transport von Substraten im Co-Transport mit Protonen als auch den Austausch von Substraten (Palmieri *et al.*, 1999). Seine Hauptfunktion ist wahrscheinlich der Transport von durch die cytosolische PEPC produziertem Oxalacetat in die Mitochondrien-Matrix (Palmieri *et al.*, 1999).

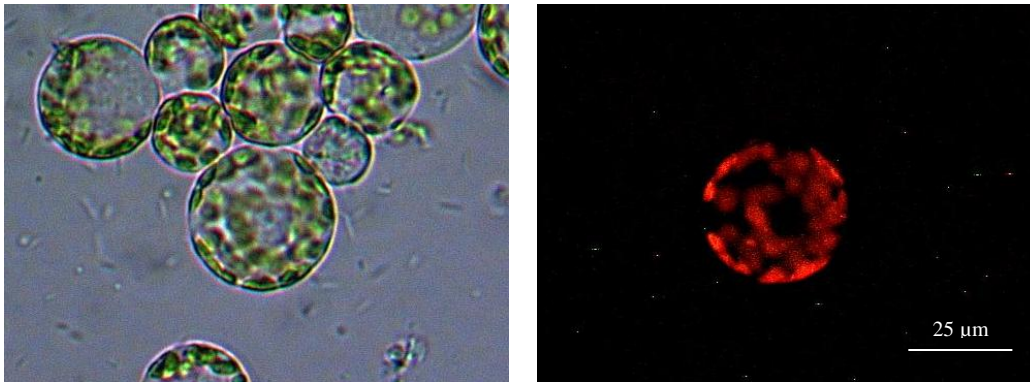
In den putativen C<sub>4</sub>-Zyklen sollte er hingegen für den Oxalacetat-Transport in die Chloroplasten sorgen. Aus diesem Grund sollte das mitochondriale Signalpeptid gegen ein chloroplastidäres Transitpeptid ausgetauscht werden. Mit den gängigen Vorhersageprogrammen wie SignalP konnte allerdings kein Signalpeptid und somit auch keine Spaltstelle identifiziert werden. Da der Translokator auch zu den TypII-

Membranproteinen gehören könnte, wurde entschieden, das chloroplastidäre Transitpeptid direkt vor die vollständige *Oac1*-Sequenz zu klonieren. TypII-Membranproteine besitzen Ankerpeptide, die nach der Translokation des Proteins nicht abgespalten werden, sondern in der Membran verbleiben (von Heijne, 1988). Als Transitpeptid für die *Oac1*-Lokalisation in die innere Chloroplastenmembran wurden zwei verschiedene Sequenzen getestet. Zum einen das Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. tuberosum* (StRbcS-cTP), welche im Chloroplastenstroma lokalisiert ist, zum anderen das Transitpeptid des membranlokalisierten PEP-Translokators aus *B. oleracea* var. *botrytis* L. (PPT-cTP). Die Lokalisationsanalyse des modifizierten Oxalacetat-Translokators fand sowohl durch Fluoreszenzmikroskopie als auch in vitro-Import des in vitro translatierten Proteins statt. Für die Lokalisationsanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden Fusionsproteine aus dem Oxalacetat-Translokator und einem rot fluoreszierenden Protein (RFP) hergestellt (2.1.8.6). Die beiden Transitpeptide StRbcS-cTP und PPT-cTP wurden jeweils vor das *Oac1*-Gen kloniert und am 3'Ende mit der *rfp*-Sequenz fusioniert. Mit diesen Konstrukten wurden Tabakblätter transient transformiert. Anschließend wurden aus den infiltrierten Blattgeweben Protoplasten isoliert, da sich diese besser mikroskopisch untersuchen lassen als ganze Blätter. Durch Vergleich der Chlorophyll-Lokalisation in der Durchlichtmikroskopie und des RFP-Signals in der Auflichtfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass beide Transitpeptide für eine Lokalisation des *Oac1*-Translokators in die Chloroplasten sorgen (Abbildung 3.4). Zudem wurde die Lokalisation der Eigenfluoreszenz der Chloroplasten mit der des RFP-Signals verglichen (nicht gezeigt).

1) StRbcS-cTP\_Oac1



2) TPT-cTP\_Oac1



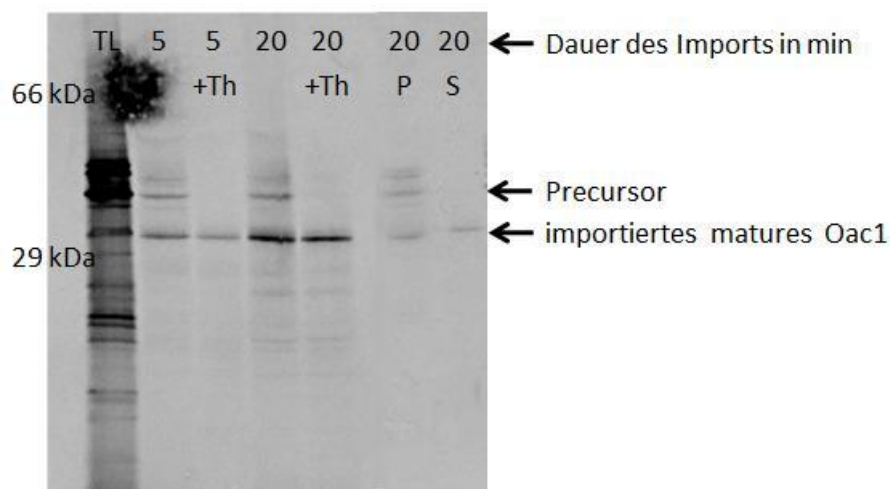
**Abbildung 3.4: Oac1-Lokalisationsanalysen mittels Fluoreszenzmikroskopie**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Lokalisationsanalysen des Oac1-Translokators. Dieser wurde mit zwei unterschiedlichen Transitpeptiden als RFP-Fusionsprotein transient in Tabak exprimiert. Die verwendeten Transitpeptide stammen von der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. tuberosum* (1) und vom PEP-Translokator aus *B. oleracea* var. *botrytis* L. (2). Zu besserer Sichtbarmachung der Chloroplasten wurden für die Aufnahmen isolierte Protoplasten verwendet. Die Bilder zeigen jeweils eine Durchlicht- und eine Auflichtfluoreszenzaufnahme mit DsRed-Filter (C128068 42005 DsRed2, Chroma, Bellows Falls, USA), welcher die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten unterdrückt.

Durch *in vitro* Import des radioaktiv markierten Oac1-Translokators in isolierte Erbsenchloroplasten wurde dessen Lokalisation noch genauer untersucht (Aronsson und Jarvis, 2002; Benz *et al.*, 2009). Außerdem wurde die korrekte Prozessierung des Proteins überprüft. Die Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 zeigen die Ergebnisse für den *in vitro* Import des Oac1-Translokators mit den beiden verschiedenen Transitpeptiden. Sowohl mit StRbcS-cTP als auch mit PPT-cTP wurde der Translokator in die Chloroplasten importiert, was durch die Resistenz des Proteins gegenüber der Thermolysin-Behandlung belegt wird. Nach Aufschluss der Chloroplasten und anschließender Zentrifugation fand sich das radioaktiv markierte Protein sowohl im Pellet als auch im Überstand. Dies bedeutet, dass der Translokator sowohl in einer der vielen Membranen als auch im Stroma der Chloroplasten lokalisiert war. Mit beiden Transitpeptiden fanden sich etwa 60% des Proteins in der Membran und 40% im Stroma. Nach dem Import des Proteins konnte auch die Abspaltung der Transitpeptide beobachtet werden. Während das importierte reife Oac1, welches durch Abspaltung des StRbcS-Transitpeptids entstand, der erwarteten Größe entsprach, war das importierte reife Oac1 nach PPT-cTP-Abspaltung größer als erwartet. Der Oac1-Translationsmix mit dem PPT-Transitpeptid enthielt allerdings bereits ein Protein, welches in der Größe dem erwarteten reifen Oac1-Translokator entsprach. Dieses wurde ebenfalls in die Chloroplasten importiert, war resistent gegenüber der Thermolysin-Behandlung und war sowohl in der Membran- als auch der Stromafraktion zu finden. Als Kontrollen dienten der PEP-Translokator und der Light Harvesting Com-

plex (LHC) aus *Pisum sativa* (nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigten, dass mithilfe beider getesteten Transitpeptide eine Lokalisation des ursprünglich mitochondrial lokalisierten Translokators in die Chloroplastenmembran möglich ist. Da die Abspaltung mit dem PPT-cTP nicht an der erwarteten Stelle erfolgte, wurde das StRbcS-cTP-Konstrukt für die weiteren Arbeiten verwendet.

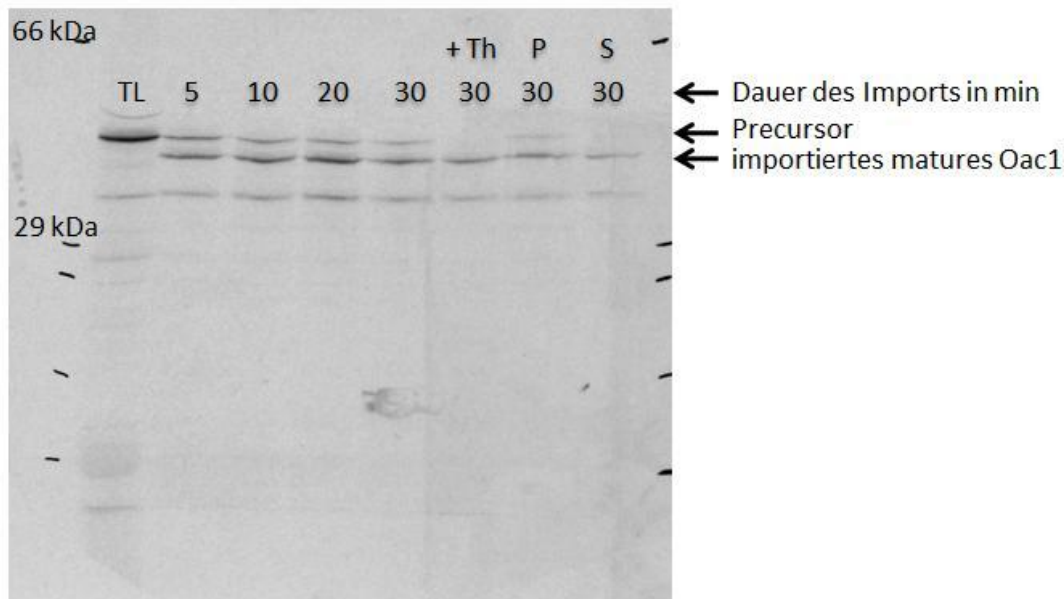
Die in vitro Translation sowie der in vitro Import wurden freundlicherweise von Dr. Bettina Bölter (Institut für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt. Für die in vitro Translation wurden die unter 2.1.8.6 beschriebenen Plasmide verwendet.



**Abbildung 3.5: In vitro Import des Oac1-Translokators mit StRbcS-cTP**

Dargestellt ist das Radiogramm des in vitro Imports des radioaktiv markierten Oac1-Translokators mit StRbcS-cTP in isolierte Erbsenchloroplasten. Das Oac1-Protein wurde durch in vitro Translation mit Hilfe eines Weizenkeimlysats hergestellt. TL steht für die erhaltenen Produkte aus dieser Translation. Die Importzeit betrug 5 oder 20 min. Precursor bezeichnet das nicht prozessierte Oac1-Protein inklusive Transitpeptid. Nicht importierte Proteine wurden durch Thermolysin (Th) abgebaut. Die Chloroplasten wurden aufgeschlossen und durch Zentrifugation in Membran- (P) und Stromafraktion (S) getrennt.





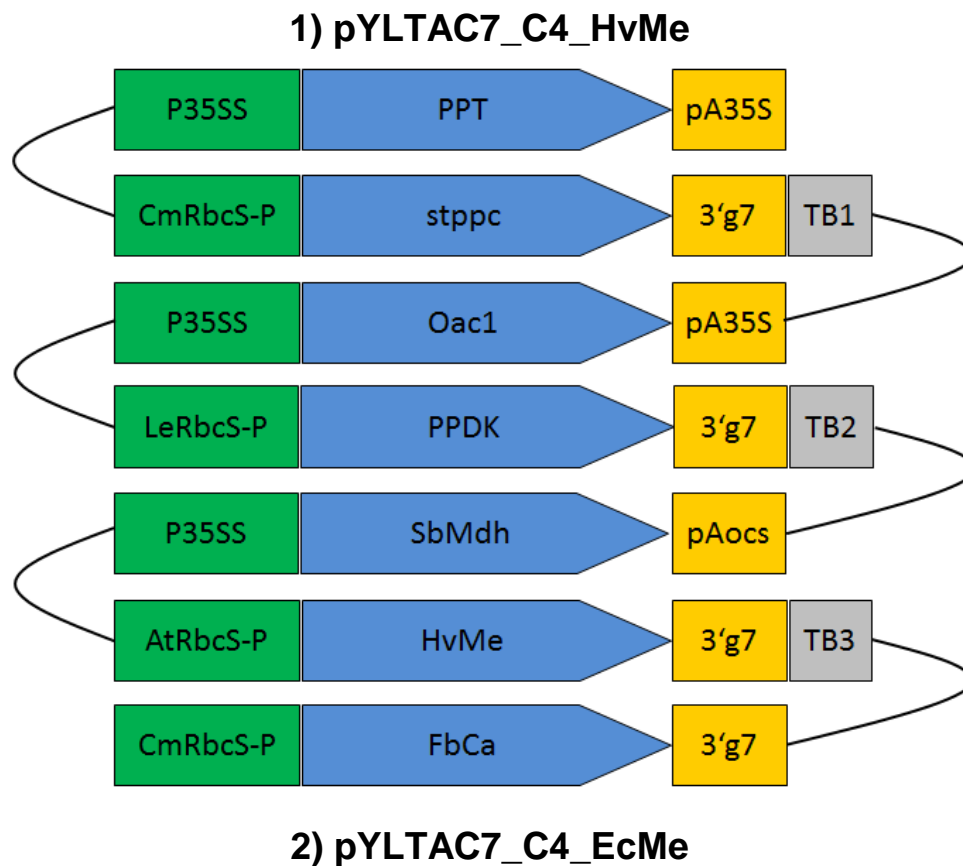
**Abbildung 3.6: In vitro Import des Oac1-Translokators mit PPT-cTP**

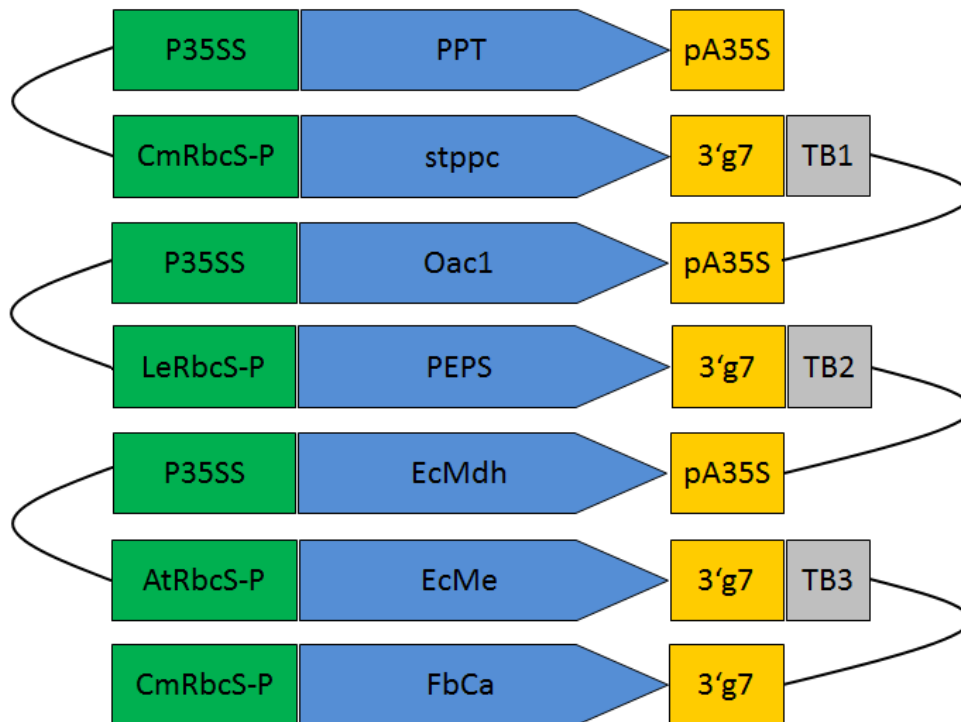
Dargestellt ist das Radiogramm des in vitro Imports des radioaktiv markierten Oac1-Translokators mit PPT-cTP in isolierte Erbsenchloroplasten. Das Oac1-Protein wurde durch in vitro Translation mit Hilfe eines Weizenkeimlysats hergestellt. TL steht für die erhaltenen Produkte aus dieser Translation. Die Importzeit betrug 5, 10, 20 oder 30 min. Precursor bezeichnet das nicht prozessierte Oac1-Protein inklusive Transitpeptid. Nicht importierte Proteine wurden durch Thermolysin (Th) abgebaut. Die Chloroplasten wurden aufgeschlossen und durch Zentrifugation in Membran- (P) und Stromafraktion (S) getrennt. Die Isolation der Chloroplasten erfolgte nach Aronsson *et al.* (2002), der in vitro Import nach Benz *et al.* (2009).

### 3.2.2 Konstruktion der Gateway-Plasmide

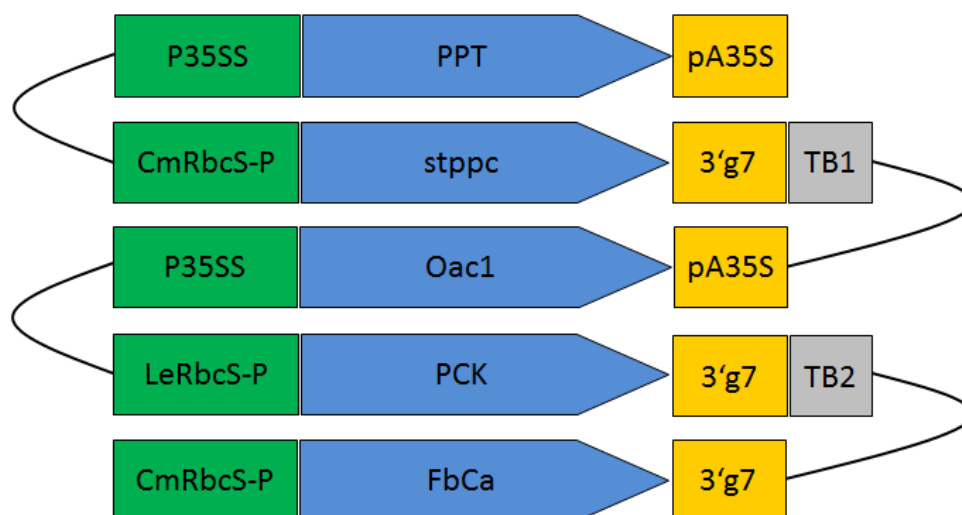
Die Vektoren pYLTA7\_C4\_HvMe, pYLTA7\_C4\_EcMe und pYLTA7\_C4\_PCK wurden durch MultiRound-Gateway-Rekombination in den Destination-Vektor pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR erhalten. Die verwendeten Entry-Vektoren und die Reihenfolge der Rekombination sind unter 2.1.8.4 beschrieben. Bei der Konstruktion der Entry-Vektoren wurde die Orientierung der Expressionskassetten so gewählt, dass nach der Rekombination zwei aufeinanderfolgende Kassetten entweder voneinander weglaufen oder durch einen Transkriptionsblocker getrennt sind. Dies soll Silencing aufgrund von transkriptioneller Interferenz verhindern. Bei den Transkriptionsblockern handelt es sich um AT-reiche Sequenzen aus dem Lambdaphagen, die nach Padidam und Cao (2001) für diesen Zweck verwendet werden können. Da auch gleiche Promotoren Silencing auslösen können, wurden die C<sub>4</sub>-Gene unter die Kontrolle unterschiedlicher Promotoren kloniert. Es standen jedoch keine sieben verschiedenen Promotoren zur Verfügung, so dass manche mehrmals verwendet wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass gleiche Promotoren nach der Rekombination nicht genau nebeneinander liegen. Die direkte Nachbarschaft langer homologer

Sequenzen könnte eine unerwünschte intramolekulare Rekombination begünstigen. Die Anordnung der einzelnen Expressionskassetten in den Destination-Plasmiden zeigt Abbildung 3.7.





### 3) pYL7AC7\_C4\_PCK

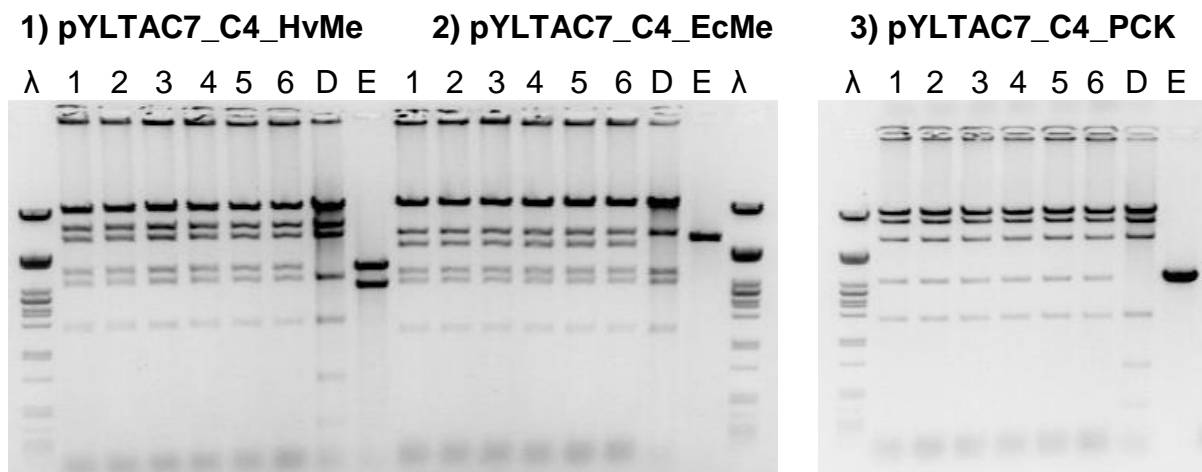


**Abbildung 3.7: Anordnung der Genexpressionskassetten in den Destination-Vektoren**

Dargestellt ist die Anordnung der Genexpressionskassetten in den Destination-Vektoren pYL7AC7\_C4\_HvMe (1), pYL7AC7\_C4\_EcMe (2) und pYL7AC7\_C4\_PCK (3). Dabei sind die verwendeten Promotoren in grün, die Gene in blau und die Terminations-/Polyadenylierungsregionen in gelb gekennzeichnet. TB1/2/3: AT-reiche Sequenzen aus Lambdaphage als Transkriptions-Blocker; PPT: Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator *B. oleracea* var. *botrytis* L.; stppc: modifizierte

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *S. tuberosum*; Oac1: Oxalacetat-Translokator aus *S. cerevisiae*; ppdk: Pyruvatorthosphatdikinase aus *F. trinervia*; SbMdh: Malatdehydrogenase aus *S. bicolor*; HvMe: Malat-Enzym aus *H. verticillata*; FbCa: Carboanhydrase aus *F. bidentis*; PEPS: Phosphoenolpyruvat-Synthase aus *E. coli*; EcMdh: Malatdehydrogenase aus *E. coli*; EcMe: Malat-Enzym aus *E. coli*; PCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase aus *U. panicoides*; CmRbcS-P: Promotorsequenz der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *Chrysanthemum*; LeRbcS-P: Promotorsequenz der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. lycopersicum*; AtRbcS-P: Promotorsequenz der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *A. thaliana*; P35SS: Promotorsequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus; pA35S: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus; 3'g7: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz von Gen 7 aus *A. tumefaciens*; pAocs: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Octopin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*.

Der Erfolg der Rekombinationen wurde nach jeder Runde durch Restriktionsverdau überprüft. Die Abbildung 3.8 bis Abbildung 3.10 zeigen die Ergebnisse der Restriktionsverdau der verschiedenen Destination-Plasmide mit den C<sub>4</sub>-Genen nach den letzten drei Rekombinationsrunden. Dabei zeigten alle Klone das erwartete Bandenmuster (Tabelle 3.1 - Tabelle 3.3).

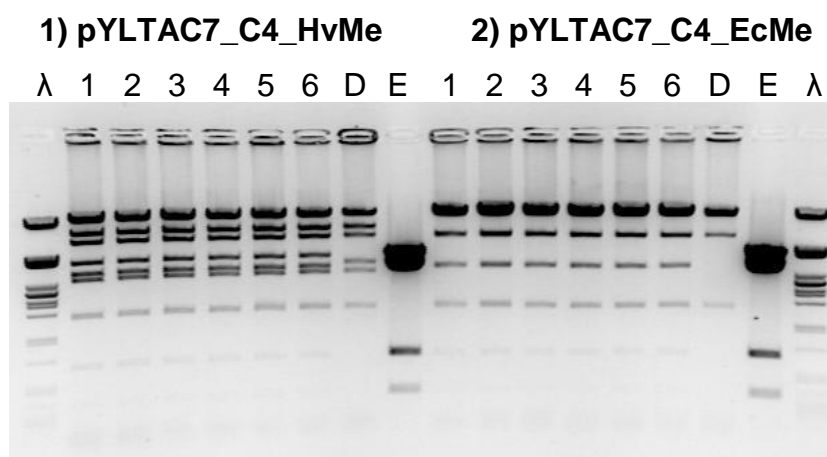


**Abbildung 3.8: Kontrollverdau der Destination-Plasmide nach der 5. Rekombinationsrunde**  
 Dargestellt ist die Auftrennung der Kontrollverdau der Destination-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen nach der 5. Rekombinationsrunde in einem 0,6%igen Agarosegel. Die Spuren 1-6 zeigen jeweils 6 Klone nach der Rekombination. Die erwarteten Fragmentgrößen sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor; λ: Lambda-Marker.

**Tabelle 3.1: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 5. Rekombinationsrunde**

Angegeben sind die verwendeten Enzyme und die daraus resultierenden Fragmentgrößen. rekD: rekombinierter Destination-Vektor; D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor.

1) pYLTA <b>C</b> 7_C4_HvMe ( <i>Bam</i> HI)			2) pYLTA <b>C</b> 7_C4_EcMe ( <i>Acc</i> 65I)			3) pYLTA <b>C</b> 7_C4_PCK ( <i>Bam</i> HI)		
rekD	D	E	rekD	D	E	rekD	D	E
45742	43030	6305	45184	42719	6058	44497	42090	6000
22011	21936	3663	25383	28309	6058	22011	21936	3083
8621	8621	2642	6962	6962		11161	10739	2917
6821	6811		5391	3277		6811	6811	
6811	3058		3277			2917	1597	
3663	1597		2789			1597	703	
3039	703		1382				304	
1597	304							



**Abbildung 3.9: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 6. Rekombinationsrunde**

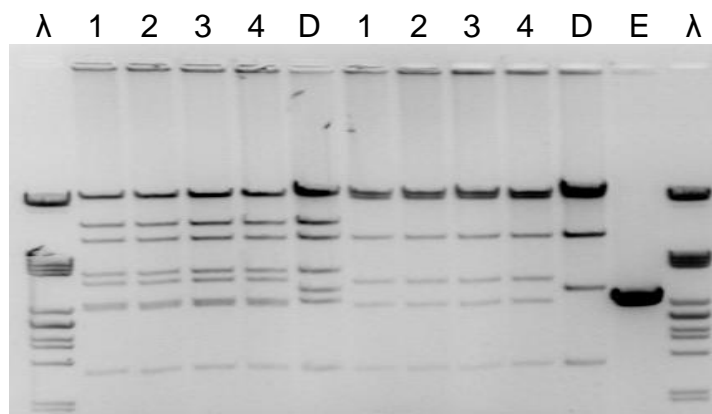
Dargestellt ist die Auftrennung der Kontrollverdaue der Destination-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen nach der 6. Rekombinationsrunde in einem 0,6%igen Agarosegel. Die Spuren 1-6 zeigen jeweils 6 Klone nach der Rekombination. Die erwarteten Fragmentgrößen sind Tabelle 3.2 zu entnehmen. D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor; λ: Lambda-Marker.

**Tabelle 3.2: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 6. Rekombinationsrunde**

Angegeben sind die verwendeten Enzyme und die daraus resultierenden Fragmentgrößen. rekD: rekombinierter Destination-Vektor; D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor.

1) pYLTA7_C4_HvMe (BamHI)			2) pYLTA7_C4_EcMe (BamHI)		
rekD	D	E	rekD	D	E
50970	45742	9031	50554	45184	8965
22119	22011	4578	22223	22011	4601
8621	8621	3446	15559	14765	3357
6811	6811	703	6811	6811	703
4320	3663	304	3357	1597	304
3446	3039		1597		
3039	1597		703		
1597			304		
703					
304					

**1) pYLTA7\_C4\_HvMe 2) pYLTA7\_C4\_EcMe**



**Abbildung 3.10: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 7. Rekombinationsrunde**

Dargestellt ist die Auftrennung der Kontrollverdaue der Destination-Plasmide mit C<sub>4</sub>-Genen nach der 7. Rekombinationsrunde in einem 0,6%igen Agarosegel. Die Spuren 1-4 zeigen jeweils 4 Klone nach der Rekombination. Die erwarteten Fragmentgrößen sind Tabelle 3.3 zu entnehmen. Fragmente kleiner als etwa 1000 bp sind bereits aus dem Gel gelaufen. D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor; λ: Lambda-Marker.

**Tabelle 3.3: Kontrollverdauung der Destination-Plasmide nach der 7. Rekombinationsrunde**

Angegeben sind die verwendeten Enzyme und die daraus resultierenden Fragmentgrößen. rekD: rekombinierter Destination-Vektor; D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor.

1) pYL7AC7_C4_HvMe ( <i>Bam</i> HI)			2) pYL7AC7_C4_EcMe ( <i>Bam</i> HI)		
rekD	D	E	rekD	D	E
53377	50970	6000	52857	50450	6000
22194	22119	3083	22194	22119	3083
8621	8621	2917	15559	15559	2917
6811	6811		6822	6811	
4330	4330		3779	3357	
3868	3446		2917	1597	
3039	3039		1597	703	
2917	1597			304	
1597	703				
	304				

### 3.2.3 Transformation der Destination-Plasmide in Agrobakterien

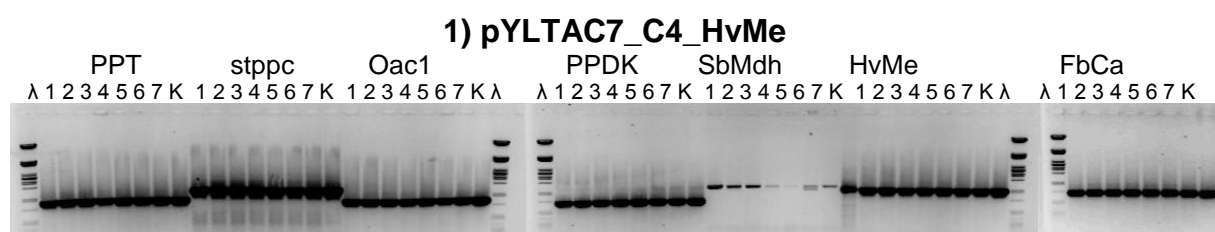
Für die Transformation der Destination-Plasmide wurden zwei verschiedene Agrobakterien-Stämme getestet: GV2260 und AGL1. Diese unterscheiden sich in für die Transformation wichtigen Eigenschaften. Während GV2260 das Ti-Plasmid pTiB6S3 trägt, besitzt AGL1 das hypervirulente Ti-Plasmid pTiBo542. Außerdem enthält AGL1 zusätzlich eine Insertions-Mutation im *recA*-Gen, was sich positiv auf die Stabilität rekombinanter Plasmide auswirken soll (Lazo *et al.*, 1991).

Um die Stabilität der Gateway-Plasmide in den beiden Agrobakterien-Stämme zu testen, wurde das Plasmid pYL7AC7\_PPT\_stppc\_Oac1 (entspricht den Gateway-Plasmiden mit den C<sub>4</sub>-Genen nach der 3. Rekombinationsrunde) transformiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden neu ausgestrichen (YEB-Agarplatten für GV2260, LB-Agarplatten für AGL1) und durch Kolonie-PCR (PHIRE-Polymerase) auf das Vorhandensein der drei Gene PPT, stppc und Oac1 untersucht. Dabei wurden die fol-

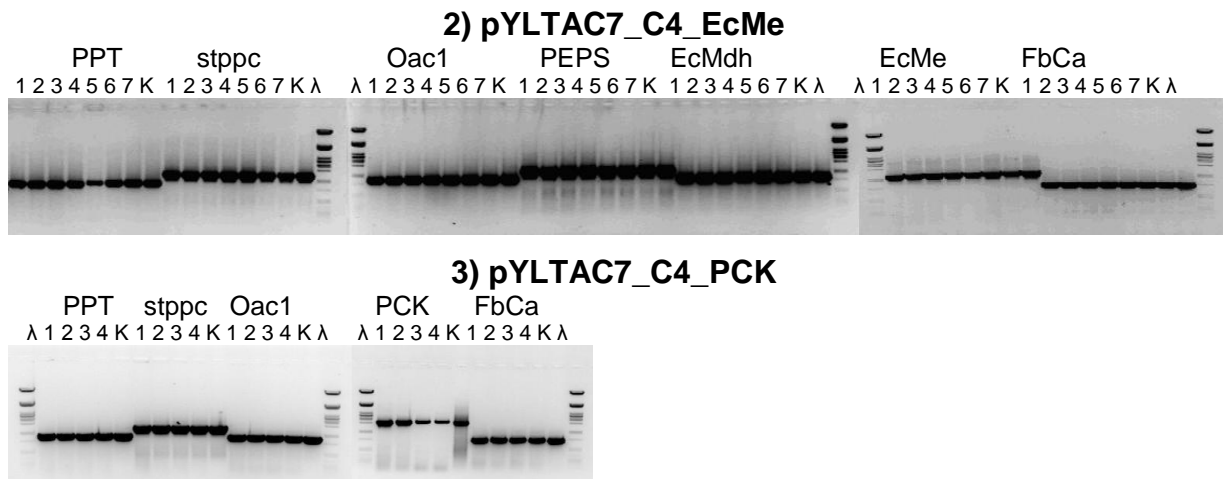
genden Primerpaare verwendet: 3472 und 865 für PPT, 4255 und 4225 für stppc sowie 3971 und 4100 für Oac1. Als Positiv-Kontrolle diente das isolierte Plasmid pYL7AC7\_PPT\_stppc\_Oac1, als Negativ-Kontrolle Agrobakterien, die das Leerplasmid pYL7AC7\_leer trugen. Während bei GV2260 nur 20-30% der Klone positiv auf alle drei Gene getestet wurden, waren es bei AGL1 90-100%. Für die spätere Transformation von *N. tabacum* mit den fertigen Destination-Plasmiden wurde daher der Stamm AGL1 verwendet. Durch dessen hypervirulentes Ti-Plasmid ließen sich hier auch höhere Transformationsraten erwarten (Nadolska-Orzyk *et al.*, 2000).

Die Gateway-Plasmide pYL7AC7\_C4\_HvMe, pYL7AC7\_C4\_EcMe, pYL7AC7\_C4\_PCK und pYL7AC7\_leer wurden in den *A. tumefaciens* Stamm AGL1 transformiert. Nach drei bis vier Tagen wurden die erhaltenen Einzelkolonien neu auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Anschließend wurden die verschiedenen Klone durch Kolonie-PCR (PHIRE-Polymerase) auf das Vorhandensein der entsprechenden Gene getestet: pYL7AC7\_C4\_HvMe auf PPT, stppc, Oac1, PPDK, SbMdh, HvMe und FbCA, pYL7AC7\_C4\_EcMe auf PPT, stppc, Oac1, PEPS, EcMdh, EcMe und FbCA sowie pYL7AC7\_C4\_PCK auf PPT, stppc, Oac1, PCK und FbCA. Das Ergebnis der Kolonie-PCR zeigt Abbildung 3.11. Die verwendeten Primer sowie die zu erwartenden Produktgrößen sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Als Positiv-Kontrollen dienten die entsprechenden isolierten Gateway-Plasmide mit den C<sub>4</sub>-Genen, als Negativ-Kontrolle Agrobakterien, welche das Leerplasmid pYL7AC7\_leer trugen. Dabei wiesen alle PCR-Produkte die erwartete Größe auf und stimmten mit den Positivkontrollen überein. Zudem zeigten die Negativkontrollen keine Banden entsprechender Größe (nicht gezeigt). Bei längerer Vermehrung in den Agrobakterien ging in manchen Fällen das SbMdh-Gen in pYL7AC7\_C4\_HvMe und das PCK-Gen in pYL7AC7\_C4\_PCK verloren (nicht gezeigt). Beim pYL7AC7\_C4\_EcMe-Konstrukt wurde ein derartiger Verlust nicht beobachtet.

Trotz des vereinzelt beobachteten Verlustes eines Genes ist AGL1 im Gegensatz zu GV2260 also zur Vermehrung der Gateway-Plasmide geeignet.







**Abbildung 3.11: Kolonie-PCR auf Destination-Plasmide in *A. tumefaciens* AGL1**

Dargestellt ist die Auftrennung der Produkte aus der Kolonie-PCR auf die Gateway-Plasmide pYLTA7\_C4\_HvMe (1), pYLTA7\_C4\_EcMe (2) und pYLTA7\_C4\_PCK (3) in *A. tumefaciens* AGL1 in einem 1%igen Agarosegel. Dabei wurden die Kolonien auf den Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT), die modifizierten Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (stppc), den Oxalacetat-Translokator (Oac1), die Pyruvatorthosphat-Dikinase (PPDK), die Malatdehydrogenase (SbMdh bzw. EcMdh), das Malatenzym (HvMe bzw. EcMe), die Carboanhydrase (FbCa) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK) getestet. Die verwendeten Primer und die zu erwartenden Produktgrößen sind Tabelle 3.4 zu entnehmen.

**Tabelle 3.4: Verwendete Primer für Kolonie-PCR auf Destination-Plasmide in *A. tumefaciens* AGL1**

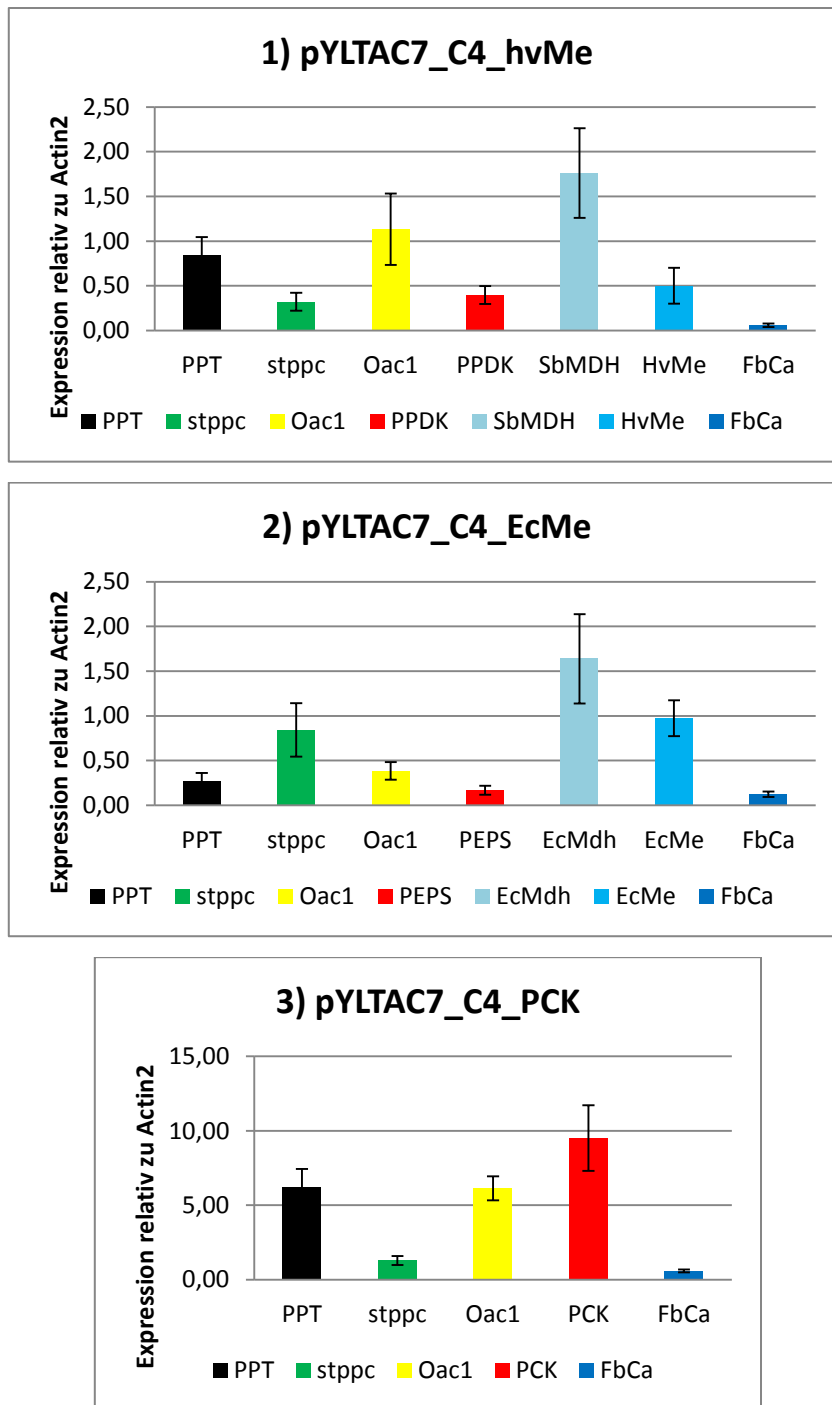
Aufgelistet sind die für die Kolonie-PCR verwendeten Primer sowie die zu erwartenden Produktgrößen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind unter 2.1.7 angegeben.

Gen	Primer	Produkt (bp)
PPT	3472 / 865	1019
stppc	4255 / 4225	1454
Oac1	3971 / 4100	1000
PPDK	4048 / 4052	778
SbMdh	4281 / 4282	1315
HvMe	3545 / 3546	1192
FbCa	4309 / 4310	799
PEPS	3874 / 4284	1385
EcMdh	3978 / 3979	970
EcMe	4256 / 4223	1264
PCK	4233 / 4234	1794

### 3.2.4 Transiente Expression der C<sub>4</sub>-Gene in Tabak

Vor der stabilen Transformation von Tabak mit den Gateway-Plasmiden, welche für die drei verschiedenen C<sub>4</sub>-Wege codierten, wurde eine transiente Transformation

durchgeführt. Damit sollte getestet werden, ob alle sieben Gene von pYL7\_C4\_HvMe und pYL7\_C4\_EcMe bzw. alle fünf Gene von pYL7\_C4\_PCK in Tabak exprimiert werden. Die transiente Transformation wurde wie unter 2.2.19 beschrieben durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden im Dunkeln wurden die Pflanzen zwei Tage unter Langtagbedingungen inkubiert (16 Stunden Licht mit ca. 160 PAR, 8 Stunden Dunkelheit). Anschließend wurden an den Infiltrationsstellen je drei Blattscheiben ausgestanzt. Die RNA wurde wie unter 2.2.1.4 beschrieben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch Real-Time PCR wurde dann die Expression der Transgene auf RNA-Ebene im Verhältnis zum Actin2-Gen bestimmt (Igarashi *et al.*, 2003). Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse der Dreifach-Bestimmung. Es stellte sich heraus, dass alle sieben bzw. fünf Transgene der verschiedenen Gateway-Plasmide exprimiert werden. Die Expression war allerdings sehr heterogen. Auch gleiche Promotoren bedeuteten nicht unbedingt eine ähnliche Expressionsstärke. Dies wird besonders beim Vergleich der Expressionsstärken von PPK und PEPS zu PCK deutlich, welche alle unter Kontrolle des lichtinduzierbaren LeRbcS-Promotors stehen. Die Expression lag für die sieben Transgene von pYL7\_C4\_HvMe und pYL7\_C4\_Me etwa 0,1 bis 2-mal so hoch wie die vom Actin2-Gen. Beim etwas kleineren Vektor pYL7\_C4\_PCK war die Expression der fünf Transgene deutlich höher. Sie lag hier ca. 1 bis 10-mal über dem Actin2-Level. Die höchste Expression zeigten durchschnittlich die Transgene unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors (PPT, Oac1, SbMdh, EcMdh), die niedrigste Expression das FbCa-Gen unter Kontrolle des lichtinduzierbaren CmRbcS-Promotors. Eine Übertragung der großen Gateway-Plasmide mittels Agrobakterien war also möglich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Promotoren dazu in der Lage waren die Genexpression in Tabak zu steuern.



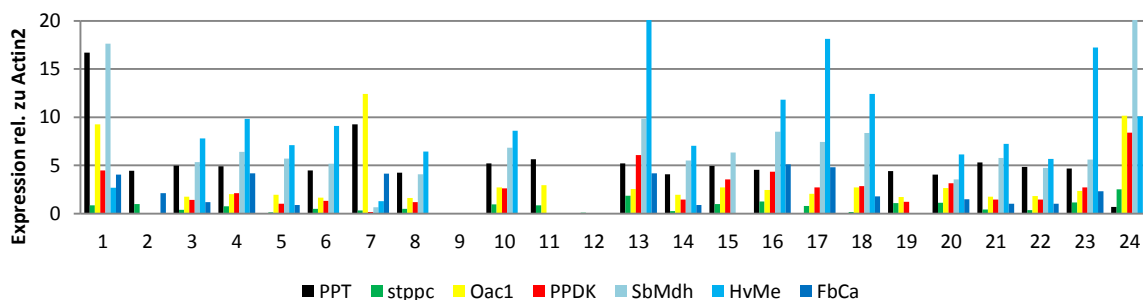
**Abbildung 3.12: Transiente Expression der C<sub>4</sub>-Gene in Tabak**

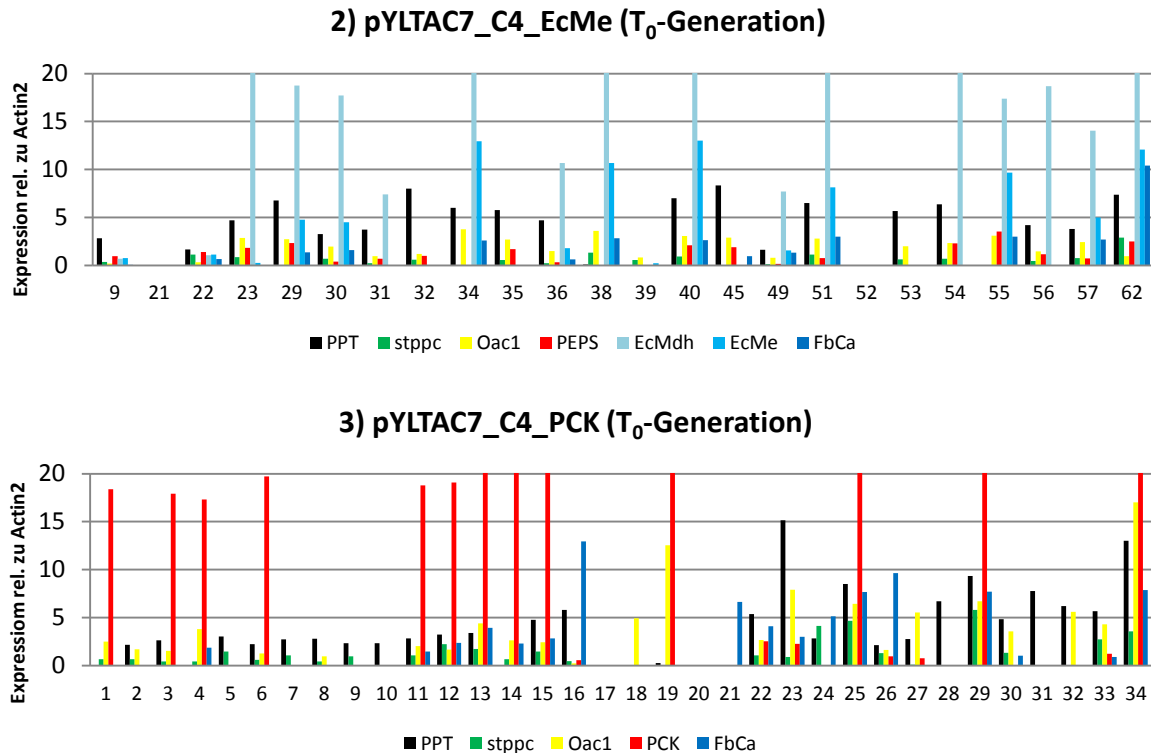
Dargestellt sind die Ergebnisse der transienten Transformation von Tabak mit den Gateway-Plasmiden pYLTA7\_C4\_HvMe (1), pYLTA7\_C4\_EcMe (2) und pYLTA7\_C4\_PCK (3). Die Expression der verschiedenen Transgene wurde mittels Real-Time-PCR bestimmt und relativ zur Expression des endogenen Actin2-Gens angegeben. Jeder Datenpunkt basiert auf der Vermessung von drei verschiedenen Proben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

### 3.2.5 Stabile Expression der C<sub>4</sub>-Gene in Tabak (T<sub>0</sub>-Generation)

Die stabile Transformation von Tabak mit den Gateway-Plasmiden, welche für die drei verschiedenen putativen C<sub>4</sub>-Wege codierten, erfolgte nach De Block (1988) und Dietze *et al.* (1995). Details des Transformationsprozesses sind unter 2.2.18 beschrieben. Nach zwei Wochen Wachstum der Pflanzen in Erde wurde die Expression der verschiedenen Transgene auf RNA-Ebene durch Real-Time-PCR getestet. Die Expression der verschiedenen Transgene in unterschiedlichen RNA-Präparationen wurde mit Hilfe des endogenen Actin2-Transkriptes normalisiert (Igarashi *et al.*, 2003). Es zeigte sich, dass für alle Konstrukte Pflanzen gefunden werden konnten, die alle sieben (pYLTA7\_C4\_HvMe und pYLTA7\_C4\_EcMe) bzw. fünf Gene (pYLTA7\_C4\_PCK) exprimierten (Abbildung 3.13). Am höchsten waren dabei die Expressionslevel von SbMdh und HvMe in den Pflanzen mit dem pYLTA7\_C4\_HvMe-Konstrukt (1) bzw. EcMdh und EcMe in den Pflanzen mit dem pYLTA7\_C4\_EcMe-Konstrukt (2). In Pflanzen, welche mit dem pYLTA7\_C4\_PCK-Konstrukt (3) transformiert wurden, war die PCK-Expression am höchsten. Auffällig war, dass das stppc-Expressionslevel unabhängig vom transformierten Konstrukt in allen Pflanzen niedrig war (ca. 0,5-2x Actin2-Level). Bei den beiden Konstrukten pYLTA7\_C4\_HvMe und pYLTA7\_C4\_EcMe exprimierten etwa 30% der insgesamt 66 in der T<sub>0</sub>-Generation getesteten Pflanzen alle sieben Gene. Beim pYLTA7\_C4\_PCK-Konstrukt waren es ca. 40% von 38 Pflanzen, welche alle fünf Gene exprimierten. Für ein anderes Konstrukt, welches für drei verschiedene Gene codierte, konnten über 80% von 115 Pflanzen positiv auf die Expression aller Gene getestet werden (nicht gezeigt).

1) pYLTA7\_C4\_HvMe (T<sub>0</sub>-Generation)



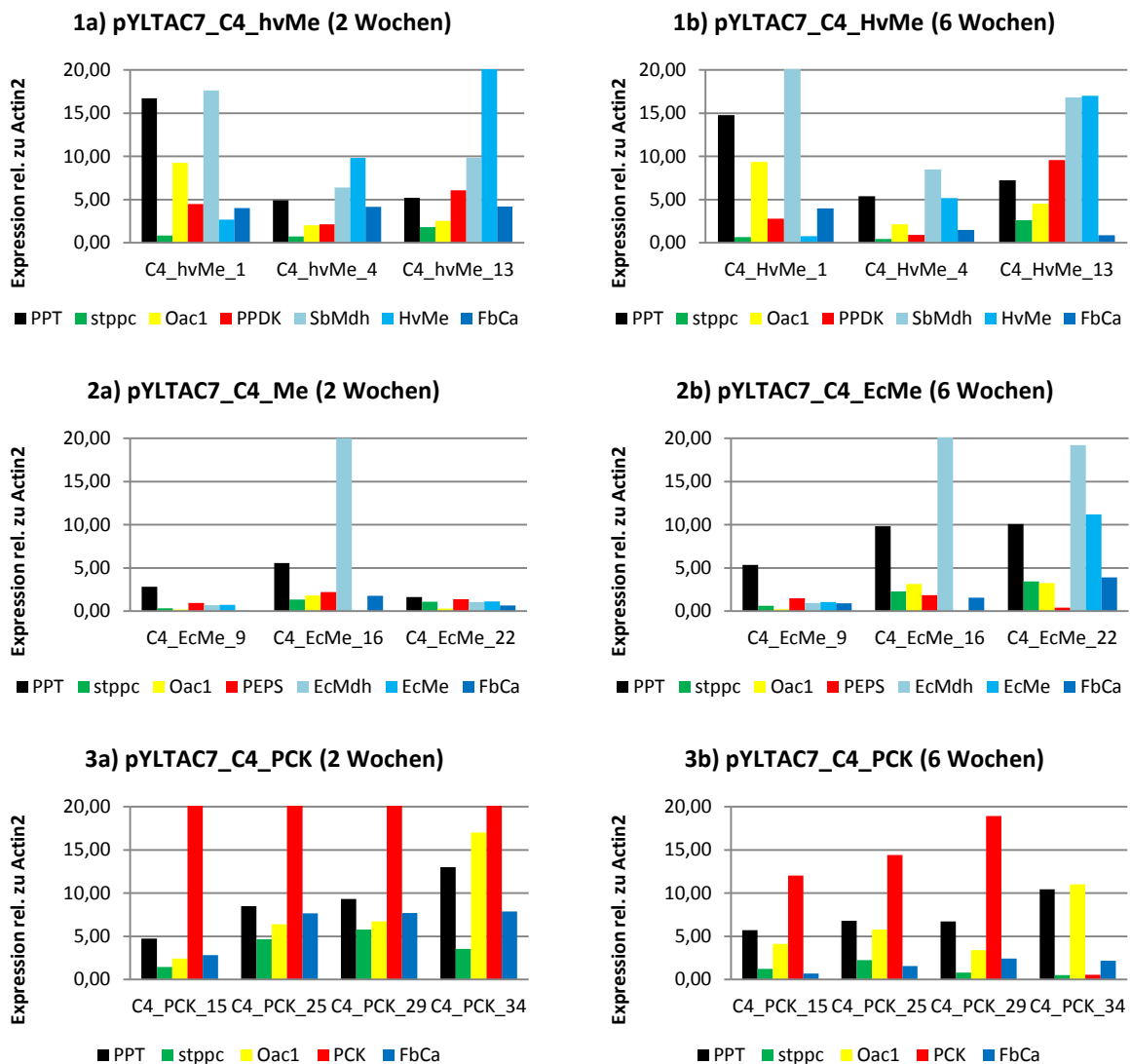


**Abbildung 3.13: Transgen-Expressionslevel in Tabakpflanzen der T<sub>0</sub>-Generation**

Dargestellt sind die durch Real-Time-PCR auf RNA-Ebene bestimmten Expressionslevel der Transgene in den Tabakpflanzen, welche mit den Gateway-Plasmiden pYLTA7\_C4\_HvMe (1), pYLTA7\_C4\_EcMe (2) und pYLTA7\_C4\_PCK (3) transformiert wurden. Die Werte sind relativ zum Expressionslevel des endogenen Actin2-Gens angegeben. Die Proben wurden von zwei Wochen alten Pflanzen nach etwa vier Stunden Belichtung genommen.

Um die Stabilität der Expression zu überprüfen wurden von je drei (C4\_HvMe und C4\_EcMe) bzw. vier Pflanzen (C4\_PCK) nach 6 Wochen erneut Proben genommen und die Expression wieder auf RNA-Ebene durch Real-Time-PCR untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Expression der Transgene für die ersten beiden Konstrukte nach vier Wochen meist nur leicht verändert hatte (Nr. 1a und 1b für C4\_HvMe bzw. Nr. 2a und 2b für C4\_EcMe in Abbildung 3.14). Vor allem beim C4\_HvMe-Konstrukt sind die Expressionsmuster nach 2 bzw. 6 Wochen sehr ähnlich. Beim C4\_EcMe-Konstrukt ist auffällig, dass sich die Expression der Transgene in Linie 22 mit Ausnahme der PEP-Synthase deutlich erhöht hat. Für das Konstrukt C4\_PCK konnte für fast alle Transgene eine Abschwächung der Expression festgestellt werden (Nr. 3a und 3b in Abbildung 3.14). Vor allem die Expression der Transgene unter Kontrolle der lichtinduzierbaren RUBISCO-Promotoren ging hier um durchschnittlich 70% deutlich zurück. Bei Linie 34 trat sogar ein fast vollständiges Silencing der PCK-Expression auf. Hier ging die Expression innerhalb der 4 Wochen um 99% zurück.

Dies äußerte sich auch in einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Zuvor zeigte die Pflanze, wie alle anderen mit hoher PCK-Expression, einen chlorotischen Phänotyp. Ein derartiges Silencing der PCK-Expression und die einhergehende Wiederherstellung des Phänotyps konnte auch noch in einem weiteren Fall beobachtet werden.



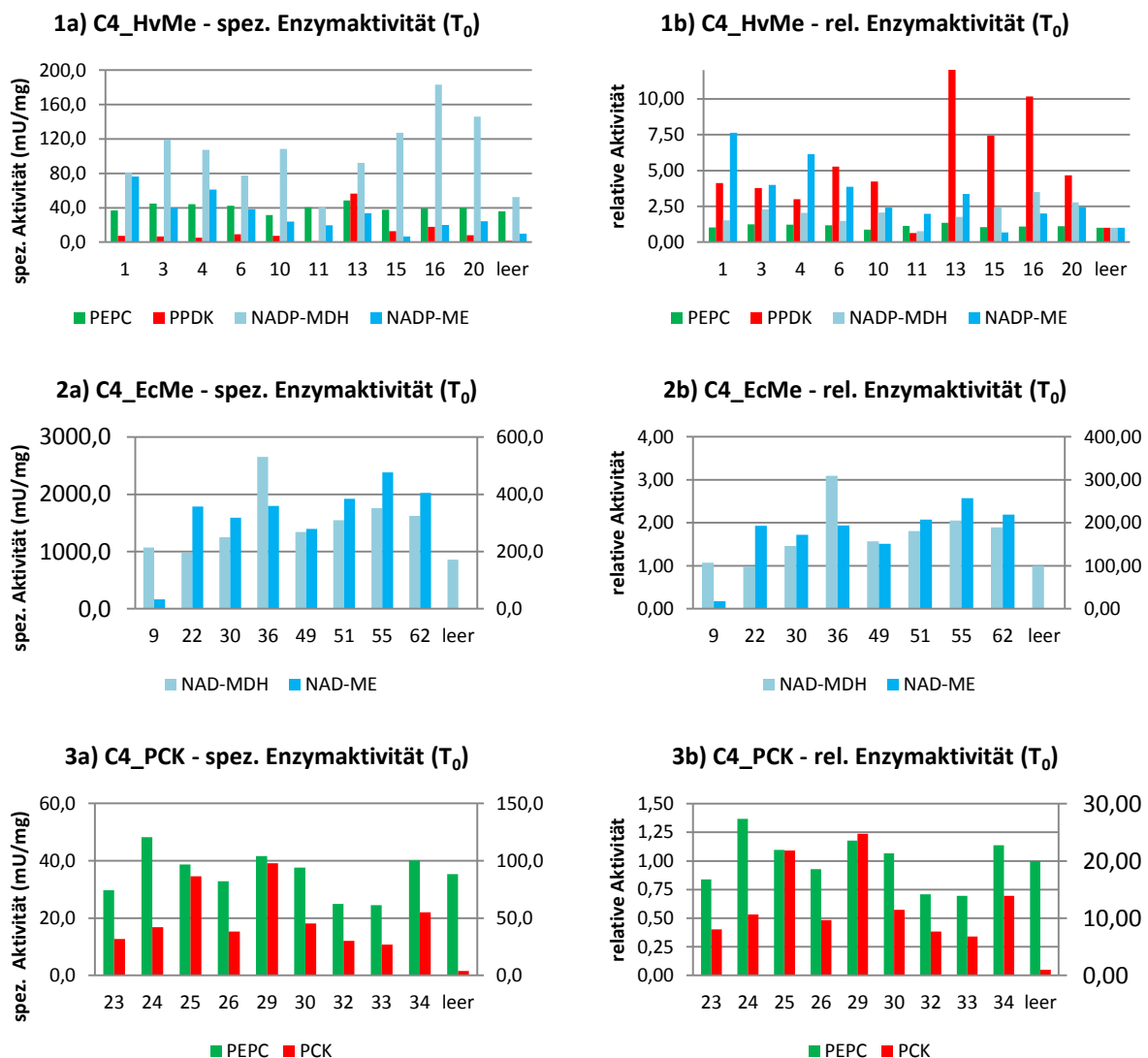
**Abbildung 3.14: Stabilität der Transgenexpression in Tabakpflanzen der T<sub>0</sub>-Generation**  
 Dargestellt ist der Vergleich der durch Real-Time-PCR auf RNA-Ebene bestimmten Transgenexpression in 2 (a) bzw. 6 (b) Wochen alten Tabakpflanzen, welche mit den Gateway-Plasmiden pYLTA7\_C4\_HvMe (1), pYLTA7\_C4\_EcMe (2) und pYLTA7\_C4\_PCK (3) transformiert wurden. Die Werte sind relativ zum Expressionslevel des endogenen Actin2-Gens angegeben. Die Proben wurden jeweils nach etwa vier Stunden Belichtung genommen.

### 3.2.6 Bestimmung der C<sub>4</sub>-Enzymaktivitäten in Tabak (T<sub>0</sub>-Generation)

Die metabolischen Bedingungen in einer Zelle (z.B. pH-Wert) können sich je nach Entwicklungsstadium der Pflanze deutlich unterscheiden. Dies kann zu Veränderungen der kinetischen Eigenschaften von Enzymen führen (Leegood, 1997). Um den Einfluss unterschiedlicher zellulärer Bedingungen zu minimieren, sollten die Messungen von Enzymaktivitäten daher in Pflanzen bzw. Blättern des gleichen Entwicklungsstadiums erfolgen. Für die Extraktion (2.2.30) wurde daher generell das dritte Blatt von oben von etwa 4 Wochen alten Pflanzen verwendet.

Die C<sub>4</sub>-Enzymaktivitäten wurden zuerst in je 24 Pflanzen aus der Transformation von pYL7AC7\_C4\_HvMe, pYL7AC7\_C4\_EcMe sowie pYL7AC7\_C4\_PCK bestimmt (T<sub>0</sub>-Generation). Als Negativkontrollen dienten Pflanzen, welche mit dem Leerplasmid pYL7AC7\_leer transformiert wurden. Um die Erhöhung der Enzymaktivitäten in individuellen Transformanten zu bestimmen, wurden die relativen Aktivitäten berechnet. Hierfür wurde die spezifische Aktivität (in mU/mg Protein) in C<sub>4</sub>-Transformanten durch diejenige in Pflanzen vom Typ pYL7AC7\_leer geteilt. Abbildung 3.15 zeigt die spezifischen sowie die relativen Aktivitäten der Enzyme PEPC, NADP-MDH, NAD-MDH, NADP-ME, NAD-ME, PPDK und PCK in einigen der getesteten Pflanzen. Es zeigte sich, dass für alle Enzyme eine Steigerung der endogenen Aktivität erreicht werden konnte. Für PEPC war diese allerdings in allen Pflanzen ziemlich gering. Die relative Aktivität lag maximal bei 2,1, in den meisten Pflanzen zwischen 1,2 und 1,5. In einigen Pflanzen konnte sogar ein Silencing der PEPC-Aktivität beobachtet werden (relative Aktivität von 0,7 bis 0,8). In den Kontrollpflanzen lag die spezifische PEPC-Aktivität bei etwa 30-40 mU/mg Protein. Für die C<sub>4</sub>\_HvMe-Transformanten lagen die relativen NADP-ME-Aktivitäten zwischen 2 und 8, die relativen PPDK-Aktivitäten zwischen 4 und 30 (mit Extraktionspuffer I, 2.2.30.1). Auch die Kontrollpflanzen zeigten eine deutliche NADP-ME-Aktivität (10-20 mU/mg Protein). Im Gegensatz dazu war die endogene PPDK-Aktivität gering (0,5-2 mU/mg Protein). Die MDH-Aktivität konnte sowohl mit der NADP-abhängigen SbMdh in den C<sub>4</sub>\_HvMe- als auch der NAD-abhängigen EcMdh in den C<sub>4</sub>\_EcMe-Transformanten maximal verdreifacht werden. Allerdings waren die endogenen NADP- und NAD-MDH-Aktivitäten bereits ziemlich hoch (NADP-MDH: 50-100 mU/mg Protein, NAD-MDH: 700-1000 mU/mg Protein). Hingegen erhöhte sich die NAD-ME-Aktivität in den C<sub>4</sub>\_EcMe-Transformanten sehr stark. Hier lagen die maximalen relativen Aktivitäten bei über

200. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass in den Kontrollpflanzen mit dem Leerplasmid nur geringe NAD-ME-Aktivitäten gemessen wurden (1-4 mU/mg Protein). In den C4\_PCK-Transformanden konnten für PCK relative Aktivitäten zwischen 7 und 25 gemessen werden. Auch für dieses Enzym war die gemessene endogene Aktivität niedrig (3-5 mU/mg Protein). Die stppc- und PEPS-Aktivitäten in den C4\_EcMe-Transformanden wurden erst in der T<sub>1</sub>-Generation bestimmt. Für die Gene PPT, Oac1 und FbCa wurde nur die Expression auf RNA-Ebene mittels Real-Time-PCR ermittelt (3.2.5).



**Abbildung 3.15: Spezifische und relative Enzymaktivitäten in Tabakpflanzen der T<sub>0</sub>-Generation**  
 Dargestellt sind die spezifischen (a) und relativen Aktivitäten (b) der Enzyme PEPC, NADP-ME, NAD-ME, NADP-MDH, NAD-MDH, PPDK und PCK in den Tabakpflanzen, welche mit den Gateway-Plasmiden pYLTA7\_C4\_HvMe (1), pYLTA7\_C4\_EcMe (2) und pYLTA7\_C4\_PCK (3) transformiert wurden. Als Grundlage zur Berechnung der relativen Aktivitäten dienten Pflanzen mit dem Leerplasmid pYLTA7\_leer.



Für die weitere Analyse der Pflanzen in der T<sub>1</sub>-Generation wurden je zwei vom Typ C4\_HvMe (Nr. 4 und 13) und C4\_EcMe (Nr. 9 und 22) bzw. eine vom Typ C4\_PCK (Nr. 25) ausgewählt, welche alle 7 bzw. 5 Gene exprimierten. Außerdem wurden zwei Pflanzen ausgewählt, welche nur die Gene PPT, stppc und Oac1 exprimierten (Nr. 11 aus der Transformation von pYLTA7\_C4\_HvMe und Nr. 4 aus der Transformation von pYLTA7\_C4\_EcMe) (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5: Transgen-Expressionsniveau und relative Enzymaktivitäten in T<sub>0</sub>-Generation ausgewählter Tabakpflanzen**

Dargestellt sind die Expression der Transgene PPT, Oac1, PEPS und FbCa relativ zu Actin2 sowie die relativen Aktivitäten der Enzyme PEPC, NADP-MDH, NAD-MDH, NADP-ME, NAD-ME und PPDK in den für die weiteren Versuche ausgewählten Tabakpflanzen, welche mit dem C4\_HvMe-, C4\_EcMe- oder C4\_PCK-Konstrukt transformiert wurden.

Typ		rel. Enzymaktivität			Expression rel. zu Actin2		
C4_HvMe	stppc	PPDK	SbMdh	HvMe	PPT	Oac1	FbCa
4	1,23	3,00	2,04	6,13	4,92	2,03	4,18
13	1,35	32,38	1,76	3,37	5,20	2,54	4,19
11	1,13	0,63	0,78	1,98	5,65	2,95	0,00
		rel. Enzymaktivität			Expression rel. zu Actin2		
C4_EcMe	stppc	EcMdh	EcMe	PPT	Oac1	PEPS	FbCa
9	1,11	1,07	17,62	2,82	0,19	0,96	0,06
22	1,01	0,99	193,19	1,65	0,32	1,40	0,65
4	1,14	1,09	0,90	0,93	2,22	0,00	0,00
		rel. Enzymaktivität			Expression rel. zu Actin2		
C4_PCK	stppc	PCK	PPT	Oac1	FbCa		
25	1,10	21,84	8,49	6,42	7,67		

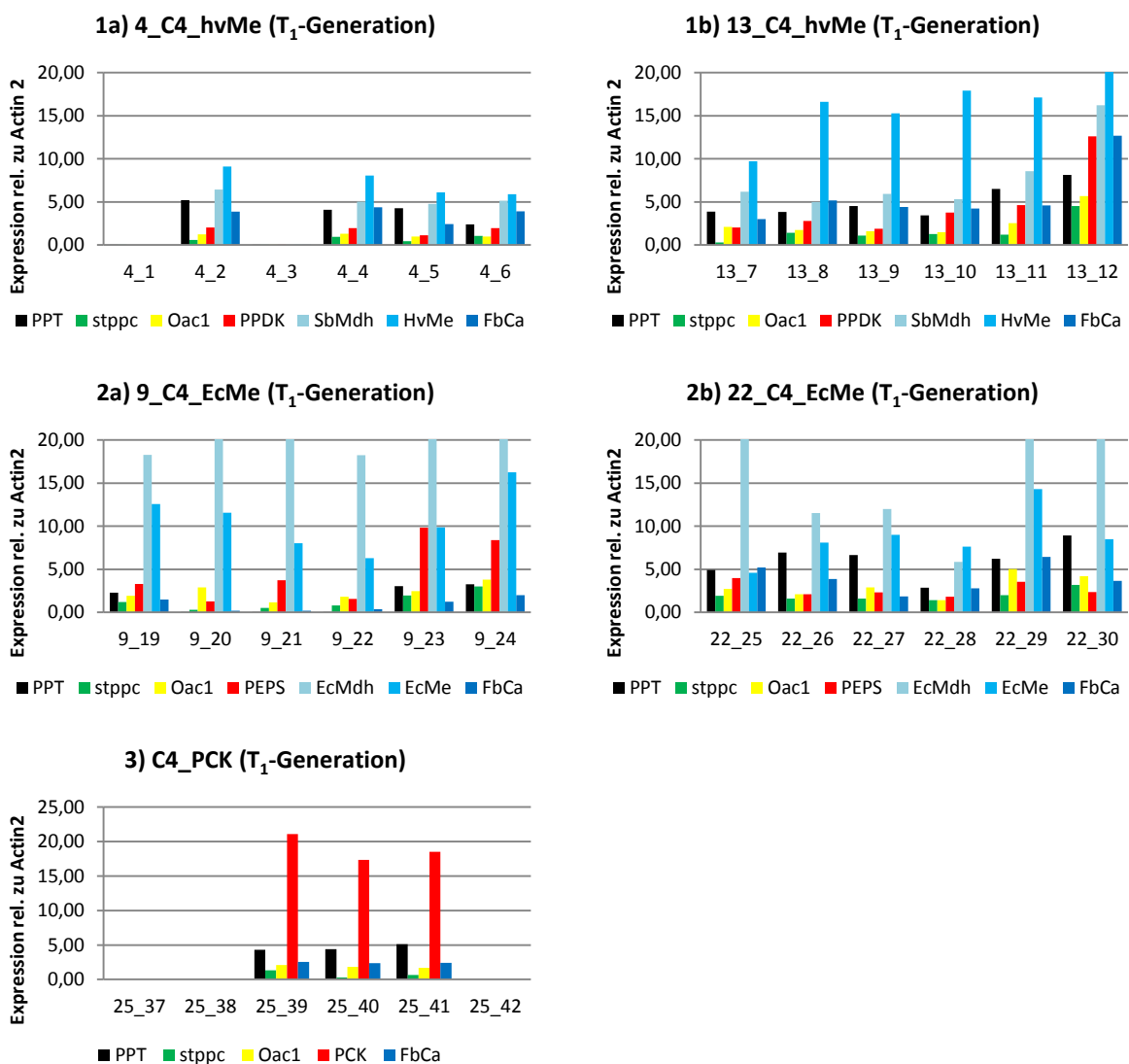
Die Lokalisation der einzelnen eingebrachten C<sub>4</sub>-Enzyme wurde im Rahmen dieser Studie nicht überprüft. Allerdings konnte bereits in einer früheren Arbeit die cytosolische bzw. chloroplastidäre Lokalisation von stppc und PPDK (mit PPDK-eigenem Transitpeptid) in Tabak gezeigt werden (Dissertation Jun Li, Institut für Biologie I, RWTH Aachen, 2001). Die Funktionen des StRbcS- und des PPT-Transitpeptids wurden bei der Oac1-Lokalisationsanalyse bestätigt. Die verwendeten CmRbcS- und LeRbcS-Transitpeptide funktionieren ebenfalls auch in Tabak (Markus Nießen, Institut für Botanik, Leibniz Universität Hannover, persönliche Mitteilung). Die Lokalisation von SbMdh aus der monokotylen C<sub>4</sub>-Pflanze *S. bicolor* in die Chloroplasten der dikotylen C<sub>3</sub>-Pflanze Tabak wurde von Gallardo *et al.* (1995) beschrieben.

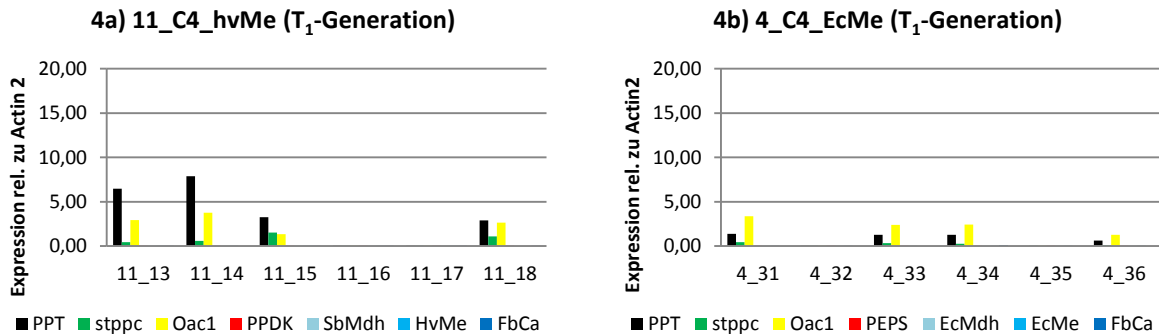
### 3.2.7 Expression der C<sub>4</sub>-Gene in Tabak (T<sub>1</sub>-Generation)

Die weitere Analyse der transgenen Tabakpflanzen mit den verschiedenen putativen C<sub>4</sub>-Zyklen erfolgte in der T<sub>1</sub>-Generation. Hierzu wurden die in Tabelle 3.5 aufgeführten Pflanzen der T<sub>0</sub>-Generation ausgewählt. 2 Wochen nach Pikieren erfolgte die Analyse der Transgen-Expression auf RNA-Ebene durch Real-Time-PCR (Abbildung 3.16). Die Proben hierfür wurden wieder nach 4 Stunden Belichtung genommen. Bei den beiden C<sub>4</sub>\_HvMe-Linien, welche in der T<sub>0</sub>-Generation positiv auf die Expression aller 7 Gene getestet wurden, zeigte sich, dass auch in der T<sub>1</sub>-Generation alle Gene exprimiert werden (Nr. 1a und 1b in Abbildung 3.16). Es traten in beiden Linien keine Pflanzen auf, die nur ein Teil der Gene exprimierten. In Linie 4 gab es jedoch zwei azygote Pflanzen. Dies weist darauf hin, dass alle 7 Gene auf einem Chromosom integriert wurden. Während innerhalb der beiden Linien die Expression bis auf eine Ausnahme (13\_12) relativ homogen war, unterschieden sie sich untereinander doch deutlich. Wie in der T<sub>0</sub>-Generation waren die Expressionsraten der meisten Gene in Linie 13 höher als in Linie 4. Dies zeigte sich vor allem in der HvMe-Expression, welche in Linie 13 etwa zwei- bis dreimal so hoch war als in Linie 4. Bei den beiden C<sub>4</sub>\_EcMe-Linien exprimierten in Linie 22 alle Pflanzen alle 7 Gene, während in Linie 9 auch drei auftraten, welche nur 6 Gene exprimierten (Nr. 2a und 2b in Abbildung 3.16). In der T<sub>0</sub>-Generation hatten noch beide Linien alle 7 Gene exprimiert. In den Pflanzen 9\_21, 9\_22 sowie 9\_23 wurde das PPT-Gen nicht exprimiert. Außerdem war die Expression von FbCa in diesen Pflanzen sehr schwach. Die Überprüfung per PCR ergab, dass das FbCa-Gen vorhanden war, das PPT-Gen aber fehlte (nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass es in Linie 9 zwei verschiedene Integrationsstellen auf unterschiedlichen Chromosomen gab. Während in einem Chromosom alle 7 Gene integriert waren, fehlte im anderen das PPT-Gen. Hingegen besaß Linie 22 wohl nur Integrationsstellen mit allen 7 Genen. Da auch bei weiteren getesteten Pflanzen keine Azygoten auftraten (nicht gezeigt), gab es vermutlich mehrere Integrationsstellen auf unterschiedlichen Chromosomen. Sowohl in Linie 9 als auch Linie 22 war die Expression von je 3 Pflanzen ziemlich homogen. In Linie 9 waren dies die Pflanzen 9\_19, 9\_23 und 9\_24 bzw. 9\_21, 9\_22 und 9\_23. In Linie 22 waren es die Pflanzen 22\_25, 22\_29 und 22\_30 bzw. 22\_26, 22\_27 und 22\_28, wobei sich der Unterschied hauptsächlich in der Expression von EcMdh zeigte. In der Linie 25\_C4\_PCK traten drei azygote Pflanzen sowie drei Pflanzen auf, welche wie in der

T<sub>0</sub>-Generation alle 5 Gene exprimierten (Nr. 3 in Abbildung 3.16). Die Transgen-Expressionsraten innerhalb der drei positiven Pflanzen 25\_39, 25\_40 und 25\_41 waren wiederum sehr ähnlich. Da auch alle weiteren getesteten Pflanzen entweder alle 5 Gene exprimierten oder azygot waren (nicht gezeigt), kann auch hier davon ausgegangen werden, dass alle 5 Gene auf einem Chromosom integriert wurden. In den beiden Linien 11\_C4\_HvMe und 4\_C4\_EcMe, welche in der T<sub>0</sub>-Generation nur die Gene PPT, stppc und Oac1 exprimierten, wurden in der T<sub>1</sub>-Generation entweder diese drei Gene exprimiert oder es handelte sich um azygote Pflanzen (Nr. 4a und 4b in Abbildung 3.16). Da dieses Ergebnis in weiteren getesteten Pflanzen bestätigt werden konnte (nicht gezeigt), gab es in beiden Linien vermutlich nur eine Integrationsstelle, welche nur den entsprechenden Teilbereich der T-DNA enthielt.

Die Transgene wurden für alle drei Konstrukte also auch in der T<sub>1</sub>-Generation noch exprimiert, teilweise sogar höher als in der T<sub>0</sub>-Generation.





**Abbildung 3.16: Transgen-Expressionslevel in Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation**

Dargestellt sind die durch Real-Time-PCR auf RNA-Ebene bestimmten Expressionslevel der Transgene in den C<sub>4</sub>HvMe- (1a, 1b, 4a), C<sub>4</sub>EcMe (2a, 2b, 4b) und C<sub>4</sub>PCK-Tabakpflanzen (3) der T<sub>1</sub>-Generation. Die Werte sind relativ zum Expressionslevel des endogenen Actin2-Gens angegeben. Die Proben wurden von zwei Wochen alten Pflanzen nach etwa vier Stunden Belichtung genommen.

### 3.2.8 Bestimmung der C<sub>4</sub>-Enzymaktivitäten in Tabak (T<sub>1</sub>-Generation)

Die Bestimmung der C<sub>4</sub>-Enzymaktivitäten in den transgenen Tabakpflanzen mit den verschiedenen putativen C<sub>4</sub>-Zyklen erfolgte auch in der T<sub>1</sub>-Generation wieder nach 4 Wochen. Zum Vergleich wurden zudem die Enzymaktivitäten in den C<sub>4</sub>-Pflanzen *Z. mays* und *A. caudatus* ermittelt. Abbildung 3.17 zeigt die relativen Aktivitäten der Enzyme PEPC, NADP-MDH, NAD-MDH, NADP-ME, NAD-ME, PPDK, PEPS und PCK in den C<sub>4</sub>HvMe-, C<sub>4</sub>Me- und C<sub>4</sub>PCK-Tabakpflanzen sowie in Mais und Amarant. Dabei wurden alle Pflanzen einer Linie, welche alle sieben (4 und 13\_C<sub>4</sub>HvMe sowie 9 und 22\_C<sub>4</sub>EcMe) bzw. 5 Gene (25\_C<sub>4</sub>PCK) exprimierten zusammengefasst. Allerdings wurde die Linie 13\_C<sub>4</sub>HvMe nochmal unterteilt, da die Pflanzen 13\_11 und 13\_12 (= 13\_C<sub>4</sub>HvMe<sub>2</sub>) deutlich höhere Aktivitäten aufwiesen, als 13\_7, 13\_8, 13\_9 und 13\_10 (= 13\_C<sub>4</sub>HvMe<sub>1</sub>). Für Mais und Amarant wurden die Aktivitäten in je 4 unabhängigen Proben bestimmt.

Es zeigte sich, dass sowohl bei den C<sub>4</sub>HvMe- (Nr. 1 in Abbildung 3.17) als auch den C<sub>4</sub>EcMe-Pflanzen (Nr. 2 in Abbildung 3.17) welche mit deutlich höheren Aktivitäten als in der T<sub>0</sub>-Generation auftraten. Allerdings konnte in keiner Pflanze die C<sub>4</sub>-Enzymaktivitäten von Mais bzw. Amarant erreicht werden. Die höchsten relativen Aktivitäten bei Pflanzen vom C<sub>4</sub>HvMe-Typ (Nr. 1 in Abbildung 3.17) wurden sowohl für PEPC (5,19), als auch die Enzyme NADP-MDH (3,67), NADP-ME (19,66) und PPDK (188,23) in Pflanze 13\_12 gemessen. Damit konnten zwar nicht die Level von Mais erreicht werden, aber immerhin ein Viertel dessen PEPC- und die Hälfte dessen PPDK-Aktivität. Für NADP-ME und NADP-MDH konnten sogar 60 bzw. 80% der En-

zymaktivitäten in Mais erzielt werden. Allerdings zeigte diese Pflanze wie auch die Pflanze 13\_11 eine ausgeprägte Chlorose. Sie waren auch deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Hingegen zeigten die C4\_HvME-Pflanzen mit niedrigeren Enzymaktivitäten keine Chlorose. Auch die Wachstumshemmung fiel deutlich geringer aus, wobei sich eine klare Korrelation mit der NADP-ME-Aktivität erkennen ließ (siehe 3.2.9). Bei den Pflanzen 13\_11 und 13\_12 handelte es sich vermutlich um homozygote Linien. Nachkommen der Pflanze 13\_12 zeigten alle den gleichen Phänotyp. Eine weitere Analyse der T<sub>2</sub>-Generation erfolgte aus Zeitgründen jedoch nicht mehr. Für PPDK lassen sich die deutlich höheren gemessenen Aktivitäten in der T<sub>1</sub>-Generation aber auch auf die Verwendung eines anderen Extraktionspuffers zurückführen (2.2.30.2 statt 2.2.30.1).

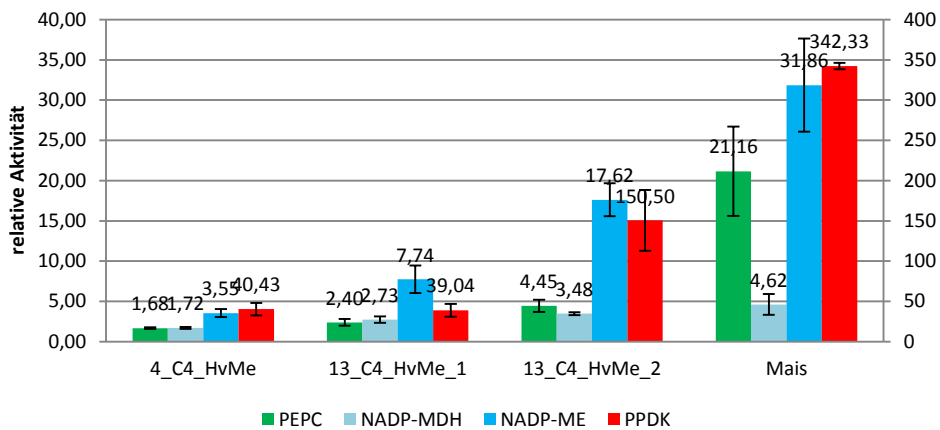
Bei den C4\_EcMe-Pflanzen (Nr. 2 in Abbildung 3.17) wurden in der T<sub>1</sub>-Generation ebenfalls deutlich höhere Aktivitäten gemessen als in der T<sub>0</sub>-Generation. Die höchsten relativen Aktivitäten wurden dabei in Nachkommen der Linie 22 gefunden. Das Maximum lag für PEPC bei 13,15, NAD-MDH 7,23, NAD-ME 936,07 und PEPS 80,20. Die Berechnung der relativen PEPS-Aktivität erfolgte dabei auf Basis der PPDK-Aktivität, da beide Enzyme die gleiche Reaktion katalysieren, Pflanzen dieses Enzym jedoch nicht besitzen. Damit konnten für PEPC und PEPS/PPDK etwa 40 bzw. 80% der Enzymaktivitäten in Amarant erreicht werden. Die relative NAD-MDH-Aktivität war mit 7,23 sogar etwa 30% höher als in Amarant. Am stärksten fiel die Erhöhung wie in der T<sub>1</sub>-Generation für NAD-ME aus. Hier konnten 300 bis über 900-mal höhere Enzymaktivitäten als in den Kontrollpflanzen gemessen werden. Ein Vergleich mit der NAD-ME-Aktivität in Amarant war nicht möglich, da dessen Aktivität aus unbekanntem Gründen nicht bestimmt werden konnte. Für C4\_EcMe waren alle Pflanzen in hohem Maße chlorotisch und teilweise sehr stark in ihrem Wachstum gehemmt. Auch hier ließ sich eine deutliche Korrelation mit der NAD-ME-Aktivität herstellen.

Bei den C4\_PCK-Pflanzen (Nr 3 in Abbildung 3.17) konnte für PEPC ebenfalls eine höhere Aktivität gemessen werden. Die relative Aktivität dieses Enzyms lag mit durchschnittlich 2,03 fast doppelt so hoch als in der T<sub>0</sub>-Generation (1,10). Die relative PCK-Aktivität lag durchschnittlich in etwa auf dem gleichen Niveau wie in der Elternpflanze. Hinsichtlich des Phänotyps fielen alle PCK-Expriemierer durch ihre chlorotischen Blätter auf. Auch ihr Wachstum war etwas langsamer. Allerdings war diese

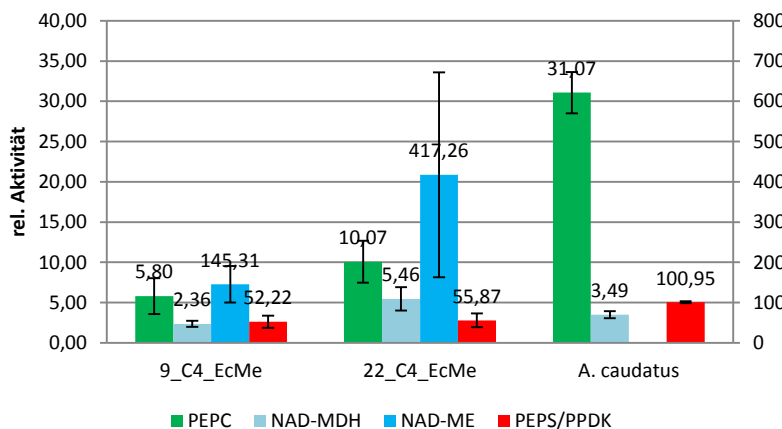
Hemmung nicht so ausgeprägt wie in Pflanzen mit hoher NADP- oder NAD-ME-Aktivität. Auch eine Korrelation der PCK-Aktivität mit dem Wachstum war nicht zu erkennen.

Für alle getesteten Enzyme konnte also eine Aktivitätserhöhung gegenüber den Kontrollpflanzen gemessen werden.

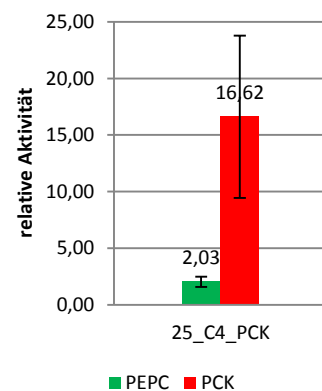
### 1) C4\_HvMe - rel. Enzymaktivität (T<sub>1</sub>)



### 2) C4\_Me - rel. Enzymaktivität (T<sub>1</sub>)



### 3) C4\_PCK - rel. Enzymaktivität (T<sub>1</sub>)



**Abbildung 3.17: Relative Enzymaktivitäten in Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation**

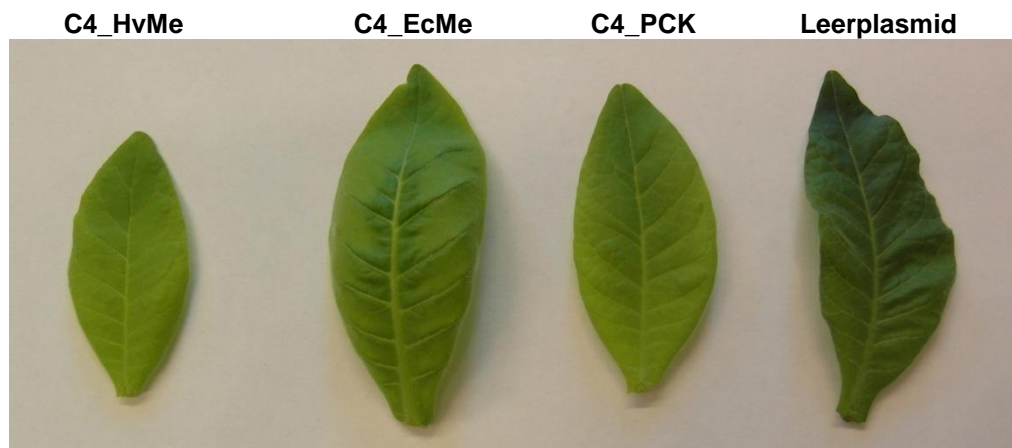
Dargestellt sind die relativen Aktivitäten der Enzyme PEPC, NADP-ME, NAD-ME, NADP-MDH, NAD-MDH, PPK und PCK in den C4\_HvMe- (1), C4\_EcMe- (2) und C4\_PCK-Tabakpflanzen (3) der T<sub>1</sub>-Generation. Als Grundlage zur Berechnung der Werte dienten Pflanzen mit dem Leerplasmid pYLAC7\_leer. Als Vergleich sind die relativen Enzymaktivitäten in *Z. mays* (NADP-ME-Typ) bzw. *A. caudatus* (NAD-ME-Typ) angegeben. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler.

Die höchsten spezifischen bzw. relativen Enzymaktivitäten wurden in Pflanzen gemessen, welche eine starke Blattchlorose sowie eine erhebliche Wachstumshemmung aufwiesen. Vergleiche des Gesamtproteingehaltes in den Enzymproben ergaben, dass dieser in solchen Pflanzen deutlich reduziert war. Er betrug teilweise nur 25-30% des Proteingehaltes in Proben von Kontrollpflanzen mit Leerplasmid. Da sich

die spezifische Enzymaktivität auf Basis des Gesamtproteingehaltes berechnet, haben diese Veränderungen großen Einfluss auf das Ergebnis. Bezogen auf die eingesetzte Blattmenge bzw. -fläche würden die gemessenen Aktivitätssteigerungen der C<sub>4</sub>-Enzyme deutlich geringer ausfallen.

### 3.2.9 Phänotypische Effekte der Transgenexpression

Für die Expression der Transgene PPT, stppc, Oac1, PPDK, PEPS, SbMdh, EcMdh sowie FbCa konnten keine phänotypischen Effekte beobachtet werden. Hingegen wirkte sich eine Expression der decarboxylierenden Enzyme HvMe, EcMe und PCK in den Chloroplasten deutlich auf den Phänotyp aus. Während EcMe und PCK unabhängig von der Expressionsstärke bzw. ihrer Aktivität zu einer Blattchlorose führten, trat dieser Effekt bei HvMe nur bei sehr hoher Expression auf. Abbildung 3.18 zeigt typische Blätter transgener Tabakpflanzen mit hohen Aktivitäten der Decarboxylierungs-Enzyme. In Pflanzen, welche transgen für das NAD-abhängige Malatenzym aus *E. coli* waren, trat außerdem eine verstärkte Blattkrümmung und bei sehr hoher Expression eine Deformierung der Blattränder auf. Wenn die EcMe-Expression nicht zu hoch war, verminderten sich Blattchlorose und Blattkrümmung mit der Zeit. Dies war jedoch nicht auf ein Silencing der EcMe-Expression zurückzuführen.



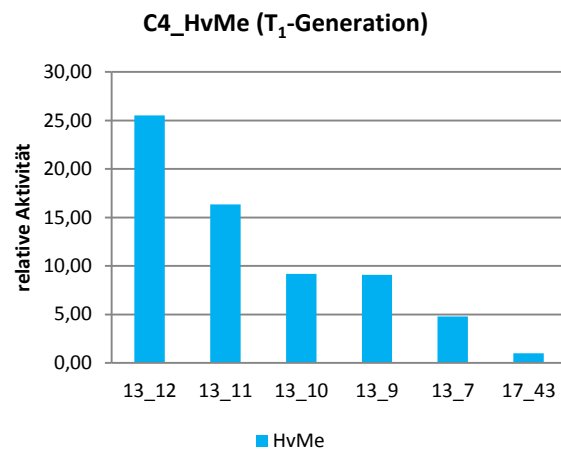
**Abbildung 3.18: Blattchlorose durch hohe HvMe-, EcMe- und PCK-Expression**

Dargestellt sind typische Blätter etwa 8 Wochen alter transgener Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation vom Typ C4\_HvMe, C4\_EcMe, C4\_PCK und Leerplasmid. Die Pflanzen zeigten jeweils hohe Aktivitäten der Enzyme HvMe, EcMe bzw. PCK. Außerdem exprimierten die Pflanzen alle weiteren Gene der drei putativen C<sub>4</sub>-Zyklen.

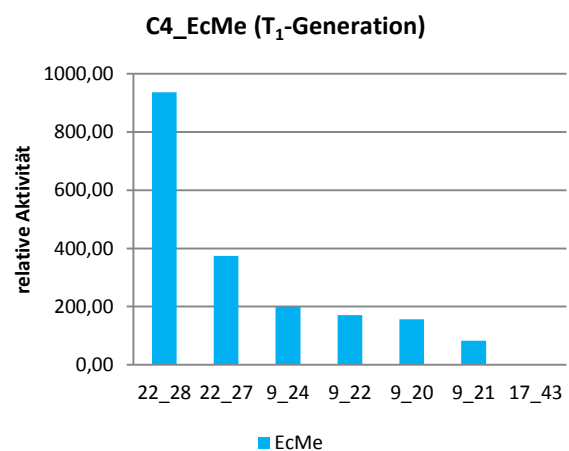
Die Erhöhung der ME-Aktivität führte außerdem zu einer ernsthaften Verschlechterung des Wachstums der transgenen Tabakpflanzen. Während sie bei photohe-

terotrophem Wachstum in Gegenwart von Sucrose unter Schwachlichtbedingungen normal wuchsen und keine Chlorose zeigten, bleichten die Blätter bei photoautotrophem Wachstum in Erde unter normalen Lichtbedingungen aus und das Wachstum war gehemmt. Das Ausmaß der Chlorose sowie der Wachstumshemmung nahm mit ansteigender NADP-ME-Aktivität zu (Nr. 1 in Abbildung 3.19). Pflanzen, in denen die NADP-ME-Aktivität nur etwas erhöht war (rel. Aktivität 2-7), waren weder chlorotisch noch in ihrem Wachstum gehemmt. Pflanzen mit dem NAD-ME aus *E. coli* waren in jedem Fall chlorotisch, der Grad der Wachstumshemmung nahm aber auch hier mit ansteigender Aktivität zu (Nr. 2 in Abbildung 3.19). Hingegen wirkte sich eine hohe PCK-Expression nicht so stark auf das Wachstum aus. Diese Pflanzen wuchsen nur etwas langsamer als die Kontrollpflanzen vom Typ pYLAC7\_leer.

### 1) C4\_HvMe



### 2) C4\_EcMe



**Abbildung 3.19: Einfluss der HvMe- und EcMe-Expression auf das Wachstum**

Dargestellt sind etwa 8 Wochen alte transgene Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation vom Typ C4\_HvMe (1) bzw. C4\_EcMe (2). Die Pflanzen exprimierten jeweils alle 7 Gene der beiden putativen C<sub>4</sub>-Zyklen.



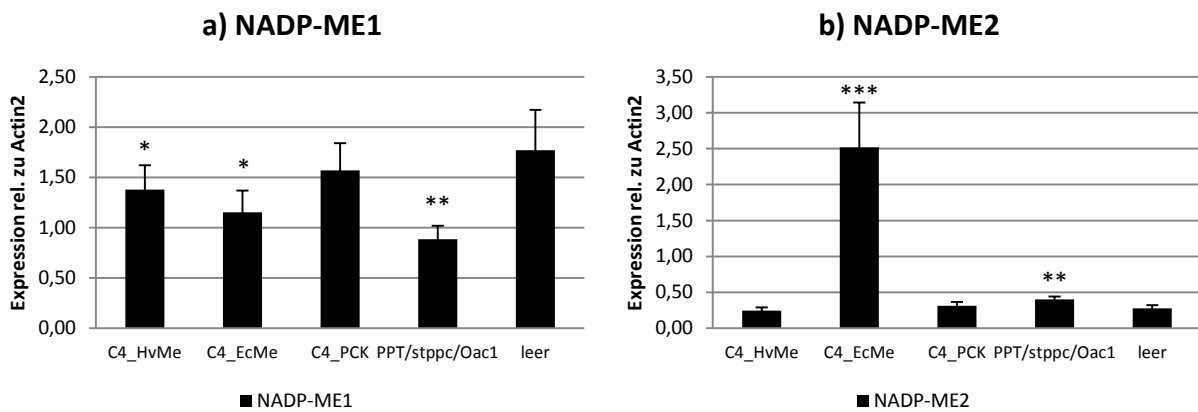
Als Vergleich diente eine Pflanze vom Typ pYL7AC7\_leer (Nr. 43). Die Diagramme zeigen jeweils die HvMe- bzw. EcMe-Aktivitäten relativ zu Pflanzen, welche mit dem Leerplasmid pYL7AC7\_leer transformiert wurden.

### 3.2.10 Auswirkungen der Transgenexpression auf die Expression von Endogenen

Der Stoffwechsel in Pflanzen ist aufgrund verschiedener Faktoren wie alternativer Enzyme und Wege sehr flexibel (Stitt und Sonnewald, 1995). Eine Erhöhung der C<sub>4</sub>-Enzymaktivitäten könnte daher zu einer Veränderung des Expressions- bzw. Aktivitätsmusters der endogenen Enzyme führen. Anhand dieser Veränderungen ließen sich wichtige Kenntnisse über die metabolischen Veränderungen durch die eingebrachten C<sub>4</sub>-Enzyme gewinnen. Die Erhöhung der PEPC-Aktivität könnte sich zum Beispiel auf Enzyme, die ebenfalls an der Umsetzung von OAA und PEP beteiligt sind, auswirken. So konnte von Häusler *et al.* (2001) gezeigt werden, dass eine Erhöhung der PEPC-Aktivität in Kartoffeln zu einer Aktivitätssteigerung des cytosolischen NADP-MEs führte. Dies deutet darauf hin, dass das von der PEPC produzierte OAA nach Umwandlung in Malat auch im Cytosol wieder decarboxyliert wird. Eine Erhöhung der chloroplastidären ME-Aktivität könnte hingegen ein Hinweis darauf sein, dass in den transgenen Pflanzen vermehrt OAA in die Chloroplasten gelangt.

In *N. tabacum* konnten bisher drei verschiedenen NADP-ME-Transkripte identifiziert werden (Müller *et al.*, 2008). Während zwei für putative cytosolische Isoformen (DQ923118 = NADP-ME2 und EH663836 = NADP-ME3) codieren, ist das dritte Genprodukt in den Chloroplasten lokalisiert (DQ923119 = NADP-ME1). Da die Expression aller drei Isoformen stark auf Transkriptionsebene kontrolliert wird, erfolgte die Untersuchung mittels Real-Time-PCR. Es wurden je 12 Pflanzen vom Typ C<sub>4</sub>\_HvMe und je 6 Pflanzen von den Typen C<sub>4</sub>\_EcMe, C<sub>4</sub>\_PCK und PPT/stppc/Oac1 untersucht. Als Kontrollen dienten 6 Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei der Probennahme etwa 4 Wochen alt. Für das chloroplastidäre NADP-ME1 (Primer 4697 und 4698) zeigte sich, dass die Expression in C<sub>4</sub>\_HvMe- und C<sub>4</sub>\_EcMe-Pflanzen signifikant niedriger als in den Kontrollpflanzen mit Leerplasmid war ( $p < 0,05$ ). In C<sub>4</sub>\_PCK-Pflanzen war die Expression ebenfalls erniedrigt. Diese Veränderung war jedoch nicht signifikant. (Abbildung 3.20). Am geringsten war die Expression in Pflanzen, welche nur die Gene PPT, stppc und Oac1 exprimierten ( $p < 0,01$ ). Die Expression des cytosolischen

NADP-ME2 (Primer 4699 und 4700) war in C4\_HvMe und C4\_PCK Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen nur leicht verändert (Abbildung 3.20), was aber nicht signifikant war. Hingegen war die Veränderung der NADP-ME2-Expression in C4\_EcMe-Pflanzen hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ). Sie war in diesen Pflanzen mehr als 9-mal so hoch als in Pflanzen mit Leerplasmid. Signifikant erhöht war die Expression auch in PPT/stppc/Oac1-Pflanzen ( $p < 0,01$ ). Dieses Ergebnis konnte auch mit einem anderen Primerpaar (4717 und 4718) reproduziert werden.

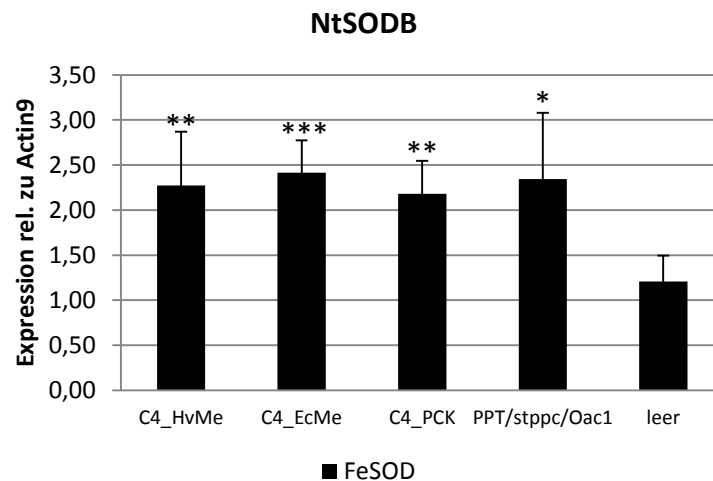


**Abbildung 3.20: Expression der endogenen Gene NADP-ME1 und NADP-ME2**

Dargestellt ist die Expression der endogenen Isoformen des NADP-abhängigen Malatenzyms NADP-ME1 (a) und NADP-ME2 (b) in 4 Wochen alten C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen auf RNA-Ebene mittels Real-Time-PCR. Als Vergleich dienten Kontrollpflanzen mit Leerplasmid. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler. \*, \*\* und \*\*\* kennzeichnen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

Die hohen Expressionen des eingebrachten NADP-abhängigen HvMe oder des NAD-abhängigen EcMe in Tabak führten zu einer starken Blattchlorose und einer erheblichen Wachstumsretardierung (siehe 3.2.9). Nach Tsuchida *et al.* (2001) ist dies unter anderem auf einen Anstieg des NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnisses im Chloroplastenstroma zurückzuführen. Ein gesteigertes NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis würde über die sogenannte Mehler Reaktion die Bildung von Sauerstoffradikalen begünstigen (Foyer, 1997; Asada, 1999), welche nach Slooten *et al.* (1995) und Kurepa *et al.* (1997) in Tabak hauptsächlich durch die FeSOD (*NtSODB*) abgebaut werden. Da die Regulation der SOD sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene stattfindet (Kurepa *et al.* 1997, Cortleven *et al.* 2011), wurde die *NtSODB*-Expression auf RNA-Ebene durch Real-Time-PCR getestet (Primer 4695 und 4696). Es wurden je 12 Pflanzen vom Typ C4\_HvMe und je 6 Pflanzen von den Typen C4\_EcMe, C4\_PCK und PPT/stppc/Oac1 untersucht. Als Kontrollen dienten 6 Pflanzen mit Leerplasmid.

Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei der Probennahme etwa 2 Wochen alt. Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis der Real-Time-PCR. Neben den C4\_HvMe Pflanzen mit dem NADP-abhängigen ME wurde auch in den C4\_EcMe, C4\_PCK sowie den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen ein signifikanter Anstieg der *NtSODB*-Transkripte gemessen ( $p < 0,05$ ). Die Expression war in allen transgenen Pflanzen etwa um den Faktor 2 erhöht.



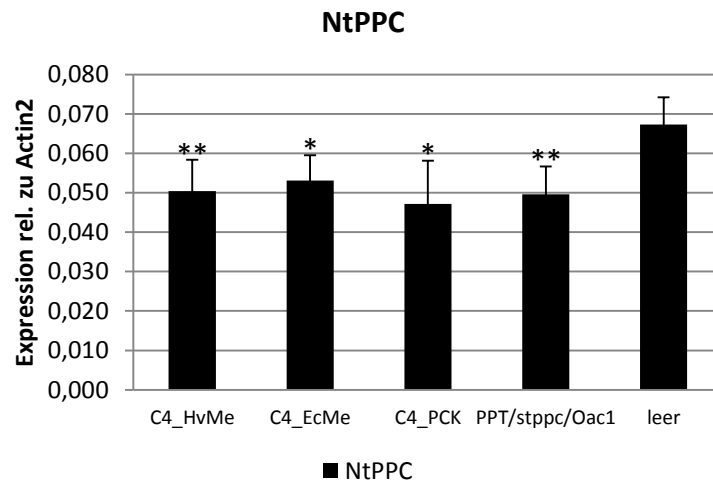
**Abbildung 3.21: Expression der Superoxid-Dismutase *NtSODB***

Dargestellt ist die Expression der Fe-abhängigen Superoxid-Dismutase (*NtSODB*) in 2 Wochen alten C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation auf RNA-Ebene mittels Real-Time-PCR. Als Vergleich dienten Kontrollpflanzen mit Leerplasmid. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler. \*, \*\* und \*\*\* kennzeichnen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

Des Weiteren wurde die Expression der endogenen PEPC (*ntppc*) in den transgenen Tabakpflanzen untersucht. Da keine Pflanzen mit hoher Expression des eingebrachten *stppc*-Gens gefunden werden konnten, wurden Silencing-Effekte als Ursache vermutet. Da die Homologie des *stppc*-Gens zum nahe verwandten endogenen *ntppc*-Gen mit 87% ziemlich hoch ist, könnte dessen Expression durch Co-Suppression blockiert werden.

Die Analyse der endogenen PEPC-Expression in den C4\_HvMe, C4\_EcMe, C4\_PCK und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen erfolgte mittels Real-Time-PCR (Primer 4715 und 4716). Es wurden je 12 Pflanzen vom Typ C4\_HvMe und je 6 Pflanzen von den Typen C4\_EcMe, C4\_PCK und PPT/stppc/Oac1 untersucht. Als Kontrollen dienten 6 Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei der Probennahme etwa 4 Wochen alt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Es zeigte sich, dass es durch die Expression von *stppc* in allen Li-

nien zu einem „silencing“ kam. Die *ntppc*-Expressionen waren signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) und erreichten nur etwa 75% der Expression in Kontrollpflanzen mit Leerplasmid.



**Abbildung 3.22: Expression des endogenen PEPC-Gens**

Dargestellt ist die Expression der endogenen Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (*ntppc*) in 4 Wochen alten C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation auf RNA-Ebene mittels Real-Time-PCR. Als Vergleich dienten Kontrollpflanzen mit Leerplasmid. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler. \* und \*\* kennzeichnen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ .

### 3.2.11 Elementar-Analyse

Die putativen C<sub>4</sub>-Zyklen könnten in einer Veränderung der elementaren Zusammensetzung hinsichtlich des C/N-Verhältnisses resultieren. Daher wurde der Gehalt dieser beiden Elemente mittels Elementar-Analyse untersucht. Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff wurde dabei über die Detektion der jeweiligen prozentualen Anteile in der Probe ermittelt (quantitative Elementaranalyse). Dadurch ist nicht nur eine Aussage über den Quotienten beider Elemente, sondern auch über den Gehalt von Kohlenstoff und Stickstoff möglich. Die Elementar-Analyse wurde freundlicherweise von der Gruppe um Prof. Dr. Andreas Weber am Institut für Biochemie der Pflanzen an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

Es wurde das getrocknete Blattmaterial von je drei bis sechs Pflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe (3x), 13\_C4\_HvMe (4x), 9\_C4\_EcMe (6x), 22\_C4\_EcMe (4x), 25\_C4\_PCK (3x) sowie der Linien 11\_C4\_HvMe (3x) und 4\_C4\_EcMe (2x), welche beide nur die drei Gene PPT, stppc und Oac1 exprimierten, untersucht. Als Vergleich dienten zehn azygote Pflanzen (7x) bzw. Pflanzen mit Leerplasmid (3x). Alle Pflan-

zen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 4 Wochen alt. Die Ergebnisse der Elementar-Analyse sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Für die beiden C4\_HvMe-Linien zeigte sich, dass der durchschnittliche Kohlenstoffgehalt um 1,3 bzw. 2,0% erniedrigt ( $p > 0,05$ ), während der mittlere Stickstoffgehalt signifikant um 0,8 bzw. 2,9% erhöht war ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ). In den C4\_HvMe-Pflanzen der Linie 13 (5,0% N) war der Stickstoffgehalt damit mehr als doppelt so hoch als in den Kontrollpflanzen (2,1% N). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die EcMe-Pflanzen, allerdings fiel der Unterschied noch etwas deutlicher aus. Hier war der Kohlenstoffgehalt signifikant um 2,4 bzw. 4,4% niedriger ( $p < 0,001$ ) und der Stickstoffgehalt signifikant um 2,9 bzw. 3,8% höher ( $p < 0,001$ ). Für Linie 22 (6,0%) bedeutet dies fast eine Verdreifachung des Stickstoffgehaltes gegenüber den Kontrollpflanzen. Sowohl bei den C4\_HvMe- als auch den EcMe-Pflanzen schienen höhere Expressionsraten der Transgene bzw. Aktivitäten der Enzyme den Effekt zu verstärken. Etwas anders sah das Ergebnis für die C4\_PCK-Pflanzen aus. Hier war der Kohlenstoffgehalt leicht erhöht (um 0,9%), was jedoch nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ). Der Stickstoffgehalt war aber auch in diesen Pflanzen signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Er war mit 3,8% fast doppelt so hoch als in den Kontrollpflanzen. Keine Auswirkungen auf den Kohlenstoff- sowie Stickstoffgehalt ergaben sich in den Pflanzen, welche nur die Gene PPT, stppc und Oac1 exprimierten. Somit zeigten die Pflanzen, welche die kompletten putativen C<sub>4</sub>-Zyklen exprimierten (6,5-14,2) ein deutlich niedrigeres C/N-Verhältnis als die Kontrollpflanzen (21,6), während es in den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen (20,7) beinahe unverändert war. Das niedrigere C/N-Verhältnis weist auf einen verstärkten Kohlenstoffverlust in den transgenen Pflanzen hin (4.3.4).

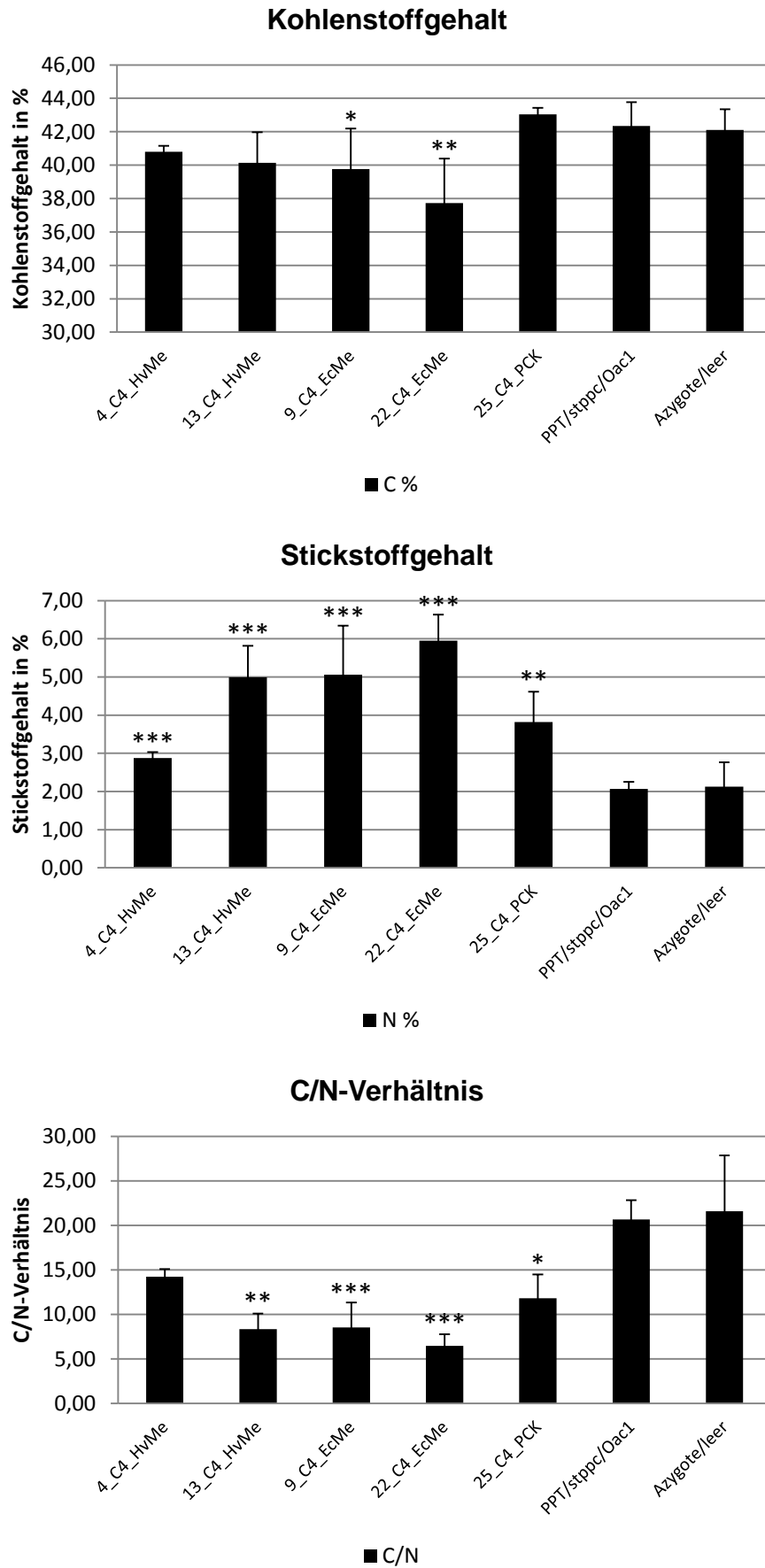


Abbildung 3.23: Prozentualer Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt sowie C/N-Verhältnis

Dargestellt sind der prozentuale Gehalt an Kohlenstoff und Stickstoff sowie das C/N-Verhältnis in etwa 4 Wochen alten C<sub>4</sub>\_HvMe-, C<sub>4</sub>\_EcMe-, C<sub>4</sub>\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation. Als Vergleich dienten azygote Pflanzen und Pflanzen mit Leerplasmid. Die Bestimmung erfolgte mithilfe eines Elementar-Analysators. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \*, \*\* und \*\*\* zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit p<0,05, p<0,01 und p<0,001.

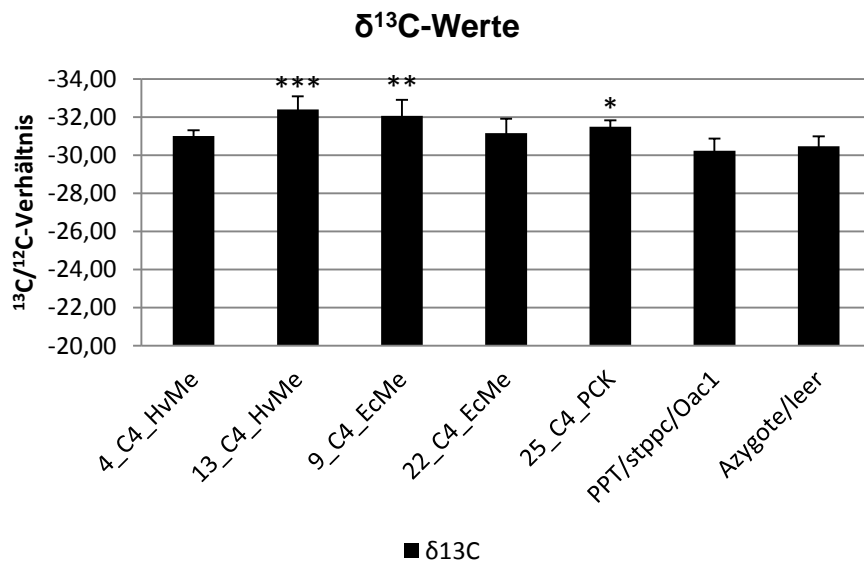
### 3.2.12 Kohlenstoff-Isotopen-Verhältnis

Pflanzen diskriminieren bei der CO<sub>2</sub>-Aufnahme gegen <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> aufgrund des unterschiedlichen Diffusionsvermögens von <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> und <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> sowie der Vorliebe der RUBISCO für <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> (Farquhar *et al.*, 1989). In C<sub>4</sub>-Pflanzen ist dieser Effekt durch deren CO<sub>2</sub>-Konzentrationsmechanismus weniger ausgeprägt. Die PEP-Carboxylase präferiert <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> weniger stark als RUBISCO. Durch die hohe interne CO<sub>2</sub>-Konzentration in den Bündelscheidenzellen kommt auch die Diskriminierung der RUBISCO nicht zum Tragen. Folglich können C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen anhand des Verhältnisses der Kohlenstoff-Isotope in ihrer Trockenmasse unterschieden werden (O'Leary, 1981). Die C<sub>3</sub>-Photosynthese führt zu δ<sup>13</sup>C-Werten von rund -28‰, die C<sub>4</sub>-Photosynthese zu δ<sup>13</sup>C-Werten von durchschnittlich -14‰ (Berechnung siehe 2.2.28). Die δ<sup>13</sup>C-Werte von C<sub>4</sub>-Arten sind also etwa 14‰ höher (weniger negativ) als die δ<sup>13</sup>C-Werte von C<sub>3</sub>-Arten.

Um zu untersuchen, ob die putativen C<sub>4</sub>-Zyklen einen Einfluss auf das Verhältnis der Kohlenstoff-Isotope in den Pflanzen haben, wurden deren δ<sup>13</sup>C-Werte bestimmt. Hierfür wurde das getrocknete Blattmaterial von je drei bis sechs Pflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe (3x), 13\_C4\_HvMe (4x), 9\_C4\_EcMe (6x), 22\_C4\_EcMe (4x), 25\_C4\_PCK (3x) sowie der Linien 11\_C4\_HvMe (3x) und 4\_C4\_EcMe (2x), welche beide nur die drei Gene PPT, stppc und Oac1 exprimierten, analysiert. Als Vergleich dienten zehn azygote Pflanzen (7x) bzw. Pflanzen mit Leerplasmid (3x). Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 4 Wochen alt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines an einen Elementar-Analysators gekoppelten Isotopenverhältnis-Massenspektrometers (IRMS). Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von der Gruppe um Prof. Dr. Andreas Weber am Institut für Biochemie der Pflanzen an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse der Isotopen-Analyse. Die durchschnittlichen δ<sup>13</sup>C-Werte waren in allen Pflanzen, welche die kompletten putativen C<sub>4</sub>-Zyklen exprimierten (-31,01 bis 32,40), niedriger (negativer) als in den Kontrollpflanzen (-30,47), wohingegen sie in den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen (-30,23) leicht höher (weni-

ger negativ) waren. Während die Erhöhung in den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen nicht signifikant war ( $p > 0,05$ ), war die Erniedrigung in den C4\_HvMe-, C4\_EcMe- und C4\_PCK-Pflanzen teilweise sogar signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Unterschiede waren mit maximal 1,9‰ allerdings ziemlich gering. Es ließ sich somit keine Verschiebung der CO<sub>2</sub>-Fixierung über den C<sub>3</sub>- zum C<sub>4</sub>-Weg erkennen.



**Abbildung 3.24: Kohlenstoff-Isotopen-Verhältnis**

Dargestellt sind die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von etwa 4 Wochen alten C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation. Als Vergleich dienten azygote Pflanzen und Pflanzen mit Leerplasmid. Die Bestimmung erfolgte mithilfe eines an einen Elementar-Analysator gekoppelten Isotopenverhältnis-Massenspektrometers. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \*, \*\* und \*\*\* zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

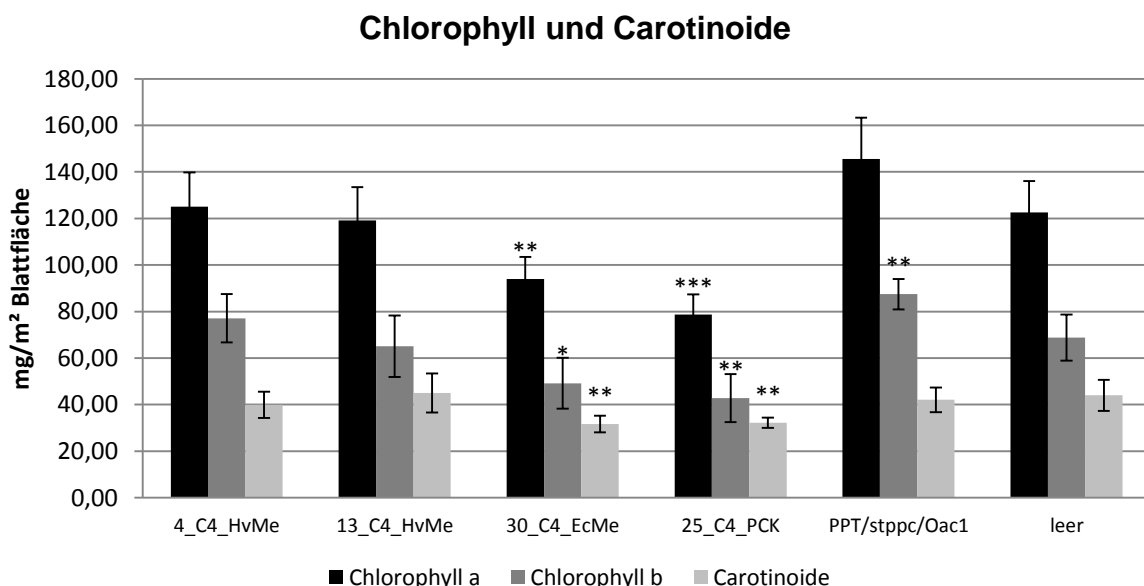
### 3.2.13 Bestimmung chloroplastidärer Pigmente

Die Chlorophyll-Biosynthese kann sowohl durch die Kohlenstoff- als auch die Stickstoffverfügbarkeit limitiert sein. Eine verbesserte Nettoassimilation oder die unter 3.2.11 gemessenen höheren Stickstoffgehalte könnten sich positiv auf dessen Synthese auswirken. Bei den nicht chlorotischen C4\_HvMe- sowie den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen könnte der Chlorophyllgehalt daher erhöht sein.

Die Bestimmung der chloroplastidären Pigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoide erfolgte wie unter 2.2.31 beschrieben. Es wurden je 6 Pflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe, 13\_C4\_HvMe, 30\_C4\_EcMe, 25\_C4\_PCK sowie der Linie 11\_C4\_HvMe, welche nur die drei Gene PPT, stppc und Oac1 exprimiert, analysiert. Als Kontrolle dienten 6 Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 5 Wochen alt. Die Pflanzen der



beiden C4\_HvMe-Linien wiesen alle keinen chlorotischen Phänotyp durch eine zu hohe HvMe-Expression auf. Das Transgen-Expressionsmuster in den Pflanzen der Linie 30\_C4\_EcMe war mit Linie 22\_C4\_EcMe vergleichbar, was sich auch in einem gleichen Phänotyp äußerte. Die Ergebnisse der Pigmente-Bestimmung sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Während die C4\_HvMe-Pflanzen keinen signifikant veränderten Pigmente-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigten ( $p > 0,05$ ), war der Chlorophyll b-Gehalt in den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Hingegen wiesen die chlorotischen C4\_EcMe- und C4-PCK-Pflanzen wie erwartet einen geringeren Pigment-Gehalt auf. Sowohl für Chlorophyll a als auch Chlorophyll b und Carotinoide waren die gemessenen Konzentrationen signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ). Die Abnahme des Chlorophyllgehaltes weist auf photooxidative Schäden in Folge von Photoinhibition hin (Powles, 1984).



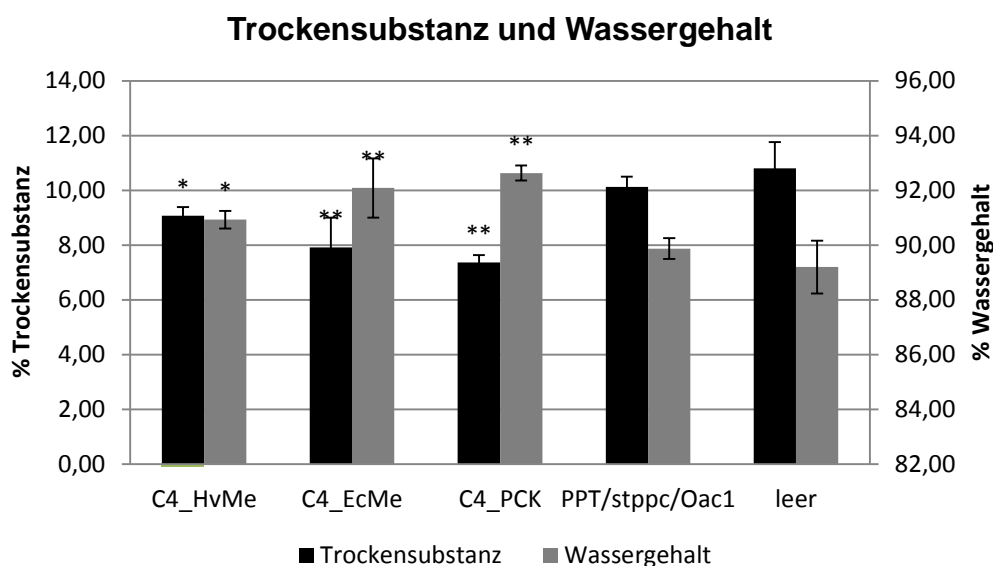
**Abbildung 3.25: Gehalt chloroplastidärer Pigmente**

Dargestellt sind die Gehalte der chloroplastidären Pigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoide in etwa 5 Wochen alten C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation. Als Vergleich dienten Pflanzen mit Leerplasmid. Jeder Datenpunkt basiert auf der Analyse von 6 Schwesterpflanzen. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \*, \*\* und \*\*\* zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

### 3.2.14 Bestimmung von Trockensubstanz und Wassergehalt

Die Expression der putativen C<sub>4</sub>-Zyklen könnte sich auf die Trockensubstanz bzw. den Wassergehalt der Pflanzen auswirken. Die Trockensubstanz ergibt sich aus dem Verhältnis von Trockengewicht zu Frischgewicht und wird in Prozent angegeben. Die Differenz entspricht dem Wassergehalt.

Es wurden je 6 Pflanzen der Linien 13\_C4\_HvMe, 30\_C4\_EcMe, 25\_C4\_PCK sowie 11\_C4\_HvMe (=PPT/stppc/Oac1) aus der T<sub>1</sub>-Generation analysiert. Die C4\_HvMe-Pflanzen wiesen alle keinen chlorotischen Phänotyp durch eine zu hohe HvMe-Expression auf. Das Transgen-Expressionsmuster in den Pflanzen der Linie 30\_C4\_EcMe war mit Linie 22\_C4\_EcMe vergleichbar. Als Kontrolle dienten 6 Pflanzen mit Leerplasmid. Die oberirdischen Teile der Pflanzen wurden in einem Alter von etwa 6 Wochen geerntet und für 2 Tage bei 100°C getrocknet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Trockensubstanz sowohl in den C4\_HvMe (p<0,05) als auch den C4\_EcMe (p<0,01) und den C4\_PCK-Pflanzen (p<0,01) signifikant gegenüber den Kontrollpflanzen erniedrigt war. Demzufolge war der Wassergehalt in diesen Pflanzen erhöht. Die größte Differenz zeigten dabei die C4\_PCK-Pflanzen mit einer Zunahme von 3,4%, gefolgt von den Pflanzen mit C4\_EcMe (+2,9%) und C4\_HvMe (+1,7%). Die Trockensubstanz in den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen war nur leicht verändert (-0,7%), aber nicht signifikant verändert (p>0,05).



**Abbildung 3.26: Trockensubstanz und Wassergehalt**

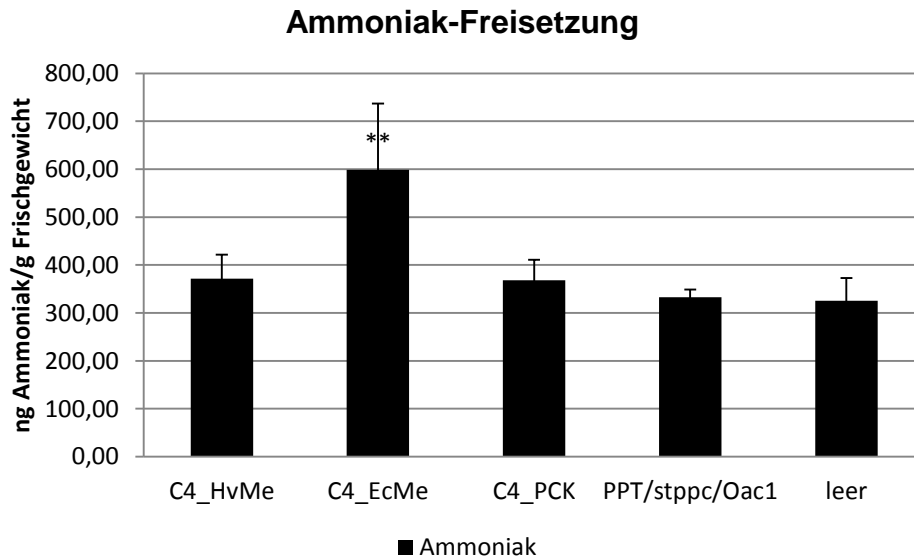
Dargestellt sind die Trockensubstanz sowie der Wassergehalt in etwa 6 Wochen alten C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation. Als Vergleich dienten Pflanzen mit Leerplasmid. Die Pflanzen wurden für 2 Tage bei 100°C getrocknet. Jeder Datenpunkt basiert auf der Analyse von 6 Schwesterpflanzen. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \* und \*\* zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit p<0,05 und p<0,01.

### 3.2.15 Bestimmung der Ammoniak-Freisetzung durch Photorespiration

Im Zuge der Photorespiration wird während der Umwandlung von Glycin zu Serin in den Mitochondrien Ammoniak freigesetzt. Dieses wird dann durch den GS-GOGAT-

Zyklus refixiert (siehe 1.1.2.1). Lacuesta *et al.* (1989), Tachibana *et al.* (1986) sowie Wild und Ziegler (1989) konnten zeigen, dass das Herbizid Phosphinothricin ein Glutamat-Analogon ist, welches die Glutamin-Synthetase irreversibel inhibiert. Infolgedessen reichert sich das freigesetzte Ammoniak im Blattgewebe an. Von De Block *et al.* (1995) wurde ein Assay entwickelt, welcher die quantitative Bestimmung des im Blattgewebe angesammelten Ammoniaks im Multiwell-Maßstab erlaubt. Der Test beruht darauf, dass Blattgewebe, welches in phosphinothricinhaltigem Medium inkubiert wird, Ammoniak nicht assimilieren kann. Das freigesetzte Ammoniak diffundiert daher in das umgebende Medium, wo es anschließend durch eine Farbreaktion photometrisch bestimmt werden kann. Höhere Ammoniakkonzentrationen im Medium bedeuten eine höhere Photorespiration und umgekehrt.

Daher wurde entschieden, die Ammoniak-Freisetzung aus dem pflanzlichen Blattgewebe zu messen. Es wurden je 6 Pflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe, 13\_C4\_HvMe, 30\_C4\_EcMe, 25\_C4\_PCK sowie 11\_C4\_HvMe (=PPT/stppc/Oac1) untersucht. Als Kontrolle dienten 6 Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 3 Wochen alt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Die Ammoniak-Freisetzung in den C4\_HvMe-, C4\_PCK- sowie den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen war leicht, aber nicht signifikant gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht ( $p > 0,05$ ). Hingegen war sie in den C4\_EcMe-Pflanzen durchschnittlich fast doppelt so hoch als in den Pflanzen mit Leerplasmid ( $p < 0,01$ ). Die putativen C<sub>4</sub>-Zyklen scheinen also keinen positiven Einfluss auf die Photorespiration zu haben, in den EcMe-Pflanzen hat sie sich sogar deutlich verstärkt.



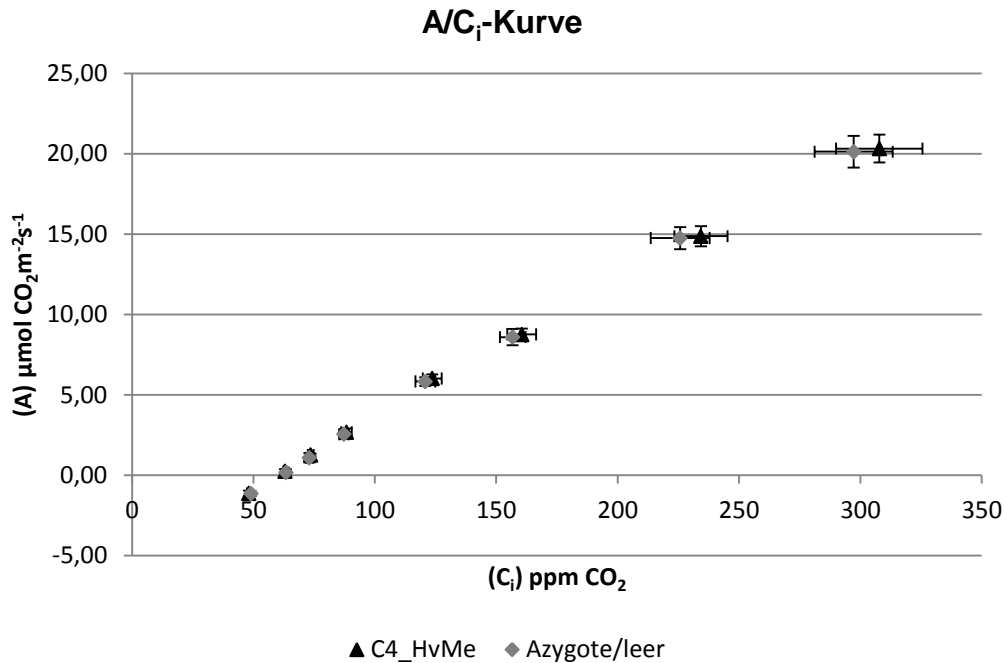
**Abbildung 3.27: Ammoniak-Freisetzung aus transgenen Pflanzen**

Dargestellt ist die Ammoniak-Freisetzung aus etwa 3 Wochen altem Blattgewebe von C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- und PPT/stppc/Oac1-Tabakpflanzen der T<sub>1</sub>-Generation. Als Vergleich dienen Pflanzen mit Leerplasmid. Die Menge an freigesetztem Ammonium wurde durch Inkubation von Blattscheiben (je 8 mg) in Phosphinothrisin-haltigem Medium gemessen. Die Datenpunkte zeigen die freigesetzte Ammoniak-Menge und basieren jeweils auf der Analyse von 6 Schwesterpflanzen. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \*\* zeigt den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit p<0,01.

### 3.2.16 Bestimmung des apparenten CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes

Der apparente CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt ( $\Gamma$ ) stellt einen wichtigen Parameter der photosynthetischen Leistung einer Pflanze dar. An diesem Punkt ist die CO<sub>2</sub>-Fixierung gleich groß wie die CO<sub>2</sub>-Freisetzung durch Photorespiration und Respiration. Man bestimmt ihn durch Messung der Photosyntheseraten (A) bei unterschiedlichen internen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (C<sub>i</sub>), wodurch sich eine sogenannte A/C<sub>i</sub>-Kurve ergibt. Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der X-Achse entspricht dann dem apparenten CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt.

Wie oben beschrieben wurden die A/C<sub>i</sub>-Kurven von C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen (Azygote und Pflanzen mit Leerplasmid) aus der T<sub>1</sub>-Generation bestimmt (Abbildung 3.28). Die chlorotischen C4\_EcMe- und C4\_PCK-Pflanzen wurden nicht untersucht, da hier keine Verbesserung hinsichtlich der Photosyntheseleistung zu erwarten war.



**Abbildung 3.28: A/C<sub>i</sub>-Kurven von C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen**

Dargestellt sind die A/C<sub>i</sub>-Kurven von 3-5 Wochen alten C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen (Azygote und Pflanzen mit Leerplasmid) bei einer Belichtung von 1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> und unterschiedlichen externen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (C<sub>a</sub>) von 400, 300, 200, 150, 100, 80, 65 und 45 ppm CO<sub>2</sub>. Die Datenpunkte repräsentieren die Assimilationsraten und basieren auf je 8 unabhängigen Messungen von 4 C4\_HvMe-Schwesterpflanzen bzw. zwei azygoten Pflanzen und zwei Pflanzen mit Leerplasmid. Die vertikalen und horizontalen Balken geben den Standardfehler an. A: Assimilationsrate; C<sub>i</sub>: interne CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Interzellulärräumen der Blätter.

Die aus den A/C<sub>i</sub>-Kurven berechneten apparenten CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkte sind in Tabelle 3.6 dargestellt. Der durchschnittliche CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt der C4\_HvMe-Pflanzen war etwas, aber nicht signifikant niedriger als derjenige der Kontrollpflanzen (-1,18 ppm CO<sub>2</sub>, p>0,05). Wie in Abbildung 3.28 ersichtlich waren auch bezüglich der Assimilationsraten sowie der internen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nur geringe Unterschiede bei den gegebenen externen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen messbar.

**Tabelle 3.6: Apparenter CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt von C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen**

Angegeben sind die apparenten CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkte, welche durch Messung von 3-5 Wochen alten C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen (Azygote und Pflanzen mit Leerplasmid) erhalten wurden.

Pflanze	apparenter CO <sub>2</sub> -Kompensationspunkt (Γ)
C4_HvMe	60,16 ± 1,32 ppm CO <sub>2</sub>
Azygote/leer	61,34 ± 2,29 ppm CO <sub>2</sub>

### 3.2.17 Bestimmung der O<sub>2</sub>-Inhibierung

Die Sauerstoffinhibierung stellt einen Parameter für das CO<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub> Verhältnis in der

Umgebung von RUBISCO dar und dient somit zur Analyse der Veränderung der Photorespiration und Photosynthese in den transgenen Pflanzen.

Wie bei der Messung des apparenten CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes wurden auch bei der Sauerstoffinhibierung nur C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen (azygote Pflanzen) aus der T<sub>1</sub>-Generation untersucht, da bei den chlorotischen C4\_EcMe- und C4\_PCK keine Verbesserung zu erwarten war. Es wurden je 8 unabhängige Messungen von 4 C4\_HvMe-Schwesterpflanzen bzw. 4 azygoten Pflanzen in einem Alter von 3-4 Wochen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Es war jedoch keine Reduktion der Sauerstoffinhibierung zu erkennen. Die C4\_HvMe-Pflanzen zeigten mit 29,21 ± 1,57% sogar eine leicht höhere Sauerstoffinhibierung als die Kontrollpflanzen mit 27,22 ± 1,23%. Der gemessene Unterschied (1,99%) war aber nicht signifikant (p>0,05).

**Tabelle 3.7: Sauerstoffinhibierung in C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen**

Angegeben ist die Sauerstoffinhibierung in 3-5 Wochen alten C4\_HvMe- und Kontrollpflanzen (azygote Pflanzen).

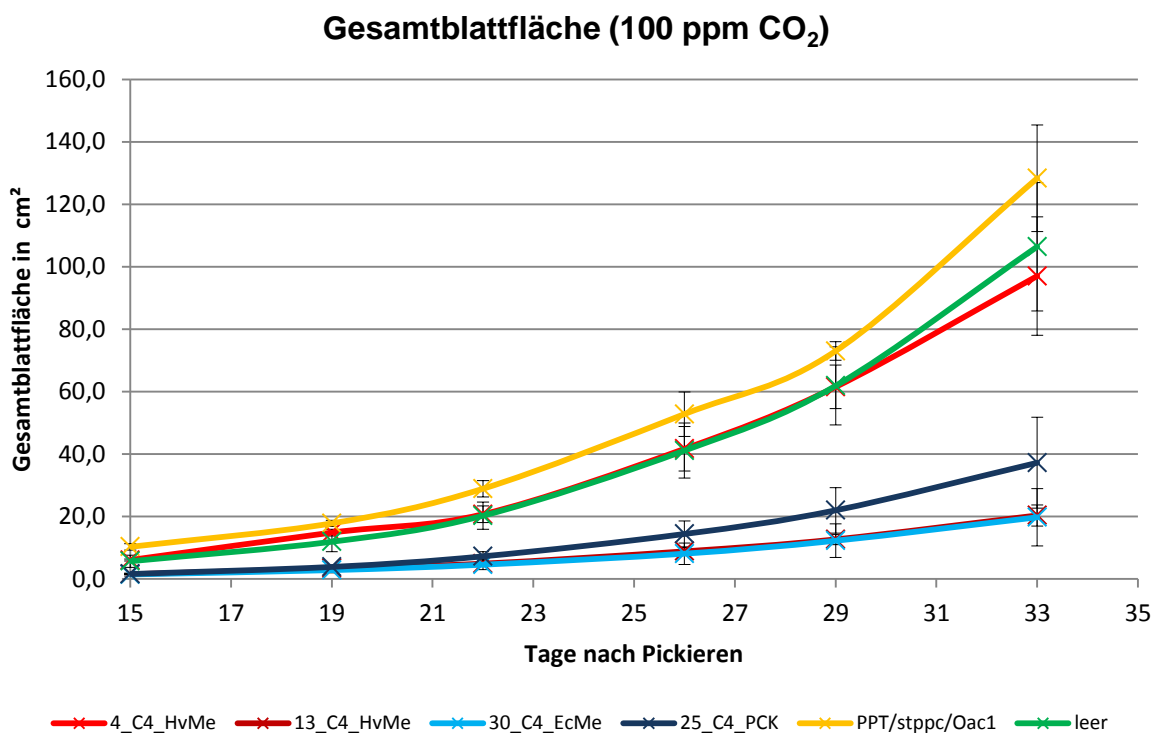
Pflanze	Sauerstoffinhibierung
C4_HvMe	29,21 ± 1,57%
Azygote	27,22 ± 1,23%

### 3.2.18 Wachstum unter niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen

C<sub>4</sub>-Pflanzen haben gegenüber C<sub>3</sub>-Pflanzen vor allem unter Bedingungen einen Wachstumsvorteil, welche das Auftreten der Photorespiration begünstigen. Um zu untersuchen, ob die eingebrachten putativen C<sub>4</sub>-Zyklen unter solchen Bedingungen einen Vorteil bringen, wurden die Pflanzen unter niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen angezogen.

Es wurden je 5 Pflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe, 13\_C4\_HvMe, 30\_C4\_EcMe, 25\_PCK sowie 11\_C4\_HvMe (=PPT/stppc/Oac1) in einer Klimakammer mit kontrollierter Gaszusammensetzung (100 ppm CO<sub>2</sub>) angezogen. Als Kontrolle dienten 5 Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und wurden eine Woche nach Aussaat in die Klimakammer gestellt. Nach einer weiteren Woche wurden sie in Töpfe (13x13x13 cm) mit etwa 2 l ED73-Erde pikiert. Zwei Wochen später wurden alle 3 bis 4 Tage die Gesamtblattflächen der Pflanzen bestimmt. Abbildung 3.29 zeigt die Zunahme der Gesamtblattflächen für einen Zeitraum von 18

Tagen. Anschließend waren die Pflanzen zu groß, so dass Selbstbeschattung das Ergebnis verfälscht hätte. Am schnellsten wuchsen die PPT/stppc/Oac1-Pflanzen gefolgt von den Kontrollpflanzen mit Leerplasmid. Berechnet auf Basis der absoluten Wachstumsrate (AGR: absolute growth rate), welche die Zunahme der Blattfläche in  $\text{cm}^2$  pro Tag bezeichnet, war der Unterschied jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Die C4\_HvMe-Pflanzen der Linie 4 mit niedriger HvMe-Expression (Transkriptabundanz von 5-10 relativ zu Actin2) wuchsen etwa gleich schnell wie die Kontrollpflanzen ( $p > 0,05$ ). Hingegen war das Wachstum der C4\_HvMe-Pflanzen der Linie 13 mit hoher HvMe-Expression (Transkriptabundanz von 20-30 relativ zu Actin2) signifikant langsamer ( $p < 0,01$ ) und war vergleichbar mit den EcMe-Pflanzen ( $p < 0,001$ ). Etwas schneller, aber ebenfalls signifikant langsamer als die Kontrollpflanzen, wuchsen die C4\_PCK Pflanzen ( $p < 0,05$ ). Die putativen C<sub>4</sub>-Zyklen verschafften den Pflanzen also auch unter diesen Bedingungen keinen Wachstumsvorteil.



**Abbildung 3.29: Wachstumskurven auf Basis der Gesamtblattfläche**

Dargestellt sind die Wachstumskurven von C4\_HvMe-, C4\_EcMe-, C4\_PCK- sowie PPT/stppc/Oac1-Pflanzen aus der T<sub>1</sub>-Generation, welche auf Basis der Gesamtblattflächen bestimmt wurden. Als Kontrollen dienten Pflanzen mit Leerplasmid. Jeder Datenpunkt basiert auf der Vermessung von 5 Schwesterpflanzen. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer mit kontrollierter Gaszusammensetzung (100 ppm CO<sub>2</sub>) angezogen. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an.

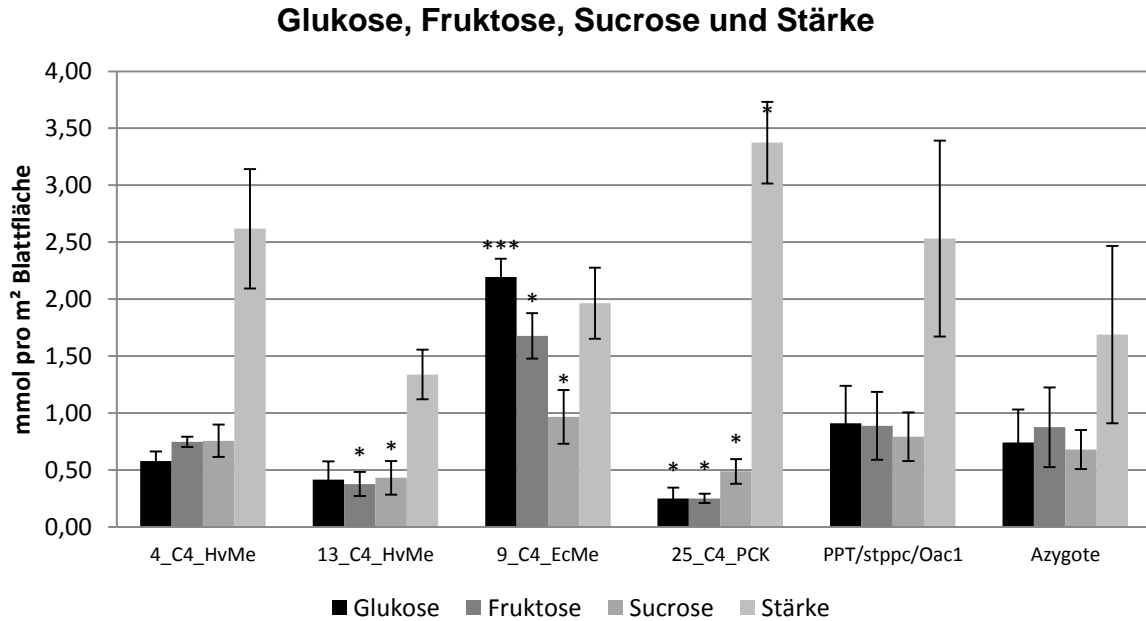
### 3.2.19 Veränderungen im Metabolismus

Um den Einfluss der putativen C<sub>4</sub>-Zyklen auf den Metabolismus zu untersuchen wurden ausgewählte Metabolite enzymatisch bestimmt. Außerdem wurde ein Metabolitprofil mittels Flüssigchromatographie mit anschließender Massenspektrometrie (LC-MS) erstellt.

#### 3.2.19.1 Bestimmung von Glukose, Fruktose, Sucrose und Stärke

Die Konzentrationen von Glukose, Fruktose, Sucrose und Stärke wurden bestimmt, da sie Endprodukte der Photosynthese darstellen. Die löslichen (Glukose, Fruktose, Sucrose) und unlöslichen Metabolite (Stärke) wurden wie unter 2.2.24.1 bzw. 2.2.24.3 extrahiert und enzymatisch quantifiziert (2.2.25). Dabei wurden je 6 Pflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe, 13\_C4\_HvMe, 9\_C4\_EcMe, 25\_PCK sowie 11\_C4\_HvMe (=PPT/stppc/Oac1) untersucht. Als Kontrollen dienten azygote Pflanzen aus diesen Linien. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 2,5 Wochen (nach Pikieren) alt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.30 dargestellt. Bei den C<sub>4</sub>\_HvMe-Pflanzen der Linie 4 sowie den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen konnten keine signifikanten Veränderungen der vier Metabolite im Vergleich zu den Kontrollpflanzen gemessen werden ( $p < 0,05$ ). Hingegen zeigten die 13\_C<sub>4</sub>\_HvMe-Pflanzen eine signifikante Reduktion der Fruktose- und Sucrose-Gehalte ( $p < 0,05$ ). Auch der Gehalt an Glukose und Stärke war niedriger ( $p > 0,05$ ). In den C<sub>4</sub>\_PCK-Pflanzen sind die Glukose-, Fruktose- und Sucrose-Konzentrationen ebenfalls geringer als in den Kontrollpflanzen ( $p < 0,05$ ), aber der Stärke-Gehalt ist signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Deutlich andere Werte ergaben sich für die C<sub>4</sub>\_EcMe-Pflanzen. Hier waren die Gehalte an Glukose, Fruktose und Sucrose signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ), während der Stärkegehalt kaum verändert war. Da der Umsatz dieser Metabolite in den Pflanzen sehr schnell abläuft unterliegen die Werte starken Schwankungen.





**Abbildung 3.30: Quantifizierung von Glukose, Fruktose, Sucrose und Stärke**

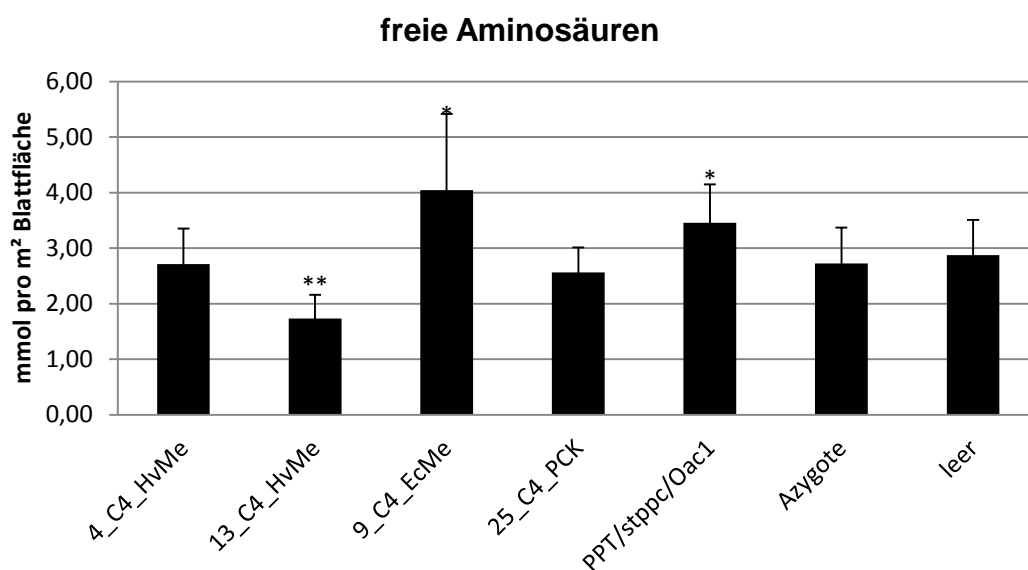
Dargestellt sind die Konzentrationen (in mmol pro m<sup>2</sup> Blattfläche) der Metabolite Glukose, Fruktose, Sucrose und Stärke in C<sub>4</sub>\_HvMe, C<sub>4</sub>\_EcMe, C<sub>4</sub>\_PCK sowie PPT/stppc/Oac1-Pflanzen. Als Vergleich dienten azygote Pflanzen. Jeder Datenpunkt basiert auf der Untersuchung von 6 Schwesterpflanzen. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \*, \*\* und \*\*\* zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit p<0,05, p<0,01 und p<0,001.

### 3.2.19.2 Bestimmung der freien Aminosäuren

In C<sub>3</sub>-Pflanzen führt die Überexpression fremder PEPCs, welche nicht der Regulation durch die wirtseigenen Kontrollmechanismen unterliegen, zu einer Umlenkung des Stoffwechsels in Richtung organischer Säuren und Aminosäuren (Miyao und Fukayama, 2003). Rademacher *et al.* (2002) konnten zeigen, dass transgene Kartoffelpflanzen mit modifizierter PEPC aus *S. tuberosum* (*stppc*) einen vierfach höheren Aminosäuregehalt aufwiesen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die PEPC-Reaktion gebildetes Oxalacetat eine wichtige Vorstufe für die Biosynthese von Aminosäuren darstellt. Nun sollte untersucht werden, ob auch Tabakpflanzen mit einem der putativen C<sub>4</sub>-Zyklen einen höheren Aminosäuregehalt haben.

Es wurden je 6 Pflanzen der Linien 4\_C<sub>4</sub>\_HvMe, 13\_C<sub>4</sub>\_HvMe, 9\_C<sub>4</sub>\_EcMe, 25\_PCK sowie 11\_C<sub>4</sub>\_HvMe (=PPT/stppc/Oac1) untersucht. Als Kontrollen dienten azygote Pflanzen aus diesen Linien und Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 3 Wochen (nach Pikieren) alt. Die Extraktion und der anschließende Nachweis der freien Aminosäuren wurden wie unter 2.2.24.1 bzw. 2.2.25.6 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse

sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Während die 4\_C4\_HvMe-Pflanzen keine Veränderung des Aminosäuregehaltes gegenüber den Kontrollpflanzen zeigten, ist er in den 13\_C4\_HvMe-Pflanzen im höherer Expression der Transgene signifikant reduziert ( $p < 0,01$ ). Hingegen wiesen die C4\_EcMe- sowie die PPT/stppc/Oac1-Pflanzen einen höheren Aminosäuregehalt als die Kontrollpflanzen auf ( $p < 0,05$ ). In den C4\_PCK-Pflanzen war die Konzentration vergleichbar mit den Kontrollpflanzen. In den C4\_HvMe- und den C4-PCK-Pflanzen scheint die Expression der anderen Enzyme der PEPC-bedingten Erhöhung der Aminosäurenkonzentration entgegenzuwirken.



**Abbildung 3.31: Quantifizierung der freien Aminosäuren**

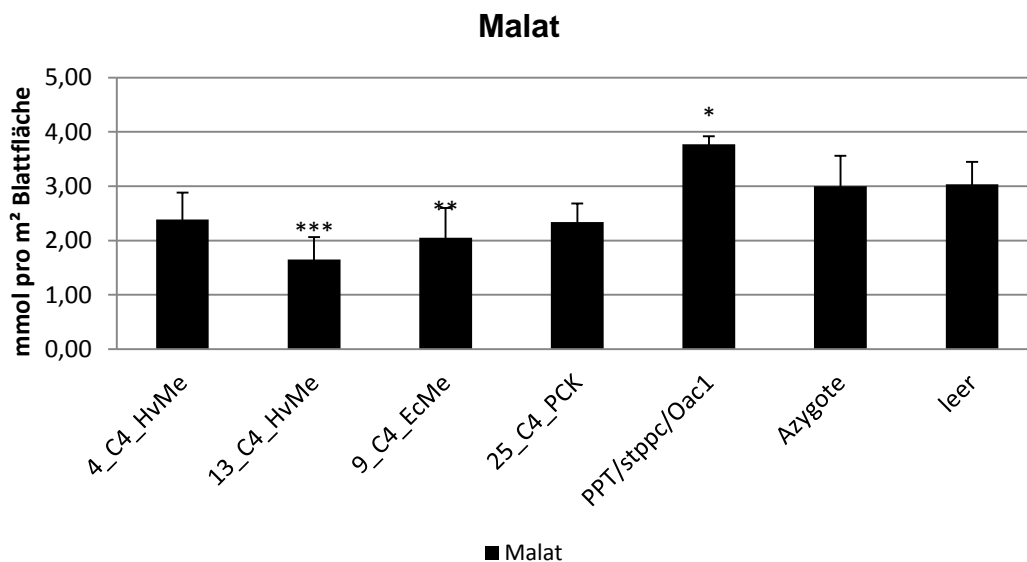
Dargestellt ist die Konzentration (in mmol pro m<sup>2</sup> Blattfläche) der freien Aminosäuren in C4\_HvMe, C4\_EcMe, C4\_PCK sowie PPT/stppc/Oac1-Pflanzen. Als Vergleich dienten azygote Pflanzen und Pflanzen mit Leerplasmid. Jeder Datenpunkt basiert auf der Untersuchung von 6 Schwesterpflanzen. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \* und \*\* zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ .

### 3.2.19.3 Bestimmung von Malat

Bei Rademacher *et al.* (2002) zeigten transgene Kartoffelpflanzen mit einer modifizierten PEPC aus *S. tuberosum* (*stppc*) einen bis zu vierfach höheren Malatgehalt als Wildtyppflanzen. Die zusätzliche Expression der decarboxylierenden Enzyme NADP-ME, NAD-Me und PCK in den putativen C<sub>4</sub>-Zyklen könnten wieder zu einer Reduktion der Malatkonzentration führen.

Es wurden je 6 Pflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe, 13\_C4\_HvMe, 9\_C4\_EcMe, 25\_PCK sowie 11\_C4\_HvMe (=PPT/stppc/Oac1) untersucht. Als Kontrollen dienten azygote Pflanzen aus diesen Linien und Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen

stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 3 Wochen (nach Pikieren) alt. Die Extraktion und die anschließende enzymatische Quantifizierung des Malats wurden wie unter 2.2.24.1 bzw. 2.2.25.4 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.32 dargestellt. Die C4\_HvMe-, C4\_EcMe- und C4\_PCK-Pflanzen zeigten wie erwartet einen niedrigeren Malatgehalt als die Kontrollpflanzen. Signifikant war die Reduktion jedoch nur für die Linien 13\_C4\_HvMe ( $p < 0,001$ ) und 9\_C4\_EcMe ( $p < 0,01$ ). Hingegen wurden in den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen erwartungsgemäß höhere Malatkonzentrationen gemessen ( $p < 0,05$ ). Die zusätzlichen Decarboxylasen scheinen tatsächlich niedrigere Malatkonzentration zu bewirken.



**Abbildung 3.32: Quantifizierung von Malat**

Dargestellt ist die Malat-Konzentration (in mmol pro m<sup>2</sup> Blattfläche) in C4\_HvMe, C4\_EcMe, C4\_PCK sowie PPT/stppc/Oac1-Pflanzen. Als Vergleich dienten azygote Pflanzen und Pflanzen mit Leerplasmid. Jeder Datenpunkt basiert auf der Untersuchung von 6 Schwesterpflanzen. Die vertikalen Balken geben den Standardfehler an. \*, \*\* und \*\*\* zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .

### 3.2.19.4 Metabolitprofil mittels LC-MS

Um den Einfluss der putativen C<sub>4</sub>-Zyklen auf den Metabolismus der Pflanzen zu untersuchen, wurde ein Metabolit-Profil mittels LC-MS aufgenommen (Tabelle 3.8). Hiermit sollten auch eventuelle Veränderungen im NADPH/NADP-Verhältnis (siehe 3.2.10) festgestellt werden. Verglichen wurden 4\_C4\_HvMe-, 30\_C4\_EcMe- sowie 25\_C4\_PCK-Pflanzen mit Pflanzen mit Leerplasmid. Alle Pflanzen stammten aus der T<sub>1</sub>-Generation und waren bei Probennahme etwa 6 Wochen (nach Pikieren) alt. Analysiert wurden vor allem die Metabolite aus Citrat- und Calvin-Zyklus. Zudem wurden

der Energieträger ATP (ADP, AMP) sowie die Reduktionsäquivalente NADP und NAD untersucht.

Diese Messungen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Marco Oldiges am Institut für Bio- und Geowissenschaften am Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

**Tabelle 3.8: Identifizierte Substanzen in der LC-MS**

Dargestellt sind die Ergebnisse der LC-MS-Analyse von 6 Wochen alten C4\_HvMe-, C4\_EcMe- und C4\_PCK-Pflanzen aus der T<sub>1</sub>-Generation. Als Vergleich dienten Pflanzen mit Leerplasmid. Jeder Datenpunkt basiert auf mindestens vier unabhängigen Replikaten. MW: Mittelwert, SF: Standardfehler. <sup>a</sup>, <sup>b</sup> und <sup>c</sup> zeigen den Grad der Abweichung von den Kontrollpflanzen mit p<0,05, p<0,01 und p<0,001.

Substanz (µmol/m <sup>2</sup> )	C4_HvMe		C4_EcMe		C4_PCK		leer	
	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF
Glucose-6-P	54,10 <sup>a</sup>	5,80	31,58	2,76	38,32	3,63	40,76	7,58
Fructose-6-P	19,61	1,74	10,42	1,85	16,67	2,45	16,95	4,77
Fructose-1,6-bis-P	7,78	3,03	6,70	0,80	7,99	3,24	13,12	6,08
Dihydroxyaceton-P	24,93	5,78	18,49 <sup>a</sup>	2,05	22,20	5,39	32,73	8,64
Glycerinaldehyd-3-P	9,53	2,07	7,15 <sup>a</sup>	0,76	8,01 <sup>a</sup>	2,07	12,46	3,17
2-/3-P-Glycerat	234,45	22,81	72,86 <sup>c</sup>	13,82	123,00 <sup>a</sup>	48,55	210,22	50,89
Phosphoenolpyruvat	13,73	0,88	9,39 <sup>b</sup>	2,41	12,06	3,05	15,19	2,67
Pyruvat	55,07 <sup>c</sup>	4,92	21,72	4,68	24,56	4,84	21,47	5,84
Ribose-5-P	2,20	0,29	0,87 <sup>b</sup>	0,18	1,22 <sup>a</sup>	0,10	2,49	0,75
Ribulose-/Xylulose-5-P	5,80	2,35	2,75 <sup>a</sup>	0,88	2,71 <sup>a</sup>	0,43	5,11	1,69
Sedoheptulose-7-P	14,32 <sup>a</sup>	4,54	2,58 <sup>a</sup>	0,44	9,44	1,37	7,93	3,51
cis-Aconitat	10,34 <sup>a</sup>	2,05	9,95	3,67	5,57	3,09	6,52	1,92
Isocitrat	24,58	7,11	41,32 <sup>a</sup>	2,11	27,96	4,63	29,42	7,46
2-Oxoglutarat	101,67 <sup>c</sup>	7,76	73,04	12,57	125,29 <sup>b</sup>	36,28	55,40	16,23
Succinat	66,52 <sup>c</sup>	14,90	41,42 <sup>b</sup>	17,37	71,45 <sup>c</sup>	20,13	16,97	5,07
AMP	1,74	0,33	3,03	0,86	2,44	0,80	2,42	0,56
ADP	9,06	1,76	7,72	1,66	8,93	0,74	8,13	1,25
ATP	14,95	3,07	10,63 <sup>a</sup>	1,55	13,21	5,22	16,48	4,66
NAD	3,79	0,44	1,68 <sup>a</sup>	0,61	1,72 <sup>a</sup>	0,73	3,82	1,36
NADP	7,74 <sup>b</sup>	0,69	4,07 <sup>c</sup>	0,67	5,77 <sup>c</sup>	1,72	10,30	1,32

Es zeigte sich, dass die gemessenen Metabolite des Calvin-Zyklus in den C4\_EcMe- sowie den C4\_PCK-Pflanzen fast ausnahmslos geringer konzentriert waren als in den Kontrollpflanzen mit Leerplasmid. So waren zum Beispiel die Gehalte an 2/3-Phosphoglycerat um durchschnittlich 65 bzw. 31% reduziert (p<0,001 bzw. p<0,05) und die Konzentration an Ribulose-/Xylulose-5-P nur halb so groß (p<0,05). Bei den

C4\_HvMe-Pflanzen konnte lediglich für eine Substanz ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Gehalt an Sedoheptulose-7-Phosphat lag hier mit  $14,32 \pm 4,54 \mu\text{mol/m}^2$  sogar um den Faktor 1,8 höher ( $p < 0,05$ ). Bei den untersuchten Metaboliten des Citrat-Zyklus war in den C4\_HvMe-, C4\_EcMe- und C4\_PCK-Pflanzen eine deutliche Konzentrationserhöhung gegenüber den Kontrollpflanzen erkennbar. Besonders deutlich waren die Unterschiede im Succinat- und 2-Oxoglutarat-Gehalt, welche in diesen Pflanzen um den Faktor 2,4 bis 4,2 bzw. 1,3 bis 2,7 gesteigert waren. Auffällig war außerdem ein höherer Pyruvat-Gehalt in den C4\_HvMe-Pflanzen ( $p < 0,001$ ) sowie ein niedrigerer PEP-Gehalt in den EcMe-Pflanzen ( $p < 0,01$ ). Das Verhältnis von NADPH zu NADP konnte nicht bestimmt werden, da die NADPH-Konzentration unter der Nachweisgrenze lag. Allerdings ließ sich für alle drei Typen eine signifikante Reduktion des NADP-Gehaltes erkennen ( $p < 0,01$ ). In den C4\_EcMe- sowie C4\_PCK-Pflanzen war zudem der NAD-Gehalt niedriger ( $p < 0,05$ ). Bezüglich der ATP-, ADP- und AMP-Gehalte ergab sich lediglich für ATP in den C4\_EcMe-Pflanzen eine signifikante Veränderung ( $p < 0,05$ ). Die ATP-Konzentration war hier um durchschnittlich 35% niedriger als in den Kontrollpflanzen.

### 3.2.20 Erhöhung der PEPC-Aktivität

In den meisten Tabakpflanzen konnte maximal eine Verdopplung der PEPC-Aktivität erreicht werden. Auch die Expression auf RNA-Ebene lag in den meisten Fällen maximal doppelt so hoch wie die des endogenen Actin2-Gens. Dies ist vermutlich auf Co-Suppression bzw. HdGS (homology-dependent gene silencing) zurückzuführen (Meyer und Saedler, 1996), da eine signifikante Unterdrückung der endogenen PEPC-Expression beobachtet wurde (siehe 3.2.10). Durch zwei verschiedene Ansätze sollte daher versucht werden die PEPC-Expression bzw. Aktivität zu erhöhen. Zum einen wurde das *stppc*-Gen unter die Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors gestellt, da mit diesem Konstrukt in Kartoffeln die höchsten Aktivitäten erreicht wurden (Dissertation Thomas Rademacher, Institut für Biologie I, RWTH Aachen, 2002). Zum anderen wurde das PEPC-Gen aus *H. verticillata* (*hvppc*) verwendet, weil es mit 73% eine deutlich geringere Homologie zum endogenen PEPC-Gen (*ntppc*) zeigt als *stppc* (87%). Laut Literatur liegt die Grenze, über der HdGS auftreten kann, in einem Bereich von etwa 80% (Thierry und Vaucheret, 1996). Das *hvppc*-Gen wurde unter

Kontrolle des AtRbcS-Promotors gestellt, da für HvMe und EcMe sehr gute Expressionsraten mit diesem Promotor erreicht wurden.

Die beiden Plasmide pTRAK\_35S\_stppc sowie pTRAK\_AtRbcS\_hvppc wurden wie unter 2.1.8.7 beschrieben kloniert. Als Kontrolle wurde zudem der Leervektor pTRAK\_leer ohne Expressionskassette konstruiert. Im Gegensatz zu den pYLTA7-Vektoren (HygR) enthielten alle drei Plasmide ein Resistenzgen (*nptii*) gegen Kanamycin als pflanzlichen Selektionsmarker. Daher konnte nach Transformation der transgenen Tabakpflanzen, welche bereits die pYLTA7-Plasmide mit den verschiedenen putativen C<sub>4</sub>-Zyklen enthielten, gezielt auf diese Plasmide selektiert werden.

Tabakpflanzen der Linien 4\_C4\_HvMe, 13\_C4\_HvMe, 22\_C4\_EcMe sowie 25\_C4\_PCK (T<sub>1</sub>-Generation) wurden mit den Plasmiden pTRAK\_35S\_stppc bzw. pTRAK\_leer transformiert. Mit dem Vektor pTRAK\_AtRbcS\_hvppc wurden Tabakpflanzen der Linien 4\_4\_C4\_HvMe, 17\_9\_C4\_EcMe, 29\_25\_C4\_PCK sowie 31\_17\_leer (T<sub>2</sub>-Generation) transformiert. Dabei fand jeweils der Agrobakterienstamm GV3101 Verwendung. Während für die erste Transformation sterile Blätter verwendet wurden (2.2.18), wurde die zweite Transformation durch Spritzeninfiltration in nicht sterile Pflanzen durchgeführt (2.2.19) und die transformierten Blätter anschließend sterilisiert. Zur Sterilisation wurden die Blätter kurz in 70% EtHO getaucht und dann für 5 min in 0,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Blätter 5-mal in sterilem Wasser gewaschen. Die weiteren Schritte der Transformation bzw. Regeneration der transgenen Pflanzen erfolgten wie unter 2.2.18 beschrieben.

Die durch Transformation des Plasmides pTRAK\_35S\_stppc erhaltenen Pflanzen wurden durch Real-Time-PCR auf ihre stppc-Expression bzw. mittels Enzymtest auf ihre PEPC-Aktivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass das 35S\_stppc-Konstrukt nur in wenigen Pflanzen zu einer etwas höheren stppc-Expression führte als in den Elternpflanzen. Die höchste Expression zeigte die Pflanze 46\_4\_C4\_HvMe+35S\_stppc mit einer Transkriptabundanz von 4,6 relativ zu Actin2. In den meisten Pflanzen lag die stppc-Transkriptabundanz (0,5 bis 2 relativ zu Actin2) in einem vergleichbaren Bereich wie mit CmRbcS\_stppc alleine. Auch die gemessenen PEPC-Enzymaktivitäten lagen auf einem ähnlichen Niveau (relative Aktivitäten von 0,5 bis 2). Die höchste relative PEPC-Aktivität zeigte ebenfalls Pflanze 46\_4\_C4\_HvMe+35S\_stppc mit 3,9 im Vergleich zu Pflanzen mit Leerplasmid. Im

Gegensatz zu den zuvor gefundenen Pflanzen mit hoher *stppc*-Expression bzw. PEPC-Aktivität (siehe 3.2.7 bzw. 3.2.8) war diese Pflanze nicht chlorotisch, da sie nur eine geringe HvMe-Aktivität besaß (relative Aktivität von 2,3). In einigen Fällen schien es zu Silencing-Effekten durch die zusätzliche *stppc*-Expression zu kommen. So zeigten einige Pflanzen deutlich niedrigere PEPC-Aktivitäten als Kontrollpflanzen mit Leerplasmid (relative Aktivitäten von 0,1-0,5).

Auch mit dem *hvppc*-Konstrukt gelang es nicht die PEPC-Aktivität zu erhöhen. Sowohl die *hvppc*-Expression als auch die PEPC-Aktivität waren vergleichbar mit den *stppc*-Pflanzen. Die höchste gemessene relative PEPC-Aktivität lag bei 2,0 in Pflanze 13 aus der Transformation von Pflanze 31\_17\_leer mit dem *hvppc*-Plasmid.

### **3.3 Transgener chloroplastidärer photorespiratorischer Bypass**

Im zweiten Ansatz zur Optimierung der CO<sub>2</sub>-Fixierung sollte die CO<sub>2</sub>-Freisetzung, welche im Zuge der Photorespiration auftritt, in die Chloroplasten verlagert werden. Durch Einbringen des Glykolat-Weges aus *E. coli* sollte ein photorespiratorische Bypass geschaffen werden, welcher den „normalen“ photorespiratorischen Weg umgeht (1.1.6.1.3). In Arabidopsis führte dies bereits zu vielversprechende Ergebnissen (Ke-

beish *et al.*, 2007). Nun sollte gezeigt werden, dass sich diese Ergebnisse auch auf die Kulturpflanze Reis übertragen lassen. Die Herstellung des hierfür benötigten MultiRound-Gateway-Technologie.

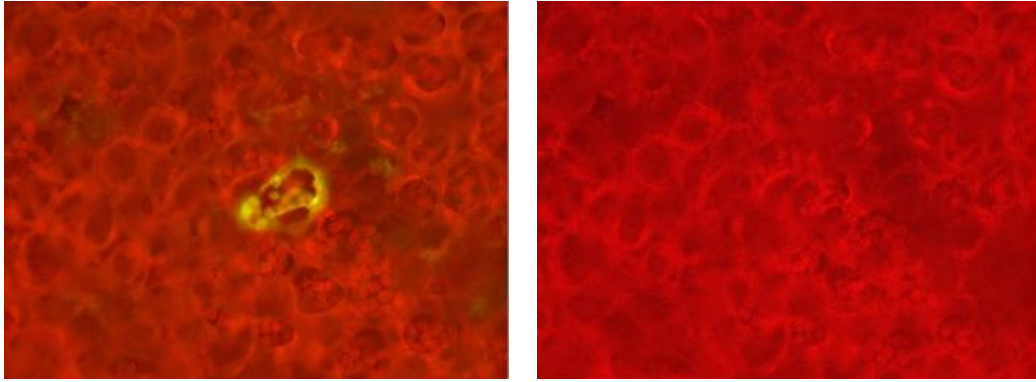
### 3.3.1 Test der Promotoren und Transitpeptide aus *Z. mays*

Um die Funktion der verschiedenen Promotoren und Transitpeptide zu testen, welche zur Expression des Glykolat-Weges aus *E. coli* in Reis-Chloroplasten verwendet werden sollten, wurden eGFP-Fusionsproteine mit den Transitpeptiden hergestellt. Diese wurden dann durch Particle Bombardment transient in *Lemna minor* L. exprimiert. *L. minor* L. gehört wie Mais und Reis zu den monokotylen Pflanzen, besitzt aber den Vorteil, dass sie als submerse Pflanze auch in der Epidermis Chloroplasten enthält. Dies erleichtert die Lokalisationsanalyse, da durch Particle Bombardment überwiegend die äußerste Zellschicht getroffen wird. Außerdem liegen dann bei der anschließenden mikroskopischen Untersuchung keine störenden Zellschichten über den transformierten Zellen.

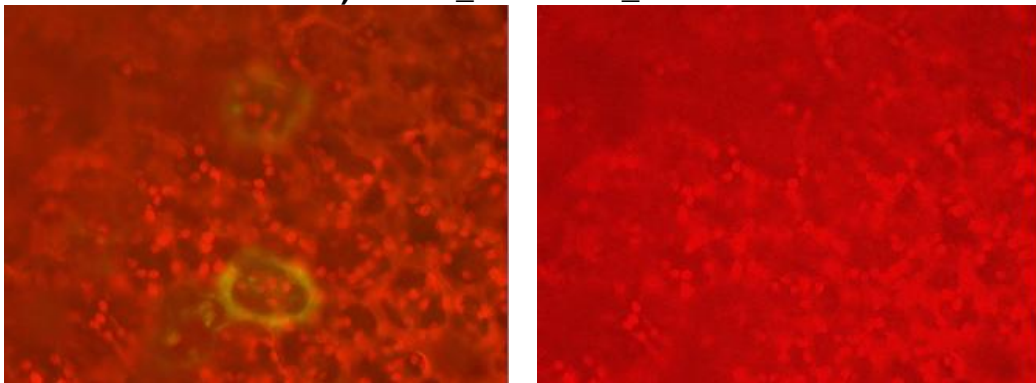
Die Ergebnisse für die verschiedenen Konstrukte sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Es zeigte sich, dass bis auf den PPDK-Promotor alle Promotoren zu einer deutlichen eGFP-Expression in den Zellen führten. Während die Transitpeptide von GAPDH und RbcS auch eine Lokalisation des eGFP in die Chloroplasten bewirkten, konnte das Cab7-Transitpeptid diese Aufgabe nicht bewerkstelligen. Sowohl unter Kontrolle des PEPC- als auch des Ubiquitin-Promotors war das eGFP im Cytosol lokalisiert. Als Kontrollen dienten Konstrukte mit 35S-Promotor mit und ohne Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. tuberosum* (StRbcS-cTP).

#### 1) GAPDH\_eGFP

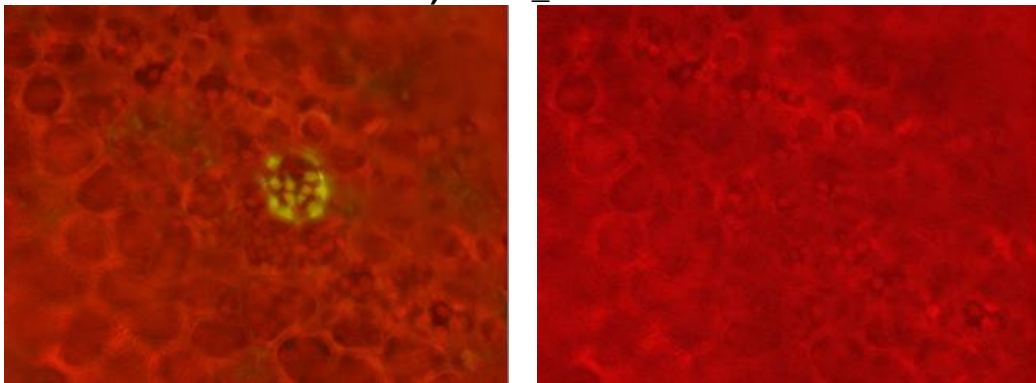




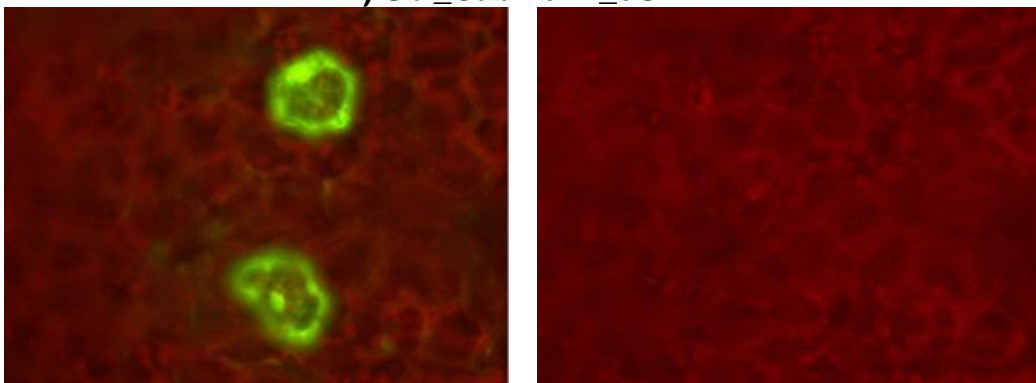
2) PEPC\_Cab7-cTP\_eGFP

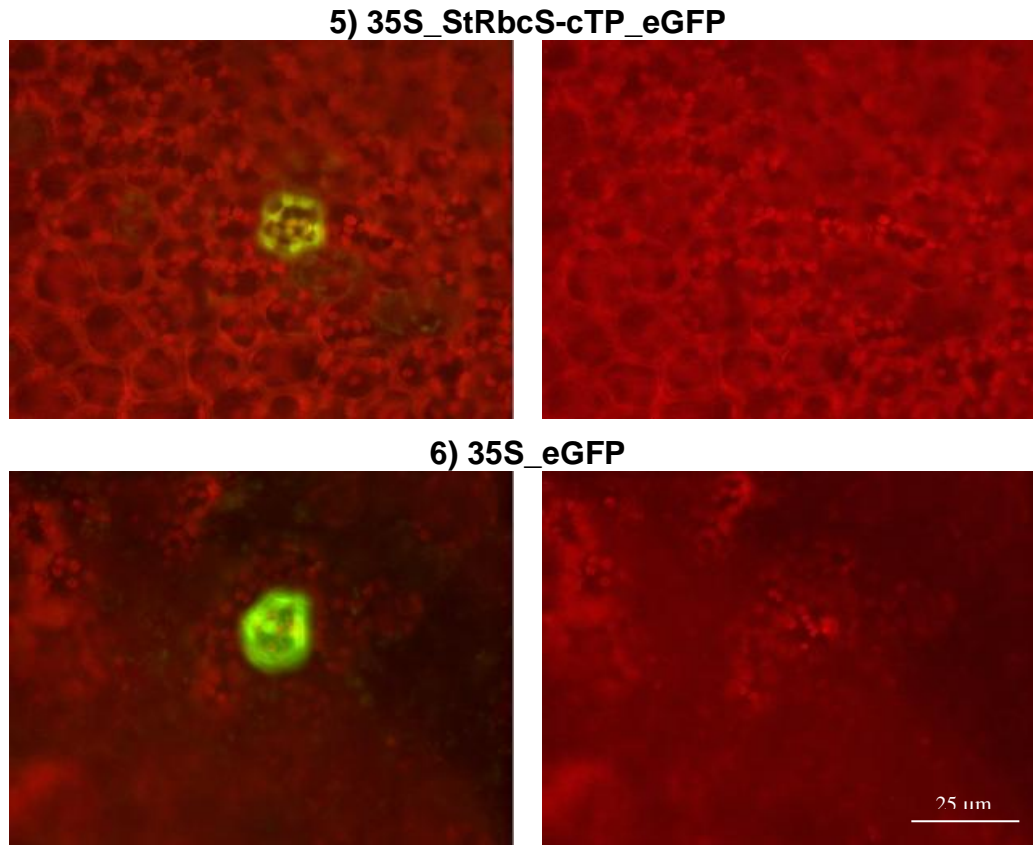


3) RbcS\_eGFP



4) Ubi\_Cab7-cTP\_eGFP





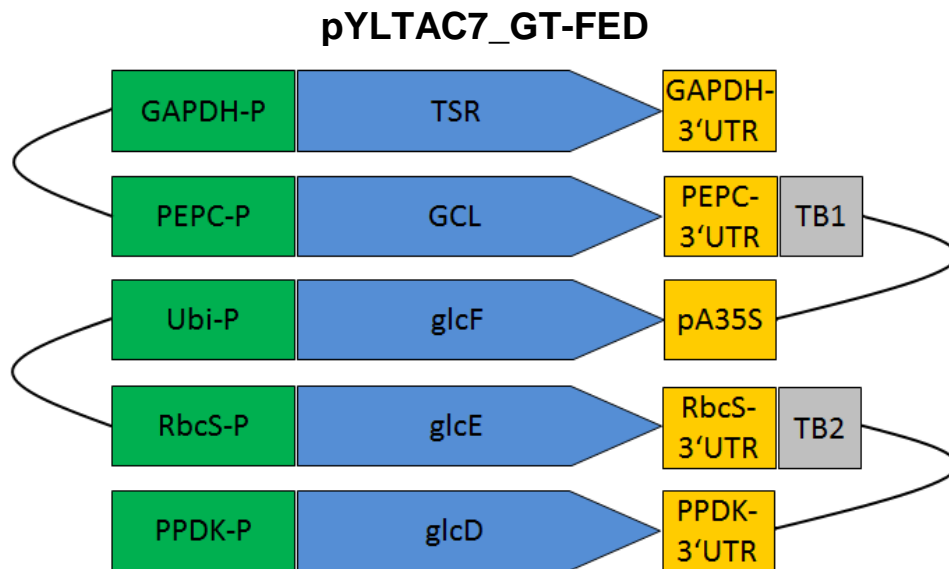
**Abbildung 3.33: Überprüfung der Monocot-Promotoren und Transitpeptide aus *Z. mays***

Dargestellt sind die Ergebnisse der Funktionstests der verschiedenen Monocot-Promotoren und Transitpeptide aus *Z. mays*. Fusionsproteine aus den Transitpeptiden und eGFP wurden unter die Kontrolle der verschiedenen Promotoren gestellt und transient in *Lemna minor* L. exprimiert. Die Bilder zeigen jeweils zwei verschiedene Aufsicht-Fluoreszenz-Aufnahmen. Für die ersten Bilder wurde ein GFP-Filter (I3 513808, Leica, Wetzlar) verwendet, welcher neben dem GFP-Signal auch die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten zeigt. Für die zweiten Aufnahmen wurde ein RFP-Filter (N2.1 513812, Leica, Wetzlar) verwendet, welcher ebenfalls die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten zeigt, jedoch das GFP-Signal herausfiltert. (1) und (3) zeigen die Ergebnisse für die Promotoren der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sowie der kleinen Untereinheit von RUBISCO (RbcS) jeweils inklusive zugehörigem Transitpeptid. (2) und (4) zeigen die Ergebnisse für die Promotoren der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) sowie von Ubiquitin (Ubi) jeweils mit dem Transitpeptid des Chlorophyll-a/b-Bindeproteins 7 (Cab7). Als Kontrollen dienten Konstrukte mit 35S-Promotor mit (5) und ohne (6) Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *S. tuberosum* (StRbcS-cTP).

### 3.3.2 Konstruktion des Destination-Plasmids

Das Plasmid pYLTA7\_GT-FED wurde durch MultiRound-Gateway-Rekombination der unter 2.1.8.9 beschriebenen Entry-Vektoren in den Destination-Vektor pYLTA7\_R12\_CmR\_ccdB\_SAR erhalten. Bei der Konstruktion der Entry-Vektoren wurde die Orientierung der Expressionskassetten auch hier so gewählt, dass nach der Rekombination zwei aufeinanderfolgende Kassetten entweder voneinander weglaufen oder durch einen Transkriptionsblocker getrennt sind. Um mögliche Silencing-Effekte zu vermeiden, wurden die Gene, welche für den Glykolat-Weg codieren, un-

ter die Kontrolle verschiedener Promotoren kloniert. Außerdem wurden unterschiedliche 3'UTR-Bereiche verwendet, welche die Terminations-/Polyadenylierungssignale enthalten. Die Zuordnung der Promotoren und 3'UTR-Bereiche zu den einzelnen Genen sowie deren Anordnung im fertigen Vektor pYLTA7\_GT-FED zeigt Abbildung 3.34.

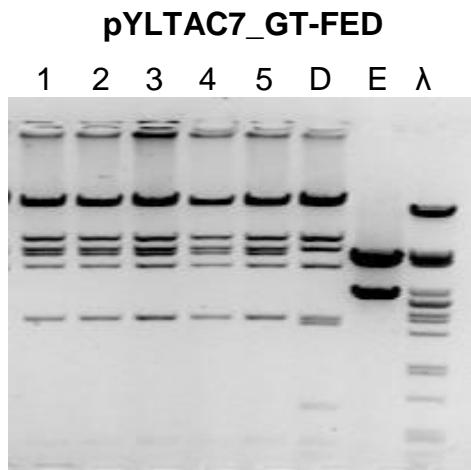


**Abbildung 3.34: Anordnung der Genexpressionskassetten im Destination-Vektor mit Glykolat-Weg aus *E. coli***

Dargestellt ist die Anordnung der Genexpressionskassetten im Destination-Vektor pYLTA7\_C4\_FED. Dabei sind die verwendeten Promotoren in grün, die Gene in blau und die Terminations-/Polyadenylierungsregionen in gelb gekennzeichnet.

TB1/2: AT-reiche Sequenzen aus Lambdaphage als Transkriptions-Blocker; TSR: Tartronat-Semialdehyd-Reduktase aus *E. coli*; GCL: Glyoxylat-Carboligase aus *E. coli*; GlcD, GlcE und GlcF: Untereinheiten der Glykolat-Dehydrogenase aus *E. coli*; GAPDH-P und GAPDH-3'UTR: Promotor und 3'UTR der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Z. mays*; PEPC-P und PEPC-3'UTR: Promotor und 3'UTR der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *Z. mays*; PPDK-P und PPDK-3'UTR: Promotor und 3'UTR der Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase aus *Z. mays*; RbcS-P und RbcS-3'UTR: Promotor und 3'UTR der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus *Z. mays*; Ubi-P: Ubiquitin-Promotor aus *Z. mays*; pA35S: Polyadenylierungs-/Terminationssequenz des Cauliflower-Mosaik-Virus.

Der Erfolg der Rekombinationen wurde nach jeder Runde durch Restriktionsverdau bestätigt. Abbildung 3.35 zeigt die Ergebnisse des Restriktionsverdaus des Destination-Plasmids nach der letzten Rekombinationsrunde. Dabei zeigten alle Klone das erwartete Bandenmuster (Tabelle 3.9).



**Abbildung 3.35: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide mit Glykolat-Weg aus *E. coli* nach der 5. Rekombinationsrunde**

Dargestellt ist die Auftrennung der Kontrollverdaue der Destination-Plasmide mit dem Glykolat-Weg aus *E. coli* nach der 5. Rekombinationsrunde in einem 0,6%igen Agarosegel. Die Spuren 1-5 zeigen 5 Klone nach der Rekombination. Die erwarteten Fragmentgrößen sind Tabelle x zu entnehmen. D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor; λ: Lambda-Marker.

**Tabelle 3.9: Kontrollverdaue der fertigen Destination-Plasmide mit dem Glykolat-Weg aus *E. coli***

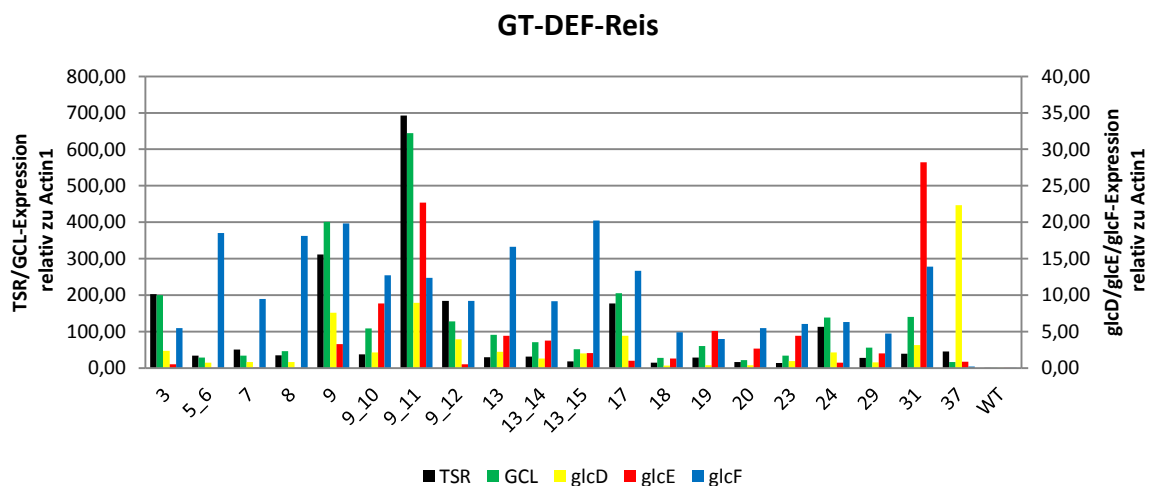
Angegeben sind das verwendete Enzym und die daraus resultierenden Fragmentgrößen. rekD: rekombinierter Destination-Vektor; D: Destination-Vektor vor Rekombination; E: Entry-Vektor.

pYLTA7_GT-FED ( <i>Bam</i> HI)		
rekD	D	E
46758	42854	7564
22019	21940	4795
6460	6460	2769
5196	5196	
4720	3931	
3931	2014	
2014	1893	
2005	703	
413	413	
	304	

### 3.3.3 Stabile Expression der GT-DEF-Gene in Reis

Die Transformation der GT-DEF-Gene (pYLTA7\_GT-FED) in Reis (*Oryza sativa*) wurde durch Dawei Yuan (Department of Plant Production and Forestry Science, University of Lleida) mittels Particle Bombardment durchgeführt. Nach Regeneration

der Pflanzen wurde mit Hilfe der Northern Blot-Methode eine Vorauswahl der Transformanten getroffen. Anschließend wurde mittels Real Time-PCR die Transgenexpression in diesen Pflanzen genauer untersucht. Hierfür wurde die RNA wie unter 2.2.1.4 beschrieben isoliert und in cDNA-umgeschrieben (2.2.4). Abbildung 3.36 zeigt die Ergebnisse der Real Time-PCR für einige Pflanzen. Die Expression der verschiedenen Transgene wurde dabei mit Hilfe des endogenen Actin1-Transkriptes normalisiert. Es zeigte sich, dass die Expressionsraten der Transgene sehr heterogen war. Während die durchschnittlichen Expressionsraten für TSR bei  $61,0 \pm 60,82$ , GCL  $81,1 \pm 57,85$ , glcD  $2,4 \pm 2,3$  (PPDK-P), glcE  $2,9 \pm 2,2$  (RbcS-P) und glcF  $10,5 \pm 5,81$  (Ubi-P) lagen, waren die maximalen 692,4 für TSR, 644,26 für GCL, 22,35 für glcD, 28,2 für glcE und 20,2 für glcF. Die Expressionen von TSR und GCL waren also viel höher als die der drei anderen Gene. Es konnten auch einige Pflanzen gefunden werden, welche alle 5 Gene exprimierten. Gute Expressionsraten zeigten die Linien 9, 13 und 31.



**Abbildung 3.36: Transgen-Expressionslevel in Reispflanzen der T<sub>0</sub>-Generation**

Dargestellt sind die durch Real-Time-PCR auf RNA-Ebene bestimmten Expressionslevel der Transgene TSR, GCL, glcD, glcE und glcF in den Reispflanzen, welche mit dem Gateway-Plasmid pYLAC7\_GT-FED transformiert wurden. Die Werte sind relativ zum Expressionslevel des endogenen Actin1-Gens angegeben. TSR: Tartronat-Semialdehyd-Reduktase; GCL: Glyoxylat-Carboligase; glcD, glcE und glcF: Untereinheiten der Glykolat-Dehydrogenase.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einbringen multipler Gene in Pflanzen

Der Großteil der agronomischen Eigenschaften inklusive Ertragsmerkmalen, metabolischen Wegen, Signalwegen und Signaltransduktionen wird durch Polygene kontrolliert. Eine genetische Manipulation solcher polygener Züge erfordert das Einbringen multipler Transgene in das pflanzliche Genom. Beispiele hierfür sind der goldene Reis (Ye *et al.*, 2000), die violetten Tomaten (Butelli *et al.*, 2008) oder der rote Mais (Zhu *et al.*, 2008). Mehrere Methoden wie Cotransformation (Chen *et al.*, 1998, Zhu *et al.*, 2008), Retransformation (Li *et al.*, 2003) und Kreuzung (Zhao *et al.*, 2003) können für die Übertragung multipler Transgene in Pflanzen verwendet werden. Die Integration multipler Gene durch Retransformation oder Kreuzung ist jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwändig. Außerdem wird für jede Runde ein anderer Selektionsmarker benötigt. Bessere Möglichkeiten bietet hier die Cotransformation durch Cobombardment mehrerer Plasmide. Mit dieser Methode können zahlreiche Gene gleichzeitig unter Verwendung nur eines Selektionsmarkers transformiert werden (Francois *et al.*, 2002). So wurde von Chen *et al.* (1998) die Integration von bis zu 13 verschiedenen Plasmiden bzw. Transgenen in Reis demonstriert. Die Integration erfolgt an einer oder wenigen Stellen, da die Stelle der ersten Integration vermutlich ein „hot spot“ für weitere Insertionsereignisse bildet (Kohli *et al.*, 1998). Neben der Integration multipler Kopien kommt es oft zur Fragmentierung, Umordnung und Deletion (Register *et al.*, 1994; Pawlowski und Somers, 1998). Die Zahl der Kopien liegt meist zwischen 1 und 10, bei vielen verschiedenen Plasmiden eher im unteren Bereich (Cooley *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998). Mit der Cobombardment-Methode ist es bei vielen Plasmiden fast unmöglich Linien zu erhalten, die jedes Transgen in genau einer Kopie tragen. Multiple Kopien sind unerwünscht, da vermutlich ein Zusammenhang zwischen einer ansteigenden Zahl an Genkopien und Transgen-Silencing besteht (Jorgensen, 1991; Cooley *et al.*, 1995; Komari *et al.*, 1998; Finer *et al.*, 1999). Bei mehreren Integrationsstellen kommt es zudem zu einer unabhängigen Segregation der Transgene.

Deutliche Vorteile bietet hier die Übertragung mehrerer Transgene auf einem Konstrukt. So kann bei Verwendung eines binären Vektors neben der biolistischen auch eine Agrobakterien-vermittelte Transformation durchgeführt werden. Außerdem er-

höht sich die Wahrscheinlichkeit Linien mit nur einer Kopie bzw. einem Integrationslocus zu erhalten. Wenn die gewünschten Gene zufällig in einem zusammenhängenden DNA-Segment im Ursprungsorganismus vorliegen sind keine besonderen Assembly-Techniken notwendig. In den meisten Fällen jedoch sind die für einen bestimmten Stoffwechselweg erforderlichen Gene über das Genom verteilt. Sollen diese Gene oder Gene verschiedener Organismen zusammen als ein Konstrukt transformiert werden, müssen sie zuvor zusammengesetzt werden. Bisher existieren hierfür nur wenige effektive und vielseitige Methoden.

Ein bedeutender Nachteil der konventionellen Klonierung von großen DNA-Konstrukten ist das häufige Vorkommen der Erkennungsstellen von Typ-II-Restriktionsenzymen in den DNA-Sequenzen. Daher ist die Verwendung dieser Enzyme beim Zusammenfügen mehrerer Genexpressionskassetten limitiert oder manchmal sogar unmöglich. Eine Möglichkeit diese Probleme zu umgehen, bietet die von Chen *et al.* (2006) entwickelte und im Rahmen dieser Arbeit optimierte MultiRound-Gateway-Methode. Die Gateway-Klonierung ist eine flexibel und vielseitig einsetzbare Methode, welche zudem eine hohe Effizienz bietet (Hartley *et al.*, 2000). Eine bedeutende Einschränkung ist jedoch, dass nur eine Rekombinationsrunde durchgeführt werden kann. Erst die Einführung des MultiSite-Gateway-Systems, welches die gleichzeitige Klonierung mehrerer Fragmente in definierter Reihenfolge und Orientierung erlaubt, konnte diese Begrenzung umgehen (Sasaki *et al.*, 2004; Cheo *et al.* 2004). Jedoch basiert auch diese Technologie immer noch auf einer Rekombinationsrunde und kann nicht für mehrere Runden verwendet werden. Zudem müssten mehr unterschiedliche Attachment-Sites entwickelt werden, wenn mehr als vier Fragmente in einen Zielvektor rekombiniert werden sollen. Die MultiRound-Gateway-Methode lässt sich hingegen für mehrere Rekombinationsrunden verwenden, um multiple Fragmente in einer definierten Reihenfolge und Orientierung in einen Zielvektor zu rekombinieren. Bis zu 7 Expressionskassetten konnten erfolgreich rekombiniert (3.1.3) und mittels Agrobakterien in Tabak transformiert werden (3.2.5). Ein Multigen-Konstrukt mit 5 Expressionskassetten konnte durch biolistische Transformation in Reis übertragen werden (3.3.3). Im Prinzip kann die Prozedur unendlich oft wiederholt werden, in der Praxis wird sie jedoch durch die Klonierungskapazität des Destination-Vektors begrenzt. Der hier konstruierte Gateway-kompatible TAC-Vektor (transformation competent artificial chromosome) (3.1.2) besitzt eine Klonierungskapa-

pazität von mehr als 100 kb (Liu *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2003). Bei einer durchschnittlichen Größe der hier verwendeten Expressionskassetten von etwa 4 kb ließen sich also mehr als 25 Rekombinationsrunden durchführen.

Eine andere Möglichkeit zur Konstruktion von Multigen-Konstrukten wurde bereits einige Jahre zuvor von Lin *et al.* (2003) vorgestellt. Die Methode basiert auf dem Cre/*loxP*-Rekombinationssystem sowie der Einführung von Homing-Endonukleasen (PI-Scel und I-Scel). Als Akzeptor dient ein TAC-basierter binärer Vektor (pYLTA747), dessen T-DNA-Region mit einer *loxP*- und einer Scel-Site versehen wurde. Die Donor-Vektoren (pYLVS und pYLSV) enthalten ebenfalls eine *loxP*-Site sowie eine Multiple Cloning Site (MCS), welche von den Erkennungssequenzen der beiden Homing-Endonukleasen PI-Scel und I-Scel flankiert wird. Die Konstruktion des Multigen-Vektors beginnt mit der Rekombination eines pYLVS-Donor-Vektors mit pYLTA747 und resultiert im Einbau des kompletten Donor-Plasmids in die T-DNA-Region. Das unerwünschte Rückgrat des Plasmids sowie die überzählige *loxP*-Site werden durch I-Scel-Verdau aus dem rekombinierten Plasmid entfernt. Da die beiden asymmetrischen I-Scel-Sites in dem Cointegrat in umgekehrter Orientierung angeordnet sind, sind die Enden nicht komplementär und die Plasmidzirkularisierung erfordert die Zuhilfenahme eines kompatiblen Linkers (LS). Danach wird die resultierende Verbindungsstelle nicht länger durch das Enzym erkannt. Zurück bleibt das rekombinierte Plasmid mit der ursprünglichen *loxP*- und einer neuen PI-Scel-Site. Diese Sites können nun für eine neue Runde aus Rekombination und Verdau mit dem zweiten Donor-Vektor (pYLSV) verwendet werden. Durch Abwechseln der beiden Donor-Vektoren konnten die Autoren in acht Rekombinationsrunden einen binären Vektor zusammensetzen, welcher 10 fremde oder funktionelle DNA-Sequenzen enthielt und mittels Agrobakterien erfolgreich in Reis übertragen werden konnte. Allerdings ist dieses System aufgrund der notwendigen Entfernung der zweiten *loxP*-Site und des Rückgrates des Donor-Plasmids sowie der anschließenden Rezirkularisierung des Vektors ziemlich zeitaufwändig. Erschwert wird diese Nachbehandlung des Vektors zudem durch die niedrige Kopiezahl des TAC-Vektors. Hingegen verbleiben bei der MultiRound-Gateway-Methode weder überzählige Rekombinationssites noch Vektor-Rückgrate nach der Rekombination im Zielvektor. Eine Entfernung dieser Nebenprodukte entfällt daher.



Besonders zeitsparend ist es, wenn Transfer sowie homologe Rekombination *in vivo* in *E. coli* durchgeführt werden (Muyrers *et al.*, 2001; Warming *et al.* 2005; Li und Elledge, 2005). Allerdings ist diese Strategie nicht für Konstrukte mit wiederholten Sequenzen geeignet, da DNA-Sequenzen zwischen diesen Wiederholungen durch homologe Rekombination deletiert werden können. Kürzlich wurde aber von Chen *et al.* (2010) eine als MISSA (multiple round *in vivo* site-specific assembly) bezeichnete Technik entwickelt, welche auf eine Kombination aus Cre/*loxP*- und Rekombinationssystem des Lambdaphagen setzt und ein Zusammenfügen von DNA-Sequenzen *in vivo* erlaubt. Es basiert auf einem conjugationalen Transfer, welcher durch Donor-Stämme getrieben wird, und zwei *in vivo*-Rekombinationsereignissen, welche durch die Cre-Rekombinase und die ortsspezifischen  $\lambda$ -Rekombinationsproteine in Empfänger-Stämmen vermittelt werden. Die Donor-Stämme tragen die notwendigen *in trans*-wirkenden Faktoren (Pir = Replikationsinitiationsprotein und Tra = conjugationale Transferproteine) für die Replikation und den conjugationalen Transfer der suicidalen Donor-Vektoren. Die Donor-Vektoren sind suicidal, da sie den konditionalen oriR6Ky-Replikationsursprung besitzen, welcher für die Replikation das Pir-Protein benötigt. Außerdem enthalten die Donor-Vektoren neben einem oriT (origin of transfer) eine *loxP*- sowie zwei attL- (attL1 und attL2 in pL-Reihe) bzw. attR-Sites (attR1 und attR2 in pR-Reihe), welche das zu integrierende Fragment flankieren. Hingegen können die Empfängerstämme die Cre-Rekombinase und die  $\lambda$ -Rekombinationsproteine (Int, Xis, IHF) gezielt exprimieren und sie enthalten einen Empfängervektor, welcher eine *loxP*- sowie eine attR2-Site trägt. Wenn die Donor- und Empfänger-Stämme gemischt werden, wird der Donor-Vektor in den Empfängerstamm übertragen. Anschließend kommt es zur ortsspezifischen Rekombination zwischen den Donor- und Empfängervektoren. Jede Runde der *in vivo* ortsspezifischen Rekombination beinhaltet zwei Rekombinationsereignisse: Zuerst integriert der Donor-Vektor durch Cre/*loxP*-vermittelte Rekombination in den Empfänger-Vektor, dann wird das Backbone des Donor-Vektors durch Rekombination zwischen den Lambda-Sites entfernt. Für die erste MISSA-Runde wird ein Donor-Vektor der pL-Reihe verwendet. Nach Integration in die *loxP*-Site findet die ortsspezifische Rekombination zwischen attL2 und attR2 statt. Die zweite MISSA-Runde mit einem Donor-Vektor der pR-Reihe läuft ähnlich ab wie die erste, nur dass die zweite Rekombination zwischen attL1 und attR2 stattfindet. Da in jeder Runde neue Rekombinationssites (attL1 bzw.

attR2) in den Zielvektor mit eingeführt werden, kann die Prozedur theoretisch unendlich oft wiederholt werden. Praktisch wird sie wie bei der MultiRound-Gateway-Methode durch die Klonierungskapazität des Empfängervektors begrenzt. Bisher ist MISSA das einzige System, welches Transfer und Zusammensetzen von multiplen Genen in vivo ermöglicht. Sobald die gewünschten Gene in die Donor-Stämme eingebracht sind, müssen die Bakterienstämme zur Rekombination nur noch gemischt und zur Selektion ausgestrichen werden. Diese Eigenschaft bedeutet einen geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand für die einzelnen Rekombinationsrunden gegenüber der MultiRound-Gateway-Methode. Ein weiterer Vorteil der MISSA-Methode ist die Kompatibilität der Donor-Vektoren zur BP-Gateway-Klonierung, was bei den MultiRound-Gateway-Vektoren nicht gegeben ist. Die maximale Klonierungs-Effizienz der MISSA-Methode lag allerdings bei maximal 80%. Bei der MultiRound-Gateway-Methode wurden fast 100% richtige Klone erhalten (3.1.3). Die wenigen falschen Klone waren auf Cotransformationen von Donor- und Destinationvektor zurückzuführen. Diese ließen sich durch Linearisierung der Donor-Vektoren aber fast vollständig eliminieren.

Ein Nachteil der auf der ortsspezifischen Rekombination basierenden Klonierungstechnologien ist, dass sie zusätzliche Sequenzen im Zielvektor hinterlassen. Eine als „Golden Gate“-Klonierung bezeichnete Strategie, welche dieses Manko umgeht, wurde von Engler *et al.* (2008) entwickelt. Sie basiert auf der Verwendung von Typ-II-Restriktionsenzymen, welche außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden (z.B. *BsaI*) sowie einer gleichzeitigen Durchführung von Restriktionsverdau und Ligation. Bei richtigem Design der Schnittstellen können zwei Fragmente, welche mit solchen Enzymen geschnitten wurden, ligiert werden, ohne dass das Produkt noch die ursprüngliche Erkennungssequenz enthält. Alle anderen Ligationsprodukte, welche die ursprünglichen Schnittstellen enthalten, werden erneut geschnitten. Ihre Komponenten stehen dadurch für die weitere Ligation wieder zur Verfügung. Mit andauernder Inkubationszeit führt dies zu einer zunehmenden Menge des gewünschten Produkts. Da die Sequenz der vier überhängenden Nukleotide an den Fragmentenden beliebig gewählt werden kann, können auch mehrere Fragmente auf einmal in definierter Orientierung in einen Zielvektor kloniert werden. Um die zu ligierenden Fragmente mit flankierenden Schnittstellen auszustatten, werden diese durch PCR amplifiziert und anschließend in verschiedene Entry-Vektoren kloniert. Interne Schnittstellen des En-

zyms können ebenfalls durch PCR entfernt werden. Der Zielvektor besitzt zwei zu den Entryklonen kompatible Schnittstellen, welche ein lacZ-Alpha-Fragment flankieren, sowie einen zu den Entryvektoren unterschiedlichen Antibiotikaresistenzmarker. Dies erlaubt eine gezielte Selektion auf rekombinierte Zielvektoren. Neben der Eigenschaft keine zusätzlichen Sequenzen im Zielvektor zu hinterlassen liegt der Vorteil dieser Methode darin, dass mehrere Fragmente auf einmal ligiert werden können. Allerdings können im Gegensatz zur MultiRound-Gateway-Methode anschließend keine weiteren Fragmente mehr hinzugefügt werden. Zudem ist fraglich, ob die Methode auch bei großen Fragmenten noch effizient abläuft, da die Ligationseffizienz mit zunehmender Plasmidgröße abnimmt. Für die Konstruktion der Expressionskassetten in den Donor-Vektoren könnte die Methode aber sehr hilfreich sein. Eine entsprechende Modifikation der Donor-Vektoren wäre leicht möglich. Es müsste lediglich ein lacZ-Alphafragment in die Multiple Cloning Site eingebracht werden, welches von entsprechenden Schnittstellen flankiert wird. Bei Verwendung von *Bsal* müsste außerdem die interne Schnittstelle im *bla*-Gen entfernt werden.

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass die MultiRound-Gateway-Methode eine gute Wahl zur Herstellung von Multigen-Konstrukten ist. Sie ist zwar etwas zeitaufwändiger als die MISSA-Methode, dafür liegt die Effizienz fast 20% höher. Auch die zahlreichen homologen Regionen (z.B. gleiche Promotoren) stellten kein Problem dar. Für die Konstruktion der Donor-Vektoren wäre die Verwendung der „Golden Gate“- (Engler *et al.*, 2008) oder der „In Phusion“-Klonierung (Zhu *et al.*, 2007) sinnvoll.

## **4.2 Design der MultiRound-Gateway-Vektoren bzw. der Multigen-Konstrukte**

### **4.2.1 Entry- und Destinationvektoren**

Theoretisch kann die MultiRound-Gateway-Rekombination unendlich oft wiederholt werden. Praktisch wird sie durch die Klonierungskapazität des Destination-Vektors begrenzt. Um eine hohe Klonierungskapazität zu gewährleisten, wurde ein Gateway-kompatibler TAC-Vektor konstruiert. In dieser Arbeit wurden sieben Expressionskassetten mit einer Gesamtlänge von etwa 26 kb zwischen den beiden Border-Sequenzen des TAC-Vektors integriert (3.1.3). Dies entspricht jedoch nicht der maximalen Kapazität des Destinationvektors. Der TAC-Vektor leitet sich vom P1-

Bakteriophagen-Klonierungssystem ab, welches DNA-Fragmente von bis zu 100 kb akzeptiert (Sternberg, 1990). So konnten Liu *et al.* (1999) bis zu 80 kb genomischer Arabidopsis-DNA in den Vektor integrieren und mit hoher Effizienz retransformieren. Eine noch höhere Klonierungskapazität ließe sich mit einem Destination-Vektor erzielen, welcher auf dem BIBAC-Vektor (binary bacterial artificial chromosome) basiert. Der BIBAC-Vektor stammt von künstlichen Bakterienchromosomen ab, welche DNA-Fragmente von mehr als 300 kb aufnehmen können (Shizuya *et al.*, 1992). Humane genomische DNA-Fragmente von bis zu 150 kb konnten von Hamilton *et al.* (1996) in einen BIBAC-Vektor integriert und mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in Tabak übertragen werden. Vermutlich könnte die Klonierungskapazität der beiden Vektor-Systeme aber nicht vollständig ausgenutzt werden. Sofern nicht für jedes Gen unterschiedliche Promotoren, 5'-UTR, 3'-UTR und Terminationsregionen zur Verfügung stehen, könnten die wiederholten Sequenzen zu einer Instabilität des Vektors durch homologe Rekombination führen. In den konstruierten pYL7AC7-Plasmiden C4\_HvMe und C4\_EcMe wurde mangels Alternativen dreimal der 35S-, zweimal der CmRbcS-Promotor sowie mehrmals die gleichen Terminationsregionen verwendet. Während die Plasmide in *E. coli* zu jeder Zeit stabil waren, schienen sie in Agrobakterien teilweise instabil zu sein (3.2.3), obwohl mit AGL1 ein *recA*-defizienter Stamm verwendet wurde. Zur homologen Rekombination kann es aber auch im Verlauf des Transformationsprozesses in Agrobakterien kommen. Eventuell käme es bei einem Transfer durch Konjugation seltener zu Sequenzverlusten als durch die verwendete Elektroporation. Hierfür müsste der Destinationvektor mit einem *oriT* ausgestattet werden, an welchem der Transfer initiiert wird. Außerdem müsste ein *E. coli*-Stamm verwendet werden, welcher die in trans wirkenden Faktoren für den Transfer exprimiert. Ein Transfer durch Konjugation hätte auf jeden Fall den Vorteil, dass die zeitaufwändige Herstellung kompetenter Agrobakterien entfallen würde. Wenn es zu Sequenzverlusten kommt, müssen aber noch andere Faktoren als die homologe Rekombination in Agrobakterien in Betracht gezogen werden. Dieses Phänomen kann auch durch homologe Rekombination in den Pflanzen oder während des Integrationsprozesses der T-DNA auftreten. Die beobachteten Effizienzen für den Transfer der Multigen-Konstrukte in Pflanzen (30% für Konstrukte mit 7 Genen (3.2.5), 40% für 5 Gene (3.2.5) und 80% für 3 Gene (Daten nicht gezeigt) auf Basis der RNA-

Expression) repräsentieren daher nicht die optimale Situation. Bei Vermeidung homologer Sequenzen kann eine deutlich höhere Effizienz erwartet werden.

Während die beiden single copy origins P1 und pRiA4b eine hohe Stabilität des Destination-Plasmids in *E. coli* bzw. *A. tumefaciens* gewährleisten, erlaubt das mit IPTG induzierbare lytische P1-Replikon höhere Kopiezahlen. Nach Sternberg und Cohen (1989) nimmt die Plasmidmenge proportional zur IPTG-Konzentration zu. Bei der eingesetzten Konzentration von 160 µM IPTG entspricht dies einer Kopiezahl von 6 bis 7. Nach Induktion der Plasmid-Vermehrung über diesen Replikationsursprung liefert daher bereits eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab genug DNA-Material für eine Restriktionsanalyse, was die Untersuchung der Rekombinationsprodukte deutlich erleichtert. Die Destination-Plasmide waren auch bei diesen Kopiezahlen stabil.

#### **4.2.2 Verwendete Promotoren und Anordnung der Expressionskassetten**

Für die Expression der C<sub>4</sub>-Gene in Tabak bzw. des Glykolatweges in Reis wurden soweit möglich unterschiedliche Promotoren verwendet. In Versuchen, in welchen mehrere Gene unter Verwendung eines Multigen-Konstrukts in Reispflanzen transformiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit der Coexpression aller Gene von Art und Orientierung der Promotoren sowie der Zahl der Gene unter Kontrolle des gleichen Promotors abhängt (Christou, 1997). Während Art und Orientierung der Promotoren bei nur zwei Genen keine Rolle zu spielen scheinen, werden sie bei mehreren wichtige Faktoren. So konnte durch die Verwendung verschiedener Arten und/oder Orientierungen der Promotoren in Konstrukten mit mehreren Genen die Zahl der Pflanzen, welche alle Gene exprimieren deutlich gesteigert werden (Christou, 1997). Da Homologien durch den wiederholten Einsatz gleicher Promotorsequenzen oder auch gleicher 5'-UTR- und 3'-UTR-Sequenzen zu einer Inaktivierung von Transgenen führen können (homology-dependent transcriptional gene silencing) (Meyer und Saedler, 1996; Vaucheret und Fagard, 2001), ist insbesondere beim Einsatz mehrerer verschiedener Expressionskassetten innerhalb eines Konstrukts die Verwendung unterschiedlicher Promotoren bzw. 5'-UTR- und 3'-UTR-Bereichen sinnvoll.

Die Multigen-Konstrukte wurden so konzipiert, dass die einzelnen Gene Kopf an Kopf vorliegen bzw. durch Transkriptionsblocker getrennt werden. Wenn zwei Gene direkt

Kopf an Schwanz ( $\rightarrow \rightarrow$ ) kloniert werden, wird die Expression des stromabwärts gelegenen Gens durch die Expression des stromaufwärts gelegenen um bis zu 80% reduziert. Die Klonierung zweier Gene in der Orientierung Schwanz an Schwanz ( $\rightarrow \leftarrow$ ) führt zu einer um etwa 53% verminderten Expression des stromabwärts gelegenen Gens. Bei einer Kopf an Kopf-Orientierung ( $\leftarrow \rightarrow$ ) wird keine Interferenz beobachtet (Padidam und Cao, 2001). Die Autoren vermuten, dass die transkriptionelle Interferenz eine Folge des „read-through“ der RNA-Polymerase und/oder der Antisense-RNA-Produktion ist. Verwendung findet die transkriptionelle Interferenz in manchen Organismen als eine Form der Genregulation. Zur Repression eines Gens liegt vor dem Promotor des Gens ein zweiter Promoter. Zum Beispiel produziert eine verkürzte Kopie des tandemartig wiederholten *Mlo*-Gens in Gerste siRNA, welche die Expression der Wildtypkopien blockiert (Piffanelli *et al.*, 2004). Beschrieben wurde dieser Regulations-Mechanismus bisher außerdem bei *Drosophila melanogaster* und Hefe, er dürfte aber auch noch in weiteren Organismen vorkommen (Greger *et al.*, 2000).

Padidam und Cao (2001) konnten zeigen, dass AT-reiche Sequenzen aus dem Lambdaphagen als Transkriptionsblocker dienen und eine transkriptionelle Interferenz verhindern können. Um die möglichen negativen Einflüsse der Expression der einzelnen Kassetten aufeinander zu verringern, wurden daher wurden die Lambdasequenzen als Separatoren in das Konstrukt eingefügt. Die verwendeten Scaffold attachment regions (SARs), welche für eine Anheftung der DNA an die Kernmatrix sorgen (Heng *et al.*, 2004), sollen zu einer Reduktion von Positionseffekten führen (Grosveld *et al.*, 1987; Stief *et al.*, 1989; Bonifer *et al.*, 1990). Sie können vom umgebenden Chromatin unabhängige Domänen definieren und vor dessen Einfluss abschirmen (Elgin, 1991; Jackson, 1991; Pienta *et al.*, 1991). Außerdem können sie den Einfluss von Enhancern und anderen *cis*-regulatorischen Elementen nahe der Integrationsstelle verringern. Da SAR-Elemente am effektivsten sind, wenn sie die Transgene flankieren (Thompson *et al.*, 1996; Holmes-Davis und Comai, 1998), wurden sie an die Enden der T-DNA platziert. Die von der Umgebung unabhängige Bestimmung der Chromatinstruktur durch SAR-Elemente kann vor allem bei der Transformation durch „particle bombardment“ von Bedeutung sein, die zu einer Integration des Transgens an einer zufälligen Stellen im Genom führt (Puchta, 1998). Transgene, die an Positionen mit hoch kondensiertem Chromatin integriert oder methyliert

werden, werden nicht oder geringer exprimiert als solche, die an Transkriptionsaktiven Stellen integriert werden. Hingegen findet man die T-DNA-Inserts von *Agrobacterium tumefaciens* oft in transkriptionell aktiven Regionen (Komari *et al.*, 1998; Finer *et al.*, 1999), also an Stellen, die schon eine Chromatinstruktur besitzen, welche die Transkription begünstigt. In solchen Regionen könnten SARs sogar zu einer verringerten Expression des Transgens führen, indem sie die Einflüsse nahe gelegener positiver *cis*-regulatorischer Elemente reduzieren. Des Weiteren können SARs zu einer Reduktion von Transgen-Silencing und Cosuppression durch multiple Kopien des Transgens führen (Allen *et al.*, 1993; Vain *et al.*, 1999). Diese Eigenschaft wäre ebenfalls vor allem bei einer Transformation durch „particle bombardment“ von Vorteil, die in der Mehrheit der Fälle zur Integration multipler Kopien führt (Christou, 1997; Finer *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001). Aber auch bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation kann es zur Integration mehrerer Kopien kommen (Reppellin *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001).

### 4.3 C<sub>4</sub>- ähnlicher Zyklus in C<sub>3</sub>-Pflanzen

#### 4.3.1 Die Bifunktionalität der RUBISCO

Das für die CO<sub>2</sub>-Fixierung verantwortliche Enzym RUBISCO (EC 4.1.1.39) ist ein bifunktionales Enzym. Neben seiner Carboxylierungsfunktion besitzt es auch eine Oxygenaseaktivität (Bowes *et al.*, 1971). CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> konkurrieren gegenseitig um dasselbe aktive Zentrum der großen Untereinheit der RUBISCO. Trotz der höheren Affinität der RUBISCO für CO<sub>2</sub> (K<sub>m</sub> = 10 µM) als für O<sub>2</sub> (K<sub>m</sub> = 200 µM) und der höheren Löslichkeit von CO<sub>2</sub> als von O<sub>2</sub> wird pro drei Molekülen CO<sub>2</sub> ein Molekül O<sub>2</sub> fixiert (Sharkey, 2001), da die O<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre (ca. 21 Vol%) etwa 500-mal höher ist als die von CO<sub>2</sub> (0,038 Vol%). Das durch die Oxygenierung entstandene Glykolat ist für die Pflanze toxisch und muss in der Photorespiration metabolisiert werden (Zelitch *et al.*, 2008), welche zu einem Verlust von 25% des im Phosphoglykolat gebundenen Kohlenstoffs führt (Leegood *et al.*, 1995). Zudem verbraucht die Photorespiration etwa die Hälfte der photosynthetisch erzeugten Energie (Tolbert, 1997). Die Effizienz der Photosynthese wird somit stark von dem Verhältnis von Carboxylierungs- zu Oxygenierungsreaktion bestimmt. Unter ungünstigen Bedingungen wie hohen Temperaturen und Trockenheit kann die Effizienz der Photosynthese um

bis zu 40% reduziert werden (Ehleringer *et al.*, 1991). Die unvorteilhafte Oxygenase-Reaktion der RUBISCO kann als ein Relikt der evolutionären Geschichte des Enzyms erklärt werden, welches sich vor mehr als 3 Mrd. Jahren entwickelt hat, als die CO<sub>2</sub>-Konzentrationen hoch und die O<sub>2</sub>-Konzentrationen niedrig waren. Offensichtlich war es danach nicht möglich die Eigenschaften des Enzyms zu verändern oder die RUBISCO durch eine andere Carboxylase zu ersetzen. Gleichwohl haben Pflanzen verschiedene Wege entwickelt, um mit diesem Problem fertig zu werden. Die wahrscheinlich erfolgreichste Lösung war die C<sub>4</sub>-Photosynthese.

C<sub>4</sub>-Pflanzen erreichen durch ihren CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus eine bis zu zehnfach höhere CO<sub>2</sub>-Konzentration in den Bündelscheidenzellen im Vergleich zur Umgebungsluft, was zu einer effizienten Unterdrückung der Oxygenase-Reaktion der RUBISCO führt (Ku *et al.*, 1996; Carmo-Silva *et al.*, 2008; Furbank, 2011). Bei Versuchen von Farineau *et al.* (1984) mit isolierten Bündelscheidensträngen von C<sub>4</sub>-Pflanzen betrug die Photorespirationsrate unter Umgebungsbedingungen nur etwa 3 bis 7% der CO<sub>2</sub>-Fixierungsrate. Daher wurde angenommen, dass die Photorespiration in C<sub>4</sub>-Pflanzen nur eine unbedeutende Rolle spielt (Edwards *et al.*, 2001). Versuche von Zeltich *et al.* (2008) mit Maismutanten, welche nur 5-10% der Wildtyp-Glykolatoxidaseaktivität besaßen, haben aber gezeigt, dass auch die C<sub>4</sub>-Photosynthese abhängig von der Photorespiration ist. Entgegen den Erwartungen waren homozygote Mutanten unter Standardbedingungen nicht überlebensfähig und benötigten höhere CO<sub>2</sub>-Konzentrationen für ein normales Wachstum. Zudem kam es zu einer Anreicherung von Glykolat und einer Hemmung der Photosynthese durch hohe Sauerstoffkonzentrationen in diesen Pflanzen. All diese Auswirkungen erinnern an Photorespirationsmutanten in C<sub>3</sub>-Pflanzen (Reumann und Weber, 2006). Die niedrigen Oxygenase-Aktivitäten in C<sub>4</sub>-Pflanzen produzieren anscheinend genug Phosphoglykolat, um die Photosynthese zu hemmen wenn es sich anreichert.

C<sub>4</sub>-Pflanzen verwendeten für den CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus Enzyme, welche bereits in ihren C<sub>3</sub>-Vorfahren vorhanden waren (Ku *et al.*, 1996; Drincovich *et al.*, 1998; Sheen, 1999). Die C<sub>3</sub>-Formen erfüllen jedoch meist andere Aufgaben im Stoffwechsel und unterscheiden sich von den C<sub>4</sub>-Formen hinsichtlich der kinetischen Eigenschaften (Ku *et al.*, 1996; Lepiniec *et al.*, 1994). Zudem änderten sich sowohl die Expressionsstärke als auch die subzelluläre bzw. zelltypspezifische Lokalisation der Enzyme (Hatch, 1987). Der Mechanismus beruht auf dem Zusammenspiel der bei-



den Zelltypen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen, wodurch eine räumliche Trennung von CO<sub>2</sub>-Fixierung und Decarboxylierung gewährleistet wird (1.1.3). Hingegen setzen CAM-Pflanzen auf eine zeitliche Trennung der beiden Prozesse (Cushman, 2001) (1.1.5). Neben diesen beiden Mechanismen haben einige aquatische Pflanzen wie *H. verticillata* eine „Single-Cell“-C<sub>4</sub>-Photosynthese entwickelt (Bowes, 2002; Rao *et al.*, 2002) (1.1.4). Hier verteilen sich die primäre CO<sub>2</sub>-Fixierung und die anschließende Freisetzung auf Cytosol und Chloroplasten. Sie setzen damit ebenfalls auf eine räumliche Trennung von CO<sub>2</sub>-Fixierung und Decarboxylierung. C<sub>4</sub>-Blätter von Hydrilla erreichen eine mehr als vierfache Konzentrierung an anorganischem Kohlenstoff (CO<sub>2</sub> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), was in einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von etwa 400 µM in den Chloroplasten resultiert (Reiskind *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu liegt die CO<sub>2</sub>-Konzentration im C<sub>3</sub>-Blatt unter dem Gleichgewicht mit der externen CO<sub>2</sub>-Konzentration. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration in den Chloroplasten beträgt etwa 7 µM, was in derselben Größenordnung wie in terrestrischen C<sub>3</sub>-Pflanzen liegt. Durch die CO<sub>2</sub>-Konzentrierung erreicht Hydrilla eine Reduktion des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes von 60 auf 20 µl CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> sowie der Sauerstoffinhibierung von 43 auf 14% (Magnin *et al.*, 1997).

Viele Forschergruppen arbeiten daran, den Ertrag von C<sub>3</sub>-Pflanzen durch Steigerung der Photosynthese und/oder Reduzierung der Photorespiration zu erhöhen (1.1.6). Ein Ansatz ist dabei die Übertragung des C<sub>4</sub>-Weges auf C<sub>3</sub>-Pflanzen. Verglichen mit der C<sub>3</sub>-Photosynthese verbraucht der C<sub>4</sub>-Weg ein (PCK-Typ) oder zwei (NADP-ME und NAD-ME) ATP-Moleküle pro fixiertem CO<sub>2</sub> zusätzlich. Der erhöhte Energieaufwand wirkt sich aber nicht gravierend aus, da im Gegenzug weniger Energie in der Photorespiration verbraucht wird (Kluge, 1999). Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Oxygenase-Reaktion ist der C<sub>4</sub>-Weg bei Temperaturen über 20-25°C weniger energieaufwändig als die C<sub>3</sub>-Photosynthese (Ehleringer und Björkman; 1977; Ehleringer und Pearcy; 1983), wodurch C<sub>4</sub>-Pflanzen unter solchen Bedingungen produktiver sind. Unter den natürlich vorkommenden C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-Zwischenformen finden sich je nach Ausprägung der biochemischen bzw. morphologischen C<sub>4</sub>-Charakterzüge Pflanzen, welche geringere photorespiratorische CO<sub>2</sub>-Verluste zeigen als reine C<sub>3</sub>-Pflanzen (Ku *et al.*, 1991). Die Etablierung eines C<sub>4</sub>-Zyklus könnte also zu einer Unterdrückung der Oxygenase-Reaktion und damit auch der Photorespiration führen. In zwei Studien mit *Arabidopsis* (Beckmann *et al.*, 1997) und Gerste (Wingler *et al.*,

1997), welche das Wachstum von Photorespirationsmutanten unter verschiedenen CO<sub>2</sub>-Bedingungen untersuchten, zeigte sich unter hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (keine oder niedrige Photorespirationsrate) keine Beeinträchtigung des Pflanzenwachstums. Unter niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (hohe Photorespirationsrate) war es hingegen verlangsamt oder die Pflanzen starben sogar. Die Photorespiration hilft C<sub>3</sub>-Pflanzen also unter Bedingungen mit hoher Oxygenaseaktivität der RUBISCO zu überleben. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass eine teilweise Unterdrückung der Photorespiration nicht schädlich für das Wachstum der C<sub>3</sub>-Pflanzen ist. Eine Stimulation der Photosynthese, wie sie unter hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auftritt, ist oft nur auf die Unterdrückung der Photorespiration zurückzuführen (Harley und Sharkey, 1991). Dies unterstützt die These, dass eine Unterdrückung der Photorespiration in C<sub>3</sub>-Pflanzen die Photosynthese-Leistung unter vergleichbaren Bedingungen erhöhen könnte.

#### **4.3.2 Wahl der Enzyme und Transporter für Etablierung eines C<sub>4</sub>-ähnlichen Zyklus in Tabak**

Während die grundlegende Biochemie des C<sub>4</sub>-Zyklus gut untersucht ist, sind die Kenntnisse über andere Gene und Proteine, welche für eine effiziente C<sub>4</sub>-Photosynthese benötigt werden, begrenzt. So sind zum Beispiel weder alle Transporter, welche den erhöhten inter- und intrazellulären metabolischen Fluss sicherstellen, noch die Gene, welche die Veränderungen in den Zellen und der gesamten Blattmorphologie regulieren und aufrechterhalten, identifiziert. Da sich die C<sub>4</sub>-Photosynthese im Laufe der Evolution der höheren Pflanzen mehrmals unabhängig voneinander entwickelt hat (Sage, 2004; Muhaidat *et al.*, 2007), geht man davon aus, dass die Entstehung einer C<sub>4</sub>- aus einer C<sub>3</sub>-Art auf der genetischen Ebene relativ einfach ist (Westhoff und Gowik, 2010).

Mit Hilfe kürzlich entwickelter Sequenzierungstechnologien der nächsten Generation (next generation sequencing = NGS) kann das Transkriptom eines Gewebes gleichzeitig sequenziert und quantifiziert werden. Eine vergleichende Transkriptomanalyse der C<sub>3</sub>-Pflanze *Cleome spinosa* mit der nahe verwandten C<sub>4</sub>-Pflanze *Cleome gynandra* mittels NGS ergab, dass sich die Expression von etwa 600 Transkripten signifikant unterscheidet (Bräutigam *et al.*, 2011). Allerdings war unklar, wie viele der Veränderungen auf das C<sub>4</sub>-Syndrom und nicht auf die evolutionäre Distanz der bei-

den Arten zurückzuführen sind. Durch Transkriptomanalysen von fünf Flaveria-Arten, welche C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Arten sowie C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-Zwischenstufen umfassten, konnte die Wahrscheinlichkeit reduziert werden, artspezifische statt C<sub>4</sub>-Spezifische Unterschiede aufzudecken (Gowik *et al.*, 2011). In dieser Studie war die Transkriptabundanz von 213 Genen signifikant unterschiedlich. Solange kein funktionierender C<sub>4</sub>-Zyklus erfolgreich in eine C<sub>3</sub>-Pflanze eingebracht wurde, wird nicht klar sein, wie viele der Veränderungen für die Etablierung eines C<sub>4</sub>-Zyklus notwendig sind. Beruhend auf der Tatsache, dass der C<sub>4</sub>-Weg mehrfach parallel in vielen Pflanzenfamilien entstanden ist, ist es wahrscheinlich, dass viele der Veränderungen durch ein gemeinsames Genregulationsnetzwerk kontrolliert werden (Westhoff und Gowik, 2010) oder sich nach der erfolgreichen Etablierung des C<sub>4</sub>-Zyklus entwickelt haben.

In der fakultativen C<sub>4</sub>-Pflanze Hydrilla wurden bisher 13 Gene identifiziert, welche im C<sub>4</sub>-Status gegenüber dem C<sub>3</sub>-Status hochreguliert werden (Rao *et al.*, 2006). Die Analyse erfolgte durch DDRT-PCR (Differential Display RT-PCR) und anschließender Überprüfung mittels Northern Blot sowie semiquantitativer RT-PCR. Die DDRT-PCR beruht auf degenerierten Primern, die mit statistisch ermittelbarer Häufigkeit an bestimmte Bereiche der cDNAs binden. Dabei ist jedoch nicht sichergestellt, dass wirklich alle mRNAs erfasst werden. Es ist daher davon auszugehen, dass sich eine größere Zahl an Genen in der Transkriptabundanz unterscheidet, auch wenn sich deutlich geringere Unterschiede als beim Vergleich von nahe verwandten C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Arten erwarten lassen, da die Gefahr der Identifikation artspezifischer Unterschiede wegfällt. Eine vergleichende Transkriptomanalyse von C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Hydrilla mittels NGS steht bisher allerdings noch aus.

Da die Expression der Enzyme für einen putativen „Single-Cell“-CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus nach dem Vorbild von Hydrilla wesentlich einfacher ist als die Einführung der komplexen Kranz-Anatomie wurde dieser Weg zur Etablierung eines C<sub>4</sub>-ähnlichen Zyklus in der C<sub>3</sub>-Pflanze Tabak verfolgt. Während sich der Zyklus vom NADP-ME-Typ möglichst nah an Hydrilla orientiert, wurden bei den anderen beiden Typen alternative Decarboxylasen (NAD-ME bzw. PCK) verwendet. Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden NAD-ME- und PCK-Typen wurde die Decarboxylierung allerdings von den Mitochondrien bzw. dem Cytosol in die Chloroplasten verlagert. Unter den submersen Bedecktsamern verwenden alle bisher beschriebenen „Single-Cell“-C<sub>4</sub>-Systeme NADP-ME als Decarboxylase. Daher sollte die CO<sub>2</sub>-

Freisetzung in den Chloroplasten nahe der RUBISCO die effektivste Konzentrierungsmethode sein. Eine mitochondriale NAD-ME oder cytosolische PCK würde möglicherweise zu einem nutzlosen CO<sub>2</sub>-Zyklus führen, da das CO<sub>2</sub> erst durch das Cytosol diffundieren muss, um die Chloroplasten zu erreichen. Es ist wahrscheinlich, dass eine Decarboxylase in den Mitochondrien oder dem Cytosol in einem „Single-Cell“-System kein CO<sub>2</sub> konzentrieren könnte. Dafür spricht auch, dass submerse Bedecktsamer, welche NAD-ME als Decarboxylase verwenden, eine Kranzanatomie besitzen.

Für den putativen C<sub>4</sub>-Zyklus vom NADP-ME-Typ wurden einerseits Homologe der Enzyme verwendet, deren Expression bzw. Aktivität in *Hydrilla* im C<sub>4</sub>-Status erhöht ist (CA, PEPC, NADP-ME, PPDK). Andererseits wurden Translokatoren für Oxalacetat (Oac1) und PEP (PPT) eingesetzt, von denen angenommen wird, dass sie für einen funktionierenden Zyklus notwendig sind. Vergleichende quantitative Proteom- und Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass der hohe metabolische Fluss, welcher für die Aufrechterhaltung der C<sub>4</sub>-Photosynthese notwendig ist, durch eine starke Erhöhung der Zahl der Transportproteine erreicht wird (Bräutigam *et al.*, 2008; 2011; Friso *et al.*, 2010). Da *Hydrilla* zum NADP-ME-Typ gehört (Salvucci und Bowes, 1981; Magnin *et al.*, 1997), ist es wahrscheinlich, dass Oxalacetat und/oder Aspartat in die Chloroplasten importiert wird (Bowes *et al.*, 2002). Der Import von Malat würde zu einer Veränderung des NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnisses führen, da die Decarboxylierung von Malat mit einer Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH einhergeht. Als Folge käme es zu einem Mangel an NADP<sup>+</sup> für den linearen Elektronentransport. Hingegen würde die Umsetzung des Oxalacetats zu Malat innerhalb der Chloroplasten das Verhältnis der Reduktionsäquivalente konstant halten, da gleichzeitig NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird.

In C<sub>3</sub>-Pflanzen existiert entgegen früherer Annahmen von Hatch *et al.* (1984) kein entsprechender Transporter für Oxalacetat (Prof. Dr. Andreas Weber, Institut für Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung). Zwar kann Oxalacetat auch über den Malat/Oxalacetat-Shuttle (DiT1) in die Chloroplasten transportiert werden, aufgrund des gleichzeitigen Exports von Malat würde dies aber nicht in einem Nettotransfer von Kohlenstoff resultieren. Der Shuttle dient vielmehr zum Transfer von Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten ins Cytosol (Taniguchi *et al.*, 2002; Renné *et al.*, 2003). Der Oxalacetat-Translokator (Oac1)

aus Hefe wurde gewählt, da in Pflanzen bis dato kein solcher Transporter bekannt ist, weder in C<sub>3</sub>- noch in C<sub>4</sub>-Pflanzen. Neben Oxalacetat transportiert er Malonat, Sulfat und Thiosulfat. Den unidirektionalen Transport von Oxalacetat katalysiert er im Co-Transport mit Protonen (Palmieri *et al.*, 1999). Da der pH-Wert des Zytosols (pH ~7,0) niedriger ist als der des Chloroplastenstromas im Licht (pH ~8,0) (Heldt *et al.*, 1973; Werdan *et al.*, 1975; Felle, 2001), sollte (ein korrekter Einbau des ursprünglich mitochondrial lokalisierten Transporters in die innere Chloroplastenmembran vorausgesetzt) ein Oxalacetat-Import über Oac1 im Prinzip möglich sein.

Translokatoren für PEP/Phosphat (PPT) werden hingegen nicht nur in allen Geweben von C<sub>4</sub>- und CAM-Pflanzen, sondern auch in denen von C<sub>3</sub>-Pflanzen gefunden (Fischer *et al.*, 1997; Häusler *et al.*, 2000). Der PPT dient hier zum Import von PEP aus dem Cytosol, da die meisten Plastiden (außer in lipidspeicherndem Gewebe) nicht in der Lage sind 3-Phosphoglycerat über die Glykolyse zu PEP umzusetzen (Bagge und Larsson, 1986; van der Straeten *et al.*, 1991; Borchert *et al.*, 1993). Die physiologische Funktion des PPT in C<sub>3</sub>-Pflanzen ist die Versorgung von Plastiden mit PEP aus dem Cytosol als Vorstufe für die Synthese aromatischer Aminosäuren und einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten wie Phenylpropanoide und Anthocyane (Schmid und Amrhein, 1995; Herrmann und Weaver, 1999). Chloroplasten von C<sub>3</sub>-Pflanzen zeigen allerdings nur eine geringe PEP-Transportaktivität (Heldt und Rapley, 1970; Fliege *et al.*, 1978). Hingegen zeigen Chloroplasten von C<sub>4</sub>-Pflanzen hohe PEP-Transportaktivitäten (Huber und Edwards, 1977; Day und Hatch, 1981). Der PPT hat hier die Aufgabe das durch die stromale PPDK produzierte PEP als Substrat für die PEPC ins Cytosol zu exportieren. Die niedrige endogene PEP-Transportaktivität von C<sub>3</sub>-Pflanzen wird daher als möglicherweise limitierend für einen C<sub>4</sub>-Zyklus betrachtet. Der PPT aus Blumenkohl wurde verwendet, da er sehr gut untersucht ist. So konnte eine Arabidopsis Mutante (*cue1*), welche einen Defekt im PEP/Phosphat-Translokator (AtPPT1) aufweist (Li *et al.*, 1995; Streatfield *et al.*, 1999), durch heterologe Überexpression des PPT aus Blumenkohl komplementiert werden (Voll *et al.*, 2003).

Für den ersten Schritt des C<sub>4</sub>-Zyklus, die Hydratisierung des CO<sub>2</sub> zu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sollte eine CA aus *F. bidentis* dienen. Für die Verwendung einer CA sprach zum einen die deutliche Aktivitätserhöhung (etwa 5-6-fach) bei der Induktion des C<sub>4</sub>-Zyklus in Hydrilla (Salvucci und Bowes, 1983; Spencer *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2005). Eine

Hemmung der CA in C<sub>4</sub>-Blätter von Hydrilla durch den spezifischen Inhibitor Ethoxazolamid führte zu einer Reduktion der Nettophotosynthese um 40% sowie einer Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes und der Sauerstoffinhibierung (Salvucci und Bowes, 1983). Dagegen hatte der Inhibitor auf C<sub>3</sub>-Blätter nur geringfügige Auswirkungen. Zum anderen zeigten *F. bidentis*-Pflanzen, in denen die CA-Aktivität durch ein Antisense-Konstrukt um mehr als 90% reduziert war, nur noch sehr niedrige CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten und ein stark vermindertes Wachstum (von Caemmerer *et al.*, 2004). Diese Daten belegen die wichtige Rolle der CA im C<sub>4</sub>-Zyklus. Zwar besitzen auch C<sub>3</sub>-Pflanzen eine CA-Aktivität, allerdings ist diese zu 98% in den Chloroplasten lokalisiert (Reed und Graham, 1981; Fett und Coleman, 1984; Tsuzuki *et al.*, 1985). Für den zweiten Schritt des C<sub>4</sub>-Zyklus, die Fixierung des HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu Oxalacetat, wurde eine modifizierte PEPC aus Kartoffel (*stppc*) mit hoher Substrataffinität und niedriger Produkthemmung verwendet (Rademacher *et al.*, 2002). Die endogene PEPC spielt in C<sub>3</sub>-Pflanzen zum Beispiel bei der Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für die Aminosäuren-Synthese (Miyao und Fukayama, 2003) und der Regulation des cytosolischen pH-Wertes eine Rolle (Martinoia und Rentsch, 1994). In Hydrilla ist die PEPC das erste Enzym, das in seiner Aktivität hochreguliert wird. Im Laufe der C<sub>4</sub>-Induktion steigt seine Aktivität um den Faktor 15 (Salvucci und Bowes, 1981, 1983; Ascencio und Bowes, 1983; Magnin *et al.*, 1997). Eine Behandlung von C<sub>4</sub>-Blättern mit Diethylloxalacetat, ein PEPC-Inhibitor, reduzierte die Photosyntheserate und erhöhte die Sauerstoffinhibierung um mehr als das Doppelte (Magnin *et al.*, 1997). Für die Verwendung eines modifizierten C<sub>3</sub>-Enzyms sprachen verschiedene Gründe. Als C<sub>3</sub>-Enzym besitzt die *stppc* eine höhere Substrat-Affinität für PEP (niedrigerer K<sub>m, PEP</sub>) als vergleichbare C<sub>4</sub>-Enzyme (höherer K<sub>m, PEP</sub>) oder auch prokaryotische PEPCs, welche sich durch relativ hohe K<sub>m, PEP</sub>-Werte auszeichnen (Svensson *et al.*, 1997). Dies könnte für die Etablierung des C<sub>4</sub>-Zyklus von Vorteil sein, da die PEP-Konzentration in der C<sub>3</sub>-Pflanze Tabak deutlich niedriger ist als in C<sub>4</sub>-Pflanzen. Allerdings ist die Malatsensitivität von C<sub>3</sub>-PEPCs (niedriger I<sub>50, L-Malat</sub>) deutlich höher als die von C<sub>4</sub>-PEPCs (hoher I<sub>50, L-Malat</sub>) (Svensson *et al.*, 1997). Für die Regulation der Malatsensitivität spielt die Phosphorylierung eines Serinrestes in der N-terminalen Domäne der PEPC durch eine spezifische PEPC-Kinase eine wichtige Rolle. Diese posttranslationale Modifikation führt zu einer Reduktion der Malathemmung (Bakrim *et al.*, 1992; Wang und Chollet, 1993; Zhang *et al.*, 1995), was besonders in C<sub>4</sub>- und

CAM-Pflanzen von Bedeutung ist, wo sie zur Aufrechterhaltung der PEPC-Aktivität bei erhöhtem Malatspiegel während der CO<sub>2</sub>-Vorfixierung dient (Borland *et al.*, 1999; Hartwell *et al.*, 1999; Nimmo, 2000; Ueno *et al.*, 2000).

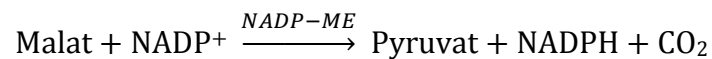
Bei *in vitro* Untersuchungen mit bakteriell exprimierten, rekombinanten C<sub>4</sub>-PEPCs konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt der Phosphorylierung durch Mutation des zu phosphorylierenden Serins (S) zu Aspartat (D) imitieren ließ. Dies führte zu der Überlegung, dass die Expression einer PEPC mit SD-Mutation besonders zur Erhöhung des Gehaltes an C<sub>4</sub>-Säuren in C<sub>3</sub>-Pflanzen geeignet sein könnte, da diese *in vivo* praktisch „dauerphosphoryliert“ wäre und somit aktiver als eine unmutierte PEPC sein müsste. Dies wäre auch von Vorteil, da C<sub>3</sub>-Pflanzen nur eine geringe PEPC-Kinase-Aktivität zeigen (Duff und Chollet, 1995; Leport *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996) und die Regulation eventuell nicht in die gewünschte Richtung erfolgt. In Mais ist der N-Terminus im Hellen phosphoryliert, aber in transgenen Reispflanzen, welche das C<sub>4</sub>-Protein exprimierten, trat die Phosphorylierung im Dunkeln auf (Fukayama *et al.*, 2003). Eine Antisense-Hemmung der PEPC-Kinase in *F. bidentis* beeinträchtigte allerdings weder die Photosynthese-Leistung noch das Pflanzenwachstum (Furumoto *et al.*, 2007). Die physiologische Rolle dieser Modifikation *in vivo* ist daher noch nicht endgültig geklärt. Markierungsexperimente mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> zeigten, dass die modifizierte C<sub>3</sub>-PEPC auch in planta aktiver war als die C<sub>4</sub>-PEPC aus *F. bidentis*. Während die modifizierte *stppc* in Kartoffel zu einem signifikant erhöhten Einbau von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in Malat führte, war die <sup>14</sup>C-Einbaurrate mit *ftppc* nur leicht erhöht (Dissertation Thomas Rademacher, Institut für Biologie I, RWTH Aachen, 2002). Dass C<sub>4</sub>-PEPCs trotz hoher *in vitro* Aktivität in planta kaum aktiv sein können, wurde auch von Fukayama *et al.* (2000) und Matsuoka *et al.* (2001) beobachtet. So ergab die Überexpression der PEPC aus Mais in Reis, welche in einer 110-fach erhöhten *in vitro*-PEPC-Aktivität resultierte (dreimal höher als Mais selbst), keine Erhöhung der Markierung von organischen Säuren. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die PEPC in der weniger aktiven unphosphorylierten Form vorlag. Auch die Expression einer bakteriellen PEPC aus *Corynebacterium glutanicum* (*cgppc*) in Kartoffel, welche nicht durch Phosphorylierung reguliert wird, führte zu keiner messbaren Erhöhung der Markierungsraten von Malat (Dissertation Thomas Rademacher, Institut für Biologie I, RWTH Aachen, 2002).

Die Ergebnisse von Rademacher legen nahe, dass es für die Funktion einer PEPC in der C<sub>3</sub>-Umgebung wichtig ist, dass diese sowohl eine hohe Affinität zu PEP als auch eine niedrige Sensitivität gegenüber Inhibitoren wie Malat aufweist. Die geringe Malatsensitivität von C<sub>4</sub>-PEPCs, welche auch im unphosphorylierten Zustand noch deutlich niedriger ist als von C<sub>3</sub>-PEPCs, scheint für die Funktion im Stoffwechsel von C<sub>3</sub>-Pflanzen alleine nicht ausreichend zu sein. Wie bei der bakteriellen PEPC (*cgppc*) scheint die geringe in planta-Aktivität der C<sub>4</sub>-PEPCs auf der geringen Substrataffinität zu beruhen. Da der  $K_{m, PEP}$ -Wert der C<sub>4</sub>-PEPCs auch bei einer Aktivierung durch Phosphorylierung bzw. SD-Mutation im Phosphorylierungsmotiv immer noch wesentlich höher liegt als der  $K_{m, PEP}$ -Wert der C<sub>3</sub>-PEPCs (Duff *et al.*, 1995), wäre die Aktivität in planta möglicherweise auch dann noch sehr gering, wenn in C<sub>3</sub>-Pflanzen eine mutierte C<sub>4</sub>-PEPC exprimiert würde. Auch eine hohe PEP-Affinität alleine war in den Arbeiten von Rademacher nicht ausreichend, um in der C<sub>3</sub>-Umgebung eine PEPC-Aktivität zu erzielen, welche sich in einer Erhöhung des Malatspiegels niederschlägt. Die Ergebnisse von Rademacher zeigen, dass es zur Manipulation des Kohlenstoffwechsels in C<sub>3</sub>-Pflanzen offensichtlich nicht ausreicht, eine PEPC-Isoform zu exprimieren, welche lediglich die gewünschte Reaktion katalysiert. Erst durch Anpassung des Enzyms an die C<sub>3</sub>-Umgebung konnten deutliche Effekte erzielt werden. Kinney (1998) vermutete sogar, dass sich Stoffwechselwege generell nur mit entsprechend modifizierten Enzymen manipulieren lassen.

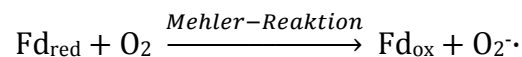
Nach Import des Oxalacetats in die Chloroplasten muss es mittels Malatdehydrogenase zu Malat umgesetzt werden, sofern es nicht durch die PCK direkt decarboxyliert werden soll. Die endogene chloroplastidäre NADP-MDH-Aktivität in C<sub>3</sub>-Pflanzen ist bereits ziemlich hoch, wie der Vergleich mit der C<sub>4</sub>-Pflanze Mais zeigte. So betrug die NADP-MDH-Aktivität in den Wildtytabakpflanzen bereits etwa 20% der Aktivität in Mais (3.2.8). Die NADP-MDH spielt hier eine zentrale Rolle beim Transport von überschüssigen Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten ins Cytosol (Berkemeyer *et al.*, 1998; Scheibe, 2004). Da die NADP-MDH-Aktivität in Hydrilla beim Umschalten von C<sub>3</sub>- auf C<sub>4</sub>-Photosynthese nicht signifikant ansteigt, ging man bisher davon aus, dass die endogene Aktivität hoch genug für einen C<sub>4</sub>-Zyklus wäre. Die Ergebnisse von Taniguchi *et al.* (2008) deuten aber darauf hin, dass eine erhöhte NADP-MDH-Aktivität eine Schlüsselrolle spielen könnte. Während transgene Reispflanzen, welche nur die drei Gene PEPC, NADP-ME und PPDK überexprimierten,



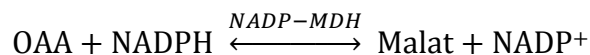
niedrigere CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten als Nichttransformanden zeigten, resultierte die zusätzliche Überexpression von NADP-MDH in vergleichbaren oder sogar höheren Raten. Außerdem führte die Überexpression von NADP-MDH zu einer Abschwächung der durch Überexpression von PEPC und ME ausgelösten Wachstumshemmung. Diese ist nach Tsuchida *et al.* (2001) unter anderem auf eine Erhöhung des NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis durch die gesteigerte NADP-ME Aktivität zurückzuführen:



Im nicht-zyklischen Elektronentransport werden die Elektronen normalerweise am Photosystem I von Ferredoxin auf NADP<sup>+</sup> übertragen. Bei einem zu hohen NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis können die Elektronen von der Ferredoxinreduktase aber statt auf NADP<sup>+</sup> auch auf Sauerstoff übertragen werden, was in der Bildung schädlicher Sauerstoffradikale resultiert (Mehler-Reaktion) (Foyer, 1997; Asada, 1999; Baier und Dietz, 1999):



NADP-MDH könnte zur Rückgewinnung von NADP<sup>+</sup> aus NADPH beitragen um dadurch genug NADP<sup>+</sup> für den linearen Elektronentransport zur Verfügung zu stellen.



Zu einem Anstieg des NADPH-Levels kann es kommen, wenn Malat aus dem Cytosol importiert und als Substrat für das Enzym verwendet wird. Wenn Malat durch die Reaktion der NADP-MDH aus OAA zur Verfügung gestellt wird, welches durch den Oac1-Translokator in die Chloroplasten importiert wurde, bleibt das NADPH-Level konstant. Eine schnelle Umsetzung des Oxalacetats zu Malat könnte auch dessen Import unterstützen, da dieser vom Konzentrationsgradienten abhängt (Palmieri *et al.*, 1999).

Für die Decarboxylierung des Malats in den Chloroplasten wurde die C<sub>4</sub>-spezifische NADP-ME-Isoform aus *Hydrilla* (*hvme1*) verwendet (für den NADP-ME-Typ), dessen Aktivität sich in *Hydrilla* während der Umschaltung von C<sub>3</sub>- auf C<sub>4</sub>-Photosynthese verzehnfacht (Magnin *et al.*, 1997). Die endogenen Isoformen in C<sub>3</sub>-Pflanzen sind sowohl im Cytosol als auch den Chloroplasten lokalisiert (Edwards und Andreo, 1992; Drincovich *et al.*, 2001). Cytosolisches NADP-ME spielt zum Beispiel bei der Regulation der Malat-Konzentration als auch bei der Kontrolle des cytosolischen pH-Wertes eine Rolle (Martinoia und Rentsch, 1994; Lai *et al.*, 2002b). Außerdem sind beide Isoformen an Stress- und Abwehrreaktionen beteiligt (Schaaf *et al.*, 1995; Ca-

sati *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2002a). Bei Tsuchida *et al.* (2001) führte die Überexpression der C<sub>4</sub>-spezifischen NADP-ME-Isoform aus Mais in den Chloroplasten von Reis zu Blattchlorosen und Wachstumshemmung durch ein erhöhtes NADPH-Level in den Chloroplasten. Hingegen wurden bei Überexpression der C<sub>3</sub>-spezifischen Isoform aus Reis keine derartigen nachteiligen Effekte beobachtet, selbst wenn dessen Aktivität fünfmal so hoch als in Nichttransformanden war. Miyao *et al.* (2011) vermuten, dass dies auf die deutlich unterschiedlichen K<sub>m</sub>-Werten für Malat und NADP<sup>+</sup> von C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-NADP-ME-Isoformen zurückzuführen ist. Kinetische Studien mit rekombinanten C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-NADP-ME-Isoformen aus Mais zeigten, dass die K<sub>m</sub>-Werte für Malat bei 0,43 bzw. 0,22 mM und die K<sub>m</sub>-Werte für NADP<sup>+</sup> bei 0,07 bzw. 0,008 mM liegen (Saigo *et al.*, 2004; Detarsio *et al.*, 2006). Das Verhältnis von NADPH zu (NADP<sup>+</sup> + NADPH) im Chloroplastenstroma liegt bei 0,35 bis 0,7 und ist unter Belichtung höher (Fridlyand *et al.*, 1998). Es ist denkbar, dass die hohe Affinität der C<sub>4</sub>-Isoform für NADP<sup>+</sup> und Malat es ermöglicht, die Reaktion in Richtung Decarboxylierung aufrecht zu erhalten, auch wenn die Konzentrationen an NADP<sup>+</sup> und Malat niedrig sind. Der Transport von Dicarbonsäuren über die innere Chloroplastenmembran erfolgt über Antiporter, welche Moleküle entlang ihrem Konzentrationsgradienten transportieren (Bräutigam und Weber, 2011). Der Verbrauch des Malats im Stroma führt folglich zu einer Malataufnahme aus dem Cytosol, obwohl Malat als Träger von Reduktionsenergie aus dem Stroma exportiert werden muss (Scheibe, 2004). Mit einer C<sub>3</sub>-spezifischen Isoform könnte die Reaktion nach Miyao *et al.* (2011) auch in Richtung Carboxylierung von Malat verlaufen, da das NADPH/(NADP<sup>+</sup> + NADPH)-Verhältnis unter Belichtung hoch und die Affinität des Enzyms für NADP<sup>+</sup> niedrig ist. Die C<sub>4</sub>-spezifische NADP-ME-Isoform aus Hydrilla bietet mit einem K<sub>m</sub>-Wert für Malat von 0,60 mM und einem K<sub>m</sub>-Wert für NADP<sup>+</sup> von 0,05 mM kinetische Eigenschaften (Estavillo *et al.*, 2007), die zwischen der C<sub>3</sub>-Isoform aus Reis und der C<sub>4</sub>-Isoform aus Mais liegen, was das Enzym zu einem geeigneten Kandidaten machte.

Beim zweiten in dieser Arbeit vorgeschlagenen Zyklus sollte durch Verwendung NAD-abhängiger Enzyme versucht werden, einen C<sub>4</sub>-Weg zu schaffen, der weniger in Licht- und Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus) der Photosynthese eingreift, welche beide NADPH bzw. NADP<sup>+</sup> als Reduktionsäquivalente nutzen. Wie die NADP-MDH-Aktivität ist auch die endogene NAD-MDH-Aktivität in C<sub>3</sub>-Pflanzen bereits ziemlich hoch. Aber während die endogenen NADP-MDH-Isoformen ausschließlich in den

Chloroplasten lokalisiert sind (Berkemeyer *et al.*, 1998), finden sich die endogenen NAD-Isoformen auch in Mitochondrien, Peroxisomen, Glyoxysomen sowie im Cytosol (Gietl, 1990; Gietl *et al.*, 1992). Die chloroplastidäre NAD-MDH-Isoform könnte eine Rolle beim Gleichgewicht der Reduktionsäquivalente im Dunkeln spielen, da sie im Gegensatz zu den NADP-abhängigen Isoformen auch im Dunkeln aktiv ist (Berkemeyer *et al.*, 1998). Da nicht klar war, ob die endogene chloroplastidäre NAD-MDH-Aktivität für einen C<sub>4</sub>-Zyklus ausreichen würde, wurde auch dieses Enzym (aus *E. coli*) überexprimiert. Vergleiche der beiden nahe verwandten Spinnenblumenarten *Cleome spinosa* (C<sub>3</sub>) und *Cleome gynandra* (C<sub>4</sub>) zeigten allerdings keine höheren NAD-MDH-Aktivitäten in der C<sub>4</sub>-Form (Bräutigam *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zur MDH-Aktivität ist die endogene NAD-ME-Aktivität in C<sub>3</sub>-Pflanzen niedrig. Das Enzym ist in den Mitochondrien lokalisiert und zusammen mit der PEPC an der anaplerotischen Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für die Aminosäurensynthese beteiligt (Douce und Neuburger, 1989). Außerdem spielt es eine Rolle bei der Koordination von Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus (Tronconi *et al.*, 2008). Für die NAD-abhängige Decarboxylierung des Malats in den Chloroplasten wurde das ME aus *E. coli* (*SfcA*, EC 1.1.1.38) gewählt, da es ein breites pH-Optimum bietet. Der optimale pH-Wert liegt bei pH 7,5, bei pH 8,0 zeigt es noch etwa 90% Aktivität (Yamaguchi *et al.*, 1973; Bologna *et al.*, 2007). Der optimale pH-Wert der pflanzlichen NAD-MEs hingegen liegt im leicht sauren Bereich bei pH 6,5 – 7. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Enzymaktivität stark ab, da er eine wichtige Rolle bei der Regulation spielt (Hatch *et al.*, 1974; Grover *et al.*, 1981; Willeford und Wedding, 1987). So zeigt zum Beispiel das NAD-ME aus *Hydrilla*, dessen pH-Optimum bei pH 7,2 liegt, nur noch 2% seiner Aktivität bei pH 8,3 (Magnin *et al.*, 1997). Hinsichtlich der Cosubstrate bevorzugt *SfcA* klar NAD<sup>+</sup> gegenüber NADP<sup>+</sup>. Mit NAD<sup>+</sup> ist die katalytische Effizienz 100-mal höher als mit NADP<sup>+</sup> (Bologna *et al.*, 2007). Neben der oxidativen Decarboxylierung von Malat kann *SfcA* auch Oxalacetat decarboxylieren, allerdings nur bei sauren pH-Werten (Yamaguchi *et al.*, 1973, Yamaguchi, 1979). Beim Vergleich der beiden Reaktionsrichtungen überwiegt die Decarboxylierung gegenüber der Carboxylierung deutlich. Selbst beim für die Carboxylierung optimalen pH-Wert von 7,0 ist die Decarboxylierungsrate 30-mal höher (Bologna *et al.*, 2007). Die Regeneration des HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Akzeptors PEP sollte durch die PPDK (EC 2.7.9.1) aus *F. trinervia* (NADP-ME-Typ) bzw. der PEP-Synthetase (EC 2.7.9.2) aus *E. coli* (NAD-

ME-Typ) erfolgen. Die endogene PPDK-Aktivität ist in C<sub>3</sub>-Pflanzen niedrig und je nach Art entweder nur in den Chloroplasten oder auch im Cytosol lokalisiert (Aoyagi und Bassham, 1984; Nomura *et al.*, 2000). Die Funktion der PPDK in C<sub>3</sub>-Pflanzen ist allerdings nicht ganz klar, für die Photosynthese spielt sie vermutlich keine Rolle (Chastain *et al.*, 2002). In *Hydrilla* verzehnfacht sich die PPDK-Aktivität während der Induktion des C<sub>4</sub>-Zyklus (Magnin *et al.*, 1997). Die Verwendung der PEPS an Stelle der PPDK liegt darin begründet, dass die PPDK vermutlich nicht das effizienteste Enzym für die PEP-Rückgewinnung darstellt und die PPDK-Reaktion gemeinhin als der limitierende Schritt der C<sub>4</sub>-Photosynthese gilt (Edwards *et al.*, 1985). In C<sub>4</sub>-Pflanzen wird die PPDK-Reaktion durch die zusätzliche Aktivität der beiden Enzyme Adenylat-Kinase und der anorganischen Pyrophosphatase unterstützt, welche die Entfernung inhibitorischer Endprodukte katalysieren. Ferner wird die PPDK-Aktivität stark durch die umgebende Adenylat-Energieladung (adenylate energy charge, AEC) bestimmt (Edwards *et al.*, 1985), welche das Verhältnis der Zahl energiereicher Phosphatbindungen zur Summe der Adenylat-Nukleotidkonzentrationen bezeichnet. Die bakterielle PEPS katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu PEP mit einer signifikant höheren Umsatzrate als die pflanzliche PPDK. Darüber hinaus ist die PEPS weniger kälteempfindlich und benötigt keine Pyrophosphatase, da sie kein PP<sub>i</sub> produziert. Daher könnte die bakterielle PEPS biochemische und physiologische Vorteile gegenüber der pflanzlichen PPDK für die Einführung eines C<sub>4</sub>-Zyklus in C<sub>3</sub>-Pflanzen bieten. Die Aktivität der PEPS wird ähnlich der PPDK durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert. Das hierfür zuständige Protein (in *E. coli* DUF299) zeigt deutliche Homologien zum PPDK-Regulator-Protein (PDRP). Kürzliche Versuche haben aber gezeigt, dass das endogene pflanzliche PDRP nicht im Stande ist, die PEPS aus *E. coli* zu inaktivieren (Burnell, 2010). Soll die PEPS reguliert werden, müsste DUF299 zusätzlich mit eingebracht werden. Das Gleichgewicht der PEPS-Reaktion liegt weit auf Seite der PEP-Bildung (Cooper und Kornberg, 1965) und würde somit die gewünschte Reaktionsrichtung favorisieren. Auch das pH-Optimum für die PEP-Bildung durch die PEPS aus *E. coli* liegt mit 8,4 in einem günstigen Bereich für den Einsatz in Chloroplasten (Cooper und Kornberg, 1974; Jakeman und Evans; 1998).

Beim PCK-Typ wurde die PCK aus *U. panicoides* für die Decarboxylierung von Oxalacetat in den Chloroplasten verwendet. Die endogene PCK-Aktivität in den Blät-

tern von C<sub>3</sub>-Pflanzen ist niedrig. Wie in C<sub>4</sub>-Pflanzen ist die PCK in C<sub>3</sub>-Pflanzen im Cytosol lokalisiert und hat hier je nach Gewebeart und Entwicklungsstadium unterschiedliche Funktionen. In Trichomen spielt das Enzym zum Beispiel eine Rolle bei der Pflanzenabwehr, indem es dem Shikimat-Weg PEP für die Synthese aromatischer Aminosäuren liefert (Leegood *et al.*, 1999). Hingegen ist es in Phloem-assoziierten Zellen vermutlich am Stickstoffmetabolismus sowie der pH-Regulation beteiligt (Walker *et al.*, 1999; Delgado-Alvarado *et al.*, 2007; Malone *et al.*, 2007). Die Verwendung der PCK als Decarboxylase hat den Vorteil, dass die Decarboxylierung von Oxalacetat direkt zu PEP führt, wodurch zwei Enzyme weniger für einen geschlossenen Zyklus benötigt werden. Da die Reaktion unabhängig von Reduktionsäquivalenten ist, lässt sie außerdem den Redoxstatus innerhalb der Chloroplasten unverändert. Als Cosubstrat wird nur ATP benötigt, welches durch zyklischen Elektronentransport produziert werden könnte. Dieser hätte keine Freisetzung von Sauerstoff zur Folge und würde somit nicht zu einer Stimulation der Photorespiration führen. Die PCK aus *U. panicoides* wurde verwendet, da sie bei Versuchen von Suzuki *et al.* (2000) vielversprechende Ergebnisse zeigte. Die PCK-Expression in den Chloroplasten von Reis führte hier zu einer teilweisen Umlenkung des Kohlenstoffflusses in Richtung eines C<sub>4</sub>-ähnlichen Weges. In einigen C<sub>4</sub>-Pflanzen wie *Panicum maximum* wird die PCK-Aktivität durch eine lichtabhängige Phosphorylierung reguliert (Walker und Leegood, 1996; Walker *et al.*, 1997). Das Enzym aus *U. panicoides* unterliegt aber nicht einer derartigen Regulation (Walker und Leegood, 1996).

#### 4.3.3 Chloroplastidäre Lokalisation der C<sub>4</sub>-Enzyme

Wie unter 3.2.6 beschrieben wurde die chloroplastidäre Lokalisation der verwendeten Enzyme bereits in früheren Arbeiten bestätigt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl fremde Transitpeptide von C<sub>3</sub>- (StRbcS-cTP, CmRbcS-cTP, LeRbcS-cTP, PPT-cTP) als auch C<sub>4</sub>-Enzymen (SbMdh-cTP, FtPPDK-cTP) in der C<sub>3</sub>-Pflanze Tabak erkannt und prozessiert werden. Für ME und PPDK von verschiedenen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass ihre Transitpeptide nur eine geringe Ähnlichkeit aufweisen (Lipka *et al.*, 1994; Matsuoka, 1995; Drincovich *et al.*, 2001). Auch die Ähnlichkeit des StRbcS-Transitpeptids aus *S. tuberosum* (Volter *et al.*, 1988) und des endogenen NtRbcS-Transitpeptids aus *N. tabacum* (Mazur und Chui, 1985) ist mit 75% niedrig. Trotz dieser geringen Ähnlichkeiten funktionieren die Transitpeptide

jedoch gut in Tabak. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Transitpeptide des MEs aus der dikotylen  $C_3$ -Pflanze *F. pringlei* in der dikotylen  $C_3$ -Pflanze Kartoffel und der PPDK aus der monokotylen  $C_4$ -Pflanze Mais in der dikotylen  $C_3$ -Pflanze Arabidopsis berichtet. Es scheint, dass die gemeinsamen Eigenschaften der Transitpeptide, wie ein hoher Gehalt an hydrophoben und hydroxylierten Aminosäuren, ein niedriger Gehalt an sauren Aminosäuren und daher einer positiven Nettoladung (van't Hof und Kruijff, 1995) in erster Linie für ihre Funktion verantwortlich sind.

Das StRbcS-Transitpeptid erlaubte auch eine Lokalisation des Oac1-Translokators, welcher in Hefe in der Mitochondrienmembran sitzt, in die Chloroplastenmembran von Tabak (3.2.1). Smeeckens *et al.* (1987) konnten bereits zeigen, dass durch das Transitpeptid von Ferredoxin (Chloroplastenstroma) eine Lokalisation des mitochondrialen Stromaproteins Mangan-Superoxid-Dismutase in das Chloroplastenstroma möglich ist. Im Falle des Oac1-Translokators sollte die Lokalisation aber nicht in das Stroma, sondern in die innere Chloroplastenmembran erfolgen. Da die Abspaltung des Transitpeptids des PEP-Translokators nicht an der vorhergesagten Stelle erfolgte (3.2.1), wurde das StRbcS-Transitpeptid verwendet, obwohl die RUBISCO normalerweise im Stroma lokalisiert ist. Knight und Gray (1995) konnten aber zeigen, dass hydrophobe Regionen innerhalb des reifen Phosphat-Translokators aus Erbse (*Pisum sativum*) für eine Lokalisation des Proteins in die innere Chloroplastenmembran sorgten, selbst wenn für den Import das Transitpeptid der kleinen Untereinheit von RUBISCO aus Erbse (PsRbcS-cTP) zum Einsatz kam. Die hydrophoben Regionen innerhalb des Oac1-Translokators scheinen also ebenfalls dazu in der Lage zu sein, das Protein in die innere Chloroplastenmembran zu lenken.

#### 4.3.4 $CO_2$ -Konzentrierung durch die putativen $C_4$ -Zyklen?

Die bisherigen Ergebnisse sprechen nicht dafür, dass die eingebrachten putativen  $C_4$ -Zyklen zu einer Erhöhung der  $CO_2$ -Konzentration in den Chloroplasten führen. Weder der  $CO_2$ -Kompensationspunkt (3.2.16) noch die Sauerstoffinhibierung (3.2.17) der Photosynthese sind signifikant erniedrigt. Beide Parameter stellen wichtige Kennzeichen für eine  $CO_2$ -Konzentrierung um die RUBISCO dar. Auch die Photorespirationsrate ist nicht verringert, wie die Untersuchung der  $NH_3$ -Freisetzung zeigte (3.2.15). Dies bedeutet aber nicht, dass die eingebrachten  $C_4$ -Zyklen überhaupt nicht ablaufen, es könnte auch sein, dass sie nicht die notwendige Aktivität erreichen. Ma-

thematische Modelle von „Single-Cell“-C<sub>4</sub>-Wegen nach dem Vorbild Hydrilla ergaben, dass für eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in den Chloroplasten die Aktivität des C<sub>4</sub>-ähnlichen Weges mindestens 38% der maximalen Carboxylase-Aktivität der RUBISCO unter den atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen erreichen muss (von Caemmerer, 2003). Hierfür wäre ein entsprechend hoher Fluss durch den C<sub>4</sub>-ähnlichen Zyklus notwendig. Unzureichende Enzymaktivitäten oder ein ineffizienter Transport der Metabolite Oxalacetat und PEP über die Chloroplastenmembran könnten diesen verhindern. Bei der Untersuchung der Enzymaktivitäten in den transgenen Tabakpflanzen fielen vor allem die niedrigen PEPC-Aktivitäten auf. In den meisten Pflanzen wurde maximal eine Verdopplung der PEPC-Aktivität erzielt. Hingegen steigt die PEPC-Aktivität in Hydrilla während der Induktion des C<sub>4</sub>-Zyklus um den Faktor 15 (Magnin *et al.*, 1997). Verglichen mit den C<sub>4</sub>-Pflanzen Mais und Amarant wurde in den Pflanzen mit der höchsten Aktivität 20% (NADP-ME-Zyklus) bzw. 30% (NAD-ME-Typ) der PEPC-Aktivität erreicht. Dies entspricht einer Erhöhung der endogenen Aktivität um den Faktor 4-10. Diese relativ hohen Werte wurden jedoch nur bei Berechnung der Aktivität auf Basis des Gesamtproteingehaltes erhalten. Da die Pflanzen gleichzeitig eine sehr hohe ME-Aktivität aufwiesen waren sie chlorotisch und besaßen einen deutlich niedrigeren Proteingehalt. Bezogen auf die Blattfläche entsprach die Erhöhung nur einer Verdopplung bis maximal Vervierfachung.

Eine Ursache für die niedrigen PEPC-Aktivitäten könnten Silencing-Effekte sein. Die Inaktivierung eines Transgens durch Silencing ist ein bei Pflanzen häufig beobachtetes Phänomen (Flavell, 1994; Meyer und Saedler, 1996; Stam *et al.*, 1997). Es tritt bevorzugt auf, wenn ein Transgen mehrfach ins Genom integriert worden ist und kann sowohl auf DNA-Ebene, als transkriptionales Gen-Silencing (TGS), als auch auf RNA Ebene, als posttranskriptionales Gen-Silencing (PTGS), erfolgen. Bei der Transformation mittels Agrobakterien, wie sie hier verwendet wurde, erhält man allerdings bevorzugt „Single-Copy“-Integrationen. Wenn Homologien zu endogenen Genen bestehen, kann es aber auch bei Transgenen, welche als Einzelkopie vorliegen, zu Silencing kommen. In diesem Fall sind sowohl das Transgen als auch das endogene Gen von der Inaktivierung betroffen, weshalb es auch als Co-Suppression oder HdGS (homology-dependent gene silencing) bezeichnet wird (Meyer und Saedler, 1996). Da die Homologie des *stppc*-Gens zum nahe verwandten endogenen *ntppc*-Gen mit 87% ziemlich hoch ist, könnte dessen Expression durch eine solche

Co-Suppression blockiert werden. Eine Analyse der *ntppc*-Expression zeigte, dass diese in den transgenen Pflanzen tatsächlich signifikant erniedrigt war. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die Grenze, über der HdGS auftreten kann, in einem Bereich von etwa 80% liegt. Bei Expressionsanalysen von Thierry und Vaucheret (1996) führten Transgene mit einer Homologie von 84% zu „silencing“, während Transgene mit einer Homologie von 76% nicht inaktiviert wurden. Aber auch die Verwendung des PEPC-Gens aus *Hydrilla*, welches mit 73% einen deutlich geringeren Homologiegrad besitzt, führte nicht zu Pflanzen mit hoher PEPC-Aktivität. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Pflanzen mit (sehr) hoher PEPC-Aktivität nicht überlebensfähig sind. Bei Hudspeth *et al.* (1991) führte schon die Verdopplung der PEPC-Aktivität in Tabak durch Expression des PEPC-Gens aus Mais zu einem signifikant erhöhten Säuregehalt. Die Absenkung des zyttoplasmatischen pH-Wertes könnte wichtige Enzyme in ihrer Funktion beeinträchtigen. Bei einer effektiven Decarboxylierung der C<sub>4</sub>-Säuren in den Chloroplasten in einem geschlossenen C<sub>4</sub>-Zyklus sollte dieser Effekt aber nicht auftreten oder zumindest vermindert werden. Mit den bisherigen Daten lässt sich also nicht eindeutig belegen, auf was die niedrigen PEPC-Aktivitäten zurückzuführen sind. Die Cosuppression des endogenen *ntppc*-Gens sprechen für silencing, die niedrigen PEPC-Aktivitäten mit *hvpepc* für physiologische Grenzen. Vermutlich ist es eine Kombination aus beidem.

Ein weiterer Grund für einen niedrigen Fluss durch den Zyklus könnte der ineffiziente Transport von Oxalacetat in die Chloroplasten sein. Es muss noch genauer untersucht werden, ob der verwendete *Oac1*-Translokator diese Aufgabe erfüllen kann. Zwar konnte dessen Lokalisation in die innere Chloroplastenmembran gezeigt werden, allerdings ist noch nicht klar, ob der ursprünglich mitochondrial lokalisierte Translokator in einer funktionsfähigen Form in die Chloroplastenmembran integriert wird. Der Versuch eines indirekten Nachweises über eine veränderte Expression des endogenen chloroplastidären NADP-MEs (*Nt-nadp-me1*) in PPT/*stppc*/*Oac1*-Pflanzen lieferte keinen Hinweis darauf. Bei einem erfolgreichen Import wäre es denkbar gewesen, dass die endogene Expression der chloroplastidären NADP-MEs erhöht ist, so wie die Expression des zytosolischen NADP-MEs in den Kartoffelpflanzen mit alleiniger überexprimierter *stppc* von Rademacher (Dissertation Thomas Rademacher, Institut für Biologie I, RWTH Aachen, 2002). Stattdessen war sie aber um 50% signifikant erniedrigt und damit sogar niedriger als in den Pflanzen mit heterolo-



ger Expression einer Decarboxylase in den Chloroplasten (HvMe: -25%, EcMe: -35%) (3.2.10). Signifikant erhöht war hingegen die Expression des endogenen zytosolischen NADP-MEs (*Nt-nadp-me2*), was für eine Decarboxylierung des Malats im Cytosol spricht. Da das zytosolische NADP-ME bei der Regulation des pH-Wertes eine Rolle spielt (Davies, 1986; Roberts *et al.*, 1992), könnte die erhöhte Expression dazu dienen, der Erniedrigung des pH-Wertes durch die PEPC entgegenzuwirken. Die Expression der Endogene *Nt-nadp-me1* und *Nt-nadp-me2* verändert sich aber auch als Reaktion auf diverse andere Stressbedingungen (Müller *et al.*, 2008).

Ein Vergleich der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (3.2.12) lieferte ebenfalls keinen Hinweis auf eine  $\text{CO}_2$ -Fixierung über die eingebrachten  $\text{C}_4$ -Wege. In den transgenen Pflanzen waren die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte sogar leicht niedriger (negativer) als in den Kontrollpflanzen. Allerdings zeigen auch die meisten  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$ -Zwischenformen von *Flaveria* Isotopenverhältnisse wie  $\text{C}_3$ -Pflanzen (Monson *et al.*, 1986; Edwards und Ku, 1987; Monson *et al.* 1988; Gowik *et al.* 2011), so dass in diesem Parameter nicht unbedingt ein Unterschied zu erwarten war.

Die signifikant erniedrigten C/N-Verhältnisse könnten auf einen verstärkten Kohlenstoffverlust in den transgenen Pflanzen zurückzuführen sein. In Versuchen von Ku *et al.* (1999) führte die Expression der  $\text{C}_4$ -spezifischen PEPC-Isoform aus Mais in Reis neben einer erhöhten  $\text{CO}_2$ -Fixierung in organischen Säuren ebenfalls zu höheren Stickstoffkonzentrationen. Osaki und Shinano (2000) erklären dieses Phänomen damit, dass mehr organische Säuren im Calvin-Zyklus veratmet werden. Darauf deuten auch die gemessenen Konzentrationsanstiege der Metabolite des Calvin-Zyklus hin (3.2.19.4). Der beobachtete Anstieg der zytosolischen ME-Aktivität (3.2.10) trägt ebenfalls zum Kohlenstoffverlust bei. Bei einer  $\text{CO}_2$ -Konzentrierung innerhalb der Chloroplasten würde man eher höhere C/N-Verhältnisse erwarten. So führt die Anzucht von Pflanzen unter erhöhten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen in der Regel zu niedrigeren Stickstoffkonzentrationen in den Blättern (Ainsworth und Long, 2005).

Ein Problem der  $\text{CO}_2$ -Konzentrierung in den Chloroplasten von  $\text{C}_3$ -Pflanzen durch einen  $\text{C}_4$ -ähnlichen Zyklus könnte die niedrige interne Resistenz für die  $\text{CO}_2$ -Diffusion sein, welche für die  $\text{C}_3$ -Photosynthese erforderlich ist. Ein Großteil des eben freigesetzten  $\text{CO}_2$  könnte verloren gehen. Die Arbeiten von Kebeish *et al.* (2007) haben zwar gezeigt, dass prinzipiell eine  $\text{CO}_2$ -Konzentrierung in den Chloroplasten möglich ist, dennoch könnte hier Optimierungsbedarf bestehen. Für  $\text{C}_4$ -Pflanzen wurde ge-

zeigt, dass eine hohe Bündelscheiden-Resistenz gegenüber CO<sub>2</sub> eine wichtige Eigenschaft für eine effiziente C<sub>4</sub>-Photosynthese darstellt. Wie Hydrilla dieses Problem beim Umschalten von C<sub>3</sub>- auf C<sub>4</sub>-Photosynthese löst ist bisher nicht bekannt. Reiskind et al. (1997) vermuteten, dass ein Komplex zwischen NADP-ME und RUBISCO die Refixierung des CO<sub>2</sub> unterstützt, ähnlich der Verbindung von CA und RUBISCO in den Carboxysomen von Cyanobakterien (Kaplan und Reinhold, 1999; Badger et al., 2006). Für einen solchen Komplex wurden bis dato aber keine Beweise gefunden. Bowes et al. (2007) nehmen an, dass Aquaporine an der veränderten CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit beteiligt sind. In Tabak erleichtert zum Beispiel das Aquaporin NtAQP1 den CO<sub>2</sub>-Transport über die Plasmamembran (Uehlein et al., 2003; Flexas et al., 2006). Eine Unterdrückung der NtAQP1-Expression reduziert die CO<sub>2</sub>-Permeabilität sowie die Photosyntheserate. Aquaporine sind auch mit der äußeren Chloroplastenmembran assoziiert, welche eine höhere Durchlässigkeit für CO<sub>2</sub> besitzt als die innere Membran (Raven et al., 2002; Tetlow et al., 2005). Falls Aquaporine wirklich einen Einfluss auf die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit in Hydrillablättern haben, sollte ihre Expression in der Chloroplastenhülle, aber nicht der Plasmamembran, herunterreguliert werden. Außerdem sollte das Level der Carboanhydrase in den Chloroplasten reduziert werden. Die Expression einer Carboanhydrase in den Bündelscheiden-Chloroplasten von *F. bidentis* führte zu einer erhöhten Undichtigkeit für anorganischen Kohlenstoff und dadurch zu einer geringeren CO<sub>2</sub>-Assimilation (Ludwig et al., 1998).

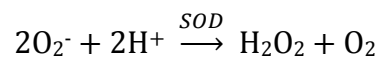
Ein möglicher positiver Effekt der putativen C<sub>4</sub>-Zyklen könnte auch durch eine Akklimatisierung der Pflanzen an die höheren CO<sub>2</sub>-Konzentrationen wieder verloren gehen. In Versuchen C<sub>3</sub>-Pflanzen unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen anzuziehen, zeigten diese teilweise nur anfangs eine Stimulation der Photosyntheseraten. Bei längerer Exposition reagierten jedoch viele Arten mit einer Herunterregelung der RUBISCO-Aktivität (Makino und Mae, 1999). Die Anzucht der Pflanzen unter Bedingungen, unter denen ein CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus deutliche Vorteile bringt, könnte diese Anpassung verhindern.

#### **4.3.5 Auswirkungen der erhöhten C<sub>4</sub>-Enzymaktivitäten**

Die hohen Expressionen des eingebrachten NADP-abhängigen HvMe oder des NAD-abhängigen EcMe in Tabak führten zu einer starken Blattchlorose und einer erheblichen Wachstumsretardierung (siehe 3.2.9). Diese Effekte wurden von Tsuchida et al. (2001) auch schon in Reis nach Überexpression des NADP-MEs aus Mais beobach-

tet. Sie postulieren, dass diese nachteiligen Auswirkungen aus einer verstärkten Photoinhibition resultieren, welche auf einen Anstieg des NADPH-Levels im Chloroplastenstroma durch die Aktivität des Maisenzym zurückzuführen sei. Bei einem gesteigerten NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis entstehen durch die Mehler-Reaktion vermehrt Sauerstoffradikale, welche irreversible Schäden am Photosyntheseapparat verursachen sowie zu einer Reduktion des Chlorophyll- und RUBISCO-Gehaltes führen können. Die Messung der chloroplastidären Pigmente ergab, dass der Chlorophyllgehalt in diesen Pflanzen tatsächlich erniedrigt war (3.2.13). Aber auch in transgenen Tabakpflanzen mit reduzierter RUBISCO-Aktivität (Hudson *et al.*, 1992) oder erhöhter PEPC-Aktivität (Kogami *et al.*, 1994) wird von einer Erniedrigung des Chlorophyllgehaltes berichtet.

Zum Schutz vor solchen oxidativen Schäden sorgt das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) für einen schnellen Abbau der Sauerstoffradikale:

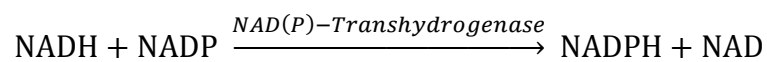


Das dabei entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird entweder durch die Katalase zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> umgewandelt oder von der Ascorbat-Peroxidase über die Oxidation von Ascorbinsäure zu H<sub>2</sub>O reduziert (Kuzniak *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000).

Bei den Superoxid-Dismutasen unterscheidet man basierend auf ihrem metallischen Cofaktor drei verschiedene Klassen: Mangan (MnSOD), Eisen (FeSOD) und Kupfer/Zink (Cu/ZnSOD) (Bannister *et al.*, 1987). Diese sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert. MnSOD kommt in den Mitochondrien, FeSOD in den Chloroplasten und Cu/ZnSOD sowohl im Cytosol als auch den Chloroplasten vor (Bowler *et al.*, 1989; van Camp *et al.*, 1990; Tsang *et al.*, 1991; Kurepa *et al.*, 1997). Die Hauptaufgabe der chloroplastidären SOD in Pflanzen ist die Entfernung von am Photosystem I gebildeten Superoxid-Radikalen (Asada *et al.*, 1987). Es wird vermutet, dass der Abbau von Superoxid-Radikalen in Tabak hauptsächlich durch die FeSOD (*NtSODB*) und nicht die Cu/ZnSOD bewerkstelligt wird (Slooten *et al.*, 1995; Kurepa *et al.*, 1997). Die Regulation der SOD findet sowohl auf Transkriptions- als auch Translationsebene statt. Cortleven *et al.* (2011) beobachteten in Tabak, dass oxidativer Stress, welcher durch Erhöhung des Cytokiningehaltes induziert wurde, eine Erhöhung des FeSOD-Transkriptlevels (*NtSODB*) bewirkte. Das gleiche Ergebnis erzielten Kurepa *et al.* (1997) durch Behandlung von Tabakpflanzen mit dem synthetischen Cytokinin Kinetin. Hingegen führte die Behandlung von Pflanzen mit Prooxi-

dantien wie Paraquat und Norflurazon zu unterschiedlichen Ergebnissen (Übersicht siehe Pilon *et al.*, 2011).

Die Untersuchung der *NtSODB*-Expression auf RNA-Ebene durch Real-Time-PCR zeigte tatsächlich einen signifikanten Anstieg der *NtSODB*-Transkripte in den C4\_HvMe-Pflanzen. Aber auch in den C4\_EcMe-, C4\_PCK- sowie den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen wurde ein höherer Transkript-Level gemessen. In den C4\_EcMe-Pflanzen wäre es denkbar, dass sich ein durch NAD-ME verändertes NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis über eine NAD(P)-Transhydrogenase oder indirekt über Substratzyklen (z.B. unter Beteiligung von NADP- und NAD-MDH) auch auf das NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis auswirkt (Burrows *et al.*, 1998):



In den C4\_PCK-Pflanzen wird zwar kein zusätzliches NADPH bei der Decarboxylierung generiert, allerdings könnte der Verbrauch des OAA durch die PCK ebenfalls den Export von Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten verringern. In den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen könnte bereits ein vermehrter Malat-Import zu einem veränderten NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis führen. Aber während der Chlorophyllgehalt in den PCK-Pflanzen ebenfalls erniedrigt war, war er in den PPT/stppc/Oac1-Pflanzen sogar erhöht (3.2.13).

Eine Erschöpfung des Malatpools im Chloroplastenstroma führt wahrscheinlich auch zu einer Hemmung der Photorespiration, da 2-Oxoglutarat im Austausch für Malat durch den 2-Oxoglutarat-Transporter in die Chloroplasten für die Photorespiration importiert werden muss (Flügge und Heldt, 1991). Eine Hemmung der Photorespiration würde dann die Regeneration von RuBP für den Calvin-Zyklus verzögern, was wiederum zu einer Stimulation der Photoinhibition führt. Eine Untersuchung des Malatgehaltes zeigte, dass dieser in Blättern von Pflanzen mit hoher ME-Aktivität signifikant erniedrigt war (3.2.19.3). Allerdings wurde nur der Gesamtgehalt an Malat gemessen und nicht speziell derjenige in den Chloroplasten. Wie unter 3.2.10 gezeigt, war die Expression des endogenen cytosolischen MEs in diesen Pflanzen ebenfalls erhöht, was zu den niedrigen Malatgehalten beitragen könnte. Eine signifikante Reduktion des Malatgehalts in den Blättern transgener Arabidopsis-Pflanzen, welche das C<sub>4</sub>-spezifische NADP-ME aus Mais exprimierten, wird auch von Fahnenstich *et al.* (2007) berichtet. Hingegen beobachteten Tsuchida *et al.* (2001) höhere Malatgehalte in den ausgebleichten Blättern ihrer Reispflanzen mit hoher NADP-ME-Aktivität,

was sie als eine typische Reaktion auf Stressbedingungen erklärten (Lance und Rustin, 1984). Es ist auch wahrscheinlich, dass die Malatdecarboxylierung zu einer Verschwendung von bereits assimiliertem Kohlenstoff führt. Solch ein Effekt würde das Wachstum der Tabakpflanzen selbst unter Schwachlichtbedingungen hemmen. Takeuchi *et al.* (2000) vermuten zudem eine Beeinträchtigung der Entwicklung der Chloroplasten durch eine hohe chloroplastidäre NADP-ME-Aktivität. Reispflanzen mit 20-70-fach erhöhter NADP-ME-Aktivität (aus Mais) zeigten in ihren Versuchen anormale Chloroplasten ohne Granathylakoide. Normal besitzen nur die Bündelscheidenzellen von  $C_4$ -Pflanzen vom NADP-ME-Typ granumfreie Chloroplasten (Edwards und Walker, 1983). Des Weiteren beobachteten sie eine umgekehrte Korrelation des Chlorophyllgehaltes und der Aktivität des Photosystems II mit dem Level der NADP-ME-Aktivität, was sich unter anderem dadurch erklären lässt, dass die Granathylakoide gegenüber den Stromathylakoiden mehr Pigmente und Photosystem II-Komplexe enthalten. Weniger Photosystem II-Komplexe würde sich in einem veränderten Chlorophyll a/b-Verhältnis äußern, da die beiden Photosysteme unterschiedliche Mengen der beiden Chlorophyll-Typen besitzen. In  $C_3$ -Chloroplasten enthält der Lichtsammelkomplex des Photosystems I hauptsächlich Chlorophyll a, während der Lichtsammelkomplex des Photosystems II etwa gleiche Mengen an Chlorophyll a und b beinhaltet. Eine wie von Takeuchi *et al.* (2000) berichtete Zunahme des Chlorophyll a/b-Verhältnisses konnte in den transgenen Tabakpflanzen aber nicht gefunden werden.

Die transgenen Tabakpflanzen mit NAD-ME waren in jedem Fall chlorotisch und in ihrem Wachstum gehemmt, während die NADP-ME-Pflanzen keine solch negativen Effekte zeigten, solange die Aktivität nicht zu hoch war (rel. Aktivität unter 7). Die spezifische Aktivität (mU/mg Protein) war in allen NAD-ME-Pflanzen aber auch mindestens um den Faktor 10 höher als in den nicht chlorotischen NADP-ME-Pflanzen. Neben unterschiedlichen Proteinniveaus (nicht untersucht) könnte dies auf die verschiedenen kinetischen Eigenschaften der beiden Enzyme zurückzuführen sein. Die  $K_{m, \text{Malat}}$ -Werte liegen mit 0,60 mM (Estavillo *et al.*, 2007) für das Hydrilla-Enzym und 0,42 mM für das *E. coli*-Enzym (Wang *et al.*, 2007) in einer ähnlichen Größenordnung. Jedoch ist die Umsatzrate  $V_{\text{max}}$  des bakteriellen Enzyms mit 125,47 (Wang *et al.*, 2007) fast viermal so hoch, wie die des pflanzlichen Enzyms mit 33,2 (Estavillo *et al.*, 2007). Die *in vivo*-Aktivität von EcMe könnte daher deutlich höher sein als die von

HvMe. Allerdings wird die Aktivität auch noch durch mehrere Effektoren reguliert. EcMe wird durch Aspartat aktiviert und OAA gehemmt (Bologna et al., 2007). Hingegen wird HvMe durch Succinat aktiviert und Aspartat gehemmt (Estavillo *et al.*, 2007).

Phänotypische Auswirkungen durch die Expression der anderen C<sub>4</sub>-Gene wurden nicht beobachtet. Während Rademacher (Dissertation, Institut für Biologie I, RWTH Aachen, 2002) von einer starken Wachstumshemmung der Kartoffelpflanzen mit hoher Aktivität der modifizierten PEPC berichtet, trat dieser Effekt mit Tabak nicht auf. Die unphysiologisch hohen PEPC-Aktivitäten können sich aber in mehrfacher Hinsicht auf den Stoffwechsel auswirken. Zum einen führt die Erhöhung der Konzentration von C<sub>4</sub>-Säuren (Oxalacetat, Malat, Aspartat) zu einer Absenkung des zytoplasmatischen pH-Wertes, wodurch wichtige Enzyme in ihrer Funktion beeinträchtigt werden könnten. So führte bei Hudspeth *et al.* (1991) schon die Verdopplung der PEPC-Aktivität in Tabak durch Expression des PEPC-Gens aus Mais zu einem signifikant erhöhten Säuregehalt. Zum anderen wird dem Stoffwechsel PEP entzogen, welches als besonders energiereiche Verbindung in vielen Stoffwechselwegen eine wichtige Rolle spielt. So dient PEP zum Beispiel als Ausgangssubstanz für die Bildung von Pyruvat, welches zur Energiegewinnung in den Citrat-Zyklus eingespeist wird. Ein zu starker Verbrauch des PEP durch die PEPC könnte zu einer Hemmung dieses zentralen Zyklus führen. Signifikant erniedrigte PEP-Konzentrationen konnten aber nur in den C<sub>4</sub>\_EcMe-Pflanzen gemessen werden (3.2.19.4). Entweder war die PEPC-Aktivität dafür zu niedrig oder es wird durch die anderen eingebrachten C<sub>4</sub>-Enzyme effizient regeneriert.

Das Produkt der PEPC, Oxalacetat, wird schnell in nichtphosphorylierte Verbindungen wie Malat oder Aspartat umgesetzt oder kann in Citratzyklus zur Bildung von 2-Oxoglutarat eingehen. 2-Oxoglutarat kann dann über den GS/GOGAT-Zyklus für die Aminosäurebiosynthese verwendet werden (Goodwin und Mercer, 1983). Da PEP auch über glykolytische Reaktionswege bereitgestellt werden kann (Huppe und Turpin, 1994; Stitt, 1999), kann die Überexpression einer physiologisch aktiven PEPC, wie von Rademacher *et al.* (2002) beschrieben, den Fluss von Kohlenstoffgerüsten in organische Säuren und Aminosäuren zu Lasten der Zucker erhöhen. Eine Erhöhung von Aminosäuren (+27%) und Malat (+26%) konnte auch in den PPT/stppc/PPT-Pflanzen gemessen werden. Hingegen war in den Pflanzen mit den kompletten Zyk-

len die Malat-Konzentration durch die hochaktiven Decarboxylasen wie erwartet verringert (4\_C4\_HvMe: -20%, 13\_C4\_HvMe: -45%, 9\_C4\_EcMe: -32%, 25\_C4\_PCK: -22%). Mit Ausnahme der C4\_EcMe-Pflanzen (9\_C4\_EcMe: +48%) war in diesen Pflanzen auch keine Erhöhung der Aminosäurenkonzentration zu beobachten (4\_C4\_HvMe:  $\pm 0\%$ , 13\_C4\_HvMe: -36%, 25\_C4\_PCK: -6%). Die Aktivität der anderen C<sub>4</sub>-Enzyme scheint diesen Effekt also aufzuheben oder sogar umzukehren. Dies ist etwas überraschend, da die Konzentration der Aminosäuren-Vorstufe 2-Oxoglutarat in diesen Pflanzen deutlich erhöht ist (3.2.19.4) (4\_C4\_HvMe: +84%, 25\_C5\_PCK: +126%).

Eine Untersuchung des Verhältnisses von Pyruvat zu PEP in den transgenen Pflanzen ergab (3.2.19.4), dass es in den C4\_HvMe-Pflanzen (ca. 4:1) deutlich höher war als in den C4\_EcMe-Pflanzen (ca. 2:1). Auch wenn die PEP-Konzentration selbst in den C4\_EcMe im Vergleich zu den Kontrollpflanzen erniedrigt war, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die PEPS tatsächlich besser für die PEP-Regeneration geeignet ist als die PPDK. Während das Gleichgewicht der PEPS-Reaktion weit auf Seiten der PEP-Bildung liegt (Cooper und Kornberg, 1965), wird die PPDK-Reaktion in C<sub>4</sub>-Pflanzen erst durch die hohe Aktivität der Pyrophosphatase in Richtung PEP-Bildung gelenkt. Eine zusätzliche Expression der Pyrophosphatase könnte in den C4\_HvMe-Pflanzen notwendig sein. Darauf deutet auch die deutlich höhere Expression der Pyrophosphatase in der C<sub>4</sub>-Pflanze *Cleome gynandra* im Vergleich zur nahe verwandten C<sub>3</sub>-Pflanze *Cleome spinosa* hin (Bräutigam *et al.*, 2011)

#### 4.3.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MultiRound-Gateway-Technologie eine geeignete Strategie zur Konstruktion von Multigen-Konstrukten darstellt. Das nun vorhandene Set an Entry- und Destinationvektoren wird zukünftige Transformationen multipler Gene erheblich erleichtern. Für Tabak (Agrobakterienvermittelt) und Reis (biolistisch) konnte gezeigt werden, dass sich diese Pflanzen effizient mit den Multigen-Konstrukten transformieren lassen. Der Transfer einer noch größeren Zahl an Genen sollte daher möglich sein. In ersten Versuchen konnte auch Arabidopsis mittels der „Floral-Dip“-Methode mit den Multigen-Konstrukten transformiert werden. Allerdings scheint die Effizienz hier mit zunehmender Größe des Destination-Vektors stark abzunehmen. Hier sind weitere Versuche notwendig.

Mittels der MultiRound-Gateway-Technologie konnten Tabakpflanzen erzeugt werden, welche die Gene für drei verschiedene putative C<sub>4</sub>-Zyklen exprimieren. Die bisherigen Versuche wie die Messung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes und der Sauerstoffinhibierung konnten aber keine CO<sub>2</sub>-Konzentrierung innerhalb der Chloroplasten belegen. Nun gilt es zu zeigen, ob der C<sub>4</sub>-Zyklus in den Pflanzen zwar abläuft, die CO<sub>2</sub>-Konzentrierung aber an einem zu geringen Durchfluss bzw. der zu hohen CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der Chloroplasten scheitert. Die CO<sub>2</sub>-Einbaurrate in C<sub>4</sub>-Säuren könnte durch eine Kurzeitmarkierung mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> und anschließender Dünnschichtchromatographie ermittelt werden. Mit Hilfe der Silikonöl-Filtrationszentrifugation und <sup>14</sup>C-markiertem Oxalacetat ließe sich der Oac1-Translokator testen (Heldt, 1980; Gross *et al.*, 1990).

Ebenfalls mit Hilfe der MultiRound-Gateway-Technologie wurden Reispflanzen erzeugt, welche den Glykolatweg aus *E. coli* exprimieren. Bisher konnte die Expression der Gene auf RNA-Ebene sowie die Funktion des GAPDH- und des RbcS-Transitpeptids gezeigt werden. Mittels Antikörper soll jetzt noch die Expression auf Proteinebene sowie die Funktion der anderen Transitpeptide (PPDK-cTP, Cab7-cTP) überprüft werden. Anschließend kann die Auswirkung des chloroplastidären photorespiratorischen Bypasses auf photosynthetische Parameter und den Phänotyp untersucht werden.



## 5 Anhang

### 5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Thylakoidmembran in Chloroplasten.....	3
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung Calvin-Zyklus.....	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Doppelfunktion von RUBISCO.....	7
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Photorespiration in C <sub>3</sub> -Pflanzen.....	8
Abbildung 1.5: Verschiedene Typen der C <sub>4</sub> -Photosynthese.....	11
Abbildung 1.6: „Single Cell“-C <sub>4</sub> -Photosynthese in <i>Hydrilla verticillata</i> .....	14
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des CAM-Weges.....	16
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des photorespiratorischen Weges (schwarz) in C <sub>3</sub> -Pflanzen und der vorgeschlagene Weg (rot) für die Umsetzung des Glykolats zu Glycerat.....	23
Abbildung 1.9: Calvin-Zyklus.....	26
Abbildung 2.1: Plasmide mit den synthetisierten Attachment sites.....	35
Abbildung 2.2: Entry-Plasmide für Gateway-Rekombination.....	37
Abbildung 2.3: Destination-Vektoren für Gateway-Rekombination.....	38
Abbildung 2.4: Entry-Plasmide mit C <sub>4</sub> -Genen.....	42
Abbildung 2.5: pYLTA7_C4_HvMe.....	43
Abbildung 2.6: pYLTA7_C4_EcMe.....	44
Abbildung 2.7: pYLTA7_C4_PCK.....	45
Abbildung 2.8: pYLTA7_leer.....	46
Abbildung 2.9: RFP-Plasmide.....	47
Abbildung 2.10: pCR2.1-TOPO-Plasmide für in vitro Import-Assay.....	48
Abbildung 2.11: Plasmide zur Erhöhung der PEPC-Aktivität.....	50
Abbildung 2.12: Entry-Plasmide mit Genen für Glykolat-Weg aus <i>E. coli</i> .....	51
Abbildung 2.13: Destination-Plasmid mit Genen für Glykolat-Weg aus <i>E. coli</i> .....	53
Abbildung 2.14: eGFP-Plasmide zur Kontrolle der Transitpeptide aus <i>Z. mays</i> .....	55
Abbildung 2.15: Gateway LR-Reaktion.....	68
Abbildung 3.1: Design der Entry-Vektoren für MultiRound-Gateway-Rekombination.....	98
Abbildung 3.2: MultiRound-Gateway.....	101
Abbildung 3.3: „Single-Cell“-C <sub>4</sub> -ähnlicher Zyklus in <i>N. tabacum</i> .....	104
Abbildung 3.4: Oac1-Lokalisationsanalysen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	106
Abbildung 3.5: In vitro Import des Oac1-Translokators mit StRbcS-cTP.....	107
Abbildung 3.6: In vitro Import des Oac1-Translokators mit PPT-cTP.....	108
Abbildung 3.7: Anordnung der Genexpressionskassetten in den Destination-Vektoren.....	110
Abbildung 3.8: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 5. Rekombinationsrunde.....	111
Abbildung 3.9: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 6. Rekombinationsrunde.....	112
Abbildung 3.10: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 7. Rekombinationsrunde.....	113
Abbildung 3.11: Kolonie-PCR auf Destination-Plasmide in <i>A. tumefaciens</i> AGL1.....	116

Abbildung 3.12: Transiente Expression der C <sub>4</sub> -Gene in Tabak .....	118
Abbildung 3.13: Transgen-Expressionslevel in Tabakpflanzen der T <sub>0</sub> -Generation .....	120
Abbildung 3.14: Stabilität der Transgenexpression in Tabakpflanzen der T <sub>0</sub> -Generation .....	121
Abbildung 3.15: Spezifische und relative Enzymaktivitäten in Tabakpflanzen der T <sub>0</sub> -Generation.....	123
Abbildung 3.16: Transgen-Expressionslevel in Tabakpflanzen der T <sub>1</sub> -Generation .....	127
Abbildung 3.17: Relative Enzymaktivitäten in Tabakpflanzen der T <sub>1</sub> -Generation.....	129
Abbildung 3.18: Blattchlorose durch hohe HvMe-, EcMe- und PCK-Expression.....	130
Abbildung 3.19: Einfluss der HvMe- und EcMe-Expression auf das Wachstum.....	131
Abbildung 3.20: Expression der endogenen Gene NADP-ME1 und NADP-ME2 .....	133
Abbildung 3.21: Expression der Superoxid-Dismutase <i>NtSODB</i> .....	134
Abbildung 3.22: Expression des endogenen PEPC-Gens .....	135
Abbildung 3.23: Prozentualer Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt sowie C/N-Verhältnis .....	137
Abbildung 3.24: Kohlenstoff-Isotopen-Verhältnis .....	139
Abbildung 3.25: Gehalt chloroplastidärer Pigmente .....	140
Abbildung 3.26: Trockensubstanz und Wassergehalt .....	141
Abbildung 3.27: Ammoniak-Freisetzung aus transgenen Pflanzen .....	143
Abbildung 3.28: A/C <sub>1</sub> -Kurven von C <sub>4</sub> _HvMe- und Kontrollpflanzen .....	144
Abbildung 3.29: Wachstumskurven auf Basis der Gesamtblattfläche.....	146
Abbildung 3.30: Quantifizierung von Glukose, Fruktose, Sucrose und Stärke .....	148
Abbildung 3.31: Quantifizierung der freien Aminosäuren.....	149
Abbildung 3.32: Quantifizierung von Malat.....	150
Abbildung 3.33: Überprüfung der Monocot-Promotoren und Transitpeptide aus <i>Z. mays</i> .....	157
Abbildung 3.34: Anordnung der Genexpressionskassetten im Destination-Vektor mit Glykolat-Weg aus <i>E. coli</i> .....	158
Abbildung 3.35: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide mit Glykolat-Weg aus <i>E. coli</i> nach der 5. Rekombinationsrunde.....	159
Abbildung 3.36: Transgen-Expressionslevel in Reispflanzen der T <sub>0</sub> -Generation .....	160

## 5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Auswirkungen der Expression von C <sub>4</sub> -Enzymen in C <sub>3</sub> -Pflanzen.....	19
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und Zubehör .....	28
Tabelle 2.2: Verwendete Größenstandards für die Gelelektrophorese.....	30
Tabelle 2.3: Verwendete Reaktionskits .....	31
Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme.....	31
Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide.....	32
Tabelle 2.6: Murashige und Skoog (MS) Medium .....	56
Tabelle 2.7: Luria Bertani (LB) Medium.....	56
Tabelle 2.8: YEB-Medium.....	57
Tabelle 2.9: GYPC-Medium.....	58

Tabelle 2.10: Verwendete Computerprogramme .....	58
Tabelle 2.11: Verwendete Internetdatenbanken und Onlineprogramme .....	58
Tabelle 2.12: Puffer PI für Plasmidisolierung .....	59
Tabelle 2.13: Puffer PII für Plasmidisolierung .....	59
Tabelle 2.14: Puffer PIII für Plasmidisolierung .....	60
Tabelle 2.15: DNA/RNA-Extraktionspuffer .....	61
Tabelle 2.16: 50xTris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) .....	62
Tabelle 2.17: Standard PCR-Ansatz .....	62
Tabelle 2.18: Standard-PCR-Programm für Phusion-Polymerase.....	63
Tabelle 2.19: Standard PCR-Programm für GoTaq-Polymerase.....	63
Tabelle 2.20: Standard-PCR-Programm für Phire-Polymerase .....	63
Tabelle 2.21: DNase-Verdau.....	64
Tabelle 2.22: Reverse Transkription .....	64
Tabelle 2.23: Standardansatz für die Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden .....	66
Tabelle 2.24: Standardansatz für „Blunting“ von DNA-Enden.....	67
Tabelle 2.25: Ligationsansatz.....	67
Tabelle 2.26: Standardansatz für Gateway-Rekombination.....	68
Tabelle 2.27: YEB-Induktionsmedium (pH 5,6) .....	71
Tabelle 2.28: Infiltrationsmedium (pH 5,6) .....	71
Tabelle 2.29: MSII-Medium .....	72
Tabelle 2.30: MSIII-Medium .....	72
Tabelle 2.31: Wasseragar .....	74
Tabelle 2.32: Puffer und Medien für die Protoplastenisolierung .....	75
Tabelle 2.33: Metabolit-Extraktionspuffer.....	76
Tabelle 2.34: Glukose/Fruktose-Reaktionspuffer .....	78
Tabelle 2.35: Citrat-NaOH-Puffer .....	79
Tabelle 2.36: Puffer für Malat-Bestimmung.....	80
Tabelle 2.37: Pyruvat/PEP-Reaktionspuffer.....	81
Tabelle 2.38: Aminosäuren-Reaktionspuffer .....	81
Tabelle 2.39: Bradford-Reagenz .....	83
Tabelle 2.40: Extraktionspuffer I.....	85
Tabelle 2.41: Extraktionspuffer IIA .....	85
Tabelle 2.42: Extraktionspuffer IIB .....	85
Tabelle 2.44: PEPC-Reaktionspuffer .....	86
Tabelle 2.45: NADP-ME-Reaktionspuffer.....	87
Tabelle 2.46: NAD-ME-Reaktionspuffer .....	87
Tabelle 2.47: NADP-MDH-Reaktionspuffer.....	88
Tabelle 2.48: NAD-MDH-Reaktionspuffer .....	89
Tabelle 2.49: PPKK-Reaktionspuffer .....	89
Tabelle 2.50: PEPS-Reaktionspuffer.....	90

Tabelle 2.51: Ammonia Release Assay Inkubations-Medium .....	92
Tabelle 2.52: Ammonia Release Assay Reagenz I .....	92
Tabelle 2.53: Ammonia Release Assay Reagenz II .....	92
Tabelle 2.54: Messprotokoll für die Sauerstoffinhibierung .....	93
Tabelle 3.1: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 5. Rekombinationsrunde .....	112
Tabelle 3.2: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 6. Rekombinationsrunde .....	113
Tabelle 3.3: Kontrollverdaue der Destination-Plasmide nach der 7. Rekombinationsrunde .....	114
Tabelle 3.4: Verwendete Primer für Kolonie-PCR auf Destination-Plasmide in <i>A. tumefaciens</i> AGL1 .....	116
Tabelle 3.5: Transgen-Expressionsniveau und relative Enzymaktivitäten in T <sub>0</sub> -Generation ausgewählter Tabakpflanzen .....	124
Tabelle 3.6: Apparenter CO <sub>2</sub> -Kompensationspunkt von C4_HvMe- und Kontrollpflanzen .....	144
Tabelle 3.7: Sauerstoffinhibierung in C4_HvMe- und Kontrollpflanzen .....	145
Tabelle 3.8: Identifizierte Substanzen in der LC-MS .....	151
Tabelle 3.9: Kontrollverdaue der fertigen Destination-Plasmide mit dem Glykolat-Weg aus <i>E. coli</i> ...	159

### 5.3 Formelverzeichnis

Formel 2.1: Berechnung der Metabolitkonzentrationen .....	78
Formel 2.2: Schematischer Reaktionsablauf der Glukose/Fruktose-Messung .....	78
Formel 2.3: Schematischer Reaktionsablauf der Sucrose-Messung .....	79
Formel 2.4: Schematischer Reaktionsablauf der Malat-Messung .....	80
Formel 2.5: Schematischer Reaktionsablauf der Pyruvat- und PEP-Messung .....	81
Formel 2.6: Berechnung der Abweichung des $\delta^{13}\text{C}$ -Verhältnisses vom Arbeitsstandard .....	83
Formel 2.7: Berechnung der spezifischen Enzymaktivität .....	84
Formel 2.8: Reaktionsschema zur Bestimmung der PEPC-Aktivität .....	86
Formel 2.9: Reaktionsschema zur Bestimmung der NADP-ME-Aktivität .....	87
Formel 2.10: Reaktionsschema zur Bestimmung der NAD-ME-Aktivität .....	88
Formel 2.11: Reaktionsschema zur Bestimmung der NADP-MDH-Aktivität .....	88
Formel 2.12: Reaktionsschema zur Bestimmung der NAD-MDH-Aktivität .....	89
Formel 2.13: Reaktionsschema zur Bestimmung der PPDK-Aktivität .....	90
Formel 2.14: Reaktionsschema zur Bestimmung der PEPS-Aktivität .....	91
Formel 2.15: Berechnung chloroplastidärer Pigmente .....	91
Formel 2.16: Berechnung der Sauerstoffinhibierung .....	93

## 5.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
A	Adenin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AGA	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
att	attachment region
<i>B. oleraceae</i>	<i>Brassica oleraceae</i>
bla	Beta-Lactamase
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Carboanhydrase
ca.	zirka
Cab	Chlorophyll a/b-Bindeprotein
CAM	crassulacean acid metabolism
CaMV	Cauliflower-Mosaik-Virus
<i>Cm</i>	<i>Crysanthemum</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
dCMP	Desoxy-Cytidin-Monophosphat
dest.	destilliert
dGMP	Desoxy-Guanosin-Monophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC number	enzyme comission number
eGFP	enhanced green fluorescent protein
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> bzw. <i>et alii</i> (lateinisch für „und andere“)
EtBr	Ethidiumbromid
<i>F. bidentis</i>	<i>Flaveria bidentis</i>

<i>F. trinervia</i>	<i>Flaveria trinervia</i>
G	Guanin
G3P	Glycerin-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	Glyoxylat-Carboligase
GDC	Glycinderboxylase
GDH	Glycolatdehydrogenase
GGAT	Glyoxylat:Glutamat-Aminotransferase
GGT	Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase
GK	Glyceratkinase
glcD	Untereinheit D der Glykolat-Dehydrogenase
glcE	Untereinheit E der Glykolat-Dehydrogenase
glcF	Untereinheit F der Glykolat-Dehydrogenase
GOX	Glycolatoxidase
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
<i>H. verticillata</i>	<i>Hydrilla verticillata</i>
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPR	Hydroxypyruvatreduktase
HPT	Hygromycinphosphotransferase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KOH	Kaliumhydroxid
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>
<i>L. minor</i>	<i>Lemna minor</i>
LB	left border
LB	Luria Bertani (Medium)
M	Mol pro Liter (molar)
MDH	Malat-Dehydrogenase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger (Boten-) RNA
MS	Murashige und Skoog (Medium)
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid

---

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamiddinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamiddinucleotid, reduziert
NAD-ME	NAD-dependent malic enzyme
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamiddinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamiddinucleotidphosphat, reduziert
NADP-ME	NADP-dependent malic enzyme
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
<i>npt</i>	Neomycin-Phosphotransferase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ori	origin
P	Promotor
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PEPS	Phosphoenolpyruvat-Synthetase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGP	Phosphoglycolatphosphatase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
P <sub>i</sub>	inorganisches Phosphat
PMI	Phosphomannose-Isomerase
pmol	Picomol
PPDK	Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase
PPT	Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator
PPT	Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator
PYR	Pyruvat
RB	right border
RbcS	RUBISCO small subunit
rfp	red fluorescence protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule

---

s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SAR	scaffold attachment region
SGAT	Serin:Glyoxylat-Aminotransferase
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
SOD	Superoxiddismutase
spec	Spectinomycin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	transcription blocker
TBE	Tris-Borat-EDTA
T-DNA	transfer-DNA
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
TSR	Tatronat-Semialdehyd-Reduktase
U	Unit
<i>U. panicoides</i>	<i>Urochloa panicoides</i>
Ubi	Ubiquitin
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
WT	Wildtyp



## 5.5 Literaturverzeichnis

- Ainsworth, E. A. und Long, S. P.** (2005), 'What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>', *New Phytol*, 165 (2), 351-371.
- Akhani, H., Barroca, J., Koteeva, N., Voznesenskaya, E. V., Franceschi, V. R., Edwards, G. E., Ghaffari, S. M., und Ziegler, H.** (2005), 'Bienertia sinuspersici (Chenopodiaceae): a new species from southwest Asia and discovery of a third terrestrial C<sub>4</sub> plant without Kranz anatomy', *Syst. Bot.*, 30, 290–301.
- Allen, G. C., Hall, G. E., Jr., Childs, L. C., Weissinger, A. K., Spiker, S., und Thompson, W. F.** (1993), 'Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells', *Plant Cell*, 5 (6), 603-613.
- Amoroso, G., Seimetz, N., und Sultemeyer, D.** (2003), 'The dc13 gene upstream of *ictB* is involved in rapid induction of the high affinity Na<sup>+</sup> dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter in cyanobacteria', *Photosynth Res*, 77 (2-3), 127-138.
- Anderson, L. E.** (1971), 'Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphate isomerases', *Biochim Biophys Acta*, 235 (1), 237-244.
- Andersson, I. und Taylor, T. C.** (2003), 'Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase', *Arch Biochem Biophys*, 414 (2), 130-140.
- Aoyagi, K. und Bassham, J. A.** (1984), 'Pyruvate orthophosphate dikinase of c(3) seeds and leaves as compared to the enzyme from maize', *Plant Physiol*, 75 (2), 387-392.
- Aoyagi, K. und Bassham, J. A.** (1984), 'Pyruvate orthophosphate dikinase mRNA organ specificity in wheat and maize', *Plant Physiol*, 76 (1), 278-280.
- Aronsson, H. und Jarvis, P.** (2002), 'A simple method for isolating import-competent Arabidopsis chloroplasts', *FEBS Lett*, 529 (2-3), 215-220.
- Asada, K. und Takahashi, M.** (1987), 'Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis', Kyle, D. J., Osmond, C.B. and Arntzen, C. J. (eds) *Photoinhibition*, 227-287.
- Asada, K.** (1999), '[Responses to active oxygens, strong and weak lights, an overview]', *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 44 (15 Suppl), 2230-2231.
- Ascencio, J. und Bowes, G.** (1983), 'Phosphoenolpyruvate carboxylase in Hydrilla plants with varying CO<sub>2</sub> compensation points', *Photosynth Res*, 4, 151-170.
- Ashton, A. R. und Hatch, M. D.** (1983), 'Regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis: physical and kinetic properties of active (dithiol) and inactive (disulfide) NADP-malate dehydrogenase from *Zea mays*', *Arch Biochem Biophys*, 227 (2), 406-415.

- Ashton, A. R. und Hatch, M. D.** (1983), 'Regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis: regulation of pyruvate, Pi dikinase by ADP-dependent phosphorylation and dephosphorylation', *Biochem Biophys Res Commun*, 115 (1), 53-60.
- Ashton, A. R., Burnell, J. N., Furbank, R. T., Jenkins, C. L. D., und Hatch, M. D.** (1990), 'Enzymes of C<sub>4</sub> photosynthesis', *Lea PJ, editor. Methods in plant biochemistry*, 3, 39-72.
- Badger, M. R. und Price, G. D.** (2003), 'CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution', *J Exp Bot*, 54 (383), 609-622.
- Badger, M. R., Price, G. D., Long, B. M., und Woodger, F. J.** (2006), 'The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanism', *J Exp Bot*, 57 (2), 249-265.
- Bagge, P. und Larsson, C.** (1986), 'Biosynthesis of aromatic amino acids by highly purified spinach chloroplasts – Compartmentation and regulation of the reactions', *Physiol. Plant.*, 68, 641-647.
- Baier, M. und Dietz, K. J.** (1999), 'The Costs and benefits of oxygen for photosynthesizing plants', *Progress in Botany 60, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg*, 282-314.
- Bakrim, N., Echevarria, C., Cretin, C., Arrio-Dupont, M., Pierre, J. N., Vidal, J., Chollet, R., und Gadal, P.** (1992), 'Regulatory phosphorylation of Sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Identification of the protein-serine kinase and some elements of the signal-transduction cascade', *Eur J Biochem*, 204 (2), 821-830.
- Beckmann, K., Dzuibany, C., Biehler, K., Fock, H., Hell, R., Migge, A., und Becker, T. W.** (1997), 'Photosynthesis and fluorescence quenching, and the mRNA levels of plastidic glutamine synthetase or of mitochondrial serine hydroxymethyltransferase (SHMT) in the leaves of the wild-type and of the SHMT-deficient *stm* mutant of *Arabidopsis thaliana* in relation to the rate of photorespiration', *Planta*, 202 (3), 379-386.
- Benz, J. P., Soll, J., und Bolter, B.** (2009), 'Protein transport in organelles: The composition, function and regulation of the Tic complex in chloroplast protein import', *FEBS J*, 276 (5), 1166-1176.
- Berkemeyer, M., Scheibe, R., und Ocheretina, O.** (1998), 'A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*', *J Biol Chem*, 273 (43), 27927-27933.
- Berner, R. A.** (1990), 'Atmospheric carbon dioxide levels over phanerozoic time', *Science*, 249 (4975), 1382-1386.
- Berner, R. A.** (2006), 'GEOCARBSULF: A combined model for Phanerozoic atmospheric O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>', *Geochim. Cosmochim. Acta*, 70, 5653-5664

- Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R. N., und Willmitzer, L.** (2000), 'Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight', *Planta*, 211 (6), 841-845.
- Bohmert, K., Balbo, I., Steinbuchel, A., Tischendorf, G., und Willmitzer, L.** (2002), 'Constitutive expression of the beta-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants', *Plant Physiol*, 128 (4), 1282-1290.
- Bologna, F. P., Andreo, C. S., und Drincovich, M. F.** (2007), 'Escherichia coli malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure', *J Bacteriol*, 189 (16), 5937-5946.
- Bonfil, D. J., Ronen-Tarazi, M., Sultemeyer, D., Lieman-Hurwitz, J., Schatz, D., und Kaplan, A.** (1998), 'A putative HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7942', *FEBS Lett*, 430 (3), 236-240.
- Bonifer, C., Vidal, M., Grosveld, F., und Sippel, A. E.** (1990), 'Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice', *EMBO J*, 9 (9), 2843-2848.
- Borchert, S., Harborth, J., Schunemann, D., Hoferichter, P., und Heldt, H. W.** (1993), 'Studies of the Enzymic Capacities and Transport Properties of Pea Root Plastids', *Plant Physiol*, 101 (1), 303-312.
- Borland, A. M., Hartwell, J., Jenkins, G. I., Wilkins, M. B., und Nimmo, H. G.** (1999), 'Metabolite Control Overrides Circadian Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase and CO<sub>2</sub> Fixation in Crassulacean Acid Metabolism', *Plant Physiol*, 121 (3), 889-896.
- Bowes, G., Ogren, W. L., und Hageman, R. H.** (1971), 'Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase', *Biochem Biophys Res Commun*, 45 (3), 716-722.
- Bowes, G., Rao, S. K., Estavillo, G. M., und Reiskind, J. B.** (2002), 'C<sub>4</sub> mechanisms in aquatic angiosperms: comparisons with terrestrial C<sub>4</sub> systems', *Functional Plant Biology*, 29, 379-392.
- Bowes, G., Rao, S. K., Reiskind, J. B., Estavillo, G. M., und Rao, V. S.** (2007), 'Hydrilla: retrofitting a C<sub>3</sub> leaf with a single-cell C<sub>4</sub> NADP-ME system', *Sheehy, J. E., Mitchell, P. L. and Hardy, B. (eds) Charting New Pathways to C4 rice*, 275-296.
- Bowler, C., Alliotte, T., Van den Bulcke, M., Bauw, G., Vandekerckhove, J., Van Montagu, M., und Inze, D.** (1989), 'A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (9), 3237-3241.

- 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.
- Brautigam, A., Hoffmann-Benning, S., und Weber, A. P.** (2008), 'Comparative proteomics of chloroplast envelopes from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants reveals specific adaptations of the plastid envelope to C<sub>4</sub> photosynthesis and candidate proteins required for maintaining C<sub>4</sub> metabolite fluxes', *Plant Physiol*, 148 (1), 568-579.
- Brautigam, A. und Weber, A. P.** (2011), 'Do metabolite transport processes limit photosynthesis?', *Plant Physiol*, 155 (1), 43-48.
- 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., und Weber, A. P.** (2011), 'An mRNA blueprint for C<sub>4</sub> photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species', *Plant Physiol*, 155 (1), 142-156.
- Brooks, A. und Farquhar, G. D.** (1985), 'Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light: estimates from gas exchange measurements on spinach', *Planta*, 165, 397-406.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., und Jones, R. L.** (2000), 'Biochemistry & Molecular Biology of plants', *American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland*, 625.
- Burnell, J. N. und Hatch, M. D.** (1985), 'Regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis: purification and properties of the protein catalyzing ADP-mediated inactivation and Pi-mediated activation of pyruvate, Pi dikinase', *Arch Biochem Biophys*, 237 (2), 490-503.
- Burnell, J. N.** (2010), 'Cloning and characterization of Escherichia coli DUF299: a bifunctional ADP-dependent kinase--Pi-dependent pyrophosphorylase from bacteria', *BMC Biochem*, 11, 1.
- Burrows, P. A., Sazanov, L. A., Svab, Z., Maliga, P., und Nixon, P. J.** (1998), 'Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid ndh genes', *EMBO J*, 17 (4), 868-876.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H. P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E. G., Hall, R. D., Bovy, A. G., Luo, J., und Martin, C.** (2008), 'Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors', *Nat Biotechnol*, 26 (11), 1301-1308.
- Calvin, B.** (1989), 'Forty years of photosynthesis and related activities', *Photosynth. Reserach*, 21, 3-16.

- Casati, P., Drincovich, M. F., Edwards, G.E., und Andreo, C. S.** (1999), 'Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense', *Photosyn. Res.*, 61, 99-105.
- Chang, Y. Y., Wang, A. Y., und Cronan, J. E., Jr.** (1993), 'Molecular cloning, DNA sequencing, and biochemical analyses of *Escherichia coli* glyoxylate carboligase. An enzyme of the acetohydroxy acid synthase-pyruvate oxidase family', *J Biol Chem*, 268 (6), 3911-3919.
- Chastain, C. J., Fries, J. P., Vogel, J. A., Randklev, C. L., Vossen, A. P., Dittmer, S. K., Watkins, E. E., Fiedler, L. J., Wacker, S. A., Meinhover, K. C., Sarath, G., und Chollet, R.** (2002), 'Pyruvate, orthophosphate dikinase in leaves and chloroplasts of C<sub>3</sub> plants undergoes light-/dark-induced reversible phosphorylation', *Plant Physiol*, 128 (4), 1368-1378.
- Chastain, C. J., Fries, J. P., Vogel, J. A., Randklev, C. L., Vossen, A. P., Dittmer, S. K., Watkins, E. E., Fiedler, L. J., Wacker, S. A., Meinhover, K. C., Sarath, G., und Chollet, R.** (2002), 'Pyruvate, orthophosphate dikinase in leaves and chloroplasts of C<sub>3</sub> plants undergoes light-/dark-induced reversible phosphorylation', *Plant Physiol*, 128 (4), 1368-1378.
- Chen, L., Marmey, P., Taylor, N. J., Brizard, J. P., Espinoza, C., D'Cruz, P., Huet, H., Zhang, S., de Kochko, A., Beachy, R. N., und Fauquet, C. M.** (1998), 'Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants', *Nat Biotechnol*, 16 (11), 1060-1064.
- Chen, Q. J., Zhou, H. M., Chen, J., und Wang, X. C.** (2006), 'A Gateway-based platform for multigene plant transformation', *Plant Mol Biol*, 62 (6), 927-936.
- Chen, Q. J., Xie, M., Ma, X. X., Dong, L., Chen, J., und Wang, X. C.** (2010), 'MISSA is a highly efficient in vivo DNA assembly method for plant multiple-gene transformation', *Plant Physiol*, 153 (1), 41-51.
- Cheo, D. L., Titus, S. A., Byrd, D. R., Hartley, J. L., Temple, G. F., und Brasch, M. A.** (2004), 'Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: functional analysis of multi-segment expression clones', *Genome Res*, 14 (10B), 2111-2120.
- Christou, P.** (1997), 'Rice transformation: bombardment', *Plant Mol Biol*, 35 (1-2), 197-203.
- Chuong, S. D., Franceschi, V. R., und Edwards, G. E.** (2006), 'The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C<sub>4</sub> photosynthesis in Chenopodiaceae species', *Plant Cell*, 18 (9), 2207-2223.
- Cloney, L. P., Bekkaoui, D. R., und Hemmingsen, S. M.** (1993), 'Co-expression of plastid chaperonin genes and a synthetic plant rubisco operon in *Escherichia coli*', *Plant Mol. Biol.*, 23, 1285-1290.
- Cooper, R. A. und Kornberg, H. L.** (1965), 'Net formation of phosphoenolpyruvate from pyruvate by *Escherichia coli*', *Biochim Biophys Acta*, 104 (2), 618-620.

- Cooper, R. A. und Kornberg, H. L.** (1974), 'Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate phosphate dikinase', *P.D. Boyer (Ed.), The Enzymes, Vol. 10 Academic Press, New York, NY*, 631–649.
- Cornic, G. und Briantais, J. M.** (1991), 'Partitioning of photosynthetic electron flow between CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> reduction in a C<sub>3</sub> leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO<sub>2</sub> concentrations and during drought stress', *Planta*, 183, 178–184.
- Cortleven, A. und Valcke, R.** (2011), 'Evaluation of the photosynthetic activity in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: lessons from cytokinin', *Physiol Plant*.
- Cortleven, A., Noben, J. P., und Valcke, R.** (2011), 'Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study', *Proteome Sci*, 9, 33.
- Cousins, A. B., Baroli, I., Badger, M. R., Ivakov, A., Lea, P. J., Leegood, R. C., und von Caemmerer, S.** (2007), 'The role of phosphoenolpyruvate carboxylase during C<sub>4</sub> photosynthetic isotope exchange and stomatal conductance', *Plant Physiol*, 145 (3), 1006-1017.
- Cushman, J. C. und Bohnert, H. J.** (1997), 'Molecular Genetics of Crassulacean Acid Metabolism', *Plant Physiol*, 113 (3), 667-676.
- Cushman, J. C.** (2001), 'Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments', *Plant Physiol*, 127 (4), 1439-1448.
- Dafny-Yelin, M. und Tzfira, T.** (2007), 'Delivery of multiple transgenes to plant cells', *Plant Physiol*, 145 (4), 1118-1128.
- Dai, Z., Ku, M., und Edwards, G. E.** (1993), 'C<sub>4</sub> Photosynthesis (The CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism and Photorespiration)', *Plant Physiol*, 103 (1), 83-90.
- Daniell, H. und Dhingra, A.** (2002), 'Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology', *Curr Opin Biotechnol*, 13 (2), 136-141.
- Davies, D. D.** (1986), 'The fine control of cytosolic pH', *Physiol. Plant*, 67, 702–706.
- Day, D. A. und Hatch, M. D.** (1981), 'Transport of 3-phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvate, and inorganic phosphate in maize mesophyll chloroplasts, and the effect of 3-phosphoglyceric acid on malate and phosphoenolpyruvate production', *Arch. Biochem. Biophys.*, 211, 743-749.
- De Block, M.** (1988), 'Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*', *Theoretical and Applied Genetics*, 76, 767–774.
- De Block, M.** (1995), 'In situ enzyme histochemistry on plastic-embedded plant material', *Methods Cell Biol*, 49, 153-163.

- Delgado-Alvarado, A., Walker, R. P., und Leegood, R. C.** (2007), 'Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive', *Plant Cell Environ*, 30 (2), 225-235.
- Detarsio, E., Alvarez, C. E., Saigo, M., Andreo, C. S., und Drincovich, M. F.** (2007), 'Identification of domains involved in tetramerization and malate inhibition of maize C<sub>4</sub>-NADP-malic enzyme', *J Biol Chem*, 282 (9), 6053-6060.
- Dietze, J., Blau, A., und Willmitzer, L.** (1995), 'Agrobacterium-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*)', *Gene Transfer to Plants XXII*. eds Potrykus, I., Spangenberg, G. (Springer Verlag, Berlin), 24–29.
- Douce, R. und Neuburger, M.** (1999), 'Biochemical dissection of photorespiration', *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 214-222.
- Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S., Chessin, S. J., Franceschi, V. R., Edwards, G. E., und Ku, M. S.** (1998), 'Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in flaveria species. Isoforms Of nadp-malic enzyme', *Plant Physiol*, 117 (3), 733-744.
- Drincovich, M. F., Casati, P., und Andreo, C. S.** (2001), 'NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways', *FEBS Lett*, 490 (1-2), 1-6.
- Duff, S. und Chollet, R.** (1995), 'In Vivo Regulation of Wheat-Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Reversible Phosphorylation', *Plant Physiol*, 107 (3), 775-782.
- Duff, S. M., Andreo, C. S., Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S. A., Vidal, J., Gadal, P., und Chollet, R.** (1995), 'Kinetic analysis of the non-phosphorylated, in vitro phosphorylated, and phosphorylation-site-mutant (Asp8) forms of intact recombinant C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from Sorghum', *Eur. J. Biochem.*, 228, 92-95.
- Eckardt, N. A. und Portis Jr, A. R.** (1997), 'Heat Denaturation Profiles of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) and Rubisco Activase and the Inability of Rubisco Activase to Restore Activity of Heat-Denatured Rubisco', *Plant Physiol*, 113 (1), 243-248.
- Edwards, G. E. und Walker, D. A.** (1983), 'C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis', *Oxford: Blackwell Scientific publications*.
- Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J. N., und Hatch, M. D.** (1985), 'Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C<sub>4</sub> photosynthesis. Properties and mechanism of light/dark regulation. ', *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 36, 255-286.

- Edwards, G. E. und Ku, M. S. B.** (1987), 'Biochemistry of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediates', *The Biochemistry of Plants, Vol. 10, M.D. Hatch and N.K. Boardman, eds* (New York: Academic Press), 275–325.
- Edwards, G. E. und Andreo, C. S.** (1992), 'NADP-malic enzyme from plants', *Phytochemistry*, 31 (6), 1845-1857.
- Edwards, G. E., Franceschi, V. R., Ku, M. S., Voznesenskaya, E. V., Pyankov, V. I., und Andreo, C. S.** (2001), 'Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C<sub>4</sub> plants', *J Exp Bot*, 52 (356), 577-590.
- Edwards, G. E., Franceschi, V. R., und Voznesenskaya, E. V.** (2004), 'Single-cell C<sub>4</sub> photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm', *Annu Rev Plant Biol*, 55, 173-196.
- Edwards, G. E., Voznesenskaya, E., Smith, M., Koteyeva, N., Park, Y., Park, J. H., Kiirats, O., Okita, T. W., und Chuong, S. D. X.** (2007), 'Breaking the Kranz paradigm in terrestrial C<sub>4</sub> plants: does it hold promise for C<sub>4</sub> rice?', *J. E. Sheehy, P. L. Mitchell, B. Hardy, eds, Charting New Pathways to C<sub>4</sub> Rice. International Rice Research Institute, Makati City, Philippines*, 249–273.
- Ehleringer, J. und Bjorkman, O.** (1977), 'Quantum Yields for CO<sub>2</sub> Uptake in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Plants: Dependence on Temperature, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> Concentration', *Plant Physiol.*, 59, 86-90.
- Ehleringer, J. und Pearcy, R. W.** (1983), 'Variation in Quantum Yield for CO<sub>2</sub> Uptake among C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Plants', *Plant Physiol*, 73 (3), 555-559.
- Ehleringer, J. R., Sage, R. F., Flanagan, L. B., und Pearcy, R. W.** (1991), 'Climate change and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis', *Trends Ecol Evol*, 6 (3), 95-99.
- Elgin, S. C.** (1991), 'On the importance of taking a firm position. Chromatin structure and gene expression sponsored by Fundacion Juan March, Madrid, Spain September 24-26, 1990', *New Biol*, 3 (1), 37-41.
- Engler, C., Kandzia, R., und Marillonnet, S.** (2008), 'A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability', *PLoS One*, 3 (11), e3647.
- Estavillo, G. M., Rao, S. K., Reiskind, J. B., und Bowes, G.** (2007), 'Characterization of the NADP malic enzyme gene family in the facultative, single-cell C<sub>4</sub> monocot *Hydrilla verticillata*', *Photosynth Res*, 94 (1), 43-57.
- Fahnenstich, H., Saigo, M., Niessen, M., Zanon, M. I., Andreo, C. S., Fernie, A. R., Drincovich, M. F., Flugge, U. I., und Maurino, V. G.** (2007), 'Alteration of organic acid metabolism in Arabidopsis overexpressing the maize C<sub>4</sub> NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness', *Plant Physiol*, 145 (3), 640-652.



- Farineau, J., Bottin, H., und Garab, G.** (1984), 'Effect of dibromothymoquinone (DBMIB) on reduction rates of Photosystem I donors in intact chloroplasts', *Biochem Biophys Res Commun*, 120 (3), 721-725.
- Farquhar, G. D., Hubick, K. T., Condon, A. G., und Richards, R. A.** (1989), 'Carbon isotope fractionation and plant water-use efficiency', *P. W. Rundel, J. R. Ehleringer, K. A. Nagy, eds, Stable Isotopes in Ecological Research. Springer-Verlag, New York*, 21–40.
- Farquhar, G. D., von Caemmerer, S., und Berry, J. A.** (2001), 'Models of photosynthesis', *Plant Physiol*, 125 (1), 42-45.
- Felle, H. H.** (2001), 'pH: signal and messenger in plant cells', *Plant Biol.*, 3, 577-591.
- Feng, L., Wang, K., Li, Y., Tan, Y., Kong, J., Li, H., Li, Y., und Zhu, Y.** (2007), 'Overexpression of SBPase enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plants', *Plant Cell Rep*, 26 (9), 1635-1646.
- Feng, L. L., Han, Y. J., An, B. G., Yang, J., Yang, G. H., Li, Y. S., und Zhu, Y. G.** (2007), 'Overexpression of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase enhances photosynthesis and growth under salt stress in transgenic rice plants', *Funct. Plant Biol.*, 34, 822–834.
- Fett, T. W. und Coleman, J. R.** (1984), 'Characterization and expression of two cDNAs encoding carbonic anhydrase in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Physiol.*, 105, 707-713.
- Finer, J. J., Finer, K. R., und Ponappa, T.** (1999), 'Particle bombardment mediated transformation', *Curr Top Microbiol Immunol*, 240, 59-80.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbingler, B., Weber, A., Häusler, R. E., und Flüge, U. I.** (1997), 'A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/ phosphate antiporter', *Plant Cell*, 9, 453-462.
- Flavell, R. B.** (1994), 'Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (9), 3490-3496.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D. T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H., und Kaldenhoff, R.** (2006), 'Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo', *Plant J*, 48 (3), 427-439.
- Fliege, R., Flugge, U. I., Werdan, K., und Heldt, H. W.** (1978), 'Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts', *Biochim Biophys Acta*, 502 (2), 232-247.
- Flüge, U. I. und Heldt, H. W.** (1991), 'Metabolite translocators of the chloroplast envelope', *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 129-144.

- Foyer, C.** (1997), 'Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis', *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defense*. Ed. G. Scandalios. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 587–621.
- Francois, I., Broekaert, W., und Cammue, B.** (2002), 'Different approaches for multi-transgene-stacking in plants', *Plant Sci.*, 163, 281–295.
- Fridlyand, L. E., Backhausen, J. E., und Scheibe, R.** (1998), 'Flux control of the malate valve in leaf cells', *Arch Biochem Biophys*, 349 (2), 290-298.
- Friso, G., Majeran, W., Huang, M., Sun, Q., und van Wijk, K. J.** (2010), 'Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly', *Plant Physiol*, 152 (3), 1219-1250.
- Fujisawa, M., Takita, E., Harada, H., Sakurai, N., Suzuki, H., Ohyama, K., Shibata, D., und Misawa, N.** (2009), 'Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key enzyme genes involved in ketocarotenoid formation', *J Exp Bot*, 60 (4), 1319-1332.
- Fukayama, H., Imanari, E., Tsuchida, H., Izui, K., und Matsuoka, M.** (2000), 'In vivo activity of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants', *Plant Cell Physiol.*, 41, 112.
- Fukayama, H., Tsuchida, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Lee, B. H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M. S., Makino, A., Matsuoka, M., und Miyao, M.** (2001), 'Significant accumulation of C<sub>4</sub>-specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C<sub>3</sub> plant, rice', *Plant Physiol*, 127 (3), 1136-1146.
- Fukayama, H., Hatch, M. D., Tamai, T., Tsuchida, H., Sudoh, S., Furbank, R. T., und Miyao, M.** (2003), 'Activity regulation and physiological impacts of maize C<sub>4</sub>-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants', *Photosynth Res*, 77 (2-3), 227-239.
- Furbank, R. T., Jenkins, C. L., und Hatch, M. D.** (1989), 'CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanism of C<sub>4</sub> Photosynthesis: Permeability of Isolated Bundle Sheath Cells to Inorganic Carbon', *Plant Physiol*, 91 (4), 1364-1371.
- Furbank, R. T.** (2011), 'Evolution of the C<sub>4</sub> photosynthetic mechanism: are there really three C<sub>4</sub> acid decarboxylation types?', *J Exp Bot*, 62 (9), 3103-3108.
- Furumoto, T., Izui, K., Quinn, V., Furbank, R. T., und von Caemmerer, S.** (2007), 'Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase is not essential for high photosynthetic rates in the C<sub>4</sub> species *Flaveria bidentis*', *Plant Physiol*, 144 (4), 1936-1945.
- Gallardo, F., Miginiac-Maslow, M., Sangwan, R. S., Decottignies, P., Keryer, E., Dubois, F., Bismuth, E., Galvez, S., Sangwan-Norreel, B., Gadal, P., und et al.** (1995), 'Monocotyledonous C<sub>4</sub> NADP(+)-malate dehydrogenase is effi-

- ciently synthesized, targeted to chloroplasts and processed to an active form in transgenic plants of the C<sub>3</sub> dicotyledon tobacco', *Planta*, 197 (2), 324-332.
- Galmes, J., Cifre, J., Medrano, H., und Flexas, J.** (2005), 'Modulation of relative growth rate and its components by water stress in Mediterranean species with different growth forms', *Oecologia*, 145 (1), 21-31.
- Gaunt, S. R., Riley, A., Lazzeri, P., and Barcelo, P.** (1998), 'A facile method for screening for phosphinothricin (PPT)-resistant transgenic wheats', *Molecular Breeding*, 5, 255-262.
- Gehlen, J., Panstruga, R., Smets, H., Merkelbach, S., Kleines, M., Porsch, P., Fladung, M., Becker, I., Rademacher, T., Hausler, R. E., und Hirsch, H. J.** (1996), 'Effects of altered phosphoenolpyruvate carboxylase activities on transgenic C<sub>3</sub> plant *Solanum tuberosum*', *Plant Mol Biol*, 32 (5), 831-848.
- Gietl, C.** (1990), 'Glyoxysomal malate dehydrogenase from watermelon is synthesized with an amino-terminal transit peptide', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (15), 5773-5777.
- Gietl, C., Lehnerer, M., und Olsen, O.** (1990), 'Mitochondrial malate dehydrogenase from watermelon: sequence of cDNA clones and primary structure of the higher-plant precursor protein', *Plant Mol Biol*, 14 (6), 1019-1030.
- Gietl, C.** (1992), 'Partitioning of malate dehydrogenase isoenzymes into glyoxysomes, mitochondria, and chloroplasts', *Plant Physiol*, 100 (2), 557-559.
- Goodwin, T. und Mercer, E.** (1983), 'Introduction to Plant Biochemistry', *Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt*.
- Gowik, U. und Westhoff, P.** (2011), 'The path from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> photosynthesis', *Plant Physiol*, 155 (1), 56-63.
- Gowik, U., Brautigam, A., Weber, K. L., Weber, A. P., und Westhoff, P.** (2011), 'Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis in the genus flaveria: how many and which genes does it take to make C<sub>4</sub>?', *Plant Cell*, 23 (6), 2087-2105.
- Greger, I. H., Aranda, A., und Proudfoot, N.** (2000), 'Balancing transcriptional interference and initiation on the GAL7 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (15), 8415-8420.
- Gross, A., Brückner, G., Heldt, H. W., und Flügge, U. I.** (1990), 'Comparison of the kinetic properties, inhibition and labelling of the phosphate translocators from maize and spinach mesophyll chloroplasts', *Planta*, 180, 262-271.
- Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R., und Kollias, G.** (1987), 'Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice', *Cell*, 51 (6), 975-985.
- Grover, S. D., Canellas, P. F., und Wedding, R. T.** (1981), 'Purification of NAD malic enzyme from potato and investigation of some physical and kinetic properties', *Arch Biochem Biophys*, 209 (2), 396-407.

- Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U., und Stitt, M.** (1998), 'A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch and inhibits growth of potato plants.', *Plant J.*, 14, 147.
- Halpin, C., Barakate, A., Askari, B. M., Abbott, J. C., und Ryan, M. D.** (2001), 'Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways', *Plant Mol Biol*, 47 (1-2), 295-310.
- Hamilton, C. M., Frary, A., Lewis, C., und Tanksley, S. D.** (1996), 'Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (18), 9975-9979.
- Hansen, R. W. und Hayashi, J. A.** (1962), 'Glycolate metabolism in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 83, 679-687.
- Harley, P.C. und Sharkey, T.D.** (1991), 'An improved model of C<sub>3</sub> photosynthesis at high CO<sub>2</sub>: reversed O<sub>2</sub> sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast', *Photosynth. Research*, 27, 169-178.
- Harrison, E. P., Willingham, N. M., Lloyd, J. C., und Raines, C. A.** (1998), 'Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation', *Planta*, 204, 27.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., und Brasch, M. A.** (2000), 'DNA cloning using in vitro site-specific recombination', *Genome Res*, 10 (11), 1788-1795.
- Hartwell, J., Gill, A., Nimmo, G. A., Wilkins, M. B., Jenkins, G. I., und Nimmo, H. G.** (1999), 'Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression', *Plant J*, 20 (3), 333-342.
- Hatch, M. D. und Slack, C. R.** (1968), 'A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C<sub>4</sub> dicarboxylic acid pathway of photosynthesis', *Biochem J*, 106 (1), 141-146.
- Hatch, M. D., Mau, S. L., und Kagawa, T.** (1974), 'Properties of leaf NAD malic enzyme from plants with C<sub>4</sub> pathway photosynthesis', *Arch Biochem Biophys*, 165 (1), 188-200.
- Hatch, M. D., Kagawa, T., und Craig, S.** (1975), 'Subdivision of C<sub>4</sub> pathway species based on differing C<sub>4</sub> acid decarboxylating systems and ultrastructural features', *Aust. J. Plant Physiol.*, 2, 111-128.
- Hatch, M. D.** (1979), 'Regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis: factors affecting cold-mediated inactivation and reactivation of pyruvate, Pi dikinase', *Aust. J. Plant Physiol.*, 6, 607-619.
- Hatch, M. D., Dröscher, L., Flügge, U. I., und Heldt, H. W.** (1984), 'A specific translocator for oxaloacetate in chloroplasts', *FEBS Lett*, 178, 15-19.
- Hatch, M. D.** (1987), 'C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure', *Biochim. Biophys. Acta*, 895, 81-106.

- Hatch, M. D.** (1992), 'C<sub>4</sub> Photosynthesis: an Unlikely Process Full of Surprises', *Plant Cell Physiol*, 33, 333-342.
- Hatch, M. D.** (1997), 'Resolving C<sub>4</sub> photosynthesis: trials, tribulations and other unpublished stories', *Aust. J. Plant Physiol.*, 24, 413–422.
- Hausler, R. E., Holtum, J. A., und Latzko, E.** (1987), 'CO<sub>2</sub> is the inorganic carbon substrate of NADP malic enzymes from *Zea mays* and from wheat germ', *Eur J Biochem*, 163 (3), 619-626.
- Hausler, R. E., Baur, B., Scharte, J., Teichmann, T., Eicks, M., Fischer, K. L., Flugge, U. I., Schubert, S., Weber, A., und Fischer, K.** (2000), 'Plastidic metabolite transporters and their physiological functions in the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*', *Plant J*, 24 (3), 285-296.
- Hausler, R. E., Hirsch, H. J., Kreuzaler, F., und Peterhansel, C.** (2002), 'Overexpression of C<sub>4</sub>-cycle enzymes in transgenic C<sub>3</sub> plants: a biotechnological approach to improve C<sub>3</sub>-photosynthesis', *J Exp Bot*, 53 (369), 591-607.
- Häusler, R. E., Kleines, M., Uhrig, H., Hirsch, H. J. , und Smets, H.** (1999), 'Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum* lowers the CO<sub>2</sub> compensation point (T) and enhances dark and light respiration in transgenic potato', *J Exp Bot*, 50, 1231–1242.
- Häusler, R. E., Rademacher, T., Li, J., Lipka, V., Fischer, K. L., Schubert, S., Kreuzaler, F., und Hirsch, H. J.** (2001), 'Single and double overexpression of C<sub>4</sub>-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants', *J Exp Bot*, 52 (362), 1785-1803.
- Heldt, H. W. und Rapley, L.** (1970), 'Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and dihydroxyacetonephosphate, and of dicarboxylates across the inner membrane of spinach chloroplasts', *FEBS Lett*, 10 (3), 143-148.
- Heldt, W. H., Werdan, K., Milovancev, M., und Geller, G.** (1973), 'Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space', *Biochim Biophys Acta*, 314 (2), 224-241.
- Heldt, H. W., Portis, A. R., Lilley, R. M., Mosbach, A., und Chon, C. J.** (1980), 'Assay of nucleotides and other phosphate-containing compounds in isolated chloroplasts by ion exchange chromatography', *Anal Biochem*, 101 (2), 278-287.
- Heldt, H. W.** (1997), 'Plant Biochemistry & Molecular Biology', *Oxford University Press, New York*.
- Heng, H. H., Goetze, S., Ye, C. J., Liu, G., Stevens, J. B., Bremer, S. W., Wykes, S. M., Bode, J., und Krawetz, S. A.** (2004), 'Chromatin loops are selectively

- anchored using scaffold/matrix-attachment regions', *J Cell Sci*, 117 (Pt 7), 999-1008.
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R., und Stitt, M.** (2001), 'A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism', *Plant Cell*, 13 (3), 535-551.
- Herrmann, K. M. und Weaver, L. M.** (1999), 'The Shikimate Pathway', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 473-503.
- Holaday, A. S. und Chollet, R.** (1983), 'Photosynthetic/Photorespiratory Carbon Metabolism in the C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> Intermediate Species, *Moricandia arvensis* and *Panicum milioides*', *Plant Physiol*, 73 (3), 740-745.
- Holmes-Davis, R. und Comai, L.** (1998), 'Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression', *Trends Plant Sci.*, 3, 91-97.
- Huber, S. C. und Edwards, G. E.** (1977), 'Transport in C<sub>4</sub> mesophyll chloroplasts: evidence for an exchange of inorganic phosphate and phosphoenolpyruvate', *Biochim Biophys Acta*, 462 (3), 603-612.
- Hudson, G. S., Evans, J. R., von Caemmerer, S., Arvidsson, Y. B., und Andrews, T. J.** (1992), 'Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants', *Plant Physiol*, 98 (1), 294-302.
- Hudspeth, R. L., Guala, J. W., Dai, Z., Edwards, G. E., und Ku, M. S.** (1992), 'Expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic tobacco : effects on biochemistry and physiology', *Plant Physiol*, 98 (2), 458-464.
- Huppe, H. C. und Turpin, D. H.** (1994), 'Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells', *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 577-607.
- Igamberdiev, A. U. und Lea, P. J.** (2002), 'The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms', *Phytochemistry*, 60 (7), 651-674.
- Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., und Ohsumi, C.** (2003), 'Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*', *Plant J*, 33 (6), 975-987.
- Ireland, R. P. und Lea, P. J.** (1998), 'The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism in "Plant Amino Acids" edited by B. Singh', *Academic Press, New York*, 49-109.
- Ishimaru, K., Ishikawa, I., Matsuoka, M., und Ohsugi, R.** (1997), 'Analysis of a C<sub>4</sub> maize pyruvate, orthophosphate dikinase expressed in C<sub>3</sub> transgenic *Arabidopsis* plants', *Plant Science*, 129, 57-64.

- Ishimaru, K., Okawa, Y., Ishige, T., Tobias, D. J., und Ohsugi, R.** (1998), 'Elevated pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C<sub>3</sub> transgenic potatoes with a C<sub>4</sub> maize PPDK gene', *Physiol. Plant.*, 103, 340-346.
- Jackson, D.A.** (1991), 'Structure-function relationships in eukaryotic nuclei', *Bioessays*, 13, 1-10.
- Jakeman, D. L. und Evans, J. N. S.** (1998), 'Overexpression, purification, and use of phosphoenol pyruvate synthetase in the synthesis of PEP analogs', *Bioorg. Chem.*, 26, 245-253.
- Jenkins, C. L., Furbank, R. T., und Hatch, M. D.** (1989), 'Mechanism of C<sub>4</sub> photosynthesis: a model describing the inorganic carbon pool in bundle sheath cells', *Plant Physiol*, 91 (4), 1372-1381.
- Jenkins, C. L., Furbank, R. T., und Hatch, M. D.** (1989), 'Inorganic Carbon Diffusion between C<sub>4</sub> Mesophyll and Bundle Sheath Cells: Direct Bundle Sheath CO<sub>2</sub> Assimilation in Intact Leaves in the Presence of an Inhibitor of the C<sub>4</sub> Pathway', *Plant Physiol*, 91 (4), 1356-1363.
- Jenkins, C. L.** (1989), 'Effects of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Inhibitor 3,3-Dichloro-2-(Dihydroxyphosphinoylmethyl)propenoate on Photosynthesis: C<sub>4</sub> Selectivity and Studies on C<sub>4</sub> Photosynthesis', *Plant Physiol*, 89 (4), 1231-1237.
- Jiao, J. A. und Chollet, R.** (1991), 'Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>4</sub> and crassulacean Acid metabolism plants', *Plant Physiol*, 95 (4), 981-985.
- Jordan, D. B. und Ogren, W. L.** (1984), 'The CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase', *Planta*, 161, 308-313.
- Jorgensen, R.** (1991), 'Silencing of plant genes by homologous transgenes', *Ag-Biotechnol. News Info*, 4, 265N-273N.
- Jorgensen, R.** (1991), 'Beyond antisense: how do transgenes interact with homologous plant genes? ', *Trends Biotechnol.*, 9, 266-267.
- Kajala, K., Covshoff, S., Karki, S., Woodfield, H., Tolley, B. J., Dionora, M. J., Mogul, R. T., Mabilangan, A. E., Danila, F. R., Hibberd, J. M., und Quick, W. P.** (2011), 'Strategies for engineering a two-celled C<sub>4</sub> photosynthetic pathway into rice', *J Exp Bot*, 62 (9), 3001-3010.
- Kaplan, A. und Reinhold, L.** (1999), 'CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms in Photosynthetic Microorganisms', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 539-570.
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H. J., Rosenkranz, R., Stabler, N., Schonfeld, B., Kreuzaler, F., und Peterhansel, C.** (2007), 'Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*', *Nat Biotechnol*, 25 (5), 593-599.

- Kinney, A. J.** (1998), 'Manipulating flux through plant metabolic pathways', *Curr Opin Plant Biol*, 1 (2), 173-178.
- Kirschbaum, M. U.** (2010), 'Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO<sub>2</sub> enrichment studies', *Plant Physiol*, 155 (1), 117-124.
- Kluge, M.** (1999), 'Ökologische Anpassungen: Crassulaceen-Säurestoffwechsel und C<sub>4</sub>-Photosynthese', *Photosynthese. D-P Häder, ed. (Stuttgart, New York: Thieme)*, 194-215.
- Knight, J. S. und Gray, J. C.** (1995), 'The N-terminal hydrophobic region of the mature phosphate translocator is sufficient for targeting to the chloroplast inner envelope membrane', *Plant Cell*, 7 (9), 1421-1432.
- Kobza, J. und Edwards, G. E.** (1987), 'Influences of leaf temperature on photosynthetic carbon metabolism in wheat', *Plant Physiol*, 83 (1), 69-74.
- Kogami, H., Shono, M., Koike, T., Yanagisawa, S., Izui, K., Sentoku, N., Tanifuji, S., Uchimiya, H., und Toki, S.** (1994), 'Molecular and physiological evaluation of transgenic tobacco plants expression a maize phosphoenolpyruvate carboxylase gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter', *Transgenic Res.*, 3, 287-296.
- Kohli, A., Leech, M., Vain, P., Laurie, D. A., und Christou, P.** (1998), 'Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (12), 7203-7208.
- Komari, T., Hiei, Y., Ishida, Y., Kumashiro, T., und Kubo, T.** (1998), 'Advances in cereal gene transfer', *Curr Opin Plant Biol*, 1 (2), 161-165.
- Kornberg, H. L. und Sadler, J. R.** (1961), 'The metabolism of C<sub>2</sub>-compounds in microorganisms. VIII. A dicarboxylic acid cycle as a route for the oxidation of glycollate by *Escherichia coli*', *Biochem J*, 81, 503-513.
- Kozaki, A. und Takeba, G.** (1996), 'Photorespiration protects C<sub>3</sub> plants from photooxidation', *Nature*, 384, 557-560.
- Ku, S. B. und Edwards, G. E.** (1977), 'Oxygen Inhibition of Photosynthesis: II. Kinetic Characteristics as Affected by Temperature', *Plant Physiol*, 59 (5), 991-999.
- Ku, S. B. und Edwards, G. E.** (1977), 'Oxygen Inhibition of Photosynthesis: I. Temperature Dependence and Relation to O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Solubility Ratio', *Plant Physiol*, 59 (5), 986-990.
- Ku, S. B., Edwards, G. E., und Tanner, C. B.** (1977), 'Effects of Light, Carbon Dioxide, and Temperature on Photosynthesis, Oxygen Inhibition of Photosynthesis, and Transpiration in *Solanum tuberosum*', *Plant Physiol*, 59 (5), 868-872.
- Ku, M. S., Wu, J., Dai, Z., Scott, R. A., Chu, C., und Edwards, G. E.** (1991), 'Photosynthetic and photorespiratory characteristics of flaveria species', *Plant Physiol*, 96 (2), 518-528.



- Ku, M. S., Kano-Murakami, Y., und Matsuoka, M.** (1996), 'Evolution and expression of C<sub>4</sub> photosynthesis genes', *Plant Physiol*, 111 (4), 949-957.
- Ku, M. S., Agarie, S., Nomura, M., Fukayama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, M., und Matsuoka, M.** (1999), 'High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants', *Nat Biotechnol*, 17 (1), 76-80.
- Ku, M. S., Cho, D., Li, X., Jiao, D. M., Pinto, M., Miyao, M., und Matsuoka, M.** (2001), 'Introduction of genes encoding C<sub>4</sub> photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences', *Novartis Found Symp*, 236, 100-111; discussion 111-106.
- Kurek, I., Chang, T. K., Bertain, S. M., Madrigal, A., Liu, L., Lassner, M. W., und Zhu, G.** (2007), 'Enhanced Thermostability of Arabidopsis Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress', *Plant Cell*, 19 (10), 3230-3241.
- Kurepa, J., Herouart, D., Van Montagu, M., und Inze, D.** (1997), 'Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments', *Plant Cell Physiol*, 38 (4), 463-470.
- Kuzniak, E., Patykowski, J., und Urbanek, H.** (1999), 'Involvement of the antioxidative system in tomato response to fusaric acid treatment', *J. Phytopathol.*, 147, 385-390.
- Lacuesta, M., Gonzalez-Moro, B., Gonzalez-Murua, C., Aparicio tejo, P., und Munoz-Rueda, A.** (1989), 'Effect of phosphinotricin (glufosinate) on activities of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Medicago sativa*', *Plant Physiol.*, 134, 304-307.
- Lai, L. B., Wang, L., und Nelson, T. M.** (2002), 'Distinct but conserved functions for two chloroplastic NADP-malic enzyme isoforms in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Flaveria species', *Plant Physiol*, 128 (1), 125-139.
- Lai, L. B., Tausta, S. L., und Nelson, T. M.** (2002), 'Differential regulation of transcripts encoding cytosolic NADP-malic enzyme in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Flaveria species', *Plant Physiol*, 128 (1), 140-149.
- Landy, A.** (1989), 'Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination', *Annu Rev Biochem*, 58, 913-949.
- Lawlor, D. W. und Fock, H.** (1977), 'Photosynthetic assimilation of 14CO<sub>2</sub> by water-stressed sunflower leaves in two oxygen concentrations and the specific activity of products', *J Exp Bot*, 28, 320-328.
- Lawlor, D. W.** (2001), 'Photosynthesis, 3rd edition', *BIOS scientific publishers Ltd.*

- Lazo, G. R., Stein, P. A., und Ludwig, R. A.** (1991), 'A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium', *Biotechnology (N Y)*, 9 (10), 963-967.
- Leegood, R. C.; Lea, P. J.; Adcock, M. D.; Haeusler, R. E.** (1995), 'The regulation and control of photorespiration', *J Exp Bot*, 46, 1397-1414.
- Leegood, R. C.** (1997), 'The regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis', *Advances in Botanical Research*, 26, 251-316.
- Leegood, R. C.** (2002), 'C<sub>4</sub> photosynthesis: principles of CO<sub>2</sub> concentration and prospects for its introduction into C<sub>3</sub> plants', *J Exp Bot*, 53 (369), 581-590.
- Leegood, R. C.** (2007), 'A welcome diversion from photorespiration', *Nat Biotechnol*, 25 (5), 539-540.
- Leegood RC, Acheson RM, Técsi LI, Walker RP.** (1999), 'The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants', *Kruger NJ, Hill SA, Ratcliffe RG, eds. Regulation of primary metabolic pathways in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*, 37-51.
- Lefebvre, S., Lawson, T., Zakhleniuk, O. V., Lloyd, J. C., Raines, C. A., und Fryer, M.** (2005), 'Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development', *Plant Physiol*, 138 (1), 451-460.
- Lehninger** (2001), 'Lehninger Biochemie 3. Auflage'.
- Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., und Cretin, C.** (1994), 'Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution', *Plant Sci.*, 99, 111-124.
- Leport, L., Kandlbinder, A., Baur, B., und Kaiser, W. M.** (1996), 'Diurnal modulation of phosphoenolpyruvate carboxylation in pea leaves and roots as related to tissue malate concentrations and to the nitrogen source', *Planta*, 198, 495-501.
- Li, H., Culligan, K., Dixon, R. A., und Chory, J.** (1995), 'CUE1: A Mesophyll Cell-Specific Positive Regulator of Light-Controlled Gene Expression in Arabidopsis', *Plant Cell*, 7 (10), 1599-1610.
- Li, B., Zhang, X. Q., und Chollet, R.** (1996), 'Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in tobacco leaves is activated by light in a similar but not identical way as in maize', *Plant Physiol.*, 111, 497-505.
- Li, M. Z. und Elledge, S. J.** (2005), 'MAGIC, an in vivo genetic method for the rapid construction of recombinant DNA molecules', *Nat Genet*, 37 (3), 311-319.
- Lieman-Hurwitz, J., Rachmilevitch, S., Mittler, R., Marcus, Y., und Kaplan, A.** (2003), 'Enhanced photosynthesis and growth of transgenic plants that express ictB, a gene involved in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> accumulation in cyanobacteria', *Plant Biotechnol J*, 1 (1), 43-50.

- Lin, L., Liu, Y. G., Xu, X., und Li, B.** (2003), 'Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10), 5962-5967.
- Lipka, B., Steinmuller, K., Rosche, E., Borsch, D., und Westhoff, P.** (1994), 'The C<sub>3</sub> plant *Flaveria pringlei* contains a plastidic NADP-malic enzyme which is orthologous to the C<sub>4</sub> isoform of the C<sub>4</sub> plant *F. trinervia*', *Plant Mol Biol*, 26 (6), 1775-1783.
- Lipka, V., Häusler, R. E., Rademacher, T., Li, J., Hirsch, H. J., und Kreuzaler, F.** (1999), '*Solanum tuberosum* double transgenic expressing phosphoenolpyruvate carboxylase and NADP-malic enzyme display reduced electron requirement for CO<sub>2</sub> fixation', *Plant Sci.*, 144, 93-105.
- Liu, Y. G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., und Shibata, D.** (1999), 'Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (11), 6535-6540.
- Lord, J. M.** (1972), 'Glycolate oxidoreductase in *Escherichia coli*', *Biochim Biophys Acta*, 267 (2), 227-237.
- Ludwig, M., von Caemmerer, S., Dean Price, G., Badger, M. R., und Furbank, R. T.** (1998), 'Expression of tobacco carbonic anhydrase in the C<sub>4</sub> dicot *Flaveria bidentis* leads to increased leakiness of the bundle sheath and a defective CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism', *Plant Physiol*, 117 (3), 1071-1081.
- Lyznik, L. A. und Dress, V.** (2008), 'Gene targeting for chromosome engineering applications in eukaryotic cells', *Recent Pat Biotechnol*, 2 (2), 94-106.
- Magnin, N. C., Cooley, B. A., Reiskind, J. B., und Bowes, G.** (1997), 'Regulation and Localization of Key Enzymes during the Induction of Kranz-Less, C<sub>4</sub>-Type Photosynthesis in *Hydrilla verticillata*', *Plant Physiol*, 115 (4), 1681-1689.
- Makino, A. und Mae, T.** (1999), 'Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO<sub>2</sub>', *Plant Cell Physiol.*, 40, 999-1006.
- Malone, S., Chen, Z. H., Bahrami, A. R., Walker, R. P., Gray, J. E., und Leegood, R. C.** (2007), 'Phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis: changes in gene expression, protein and activity during vegetative and reproductive development', *Plant Cell Physiol*, 48 (3), 441-450.
- Martinoia, E. und Rentsch, D.** (1994), 'Malate Compartmentation-Responses to a Complex Metabolism', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 45, 447-467.
- Matsumura, I. und Rowe, L. A.** (2005), 'Whole plasmid mutagenic PCR for directed protein evolution', *Biomol Eng*, 22 (1-3), 73-79.
- Matsuoka, M., Tada, Y., Fujimura, T., und Kano-Murakami, Y.** (1993), 'Tissue-specific light-regulated expression directed by the promoter of a C<sub>4</sub> gene,

- maize pyruvate, orthophosphate dikinase, in a C<sub>3</sub> plant, rice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (20), 9586-9590.
- Matsuoka, M.** (1995), 'The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in C<sub>4</sub> plants: structure, regulation and evolution', *Plant Cell Physiol*, 36 (6), 937-943.
- Matsuoka, M., Furbank, R. T., Fukayama, H., and Miyao, M.** (2001), 'Molecular Engineering of C<sub>4</sub> Photosynthesis', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 297-314.
- Maurino, V. G. and Peterhansel, C.** (2010), 'Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering', *Curr Opin Plant Biol*, 13 (3), 249-256.
- Mazur, B. J. and Chui, C. F.** (1985), 'Sequence of a genomic DNA clone for the small subunit of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase from tobacco', *Nucleic Acids Res*, 13 (7), 2373-2386.
- Meyer, P. and Saedler, H.** (1996), 'Homology-Dependent Gene Silencing in Plants', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 23-48.
- Migge, A., Carryol, E., Kunz, C., Hirel, B., Foch, H., and Becker, T.** (1997), 'Expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase doesn't depend on nitrate reduction and is unaffected by suppression of photorespiration', *J. Exp. Bot.*, 48, 1175-1184.
- Miyagawa, Y., Tamoi, M., and Shigeoka, S.** (2001), 'Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth', *Nat Biotechnol*, 19 (10), 965-969.
- Miyao, M. and Fukayama, H.** (2003), 'Metabolic consequences of overproduction of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants', *Arch Biochem Biophys*, 414 (2), 197-203.
- Miyao, M.** (2003), 'Molecular evolution and genetic engineering of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes', *J Exp Bot*, 54 (381), 179-189.
- Miyao, M., Masumoto, C., Miyazawa, S., and Fukayama, H.** (2011), 'Lessons from engineering a single-cell C<sub>4</sub> photosynthetic pathway into rice', *J Exp Bot*, 62 (9), 3021-3029.
- Mokhtarpour, H., Teh, C. B. S., Saleh, G., Selamat, A. B., Asadi, M. E., and Kamkar, B.** (2010), 'Non-destructive estimation of maize leaf area, fresh weight, and dry weight using leaf length and leaf width', 5, 19-26.
- Monson, R. K., Moore, B. d., Ku, M. S. B., and Edwards, G. E.** (1986), 'Co-function of C<sub>3</sub>- and C<sub>4</sub>-photosynthetic pathways in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Flaveria* species', *Planta*, 168, 493-502.
- Monson, R. K., Teeri, J. A., Ku, M. S. B., Gurevitch, J., Mets, L. J., and Dudley, S.** (1988), 'Carbon-isotope discrimination by leaves of *Flaveria* species exhibiting different amounts of C<sub>3</sub>- and C<sub>4</sub>-cycle co-function', *Planta*, 174, 145-151.

- Muhaidat, R., Sage, R. F., und Dengler, N. G.** (2007), 'Diversity of Kranz anatomy and biochemistry in C<sub>4</sub> eudicots', *Am J Bot*, 94 (3), 362-381.
- Muller, G. L., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., und Lara, M. V.** (2008), 'Nicotiana tabacum NADP-malic enzyme: cloning, characterization and analysis of biological role', *Plant Cell Physiol*, 49 (3), 469-480.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., und Stewart, A. F.** (2001), 'Techniques: Recombinogenic engineering--new options for cloning and manipulating DNA', *Trends Biochem Sci*, 26 (5), 325-331.
- Nadolska-Orczyk, A., Orczyk, W., und Przetakiewicz, A.** (2000), 'Agrobacterium-mediated transformation of cereals - from technique development to its application', *Acta Physiol. Plant*, 22, 77-88.
- Naidu, S. L., Moose, S. P., AK, A. L-Shoaibi, Raines, C. A., und Long, S. P.** (2003), 'Cold tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes', *Plant Physiol*, 132 (3), 1688-1697.
- Naqvi, S., Farre, G., Sanahuja, G., Capell, T., Zhu, C., und Christou, P.** (2010), 'When more is better: multigene engineering in plants', *Trends Plant Sci*, 15 (1), 48-56.
- Nelson, E. B. und Tolbert, N. E.** (1970), 'Glycolate dehydrogenase in green algae', *Arch Biochem Biophys*, 141 (1), 102-110.
- Nimmo, H.G.** (2000), 'The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants', *Trends Plant Sci.*, 5, 75-80.
- Nomura, M., Sentoku, N., Nishimura, A., Lin, J. H., Honda, C., Taniguchi, M., Ishida, Y., Ohta, S., Komari, T., Miyao-Tokutomi, M., Kano-Murakami, Y., Tajima, S., Ku, M. S., und Matsuoka, M.** (2000), 'The evolution of C<sub>4</sub> plants: acquisition of cis-regulatory sequences in the promoter of C<sub>4</sub>-type pyruvate, orthophosphate dikinase gene', *Plant J*, 22 (3), 211-221.
- Nybom, N.** (1955), 'The pigment characteristics of chlorophyll mutations in barley', *Hereditas*, 41, 483-498.
- Ogren, W. L.** (1984), 'Photorespiration: Pathways, regulation and modification', *Annual Review in Plant Physiology*, 35, 415-442.
- O'Leary, M. H., Rife, J. E., und Slater, J. D.** (1981), 'Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase', *Biochemistry*, 20 (25), 7308-7314.
- Osaki, M. und Shinano, T.** (2000), 'Influence of carbon-nitrogen balance on productivity of C<sub>3</sub> plants and effect of high expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice', *Studies in Plant Science*, 7, 177-192.
- Osmond, C. B.** (1978), 'Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context', *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29, 379-414.

- Padidam, M. und Cao, Y.** (2001), 'Elimination of transcriptional interference between tandem genes in plant cells', *Biotechniques*, 31 (2), 328-330, 332-324.
- Palmieri, L., Vozza, A., Agrimi, G., De Marco, V., Runswick, M. J., Palmieri, F., und Walker, J. E.** (1999), 'Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate', *J Biol Chem*, 274 (32), 22184-22190.
- Park, J., Okita, T. W., und Edwards, G. E.** (2010), 'Expression profiling and proteomic analysis of isolated photosynthetic cells of the non-Kranz C<sub>4</sub> species *Bienertia sinuspersici*', *Funct. Plant Biol.*, 37, 1-13.
- Parry, M. A., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A., Madgwick, P. J., und Keys, A. J.** (2003), 'Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation', *J Exp Bot*, 54 (386), 1321-1333.
- Pawlowski, W. P. und Somers, D. A.** (1998), 'Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (21), 12106-12110.
- Pellicer, M. T., Badia, J., Aguilar, J., und Baldoma, L.** (1996), 'glc locus of *Escherichia coli*: characterization of genes encoding the subunits of glycolate oxidase and the glc regulator protein', *J Bacteriol*, 178 (7), 2051-2059.
- Peterhänsel, C., Niessen, M., und Kebeish, R. M.** (2008), 'Metabolic engineering towards the enhancement of photosynthesis', *Photochem Photobiol*, 84 (6), 1317-1323.
- Peterhänsel, C.** (2011), 'Best practice procedures for the establishment of a C<sub>4</sub> cycle in transgenic C<sub>3</sub> plants', *J Exp Bot*, 62 (9), 3011-3019.
- Peterhänsel, C. und Maurino, V. G.** (2011), 'Photorespiration redesigned', *Plant Physiol*, 155 (1), 49-55.
- Pienta, K. J., Getzenberg, R. H., und Coffey, D. S.** (1991), 'Cell structure and DNA organization', *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1 (4), 355-385.
- Piffanelli, P., Ramsay, L., Waugh, R., Benabdelmouna, A., D'Hont, A., Hollricher, K., Jorgensen, J. H., Schulze-Lefert, P., und Panstruga, R.** (2004), 'A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew', *Nature*, 430 (7002), 887-891.
- Pilon, M., Ravet, K., und Tapken, W.** (2011), 'The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases', *Biochim Biophys Acta*, 1807 (8), 989-998.
- Portis, A. R., Jr. und Parry, M. A.** (2007), 'Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective', *Photosynth Res*, 94 (1), 121-143.
- Powles, S. B.** (1984), 'Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light', *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35, 15-44.

- Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E., und Smith, S. M.** (2007), 'Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in beta-oxidation but not in the glyoxylate cycle', *Plant J*, 50 (3), 381-390.
- Preston, A.** (2003), 'Choosing a cloning vector', *Methods Mol Biol*, 235, 19-26.
- Puchta, H.** (1998), 'Towards targeted transformation in plants', *Trends Plant Sci*, 3, 77-87.
- Rademacher, T., Hausler, R. E., Hirsch, H. J., Zhang, L., Lipka, V., Weier, D., Kreuzaler, F., und Peterhansel, C.** (2002), 'An engineered phosphoenolpyruvate carboxylase redirects carbon and nitrogen flow in transgenic potato plants', *Plant J*, 32 (1), 25-39.
- Raines, C. A.** (2003), 'The Calvin cycle revisited', *Photosynth Res*, 75 (1), 1-10.
- Raines, C. A.** (2011), 'Increasing photosynthetic carbon assimilation in C<sub>3</sub> plants to improve crop yield: current and future strategies', *Plant Physiol*, 155 (1), 36-42.
- Ramazanov, Z. und Cardenas, J.** (1992), 'Inorganic carbon transport across cell compartments of the halotolerant alga *Dunaliella salina*', *Physiol. Plant*, 85, 121-128.
- Rao, S. K., Magnin, N. C., Reiskind, J. B., und Bowes, G.** (2002), 'Photosynthetic and other phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in the single-cell, facultative C<sub>4</sub> system of *Hydrilla verticillata*', *Plant Physiol*, 130 (2), 876-886.
- Rao, V. S., Rao, S. K., Reiskind, J. B., und Bowes, G.** (2005), 'Carbonic anhydrase isoforms in the C<sub>4</sub> CCM of *Hydrilla*', *van der Est, A., Bruce, D., (eds) Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives Allen Press, Inc Kansas*, 954-955.
- Rao, S., Reiskind, J., und Bowes, G.** (2006), 'Light regulation of the photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in *Hydrilla verticillata*', *Plant Cell Physiol*, 47 (9), 1206-1216.
- Rao, S. K., Fukayama, H., Reiskind, J. B., Miyao, M., und Bowes, G.** (2006), 'Identification of C<sub>4</sub> responsive genes in the facultative C<sub>4</sub> plant *Hydrilla verticillata*', *Photosynth Res*, 88 (2), 173-183.
- Rau, M. H. und Senger, H.** (1965), 'Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit einzelner Pigmentmangel-Mutanten von *Chlorella*', *Planta*, 65, 186-194.
- Raven, J. A., Johnston, A. M., Kübler, J. E., Korb, R., McInroy, S. G., Handley, L. L., Scrimgeour, C. M., Walker, D. I., Beardall, J., Vanderklift, M., Fredriksen, S., und Dunton, K. H.** (2002), 'Mechanistic interpretation of carbon isotope discrimination by marine macroalgae and seagrasses', *Funct. Plant Biol.*, 29, 355-378.
- Read, B. A. und Tabita, F. R.** (1994), 'High substrate specificity factor ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from eukaryotic marine algae and prop-

- erties of recombinant cyanobacterial RubiSCO containing "algal" residue modifications', *Arch Biochem Biophys*, 312 (1), 210-218.
- Reed, M. L. und Graham, D.** (1981), 'Carbonic anhydrase in plants: distribution, properties and possible physiological roles', *Reinhold, L., Harbourne J. B., Swain, T., Eds. Progress in Phytochemistry. Oxford: Pergamon Press*, 47-94.
- Register, J. C., 3rd, Peterson, D. J., Bell, P. J., Bullock, W. P., Evans, I. J., Frame, B., Greenland, A. J., Higgs, N. S., Jepson, I., Jiao, S., und et al.** (1994), 'Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment', *Plant Mol Biol*, 25 (6), 951-961.
- Reiskind, J. B., Madsen, T. V., VanGinkel, L. C., und Bowes, G.** (1997), 'Evidence that inducible C<sub>4</sub>-type photosynthesis is a chloroplastic CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in *Hydrilla*, a submersed monocot', *Plant Cell and Environment*, 20, 211-220.
- Renne, P., Dressen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Flugge, U. I., Westhoff, P., und Weber, A. P.** (2003), 'The Arabidopsis mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2', *Plant J*, 35 (3), 316-331.
- Reppellin, A., Baga, M., Jauhar, P., und Chibbar, R.** (2001), 'Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: New challenges', *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 64, 159-183.
- Reumann, S. und Weber, A. P.** (2006), 'Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C<sub>2</sub> cycle have become filled--others remain', *Biochim Biophys Acta*, 1763 (12), 1496-1510.
- Rinalducci, S., Murgiano, L., und Zolla, L.** (2008), 'Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants', *J Exp Bot*, 59 (14), 3781-3801.
- Roberts, J. K., Hooks, M. A., Miaullis, A. P., Edwards, S., und Webster, C.** (1992), 'Contribution of Malate and Amino Acid Metabolism to Cytoplasmic pH Regulation in Hypoxic Maize Root Tips Studied Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy', *Plant Physiol*, 98 (2), 480-487.
- Robinson, S. P. und Portis, A. R.** (1988), 'Involvement of stromal ATP in the light activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in intact isolated chloroplasts', *Plant Physiol*, 86 (1), 293-298.
- Sage, R. F., Percy, R. W., und Seemann, J. R.** (1987), 'The Nitrogen Use Efficiency of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Plants : III. Leaf Nitrogen Effects on the Activity of Carboxylating Enzymes in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.)', *Plant Physiol*, 85 (2), 355-359.
- Sage, R. F.** (1999), 'Why C<sub>4</sub> photosynthesis. C<sub>4</sub> Plant Biology, edited by R.K. Monson and R.F. Sage.', *Academic Press San Diego*, 3, 3-16.



- Sage, R. F.** (2002), 'Variation in the  $k_{\text{cat}}$  of Rubisco in  $C_3$  and  $C_4$  plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature', *J Exp Bot*, 53 (369), 609-620.
- Sage, R. F.** (2002), ' $C_4$  photosynthesis in terrestrial plants does not require Kranz anatomy', *Trends Plant Sci*, 7 (7), 283-285.
- Sage, R. F., Cen, Y. P., und Li, M.** (2002), 'The activation state of Rubisco directly limits photosynthesis at low  $\text{CO}_2$  and low  $\text{O}_2$  partial pressures', *Photosynth Res*, 71 (3), 241-250.
- Sage, R. F.** (2004), 'The evolution of  $C_4$  photosynthesis', *New Phytologist*, 161, 341-370.
- Saigo, M., Bologna, F. P., Maurino, V. G., Detarsio, E., Andreo, C. S., und Drincovich, M. F.** (2004), 'Maize recombinant non- $C_4$  NADP-malic enzyme: a novel dimeric malic enzyme with high specific activity', *Plant Mol Biol*, 55 (1), 97-107.
- Salvucci, M. E. und Bowes, G.** (1981), 'Induction of reduced photorespiratory activity in submersed and amphibious aquatic macrophytes', *Plant Physiol*, 67 (2), 335-340.
- Salvucci, M. E. und Bowes, G.** (1983), 'Two photosynthetic mechanisms mediating the low photorespiratory state in submersed aquatic angiosperms', *Plant Physiol*, 73 (2), 488-496.
- Salvucci, M. E., Osteryoung, K. W., Crafts-Brandner, S. J., und Vierling, E.** (2001), 'Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo', *Plant Physiol*, 127 (3), 1053-1064.
- Salvucci, M. E. und Crafts-Brandner, S. J.** (2004), 'Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments', *Plant Physiol*, 134 (4), 1460-1470.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R.** (1977), 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12), 5463-5467.
- Sasaki, Y., Sone, T., Yoshida, S., Yahata, K., Hotta, J., Chesnut, J. D., Honda, T., und Imamoto, F.** (2004), 'Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system', *J Biotechnol*, 107 (3), 233-243.
- Schaaf, J., Walter, M. H., und Hess, D.** (1995), 'Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues)', *Plant Physiol*, 108 (3), 949-960.
- Scheibe, R.** (2004), 'Malate valves to balance cellular energy supply', *Physiol Plant*, 120 (1), 21-26.

- Schmid, J. und Amrhein, N.** (1995), 'Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants', *Phytochemistry*, 4, 737-749.
- Sentoku, N., Taniguchi, M., Sugiyama, T., Ishimaru, K., Ohsugi, R., Takaiwa, F., und Toki, S.** (2000), 'Analysis of the transgenic tobacco plants expressing *Panicum miliaceum* aspartate aminotransferase genes', *Plant Cell Rep.*, 19, 598-603.
- Sharkey, T. D.** (1985), ' $O_2$ -insensitive photosynthesis in  $C_3$  plants: its occurrence and a possible explanation', *Plant Physiol*, 78 (1), 71-75.
- Sharkey, T. D., Seemann, J. R., und Berry, J. A.** (1986), 'Regulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Activity in Response to Changing Partial Pressure of  $O_2$  and Light in *Phaseolus vulgaris*', *Plant Physiol*, 81 (3), 788-791.
- Sharkey, T. D.** (1988), 'Estimating the rate of photorespiration in leaves', *Plant Physiol.*, 73, 147-152.
- Sharkey, T. D., Badger, M. R., von Caemmerer, S., und Andrews, T. J.** (2001), 'Increased heat sensitivity of photosynthesis in tobacco plants with reduced Rubisco activase', *Photosynth Res*, 67 (1-2), 147-156.
- Sharkey, T. D.** (2001), 'Photorespiration', *Encyclopedia of life sciences* 1-5.
- Sharkey, T. D., Laporte, M., Lu, Y., Weise, S., und Weber, A. P.** (2004), 'Engineering plants for elevated  $CO_2$ : a relationship between starch degradation and sugar sensing', *Plant Biol (Stuttg)*, 6 (3), 280-288.
- Sharkey, T. D. und Zhang, R.** (2010), 'High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis', *J Integr Plant Biol*, 52 (8), 712-722.
- Sheen, J.** (1999), ' $C_4$  Gene Expression', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 187-217.
- Sheriff, A., Meyer, H., Riedel, E., Schmitt, J. M., und Lapke, C.** (1998), 'The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a  $C_3$  plant with respect to the intracellular location of the enzyme', *Plant Sci.*, 136, 43-57.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., und Simon, M.** (1992), 'Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (18), 8794-8797.
- Slooten, L., Capiou, K., Van Camp, W., Van Montagu, M., Sybesma, C., und Inze, D.** (1995), 'Factors Affecting the Enhancement of Oxidative Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Overexpressing Manganese Superoxide Dismutase in the Chloroplasts', *Plant Physiol*, 107 (3), 737-750.
- Smeekens, S., van Steeg, H., Bauerle, C., Bettenbroek, H., Keegstra, K., und Weisbeek, P.** (1987), 'Import into chloroplasts of a yeast mitochondrial protein directed by ferredoxin and plastocyanin transit peptides', *Plant Mol Biol*, 9, 377-388.

- Smith, N., Kilpatrick, J. B., und Whitelam, G. C.** (2001), 'Superfluous transgene integration in plants', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20, 215-249.
- Somerville, C. R., Portis, A. R., und Ogren, W. L.** (1982), 'A Mutant of *Arabidopsis thaliana* Which Lacks Activation of RuBP Carboxylase In Vivo', *Plant Physiol*, 70 (2), 381-387.
- Somerville, C. R. und Ogren, W. L.** (1982), 'Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity', *Biochem J*, 202 (2), 373-380.
- Somerville, C. R.** (2001), 'An Early Arabidopsis Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration', *Plant Physiol.*, 125 (1), 20-24.
- Spalding, M. H., Schmitt, M. R., Ku, S. B., und Edwards, G. E.** (1979), 'Intracellular Localization of Some Key Enzymes of Crassulacean Acid Metabolism in *Sedum praealtum*', *Plant Physiol*, 63 (4), 738-743.
- Spencer, D., Anderson, L., Ksander, G., Klaine, S., und Bailey, F.** (1994), 'Vegetative propagule production and allocation of carbon and nitrogen by monoecious *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle grown at two photoperiods', *Aquatic Botany*, 48, 121-132.
- Spreitzer, R. J. und Salvucci, M. E.** (2002), 'Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme', *Annu Rev Plant Biol*, 53, 449-475.
- Stabenau, H., Winkler, U., und Saftel, W.** (1984), 'Mitochondrial metabolism of glycolate in the alga *Eremosphaera viridis*', *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 114, 413-420.
- Stam, M., de Bruin, R., Kenter, S., van der Hoorn, R. A. L., van Blokland, R., Mol, J. N. M., und Kooter, J. M.** (1997), 'Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats', *Plant J.*, 12, 63-82.
- Stemmer, W. P.** (1994), 'DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (22), 10747-10751.
- Sternberg, N. und Cohen, G.** (1989), 'Genetic analysis of the lytic replicon of bacteriophage P1. II. Organization of replicon elements', *J Mol Biol*, 207 (1), 111-133.
- Sternberg, N.** (1990), 'Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (1), 103-107.
- Stief, A., Winter, D. M., Stratling, W. H., und Sippel, A. E.** (1989), 'A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity', *Nature*, 341 (6240), 343-345.
- Stitt, M. und Sonnewald, U.** (1995), 'Regulation of metabolism in transgenic plants', *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 341-368.

- Stitt, M.** (1999), 'Nitrate regulation of metabolism and growth', *Curr Opin Plant Biol*, 2 (3), 178-186.
- Streatfield, S. J., Weber, A., Kinsman, E. A., Hausler, R. E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W. M., Pyke, K. A., Flugge, U. I., und Chory, J.** (1999), 'The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression', *Plant Cell*, 11 (9), 1609-1622.
- Sutherland, P. und McAlister-Henn, L.** (1985), 'Isolation and expression of the *Escherichia coli* gene encoding malate dehydrogenase', *J Bacteriol*, 163 (3), 1074-1079.
- Suzuki, S., Murai, N., Burnell, J. N., und Arai, M.** (2000), 'Changes in photosynthetic carbon flow in transgenic rice plants that express C<sub>4</sub>-type phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Urochloa panicoides*', *Plant Physiol*, 124 (1), 163-172.
- Svensson, P., Blasing, O. E., und Westhoff, P.** (1997), 'Evolution of the enzymatic characteristics of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase--a comparison of the orthologous PPCA phosphoenolpyruvate carboxylases of *Flaveria trinervia* C<sub>4</sub> and *Flaveria pringlei* C<sub>3</sub>', *Eur J Biochem*, 246 (2), 452-460.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., und Takematsu, T.** (1986), 'Accumulation of ammonia in plants treated with Bialaphos', *Pesticide Sci.*, 11, 33-37.
- Taiz, L. und Zeiger, E.** (2001), 'Lehrbuch der Pflanzenphysiologie'.
- Takahashi, S., Bauwe, H., und Badger, M.** (2007), 'Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 144 (1), 487-494.
- Takeuchi, Y., Akagi, H., Kamasawa, N., Osumi, M., und Honda, H.** (2000), 'Aberant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme', *Planta*, 211 (2), 265-274.
- Taniguchi, M., Taniguchi, Y., Kawasaki, M., Takeda, S., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Miyake, H., und Sugiyama, T.** (2002), 'Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell Physiol*, 43 (7), 706-717.
- Taniguchi, Y., Ohkawa, H., Masumoto, C., Fukuda, T., Tamai, T., Lee, K., Sudoh, S., Tsuchida, H., Sasaki, H., Fukayama, H., und Miyao, M.** (2008), 'Overproduction of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C<sub>4</sub>-like photosynthetic pathway into rice', *J Exp Bot*, 59 (7), 1799-1809.
- Tetlow, I. J., Rawsthorne, S., Rines, C., und Emes, M. J.** (2005), 'Plastid metabolic pathways', *Møller SG (ed) Plastids. Blackwell, Oxford*, 60-109.

- Thierry, D. und Vaucheret, H.** (1996), 'Sequence homology requirements for transcriptional silencing of 35S transgenes and post-transcriptional silencing of nitrite reductase (trans)genes by the tobacco 271 locus', *Plant Mol Biol*, 32 (6), 1075-1083.
- Thompson, W. F., Allen, G. C., Hall, G. E., und Spiker, S.** (1996), 'Matrix attachment regions and transgene expression', *Genomes of Plant and Animals. 21st Stadler Genetics Symposium. (Gustafson, J. P. and Flavell, R. B., eds). New York: Plenum Press*, 243-269.
- Tolbert, N. E.** (1997), 'The C<sub>2</sub> Oxidative Photosynthetic Carbon Cycle', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 1-25.
- Tronconi, M. A., Fahnenstich, H., Gerrard Weehler, M. C., Andreo, C. S., Flugge, U. I., Drincovich, M. F., und 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 (4), 1540-1552.
- Tsang, E. W., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villarreal, R., Genetello, C., Van Montagu, M., und Inze, D.** (1991), 'Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress', *Plant Cell*, 3 (8), 783-792.
- Tsuchida, H., Tamai, T., Fukayama, H., Agarie, S., Nomura, M., Onodera, H., Ono, K., Nishizawa, Y., Lee, B. H., Hirose, S., Toki, S., Ku, M. S., Matsuoka, M., und Miyao, M.** (2001), 'High level expression of C<sub>4</sub>-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C<sub>3</sub> plant, rice', *Plant Cell Physiol*, 42 (2), 138-145.
- Tsuzuki, M., Miyachi, S., und Berry, J. A.** (1985), 'Intracellular accumulation of inorganic carbon and its active species taken up by *Chlorella vulgaris* 11h', *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms. Edited by Lucas, W. J. and Berry, J. A.*, 53-66.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F., und Kaldenhoff, R.** (2003), 'The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions', *Nature*, 425 (6959), 734-737.
- Uemura, K., Anwaruzzaman, Miyachi, S., und Yokota, A.** (1997), 'Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic red algae with a strong specificity for CO<sub>2</sub> fixation', *Biochem Biophys Res Commun*, 233 (2), 568-571.
- Ueno, Y., Hata, S., und Izui, K.** (1997), 'Regulatory phosphorylation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase: role of a conserved basic residue upstream of the phosphorylation site', *FEBS Lett*, 417 (1), 57-60.
- Ueno, Y., Imanari, E., Emura, J., Yoshizawa-Kumagaye, K., Nakajima, K., Inami, K., Shiba, T., Sakakibara, H., Sugiyama, T., und Izui, K.** (2000), 'Immunological analysis of the phosphorylation state of maize C<sub>4</sub>-form phosphoenolpy-

- ruvate carboxylase with specific antibodies raised against a synthetic phosphorylated peptide', *Plant J*, 21 (1), 17-26.
- Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, J. W., Christou, P., Allen, G. C., und Thompson, W. F.** (1999), 'Matrix attachment regions increase transgenic rice plants and their progeny', *Plant J.*, 18 (3), 233-242.
- Van Camp, W., Bowler, C., Villarroel, R., Tsang, E. W., Van Montagu, M., und Inze, D.** (1990), 'Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (24), 9903-9907.
- Van der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R. A., Goodman, H. M., und Van Montagu, M.** (1991), 'Plant enolase: gene structure, expression, and evolution', *Plant Cell*, 3 (7), 719-735.
- van 't Hof, R. und de Kruijff, B.** (1995), 'Characterization of the import process of a transit peptide into chloroplasts', *J Biol Chem*, 270 (38), 22368-22373.
- Vaucheret, H. und Fagard, M.** (2001), 'Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators', *Trends Genet*, 17 (1), 29-35.
- Voll, L., Hausler, R. E., Hecker, R., Weber, A., Weissenbock, G., Fiene, G., Waffenschmidt, S., und Flugge, U. I.** (2003), 'The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway', *Plant J*, 36 (3), 301-317.
- von Caemmerer, S. und Furbank, R. T.** (1999), 'Modelling of  $C_4$  photosynthesis. In: Sage R, Monson RK, editors.  $C_4$  plant biology', *Academic Press*, 173-211.
- von Caemmerer, S.** (2000), 'Biochemical Models of Leaf Photosynthesis', *CSIRO Publishing, Collingwood, Australia*.
- von Caemmerer, S. und Furbank, R. T.** (2003), 'The  $C_4$  pathway: an efficient  $CO_2$  pump', *Photosynth Res*, 77 (2-3), 191-207.
- von Caemmerer, S.** (2003), ' $C_4$  photosynthesis in a single  $C_3$  cell is theoretically inefficient but may ameliorate internal  $CO_2$  diffusion limitations of  $C_3$  leaves', *Plant, Cell and Environment*, 26, 1191-1197.
- von Caemmerer, S., Lawson, T., Oxborough, K., Baker, N. R., Andrews, T. J., und Raines, C. A.** (2004), 'Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco', *J Exp Bot*, 55 (400), 1157-1166.
- von Caemmerer, S. und Evans, J. R.** (2010), 'Enhancing  $C_3$  photosynthesis', *Plant Physiol*, 154 (2), 589-592.
- von Heijne, G.** (1988), 'Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes', *Biochim Biophys Acta*, 947 (2), 307-333.

- Voznesenskaya, E. V., Franceschi, V. R., Kiirats, O., Freitag, H., und Edwards, G. E.** (2001), 'Kranz anatomy is not essential for terrestrial C<sub>4</sub> plant photosynthesis', *Nature*, 414 (6863), 543-546.
- Voznesenskaya, E. V., Franceschi, V. R., Kiirats, O., Artyusheva, E. G., Freitag, H., und Edwards, G. E.** (2002), 'Proof of C<sub>4</sub> photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae)', *Plant J*, 31 (5), 649-662.
- Voznesenskaya, E. V., Koteyeva, N. K., Chuong, S. D., Akhani, H., Edwards, G. E., und Franceschi, V. R.** (2005), 'Differentiation of cellular and biochemical features of the single-cell C<sub>4</sub> syndrome during leaf development in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae)', *Am J Bot*, 92 (11), 1784-1795.
- Walker, R. P. und Leegood, R. C.** (1996), 'Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. Studies in plants with C<sub>4</sub> photosynthesis and Crassulacean acid metabolism and in germinating seeds', *Biochem J*, 317 ( Pt 3), 653-658.
- Walker, R. P., Acheson, R. M., Técsi, L. I., und Leegood, R. C.** (1997), 'Phosphoenolpyruvate carboxykinase in C<sub>4</sub> plants: its role and regulation', *Aust. J. Plant Physiol.*, 24, 459-468.
- Walker, R. P., Chen, Z. H., Tecs, L. I., Famiani, F., Lea, P. J., und Leegood, R. C.** (1999), 'Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development', *Planta*, 210 (1), 9-18.
- Wang, Y. H. und Chollet, R.** (1993), 'Partial purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase from illuminated maize leaves', *Arch Biochem Biophys*, 304 (2), 496-502.
- Wang, J., Tan, H., und Zhao, Z. K.** (2007), 'Over-expression, purification, and characterization of recombinant NAD-malic enzyme from *Escherichia coli* K12', *Protein Expr Purif*, 53 (1), 97-103.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A., und Copeland, N. G.** (2005), 'Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection', *Nucleic Acids Res*, 33 (4), e36.
- Werdan, K., Heldt, H. W., und Milovancev, M.** (1975), 'The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO<sub>2</sub> fixation in the light and dark', *Biochim Biophys Acta*, 396 (2), 276-292.
- Westhoff, P. und Gowik, U.** (2010), 'Evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis--looking for the master switch', *Plant Physiol*, 154 (2), 598-601.
- Whitney, S. M., Baldet, P., Hudson, G. S., und Andrews, T. J.** (2001), 'Form I Rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts', *Plant J*, 26 (5), 535-547.

- Whitney, S. M. und Sharwood, R. E.** (2007), 'Linked Rubisco subunits can assemble into functional oligomers without impeding catalytic performance', *J Biol Chem*, 282 (6), 3809-3818.
- Whitney, S. M., Kane, H. J., Houtz, R. L., und Sharwood, R. E.** (2009), 'Rubisco oligomers composed of linked small and large subunits assemble in tobacco plastids and have higher affinities for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>', *Plant Physiol*, 149 (4), 1887-1895.
- Whitney, S. M., Houtz, R. L., und Alonso, H.** (2011), 'Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO<sub>2</sub>-sequestering enzyme, Rubisco', *Plant Physiol*, 155 (1), 27-35.
- Wild, A. und Ziegler, C.** (1989), 'The effect of bialaphos on ammonium assimilation and photosynthesis. I. Effect on the enzymes of ammonium-assimilation', *Naturforsch.*, 44, 97-102.
- Willeford, K. O. und Wedding, R. T.** (1987), 'pH Effects on the Activity and Regulation of the NAD Malic Enzyme', *Plant Physiol*, 84 (4), 1084-1087.
- Wingler, A., Lea, P. J., und Leegood, R. C.** (1997), 'Control of photosynthesis in barley plants with reduced activities of glycine decarboxylase', *Planta*, 202, 171-178.
- Winter, K. und von Willert, D.J.** (1972), 'NaCl-induzierter Crassulaceensäurestoffwechsel bei *Mesembryanthemum crystallinum*', *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 67, 166-170.
- Winter, K. und Holtum, J. A.** (2007), 'Environment or development? Lifetime net CO<sub>2</sub> exchange and control of the expression of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*', *Plant Physiol*, 143 (1), 98-107.
- Wolter, F. P., Fritz, C. C., Willmitzer, L., Schell, J., und Schreier, P. H.** (1988), 'rbcS genes in *Solanum tuberosum*: conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (3), 846-850.
- Wu, G., Truksa, M., Datla, N., Vrinten, P., Bauer, J., Zank, T., Cirpus, P., Heinz, E., und Qiu, X.** (2005), 'Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants', *Nat Biotechnol*, 23 (8), 1013-1017.
- Yamaguchi, M., Tokushige, M., und Katsuki, H.** (1973), 'Studies on regulatory functions of malic enzymes. II. Purification and molecular properties of nicotinamide adenine dinucleotide-linked malic enzyme from *Escherichia coli*', *J Biochem*, 73 (1), 169-180.
- Yamaguchi, M.** (1979), 'Studies on regulatory functions of malic enzymes. IV. Effects of sulphhydryl group modification on the catalytic function of NAD-linked malic enzyme from *Escherichia coli*', *J Biochem*, 86 (2), 325-333.



- Ye, X., Al-Babili, S., Klott, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., und Potrykus, I.** (2000), 'Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm', *Science*, 287 (5451), 303-305.
- Zelitch, I., Schultes, N. P., Peterson, R. B., Brown, P., und Brutnell, T. P.** (2009), 'High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air', *Plant Physiol*, 149 (1), 195-204.
- Zhang, X. Q., Li, B., und Chollet, R.** (1995), 'In Vivo Regulatory Phosphorylation of Soybean Nodule Phosphoenolpyruvate Carboxylase', *Plant Physiol*, 108 (4), 1561-1568.
- Zhao, J. Z., Cao, J., Li, Y., Collins, H. L., Roush, R. T., Earle, E. D., und Shelton, A. M.** (2003), 'Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution', *Nat Biotechnol*, 21 (12), 1493-1497.
- Zhong, R., Richardson, E. A., und Ye, Z. H.** (2007), 'Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis', *Planta*, 225 (6), 1603-1611.
- Zhu, B., Cai, G., Hall, E. O., und Freeman, G. J.** (2007), 'In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations', *Biotechniques*, 43 (3), 354-359.
- Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P., und Capell, T.** (2008), 'Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (47), 18232-18237.

## 5.6 Lebenslauf

### Persönliches

Name: Matthias Buntru  
 Geburtsdatum: 16.09.1980  
 Geburtsort: Überlingen  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Promotion

seit 08/2008 am Lehrstuhl für Molekulargenetik und Botanik der RWTH Aachen  
 (Prof. F. Kreuzaler)  
*Thema:* "Optimierung der Photosynthese von C<sub>3</sub>-Pflanzen: C<sub>4</sub>-ähnlicher Zyklus und chloroplastidärer Bypass"

### Hochschulstudium

10/2001 – 03/2005 Bachelorstudium der Biotechnologie an der Fachhochschule Furtwangen mit Bachelorarbeit bei Trenzyme in Konstanz  
*Thema:* „Erhöhung der Transformationseffizienz kompetenter Zellen“  
 02/2005 Studienabschluss als Bachelor of Engineering mit Gesamtnote „gut“  
 10/2005 – 03/2008 Masterstudium der Molekularen Biotechnologie an der RWTH Aachen mit Masterarbeit am Lehrstuhl für Molekulargenetik und Botanik (Prof. F. Kreuzaler)  
*Thema:* „Optimierung der CO<sub>2</sub>-Fixierung von C<sub>3</sub>-Pflanzen: Etablierung eines neuen Systems zum Gentransfer“  
 03/2008 Studienabschluss als Master of Science mit Gesamtnote „sehr gut“

### Schulbildung

09/1991 – 06/2000 Abschluss Abitur am Gymnasium Überlingen

### Berufsbezogene Tätigkeiten

09/2003 – 02/2004 Praxissemester bei Medigenomix GmbH in Martinsried bei München  
 09/2004 – 02/2005 Bachelorarbeit bei Trenzyme in Konstanz  
 04/2008 – 07/2008 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Molekulargenetik und Botanik

## 5.7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Fritz Kreuzaler danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können sowie die wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Björn Usadel danke ich für die Übernahme des Hauptreferates.

Herrn Prof. Dr. Christoph Peterhänsel danke ich für die Übernahme des Coreferates sowie die vielen hilfreichen Anregungen.

Herrn Dr. Nikolaus Schlaich und Dr. Heinz-Josef Hirsch danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Stefanie, Lena und Gina danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit und den Spaß im Labor.

Christian danke ich für die langjährige Zusammenarbeit im Labor und die daraus entstandene Freundschaft.

Den restlichen Mitgliedern des Instituts danke ich für die angenehme Zeit im Labor und die freundschaftliche Atmosphäre.

Besonders herzlich möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir über die ganze Zeit gegeben haben, danken.

## 5.8 Erklärung

Hiermit versichere ich, Matthias Buntru, dass ich die vorliegende Dissertation eigenhändig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Matthias Buntru

Aachen, im