

**Redoxhomöostase in *Arabidopsis thaliana*:  
Untersuchungen zur Rolle der NADP-abhängigen  
Malatdehydrogenase und der Alternativen  
Oxidase mittels transgener Pflanzen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(*doctor rerum naturalium*)

- Dr. rer. nat. -

Eingereicht am Fachbereich Biologie/Chemie der  
Universität Osnabrück

von  
Dipl. Biol. Inga Strodtkötter

Osnabrück, Dezember 2009



Gutachter:

Frau Prof. Dr. Renate Scheibe

Herr Prof. Dr. Karlheinz Altendorf



Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Photosynthetischer Elektronentransport und Anpassungen an hohe Lichtintensitäten.....	1
1.2	Funktion und Regulation der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase.....	9
1.3	Funktion und Regulation der Alternativen Oxidase (AOX).....	14
1.4	Ziele der Arbeit.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1	Materialien.....	21
2.2	Pflanzen, Anzuchtbedingungen und Vorbehandlungen.....	21
2.2.1	Anzucht auf Erde.....	22
2.2.2	Starklicht (SL)-Behandlung.....	22
2.2.3	Antimycin A (AA)-Behandlung.....	22
2.2.4	Anzucht in Sterilkultur.....	23
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.3.1	Bakterienstämme.....	24
2.3.2	Plasmide und Oligonukleotide.....	24
2.3.3	Anzucht von Bakterien.....	26
2.3.4	Isolierung von genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> .....	27
2.3.5	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
2.3.6	Restriktion von DNA.....	29
2.3.7	DNA-Ligation.....	29
2.3.8	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mittels Photometrie.....	30
2.3.9	DNA-Sequenzanalyse.....	30
2.3.10	Kolonie-PCR.....	30
2.3.11	Agarosegelelektrophorese.....	31
2.3.12	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
2.3.13	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.3.14	Herstellung chemisch kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen.....	32
2.3.15	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.3.16	Transformation von Plasmiden in <i>A. tumefaciens</i> -Zellen.....	33
2.3.17	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	34
2.3.18	Herstellung des Promotorregion F2-GUS-Konstrukts (pIS 36).....	34
2.3.19	<i>A. tumefaciens</i> -vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i> ( <i>floral dip</i> ).....	35
2.3.20	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. thaliana</i> .....	36
2.3.21	DNase-Verdau.....	37
2.3.22	Herstellung des ersten Strangs cDNA.....	37
2.3.23	Formaldehyd-Gel zur Auftrennung von RNA-Fragmenten.....	37
2.3.24	Transfer von RNA auf eine Nylonmembran ( <i>Northern-Blot</i> ).....	38
2.3.25	Herstellung einer radioaktiven DNA-Sonde zur Identifizierung von Expressionsmustern.....	39
2.3.26	Hybridisierung von RNA mit einer radioaktiv markierter Sonde.....	39
2.3.27	DNA- und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung.....	40
2.4	Biochemische Methoden.....	41
2.4.1	Herstellung eines <i>A. thaliana</i> -Protein-Rohextrakts.....	41
2.4.2	Bestimmung des Proteingehalts.....	41
2.4.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.4.4	<i>Western-Blot</i> -Analyse und Immunodetektion.....	43
2.4.5	Histochemische Lokalisierung der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität.....	44

2.4.6	<i>Metabolic profiling</i> mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ....	45
2.4.6.1	Probenvorbereitung .....	45
2.4.6.2	Analyse der Stoffwechselmetabolite mittels GC/MS .....	46
2.4.7	Bestimmung des Chlorophyllgehalts .....	46
2.4.8	Enzymaktivitätsmessungen .....	47
2.4.8.1	Bestimmung der Katalase-Aktivität.....	47
2.4.8.2	Bestimmung der NADP-MDH-Gesamtaktivität.....	47
2.4.8.3	Auswertung der Messdaten.....	49
2.4.9	Enzymatische Bestimmung des Stärkegehalts .....	49
2.4.10	Bestimmung des GSH- bzw. GSSG-Gehalts mittels <i>high performance liquid chromatography (HPLC)</i> .....	51
<b>2.5</b>	<b>Physiologische Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.5.1	Chlorophyllfluoreszenzmessungen mittels Fluorimeter <i>PAM-101</i> .....	53
2.5.1.1	Experimentelles <i>Setup</i> .....	53
2.5.1.2	Bestimmung der Parameter zur photosynthetischen Lichtnutzung.....	54
2.5.2	Messungen mit dem <i>portable photosynthesis</i> -System LI-6400XT .....	55
2.5.2.1	Experimentelles <i>Setup</i> .....	56
2.5.2.2	Lichtsättigungskurven und Chlorophyllfluoreszenzmessungen .....	57
2.5.2.3	<i>A/C<sub>i</sub></i> -Kurven.....	58
2.5.2.4	Berechnung des Parameters <i>A<sub>PR</sub></i> .....	60
2.5.3	Nachweis von ROS in Protoplasten .....	60
2.5.3.1	Protoplastenisolierung aus <i>A. thaliana</i> .....	60
2.5.3.2	Visualisierung von ROS.....	61
2.5.4	Bestimmung des Wassergehalts in Pflanzen .....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Nutzung von <i>nadp-mdh</i>-Mutanten zur Untersuchung alternativer Strategien zur Elektronenverteilung .....</b>	<b>63</b>
3.1.1	Molekulare Charakterisierung zweier unabhängiger homozygoter <i>nadp-mdh</i> -Mutanten .....	63
3.1.1.1	Nachweis der Homozygotie von <i>nadp-mdh</i> -Mutanten mittels PCR .....	64
3.1.1.2	Sequenzanalysen zur Lokalisation der inserierten Fremd-DNA .....	65
3.1.1.3	Nachweis der Homozygotie von <i>nadp-mdh</i> -Mutanten mittels Expressionsanalysen.....	66
3.1.2	Phänotypische und physiologische Untersuchungen der <i>nadp-mdh</i> -Mutanten.....	68
3.1.3	Einfluss von Starklicht auf <i>nadp-mdh</i> -Mutanten im Vergleich zu WT-Pflanzen .....	72
3.1.3.1	Analyse verschiedener Metabolitgehalte in <i>nadp-mdh</i> - und WT-Pflanzen nach einer Starklicht-Behandlung .....	73
3.1.3.2	Auswirkung von Starklicht auf das NTRC-System in <i>nadp-mdh</i> - und WT-Pflanzen.....	77
3.1.3.3	Auswirkung von Starklicht auf die photosynthetische Lichtnutzung von <i>nadp-mdh</i> - und WT-Pflanzen.....	79
3.1.3.4	Auswirkung von Starklicht auf die <i>AOX1A</i> -Expression und die Photorespiration in <i>nadp-mdh</i> - und WT-Pflanzen.....	81
<b>3.2</b>	<b>Regulation der Expression der <i>NADP-MDH</i> .....</b>	<b>87</b>
3.2.1	Auswirkungen von T-DNA-Insertionen in der vermuteten Promotorregion auf die Expression der <i>NADP-MDH</i> .....	88
3.2.2	Untersuchung einer vermuteten Promotorregion mittels eines GUS-Reportergen-Konstrukts.....	90
<b>3.3</b>	<b>Phänotypische und physiologische Untersuchungen von <i>aox1a</i>-Mutanten nach Behandlung mit dem Inhibitor Antimycin A .....</b>	<b>94</b>
3.3.1	Auswirkungen von Antimycin A auf den Phänotyp von <i>aox1a</i> - und WT-Pflanzen....	95
3.3.2	Auswirkungen von Antimycin A auf die Bildung von intrazellulären ROS in <i>aox1a</i> - und WT-Pflanzen.....	96
3.3.3	Analyse verschiedener Metabolitgehalte in <i>aox1a</i> - und WT-Pflanzen nach Antimycin A-Behandlung .....	99



3.3.4	Auswirkungen von Antimycin A auf die Photorespiration in <i>aox1a</i> - und WT-Pflanzen .....	101
3.3.5	Auswirkungen einer Antimycin A-Behandlung auf photosynthetische Lichtnutzung in <i>aox1a</i> - und WT-Pflanzen .....	104
3.3.6	Expressionsanalysen weiterer AOX-Isoformen in <i>aox1a</i> - und WT-Pflanzen nach Antimycin A-Behandlung.....	106
3.3.7	Identifizierung von <i>aox1a-aox1d</i> -Doppelmutanten .....	107
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>111</b>
<b>4.1</b>	<b>Analyse der <i>nadp-mdh</i>-Mutanten .....</b>	<b>111</b>
4.1.1	Phänotypischer Vergleich von <i>nadp-mdh</i> - und WT-Pflanzen .....	111
4.1.2	Auswirkungen des Fehlens der NADP-MDH auf die photochemische Lichtnutzung.....	112
4.1.3	Lichtakklimation von <i>nadp-mdh</i> -Mutanten zur Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase .....	113
4.1.3.1	Unveränderte Aktivität des Beck-Halliwell-Asada-Wegs .....	114
4.1.3.2	Unveränderte CO <sub>2</sub> -Assimilation .....	115
4.1.3.3	Prolin als Redox-Puffer .....	116
4.1.3.4	Das NTRC-System als kompensierender <i>poising</i> -Mechanismus .....	117
4.1.3.5	Photorespiration als kompensierendes Ventil.....	119
4.1.3.6	Kompensierenden Strategien im Überblick.....	122
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zur Promotorregion des <i>NADP-MDH</i>-Gens.....</b>	<b>123</b>
4.2.1	Einfluss von T-DNA-Insertionen im Promotorbereich der <i>NADP-MDH</i> .....	124
4.2.2	Untersuchung der Promotoraktivität mittels GUS-Reportergen-Analysen.....	126
<b>4.3</b>	<b>Auswirkungen des Inhibitors Antimycin A auf den Stoffwechsel von <i>aox1a</i>- und WT-Pflanzen .....</b>	<b>127</b>
4.3.1	Phänotypischer Vergleich von <i>aox1a</i> - und WT-Pflanzen.....	128
4.3.2	Einfluss von Antimycin A auf verschiedene Metabolitgehalte in <i>aox1a</i> -Mutanten und WT-Pflanzen.....	129
4.3.3	Auswirkung des Fehlens von AOX1A auf die Expression der übrigen AOX1-Isoformen .....	130
4.3.4	Auswirkungen auf photosynthetische Lichtnutzung und Photorespiration .....	131
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>155</b>
8.1	Abkürzungen .....	155
8.2	<i>Metabolic profiling</i> .....	159
8.3	Carboxylierungseffizienzen .....	161
8.4	Transkriptionsfaktor-Bindemotive .....	162
8.5	Gewebespezifische Genexpressionsdaten.....	163
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>165</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>167</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>169</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>171</b>



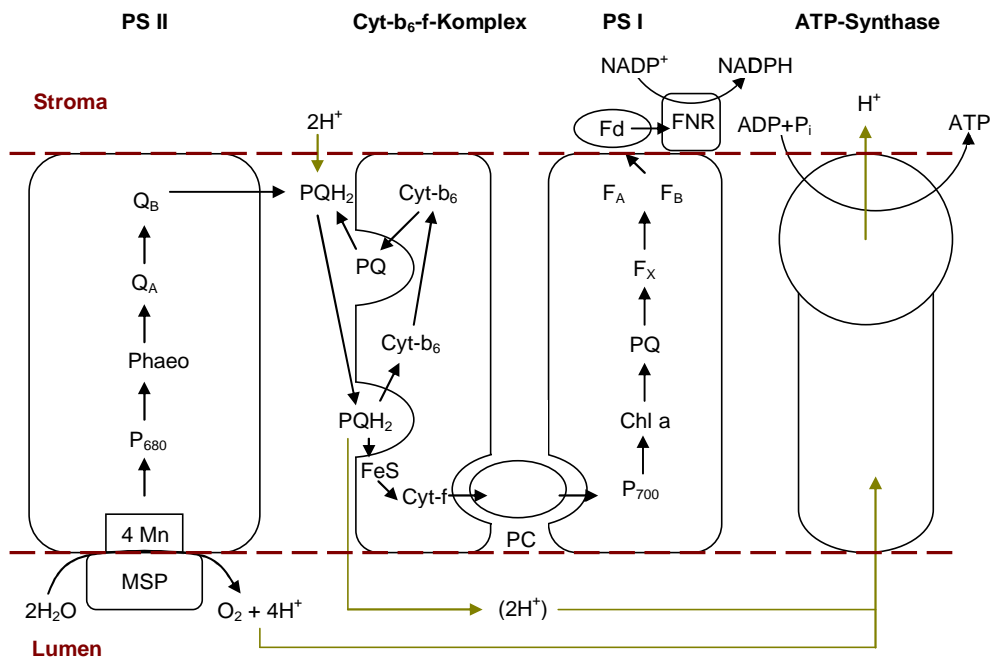
# 1 Einleitung

Photosynthetisch aktive bzw. photoautotrophe Organismen nutzen die Sonnenenergie zur Synthese organischer Verbindungen. Diese Verbindungen können verwendet werden, um Biomasse aufzubauen oder um mit Hilfe der darin gespeicherten Energie zelluläre Prozesse anzutreiben. Neben dem förderlichen Effekt der Energiegewinnung stellt die Nutzung des Sonnenlichts auch Risiken für photosynthetisch aktive Organismen dar, insbesondere bei hohen Lichtintensitäten. Im Laufe der Evolution der Landpflanzen wurde eine Vielzahl von Schutzmechanismen gebildet, welche die Balance aus Nutzen und Schaden der Lichtenergie gewährleisten. Im Folgenden werden einige der wichtigsten zellulären Abläufe aufgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei der vorgestellten Prozesse, das in Chloroplasten lokalisierte Malat-Ventil und den alternativen respiratorischen Weg der mitochondrialen Atmungskette, anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. näher zu charakterisieren.

## 1.1 Photosynthetischer Elektronentransport und Anpassungen an hohe Lichtintensitäten

In höheren Pflanzen ist die Photosynthese in Chloroplasten lokalisiert. Die Photosynthese lässt sich vereinfacht in zwei Hauptvorgänge unterteilen. In einem primären Prozess (auch als Lichtreaktion bezeichnet), der an Thylakoidmembranen abläuft, wird die Energie der Photonen dazu genutzt, unter Photolyse des Wassers über Elektronentransportketten die energiereichen Verbindungen NADPH und ATP zu generieren. In einem sekundären Prozess (auch als Dunkelreaktion bezeichnet), der im Stroma stattfindet, wird ein Teil des gebildeten ATP und NADPH im Calvin-Zyklus verwendet, um CO<sub>2</sub> zu fixieren und zu Kohlenhydraten zu reduzieren. Die Fixierung erfolgt dabei über die Carboxylase-Funktion der RubisCO.

Während der Lichtreaktion kommt es in den Thylakoidmembranen zu einem lichtinduzierten linearen Elektronentransport von Wasser auf NADP<sup>+</sup>. Die Redoxkomponenten sind entsprechend ihres Standardredoxpotentials angeordnet (HILL & BANDALL, 1960). Im Wesentlichen beinhaltet die Elektronentransportkette drei große membrandurchspannende Komplexe, das Photosystem (PS) I, den Cytochrome-b<sub>6</sub>-f-Komplex (Cyt-b<sub>6</sub>-f-Komplex) und das PSII. Diese Komplexe interagieren indirekt über kleinere Elektronen-Carrier miteinander (siehe Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des linearen photosynthetischen Elektronentransports in der Thylakoidmembran höherer Pflanzen.** PS: Photosystem; MSP: Manganstabilisierendes Enzym; Phaeo: Phaeophytin;  $Q_A$ : fest gebundenes Plastochinon;  $Q_B$ : locker gebundenes Plastochinon; PQ: Plastochinon;  $PQH_2$ : Plastohydrochinon; Cyt: Cytochrom; Chl: Chlorophyll; F:  $4Fe-4S$ -Zentrum; Fd: Ferredoxin; FNR: Ferredoxin-NADP-Reduktase (SWINDELL, 2003; modifiziert).

PSII und PSI haben unterschiedliche Absorptionsmaxima, 680 nm beim PSI und 700 nm beim PSII. Beide sind mit spezifischen Antennensystemen bestehend aus Core-Komplexen und Lichtsammelkomplexen (*light harvesting complex, LHC*) assoziiert, welche mit Pigmenten ausgestattet sind. Diese erhöhen u.a. das Spektrum der zu absorbierenden Photonen. Durch die Absorption von Licht kommt es im PSII-Reaktionszentrum P680 zu einer Ladungstrennung. P680 wird oxidiert, während Phaeophytin (Phaeo) durch Elektronenaufnahme reduziert wird. Im Lumen erfolgt durch einen  $O_2$ -entwickelnden Komplex die Oxidation von Wasser. Die Elektronen werden auf P680 übertragen, wodurch dieses Pigment wieder re-reduziert wird. Vom Phaeophytin aus erfolgt dann die Elektronenübertragung über Plastochinone (PQ) auf den Cyt- $b_6$ -f-Komplex. Von dort aus gelangen die Elektronen über Plastocyanin (PC) zum PSI. Das ebenfalls durch absorbierte Lichtenergie und Elektronenabgabe oxidiert vorliegende Reaktionszentrum P700 wird auf diese Weise wieder re-reduziert. An der Stromaseite übertragen eine Reihe membrangebundener Eisen-Schwefel-Proteine die Elektronen auf den ersten löslichen Akzeptor, das Ferredoxin (Fd). Das Enzym Fd-NADP-Reduktase (FNR) kann die Übertragung der Elektronen von Fd auf  $NADP^+$  katalysieren, wodurch NADPH entsteht (HAEHNEL, 1984). Während der Photolyse des

Wassers am PSII werden auf der Lumenseite Protonen freigesetzt. Zusätzlich kommt es am Cyt-b<sub>6</sub>-f-Komplex zu einem Elektronentransport-gekoppelten Protonentransport ins Lumen. Dieser kann mit Hilfe des sogenannten Q-Zyklus sogar verdoppelt werden. Der entstehende elektrochemische Protonengradient treibt eine transmembrane ATP-Synthase an, wobei ATP generiert wird (MITCHELL, 1979).

Photosynthetisch hergestelltes ATP und/oder NADPH wird für viele metabolische Prozesse, wie der CO<sub>2</sub>-Assimilation im Calvin-Zyklus, dem Nitrat-Metabolismus, der Lipid-, Aminosäure-, und Pigmentsynthese sowie für die Regulierung von Genexpressionen und Proteinaktivitäten, benötigt. Trotzdem können verschiedene biotische und abiotische Stressbedingungen dazu führen, dass mehr lichtinduziertes ATP und NADPH generiert wird als benötigt. Dies kann zu einer Umlenkung der Elektronen in Richtung alternativer elektronenverbrauchender Prozesse führen. Zudem werden ATP und NADPH nicht immer in einem konstanten stöchiometrischen Verhältnis benötigt. Aus diesem Grund verfügen Pflanzen über verschiedene *poising*-Mechanismen, die dazu beitragen können, das ATP/NADPH-Verhältnis auszubalancieren und eine erhöhte Bildung von reaktionsfreudigen Sauerstoffspezies (ROS) aufgrund limitierter Elektronenakzeptoren zu vermeiden. Dennoch vermehrt entstehende ROS können durch antioxidative Systeme eliminiert werden, um oxidative Schäden zu verhindern (EBERHARD *et al.*, 2008). Beide Abläufe sind für Pflanzen besonders wichtig, um sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen, wie einstrahlende Lichtintensitäten oder Temperaturen, anpassen zu können. In Abb. 1.2 ist in Anlehnung an NIYOGI (1999) ein schematisches Diagramm von Mechanismen dargestellt, welche in Chloroplasten bei Einstrahlung überschüssiger Lichtenergie zum Schutz vor Photoinhibition kurzfristig ablaufen können.

Unter **Photoinhibition** versteht man die Hemmung der Photosynthese durch überschüssiges Licht (KOK, 1956). In erster Linie ist dieses Phänomen auf eine Schädigung des D1-Proteins im PSII-Reaktionszentrum zurückzuführen. Wirken zu hohe Lichtenergien auf die Chlorophylle, können diese vom angeregten Zustand in einen Triplettzustand übergehen, woraus chemisch aggressiver Singulett-Sauerstoff entstehen kann. Die dadurch entstehenden photooxidativen Schäden werden ständig durch aufwendige molekulare Prozesse wie Zerlegung und Reparatur des partiell inaktiven PSII und Abbau des beschädigten D1-Proteins sowie dessen Neusynthese, aufgehoben. Kommt es aber durch zu hohe Lichtintensitäten zu einem Ungleichgewicht, bei dem die Schädigung überwiegt, führt dies zu

Photoinhibition (ARO, 1993). Um dies zu verhindern, verfügen Chloroplasten über zahlreiche kurzfristige Schutzmechanismen (siehe Abb. 1.2).

**Anpassungen der Antennensysteme**, welche mit den Photosystemen assoziiert sind, können zum Ausbalancieren der Lichtabsorption und der Lichtnutzung beitragen (ANDERSON, 1986). Kurzzeitige Veränderungen der relativen Antennengrößen am PSI und PSII können aufgrund von *state transitions* ablaufen. Ist die Anregung im PSII relativ gesehen höher als im PSI, stauen sich die Elektronen im PQ-Pool an. Dieser Zustand führt zur Aktivierung einer Kinase, welche die peripher gelegenen *LHCs* am PSII phosphoryliert. Dies hat eine räumliche Trennung der phosphorylierten *LHCs* vom PSII zur Folge, wodurch die effektive Größe des PSII-Antennensystems verkleinert wird. Des Weiteren wird angenommen, dass die absorbierte Lichtenergie der phosphorylierten *LHCs* aufgrund der räumlichen Umstrukturierung vermehrt in Richtung des niederenergetischen PSI geleitet wird (ALLEN, 1995).

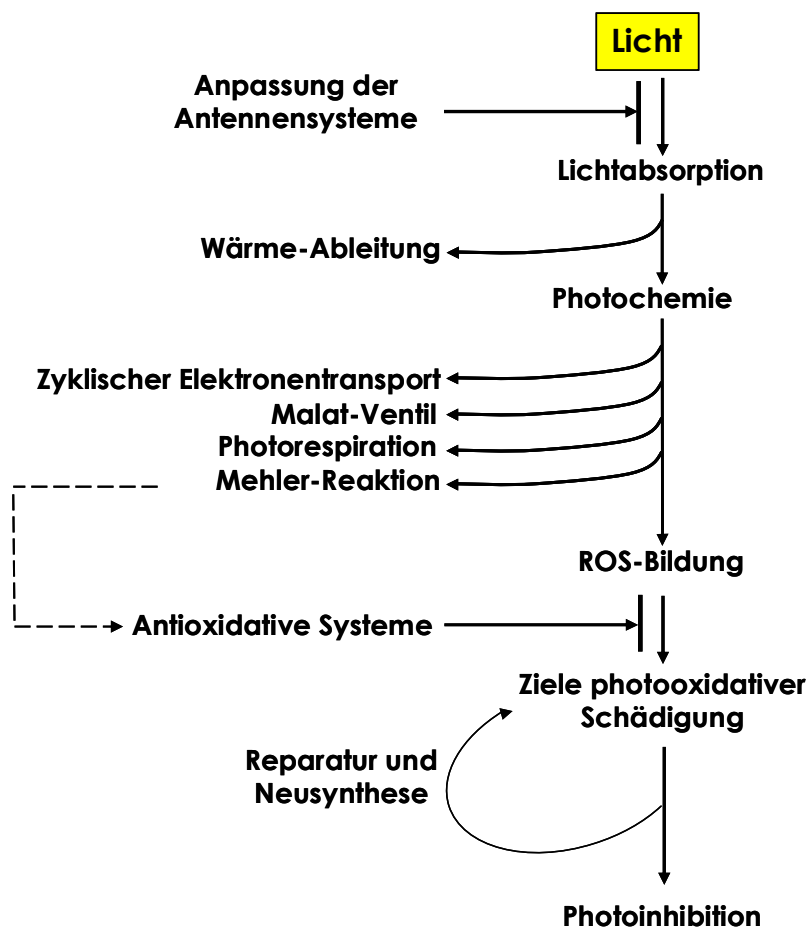


Abb. 1.2: Chloroplastidäre Mechanismen zum Schutz vor Photoinhibition bei Einstrahlung überschüssiger Lichtenergie (NIYOGI, 1999; modifiziert).

Ein weiterer Schutz des Photosyntheseapparats erfolgt über die Ableitung von großen Anteilen überschüssiger Anregungsenergien in Form von **Wärme**. *LHCs* bestehen aus Polypeptiden, die Chlorophyll-a, Chlorophyll-b sowie Carotinoide binden. Die Schutzfunktion von Carotinoiden basiert auf der Eigenschaft, sowohl den Triplettzustand des Chlorophylls als auch den Singulettzustand des Sauerstoffs in den jeweiligen Grundzustand überführen zu können. Das dadurch entstehende angeregte Triplettcarotinoid geht durch Wärmeabgabe wieder in seinen Grundzustand über (SIEFERMANN-HARMS, 1987). Eine bedeutende Rolle spielt hierbei das zu den Carotinoiden gehörende Xanthophyll Zeaxanthin. Bei hohen Lichtintensitäten kommt es aufgrund der Protonentranslokation während des photosynthetischen Elektronentransports zu einem erhöhten pH-Gradienten an der Thylakoidmembran. Dieser begünstigt den Ablauf des sogenannten Zeaxanthin-Zyklus, bei dem unter Bildung von Zeaxanthin überschüssige Lichtenergie in Wärme umgewandelt wird (DEMMIG-ADAMS & ADAMS, 1996). Die vorgestellten zellulären Abläufe von Wärme-Ableitung, *state transitions* und letztendlich auch Photoinhibition stellen wesentliche Schutzprozesse dar, die unter dem Begriff der nicht-photochemischen Löschung (*non-photochemical quenching*) von Anregungsenergie zusammengefasst werden können.

Bei der photochemisch genutzten Lichtenergie spricht man auch von der photochemischen Löschung (*photochemical quenching*) der Anregungsenergie. Überschreitet diese den metabolischen Bedarf, gibt es auch auf dieser Ebene zahlreiche Mechanismen, die einer Akkumulation von ROS und schließlich auch der Photoinhibition entgegenwirken. So kommt es neben dem linearen Elektronentransport in der chloroplastidären Elektronentransportkette unter bestimmten Bedingungen auch zum Ablauf eines **zyklischen Elektronentransports**. Bei diesem fließen die Elektronen vom angeregten Zustand des PSI wieder zurück zu PQ, um dann über den Cyt-b<sub>6</sub>-f-Komplex wieder auf das PSI übertragen zu werden. Dadurch kommt es zu einer zusätzlichen Translokation von Protonen aus dem Stroma ins Lumen, was den  $\Delta\text{pH}$ -Wert bzw. den Protonengradienten an der Thylakoidmembran erhöht. Die protonenmotorische Kraft wird dann zur Erzeugung von ATP genutzt, ohne dass NADPH und Sauerstoff entstehen. Ein ATP/NADPH-Ungleichgewicht kann so ausbalanciert werden (HEBER & WALKER, 1992). Der Transfer der Elektronen vom PSI zurück in die Elektronentransportkette kann dabei auf zwei verschiedenen Wegen ablaufen, zum einen über NADPH und zum anderen direkt vom reduzierten Fd aus. Es wird angenommen, dass der weitaus größere Anteil des zyklischen Elektronentransport-induzierten  $\Delta\text{pH}$ -Werts über den Fd-Weg entsteht (MUNEKAGA *et al.*, 2004). Dieser läuft verstärkt bei Einstrahlung hoher überschüssiger Lichtenergien





Die **Photorespiration** basiert auf der Oxygenierungsaktivität der RubisCO. Anders als bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung entstehen bei dieser Reaktion nicht zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat, sondern ein Molekül 3-Phosphoglycerat und ein Molekül 2-Phosphoglycolat. Mit steigender Temperatur sinkt die Spezifität der RubisCO für  $\text{CO}_2$  (BROOKS & FARQUHAR, 1985). Zudem nimmt die Löslichkeit von  $\text{CO}_2$  mit steigender Temperatur stärker ab als die von  $\text{O}_2$ , was insgesamt zu einer Erhöhung der Photorespirationsrate unter hohen Temperaturen führt. Das entstehende Nebenprodukt 2-Phosphoglycolat wird in einer aufwendigen Reaktionskette, die sich über drei Kompartimente erstreckt, wieder in 3-Phosphoglycerat umgewandelt, welches in den Calvin-Zyklus eingespeist werden kann. Man spricht dabei auch vom Photorespirationsweg (OGREN, 1984).

In Abb. 1.3 sind die einzelnen Reaktionsschritte des Photorespirationswegs dargestellt. Noch in den Chloroplasten wird 2-Phosphoglycolat zu Glycolat hydrolysiert. Dieses wird dann in den Peroxisomen zu Glyoxylat oxidiert. Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird durch eine in Peroxisomen vorhandene Katalase wieder zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert. In den Peroxisomen wird Glyoxylat durch Transaminierung in Glycin umgewandelt, welches die Peroxisomen über Poren verlässt und in die Mitochondrien transportiert wird. Dort werden zwei Moleküle Glycin unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_4^+$  zu einem Molekül Serin umgesetzt. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente werden auf  $\text{NAD}^+$  übertragen. Die Oxidation des Glycins erfolgt durch den Glycin-Decarboxylase (GDC)-Komplex. Dabei handelt es sich um einen Multienzymkomplex, der aus einem H-, P-, T- sowie L-Protein besteht (NEUBURGER *et al.*, 1986; DOUCE *et al.*, 1994; OLIVER, 1994). Das entstandene NADH kann entweder in der mitochondrialen Atmungskette zur ATP-Synthese verwendet oder indirekt über das Malat-Oxalacetat-*Shuttle*-System in andere Zellkompartimente exportiert werden. In den Peroxisomen kann aus Serin unter Abgabe der Aminogruppe Hydroxypyruvat gebildet werden, welches daraufhin zu Glycerat reduziert wird. Die dazu benötigten Reduktionsäquivalente werden in Form von NADH bereitgestellt. Glycerat wird in den Chloroplasten zu 3-Phosphoglycerat phosphoryliert und in den Calvin-Zyklus zurückgeführt (OGREN, 1984; LEEGOOD *et al.*, 1995). Der Photorespirationsweg ist sehr energieaufwendig. Insgesamt wird beim Photorespirationsweg als Folge der RubisCO-Oxygenierungsaktivität mehr ATP und NAD(P)H verbraucht als im Calvin-Zyklus als Folge der RubisCO-Carboxylierungsaktivität. Während die Fähigkeit der RubisCO zur Oxygenierung früher eher als unerwünschtes Rudiment angenommen wurde, wird sie aufgrund des Photorespirationswegs in neueren Arbeiten als wichtiger energieableitender

Mechanismus beschrieben, der dazu beiträgt, den Photosyntheseapparat vor Photoinhibition zu schützen (z.B. WU *et al.*, 1991; KOZAKI & TAKEBA, 1996; OSMOND *et al.*, 1997; WINGLER *et al.*, 2000).

Bei einem hohen Reduktionsgrad des Fd als Folge eines NADP<sup>+</sup>-Mangels, besteht die Möglichkeit, dass die Elektronen vom PSI auf Sauerstoff übertragen werden. Bei diesem Vorgang, der als **Mehler-Reaktion** bezeichnet wird (MEHLER, 1951), entstehen einerseits Superoxidradikale, die wieder beseitigt werden müssen, andererseits führt diese Reaktion aber auch zu einer Verminderung des Elektronendrucks in der Elektronentransportkette, wodurch ihr eine Schutzfunktion gegen Photoinhibition zukommt (POLLE, 1996).

Die Entstehung von ROS während der Photosynthese ist trotz der genannten *poising*-Mechanismen unvermeidlich. Eine Akkumulation von ROS hat aber aufgrund ihrer Eigenschaften toxische Auswirkungen, welche Lipidperoxidationen sowie Oxidationen von Proteinen und Nukleinsäuren auslösen und damit zur Zerstörung von Zellstrukturen führen können (APEL & HIRT, 2004). Um dies zu verhindern, verfügen Pflanzen über eine Reihe enzymatischer sowie nicht-enzymatischer **antioxidativer Systeme**. Zu den nicht-enzymatischen Abwehrmechanismen gehören  $\alpha$ -Tocopherol, Phenole, Ascorbat oder Glutathion. Das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert unter Aufnahme von zwei Protonen die Disproportionierung der Superoxidradikale, die u.a. während der Mehler-Reaktion entstehen, zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (ASADA *et al.*, 1973; ASADA & TAKAHASHI, 1987). Obwohl Wasserstoffperoxid als Signalmolekül bekannt ist (FOYER & NOCTOR, 2005; FOYER *et al.*, 2009), hat es in höheren Konzentrationen auch eine schädigende Wirkung auf viele Enzyme. Aus diesem Grund besitzen Pflanzen ein Netzwerk von Mechanismen, um die Entstehung zu hoher Wasserstoffperoxid-Konzentrationen zu vermeiden (MITTLER *et al.*, 2004).

Anfallendes Wasserstoffperoxid wird u.a. in einer Serie von Reaktionen entfernt, die als Beck-Halliwell-Asada-Weg bezeichnet wird (FOYER & HALLIWELL, 1976; GRODON & BECK, 1979; ASADA, 1980). Dabei wird durch eine Ascorbatperoxidase (APX) zunächst das Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert. Als Elektronendonator fungiert bei dieser Reaktion Ascorbat. Das dabei entstehende radikalische Monodehydroascorbat (MDA) kann auf verschiedenen Wegen abgebaut werden. Zum einen kann es entweder über reduziertes Fd oder durch eine NADPH-abhängige MDA-Reduktase wieder zu Ascorbat reduziert werden. Zum anderen können aber auch zwei Moleküle MDA zu

einem Molekül Ascorbat und einem Molekül Dehydroascorbat disproportionieren. Das dabei entstehende Dehydroascorbat kann dann mit Hilfe von reduziertem Glutathion (GSH) durch eine Dehydroascorbat-Reduktase wieder zu Ascorbat reduziert werden. Das entstandene oxidierte Glutathion (GSSG) wird von einer Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH reduziert (ASADA, 2000).

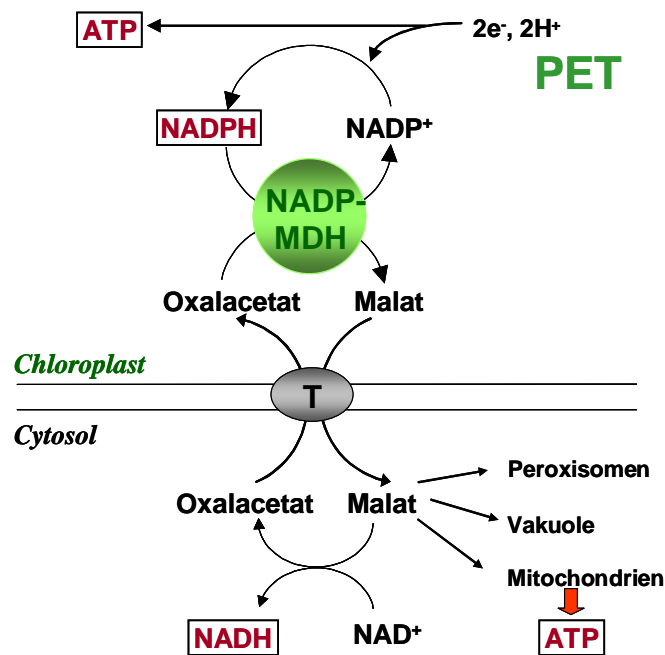
Eine Wasserstoffperoxid-entsorgende Katalase kommt in Pflanzen nur in den Peroxisomen, jedoch nicht in den Chloroplasten vor. Alternativ zum Beck-Halliwell-Asada-Weg wird Wasserstoffperoxid in den Chloroplasten aber auch über Peroxiredoxine (Prx) zu Wasser reduziert (BAIER & DIETZ, 1997). Insgesamt sind vier chloroplastidäre Isoformen bekannt (2-Cys Prx A und B, Prx Q und PrxII E), welche die nötigen Reduktionsäquivalente vermutlich über das Ferredoxin-Thioredoxin-System (Fd-Trx-System; siehe Kap. 1.2) erhalten (DIETZ *et al.*, 2006).

Als zusätzlicher Mechanismus zur Beseitigung von Wasserstoffperoxid wurde 2004 von SERRATO *et al.* ein chloroplastidäres NADPH-Thioredoxin-Reduktase-System (NTRC-System) beschrieben. Die NTRC verfügt dabei über eine NADPH-Thioredoxin-Reduktase (NTR)-Domäne am N-Terminus und eine Trx-Domäne am C-Terminus. Dadurch wird eine effiziente Reduzierung von 2-Cys Prx unter Verbrauch von NADPH ermöglicht. Reduziertes 2-Cys Prx überträgt die Elektronen, wie bereits beschrieben, auf Wasserstoffperoxid, wobei Wasser entsteht. Beim NTRC-System handelt es sich damit um ein chloroplastidäres antioxidatives System, das es ermöglicht, Reduktionsäquivalente für die Re-Reduktion von Prx über NADPH anstelle von reduziertem Fd zu liefern (SPINOLA *et al.*, 2008).

## 1.2 Funktion und Regulation der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase

Malatdehydrogenasen (MDH) katalysieren die reversible Umwandlung von Oxalacetat zu Malat, wobei sie je nach Spezifität entweder NAD/H oder NADP/H als Coenzym verwenden. NAD-abhängige Isoformen befinden sich in Mitochondrien, Cytosol, Peroxisomen und Chloroplasten (GIETL, 1992; BERKEMEYER *et al.*, 1998), während eine NADP-abhängige Isoform ausschließlich in Chloroplasten lokalisiert ist. Zusammen bilden sie ein System, das einen indirekten Austausch von Reduktionsäquivalenten zwischen den Kompartimenten ermöglicht. Die innere Membran von Mitochondrien und Plastiden gilt als weitestgehend impermeabel für NAD(P) bzw. NAD(P)H (HELDT, 1976; NEUBURGER *et al.*, 1985). Malat hingegen lässt sich zwischen den Kompartimenten

problemlos im Gegentausch mit Oxalacetat transportieren. Es ist ohnehin eine vielseitige Verbindung im pflanzlichen Metabolismus (LANCE & RUSTIN, 1984; MARTINOIA & RENTSCH, 1994) und damit als „Elektronenträger“ für den indirekten Austausch von Reduktionsäquivalenten besonders geeignet.



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Malat-Ventils in belichteten Pflanzenzellen.**  
T: Translokator; PET: photosynthetischer Elektronentransport (SCHEIBE, 2004; modifiziert).

Im Gegensatz zu ihrer besonderen Rolle bei der Vorfixierung des  $\text{CO}_2$  in der  $\text{C}_4$ -Photosynthese (EDWARDS *et al.*, 1985) ist die Funktion der im Kern kodierten chloroplastidären NADP-MDH im Stoffwechsel von  $\text{C}_3$ -Pflanzen weniger offensichtlich. Im Hinblick auf den Bedarf an Schutzmechanismen bei hohen Lichtintensitäten zur Vermeidung oxidativer Schäden, kommt der NADP-MDH in  $\text{C}_3$ -Pflanzen eine nicht zu unterschätzende Bedeutung bei der Feinabstimmung des stromalen Redoxzustands zu (SCHEIBE, 1987; SCHEIBE & STITT, 1988; BACKHAUSEN *et al.*, 1994). Wenn es unter bestimmten biotischen und abiotischen Stressbedingungen, wie z.B. hohen Lichtintensitäten, zu einem erhöhten Elektronendruck in der photosynthetischen Elektronentransportkette kommt, kann dies zu einem Anstau von NADPH führen. Unter diesen Bedingungen katalysiert die NADP-MDH in  $\text{C}_3$ -Pflanzen die Übertragung der Reduktionsäquivalente von NADPH auf Oxalacetat und stellt so den Elektronenakzeptor  $\text{NADP}^+$  wieder zur Verfügung (siehe Abb. 1.4). Das gebildete Malat

kann dann im Gegentausch mit Oxalacetat aus den Chloroplasten in das Cytosol transportiert werden. Der Dicarboxylat-Translokator, der diese Aufgabe vermutlich übernimmt, wurde 2002 von TANIGUCHI *et al.*, identifiziert. Das austransportierte Malat kann im Cytosol entweder durch eine NAD-abhängige Malatdehydrogenase (NAD-MDH) wieder zu Oxalacetat oxidiert werden, um dort NADH z.B. für die Nitrat-Reduktion bereitzustellen oder es kann über Malat-Oxalacetat-*Shuttle*-Systeme in andere Kompartimente transportiert werden. Auf diesem Weg kann Malat entweder Reduktionsäquivalente für die respiratorische Elektronentransportkette in den Mitochondrien oder für den photorespiratorischen Weg in den Peroxisomen liefern oder in der Vakuole zwischengespeichert werden. Das Zusammenwirken von NADP-MDH und Dicarboxylat-Transporter wird als Malat-Ventil bezeichnet (SCHEIBE, 2004; siehe Abb. 1.4). Da die ATP-Synthese in Chloroplasten auch während der Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf Oxalacetat fortgesetzt wird, kann mit Hilfe des Malat-Ventils ein Ungleichgewicht im ATP/NADPH-Verhältnis ausgeglichen werden (BACKHAUSEN *et al.*, 1998).

Der Elektronenfluss durch das Malat-Ventil wird über den Aktivierungszustand der redoxregulierten NADP-MDH bestimmt. Dieses Enzym liegt in seiner aktiven Form als Homodimer vor. Im Gegensatz zu den anderen Isoformen trägt die chloroplastidäre NADP-MDH am C- und N-Terminus Sequenzerweiterungen mit regulatorischen Cysteinresten, welche für die lichtabhängige Redoxmodulation verantwortlich sind (MACPHERSON *et al.*, 1998; JOHANSSON *et al.*, 1999). Liegen diese oxidiert als Disulfidbrücken vor, ist das Enzym inaktiv (SCHEIBE *et al.*, 1991). Erst bei Reduktion der Disulfidgruppen zu Dithiolgruppen durch das Fd-Trx-System kommt es zur Aktivierung des Enzyms (MIGINIAC-MASLOW *et al.*, 2000). Mit Eintreten der Dunkelheit wird die Inaktivierung der Zielenzyme durch Umkehrung der Reduktionsfolge erreicht. Dabei überführt der in Chloroplasten vorhandene Sauerstoff Trx und damit auch die Sulfhydrylgruppen der Zielenzyme wieder in den oxidierten Zustand zurück. Beim Fd-Trx-System handelt es sich um einen kovalenten Oxidations-Reduktionsmechanismus an Cysteinresten, wobei das Gleichgewicht zwischen reduzierter und oxidierter Form je nach Stoffwechselsituation mehr oder weniger stark verschoben werden kann (BUCHANAN, 1984). Aufgrund dieser Redoxregulation kann die NADP-MDH nur im Licht aktiv sein. Allerdings lässt sich im Falle der NADP-MDH die Trx-vermittelte Enzymaktivierung durch NADP<sup>+</sup> als spezifischen Effektor drosseln. Ein hohes NADP<sup>+</sup>/NADPH-Verhältnis führt so zur Hemmung der NADP-MDH-Aktivierung (SCHEIBE & JACQUOT, 1983). Diese zusätzliche Feinregulation stellt sicher,

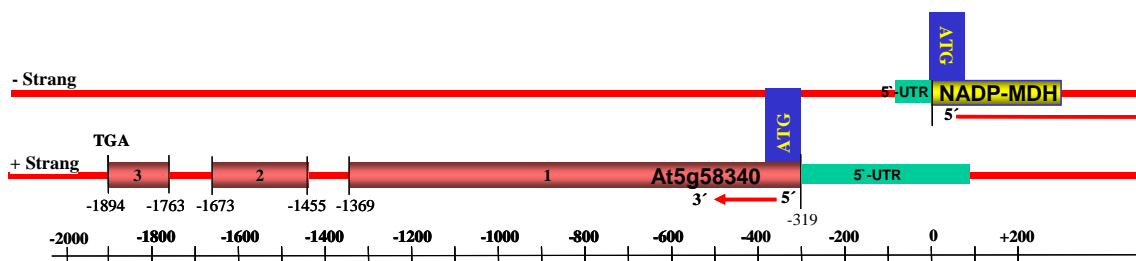
dass das Malat-Ventil nur dann aktiv ist, wenn in den Chloroplasten wenig NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht.

Die hier beschriebenen posttranslationalen Regulationen erlauben schnelle Änderungen des Aktivierungsstatus der NADP-MDH. Diese Flexibilität macht das Malat-Ventil zu einem wichtigen Mechanismus für die schnelle Anpassung des chloroplastidären NADP<sup>+</sup>-Gehalts an wechselnde Umweltbedingungen, um die Redoxhomöostase aufrechtzuerhalten (SCHEIBE *et al.*, 2005). Länger andauernde Veränderungen verschiedener Umwelteinflüsse, wie höhere Lichtintensitäten oder niedrigere Temperaturen, führen nach einem anfänglich erhöhten Aktivierungsstatus der NADP-MDH auch zu einer erhöhten Expression bzw. Kapazität der NADP-MDH (SAVITCH *et al.*, 2001; BECKER *et al.*, 2006). Da die NADP-MDH in Chloroplasten wirksam ist, aber im Kern kodiert wird, geht man davon aus, dass diese zusätzliche transkriptionelle Regulation durch ein noch unbekanntes Signal aus den Chloroplasten an den Kern vermittelt wird.

Die Transkription der meisten Gene unterliegt einer komplexen und spezifischen Regulation. Im Allgemeinen erfolgt eine Initiation der Transkription durch Bindung der RNA-Polymerase in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunkts (*transcription start site*, *TSS*), der sogenannten Promotorregion. Die Bindung der RNA-Polymerase wird durch weitere Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, beeinflusst. Diese binden in der Regel an Regulationselemente bzw. spezielle Motive, die in der in Richtung des 5'-Endes der DNA-Matrize (stromaufwärts) vorgelagerten Region lokalisiert sind, und können so die Ablesung eines Gens regulieren. Ein typischer Promotor des RNA-Polymerase II-Typs besteht aus einem *Core*-Promotor, der sich direkt vor dem zu transkribierenden Abschnitt befindet, sowie einer proximalen und einer distalen Promotorregion. Der *Core*-Promotor beinhaltet die Initiationsregion (*initiation region*, *INR*), in der sich unter anderem der Transkriptionsstartpunkt und einige Bindestellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren befinden. Die wohl bekannteste Consensus-Sequenz als Transkriptionsfaktorbindestelle ist die TATA-Box. Diese befindet sich in der Regel 25-40 bp stromaufwärts des *TSS* und bildet die Erkennungssequenz für das TATA-Bindeprotein, welches Teil des Transkriptionskomplexes ist. Stromaufwärts des *Core*-Promotors ist der proximale Promotor lokalisiert, der normalerweise 200-300 bp lang ist und Bindestellen für weitere Transkriptionsfaktoren enthält. Als typische Consensus-Sequenz wäre hier die CAAT-Box zu erwähnen, die sich ca. 80-110 bp vor dem *TSS* befindet. Die dort bindenden Transkriptionsfaktoren beeinflussen in der Regel die Intensität der Transkription. Im

distalen Promotor, der sich bis zu 1500 bp vor dem TSS befinden kann, sind ebenfalls Regulationselemente lokalisiert, die meistens als Verstärker- oder Drossелеlemente dienen (*enhancer* und *silencer*). Solche Elemente können sich ebenfalls im 3'-untranslatierten Bereich, also stromabwärts des Gens, befinden (WERNER *et al.*, 1999).

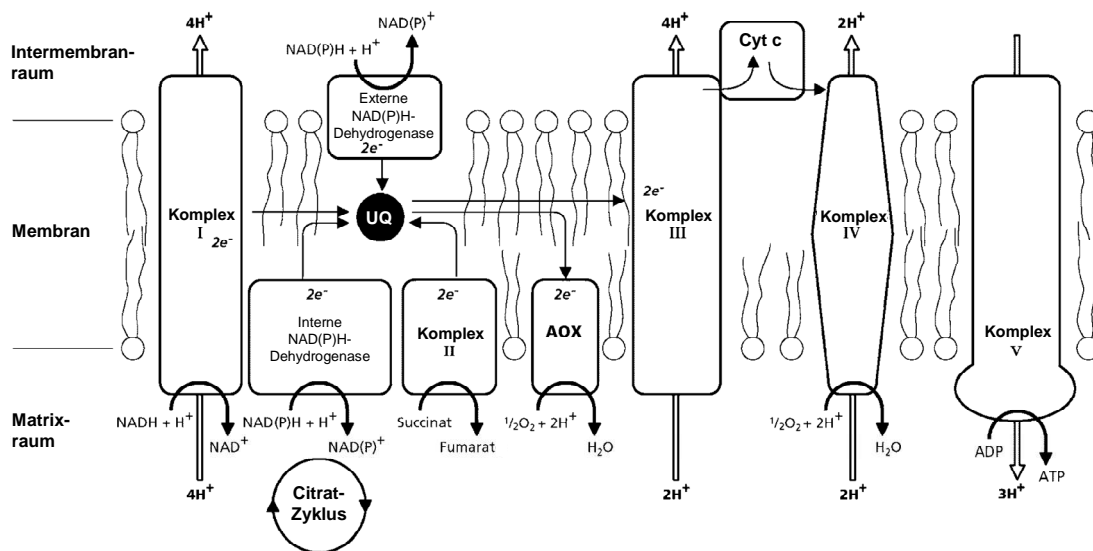
Das NADP-MDH-Gen verfügt nicht über einen Promotor, der in seinem Aufbau dem eines typischen RNA-Polymerase II-Typ-Promotors entspricht. Bioinformatische Analysen von HAMEISTER *et al.* (2007) ergaben, dass in der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens auf dem entsprechenden Gegenstrang ein Gen (At5g58340) lokalisiert ist, das für ein noch unbekanntes Protein kodiert. Das erste der insgesamt drei Exons beginnt bereits 319 bp stromaufwärts des TSS des *NADP-MDH*-Gens. Insgesamt beinhaltet das Gen des Proteins mit noch unbekannter Funktion 1575 bp und umfasst damit weite Teile der eigentlichen *NADP-MDH*-Promotorregion, vor allem distale Promotorbereiche (siehe Abb. 1.5). Darüber hinaus ist anzumerken, dass in der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens keine Consensus-Sequenzen wie die TATA- oder die CAAT-Box identifiziert werden konnten. Mit Hilfe von Promotoranalysen bzw. vergleichenden Sequenzanalysen konnten Beril Becker bzw. Steffen Hameister bereits 2005 Hinweise erlangen, dass regulatorische Elemente in *A. thaliana* eventuell im Laufe der Evolution in die kodierende Region der *NADP-MDH* verlagert wurden (BECKER, 2005; HAMEISTER, 2005; HAMEISTER *et al.*, 2007).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der 5'-stromaufwärts gelegenen Region des *NADP-MDH*-Gens (At5g58330).** Die ATG-Region des *NADP-MDH*-Gens wurde in der Skala auf 0 gesetzt. Exemplarisch wurde nur das erste Exon dieses Gens dargestellt (gelb). In der 5'-stromaufwärts gelegenen Region des *NADP-MDH*-Gens ist auf dem entsprechenden Gegenstrang das Gen At5g58340 lokalisiert, welches für ein noch unbekanntes Protein kodiert. Dieses Gen ist mit negativen Zahlen gekennzeichnet. UTR: Untranslatierter Bereich (HAMEISTER *et al.*, 2007).

### 1.3 Funktion und Regulation der Alternativen Oxidase (AOX)

In den Mitochondrien laufen viele Stoffwechselprozesse ab, die zur Energiegewinnung beitragen. Energiereiche Elektronen, die unter anderem im Citrat-Zyklus in Form von NADH und FADH anfallen, können in der mitochondrialen Atmungskette der ATP-Gewinnung dienen. Dabei werden die Elektronen in eine Elektronentransportkette, bestehend aus vier Multiproteinkomplexen (gekennzeichnet mit den römischen Ziffern I bis IV), in der inneren Mitochondrienmembran eingespeist und letztendlich am Komplex IV auf Sauerstoff übertragen, wobei Wasser entsteht (siehe Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Respiratorische Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran höherer Pflanzen.** UQ: Ubichinon; AOX: Alternative Oxidase; Cyt: Cytochrom; Komplex I: NADH-Dehydrogenase; Komplex II: Succinat-Dehydrogenase; Komplex III und IV: bilden zusammen den Cytochrom-Weg mit endständiger Cytochrom c-Oxidase; Komplex V: ATP-Synthase-Komplex (MILLENAAR & LAMBERS, 2003; modifiziert).

In den Komplexen I, III und IV ist der Transport jeweils mit einem Abfall des Redoxpotentials verbunden. Die dort freiwerdende Energie wird für die Translokation von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien verwendet. Der auf diese Weise gebildete elektrochemische Gradient kann zur ATP-Synthese durch den ATP-Synthase-Komplex genutzt werden (oft gekennzeichnet als Komplex V; siehe Abb. 1.6). In höheren Pflanzen geht die Funktion der Mitochondrien weit über die der Energiegewinnung hinaus. Pflanzliche Mitochondrien stehen in enger Beziehung mit Stoffwechselprozessen wie z.B. Photosynthese oder Photorespiration und tragen dazu bei, die Redoxbalance der Pflanzenzelle zu gewährleisten, indem überschüssige



Reduktionsäquivalente schonend abgebaut werden. Zu diesem Zweck verfügt die Atmungskette über Elektronen-*Carrier*, die bei tierischen Mitochondrien fehlen, wie z.B. zusätzliche interne und externe NAD(P)H-Dehydrogenasen und die Alternative Oxidase (AOX) (MØLLER & LIN, 1986; MØLLER, 2001; RASMUSSEN *et al.*, 2004).

Bei AOX handelt es sich um eine Chinol-Sauerstoff-Oxidoreduktase, die eine Zyanid-resistente Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysiert. Dieses Enzym ist in Mitochondrien von Pflanzen, sowie einigen Pilzen und Protisten neben der Cytochrom c-Oxidase ein weiterer Bestandteil der Atmungskette (AFFOURTIT *et al.*, 2002). So können die Elektronen vom Ubichinon-Pool anstatt auf Komplex III und schließlich Cytochrom c-Oxidase auch über AOX auf Sauerstoff übertragen werden (siehe Abb. 1.6). Man unterscheidet dabei zwischen dem Cytochrom-Weg (CW) und dem alternativen respiratorischen Weg (AW). Im Gegensatz zum CW werden mit dem Elektronentransfer über den AW zwei Komplexe umgangen, an denen Protonen für die ATP-Bildung in den Intermembranraum gepumpt werden. Die Energie wird beim AW nicht in Form von ATP konserviert, sondern in Form von Wärme abgegeben (SIEDOW & UMBACH, 1995; FINNEGAN *et al.*, 2004).

Bei der pflanzlichen AOX handelt es sich um ein redoxreguliertes membranassoziiertes Homodimer mit einer nach Isoform und Spezies variierenden Größe des Monomers von 35 bis 40 kDa. Sowohl der hydrophile N-terminale als auch der C-terminale Bereich befinden sich auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran. Es wird postuliert, dass der N-Terminus ein Di-Eisen-Zentrum ausbildet, welches die Oxidation des Ubichinons durch Sauerstoff katalysiert (MOORE *et al.*, 1995; SIEDOW & UMBACH, 2000; BERTHOLD *et al.*, 2000). In AOX der meisten Organismen befinden sich innerhalb des C-Terminus konservierte Cysteinreste, welche durch Bildung einer Disulfidbrücke für die kovalente Verbindung beider Untereinheiten im inaktiven Zustand des Enzyms sorgen. Im aktiven Zustand liegen diese Cysteinreste als Dithiolgruppen vor. RHOADS *et al.* (1998) vermuten weiter, dass diese Cysteinreste bei der Bindung von Pyruvat und anderen  $\alpha$ -Ketosäuren zur Regulation des Enzyms eine Rolle spielen. Zwischen dem C- und dem N-terminalen Bereich befindet sich ein hydrophiler membranständiger, jedoch nicht membrandurchspannender Abschnitt, in dem eine potentielle Ubichinon-Bindestelle lokalisiert ist (ANDERSSON & NORDLUND, 1999; MILLENAAR & LAMBERS, 2003).

Sehr hohe AOX-Aktivitäten wurden erstmals 1975 von MEEUSE *et al.* in Blütenkolben der Voodoolilie, *Sauromatum guttatum*, gefunden. Die Wärme, die durch AOX erzeugt

wird, wird von diesen Pflanzen während der Blüte genutzt, um Duftstoffe auszusenden, welche Bestäuber anlocken (MEEUSE & RASKIN, 1988). Die Rolle von AOX in nicht-thermogenen Pflanzen konnte bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es gibt viele Hinweise darauf, dass eine wichtige Funktion von AOX darin besteht, die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen (MAXWELL *et al.*, 1999). In der Pflanzenzelle ist die mitochondriale Atmungskette ein Hauptort der ROS-Entstehung (MØLLER, 2001). Eine Möglichkeit, um die ROS-Entstehung zu minimieren, besteht darin, eine Überreduktion der mitochondrialen Elektronentransportkette zu verhindern. Es wurde lange angenommen, dass AOX und damit der AW als eine Art „Überlauf-Ventil“ fungiert, wenn der CW mit Elektronen gesättigt ist (LAMBERS, 1982). Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass AOX, z.B. in Anwesenheit von Pyruvat, auch mit einem ungesättigten CW um Elektronen konkurriert (HOEFNAGEL *et al.*, 1995). In jedem Fall wird AOX ab einem bestimmten Reduktionsgrad des Ubichinons aktiviert. Durch das Ableiten der Elektronen auf AOX wird der Reduktionsgrad des Ubichinon-Pools und folglich der gesamten mitochondrialen Atmungskette stabilisiert (HOEFNAGEL *et al.*, 1995; MILLENAAR *et al.*, 1998). Neben dem Reduktionsgrad des Ubichinons wird die AOX-Aktivität auch durch die Verfügbarkeit verschiedener Makronährstoffe beeinflusst (SIEGER, 2005). Zudem wirken sich der Redoxstatus der Zelle und der Kohlenhydratgehalt auf die *in vivo*-Aktivität von AOX aus (VANLERBERGHE & ORDOG, 2002). AOX wird durch ein mitochondriales Trx-System redoxreguliert, wobei das reduzierte, nicht-kovalent gebundene Dimer erst die Bindung spezieller organischer Säuren wie z.B. Pyruvat ermöglicht. Dies soll eine zusätzliche Rolle bei der Aktivierung spielen (OLIVER *et al.*, 2008). In Pappel wurde bereits eine spezifische Trx-Isoform (PtTrxh2) als Reduktant für AOX identifiziert. Hier wird Trx über eine NTR mittels NADPH re-reduziert (GELHAYE *et al.*, 2004). Diese Trx-Regulation stellt somit eine Verbindung zwischen der AOX-Aktivität und dem mitochondrialen NAD(P)H-Pool sowie der Oxidation von Citrat-Zyklus-Intermediaten durch NADP<sup>+</sup>-verbrauchende Enzyme dar (VANLERBERGHE & MCINTOSH, 1997; MØLLER & RASMUSSEN, 1998).

AOX wird in vielen höheren Pflanzen von einer Multigen-Familie im Kerngenom kodiert, die aus mindestens zwei verschiedenen Unterfamilien, AOX1 und AOX2, besteht. Die Anzahl der Gene jeder Unterfamilie variiert je nach Spezies, wobei zusätzliche Unterschiede zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen bestehen (CONSIDINE *et al.*, 2002; BORECKY *et al.*, 2006). In *A. thaliana* wurden fünf Gene identifiziert, welche die verschiedenen Isoformen zweier Unterfamilien kodieren. Zu ihnen zählen AOX1A, AOX1B, AOX1C, AOX1D und AOX2 (SAISHO *et al.*, 1997). Die Transkription jeder Isoform unterliegt einer spezifischen Zell-, Gewebe-, Organ-, Entwicklungsstatus- oder

sogar Stress-spezifischen Regulation (CLIFTON *et al.*, 2006). Die AOX1A-Isoform konnte in fast allen Organen nachgewiesen werden und stellt die Hauptisoform dar. Die Bildung dieser Isoform lässt sich durch die Behandlung mit Antimycin A (AA), einem Inhibitor des CWs, induzieren (SAISHO *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte aus Expressionsstudien geschlossen werden, dass AOX1A maßgeblich an Stressantworten, wie z.B. auf niedrige Temperaturen, Trockenheit, Pathogenbefall und hohe Lichtintensitäten, beteiligt ist (CLIFTON *et al.*, 2006). Als Regulator für die mitochondriale retrograde Expression von AOX1A in *A. thaliana* vermuten GIRAUD *et al.* (2009) den Transkriptionsfaktor ABI4. Die AOX1B-Isoform konnte ausschließlich in Organen des Blütenstands nachgewiesen werden (SAISHO *et al.*, 1997) und scheint dort entwicklungsabhängige Funktionen einzunehmen (WELLMER *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005, SCHMID *et al.*, 2003). Die spezifische Funktion von AOX1C ist bis heute ungeklärt. Diese Isoform konnte in fast allen Pflanzenorganen nachgewiesen werden, allerdings war das Expressionsniveau sehr viel niedriger als das von AOX1A. Eine verstärkte Expression von AOX1D wurde in seneszenten Blättern nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass dieser Isoform bei Alterungsprozessen eine besondere Bedeutung zukommt (GUO *et al.*, 2004; LIN & WU, 2004). Die AOX2-Isoform hingegen scheint eine besondere Rolle bei der Samenreifung in frühen Stadien der Keimung zu spielen, da diese nur in reifen trockenen Samen in größerem Ausmaß vorkommt (NAKABAYASHI *et al.*, 2005).

Die Interaktion zwischen Chloroplasten und Mitochondrien als Hauptorte der Energieproduktion in Pflanzen bilden einen zentralen Fokus der Erforschung regulatorischer Prozesse in höheren Pflanzen (KRÖMER, 1995; ATKIN *et al.*, 2000). Verschiedene Stoffwechselprozesse, wie der Photorespirationsweg und der Stickstoff- bzw. der Aminosäuremetabolismus, umfassen Reaktionsabläufe, die sowohl in den Chloroplasten als auch in den Mitochondrien ablaufen (LEEGOOD *et al.*, 1995; FOYER & NOCTOR, 2002). Auch das Malat-Ventil bildet eine Brücke zwischen Chloroplasten und Mitochondrien (KRÖMER & SCHEIBE, 1996). Überschüssige Reduktionsäquivalente, die aus den Chloroplasten ins Cytosol transportiert werden, können z.B. über das Malat-Oxalacetat-*Shuttle*-System in die Mitochondrien weitergeleitet werden, wo sie in die mitochondriale Atmungskette eingespeist werden können (SCHEIBE, 2004). Zudem lässt eine lichtabhängige Expression mitochondrialer Gene auf eine enge Verbindung zwischen Photosynthese und Mitochondrienmetabolismus schließen (SVENSSON & RASMUSSEN, 2001). Um eine Kontinuität von zellulären Redoxprozessen gewährleisten zu können und somit die Akkumulation von ROS zu vermeiden, müssen photosynthetische Lichtabsorption, Kohlenstoffassimilation, ATP-Herstellung sowie

ATP-Verbrauch im Fließgleichgewicht gehalten werden. So sollte z.B. für den Citrat-Zyklus sowie für die Glycin-Decarboxylierung während des Photorespirationswegs immer  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor zur Verfügung stehen, damit es nicht zu einem Anstau von Elektronen kommt. Folglich ist der Ablauf der mitochondrialen Atmung selbst dann vonnöten, wenn kein ATP-Bedarf in der Zelle besteht oder wenn kein ADP für die Phosphorylierung bereitsteht. Auch die Rolle der respiratorischen Atmungskette zum Schutz des Photosyntheseapparats vor Photoinhibition konnte bereits anhand von Versuchen mit Erbsenprotoplasten sowie mit *Anacystis nidulans* und *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen werden (SARADADEVI & RAGHAVENDRA, 1992; SHYAM *et al.*, 1993; SINGH *et al.*, 1996; PADMASREE *et al.*, 2002). Neuere Studien lassen vermuten, dass AOX unter Stressbedingungen bei der Optimierung der Photosynthese eine physiologische Rolle spielt, indem überschüssige Reduktionsäquivalente, die aus den Chloroplasten transportiert wurden, im AW abgeleitet werden (BARTOLI *et al.*, 2005; YOSHIDA, 2007). Es wurde zusätzlich postuliert, dass der Ascorbat-Metabolismus bei der Feinregulation sowie der Abstimmung von Photosynthese und Atmung eine wichtige Funktion übernimmt (NUNES-NESE *et al.*, 2008).

## 1.4 Ziele der Arbeit

Molekulare Mechanismen und biochemische Regulationen, die es Pflanzen ermöglichen sich ständig wechselnden Umwelteinflüssen anzupassen, sind Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit. Ein ständiger, häufig schneller Wechsel der einstrahlenden Lichtintensität und der Temperatur wirkt sich insbesondere auf den Elektronendruck in den Elektronentransportketten der Chloroplastenmembran und den Redoxzustand im Chloroplastenstroma aus. So werden im Starklicht häufig mehr Photonen absorbiert als für assimilatorische und regulatorische Stoffwechselprozesse nötig wären. Die daraus resultierenden überschüssigen Elektronen können zur Akkumulation von zellschädigenden ROS führen. Um dies zu verhindern, verfügen Pflanzen über eine Reihe von *poising*-Mechanismen. Eine Entsorgung von überschüssigen Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten unter Bereitstellung des Elektronenakzeptors  $\text{NADP}^+$  wird dabei durch das Malat-Ventil bewerkstelligt. Schlüsselenzym des Malat-Ventils ist die redoxregulierte, chloroplastidäre NADP-MDH. Eine bekannte Aufgabe der NADP-MDH besteht in der Feinabstimmung des Redoxzustands in Chloroplasten und der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten im Cytosol. Dennoch ist die Funktion dieses Enzyms im Stoffwechsel von  $\text{C}_3$ -Pflanzen im Gegensatz zur  $\text{C}_4$ -Photosynthese, in der es eine besondere Rolle bei der Vorfixierung

des CO<sub>2</sub> spielt (EDWARDS *et al.*, 1985), weniger offensichtlich. Diese Arbeit ist Teil eines aus Drittmitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Forschungsprojekts (EM166/1-1 bzw. -2). Dabei sollten Untersuchungen zur licht-aktivierten NADP-MDH im Mittelpunkt stehen. Zu diesem Zweck sollten *nadp-mdh-ko*-Pflanzen von *A. thaliana* identifiziert werden. Da lediglich eine Isoform dieses Enzyms vorhanden ist, wurden in den Mutanten weitreichende Auswirkungen auf das völlige Fehlen des Malat-Ventils, vor allem unter hohen Lichtintensitäten erwartet. Durch einen Vergleich der *nadp-mdh-ko*-Pflanzen mit entsprechenden WT-Pflanzen sollten weitere Informationen zur Funktion der NADP-MDH im Stoffwechsel von C<sub>3</sub>-Pflanzen analysiert und aufgezeigt werden. Eine zentrale Fragestellung liegt dabei auf der Rolle der NADP-MDH bei der CO<sub>2</sub>-Assimilation. Des Weiteren sollten Analysen der NADP-MDH-*ko*-Mutanten zur Aufklärung des komplizierten Netzwerks beitragen, welches in *A. thaliana* selbst bei wechselnden Lichtintensitäten für die Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase sorgt.

Der indirekte Fluss von Reduktionsäquivalenten durch das Malat-Ventil wird über den Aktivierungszustand der redoxregulierten NADP-MDH bestimmt. Länger andauernder Stress, wie z.B. hohe Lichtintensitäten, führt nach einem anfänglich erhöhten Aktivierungsstatus der NADP-MDH auch zu einer erhöhten Expression der NADP-MDH. Für diese transkriptionelle Regulation verfügt das *NADP-MDH*-Gen nicht über einen Promotor, der in seinem Aufbau dem eines typischen RNA-Polymerase II-Typ-Promotors entspricht. In der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens ist auf dem entsprechenden Gegenstrang ein Gen (At5g58340) lokalisiert, das für ein unbekanntes Protein kodiert. Das erste Exon dieses Gens beginnt bereits 319 bp stromaufwärts des TSS des *NADP-MDH*-Gens. Außerdem sind keine Consensus-Sequenzen wie TATA-Box oder CAAT-Box für das Gen der NADP-MDH bekannt. In diesem Zusammenhang war die Untersuchung der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens im Hinblick auf die Promotoraktivität von besonderem Interesse.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte schließlich auf der dynamischen Feinregulation und Abstimmung von Photosynthese und Atmung liegen. Durch Stoffwechselprozesse wie die Photorespiration oder der Funktion des Malat-Ventils stehen Mitochondrien in enger Beziehung mit Redoxprozessen anderer Kompartimente und tragen dazu bei, die Redoxbalance der Pflanzenzelle zu gewährleisten, indem überschüssige Reduktionsäquivalente schonend abgebaut werden. Zu diesem Zweck ist es wichtig, dass die mitochondriale Atmung auch dann ablaufen kann, wenn kein ATP-Bedarf in der Zelle besteht oder wenn kein ADP für die Phosphorylierung

bereitsteht. Dies kann durch die Beanspruchung des AWs mit AOX als Schlüsselenzym gewährleistet werden. In *A. thaliana* wurden fünf Gene identifiziert, welche verschiedene AOX-Isoformen kodieren. Ein wesentliches Ziel dieses Forschungsprojekts war es, die Funktion der Hauptisoform AOX1A im Stoffwechsel von *A. thaliana* genauer zu analysieren, wobei die zelluläre Redoxhomöostase sowie der Schutz des Photosyntheseapparats vor Photoinhibition im Mittelpunkt standen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldendorf), Boehringer (Ingelheim), Duchefa (Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim), ICN (Eschwege), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), GE Healthcare (München), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe); Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Stratagene (Heidelberg) im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

Folgende Materialien wurden verwendet: Restriktionsenzyme von Fermentas (St. Leon-Rot), *MiniElute Extraction*-Kit (Qiagen, Hilden); *NucleoSpin Extract*-Kit (Macherey & Nagel, Düren); *Ready To Go DNA Labeling Beads (-dCTP)*-Kit (Amersham-Biosciences, Braunschweig); *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First strand cDNA Synthesis*-Kit (Fermentas, St. Leon-Rot); Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm; Schleicher & Schuell Bio Science, Dassel); Nylonmembran Hybond-N (Amersham-Biosciences, Braunschweig).

### 2.2 Pflanzen, Anzuchtbedingungen und Vorbehandlungen

Für die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit stattfanden, wurden sowohl Wildtyppflanzen (WT) als auch transgene Pflanzen (siehe Tab. 2.1) von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. des Ökotyps Columbia angezogen. Die Samen der transgenen Pflanzen-Linien wurden beim *Arabidopsis Biological Resource Stock Center, Ohio State University, USA* (<http://www.arabidopsis.org/abrc/>) bezogen oder als Teil dieser Arbeit durch *A. tumefaciens*-vermittelte Blütentransformationen selbst hergestellt.

**Tab. 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete transgene Pflanzen-Linien von *A. thaliana* (L.) Heynh. des Ökotyps Columbia**

Interne Bezeichnung	Offizielle Bezeichnung	T-DNA-Insertionsort bzw. integriertes Fusionskonstrukt
Salk 53	Salk 084897	AOX1A-Gen: At3g22370; drittes Exon
Salk 133	Salk 303 D04	AOX1A-Gen: At3g22370; zweites Intron
Salk 147	SM_3_24421	AOX1D-Gen: At1g32350; drittes Exon
Salk 50	Salk 012655	NADP-MDH-Gen: At5g58330; fünftes Intron

Tab. 2.1: (Fortsetzung)

Interne Bezeichnung	Offizielle Bezeichnung	T-DNA-Insertionsort bzw. integriertes Fusionskonstrukt
Salk 119	Salk 063444	<i>NADP-MDH</i> -Gen: At5g58330; erstes Exon
Salk 123	Salk 053119	At5g58340 ( <i>unknown protein</i> ); erstes Exon
Salk 125	Salk 018118	At5g58340 ( <i>unknown protein</i> ); zweites Exon
GUS2.1.14	/	F2-GUS-Konstrukt

### 2.2.1 Anzucht auf Erde

Falls nicht anders vermerkt, erfolgte die Anzucht der Pflanzen auf Erde in Klimakammern unter Kurztagbedingungen (7,5 h Licht;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  und 55 % Luftfeuchtigkeit). Für die Beleuchtung der Klimakammern wurden Hochdruck-Metallhalogendampflampen des Typs Son-T Agro (400 W; Philips, Eindhoven, Niederlande) eingesetzt. Die Erde für die Anzucht von *A. thaliana* setzte sich aus Bims (36,4 %), Kompost (36,4 %), Torf (18,2 %), Sand (9,1 %) und PolyCrescal (1,5 g/l) zusammen. Die Aussaat erfolgte in 7 cm x 8 cm großen Töpfen und nach 14 Tagen folgte das Pikieren der Pflanzen in einzelne Töpfe derselben Größe.

### 2.2.2 Starklicht (SL)-Behandlung

Für eine Starklicht (SL)-Behandlung wurden Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen ( $7,5 \text{ h}$  Licht,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 55 % Luftfeuchtigkeit) angezogen wurden, morgens aus der Klimakammer entnommen und in eine temperierte Klimakammer transferiert. Der Abstand der Son-T Agro-Lampen (400 W; Philips, Eindhoven, Niederlande) zu den Pflanzen wurde so verkürzt, dass die Lichtintensität auf Höhe der Pflanzen ca.  $750\text{-}800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  betrug. Da die hier verwendeten Lampen Wärme emittieren, war das Herunterkühlen der Klimakammern auf  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  nötig, damit die Temperatur der Blätter auf ca.  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  gehalten werden konnte. Nach einer Beleuchtungsdauer von 7 h wurde das Blattmaterial in flüssigen Stickstoff gegeben und konnte bis zur Verwendung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Kontrollen wurden jeweils zeitgleich, nach 7-stündiger Belichtung mit Kontrolllicht (KL) von ca.  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  geerntet.

### 2.2.3 Antimycin A (AA)-Behandlung

Aus den Blättern von ca. 10 Wochen alten WT- und *aox1a-ko*- Pflanzen wurden mit Hilfe eines Korkbohrers Blattscheiben ( $1,33 \text{ cm}^2$ ) ausgestochen. Diese Blattscheiben



wurden mit AA behandelt. Dazu wurden sie mit der Oberseite auf eine wässrige Lösung mit 20  $\mu\text{M}$  AA gegeben; die Stomata standen so in Luftkontakt. Damit die Beleuchtung der Blattoberseiten gewährleistet war, erfolgte die Inkubation über ein temperaturreguliertes Wasserbad, das von unten mit definierten Lichtintensitäten belichtet werden konnte (Radium Parabol R125 150 W, Philips, Niederlande). Die Belichtung erfolgte 6 h bei  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 22 °C. Die Blattscheiben wurden nach erfolgter Inkubation in flüssigen Stickstoff gegeben und konnten bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert werden. Die Kontrollen wurden jeweils der gleichen Behandlung, nur ohne Zusatz von AA, ausgesetzt.

#### 2.2.4 Anzucht in Sterilkultur

Die Selektion transformierter Pflanzen erfolgte in Sterilanzuchten. Bevor die Samen für diesen Zweck verwendet werden konnten, musste eine Oberflächensterilisation erfolgen. Das Sterilisieren der Samen war notwendig, um eventuell vorhandene Mikroorganismen abzutöten, damit diese nicht das Pflanzenwachstum beeinflussten. Dafür wurde ein Becherglas mit 50 ml Natriumhypochlorit-Lösung (13 %) in einen Exsikkator gestellt. Daraufhin wurden die Samen in einem geöffneten 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß ebenfalls in den Exsikkator platziert. Zum Natriumhypochlorit wurden 1,5 ml HCl (konzentriert) gegeben und der Exsikkator umgehend luftdicht verschlossen. Die Samen wurden 4-6 h lang begast und somit sterilisiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Exsikkator geöffnet und das mit Samen befüllte 1,5 ml-Reaktionsgefäß sofort geschlossen. Je nach Gebrauch konnten nun die Samen unter der Sterilbank (*microflow*-Sicherheitswerkbank ABS, Nunc GmbH, Wiesbaden) entnommen werden.

Die Anzucht von *A. thaliana* unter sterilen Bedingungen erfolgte in sterilen Petrischalen ( $\varnothing$  14,5 cm, Greiner Bio-One, Essen) auf MS-8-Agar. Um ein Bakterienwachstum zu verhindern, wurde der MS-8-Agar mit dem Antibiotikum Cefotaxim (Duchefa Biochemie BV, Niederlande) in einer Endkonzentration von 125  $\mu\text{g/ml}$  versetzt. Bei der Selektion positiv transformierter Pflanzen, mit dem *bar*-Gen als Pflanzenselektionsmarker, wurde zusätzlich das Totalherbizid Glufosinat (40  $\mu\text{M}$ ; Handelsname WEEDEX) in den Agar gegeben). Auf einer Agarplatte mit 14,5 cm Durchmesser wurden ca. 20 Samen gleichmäßig unter sterilen Bedingungen verteilt. Bevor die Platten in die Klimakammern gebracht wurden, erfolgte eine Dunkelinkubation von 2 Tagen bei 4 °C. Dies wurde durchgeführt, um eine gleichzeitige Keimung zu erzielen, was später den direkten Vergleich der einzelnen Pflanzen erlaubt.

<u>MS-8-Agar:</u>	Murashige & Skoog-Medium mit Vitaminen	2,2 g/l
	Saccharose	1 % (w/v)
	MES, pH 5,7 (KOH)	0,05 % (w/v)
	Agar	0,8 % (w/v)
	15 min bei 125 °C autoklavieren.	

Für eine gleichmäßige Verteilung größerer Mengen von Samen auf einer Platte (Ø 14,5 cm, Greiner Bio-One, Essen) wurden 500-1000 Samen in 6 ml sterile 0,1 %-ige Agarose gegeben und gleichmäßig verteilt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Zur Vermehrung von Plasmiden diente der *Escherichia coli*-Stamm XL1-Blue. Der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV 3101 wurde für die Blütentransformation von *A. thaliana*-WT-Pflanzen verwendet.

**Tab. 2.2: Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	relevante Merkmale	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsrDR17, supE44, relA1, lac, [F`proAB, lacIqZ.M15Tn10(tet)<sup>r</sup>] clm<sup>r</sup></i> Novagen	BULLOCK <i>et al.</i> , (1987)
<i>A. tumefaciens</i> (GV 3101)	C58C1, <i>rpoB</i> , ( <i>rif<sup>r</sup></i> ), [pMP90]	KONCZ & SCHELL (1986)

### 2.3.2 Plasmide und Oligonukleotide

In Tab. 2.3 sind alle Plasmidvektoren aufgeführt, die in dieser Arbeit zur Klonierung und Pflanzentransformation eingesetzt wurden.

**Tab. 2.3: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pGEM-T <i>Easy</i>	Klonierungsvektor, 3015 bp, <i>bla</i> (Amp <sup>r</sup> ), <i>lacZ</i> , T7/SP6-Promotor	Promega, Mannheim
pGPTV-bar	Binärer Pflanzentransformationsvektor, 13444 bp, <i>nptII</i> (Kan <sup>r</sup> ), pAnos, <i>uidA</i> , Pnos, <i>bar</i> , pAg7 Kan <sup>r</sup> ,	BECKER <i>et al.</i> , 1992
pPN15	<i>NADP-MDH</i> ( <i>A.t.</i> )-cDNA in pGEM-T <i>Easy</i>	NIAZI, 2005
pVE81	<i>AOX1A</i> ( <i>A.t.</i> )-cDNA in pGEM-T <i>Easy</i> , <i>EcoRI</i> : 1080 bp	BACHMANN, 2007
pIS28	F2-Promotorfragment in pGEM-T <i>Easy</i> <i>XbaI/SmaI</i> : 1992 bp	diese Arbeit
pIS36	F2-Promotorfragment in pGPTV <i>XbaI/SmaI</i> : 1992 bp	diese Arbeit

In Tab. 2.4 sind Oligonukleotide aufgelistet, die als „Primer“ zur Amplifikation von DNA mit Hilfe von PCR (Polymerasekettenreaktion, siehe Kap. 2.3.5) verwendet wurden. Es handelt sich um künstlich synthetisierte, einzelsträngige DNA-Fragmente, welche von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und geliefert wurden.

**Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide**

(eingefügte Restriktionsendonuklease-Schnittstellen sind fett gedruckt)

Bezeichnung	Gen	Basensequenz (5' → 3')	Produktgröße (ggf. Zyklenzahl)
<i>knockout screening</i>			
Nr. 121	At5g58330	TGC AAA GAA CTT CCA TGC CCT CA	389 bp mit LBa1; 1320 bp mit 84
Nr. 84	At5g58330	GCA TTG CTC AAG AAA AAT CAC A	
LBa1	Fremd- DNA	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G	
119RP	At5g58330	GGT TAG AAA TCA TTC CTG CAG C	798 bp mit LBa1; 1028 bp mit 119 LP
119LB	At5g58330	AAT GAA TTG GAG ATG TCA CGC	
53RP	At3g22370	CAA TGA TAC CCA ATT GGA GCT GG	950 bp mit LBa1; 958 bp mit 53 LP
53LP	At3g22370	CTT CGT TGG CCT ACC GAT TTG	
133LP	At3g22370	TGA TCA GTA ACA CAC GAT TTT AAG C	436 bp mit LB3; 996 bp mit RP113
133RP	At3g22370	TTC TTT GGA TTT TTG CAG CC	
LB3 (verkürzt)	Fremd- DNA	AAT TTC ATA ACC AAT CTC GAT ACA C	
RP147	At1g32350	CTT TAA TGA TAT CCA ATA GGA GCC	496 bp mit Spm32; 1055 bp mit LP147
LP147	At1g32350	CCC CAA CTG TTG TTA CTC ATG	
Spm32	Fremd- DNA	TAC GAA TAA CAG CGT CCA TTT TAG AGT GA	
<b>RT-PCR</b>			
2CPA-for	At3g11630	TCT GCC CAA CAG AGA TTA CT	827 bp mit 2CPA-rev (27)
2CPA-rev	At3g11630	TGA AAA GTC CTC TCA GTG CT	
2CPB-for	At5g06290	ATA GCT TCT TCT TCT TCC	243 bp mit 2CPB-rev (25)
2CPB-rev	At5g06290	CAT GTG TTC AAT CTT AGC	
AtNTRC-F	At2g41680	CAT GTG GCC CCT GTA GGA C	350 bp mit AtNTRC-R (24)
AtNTRC-R	At2g41680	GAG ATT CAT GGC GTT GCT C	
R37sP1/2	At4g33010	TAC TTA CAT TGC CAT GAT GGG ATC TG	588 bp mit R107asP1 (26)
R107asP1	At4g33010	GCA GCT GCG ACT TGT TCT TCC TCT	

**Tab. 2.4:** (Fortsetzung)

Bezeichnung	Gen	Basensequenz (5' → 3')	Produktgröße (ggf. Zyklenzahl)
AOX1D for	At1g32350	CCC CAA CTG TTG TTA CTC ATG	976 bp mit AOX1D rev (25)
AOX1D rev	At1g32350	CTT TAA TGA TAT CCA ATA GGA GCC	
Nr. 215	At4g05320	GAT CTT TGC CGG AAA ACA ATT GGA GGA TGT	483 bp mit Nr. 216 (26)
Nr. 216	At4g05320	CGA CTT GTC ATT AGA AAG AAA GAG ATA ACA G	
<b>GUS-Konstrukt</b>			
GUS_2_sx	At5g58340	GAT GTT ACC <b>TCT AGA</b> CAC CGA CTA AGT	2008 bp
GUS_1_2_as	At5g58340	GGG TTG AGA GCT CTG <b>CCC GGG</b> CCA TTA T	

### 2.3.3 Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37 °C unter Verwendung des folgenden Mediums, welches nach SAMBROOK *et al.* (1989) angesetzt wurde.

<u>YT-Medium:</u>	Selekt Pepton	0,8 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,25 % (w/v)

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte für 36 h bei 30 °C unter aeroben Bedingungen. Folgendes Medium kam dafür zur Anwendung:

<u>YEB -Medium:</u>	Rinderextrakt	0,5 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
	Pepton	0,5 % (w/v)
	Saccharose	0,5 % (w/v)
	MgSO <sub>4</sub>	0,05 % (w/v)

Die Medien wurden mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und 20 min bei 125 °C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Eine Selektion erfolgte durch Zugabe von Antibiotika. Die jeweiligen Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle angegeben. Die Stammlösungen wurden jeweils bei -20 °C aufbewahrt.

**Tab. 2.5: Antibiotikakonzentrationen der Selektionsmedien für *E. coli* und *A. tumefaciens***

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium	
		<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml (in 50 % Ethanol)	200 µg/ml	
Tetrazyclin (Tet)	5 mg/ml (in 50 % Ethanol)	10 µg/ml	1-2 µg/ml
Spectinomycin(Spec)	50 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	50 µg/ml	100 µg/ml
Rifampicin (Rif)	20 mg/ml (in Methanol)	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	12,5 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)	25 µg/ml	25 µg/ml

Um Bakterienklone zu konservieren, wurden wie folgt Glycerinkulturen angelegt:

<u>Glycerinkultur:</u>	steriles Glycerin (100 %)	225 µl
	entsprechende Übernachtkultur	1,5 ml

Die Glycerinkulturen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.3.4 Isolierung von genomischer DNA aus *A. thaliana*

Zur Identifizierung transgener Pflanzen wurde eine PCR-Analyse durchgeführt (siehe Kap. 2.3.5), wobei genomische DNA aus den jeweiligen Pflanzen als Matrize diente. Diese wurde nach der *simple DNA prep*-Methode des *University of Wisconsin Biotechnology Center (UWBC; USA)* durchgeführt.

Zwei *A. thaliana*-Blätter wurden in 200 µl *shorty*-Puffer mit einem Teflonstab in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gepottert (Janke & Kunkel, Staufen). Anschließend wurden weitere 300 µl *shorty*-Puffer dazupipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C für 5 min, welche zur Sedimentation der Zelltrümmer diente, wurden 350 µl des Überstands in ein mit 350 µl Isopropanol gefülltes Reaktionsgefäß überführt und invertiert. Dieser Schritt dient zur Fällung der DNA. Anschließend wurde die DNA mittels Zentrifugation für 10 min bei 16000 g pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet auf der Sterilbank getrocknet und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Für eine spätere PCR (siehe Kap. 2.3.5) wurden 2 µl der erhaltenen DNA-Lösung als Matrize eingesetzt.

<u>shorty-Puffer:</u>	Tris, pH 9 (HCl)	200 mM
	LiCl	400 mM
	EDTA	5 mM
	SDS	1 % (w/v)
<u>TE-Puffer:</u>	Tris, pH 8,0 (HCl)	10 mM
	EDTA	1 mM


### 2.3.5 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts (SAIKI *et al.*, 1987; LOTSPEICH & ZORBAS, 1998). Unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer (siehe Tab. 2.4) erreicht man bei der PCR durch die Wiederholung von drei, im Folgenden genannten, Schritten eine exponentielle Zunahme der gewünschten DNA-Sequenz: Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge bei ca. 95 °C, eine anschließende Anlagerung der spezifischen Primer (*annealing*) bei einer primerspezifischen Temperatur und eine Verlängerungsphase (*extension*) bei 72 °C, bei der mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z.B. *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*), vom freien 3'-Ende der Primer ausgehend, ein dem Matrizenstrang komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird.

Ein Standard-PCR-Ansatz zur Amplifikation genomischer DNA von *A. thaliana* (siehe Kap. 2.3.4) wurde wie folgt pipettiert:

1 µl Matrize  
 2,5 µl 10-fach *Taq* Puffer  
 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
 0,5 µl dNTP (10 mM)  
 0,25 µl *Taq* Polymerase (5 U/µl)  
 1 µl *sense*-Primer (10 µM)  
 1 µl *antisense*-Primer (10 µM)  
 ad 25 µl „Merck“- H<sub>2</sub>O

Die PCR-Reaktionen wurden in einem *Mastercycler* für PCR (Eppendorf, Hamburg) mit entsprechenden Zykluswiederholungen (n) durchgeführt.

Prä-Denaturieren	95 °C	5 min	
Denaturieren	95 °C	1 min	
<i>annealing</i>	55 °C	1 min	
<i>extension</i>	72 °C	1-2 min	
<i>extension</i>	72 °C	5 min	
Kühlung	10 °C	∞	

Für die Durchführung von Reverse-Transkriptase (RT)-PCR wurden von isolierter Gesamt-RNA (siehe Kap. 2.3.20) jeweils 5 µg für einen DNase-Verdau (siehe Kap. 2.3.21) mit anschließender eine cDNA-Synthese (siehe Kap. 2.3.22) eingesetzt. Aus dem cDNA-Ansatz wurde dann jeweils 1 µl als Matrize für die PCR verwendet, welche mit den jeweiligen spezifischen Primern mit optimierter Zyklenanzahl (siehe Tab. 2.4) durchgeführt wurde. Als interne Kontrolle wurde die PCR ebenfalls mit *Ubiquitin* (*UBQ*) 1-spezifischen Primern durchgeführt. Die quantitative densitometrische

Auswertung der Gele erfolgte mit dem *molecular imager* Gel Doc XR<sup>+</sup>-System (BioRad, München) mit Hilfe der *Software* Quantity One (Version 4.6.1; BioRad, München).

### 2.3.6 Restriktion von DNA

Unter DNA-Restriktion versteht man das Schneiden von doppelsträngiger DNA. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen geschnitten werden, die durch diese Enzyme erkannt werden und meist eine palindromische Sequenz aufweisen. Je nach Endonuklease entstehen DNA-Fragmente mit glatten (*blunt*) oder überhängenden (*sticky*) Enden, die nach der Auftrennung im Agarosegel und der Reinigung aus diesem für Ligationen verwendet werden können. Ebenso eignen sich Restriktionsanalysen zur Überprüfung von Ligationen. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) eingehalten. Zur Analyse wurde der Ansatz nach Ablauf der vorgeschriebenen Inkubationszeit einer Agarosegelelektrophorese unterzogen (siehe Kap. 2.3.11) und durch UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht.

### 2.3.7 DNA-Ligation

Eine Ligation kann sowohl mit PCR-Produkten als auch mit aus präparativen Agarosegelen extrahierten DNA-Fragmenten durchgeführt werden. Die DNA wird mit Hilfe einer T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), welche die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten Nukleotiden katalysiert, in einen zuvor linearisierten Vektor eingebracht. Die Ligation glatter (*blunt*) Enden ist aufgrund ihrer geringen Ausbeute problematischer als die *sticky end*-Ligation, da zwischen den DNA-Fragmenten kein spezifischer Zusammenhalt besteht. Das Verhältnis von Vektor zu Insertionsfragment wurde jeweils in einem molaren Verhältnis von 1:6 und 1:20 vorgenommen, um eine optimale Insertion zu erzielen.

<u>Allg. Pipettierschema:</u>	Vektor-DNA (50-100 ng)	1 $\mu\text{l}$
	Insertionsfragment	x $\mu\text{l}$
	10-fach T4-Ligase-Puffer	2 $\mu\text{l}$
	T4-Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 $\mu\text{l}$

Die Ansätze wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert.

### 2.3.8 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mittels Photometrie

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch die Absorption bei monochromatischem Licht einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Ringe der Basen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um die Konzentration zu ermitteln, wurde die Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und die Absorption in speziellen Kunststoffküvetten (Eppendorf, Hamburg) im Photometer (Bio-Photometer; Eppendorf, Hamburg) gemessen. Verunreinigungen mit Proteinen zeigen sich durch hohe Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 230 nm (Absorption der Peptidbindungen) sowie bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren). Das 260/280 nm-Verhältnis von reiner RNA beträgt 1,7-1,8 und für reine DNA  $\geq 2$  (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

### 2.3.9 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalysen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurde die notwendige Menge DNA (2 µg PCR-Produkt bzw. 3 µg Plasmid DNA) in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß über Nacht auf der Sterilbank getrocknet und mit jeweils 10 pmol des entsprechenden Primers (separat) der Firma zugesendet. Darstellung und Auswertung der erhaltenen Signale erfolgte unter Verwendung der *Software* Chromas 2.22 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

### 2.3.10 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR ermöglicht eine schnelle Verifizierung von positiven Transformanten ohne vorherige Plasmidisolierung und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Identifizierung positiver Klone von *A. tumefaciens* angewendet. Dabei wird die durch Lyse der Bakterienzellen freigesetzte DNA ohne weitere Aufreinigung als Matrize für eine PCR eingesetzt. Durch die Verwendung spezifischer Primer kommt es nur bei den Zellen zu einer DNA-Amplifikation, die zuvor das Plasmid mit dem inserierten Fremd-Gen aufgenommen hatten. Zur Herstellung eines Zelllysats wurde die zu analysierende Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und anteilig auf neues Selektionsmedium ausgestrichen. Die restliche Zellmasse wurde in 50 µl „Merck“-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10 min lang im kochenden Wasserbad



inkubiert und danach für 5 min bei 16000 *g* zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10  $\mu$ l als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt (siehe Kap. 2.3.5).

### 2.3.11 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge wurde eine Agarose-Gelmatrix verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Agarosegelen mit den Abmessungen 10 cm x 10 cm x 1 cm im 0,5-fach TBE-Laufpuffer in Anlehnung an SAMBROOK *et al.* (1989). Zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurden in dieser Arbeit 0,7 %-ige bis 2 %-ige Agarosegele je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente verwendet. Die jeweiligen DNA-Proben wurden mit 5-fach TBE-Gelladepuffer versetzt und in die entsprechenden Taschen des Gels pipettiert. Die DNA-Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V. Als Vergleichs- und Kontrollstandard fungierte  $\lambda$ -DNA, die mit dem Restriktionsenzym *Pst*I in bereits definierte Fragmentgrößen geschnitten wurde ( $\lambda$ DNA/*Pst*I; Fermentas, St. Leon-Rot).

<u>1 %-iges Agarose-Gel:</u>	Agarose	1 g
	0,5-fach TBE-Puffer	100 ml
	Homidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	3,5 $\mu$ l
<u>10-fach TBE-Puffer:</u>	Tris, pH 8,5 (HCl)	900 mM
	Borsäure	900 mM
	EDTA, pH 8,0	25 mM
<u>5-fach TBE-Ladepuffer:</u>	Bromphenolblau in 70 ml 5-fach TBE-Puffer sterilfiltrieren	0,21 g
	100 % (v/v) steriles Glycerin	3,5 $\mu$ l

### 2.3.12 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das im UV-Licht ( $\lambda = 312$  nm) sichtbare DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des *MiniElute Extraction-Kits* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers in 20  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert.

### 2.3.13 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode (HANAHAN, 1983). In YT-Medium mit Antibiotikazusatz

wurden *E. coli*-Zellen über Nacht kultiviert. Dabei wurde für XL1-Blue-*E. coli*-Zellen das Antibiotikum Tetrazyclin (10 µg/ml) zur Selektion eingesetzt. Von dieser Kultur wurden 2 ml in 200 ml YT-Medium ohne Zusatz eines Antibiotikums überführt und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) von 0,4 - 0,5 wachsen gelassen. Die Bakteriensuspension wurde bei 4 °C für 10 min bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde in 80 ml gekühlten TFB1-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Mit 8 ml gekühltem TFB2-Puffer wurden die Bakterien resuspendiert. Je 200 µl der Kultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die aliquoten Anteile von kompetenten *E. coli*-Bakterienzellen konnten bei -80 °C gelagert werden.

<u>TFB1-Puffer:</u>	Kaliumacetat, pH 5,8 (Essigsäure)	30 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	RbCl <sub>2</sub>	100 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern.	

<u>TFB2-Puffer:</u>	MOPS, pH 7,0 (NaOH)	10 mM
	RbCl <sub>2</sub>	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	20 min bei 125 °C autoklavieren.	

### 2.3.14 Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

In 200 ml YEB-Medium mit dem Antibiotikumzusatz Rifampicin (100 µg/ml) wurden Zellen des *A. tumefaciens*-Stamms GV 3101 angezogen. Die logarithmisch wachsende Kultur wurde 20 min lang bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit gekühltem TE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und das resultierende Sediment in 20 ml YEB-Medium resuspendiert. In Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden je 500 µl der *A. tumefaciens*-Suspension aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

<u>TE-Puffer:</u>	Tris, pH 8 (HCl)	10 mM
	EDTA	1 mM

### 2.3.15 Transformation von Plasmiden in *E. coli*-Zellen

Um einen konstruierten Vektor zu vervielfältigen, bringt man diesen in entsprechende kompetente Wirtszellen ein. Die Konstruktion eines Vektors und die Insertion von DNA kann *in vitro* erfolgen. Die Aufnahme fremder DNA in Bakterienzellen erfolgte durch Hitzeschocktransformation (COHEN *et al.*, 1972).

Ein aliquoter Anteil kompetenter *E. coli*-Zellen (200 µl) wurde auf Eis aufgetaut, ein kompletter Ligationsansatz bzw. ca. 10 µg Plasmid-DNA hinzupipettiert und vorsichtig vermischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock (45 sec) bei 42 °C wurde der Ansatz weitere 5 min auf Eis inkubiert und mit 1 ml YT-Medium ohne Antibiotikazusatz versetzt. Um sicher zu sein, dass sich die Plasmide in den Wirtszellen etablieren, erfolgte eine Inkubation für ca. 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Ein aliquoter Anteil von 70 µl des Transformationsansatzes wurde direkt auf Selektionsplatten (YT-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz) ausplattiert. Daraufhin wurde die Restkultur bei 4000 g und bei Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert, 500 µl des Überstands entfernt und der Ansatz homogenisiert. Von dieser Suspension wurden erneut 70 µl auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Bei Klonierungen in den Vektor pGEM-T *Easy* diente eine Blau-Weiß-Selektion dazu, positive Transformanten zu identifizieren. Dieses Plasmid trägt das Gen für die lacZ-Untereinheit, die auf dem *E. coli*-Chromosom im Stamm XL1-Blue deletiert ist. Innerhalb der lacZ-Untereinheit befindet sich die Klonierungsstelle des Plasmids. Erfolgt die Insertion eines DNA-Fragments in die Klonierungsstelle, kann keine Komplementation stattfinden und die *E. coli*-Zellen sind dadurch nicht in der Lage das Substrat 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-galactopyranosid (X-Gal) in Galaktose und einen blauen Farbstoff zu spalten. Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG) wird als molekularer Induktor des lac-Operons eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems können positive Transformanten anhand ihrer weißen Koloniefarbe identifiziert werden. Um diese Selektion durchführen zu können, wurden die Agarplatten vor dem Ausplattieren mit 80 µl X-Gal (2 % (w/v)) und 8 µl IPTG (2 % (w/v)) vorbehandelt.

### 2.3.16 Transformation von Plasmiden in *A. tumefaciens*-Zellen

Die Transformation von Plasmiden in *A. tumefaciens* erfolgte in Anlehnung an die Methode von HÖFGEN & WILLMITZER (1988). Um Plasmide in *A. tumefaciens* zu

integrieren, wurde ein aliquoter Anteil von 500 µl kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit ca. 10 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde die Suspension für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml YT-Medium ohne Antibiotikazusatz und durch Inkubation bei 28 °C für 2-4 h konnte das Bakterium das Plasmid aufnehmen. Aliquote Anteile von 200 µl und 400 µl Bakteriensuspension wurden auf YEB-Agarplatten mit Rifampicin (100 µg/ml) und Spectinomycin (25 µg/ml) ausgestrichen und zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

### 2.3.17 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Isolierte und gereinigte Plasmid-DNA kann für viele molekularbiologische Arbeiten, wie Restriktionsanalysen, DNA-Sequenzierungen und Ligationen, verwendet werden. Die Plasmidisolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979), wobei die unterschiedlichen Präzipitationseigenschaften von Plasmid-DNA, chromosomaler Wirts-DNA, Proteinen sowie RNA lysierter Bakterienzellen ausgenutzt werden (SAMBROOK *et al.*, 1989).

In dieser Arbeit verwendete Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Puffersets des *Nucleo Spin Plasmid DNA Purification*-Kits von Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers (ohne Verwendung von Säulchen) isoliert. Das dadurch erhaltene Plasmid-DNA-Pellet wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.3.18 Herstellung des Promotorregion F2-GUS-Konstrukts (pIS 36)

Unter Verwendung der *TIGR*-Genatombank (*The Institute for Genomic Research*, Rockville, MD, USA) wurde zunächst die DNA-Sequenz der 5'-stromaufwärts gelegenen Region des *NADP-MDH*-Gens (At5g58330) aus *A. thaliana* ermittelt. Als Promotorbereich wurde ein 1992 bp großer Sequenzabschnitt vor dem Startkodon der *NADP-MDH* ausgewählt (im Folgenden als F2 bezeichnet). Für die Amplifizierung der F2-Promotorsequenz wurden die Primer GUS\_2\_sx bzw. GUS\_1\_2\_as verwendet, welche so konstruiert wurden, dass sie spezifische Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Xba*I bzw. *Sma*I enthielten (Tab. 2.4). Als Matrize für die PCR wurde genomische DNA von *A. thaliana* eingesetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und der Elution des PCR-Produkts aus dem Agarosegel (siehe Kap. 2.3.11 und 2.3.12) wurde das Amplifikat zunächst in den Klonierungsvektor pGEM-T *Easy* ligiert (siehe Kap. 2.3.7). Das auf diese Weise erhaltene Konstrukt

pIS28 wurde zur Vervielfältigung in kompetente XL-1-Blue-*E. coli*-Zellen transformiert (siehe Kap. 2.3.15), welche zur Selektion auf Ampicillin/Tetracyclin-Nährmedium ausplattiert wurden. Nach einer Blau-Weiß-Selektion (siehe Kap. 2.3.15) wurden die putativ positiven Transformanten in Selektionsflüssigmedium weiterkultiviert und einer Plasmidisolierung unterzogen. Der Pflanzentransformationsvektor pGPTV-bar wurde ebenfalls in XL-1-Blue-*E. coli*-Zellen repliziert und anschließend daraus isoliert. Mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Sma*I wurde der F2-Sequenzabschnitt aus dem pIS28-Konstrukt geschnitten und nach elektrophoretischer Auftrennung und Elution in den ebenfalls mit *Xba*I und *Sma*I geöffneten Vektor pGPTV ligiert. Das auf diese Weise hergestellte Konstrukt pIS36 wurde für GUS-Reportergen-Analysen verwendet. Einzelne Klonierungsschritte wurden dabei mittels Restriktionen (siehe Kap. 2.3.6) und Sequenzanalysen (siehe Kap. 2.3.9) überprüft.

### **2.3.19 *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *A. thaliana* (floral dip)**

Durch die Fähigkeit, Pflanzen zu transformieren, hat sich *A. tumefaciens* als ein hervorragendes Hilfsmittel erwiesen, um funktionsfähige Gene in die Pflanze zu übertragen. Die Handhabung erfolgte nach der Methode von CLOUGH & BENT (1998), welche es ermöglicht, die T-DNA eines binären Vektors mittels *A. tumefaciens* in das Genom von *A. thaliana* zu integrieren.

Vorbereitend wurde an den zu transformierenden *A. thaliana*-WT-Pflanzen der primäre Blütenstand kurz nach der Bildung entfernt. Auf diese Weise wurde das Wachstum mehrerer sekundärer Blütenstände und damit eine höhere Anzahl von Blüten erzielt. Für die *floral dip*-Methode wurden *A. tumefaciens*-Zellen verwendet, die den pGPTV-Plasmidvektor mit inseriertem F2-GUS-Fusionskonstrukt enthielten (pIS 36, siehe Kap. 2.3.18). Die entsprechende *A. tumefaciens*-Kultur wurde über Nacht in 500 ml YEB-Medium unter Zugabe 100 µg/ml Rifampicin und 25 µg/ml Kanamycin bei 28 °C aerob bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) von 0,9 angezogen. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 5000 Upm (GSA-Rotor, RC 5B PLUS Zentrifuge, SORVALL Heraeus, Hamburg) sedimentiert und der Überstand dekantiert. Mit 500 ml einer 0,5 %-igen (w/v) sterilen Saccharoselösung wurde das Sediment resuspendiert. Nach Zugabe von 0,02 % (v/v) Silvet L-77 (Lehle-Seeds, Round Rock, Tx, USA) wurden die Pflanzen für 15 sec in der Bakterienlösung geschwenkt (*dippen*). Dabei wurde darauf geachtet, dass der vollständige Blütenstand in die Suspension getaucht wird, damit alle Infloreszenzen mit der Bakteriensuspension bedeckt sind. Die

Pflanzen wurden zum Abtropfen auf die Seite gelegt und 12-24 h abgedeckt, um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen. Währenddessen wurden die Pflanzen unter Schwachlichtbedingungen gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Abdeckung entfernt, und die Pflanzen wieder Normallicht ausgesetzt. Um die Transformationsrate zu erhöhen, wurde der gesamte Vorgang nach 7 Tagen wiederholt. Nach dieser Behandlung ließ man die Pflanzen ausblühen und erntete die Samen. Zur anschließenden Selektion wurden die Samen auf MS-8-Agarplatten mit dem Totalherbizid Glufosinat (40 µg/ml) ausgesät (siehe Kap. 2.2.4).

### 2.3.20 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana*

Um RNA vor dem Verdau durch Ribonukleasen zu schützen, wurden alle Puffermedien mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1 %) versetzt und nach Inkubation über Nacht autoklaviert, um das überschüssige DEPC zu inaktivieren. Außerdem wurden beim Umgang mit RNA Ribonuklease-freie Glaswaren (8 h bei 180 °C gebacken) sowie sterile, autoklavierte Kunststoffartikel verwendet. Es wurde stets mit Handschuhen gearbeitet.

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde nach einer Modifikation des Protokolls von *Genra-Systems Inc.* (RNA-Miniprep nach US-Patent 5.973.137) durchgeführt. Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff in einem sterilen, vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Pulver wurde zu aliquoten Anteilen von ca. 200 mg in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, welche durch flüssigen Stickstoff gekühlt waren. Dem noch gefrorenen Pflanzenmaterial wurden 600 µl Zellysepuffer zugeführt und es wurde erneut gemörsert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Protein-Präzipitationspuffer, der durch den hohen Salzgehalt und den niedrigen pH-Wert zur Fällung von DNA und Proteinen führte. Nach mehrmaligem, kurzem Mischen mit Hilfe des Vortexers und einer Inkubation von 5 min auf Eis, wurden Zelltrümmer, Proteine und DNA durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 16000 g sedimentiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Die RNA-Fällung erfolgte nach wiederholtem Invertieren 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurde wiederum 5 min bei 16000 g zentrifugiert, wobei die RNA pelletiert wurde. Das Pellet wurde mit 300 µl 70-75 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand mit einer ausgezogenen Glaspipette sorgfältig entfernt, und das Pellet auf der Sterilbank kurz getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, durch eine Inkubation von 5 min bei 60 °C im Thermomixer (Comf ort 5436 Eppendorf, Hamburg)

gelöst. Um letzte Verunreinigungen abzutrennen, wurde nochmals kurz bei 16000 g zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die erwartete RNA-Ausbeute bei der Isolierung nach dieser Methode lag bei 1 µg RNA pro mg Pflanzenmaterial. Die genaue Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Photometrie (siehe Kap. 2.3.8).

<u>Zellysepuffer:</u>	SDS	2 % (w/v)
	(tri-)Natrium-Citrat	68 mM
	Zitronensäure, pH3,5	132 mM
	EDTA	10 mM
	DEPC	0,1 % (v/v)
<u>Protein-Präzipitationspuffer:</u>	NaCl	4 M
	(tri-)Natrium-Citrat	17 mM
	Zitronensäure, pH3,5	33 mM
	DEPC	0,1 % (v/v)
	20 min bei 125 °C autoklavieren	

### 2.3.21 DNase-Verdau

Um einer DNA-Verunreinigung vorzubeugen wurde vor der cDNA-Herstellung (siehe Kap. 2.3.22) ein DNase-Verdau mit den entsprechenden aliquoten Anteilen der RNA-Suspension durchgeführt. Für den Verdau mit DNase I (1 U/µl bzw. 5 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) wurden jeweils 5 µg RNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.3.22 Herstellung des ersten Strangs cDNA

Die Herstellung des ersten Strangs cDNA erfolgte unter Nutzung des *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis-Kits* (Fermentas, St. Leon-Rot), in dem die *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV RT* als Reverse Transkriptase verwendet wird, welche aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus gewonnen wird und keine Ribonuklease-H-Aktivität besitzt. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA. Als Primer wurde dabei ein Oligo(dT)18-Primer verwendet. Die Durchführung fand nach Angaben des Herstellers statt.

### 2.3.23 Formaldehyd-Gel zur Auftrennung von RNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA-Fragmenten erfolgte mittels Formaldehyd-Gelen unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von

LEHRACH *et al.* (1977) und SAMBROOK *et al.* (1989). Zur Herstellung eines Formaldehyd-Gels wurde 1 g Agarose in 72 ml DEPC-H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> durch Aufkochen gelöst und danach kurz gekühlt. Dazu wurden 10 ml 10-fach konzentrierter MEN-Puffer, sowie 18 ml 37 %-iges Formaldehyd gegeben (Endvolumen 100 ml). Die Lösung wurde in eine Gelkammer mit Taschenkamm gefüllt, welche zuvor mit 3 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung behandelt (30 min Inkubation) und mit DEPC-H<sub>2</sub>O ausgespült worden war. Dies diente der Beseitigung von Ribonukleasen, um einem Abbau von RNA vorzubeugen. Nach Erstarren des Gels konnten die Proben aufgetragen werden.

Pro Probe wurden 10 µg RNA eingesetzt. Diese wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Dazu wurden 20 µl Formaldehyd-Gelladepuffer pipettiert. Daraufhin erfolgte die Denaturierung der RNA, indem die Proben 15 min bei 65 °C inkubiert wurden. Nach 5-minütigem Abkühlen auf Eis war die Probenvorbereitung abgeschlossen. Die Elektrophorese wurde für 1-1,5 h bei 70 V durchgeführt, wobei als Laufpuffer 1-fach MEN-Puffer diente.

<u>10-fach MEN-Puffer:</u>	MOPS	200 mM
	Natriumacetat	50 mM
	EDTA	10 mM

Das Medien wurde mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt und autoklaviert (dunkel lagern).

<u>Formaldehyd-Gel-ladepuffer pro Probe:</u>	10-fach MEN-Puffer	3 µl
	Formaldehyd (37 %)	5 µl
	Formamid	10 µl
	Glycerin/Bromphenolblau	2 µl
	Homidiumbromid	1 µl

### 2.3.24 Transfer von RNA auf eine Nylonmembran (*Northern-Blot*)

Vor dem Transfer von RNA auf eine Nylonmembran wurde das RNA-Gel zum Entfernen des Formaldehyds zweimal für je 15 min in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und zum Äquilibrieren weitere 15 min in 10-fach Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurde die elektrophoretisch getrennte RNA durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Amersham-Biosciences, Braunschweig) übertragen. Um erfolgreich zu *blot*ten, wurden folgende Vorbereitungen getroffen: Whatman-Papier (1 mm; Schleicher & Schuell Bio Science, Dassel) und die Nylonmembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in 10-fach SSC-Puffer vorinkubiert. Da es sich hier um das Kapillar-*Blot*-Verfahren handelt, wurde ein weiteres langes Stück



Whatman-Papier (3 mm; Schleicher & Schuell Bio Science, Dassel) in Gelbreite als Transferbrücke vorbereitet. Die *Blot*-Apparatur wurde nach SAMBROOK *et al.* (1989) aufgebaut.

Der Kapillartransfer der RNA wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ,  $120 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) mit Hilfe eines UV-Ofens (UV Stratalinker 1800, Stratagene) kovalent auf der Membran fixiert. Eine Überprüfung des RNA-Transfers wurde unter UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) vorgenommen.

<u>10-fach Transferpuffer:</u>	Natrium-Citrat	0,15 M
	NaCl	1,5 M
	pH 7,0 (Zitronensäure)	

### 2.3.25 Herstellung einer radioaktiven DNA-Sonde zur Identifizierung von Expressionsmustern

Die radioaktive Markierung von cDNA für die Hybridisierung mit RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des *Ready To Go DNA Labeling Beads (-dCTP)*-Kits (Amersham Biosciences, Braunschweig). Als markiertes Nukleotid diente hierbei  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  (3000 Ci/mmol). Von der umzuschreibenden DNA wurden 200 ng in die Reaktion eingesetzt. Eine anschließende Gelfiltrationschromatographie (NAP 5; Amersham Biosciences, Braunschweig) trennte Mononukleotide, die während der Synthese nicht eingebaut wurden, von der radioaktiven cDNA-Sonde ab. Für die Herstellung der *NADP-MDH (A.t.)*-spezifischen Sonde diente als Matrize die entsprechende Sequenz aus dem Konstrukt pPN15 und für die *AOX1A (A.t.)*-spezifische Sonde die entsprechende Sequenz aus dem Konstrukt pVE 81 (siehe Tab. 2.3).

### 2.3.26 Hybridisierung von RNA mit einer radioaktiv markierter Sonde

Zur Hybridisierung mit spezifischen cDNA-Sonden (Kap. 2.3.25) wurde die Nylonmembran in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt und zur Absättigung unbesetzter Membranbindungsstellen mit 20 ml Hybridisierungspuffer (CHURCH *et al.*, 1984) für 1,5 h bei  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  im Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen) vorhybridisiert. Nach dieser Zeit wurde der Hybridisierungspuffer durch 20 ml frischen Puffer ersetzt. Die radioaktiv markierte cDNA-Sonde (200 ng) wurde 5 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert, anschließend 5 min auf Eis/NaCl inkubiert und ebenfalls zum Hybridisierungspuffer in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im

Hybridisierungsöfen bei 65 °C. Die Hybridisierungslösung wurde am folgenden Tag abgegossen und vorerst bei -20 °C gelagert. Überschüssige sowie unspezifisch gebundene DNA-Fragmente wurden durch zweimaliges Waschen (je 15 min) mit 20 ml Waschpuffer I bei 65 °C und einmaliges Waschen (10 min) mit 20 ml Waschpuffer II bei Raumtemperatur entfernt. Nach kurzer Trocknungszeit wurde die noch feuchte Nylonmembran in Plastikfolie eingeschlagen und in einer Mappe mit Phosphoreszenzspeicherplatten (*storage phosphor screen*) fixiert. Die Exposition erfolgte bei Raumtemperatur für mehrere Stunden oder über Nacht. Die Auswertung fand mit Hilfe der Storm<sup>TM</sup>-Technologie (Storm 820; Amersham Bioscience, Freiburg) und spezieller *Software* (*storm scanner control* Version 5.0) statt.

Um die Nylonmembran mit der transferierten RNA für die Hybridisierung mit einer weiteren Sonde verwenden zu können, musste die Sonde von der Membran gewaschen (*gestrippt*) werden. Dazu wurden in einem Becherglas ca. 100-200 ml *stripp*-Puffer aufgekocht und die zu *strippende* Nylonmembran eingelegt. Nach dem Abkühlen unter ständigem Schütteln wurde die Membran aus dem Puffer genommen und getrocknet.

<u>Hybridisierungspuffer:</u>	BSA	1 % (w/v)
	EDTA (0,5 M, pH 8,0 mit NaOH)	1 mM
	SDS	7 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 M
<u>Waschpuffer I:</u>	BSA	0,5 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,2	40 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	5 % (w/v)
<u>Waschpuffer II:</u>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,2	40 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	1 % (w/v)
<u>stripp-Puffer:</u>	NaCl	3 M
	Natriumcitrat, pH 7,0	0,3 M
	SDS	10 % (w/v)

### 2.3.27 DNA- und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung

Die DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm *Clonemanager* analysiert. Für Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des Programms *ClustalW* direkt

Daten aus entsprechenden Datenbanken (*EMBL*, *GenBank*, *TIGR*, *SwissProt*, usw.) angefordert.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Herstellung eines *A. thaliana*-Protein-Rohextrakts

Für einen Expressionsvergleich wurden Rohextrakte aus entsprechenden Arabidopsis-Blättern hergestellt und mittels SDS-PAGE (Kap. 2.4.3), *Western-Blot*-Analyse und Immundetektion (Kap. 2.4.4) analysiert. Für die Herstellung der Rohextrakte wurde das Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Zu je 10 µg Pflanzenmaterial wurden ca. 100 µl PEX-Puffer zugegeben und mit Hilfe eines Vortexers gemischt (zur Extraktion von Membranproteinen wurde zuvor 0,1 % (v/v) Triton X-100 in den Puffer gegeben; PEX-Plus-Puffer). Die Zellsuspension wurde zweimal für 30 sec mit dem Ultraschall-Stab (Vibracell, Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich) behandelt und dann 30 min lang bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltenen Proteinmengen wurden nach der Bradford-Methode (Kap. 2.4.2) bestimmt. Die Lagerung der Protein-Lösungen erfolgte bei -20 °C.

<u>PEX-Puffer:</u>	Hepes, pH 7,5 (NaOH)	50 mM
	NaS <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2 mM
	BSA	0,01 % (w/v)
	SDS	0,5 % (w/v)
	Protease Inhibitor Cocktail for Plants (Sigma, Deisenhofen)	1:1000

### 2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinkonzentration in einer Lösung wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) photometrisch (Uvikon® 810 Kontron Instruments, Schweiz) gegen BSA als Eichprotein bestimmt. In diesem Verfahren wird der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G 250 verwendet. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an Proteine. In Gegenwart von Proteinen und in einem sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliantblau G 250 von 465 nm auf 595 nm. Zur Bestimmung der Proteinmenge in einer Lösung wird eine Eichgerade benötigt, die mit 0-20 µg entfettetem Rinderserumalbumin (BSA Fraktion V) hergestellt wird. Der aus

der Steigung berechnete Faktor ermöglicht es, die Proteinkonzentration aufgrund der Absorptionwerte der Probe bei 595 nm zu berechnen.

<u>Bradford-Farbreagenz:</u>	Coomassie-Brilliantblau G 250	50 mg
	Ethanol, 95 %	10 ml
	o-Phosphorsäure, 85 %	175 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml ml
<u>Proteinbestimmungsansatz:</u>	Probe	X µl
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 500 µl
	Bradford-Farbreagenz	500 µl

### 2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Trennung von Proteinen wurde die von LAEMMLI (1970) eingeführte diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladung der Proteine so effektiv überdeckt, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Die Proben wurden zur Vorbereitung zusammen mit 1-fach SDS-Gelladepuffer, d.h. mit einem Überschuss an SDS, für 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen wurden durch Zugabe einer Thiolverbindung, in diesem Fall mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), aufgespalten. Es wurde das Gelsystem der Firma BioRad (München) verwendet. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 100 %-igem Isopropanol bedeckt. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel über das Trenngel gegeben und ein Geltaschenformer eingesetzt. Die auf das Gel aufzutragenden Proben wurden mit Gelladepuffer versetzt und für 10 min gekocht. Das Volumen der Proben betrug 15-30 µl. Die Gellaufkammer wurde mit SDS-Laufpuffer befüllt und eine Spannung von 120 V angelegt.

<u>Trenngel (12 %):</u>	40 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	1,5 ml
	1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8 (HCl)	1,3 ml
	10 % APS	40 µl
	5 % TEMED	2 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,15 ml

<u>Sammelgel (5 %):</u>	40 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	210 $\mu$ l
	0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8 (HCl)	227 $\mu$ l
	10 % APS	17 $\mu$ l
	5 % TEMED	1,7 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1,2 ml
<u>SDS-Gelladepuffer:</u>	Glycerin	10 % (v/v)
	SDS	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Tris, pH 6,8 (HCl)	62,5 mM
<u>SDS-Laufpuffer:</u>	Glycerin	192 mM
	SDS	4 mM
	Tris, pH 8,3 (HCl)	25 mM

Als Proteinstandard wurde *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

#### 2.4.4 **Western-Blot-Analyse und Immunodetektion**

Die zuvor mittels SDS-PAGE (Kap. 2.4.3) elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach der Methode von BURNETTE (1981) auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße: 0,2  $\mu$ m; Schleicher & Schuell Bio Science, Dassel) transferiert. Die Nitrocellulosemembran und zwei Stück Whatman-Papier (3 mm; Schleicher & Schuell Bio Science, Dassel) wurden auf Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Das SDS-Gel und die Whatman-Papierstücke wurden in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte „nass“ unter Verwendung des Transferpuffers in der Elektrophoresekammer *mini trans-blot cell* von BioRad (München) nach Angaben des Herstellers. Danach wurde die Membran kurz in Ponceau-Rot-Lösung (1 % Ponceau S in 3 % TCA) inkubiert. Der Farbstoff Ponceau S (Applichem, Darmstadt) detektiert unspezifisch alle geblotteten Proteine und dient somit der Überprüfung des Transfers. Mit H<sub>2</sub>O wurde die Ponceau-Rot-Lösung entfernt. Nachdem die Membran jeweils 5 min mit TBS, TBST und wieder mit TBS gewaschen wurde, konnte sie zur Immundetektion eingesetzt werden. Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt, indem die Membran 1 h in Blockierungspuffer (3 % BSA in TBS) inkubiert wurde. Nach Waschen der Membran, wie zuvor beschrieben, wurde der primäre Antikörper in Blockierungspuffer zugegeben und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden Unspezifisches und nicht-gebundene Antikörper, wie zuvor beschrieben, von der Membran gewaschen, der sekundäre Antikörper in

Blockierungslösung zugegeben und die Membran 2-3 h darin inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente entweder der anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase oder der anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (BioRad, München) mit daran gekoppelter Peroxidase.

Die Alkalische-Phosphatase-Reaktion wurde mit 20 µl NBT (75 mg/ml in 70 % DMF) und 120 µl BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF) in 40 ml Puffer A gestartet und mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Um die Peroxidase-Reaktion zu starten, wurden zur Membran 25 ml TBS-Puffer (37 °C), 20 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 5 ml 100 %-igem Methanol und 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 %-ig) gegeben. Diese Reaktion wird ebenfalls durch H<sub>2</sub>O gestoppt. Als weitere Möglichkeit für den Nachweis des mit Peroxidase gekoppelten Antikörpers wurde ein *ECL*-Reaktionskit (*enhanced chemiluminescence, ECL*) von GE Healthcare (München) verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Emission des Lichts wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms (HRE-30, Fujifilm, Tokio) detektiert.

<u>10-fach TBS-Puffer:</u>	Tris, pH 7,5 (HCl)	0,5 M
	NaCl	1,5 M
<u>TBST-Puffer:</u>	1-fach TBS-Puffer	
	Tween 20	0,2 % (v/v)
<u>10-fach Transferpuffer:</u>	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	0,1 %
	Methanol	20 % (v/v)
<u>Puffer A:</u>	Tris, pH 8,8 (HCl)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM

#### 2.4.5 Histochemische Lokalisierung der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität

Die durch das  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Reporter gen vermittelte Glucuronidase-Aktivität wurde durch eine histochemische Färbung nachgewiesen (JEFFERSON *et al.*, 1987; modifiziert nach KIM *et al.*, 2006). Hierzu wurden WT- und GUS-transformierte Arabidopsis-Keimlinge verwendet. Die ca. 3 Wochen alten, auf Erde angezogenen Keimlinge wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 20 min lang bei RT in 90 %-igem, eiskaltem Aceton inkubiert und danach 3 mal mit Lösung I ohne X-Gluc gewaschen. Zur Vakuuminfiltration wurden die Keimlinge vollständig mit Lösung I mit

X-Gluc überschichtet und in einem Exsikkator 15 min lang einem Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) ausgesetzt. Anschließend wurden die Färbeansätze über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln (80 Upm) inkubiert. Das Chlorophyll sowie überschüssiger Farbstoff wurden durch mehrmaliges Waschen mit 70 %-igem (v/v) Ethanol entfernt. Zur Dokumentation der blau gefärbten Areale wurden ein Mikroskop mit Kameraaufsatz (Leica, Wetzlar) und ein Binokular verwendet.

<u>Lösung I:</u>	Na-Phosphatpuffer, pH 7,0	50 mM
	EDTA	10 mM
	Triton X-100	0,1 % (v/v)
	K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	5 mM
	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	5 mM
	X-Gluc	1 mM

## 2.4.6 **Metabolic profiling mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)**

### 2.4.6.1 **Probenvorbereitung**

Für die Extraktion von Stoffwechselmetaboliten wurden ca. 100 mg des entsprechend behandeltem Pflanzenmaterials in flüssigem Stickstoff geerntet und mit einem Metallstab in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Stickstoff homogenisiert (RW 20, Janke & Kunkel, KIKA-Werk, Staufen). Danach erfolgte eine genaue Gewichtsbestimmung des Blattmaterials. Als Extraktionsmittel diente 1,4 ml Methanol (100 %-ig). Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 µl Ribitol (0,2 mg/ml in H<sub>2</sub>O) als Standard für die polare Phase. Dieser Extraktionsansatz wurde 15 min lang bei 70 °C und 750 Upm auf dem Thermomixer (Comfort 5436 Eppendorf, Hamburg) geschüttelt, wobei das Reaktionsgefäß nach ca. 1 min für einen Druckausgleich kurz geöffnet und wieder verschlossen wurde. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei 14000 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415 R Eppendorf, Hamburg) und der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen aus Glas transferiert. Nach der Zugabe von 750 µl Chloroform und 1,5 ml H<sub>2</sub>O wurde der Extraktionsansatz für 15 sec mit Hilfe eines Vortexers homogenisiert und 15 min lang bei 4000 g zentrifugiert (Rotor SS 35, PC 5B Plus Zentrifuge SORVALL Heraeus, Hamburg). Von der polaren Phase wurden 150 µl in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und in einer *Speed Vac* (Eppendorf, Hamburg) ohne Hitze bis zur Trocknung eingengt (für mind. 3 h). Bis zur Derivatisierung wurden die Proben mit Argon überschichtet und zusammen mit Silica-Gel bei -80 °C gelagert.

### 2.4.6.2 Analyse der Stoffwechselmetabolite mittels GC/MS

Nachdem die Extrakte aus dem entsprechend behandelten Pflanzenmaterial hergestellt worden waren (siehe Kap. 2.4.6.2), wurden die Analysen mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) sowie die Kalkulationen der Ergebnisse in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Alisdair Fernie am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm, Potsdam, nach LISEC *et al.* (2006) vorgenommen. Um die Korrektheit der Ergebnisse sicherzustellen, wurden dabei pro Messreihe für jeden Genotyp und die jeweilige Vorbehandlung sechs voneinander unabhängige Extraktionen durchgeführt. Von diesen wurde der jeweilige Mittelwert mit dazugehörigem Standardfehler bestimmt. Insgesamt wurden zwei vollständige Messreihen analysiert. Die Quantifizierung der absoluten Serin- und Glycingehalte wurde ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe anhand von Kalibrierungskurven mit geeigneten Standards der entsprechenden Aminosäuren, wie von ROESSNER-TUNALI *et al.* (2003) beschrieben, durchgeführt.

### 2.4.7 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts in Pflanzenextrakten erfolgte nach SIMS & GAMON (2002). Dabei wurden 10 µl des Pflanzenrohextraktes zu 990 µl 80 %-iges Aceton gegeben und vermischt. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Messungen erfolgten im Photometer der Firma Uvikon (Uvikon 810, Kontron, Zürich, Schweiz) bei Wellenlängen von 470 nm, 537 nm, 647 nm und 663 nm. Dabei wurde immer dieselbe Quarzküvette in gleicher Orientierung verwendet. Als Referenzwert diente ein Ansatz, dem 10 µl des jeweiligen Extraktionspuffers anstelle der Probe zugegeben wurde. Die Chl a- und b-Konzentrationen konnten wie folgt berechnet werden:

$$Chl_a (\mu mol * ml^{-1}) = 0,01373 * E_{663} - 0,000897 * E_{537} - 0,003046 * E_{647}$$

$$Chl_b (\mu mol * ml^{-1}) = 0,02405 * E_{647} - 0,004305 * E_{537} - 0,005507 * E_{663}$$



## 2.4.8 Enzymaktivitätsmessungen

### 2.4.8.1 Bestimmung der Katalase-Aktivität

Die Bestimmung der Katalase-Aktivität wurde nach einer modifizierten Methode von DEL LONGO *et al.* (1993) vorgenommen. Der zu messende Rohextrakt wurde am Tag der Messung frisch hergestellt. Dabei wurden 36 mg gefrorenes Blattmaterial, welches unter flüssigem Stickstoff gemörsert wurde, in 333 µl Extraktionspuffer A aufgenommen und mit Hilfe eines Vortexers zu einer homogenen Suspension gemischt. Daraufhin wurden aliquote Anteile für eine Chlorophyllbestimmung (siehe Kap. 2.4.7) entnommen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Entnahme eines aliquoten Anteils für eine Proteinbestimmung (siehe Kap. 2.4.2) wurde der Überstand bis zur baldigen Verwendung auf Eis gelagert.

<u>Extraktionspuffer A:</u>	Na-Phosphatpuffer, pH 7,0	50 mM
	PVPP	1 % (w/v)
	Ascorbat	1 mM

Katalase katalysiert den Umsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Bildung von Sauerstoff und Wasser. Bei dieser Messung wurde der Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spektralphotometrisch mittels des Specord 50-Photometers (Analytic Jena AG, Jena) bei einer Wellenlänge von 240 nm verfolgt.

<u>Reaktionsansatz in der Küvette:</u>	Na-Phosphatpuffer, pH 7,0	50 mM
(Endvolumen 1 ml)	Rohextrakt	10 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Start der Reaktion)	12,5 mM

### 2.4.8.2 Bestimmung der NADP-MDH-Gesamtaktivität

Die Bestimmung der NADP-MDH-Gesamtaktivität erfolgte nach SCHEIBE & STITT (1988). Da die NAD-MDH zu 0,2 % auch NADP<sup>+</sup> als Coenzym verwendet, wurde neben der NADP-MDH-Gesamtaktivität auch die Aktivität der NAD-MDH gemessen. Bei der Berechnung wurde später der entsprechende prozentuale Anteil von der NADP-MDH-Aktivität abgezogen. Das Prinzip der Messungen beruht auf dem Umsatz von Oxalacetat und dem Coenzym NAD(P)H zu Malat und NAD(P). Bei dieser Messung wurde die Oxidation von NAD(P)H spektralphotometrisch mittels des Specord 50-Photometers (Analytic Jena AG, Jena) bei einer Wellenlänge von 334 nm verfolgt.

Der zu messende Rohextrakt wurde am Tag der Messung frisch hergestellt. Dabei wurden 18 mg gefrorenes Blattmaterial, welches unter flüssigem Stickstoff gemörsert wurde, in 100 µl Extraktionspuffer B aufgenommen und während des Auftauens mit Hilfe eines Vortexers zu einer homogenen Suspension gemischt. Daraufhin wurden aliquote Anteile für eine Chlorophyllbestimmung (siehe Kap. 2.4.7) entnommen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Entnahme eines aliquoten Anteils für eine Proteinbestimmung (siehe Kap. 2.4.2) wurde der Überstand bis zur baldigen Verwendung auf Eis gelagert.

<u>Extraktionspuffer B:</u>	Tris, pH 8,0 (HCl)	50 mM
	BSA	0,01 % (v/w)
	Triton X-100	0,05 % (v/v)
	β-ME	14 mM
	EDTA	1 mM

Messung der NAD-MDH-Aktivität:

Zur Messung der NAD-MDH-Aktivität wurde der Rohextrakt 1:100 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl zu 980 µl Reaktionsansatz in die Küvette gegeben.

<u>Reaktionsansatz in der Küvette:</u> (Endvolumen 1 ml)	Tris, pH 8,0 (HCl)	100 mM
	BSA	0,01 % (v/w)
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	NADH	0,2 mM
	Rohextrakt (1:100 verdünnt)	10 µl
	Oxalacetat (Start der Reaktion)	1 mM

Messung der NADP-MDH-Aktivität:

Vor Beginn der Messung wurde die NADP-MDH mittels DTT<sub>red</sub> *in vitro* vollständig aktiviert, um eine Bestimmung der Gesamtaktivität bzw. Kapazität zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde ein aliquoter Anteil des Rohextrakts in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit einem Vollaktivierungsansatz versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

<u>Vollaktivierungsansatz:</u> (Endvolumen 100 µl)	Tris, pH 8,0 (HCl)	100 mM
	BSA	0,1 % (v/w)
	Rohextrakt	50 µl
	DTT <sub>red</sub>	0,1 M
	(in 250 mM Tris, pH 8,0 (HCl), Start der Reaktion)	

Die Aktivierung wurde durch Verdünnung von 30 µl des Vollaktivierungsansatzes mit 960 µl Reaktionsansatz in der Küvette gestoppt.

<u>Reaktionsansatz in der Küvette:</u>	Tris, pH 8,0 (HCl)	100 mM
(Endvolumen 1 ml)	BSA	0,01 % (v/w)
	EDTA	1 mM
	NADH	0,2 mM
	Vollaktivierungsansatz	30 µl
	Oxalacetat (Start der Reaktion)	1 mM

### 2.4.8.3 Auswertung der Messdaten

Zur Berechnung der Enzymaktivitäten wurden die Messdaten aus den linearen Bereichen nach dem Start der Reaktion in Microsoft-Excel übertragen. Die Berechnung der Extinktionsänderung pro Minute ( $\Delta E/\text{min}$ ) aus der Steigung erfolgte durch die *Software* WinASPECT. Die Enzymaktivitäten (EA) in U/ml Rohextrakt wurden unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes mit folgender Gleichung berechnet:

$$EA[U/ml] = \frac{\left(\frac{\Delta E}{\text{min}}\right)}{\varepsilon * d} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

- $\varepsilon$  = millimolarer Extinktionskoeffizient ( $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ )  
 (  $\varepsilon$  von NAD(P)H bei 334 nm =  $6,18 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ;  
 $\varepsilon$  von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei 334 nm =  $39,4 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ )  
 $\Delta E$  = Extinktionsänderung im linearen Bereich  
 $d$  = Schichtdicke der Lösung (entspricht Schichtdicke Küvette von 1 cm)  
 EA = Enzymaktivitäten in U/ml

### 2.4.9 Enzymatische Bestimmung des Stärkegehalts

Die enzymatische Bestimmung des Stärkegehalts erfolgte nach einer modifizierten Methode von BATZ *et al.* (1995). Zu diesem Zweck wurden 18 mg, unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Blattmaterial in 1 ml 80 %-igen Ethanol homogenisiert und 8 min lang bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Dieses diente der Sedimentation der unlöslichen Stärke. Bevor der Überstand verworfen wurde, wurde ein aliquoter Anteil für eine Chlorophyllbestimmung (siehe Kap. 2.4.7) entnommen. Das Pellet wurde in 300 µl 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 4,7) resuspendiert. Um die Stärke löslich und damit für abbauende Enzyme besser zugänglich zu machen, wurden die Proben 2 h lang bei 125 °C autoklaviert. Danach erfolgte der hydrolytische Abbau der Stärke zu

Glucose. Dafür wurde jede Probe mit 150  $\mu$ l „Verdaumix“ versehen und für 2 h bei 37  $^{\circ}$ C und 300 Upm im Thermomixer (Comfort 5436 Eppendorf, Hamburg) inkubiert.

<u>„Verdaumix“:</u>	Na-Acetatpuffer, pH 4,7	0,1 N
(Endvolumen 4 ml)	Amyloglucosidase	240 U
	$\alpha$ -Amylase	600 U

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der hydrolytische Abbau durch eine 3-minütige Hitzebehandlung bei 95  $^{\circ}$ C gestoppt. Um während des Autoklavierens aufgetretene Flüssigkeitsverluste auszugleichen, wurden die Proben mit 100 mM Tris-Puffer (pH 8,0; HCl) auf ein Endvolumen von 525  $\mu$ l aufgefüllt, homogenisiert und 8 min lang bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand mit der erhaltenen löslichen Glucose wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte ggf. bis zur weiteren Analyse bei -20  $^{\circ}$ C gelagert werden. Die Glucose-Konzentration wurde mittels enzymatischer Endwertbestimmung im Specord 50-Photometer (Analytic Jena AG, Jena) bei 334 nm bestimmt. Dazu wurden 100  $\mu$ l der Probe im Reaktionsansatz in der Küvette eingesetzt.

<u>Reaktionsansatz in der Küvette:</u>	Tris, pH 8,0 (HCl)	100 mM
(Endvolumen 1 ml)	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	NADP	1 mM
	ATP	1 mM
	G6PDH	1 U
	Probe	100 $\mu$ l
	Hexokinase (Start der Reaktion)	1 U

Vor dem Start der Reaktion wurde die Messung für ca. 2 min verfolgt. Durch Zugabe der Hexokinase wurde die Reaktion gestartet und so lange gemessen, bis die Reaktion zum Erliegen kam. Während dieser Zeit sollte es durch die Hexokinase zur vollständigen Umsetzung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat (G6P) unter ATP-Verbrauch kommen, welche durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) mittels NADP<sup>+</sup> als Coenzym vollständig zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert werden sollte. Die Konzentration des dadurch entstandenen NADPHs (was stöchiometrisch auch der umgesetzten Glucose entspricht) konnte durch die Gesamtzunahme der Extinktion ( $\Delta E$ ) bei 334 nm mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes nach folgender Gleichung bestimmt werden.

$$c \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E}{\varepsilon * d} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

- $\varepsilon$  = millimolarer Extinktionskoeffizient ( $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ )  
 ( $\varepsilon$  von NAD(P)H bei 334 nm =  $6,18 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ )  
 $\Delta E$  = Extinktionsänderung  
 $d$  = Schichtdicke der Lösung (entspricht Schichtdicke der Küvette von 1 cm)  
 $c$  = Konzentration der absorbierenden Substanz ( $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )

#### 2.4.10 Bestimmung des GSH- bzw. GSSG-Gehalts mittels *high performance liquid chromatography (HPLC)*

Sowohl das Gesamt-Glutathion (GSX) als auch das oxidierte Glutathion (GSSG) wurden nach einer modifizierten Methode von SCHULTE *et al.* (2002) mittels *high performance liquid chromatography (HPLC)* bestimmt. Die Konzentration des reduziert vorliegenden Glutathions (GSH) wurde dabei indirekt aus der Differenz beider Komponenten ermittelt. Der zu messende Rohextrakt wurde am Tag der Messung frisch hergestellt. Dabei wurden ca. 2 Spatellöffel gefrorenes Blattmaterial, welches unter flüssigem Stickstoff gemörsert wurde, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Bestimmung des genauen Frischgewichts wurde Blattpulver in 1 ml 2 %-ige Perchlorsäure aufgenommen und während des Auftauens mit Hilfe eines Vortexers zu einer homogenen Suspension gemischt. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 Upm (Tischzentrifuge 5415 R Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels gesättigter  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung neutralisiert (ca. pH 7; Kontrolle mit pH-Indikatorpapier). Der entstandene Niederschlag wurde durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 Upm (Tischzentrifuge 5415 R Eppendorf, Hamburg) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und stellte den Rohextrakt für die *HPLC*-Probenvorbereitung dar.

Die *HPLC*-Probenvorbereitung für die GSX- sowie GSSG-Bestimmung erfolgte parallel in Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Zur Bestimmung des Glutathions wurden dabei aliquote Anteile des Extrakts mit  $\text{DTT}_{\text{red}}$  reduziert und die Thiolgruppen mit Monochlorobimane (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt) derivatisiert (SCHUPP & RENNENBERG, 1988).

<u>GSX-Bestimmung:</u>	200 mM CHES-Puffer, pH 9,2 (KOH)	240 $\mu\text{l}$
	Rohextrakt	160 $\mu\text{l}$
	5 mM $\text{DTT}_{\text{red}}$	20 $\mu\text{l}$
	$\text{H}_2\text{O}$	20 $\mu\text{l}$

Um die Konzentration des GSSG bestimmen zu können, wurde die Methode der Konjugation des GSH mit N-Ethylmaleimid (NEM; Sigma, Deisenhofen) verwendet. In einer spontanen Reaktion zwischen GSH und NEM entsteht dabei eine alkylierte Verbindung, welche die weitere Teilnahme des reduzierten GSH an der Reaktion effektiv verhindert.

<u>GSSG-Bestimmung:</u>	200 mM CHES-Puffer, pH 9,2 (KOH)	240 µl
	Rohextrakt	160 µl
	5 mM NEM	20 µl
	5 mM DTT	20 µl
	Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur	

Daraufhin wurden die Proben jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die reduzierten Thiolgruppen wurden anschließend durch Zugabe von 20 µl Monochlorobimane (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt) zur späteren Detektion derivatisiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde zu den Proben 260 µl 10 %-ige Essigsäure gegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12000 Upm (Tischzentrifuge 5415 R Eppendorf, Hamburg). Für die Analyse wurden jeweils 50 µl des Überstands in ein 1 ml-*HPLC-Vial* überführt.

Die in den Proben enthaltenen Glutathion-Monochlorobimane-Derivate wurden mit einer Supelcosil LC-18-Säule (Supelco, Bad Homburg) an dem *HPLC*-System der LC-10A-Serie (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) aufgetrennt (siehe Tab. 2.6). Die Flussgeschwindigkeit des Laufmittelgradienten betrug dabei 1 ml/min. Bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm erfolgte die Detektion der Glutathion-Monochlorobimane-Derivate mit einer Fluoreszenzemission bei 480 nm mit dem SPD-10AV-Fluoreszenzdetektor (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg). Mit der *Software* Shimadzu *Class-VP 5.0* (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) wurden die Chromatogramme aufgezeichnet und die Retentionszeit sowie die detektierte Fläche ausgewertet. Die Eichung der *HPLC* und die Quantifizierung der für die Kalkulation benötigten Referenzwerte wurden anhand geeigneter Glutathion-Standards vorgenommen. Die ursprünglich in der Probe enthaltenen GSH-Konzentrationen wurden indirekt nach der Gleichung  $GSH = GSX - 2 \times GSSG$  berechnet.

**Tab. 2.6: HPLC-Laufeinstellungen**

Zeit (min)	Laufpuffer B (%)
0,0	0 (Start)
18,0	20
23,0	100
30,0	100
32,0	0
40,0	0
40,0	0 (Stopp)

Laufpuffer A: Methanol 10 %  
Essigsäure 0,25 %  
pH 4,3 (KOH)

Laufpuffer B: Methanol 90 %  
Essigsäure 0,25 %  
pH 3,9 (KOH)

Für die Laufpuffer wurden Komponenten mit einer Reinheit > 99% (HPLC) verwendet.

## 2.5 Physiologische Methoden

### 2.5.1 Chlorophyllfluoreszenzmessungen mittels Fluorimeter *PAM-101*

Die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz-Emission wurden zur Einordnung der photosynthetischen Lichtnutzung von Pflanzen durchgeführt und erfolgten nach dem Puls-Amplituden-Modulationsprinzip in Anlehnung an SCHREIBER *et al.*, (1986). Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen fanden nach 3 h in der Lichtphase statt, um diurnale Schwankungen auszuschließen.

#### 2.5.1.1 Experimentelles Setup

Die Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz-Emission am PSII erfolgte mit dem Fluorometer *PAM-101* mit integriertem *PAM-103 (flash trigger control)*; Heinz Walz GmbH, Effeltrich). Durch eine LED in der Emittor-Detektor-Einheit 101 ED (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) wurden kurze Messlichtimpulse ( $ML - \lambda = 650 \text{ nm}$ ) von  $1 \mu\text{s}$  bei einer Modulation von 1,6 kHz bzw. 100 kHz abgestrahlt. Der Messlichtimpuls wurde am *PAM-101* auf eine Intensität von  $12 (0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1})$  festgelegt. Zwischen den Lichtpulsen wurde im Detektor-Teil der Emittor-Detektor-Einheit *101 ED* (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) die jeweilige Fluoreszenzemission bei  $\lambda > 700 \text{ nm}$  gemessen. Die Trennung des Messlichts vom aktinischen Licht (AL - photosynthetisch nutzbares Licht)

macht es möglich, die Chlorophyllfluoreszenz-Emission unter verschiedenen Lichtintensitäten zu messen. Emittiert wurde das aktinische Licht von der Halogenlampe *KL 1500* (Schott, Hochheim). Die Lichtpulse mit einer Intensität bis zu  $5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurden durch eine Lichtquelle *FL-103* (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) abgegeben. Die Datenaufzeichnung der Chlorophyllfluoreszenz-Emission über *WinControl Software* (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) erfolgte mit dem *PAM-data acquisition-System* (*PDA-100*, Heinz Walz GmbH, Effeltrich), wobei die Verstärkung (*gain*) des aufgenommenen Signals am *PAM-101*, nach voriger Optimierung, auf 12 und die Dämpfung (*damping*) auf 11 festgelegt wurde.

### 2.5.1.2 Bestimmung der Parameter zur photosynthetischen Lichtnutzung

Die Pflanzen wurden vor jeder Messung 15-30 min im Dunkeln gehalten bevor an Blattscheiben ( $1,33 \text{ cm}^2$ ) die Messung der Chlorophyllfluoreszenz-Emission erfolgte, wobei alle 0,02 s ein Datenpunkt aufgezeichnet wurde. Innerhalb der Messung wurde zunächst an der dunkel-adaptierten Blattscheibe die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) im Messlicht und die maximale Fluoreszenz ( $F_M$ ) durch einen Sättigungspuls (SP; 1 s bei ca.  $5000 \mu\text{E}$ ) bestimmt. Anschließend folgte eine kurze Dunkelphase (ca. 10 s), um die Re-Oxidation von P680 zu ermöglichen. Weiterhin wurde die Blattscheibe 15 min mit aktinischem Licht ( $120 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und zusätzlich in 30 s-Intervallen mit SPs bestrahlt (siehe Abb. 2.1).

Anhand der aufgezeichneten Chlorophyllfluoreszenz-Emission wurden in Anlehnung an SCHREIBER *et al.* (1986), WALKER (1988) und GENTY *et al.* (1989) Parameter zur Einordnung der photosynthetischen Lichtnutzung bestimmt bzw. berechnet, wobei die Nomenklatur nach VAN KOOTEN & SNEL (1990) erfolgte. Hierbei wurden zunächst die Parameter  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F$  (*steady-state* Fluoreszenz im aktinischem Licht),  $F_0'$  (Grundfluoreszenz im Licht-adaptierten Zustand) und  $F_M'$  (maximale Fluoreszenz im Licht-adaptierten Zustand) abgeleitet (siehe Abb. 2.1). Aus diesen Parametern wurde anhand der unten angegebenen Formeln  $\Phi_{II}$  (Quantenausbeute am PSII),  $qP$  (*photochemical quenching*, photochemische Fluoreszenzlöschung), NPQ bzw.  $pNP$  (*non-photochemical quenching*, nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung), ETR (Elektronentransportrate) sowie  $F_V/F_M$ , (Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz) berechnet:



$$\Phi_{II} = \frac{F_M' - F}{F_M'}$$

$$NPQ = \frac{F_M - F_M'}{F_M}$$

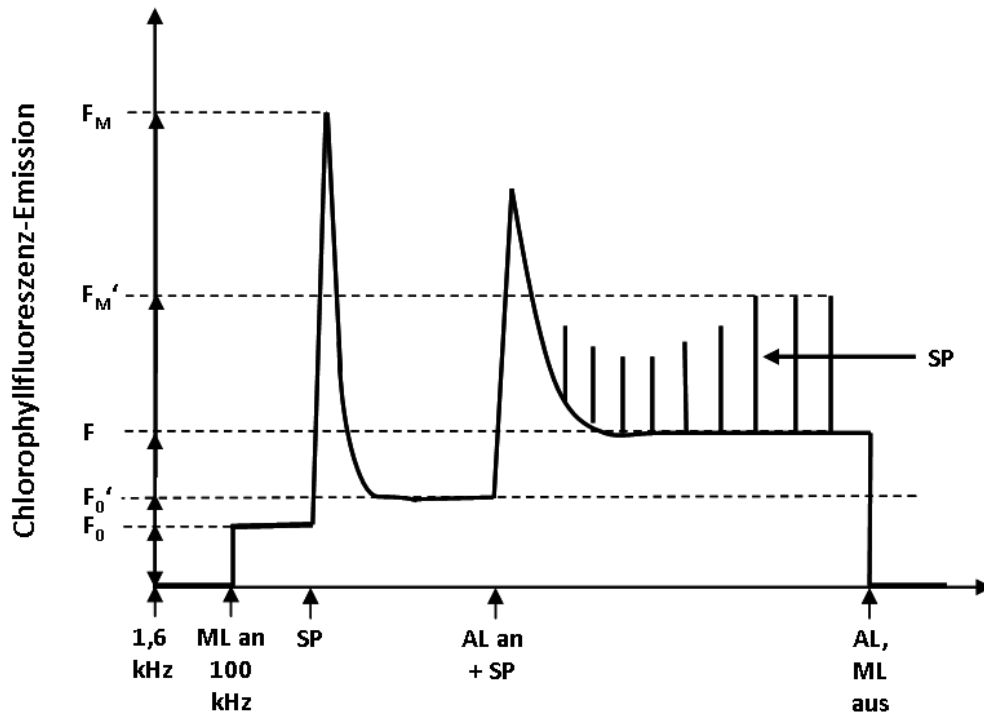
$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$$

$$qP = \frac{F_M' - F}{F_M' - F_0'}$$

$$qNP = \frac{F_M - F_M'}{F_M - F_0'}$$

$$ETR = \frac{F_M' - F}{F_M'} * LI * 0,5$$

LI = Betrag der anliegenden Lichtintensität in  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer typischen Chlorophyllfluoreszenz-Messung.** Neben der Messkurve sind an der x-Achse die variierenden Einstellungen während der Messung und an der y-Achse die zu bestimmenden Parameter für die Auswertung (siehe Kap. 2.5.1.2) angegeben.

## 2.5.2 Messungen mit dem *portable photosynthesis*-System LI-6400XT

Die in den folgenden Kapiteln beschriebene Methodik befasst sich mit dem Prinzip der  $\text{CO}_2$ -Gaswechselfmessungen und beschreibt die variablen Parameter für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche. Die Bedienung des hierbei verwendeten Systems sowie allgemeine Parameter und Anwendungen sind, soweit im Rahmen dieses Kapitels nicht aufgeführt, der Bedienungsanleitung des Herstellers (LI-6400 *Instruction Manual*, Version 6; [ftp://ftp.licor.com/perm/env/LI-6400/Manual/Using\\_the\\_LI-6400XT-v6.1.pdf](ftp://ftp.licor.com/perm/env/LI-6400/Manual/Using_the_LI-6400XT-v6.1.pdf)) zu entnehmen.

### 2.5.2.1 Experimentelles Setup

Für die Messungen an *A. thaliana* wurde das *portable photosynthesis*-System LI-6400XT (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) verwendet. Zusätzliche für das LI-6400XT *portable photosynthesis*-System spezifische Geräte und Applikationen wurden ebenfalls von der Firma LI-COR Biosciences bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

Bei dem *portable photosynthesis*-System LI-6400XT handelt es sich um ein offenes Gaswechselsystem. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde dem aufgenommenen Gasgemisch zunächst CO<sub>2</sub> mittels Natronkalk (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) entzogen und über getrocknetes CaSO<sub>4</sub> (Drierite, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) die relative Luftfeuchtigkeit reguliert. Mittels des 6400-01 CO<sub>2</sub>-Mixers wurden über einen 12 g-CO<sub>2</sub>-Zylinder (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) dem nun CO<sub>2</sub>-freien Gasgemisch kontrolliert CO<sub>2</sub> zugeführt und in die Messküvette mit der Blattprobe gepumpt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche an *A. thaliana* wurde die Gaswechsel-Küvette 6400-40 *leaf chamber fluorometer* verwendet. Diese Gaswechsel-Küvette dient hierbei zusätzlich als Lichtquelle und als Fluorometer. Die Messungen der CO<sub>2</sub>- sowie der H<sub>2</sub>O-Konzentration im Gasgemisch erfolgte über Infrarot-Gasanalytoren (IRGA). Dabei wurde ein Teil des anliegenden Gasgemischs über die Messküvette mit dem eingespannten Blatt geleitet und die CO<sub>2</sub>- sowie H<sub>2</sub>O-Konzentrationen als *Sample*-Werte ([CO<sub>2</sub>S] bzw. [H<sub>2</sub>OS]) von einem IRGA direkt hinter der Messküvette aufgezeichnet. Ein Teil des Gasgemischs wurde an der Messküvette vorbei geleitet und von einem zweiten IRGA analysiert, um die Referenz-Werte der CO<sub>2</sub>- sowie H<sub>2</sub>O-Konzentrationen ([CO<sub>2</sub>R] bzw. [H<sub>2</sub>OR]) zu bestimmen. Während der Messungen erfolgte vor jeder Aufnahme eines Datenpunkts ein Abgleich der IRGAs über den *match-mode*. Die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate bzw. Photosyntheserate (A) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$A = \frac{u * ([CO_2R] - [CO_2S])}{S} - E * [CO_2S]$$

Hierbei wurde die Flussrate (u) direkt über ein *flow-meter* bestimmt. Die Blattfläche (S) wurde über die Größe der Messküvette abgeleitet und die Transpirationsrate (E) über folgende Gleichung bestimmt:

$$E = \frac{u * ([H_2OS] - [H_2OR])}{S * (1 - [H_2OS])}$$

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Photosyntheseraten wurden zuvor Stabilitätskriterien festgelegt. Die Stabilitätskriterien beschreiben einen Bereich, in dem die aufgenommenen Parameter stabil sind und somit die Aufnahme eines Datenpunkts erlauben. Hierfür wurde ein Bemessenszeitraum von 15 s gesetzt, in welchem  $[\text{CO}_2\text{S}]$  und  $[\text{H}_2\text{OS}]$  keiner höheren Schwankung als  $1 \mu\text{mol mol}^{-1}$  unterliegen und Abweichungen in der Flussrate nicht mehr als  $1 \text{ mol s}^{-1}$  betragen durften.

Das *portable photosynthesis*-System LI-6400XT wurde über die für das System spezifische *Software OPEN* (Version 5, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) gesteuert. Die Datenaufzeichnung wurde automatisiert über die *OPEN Software* durchgeführt, wobei neben den über die System-Sensoren direkt gemessenen Parameter (z.B.  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen, Temperatur oder Lichtintensität) auch die Kalkulation der zu berechnenden Parameter (z.B. Photosyntheserate, Blattleitfähigkeit oder Transpirationsrate) automatisch erfolgte. Die entsprechenden Formeln, soweit hier nicht angegeben, sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

### 2.5.2.2 Lichtsättigungskurven und Chlorophyllfluoreszenzmessungen

Die Lichtsättigungskurven mit der simultanen Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz-Emission wurden unter den in Kap. 2.5.1 beschriebenen Voraussetzungen durchgeführt. Hierbei wurde die jeweilige Photosyntheserate in Abhängigkeit zur anliegenden Lichtintensität bestimmt. Mittels der Gaswechsel-Küvette *6400-40 leaf chamber*-Fluorometer wurde zusätzlich die Chlorophyllfluoreszenz-Emission nach dem Puls-Amplituden-Modulationsprinzip aufgezeichnet (siehe Kap. 2.5.1) und nach dem in Kap. 2.5.1.2 dargestellten System direkt über die *OPEN Software* ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden „schnelle“ Lichtsättigungskurven erstellt, um die minimale sowie maximale Photosyntheserate in Abhängigkeit zur Lichtintensität bestimmen zu können. Hierbei wurde in kurzen Abständen von hohen zu niedrigen Lichtintensitäten gemessen. Auf diese Weise sollte das natürliche Schließen der Stomata unter niedrigen Lichtintensitäten vermieden werden. Jede Lichtintensität wurde höchstens für 2 min angelegt. Die Photosyntheserate bei der jeweils anliegenden Lichtintensität wurde frühestens nach 1 min und spätestens nach 2 min, abhängig von der Erfüllung der Stabilitätskriterien, aufgezeichnet. Innerhalb der Messung über ein zuvor erstelltes Autoprogramm wurde die Pflanze zunächst für 15 min im Dunkeln gehalten, um  $F_0$  und  $F_M$  im dunkeladaptierten Blatt zu bestimmen. Nach der Dunkelinkubation wurde in großen Schritten die Lichtintensität bis auf  $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  erhöht und folgend in kleinen Schritten verringert (siehe

Lichtsättigungskurven-Autoprogramm). Für die Auswertung wurden die Daten herangezogen, die zwischen 2000 und  $0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufgenommen wurden. Während der Messung wurden die zur Anzucht identischen Bedingungen ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 55 % Luftfeuchtigkeit; 21 %  $\text{O}_2$ ; 0,04 %  $\text{CO}_2$ ) konstant gehalten.

<u>Lichtsättigungskurve-Autoprogramm:</u>	0 min - 15 min	$0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	15 min - 20 min	$500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	20 min - 22 min	$1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	22 min - 24 min	$2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	24 min - 26 min	$1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	26 min - 28 min	$500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	28 min - 30 min	$250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	30 min - 32 min	$120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	32 min - 34 min	$60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	34 min - 36 min	$30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	36 min - 38 min	$15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	38 min - 40 min	$0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

### 2.5.2.3 A/C<sub>i</sub>-Kurven

Die Erstellung von A/C<sub>i</sub>-Kurven wurde unter den in Kap. 2.5.2.1 beschriebenen Voraussetzungen durchgeführt. Hierbei wurde die Photosyntheserate in Abhängigkeit von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im substomatären Raum ( $C_i$ ) bestimmt.  $C_i$  ist eine berechnete Größe und wurde über folgende Gleichung bestimmt:

$$C_i = \frac{\left(g_{tw} - \frac{E}{2}\right) * [\text{CO}_2 S] - A}{g_{tw} + \frac{E}{2}}$$

Dabei ist  $C_i$  u.a. vom Öffnungszustand der Stomata abhängig, welcher über die  $\text{H}_2\text{O}$ -Blattleitfähigkeit ( $g_{tw}$ ) angezeigt und mittels folgender Formel berechnet wurde:

$$g_{tw} = \frac{E}{[\text{H}_2\text{O}_{ST}] - [\text{H}_2\text{O}_S]}$$

Es kann davon ausgegangen werden, dass die  $\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration im substomatären Raum  $[\text{H}_2\text{O}_{ST}]$  gesättigt und somit ausschließlich von der Temperatur und dem Druck abhängig ist. Mit dieser Annahme erfolgte die Berechnung von  $[\text{H}_2\text{O}_{ST}]$  über folgende Gleichung:

$$H_2O_{ST} = \frac{e_{sat}(T)}{P}$$

Hierbei ist  $e_{sat}(T)$  die Konstante für den Dampfdruck in Abhängigkeit zur anliegenden Temperatur und P der anliegende Druck.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden „schnelle“  $A/C_i$ -Kurven erstellt, um ein Schließen der Stomata bei hohem  $C_i$  oder eine Inaktivierung der RubisCO bei geringem  $C_i$  zu vermeiden. Um unterschiedliche  $C_0$ - und somit auch  $C_i$ -Konzentrationen zu erreichen, wurde  $[CO_2R]$  innerhalb eines Autoprogramms alle 3 min geändert, wobei zunächst geringe und zum Ende der Messung ansteigende Konzentrationen angelegt wurden (siehe  $A/C_i$ -Kurve-Autoprogramm). Die Photosyntheserate bei der jeweils anliegenden  $[CO_2R]$  wurde frühestens nach 2 min und spätestens nach 3 min, abhängig von der Erfüllung der Stabilitätskriterien, aufgezeichnet. Während der Messung wurden die bei einer SL-Behandlung herrschenden Bedingungen konstant gehalten ( $800 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ;  $20 \text{ }^\circ C$ , 55 % Luftfeuchtigkeit; 21 %  $O_2$ ).

<u><math>A/C_i</math>-Kurve-Autoprogramm:</u>	0 min - 3 min	$[CO_2R] = 400 \mu mol mol^{-1}$
	3 min - 6 min	$[CO_2R] = 300 \mu mol mol^{-1}$
	6 min - 9 min	$[CO_2R] = 200 \mu mol mol^{-1}$
	9 min - 12 min	$[CO_2R] = 100 \mu mol mol^{-1}$
	12 min - 15 min	$[CO_2R] = 50 \mu mol mol^{-1}$
	15 min - 18 min	$[CO_2R] = 200 \mu mol mol^{-1}$
	18 min - 21 min	$[CO_2R] = 400 \mu mol mol^{-1}$
	21 min - 24 min	$[CO_2R] = 500 \mu mol mol^{-1}$
	24 min - 27 min	$[CO_2R] = 600 \mu mol mol^{-1}$
	27 min - 30 min	$[CO_2R] = 700 \mu mol mol^{-1}$
	30 min - 33 min	$[CO_2R] = 800 \mu mol mol^{-1}$
	33 min - 36 min	$[CO_2R] = 900 \mu mol mol^{-1}$
	36 min - 39 min	$[CO_2R] = 1000 \mu mol mol^{-1}$
	39 min - 42 min	$[CO_2R] = 1200 \mu mol mol^{-1}$

Direkt im Anschluss an die Erstellung einer  $A/C_i$ -Kurve unter den oben beschriebenen Bedingungen wurde am gleichen Blatt eine zweite  $A/C_i$ -Kurve nach dem gleichen Prinzip gemessen. Hierbei wurde unter Verwendung von  $N_2$  anstatt der Umgebungsluft als Gasgemisch eine  $O_2$ -freie Atmosphäre in der Messküvette geschaffen. Lichtintensität, Temperatur und Luftfeuchtigkeit entsprachen den Bedingungen einer SL-Behandlung und wurden während der Messung konstant gehalten ( $800 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ;  $20 \text{ }^\circ C$ , 55 % Luftfeuchtigkeit). Die Messungen unter  $O_2$ -freier Atmosphäre wurden durchgeführt, um die maximale RubisCO-Verbrauchsrate zu bestimmen und den Parameter  $A_{PR}$  zu berechnen (siehe Kap. 2.5.2.4).

#### 2.5.2.4 Berechnung des Parameters $A_{PR}$

Der Parameter  $A_{PR}$  wurde im Rahmen dieser Arbeit eingeführt, um den apparenten prozentualen Anteil der Photorespiration an der maximalen RubisCO-Verbrauchsrate zu bestimmen. Hierfür wurden  $A/C_i$ -Kurven bei 21 %  $O_2$  im Referenzgas und in  $O_2$ -freier Atmosphäre erstellt (siehe Kap. 2.5.2.1). Die Berechnung von  $A_{PR}$  erfolgte für die jeweiligen  $C_i$ -Werte nach folgender Gleichung:

$$A_{PR}(C_i) = \frac{A_N - A_O}{A_O} * 100$$

Hierbei steht  $A_N$  für die Photosyntheserate in  $O_2$ -freier Atmosphäre und  $A_O$  für die Photosyntheserate bei 21 %  $O_2$  im Referenzgas.

### 2.5.3 Nachweis von ROS in Protoplasten

#### 2.5.3.1 Protoplastenisolierung aus *A. thaliana*

Die Isolierung von Mesophyll-Protoplasten nach SEIDEL *et al.*, (2004) erfolgte aus WT- bzw. *ko*-Pflanzen, welche für ca. 8 Wochen unter Kurztagbedingungen bei  $120 \mu E m^{-2} s^{-1}$  angezogen wurden. Zunächst wurden die Blätter mit einer scharfen Rasierklinge abgeschnitten und mit der Blattunterseite nach oben gerichtet in eine Petrischale aus Glas gelegt, welche vorher mit destilliertem Wasser befüllt wurde. Während das Blatt mit zwei Fingern unter Wasser fixiert wurde, konnte die Epidermis von der unteren Ecke her mit einer feinen, flachen Pinzette entfernt werden. Die epidermislosen Bereiche wurden mit der Rasierklinge abgetrennt und mit Hilfe eines weichen Pinsels mit der epidermislosen Blattunterseite nach unten gerichtet in eine neue Petrischale aus Glas ( $\varnothing$  ca. 94 mm) überführt, welche Lösung A ohne Enzymzusatz enthielt. Nachdem die Fläche der Petrischale mit Blattmaterial bedeckt war, wurde die Lösung A ohne Enzyme vorsichtig entfernt und durch Lösung A mit darin enthaltenen Enzymen ersetzt. In diesem Puffer wurden die Blattabschnitte für etwa 40 min in einem 24 °C warmen Wasserbad bei ca. 30 Upm geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Petrischale vorsichtig geschwenkt, um die Protoplasten aus den Blättern zu lösen. Der Puffer mit den darin enthaltenen Protoplasten wurde anschließend durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 100  $\mu m$  filtriert. Durch Zugabe von Lösung A ohne Enzyme und leichtes Schwenken wurden die Blattabschnitte so häufig gewaschen bis sich der Großteil der Protoplasten gelöst hatte. Das gesamte Filtrat wurde in 50 ml-Greinererörchen (Greiner Bio-One,

Essen) überführt und 3 min lang bei Raumtemperatur und 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig, ohne es aufzuwirbeln, mit 10 ml W5-Puffer gewaschen und erneut für 3 min bei Raumtemperatur und 100 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 6 ml W5-Puffer resuspendiert und in Greinerröhrchen (Greiner Bio-One, Essen) zur weiteren Behandlung in 6 1 ml-Anteile aliquotiert.

<u>Lösung A:</u>	Mannitol	0,4 M
	KCl	20 mM
	MES, pH 5,7	20 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	BSA	0,1 % (w/v)
	Cellulase R10 (Serva)	1,5 %
	Macerozyme R10 (Serva)	0,4 %
	anschließend durch 0,45-µm-Filter filtrieren.	

<u>W5-Puffer:</u>	NaCl	154 mM
	CaCl <sub>2</sub>	125 mM
	KCl	5 mM
	MES, pH 5,7	2 mM
	Glucose	5 mM

### 2.5.3.2 Visualisierung von ROS

Nach der entsprechenden Behandlung wurden die aliquoten Anteile der Protoplastensuspension mit 0,1 µM des membrandurchlässigen Färbemittels 5 (und 6)-Chloromethyl-2',7-dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA) versetzt und 15 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das CM-H<sub>2</sub>DCF-DA-Reagenz, welches fluoresziert, wenn es durch ROS oxidiert wird, wurde von *Molecular Probes* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) bezogen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für 3 min bei Raumtemperatur und 100 g zentrifugiert, 3-4 mal mit W5-Puffer (siehe Kap. 2.5.3.1) gewaschen und schließlich in ca. 500 µl W5-Puffer resuspendiert. Die bildliche Darstellung der Protoplasten erfolgte durch ein konfokales *laser scanning*-Mikroskopsystem (LSM 510 META; Zeiss, Göttingen) mit einem 20 x *EC Plan Neofluor* (N.A. 1.3) Öl Objektiv. CM-H<sub>2</sub>DCF-DA-Fluoreszenz bzw. Autofluoreszenz des Chlorophylls wurde nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm und durch Emission von Licht der Wellenlänge 500-530 nm (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA-Fluoreszenz) bzw. 650-710 nm (Chlorophyll) visualisiert. Um standardisierte Bedingungen zu schaffen, wurden alle Bilder unter Verwendung derselben Parameter gescannt.

#### **2.5.4 Bestimmung des Wassergehalts in Pflanzen**

Durch Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse der Arabidopsis-Blätter konnte der durchschnittliche Wassergehalt (% H<sub>2</sub>O) berechnet werden. Als Bezugsgröße wurde die Frischmasse (Blätter im Zustand der Vollturgescenz) verwendet. Die Proben wurden jeweils von 6 verschiedenen WT- und 6 verschiedenen *ko*-Pflanzen entnommen und zu gleichen Mengen bei Raumtemperatur abgewogen (jeweils 2 g Frischgewicht). Anschließend wurden die Proben für 3,5 h bei 70 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben erneut gewogen, um die Trockenmasse zu bestimmen. Aus diesen Daten wurde der Wassergehalt, bezogen auf die Frischmasse, errechnet.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Nutzung von *nadp-mdh*-Mutanten zur Untersuchung alternativer Strategien zur Elektronenverteilung

Um Informationen über die physiologische Bedeutung der NADP-MDH und anderer redoxaktiver Komponenten zu erhalten, war die Charakterisierung von NADP-MDH-*ko*-Pflanzen (im Folgenden *nadp-mdh* genannt) ein weiterer wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Die *nadp-mdh*-Linie Salk 012655 (interne Bezeichnung Salk 50) konnte bereits von Beril Becker im Rahmen ihrer Doktorarbeit (BECKER, 2005) identifiziert werden. Zusätzlich wurde jedoch eine zweite, unabhängige *ko*-Linie benötigt, um ausschließen zu können, dass phänotypische bzw. physiologische Veränderungen auf eine weitere Fremd-DNA-Insertion zurückzuführen sind.

#### 3.1.1 Molekulare Charakterisierung zweier unabhängiger homozygoter *nadp-mdh*-Mutanten

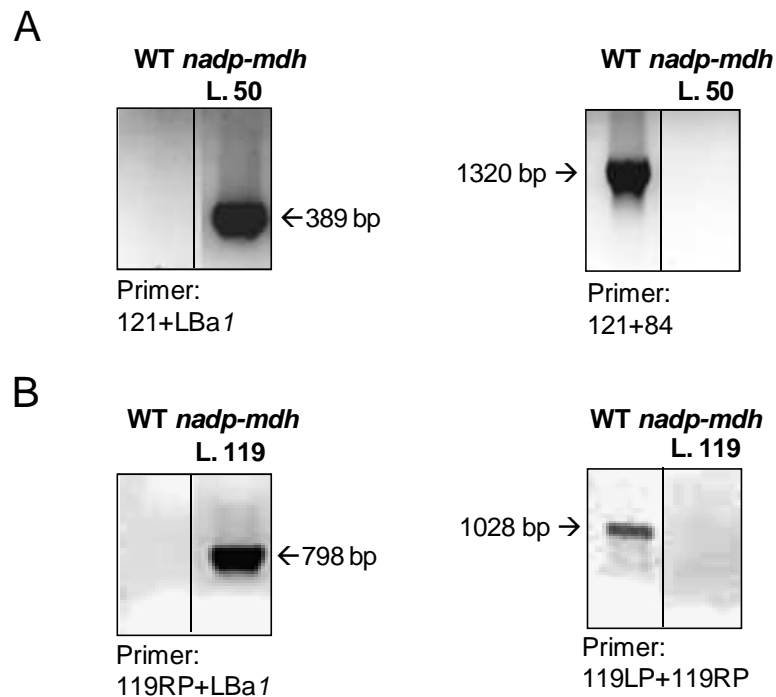
Eine Insertion von Fremd-DNA innerhalb eines Gens kann zum Verlust der Kontinuität des Gens und damit zu einer Mutation führen. Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Herstellung von *ko*-Pflanzen. Bei den hier verwendeten Linien wurde T-DNA durch Transformation des Ti-Plasmids aus *A. tumefaciens* in das pflanzliche Genom inseriert (ZAMBRYSKI, 1992). Da die Insertion der Fremd-DNA in das pflanzliche Genom zufällig erfolgt, mussten *ko*-Linien, die beim *Arabidopsis Biological Resource Stock Center* (Ohio, USA) bestellt wurden, zunächst auf Homozygotie bezüglich der Fremd-DNA-Insertion überprüft werden. Außerdem musste mittels Expressionsanalysen ausgeschlossen werden, dass es in den Mutanten dennoch zur Expression der *NADP-MDH* kommt. Zusätzlich zur bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen *nadp-mdh*-Linie 50 wurde eine weitere Linie namens Salk 063444 (interne Bezeichnung Linie 119) bestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Linien bezüglich ihrer Homozygotie und dem Fehlen des NADP-MDH-Enzyms überprüft. Im Folgenden werden die *ko*-Screenings beider Linien dargestellt.

### 3.1.1.1 Nachweis der Homozygotie von *nadp-mdh*-Mutanten mittels PCR

Um Homozygotie der Fremd- bzw. T-DNA-Insertion im Gen der NADP-MDH beider *ko*-Pflanzen-Linien festzustellen, wurden PCR-Analysen (siehe Kap. 2.3.5) mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt. Als Matrize diente dabei genomische DNA aus Blättern der einzelnen Pflanzen. Da *A. thaliana* diploid ist, musste untersucht werden, ob in beiden Chromosomen eine Insertion der Fremd-DNA in das entsprechende Gen stattgefunden hat. Heterozygote Pflanzen mit einer Insertion auf nur einem Chromosom besitzen auf dem zweiten Chromosom ein intaktes Gen und sind daher für *ko*-Studien ungeeignet. Allerdings könnten durch Selbstung der heterozygoten T<sub>1</sub>-Generation homozygote Pflanzen in der T<sub>2</sub>-Generation erzeugt werden. Für einen Nachweis der Fremd-DNA-Insertion mittels PCR-Analyse wurde zunächst eine Primerkombination gewählt, bei der ein Primer an einem Bereich der Fremd-DNA und ein anderer an einem Bereich der genomischen DNA bindet. Bei der Amplifikation eines DNA-Fragments mit dieser Primerkombination konnte zumindest von einer Heterozygotie ausgegangen werden. Dementsprechend durfte bei der DNA der WT-Pflanzen, die hier der Kontrolle dienten, keine Amplifikation eines Fragments erfolgen. Um nun nachzuweisen, dass die entsprechende Insertion in beide Chromosomen stattgefunden hat, wurden zwei genspezifische Primer für eine PCR eingesetzt, wobei die Fremd-DNA-Insertion zwischen diesen beiden Primern vermutet wurde. Durch eine inserierte Fremd-DNA-Sequenz, von ca. 5000 bp Länge, wäre das entsprechende DNA-Fragment zu lang, um durch die Polymerase amplifiziert zu werden, so dass kein Produkt gebildet werden kann. Als Kontrolle diente genomische DNA einer WT-Pflanze, auf der mit dieser Primerkombination ein Produkt amplifiziert werden sollte.

In Abb. 3.1.1 sind die Ergebnisse der PCR-Analysen homozygoter *nadp-mdh*-Mutanten der Linie 50 und der Linie 119 dargestellt. Insgesamt wurden jeweils 20 Pflanzen getestet. Exemplarisch wurden hier ausschließlich die Ergebnisse der homozygoten *ko*-Pflanzen dargestellt, mit deren Nachkommen auch im Folgenden gearbeitet wurde. Für beide Linien wurde der T-DNA-spezifische Primer LBa1 mit dem entsprechenden genspezifischen Primer Nr. 121 bzw. 119RP (siehe Tab. 2.4 und Abb. 3.1.2) für eine PCR kombiniert. Die hierbei amplifizierten DNA-Fragmente lassen auf eine T-DNA-Insertion schließen (siehe Abb. 3.1.1 links). Die Größe des Produkts beträgt 389 bp bei der Linie 50 und 798 bp bei der Linie 119, während mit der genomischen DNA der WT-Pflanzen kein Produkt amplifiziert werden konnte. Bei weiteren PCR-Analysen zum

Nachweis der Homozygotie konnten mit den genspezifischen Primern Nr. 84 und Nr. 121 (Linie 50) bzw. 119LP und 119RP (Linie 119) keine Produkte generiert werden. Mit der genomischen WT-DNA kam es mit beiden Primerkombinationen zur Amplifikation eines Produkts in der erwarteten Größe von 1320 bp bzw. 1028 bp (siehe Abb. 3.1.1 rechts). Bei beiden Individuen ist demnach die T-DNA-Insertion homozygot erfolgt.

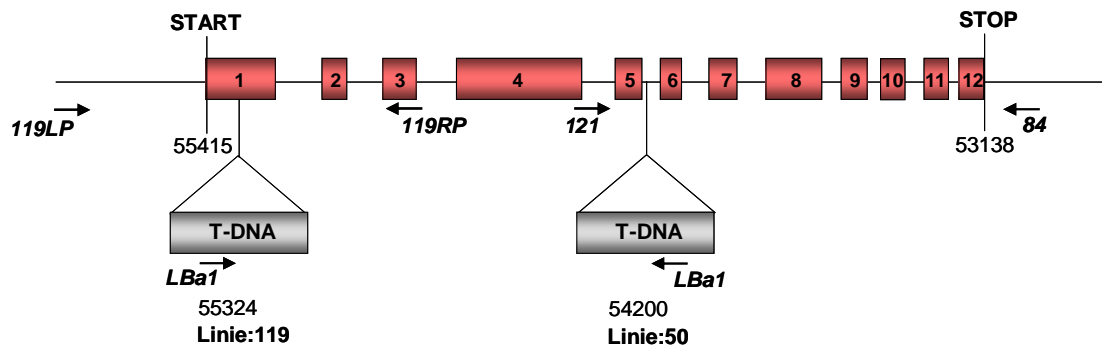


**Abb. 3.1.1: Agarosegelelektrophorese als Ergebnis einer PCR-Analyse zur Überprüfung der T-DNA-Insertion im Gen der *NADP-MDH*.** PCR-Analyse mit genomischer DNA von WT-Pflanzen und homozygoten *nadp-mdh*-Mutanten der Linie 50 (A) und der Linie 119 (B). Die verwendeten Primerkombinationen sind jeweils angegeben: gen- und T-DNA-spezifische Primer (links) bzw. zwei genspezifische Primer (rechts).

### 3.1.1.2 Sequenzanalysen zur Lokalisation der inserierten Fremd-DNA

Zur genauen Lokalisation der inserierten Fremd-DNA wurden die Produkte der PCR-Analyse mit den T-DNA- und genspezifischen Primern, welche für den entsprechenden Insertionsnachweis verwendet wurden, aus dem Gel extrahiert und einer Sequenzanalyse unterzogen (siehe Kap. 2.3.12 und 2.3.9). In Abb. 3.1.2 wird jeweils die Position der T-DNA in den Linien 50 und 119 im NADP-MDH-kodierenden Gen als Ergebnis der Sequenzanalyse schematisch dargestellt. Sie zeigt das Gen At5g58330 mit den 12 Exons, die Lage der T-DNA in beiden Linien und die Positionen der verwendeten Primer, welche als Pfeile dargestellt sind. Die T-DNA ist bei der Linie 50

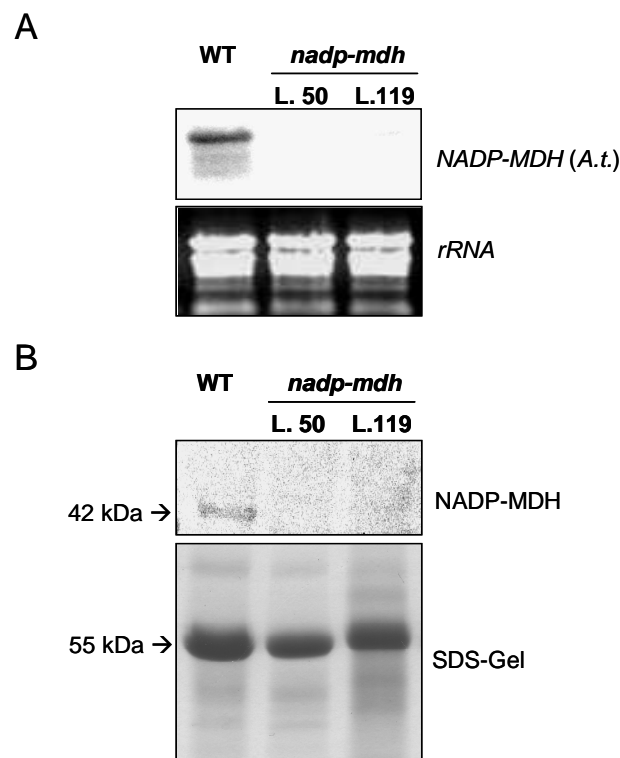
zwischen dem fünften und dem sechsten Exon und bei der Linie 119 im ersten Exon inseriert. Es ist hier darauf hinzuweisen, dass auch eine Insertion der T-DNA in Intronbereiche zum Verlust der Genkontinuität führen kann, was durch Genexpressionsanalysen verifiziert wurde.



**Abb. 3.1.2: Schematische Darstellung der T-DNA-Lokalisation im *NADP-MDH* (*A.t.*)-Gen (*At5g58330*) der beiden *nadp-mdh-ko*-Linien 50 und 119 als Ergebnis von Sequenzanalysen.** Die Insertion der Linie 50 befindet sich im fünften Intron, während die Insertion der Linie 119 im ersten Exon lokalisiert ist. Gen- und T-DNA-spezifische Primer, welche für die PCR-Analysen verwendet wurden, sind als Pfeile, Exons rot und T-DNAs grau dargestellt.

### 3.1.1.3 Nachweis der Homozygotie von *nadp-mdh*-Mutanten mittels Expressionsanalysen

Die Mutanten der Linien 50 und 119, die mittels PCR-Analysen als homozygot für die Insertion der T-DNA identifiziert werden konnten, wurden nun Expressionsanalysen unterzogen, um sicher zu gehen, dass diese Pflanzen keine *NADP-MDH* mehr exprimieren. Bevor das Blattmaterial für die Expressionsuntersuchungen geerntet wurde, wurden die jeweiligen Pflanzen einer 7-stündigen Starklicht-Behandlung ausgesetzt. Dies war wichtig, da das Expressionsniveau der *NADP-MDH* nach länger andauerndem Starklicht deutlich höher ist als nach entsprechendem Schwachlicht. Auf diese Weise sollte vermieden werden, dass das Fehlen einer *NADP-MDH* Expression auf „falsche“ Bedingungen anstelle eines Gendefekts zurückzuführen ist.



**Abb. 3.1.3: Expressionsanalysen zum Nachweis der fehlenden Expression der *nadp-mdh*-Mutanten der Linien 50 und 119.** **A.** *Northern-Blot*-Analyse: Oben: Autoradiogramm, unten: RNA-Gel zur Beladungskontrolle. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus Blättern von *nadp-mdh*-Pflanzen und WT-Pflanzen aufgetragen. Der *Northern-Blot* wurde mit einer *NADP-MDH (A.t.)*-spezifischen Sonde über Nacht bei 65 °C hybridisiert. **B.** *Western-Blot*-Analyse: Oben: colorimetrischer Nachweis, unten: SDS-Gel zur Beladungskontrolle. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden jeweils 40 µg Gesamt-Protein aus Blättern von *nadp-mdh*-Pflanzen und WT-Pflanzen (WT) auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde für die Immundetektion ein Antikörper gegen die *NADP-MDH* aus Erbse in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (BioRad, München) in einer Verdünnung von 1:3000. Die Detektion erfolgte mittels 4-Chloro-1-Naphthol-Färbung.

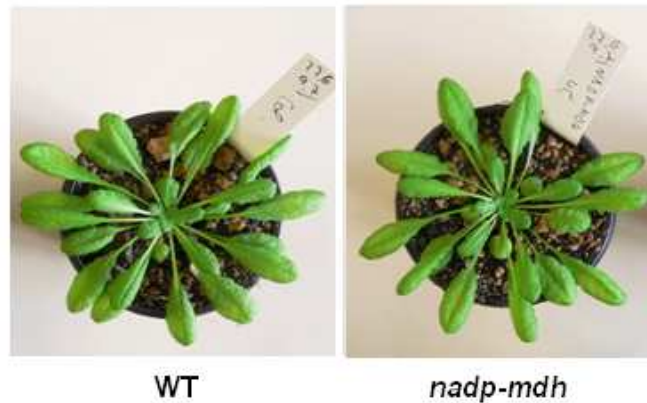
Zunächst wurden *Northern-Blot*-Analysen durchgeführt, um das Fehlen der *NADP-MDH* auf transkriptioneller Ebene nachzuweisen. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Blättern der *ko*-Pflanzen beider Linien und einer WT-Pflanze auf eine Nylonmembran transferiert (siehe Kap. 2.3.24) und mit einer radioaktiv markierten *NADP-MDH (A.t.)*-spezifischen Sonde hybridisiert (siehe Kap. 2.3.26). In Abb. 3.1.3 A ist das Autoradiogramm dargestellt. Das zugehörige RNA-Gel diente als Beladungskontrolle. Das Autoradiogramm weist eine diskrete Bande auf, welche die *NADP-MDH*-mRNA der WT-Pflanze repräsentiert. In den homozygoten *ko*-Pflanzen beider Linien konnte keine *NADP-MDH*-mRNA nachgewiesen werden. Mittels *Western-Blot*-Analyse (siehe Kap. 2.4.4) wurde auf translationaler Ebene nachgewiesen, dass eine Expression der *NADP-MDH* in den Mutanten unterbleibt. Dazu wurde Gesamtprotein aus Blättern von

*ko*-Pflanzen der Linien 50 und 119 und einer WT-Pflanze verwendet. Für die Immundetektion wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die NADP-MDH aus Erbse eingesetzt. Dieser detektiert ebenfalls das Enzym aus *A. thaliana*. Der in Abb. 3.1.3 B dargestellte *Western-Blot* weist nur bei der Probe der WT-Pflanze eine diskrete Bande in Höhe der 42 kDa-Markerbande auf. In den vermuteten *ko*-Pflanzen beider Linien in diesem Bereich konnte keine Bande nachgewiesen werden. Das dazugehörige SDS-Gel diente zur Beladungskontrolle. Zu der *Western-Blot*-Analyse wurden diese Pflanzen auch auf NADP-MDH-Aktivität geprüft. In den Pflanzen beider *ko*-Linien konnte im Gegensatz zum WT keinerlei NADP-MDH-Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Für alle folgenden Untersuchungen von *nadp-mdh*-Pflanzen wurden dementsprechend Samen der hier getesteten Pflanzen der Linien 50 oder 119 verwendet. Signifikante Ergebnisse wurden mit *ko*-Pflanzen der jeweils anderen, unabhängigen Linie verifiziert. Im weiteren Verlauf der Ergebnisdarstellung wird daher auf eine explizite Unterscheidung zwischen Mutanten der Linien 50 und 119 verzichtet.

### **3.1.2 Phänotypische und physiologische Untersuchungen der *nadp-mdh*-Mutanten**

Anomalien von *ko*-Pflanzen können indirekt Informationen über die physiologische Bedeutung des fehlenden Proteins geben. Zudem können Untersuchungen von Mutanten zu einem besseren Verständnis der Stoffwechselprozesse in Pflanzen beitragen. Für einen ersten Vergleich wurden zeitgleich *nadp-mdh*-Mutanten und zur Kontrolle WT-Pflanzen ausgesät, pikiert und unter Kontrollbedingungen (Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert. Unter diesen Anzuchtbedingungen wiesen beide Genotypen keinerlei phänotypische Unterschiede auf (siehe Abb. 3.1.4).



**Abb. 3.1.4:** Phänotyp von neun Wochen alten *nadp-mdh-ko-* und WT-Pflanzen, welche unter Kontrollbedingungen (Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen wurden.

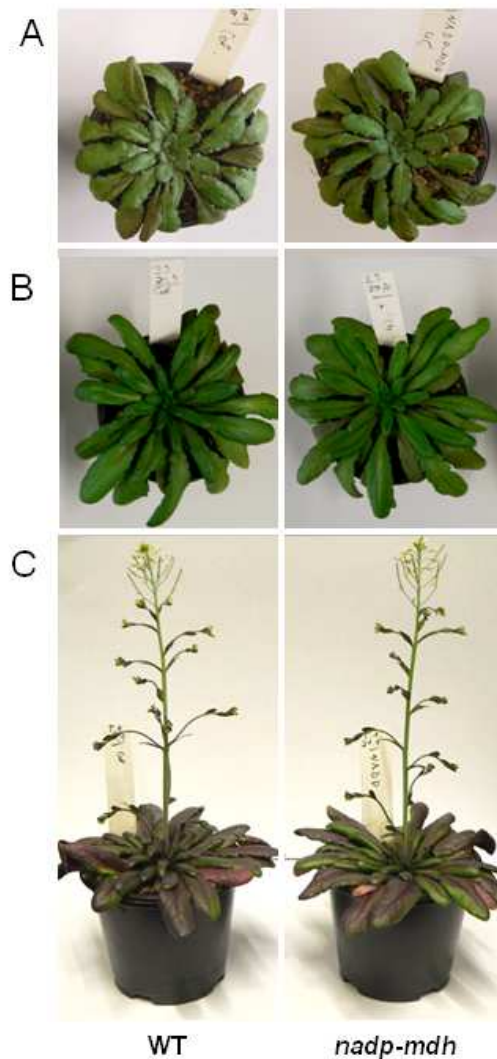
Im Folgenden wurden diese Pflanzen auf ihr spezifisches Frischgewicht, den Wassergehalt, den Chlorophyll a- und b-Gehalt sowie den Proteingehalt getestet (siehe Kap. 2.5.4, 2.4.7 und 2.4.2). Auch die Bestimmung dieser verschiedenen physiologischen Parameter ergab nahezu identische Ergebnisse für *nadp-mdh-* und WT-Pflanzen (siehe Tab. 3.1.1).

**Tab. 3.1.1:** Verschiedene physiologische Parameter von ca. neun Wochen alten *nadp-mdh-* und WT-Pflanzen, welche unter Kontrollbedingungen (Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen wurden. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  Standardabweichung).

	WT		<i>nadp-mdh</i>	
spezifisches Frischgewicht ( $\text{mg cm}^{-2}$ )	18,09	$\pm 1,14$	17,93	$\pm 1,10$
Wassergehalt (%)	92,49	$\pm 0,31$	92,11	$\pm 0,41$
Chlorophyll a-Gehalt ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	5,21	$\pm 1,34$	5,56	$\pm 1,66$
Chlorophyll b-Gehalt ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	2,10	$\pm 0,55$	2,20	$\pm 0,59$
Proteingehalt ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	157,30	$\pm 6,89$	157,18	$\pm 15,20$

Mit Hilfe des Malat-Ventils kann das chloroplastidäre ATP/NADPH-Verhältnis dem Bedarf angepasst werden, was letztendlich dem Schutz des Photosyntheseapparats dient. Die NADP-MDH katalysiert dabei die Übertragung der Elektronen von NADPH auf Oxalacetat unter Bildung von Malat. Das entstandene Malat wird im Gegentausch mit Oxalacetat ins Cytosol transportiert. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Umwelteinflüsse, wie Veränderungen im  $\text{CO}_2$ -Gehalt, erniedrigte Temperaturen und hohe Lichtintensitäten, erst zu einem Anstieg des Aktivierungsstatus der NADP-MDH und bei länger anhaltendem Stress zu einem Anstieg der Kapazität führen (SCHEIBE & STITT 1988; BECKER *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden *nadp-*

*mdh*-Mutanten und zur Kontrolle WT-Pflanzen verschiedensten Umwelt- v.a. Lichtbedingungen ausgesetzt, um eventuelle Unterschiede im Wachstumsverhalten hervorzurufen. Es wurden z.B. Anzuchtversuche unter verschiedenen Lichtintensitäten bzw. -spektren, schnell wechselnden Lichtintensitäten oder niedrigen Temperaturen durchgeführt.



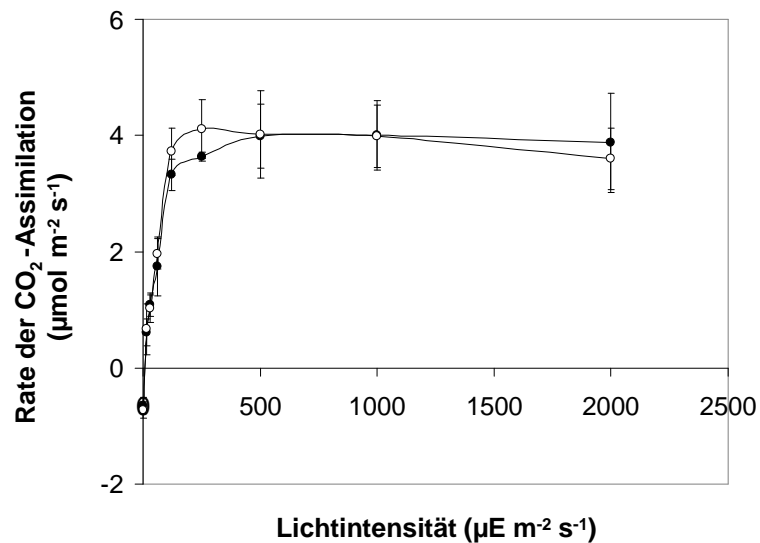
**Abb. 3.1.5: Phänotyp von *nadp-mdh-ko*- und WT-Pflanzen.** **A:** Beide Genotypen wurden neun Wochen unter Kontrollbedingungen (Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen und danach für eine Woche in Starklichtbedingungen (Kurztag;  $750\text{-}800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) transferiert. **B** und **C:** Beide Genotypen wurden direkt nach dem Pikieren unter Starklichtbedingungen angezogen (Kurztag;  $750\text{-}800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Exemplarisch sind in Abb. 3.1.5 Pflanzen beider Genotypen dargestellt, die bis zu einem Alter von neun Wochen Schwachlicht-adaptiert (Kontrollbedingungen;



Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und dann in Starklichtbedingungen (Kurztag;  $750\text{-}800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) transferiert wurden (siehe Abb. 3.1.5 A) bzw. direkt nach dem Pikieren unter Starklichtbedingungen (Kurztag;  $750\text{-}800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen wurden (siehe Abb. 3.1.5 B, C). Nach beiden Behandlungen waren keine offensichtlichen Unterschiede zu erkennen. Auch der Blühbeginn und die Entwicklung des Blütenstands schienen keinerlei Unterschiede aufzuweisen (siehe Abb. 3.1.5 C). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten noch keine Wachstumsbedingungen identifiziert werden, welche zu Anomalien der Mutanten im Vergleich zu WT-Pflanzen führten.

Mit Hilfe des Gaswechsellmessgeräts *portable photosynthesis*-System LI-6400XT (LI-COR Biosciences; Lincoln, USA) wurden Lichtkurven, wie in Kap. 2.5.2 beschrieben, an Blättern von WT- und *nadp-mdh*-Pflanzen gemessen, welche unter Kontrollbedingungen angezogen wurden. Lichtkurven zeigen eine quantitative Beziehung zwischen der Belichtungsstärke und der Netto-Photosyntheserate an. In Abb. 3.1.6 werden die Lichtsättigungskurven beider Genotypen dargestellt. Sie folgen ähnlichen Trends und erreichen identische maximale Photosyntheseraten.



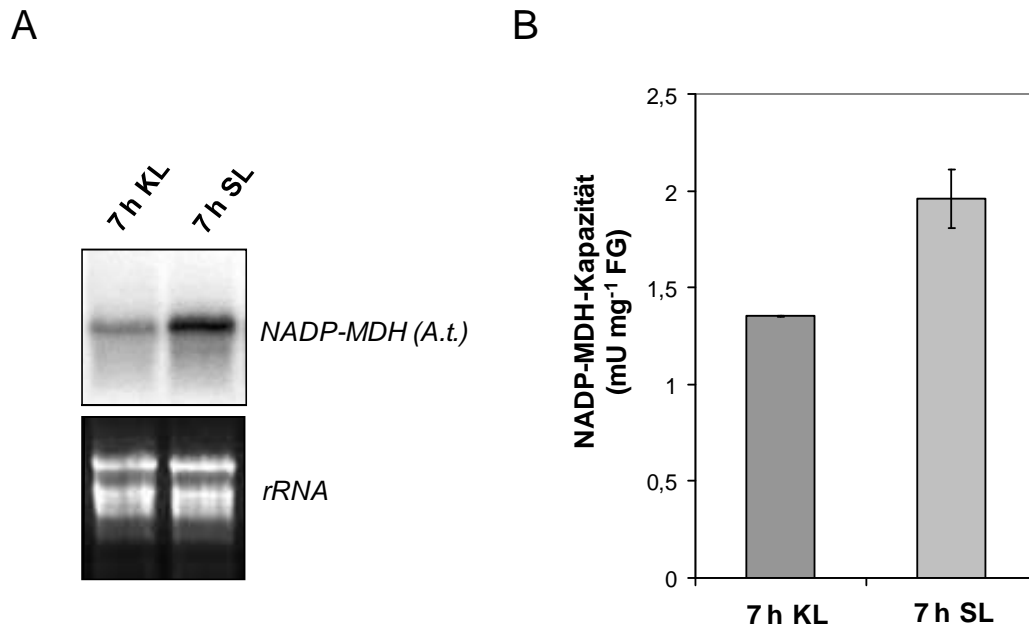
**Abb. 3.1.6: Photosynthese-Licht-Kurven.** Gemessen wurde die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate in Abhängigkeit zur Lichtintensität an Blättern von ca. 11 Wochen alten *nadp-mdh*- (○) und WT-Pflanzen (●), die unter Kontrollbedingungen angezogen wurden. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  Standardabweichung).

### 3.1.3 Einfluss von Starklicht auf *nadp-mdh*-Mutanten im Vergleich zu WT-Pflanzen

Aufgrund der in Kap. 3.1.2 dargestellten Ergebnisse stellte sich die Frage, wie Pflanzen ohne NADP-MDH-Aktivität den Überschuss an Reduktionsäquivalenten unter hohen Lichtintensitäten bewältigen, ohne oxidative Schäden davon zu tragen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dabei insbesondere untersucht werden, ob kompensierende *poising*-Mechanismen innerhalb der Chloroplasten eine Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette verhindern oder ob überschüssige Reduktionsäquivalente auf anderem Wege aus den Chloroplasten transportiert werden, um das Fehlen einer NADP-MDH-Aktivität auszubalancieren. Um diese Zusammenhänge untersuchen zu können, wurde eine Starklicht-Behandlung gewählt, bei der unter Kontrollbedingungen (Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogene, ca. 11 Wochen alte Pflanzen morgens für 7 h ins Starklicht ( $750\text{-}800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) transferiert wurden. Nach Ablauf dieser Belichtungszeit wurde das Pflanzenmaterial jeweils von WT- und *nadp-mdh*-Pflanzen geerntet (Proben im Folgenden als SL = Starklicht bezeichnet). Zur Kontrolle wurde ebenfalls nach einer Belichtungszeit von 7 h Pflanzenmaterial beider Genotypen aus Kontrollbedingungen geerntet (Proben werden im Folgenden als KL = Kontrolllicht bezeichnet). Mittels *Northern-Blot*-Analysen und Kapazitätstests wurde analysiert, ob die SL-Behandlung im WT zu einer erhöhten *NADP-MDH*-Expression führte. Für die *Northern-Blot*-Analyse wurde aus dem Blattmaterial der WT-Pflanzen nach entsprechender Lichtbehandlung Gesamt-RNA isoliert, von der je  $10 \mu\text{g}$  für die elektrophoretische Auftrennung im Formaldehydgel verwendet wurden. Nach dem *Blotting* auf eine Nylonmembran erfolgte die Detektion der *NADP-MDH* (*A.t.*)-mRNA mit einer radioaktiv markierten, *NADP-MDH*-spezifischen Sonde (siehe Kap. 2.3.25).

In Abb. 3.1.7 A wird der *Northern-Blot* bezüglich der *NADP-MDH*-Expression in Blättern von WT-Pflanzen nach KL- und SL-Bedingungen dargestellt. Das zugehörige RNA-Gel diente als Beladungskontrolle. Zudem wurden *NADP-MDH*-Kapazitätstests mit Rohextrakten von WT-Pflanzen nach gleicher Behandlung durchgeführt (siehe Abb. 3.1.7 B). Dabei wurde die Gesamtaktivität der *NADP-MDH* gemessen. Diese lässt sich durch Vollaktivierung des Rohextrakts mit  $\text{DTT}_{\text{red}}$  erreichen (siehe Kap. 2.4.8.2). Sowohl mit Hilfe von *Northern-Blot*-Analysen als auch durch Kapazitätstests konnte eine nach der SL-Behandlung erhöhte *NADP-MDH*-Expression in WT-Pflanzen nachgewiesen werden. Die hier getestete SL-Vorbehandlung wurde in den nachfolgenden Versuchen für einen Vergleich der *nadp-mdh*-Mutanten mit WT-

Pflanzen verwendet. Wichtig bei der Wahl dieser Behandlung war die Tatsache, dass sie in den WT-Pflanzen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene zu einer erhöhten Expression der *NADP-MDH* führte. Demzufolge sollte *NADP-MDH* unter diesen Bedingungen benötigt werden. In den *nadp-mdh*-ko-Pflanzen müsste die SL-Behandlung daher zur Induzierung kompensierender Strategien führen.



**Abb. 3.1.7: *NADP-MDH*-Expressionsanalysen in Blättern von ca. 11 Wochen alten WT-Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen angezogen wurden und entweder nach 7-stündiger Belichtungszeit mit Kontrolllicht (KL) oder Starklicht (SL) geerntet wurden.** **A:** *Northern-Blot*-Analyse. Oben: Autoradiogramm, unten: RNA-Gel als Beladungskontrolle. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Hybridisierung des *Northern-Blots* mit der *NADP-MDH (A.t.)*-spezifischen Sonde erfolgte über Nacht bei 65 °C. **B:** *NADP-MDH*-Kapazitätsmessungen in Blattextrakten. Die Aktivitäten wurden nach Vollaktivierung mit DTT<sub>red</sub> photometrisch bei 334 nm ermittelt. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten (n ≥ 3, ± Standardabweichung).

### 3.1.3.1 Analyse verschiedener Metabolitgehalte in *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach einer Starklicht-Behandlung

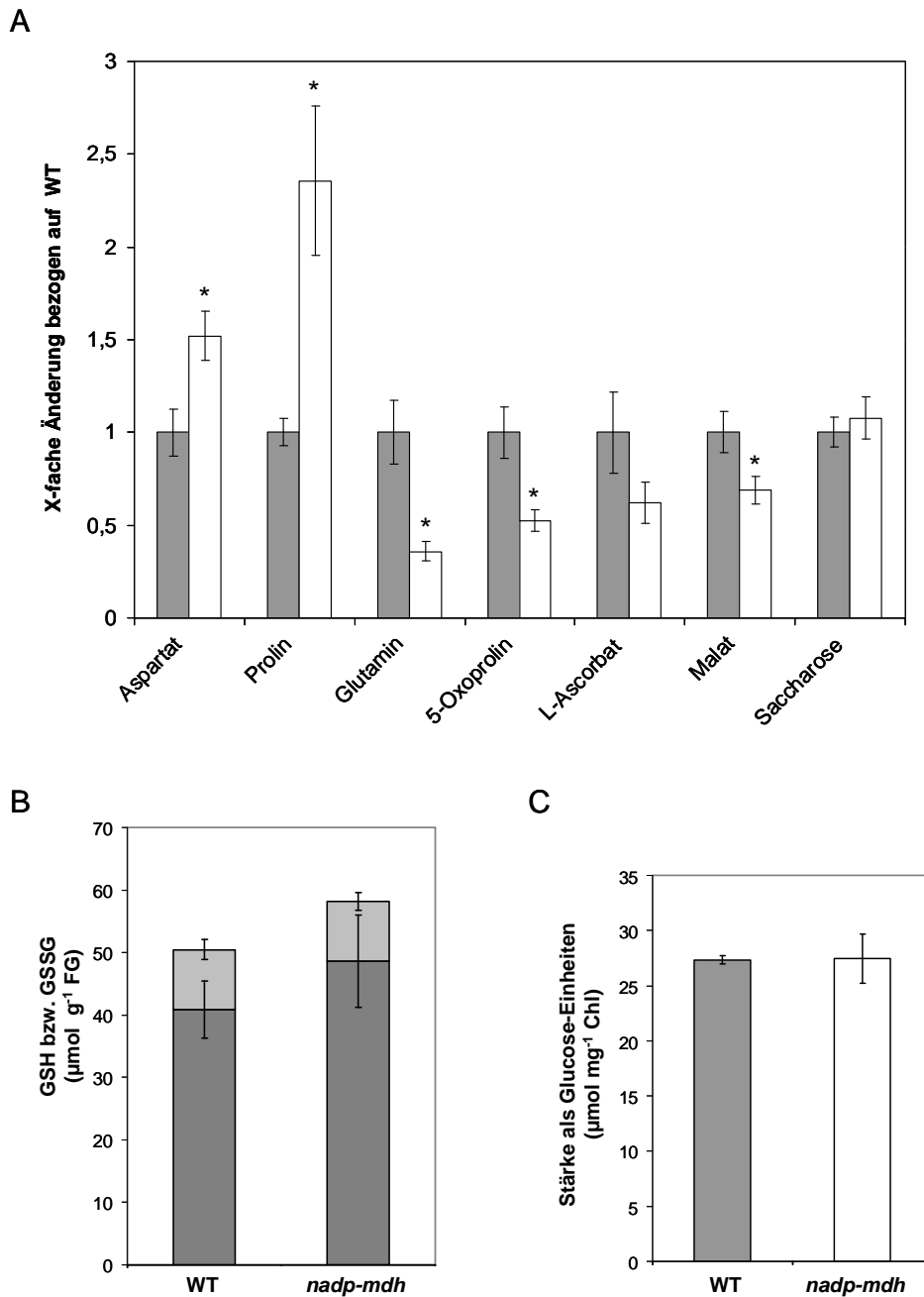
Metabolische Veränderungen in *ko*-Mutanten können direkt Informationen über die physiologische Bedeutung des fehlenden Enzyms oder indirekt Aufschluss über Zusammenhänge im modifizierten Stoffwechsel geben. Zu diesem Zweck wurde eine Analyse verschiedener Metabolitgehalte durchgeführt. Zuerst wurde eine Extraktion löslicher Metabolite aus Blättern von WT- und *nadp-mdh*-Pflanzen vorgenommen, welche zuvor sowohl 7 h SL- als auch KL-Bedingungen ausgesetzt waren. Nachdem die Extrakte aus dem entsprechend behandelten Pflanzenmaterial hergestellt worden

waren (siehe Kap. 2.4.6.1), wurden die Analysen mittels kombinierter GC/MS sowie die Kalkulationen der Ergebnisse in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Alisdair Fernie am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm, Potsdam, nach LISEC *et al.* (2006) vorgenommen. Im Anhang 8.2 befinden sich die durchschnittlichen, relativen Metabolitgehalte in Blättern von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach SL- und KL-Behandlungen. Die Daten wurden jeweils auf die entsprechenden Bezugswerte des jeweiligen WTs normalisiert (in diesem Fall immer gleich 1). In Abb. 3.1.8 A sind einige der Ergebnisse des Metabolitprofils beider Genotypen nach der SL-Behandlung im Vergleich graphisch dargestellt. Besonders auffällig war der signifikante, relative Anstieg des Aspartat- und Prolingehalts. Dies ist besonders interessant, da die Aminosäure Aspartat durch Transaminierung von Oxalacetat gebildet wird. Die Aminosäure Prolin wurde bereits 1987 von BELLINGER & LARHER als Redox-Puffer in höheren Pflanzen diskutiert. Sowohl die Aminosäure Glutamin als auch 5-Oxoprolin wiesen nach der SL-Behandlung signifikante Abnahmen in den *nadp-mdh*-Mutanten im Vergleich zu den WT-Pflanzen auf. Eine signifikante, relative Abnahme in den Mutanten nach 7-stündigem SL war ebenfalls im Malatgehalt zu verzeichnen. Dies ist besonders beachtenswert, da mit dem Fehlen der NADP-MDH-Aktivität in den Mutanten ein wichtiges Enzym für die Bildung von Malat fehlt.

Bei einem hohen Reduktionsgrad des Ferredoxins als erstem freien Akzeptor der photosynthetischen Elektronentransportkette besteht die Möglichkeit, dass Elektronen vom PSI direkt auf Sauerstoff übertragen werden. Dieser Vorgang, bei dem Superoxidradikale entstehen, wird als Mehler-Reaktion bezeichnet. Die Eliminierung dieses aggressiven Radikals erfordert ein Zusammenspiel vieler Enzyme. Ein Teil davon wird im Beck-Halliwell-Asada-Weg zusammengefasst. Da die Mehler-Reaktion verstärkt abläuft, wenn die NADP<sup>+</sup>-Verfügbarkeit in den Chloroplasten eingeschränkt ist, liegt die Vermutung nahe, dass sie in den *nadp-mdh*-Pflanzen unter SL-Bedingungen verstärkt ablaufen könnte. Aus diesem Grund wurden in Vorarbeiten von Beril Becker (BECKER, 2005) bereits Gene, die Enzyme des Beck-Halliwell-Asada-Wegs kodieren, in den *nadp-mdh*-Pflanzen im Vergleich zu WT-Pflanzen auf ihre Expression nach einer speziellen Lichtbehandlung untersucht. Die durchgeführten RT-PCR-Analysen ließen auf gleiche Expressionsniveaus in beiden Genotypen schließen. Auch bisher unveröffentlichte Untersuchungen von Kooperationspartnern (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K.-J. Dietz der Universität Bielefeld sowie von Prof. Dr. E.-M. Aro der Universität von Turku, Finnland) bezüglich der Enzyme dieses antioxidativen Systems in *nadp-mdh*-Pflanzen bestätigten diesen Befund. Ascorbat und Glutathion wirken als Redox-Puffer im Beck-Halliwell-Asada-Weg. Bei anhaltendem

oxidativen Stress wird für gewöhnlich die Synthese beider Verbindungen induziert (ASADA, 1999). Dem metabolischen Profil ist jedoch zu entnehmen, dass der Ascorbat-Gehalt in den Mutanten nach SL-Behandlung tendenziell aber nicht signifikant niedriger war als im WT (siehe Abb. 3.1.8 A). In einem ergänzenden Versuchsansatz wurde zudem der Gehalt von reduziertem Gluthation (GSH) und oxidiertem Gluthation (GSSG) bestimmt. Sollte die antioxidative Wirkung des GSHs in den Mutanten höher beansprucht werden, könnte sich dies in einer Verschiebung des Verhältnisses von GSH und GSSG äußern. Veränderte Mengenverhältnisse von GSH und GSSG würden auf einen veränderten Redoxstatus in der Zelle hindeuten. Die Bestimmung beider Verbindungen wurde mit freundlicher Unterstützung von Frau Silke Walter, via *HPLC*-Analyse durchgeführt (siehe Kap. 2.4.10). Dazu wurde eine Extraktion aus Blättern von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach einer SL-Behandlung vorgenommen. Der gemessene GSSG-Gehalt war in beiden Genotypen gleich, während der GSH-Gehalt in den Mutanten nur tendenziell, nicht aber signifikant erhöht vorlag (siehe Abb. 3.1.8 B). Alle hier beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine unveränderte Beanspruchung des Beck-Halliwell-Asada-Wegs in den Mutanten unter SL-Bedingungen im Vergleich zum WT hin.

Im Calvin-Zyklus gebildete Triosephosphate können u.a. zur Saccharosesynthese ins Cytosol transportiert oder aber zur Stärkesynthese in Chloroplasten verwendet werden. Beide Photosyntheseendprodukte könnten zusätzliche Indikatoren für eine veränderte Photosyntheseleistung sein. Wie in Abb. 3.1.8. A dargestellt, wies der Saccharosegehalt keine Unterschiede in den Mutanten im Vergleich zu den WT-Pflanzen auf. Für einen weiteren Vergleich wurde eine Stärkebestimmung durchgeführt (Kap. 2.4.9). Nach Herstellung des Rohextrakts wurde dieser in lösliche und unlösliche Fraktionen aufgetrennt. Die in der unlöslichen Fraktion enthaltene Stärke wurde durch eine Amyloglycosidasespaltung in Glucose umgesetzt. Die Quantifizierung der Glucose-Einheiten erfolgte durch einen enzymatischen Test im Photometer. Ebenso wie die Saccharosegehalte wiesen auch die Stärkegehalte zwischen beiden Genotypen nach einer SL-Behandlung keine wesentlichen Unterschiede auf (siehe Abb. 3.1.8 C). Diese Ergebnisse bestätigen, unter Berücksichtigung des unveränderten Phänotyps (siehe Abb. 3.1.4) und fast identischen CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten in Abhängigkeit von der Lichtintensität (siehe Abb. 3.1.6), dass SL in den *nadp-mdh*-Pflanzen im Vergleich zu den WT-Pflanzen nicht zu einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Assimilation führt.



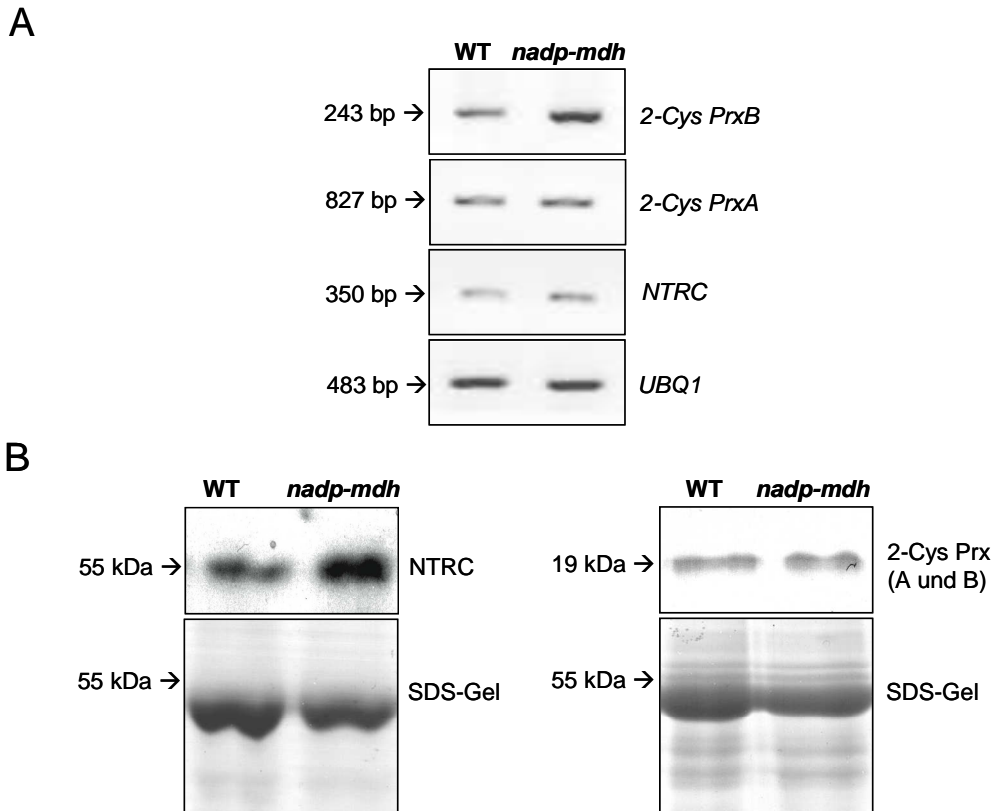
**Abb. 3.1.8: Unterschiede verschiedener Metabolitgehalte zwischen *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach SL-Behandlung.** **A:** Lösliche Metabolite wurden aus Blättern von ca. 11 Wochen alten WT- (graue Balken) und *nadp-mdh*-Pflanzen (weiße Balken) extrahiert. Die Daten wurden jeweils auf den entsprechenden Bezugswert des WT normalisiert (in diesem Fall immer gleich 1). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von insgesamt sechs voneinander unabhängigen Bestimmungen pro Genotyp. Ein Stern kennzeichnet die durch den *t*-Test errechnete Signifikanz der Unterschiede zum WT ( $P < 0.05$ ). **B:** GSH-Gehalte (dunkelgraue Balken) sowie GSSG-Gehalte (hellgraue Balken) wurden mittels *HPLC* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von insgesamt sechs voneinander unabhängigen Bestimmungen pro Genotyp. **C:** Unlösliche Stärke wurde aus Blättern von ca. 11 Wochen alten WT- (graue Balken) und *nadp-mdh*-Pflanzen (weiße Balken) extrahiert. Nach einer Hydrolyse der Stärke zu Glucose wurden die Glucose-Einheiten durch enzymatische Umsetzung photometrisch bei 334 nm quantifiziert. Die aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  Standardabweichung).

### 3.1.3.2 Auswirkung von Starklicht auf das NTRC-System in *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen

Wie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben, ist die Bildung von ROS, wie z.B. Superoxidradikalen oder Wasserstoffperoxiden, während der Photosynthese unvermeidlich. Obwohl ROS eine höchst toxische Wirkung auf Zellbestandteile hat, können geringe Mengen an Wasserstoffperoxid als Signalmoleküle dienen (FOYER & NOCTOR, 2005; FOYER *et al.*, 2009). Aus diesem Grund gibt es in der pflanzlichen Zelle zahlreiche antioxidative Systeme, die koordiniert reguliert werden müssen. Die Elektronen zur Entgiftung von ROS können dabei direkt von reduziertem Ferredoxin oder von NADPH bereitgestellt werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde das chloroplastidäre NTRC-System als zusätzlicher Schutzmechanismus gegen antioxidativen Stress in *A. thaliana* erstmals 2004 beschrieben (SERRATO *et al.*, 2004). Dabei überträgt reduziertes 2-Cys Prx die Elektronen auf Wasserstoffperoxid, wobei Wasser entsteht. NTRC ermöglicht dann eine effiziente Reduzierung des oxidierten 2-Cys Prx unter Verbrauch von NADPH. Auf diese Weise kann NADP<sup>+</sup> wieder als Elektronenakzeptor bereitgestellt werden. Aufgrund dieser Zusammenhänge galt es im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, ob in den *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen die Aktivität des NTRC-Systems erhöht vorliegt.

Zunächst wurden dafür RT-PCR-Analysen zum Expressionsvergleich der chloroplastidären 2-Cys PrxA und PrxB sowie der NTRC vorgenommen. Als interne Kontrolle wurde die PCR ebenfalls mit *UBQ1*-spezifischen Primern durchgeführt. Die Amplifikation von *UBQ* diente als Mengenstandard. *UBQ1* wird als *housekeeping*-Gen betrachtet, welches unabhängig von äußeren Einflüssen und Zelltyp immer konstant exprimiert wird und daher unter optimalen RT-PCR-Bedingungen in gleicher Menge amplifiziert wird. Die Ergebnisse der Analyse lassen auf deutlich erhöhte Transkriptmengen des 2-Cys PrxB und leicht erhöhte Transkriptmengen der NTRC in den *nadp-mdh*-Pflanzen schließen, während die Transkriptmengen des 2-Cys PrxA unverändert blieben (siehe Abb. 3.1.9 A). Zusätzlich wurde die Expression dieser Enzyme auf Translationsebene mittels *Western-Blot*-Analysen untersucht. Zu diesem Zweck wurde zum einen ein spezifischer NTRC-Antikörper aus Reis (SERRATO *et al.*, 2004) und zum anderen ein spezifischer Bas1-Antikörper aus Gerste (BAIER & DIETZ, 1997) verwendet. Der Name Bas1 bezieht sich dabei auf das entsprechende chloroplastidäre 2-Cys Prx. In *A. thaliana* erkennt dieser Antikörper beide Isoformen der chloroplastidären 2-Cys Prx. Zwischen *nadp-mdh*-Pflanzen und WT-Pflanzen ließen sich auf Translationsebene deutliche Unterschiede in der

Expression von *NTRC* feststellen (siehe Abb. 3.1.9 B). Die Proteinmenge lag dabei in den Mutanten deutlich erhöht vor. Beim Nachweis der 2-Cys Prx waren gleiche Bandenstärken für beide Genotypen zu verzeichnen (siehe Abb. 3.1.9 B). Da dieser Antikörper beide chloroplastidären 2-Cys Prx-Isoformen in *A. thaliana* detektiert, wird möglicherweise die veränderte Menge einer Isoform durch die andere überdeckt.



**Abb. 3.1.9: Untersuchungen zum antioxidativen NTRC-System in Blättern von ca. 11 Wochen alten *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach SL-Behandlung.** **A:** RT-PCR-Analyse: Gelelektrophorese der mittels RT-PCR amplifizierten cDNA-Fragmente zum Nachweis der Expression von 2-Cys PrxB, 2-Cys PrxA und NTRC. Es wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Davon wurde jeweils 1 µl als Matrize für die PCR eingesetzt, welche mit den spezifischen Primern und spezifischer Zyklusanzahl (siehe Tab. 2.4) durchgeführt wurde. Als interne Kontrolle wurde die RT-PCR, jeweils mit *UBQ1*-spezifischen Primern durchgeführt. **B:** *Western-Blots* zum Expressionsvergleich von NTRC (links) und 2-Cys Prx (rechts) in *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen. Oben: Chemilumineszenznachweis, unten: SDS-Gel zur Beladungskontrolle. Es wurden jeweils 20 µg Gesamt-Protein für eine SDS-PAGE (12 %-ig) eingesetzt. Nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der *Western-Blot* mit dem NTRC-Antikörper (1:2000) bzw. BAS1-Antikörper (1:5000) und einem anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:30000) (BioRad, München) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels *ECL*-Färbelösung (GE Healthcare, München) auf einem Röntgenfilm.

In der Gesamtheit deuten diese Ergebnisse auf eine erhöhte Beanspruchung des NTRC-Systems in den *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen hin. Dies ist



besonders bemerkenswert, da dieses antioxidative System in Chloroplasten, ebenso wie das Malatventil, Reduktionsäquivalente von NADPH erhält. In den *nadp-mdh*-Mutanten könnte dem NTRC-System beim Ausbalancieren des ATP/NADPH-Verhältnisses daher eine bedeutende Rolle zukommen, um das Fehlen des Malatventils zu kompensieren.

### 3.1.3.3 Auswirkung von Starklicht auf die photosynthetische Lichtnutzung von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob SL einen veränderten Einfluss auf die photochemische Lichtnutzung bzw. den photosynthetischen Elektronentransport der *nadp-mdh*-Pflanzen im Vergleich zu WT-Pflanzen hat. Mit dem Malat-Ventil fehlt den hier zu untersuchenden Pflanzen ein wichtiger Mechanismus, um im Licht überschüssige Elektronen der photosynthetischen Elektronentransportkette in Form von Malat indirekt aus den Chloroplasten zu transportieren, um NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor wieder bereitzustellen. Ein Fehlen von NADP<sup>+</sup> kann in Chloroplasten zur Überreduktion von Ferredoxin führen, welches wiederum Folgen auf den Reduktionsgrad der photosynthetischen Elektronentransportkette hat.

Mit Hilfe von Chlorophyllfluoreszenzmessungen, die bei  $800 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durchgeführt wurden, sollten die möglichen Auswirkungen in den Mutanten analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde das *portable photosynthesis*-System LI-6400XT (LI-COR Biosciences; Lincoln, USA) für die Messungen verwendet (siehe Kap. 2.5.2). Die Kalkulationen der Parameter erfolgten automatisch durch das Messgerät. Da PSI fast nicht fluoresziert (HÄDER, 1999), kann durch die Messungen von Chlorophyllfluoreszenzen der Zustand des PSII ermittelt werden, was auch Hinweise auf eventuell vorliegenden Stress ermöglicht.

Die von den Antennenpigmenten absorbierte Anregungsenergie wird auf das Reaktionszentrum des PSII übertragen. Dort kann das angeregte Chlorophyll auf verschiedenen Wegen relaxieren, wie durch die Abgabe von Fluoreszenz, Wärme oder durch die photochemische Nutzung der Anregungsenergie für Primärprozesse der Photosynthese. Nimmt die Fluoreszenz ab, kommen demnach zwei Prozesse in Frage: entweder es kommt zu der gewünschten photochemischen Energienutzung, der sog. photochemischen Löschung (bzw. *quenching*) der Anregungsenergie (qP), oder zur nicht-photochemischen Löschung der Anregungsenergie (NPQ). Anhand des NPQ-Werts können Aussagen über den an der Thylakoidmembran bestehenden  $\Delta\text{pH}$ -Wert

getroffen werden; je größer der NPQ-Wert, desto höher der  $\Delta pH$ -Wert (WALKER, 1988). Der qP-Wert spiegelt hingegen den Redoxzustand von  $Q_A$ , dem primären Elektronenakzeptor im PSII, wieder. Hohe qP-Werte deuten auf einen großen Anteil an oxidiertem  $Q_A$  hin, da  $Q_A$  nur in diesem Zustand Elektronen vom P680 übernehmen kann (MAXWELL & JOHNSON, 2000). Ein qP-Wert von 1 würde also bedeuten, dass 100 % des  $Q_A$  oxidiert vorliegt. Zusätzlich lässt sich anhand der Messungen auch die Quantenausbeute am PSII ( $\Phi II$ ) berechnen.  $\Phi II$  kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und beschreibt die Menge an absorbierter Lichtenergie, die für photochemische Arbeit genutzt wird. Je höher der Wert, desto höher ist die Effizienz der Lichtnutzung am PSII. Niedrige Werte hingegen geben Hinweise auf eine mögliche Photoinhibition (GENTY *et al.*, 1989). Ein weiterer Indikator für Photoinhibition ist das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz ( $F_V/F_M$ ), das in der Regel zwischen 0,7 und 0,85 liegen sollte und bei Stress erniedrigt ist (BJORKMANN & DEMMIG, 1987). Die Elektronentransportrate (ETR) im PSII ist ein aus den Chlorophyllfluoreszenzen abgeleiteter Wert und gibt Informationen über den photosynthetischen Elektronenfluss.

Anhand der erfolgten Messungen konnten in den *nadp-mdh*- im Vergleich zu WT-Pflanzen keine signifikanten Unterschiede in  $\Phi II$ , qP, NPQ,  $F_V/F_M$  und ETR festgestellt werden (siehe Tab. 3.1.2). Die hier kalkulierten Parameter deuten selbst bei einer Lichtintensität von  $800 \mu E m^{-2} s^{-1}$  nicht auf Photoinhibition in den Mutanten hin. Der photosynthetische Elektronentransport scheint also trotz hoher Lichtintensitäten durch das Fehlen einer NADP-MDH-Aktivität nicht beeinflusst zu werden.

**Tab. 3.1.2: Verschiedene photosynthetische Parameter in WT- und *nadp-mdh*-Pflanzen bei einer Lichtintensität von  $800 \mu E m^{-2} s^{-1}$ .** Die Messungen wurden am Blatt mit Hilfe des *portable photosynthesis*-System LI-6400XT (LI-COR Biosciences; Lincoln, USA) vorgenommen. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  Standardabweichung).

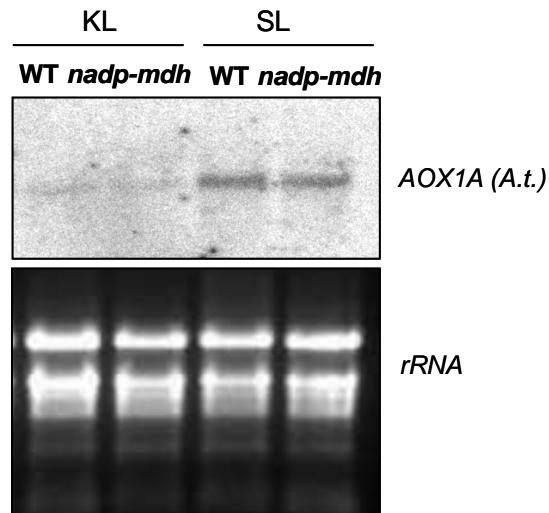
	WT	<i>nadp-mdh</i>
$F_V/F_m$	0,81 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,01
qP	0,32 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,03
NPQ	1,97 $\pm$ 0,14	1,84 $\pm$ 0,13
$\Phi II$	0,17 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,01
ETR ( $\mu mol e^- m^{-2} s^{-1}$ )	58,07 $\pm$ 6,09	55,54 $\pm$ 4,64

### 3.1.3.4 Auswirkung von Starklicht auf die *AOX1A*-Expression und die Photorespiration in *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen

Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel lassen sogar unter SL-Bedingungen auf vergleichbare Photosyntheseaktivitäten in *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen schließen. Obwohl überschüssige Reduktionsäquivalente in den Mutanten nicht mehr indirekt über das Malat-Ventil aus den Chloroplasten transportiert werden können, gab es keine Anzeichen für einen verstärkt ablaufenden Beck-Halliwell-Asada-Weg. Eine Prolin-Akkumulation und erhöhte NTRC-Protein- sowie 2-Cys *PrxB*-Transkriptmengen gaben Hinweise, dass das NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis in den Chloroplasten der *nadp-mdh*-Pflanzen unter SL-Bedingungen durch alternative Wege ausbalanciert wird. Weiterhin stellte sich die Frage, inwieweit die mitochondriale Atmungskette bzw. AOX unter diesen Bedingungen noch an der Optimierung der photosynthetischen Aktivität in den Mutanten beteiligt ist. Immerhin fehlt den Pflanzen ein Hauptweg für den indirekten Austransport von Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten ins Cytosol, von wo aus sie dann weiter indirekt in die Mitochondrien transportiert werden könnten. Wie in Kap. 1.3 beschrieben, wird *AOX1A* durch SL induziert. Dies beruht unter anderem auf einem erhöhten Angebot an Reduktionsäquivalenten in den Mitochondrien und auf einem erhöhten Reduktionsgrad des Ubichinonpools. *AOX1A* stellt also ein geeignetes Markerenzym dar, um zu überprüfen, ob ein Transport in die Mitochondrien bzw. die dortige Entsorgung von überschüssigen Reduktionsäquivalenten im SL in den Mutanten gleichermaßen stattfindet wie in den WT-Pflanzen.

Um die Auswirkung von hohen Lichtintensitäten auf die *AOX1A*-Expression in beiden Genotypen zu untersuchen, wurden *Northern-Blot*-Analysen durchgeführt. In diesem Fall wurden sowohl Pflanzen aus Kontrollbedingungen (nach 7-stündiger Belichtungszeit mit KL) als auch Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen angezogen und für 7 h ins SL transferiert wurden, untersucht. Von der extrahierten Gesamt-RNA wurden jeweils 10 µg für eine Formaldehydgelelektrophorese (siehe Kap. 2.3.23) eingesetzt und auf eine Nylonmembran transferiert (siehe Kap. 2.3.24). *AOX1A* (*A.t.*)-mRNA wurde daraufhin mit Hilfe einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde detektiert (siehe Kap. 2.3.25). Das dazugehörige Autoradiogramm ist in Abb. 3.1.10 dargestellt. Das gezeigte RNA-Gel diente als Beladungskontrolle. Der Einfluss von SL führte eindeutig zu einer erhöhten *AOX1A*-Expression. Die erhöhten Transkriptmengen unter SL-Bedingungen im Vergleich zu KL-Bedingungen waren dabei nicht nur in den WT-Pflanzen, sondern in fast gleichem Maße auch in den *nadp-mdh*-Pflanzen zu verzeichnen. Dieses Resultat führte zur Frage nach einer erhöhten Aktivität alternativer

*Shuttle*-Mechanismen für überschüssige Reduktionsäquivalente in die Mitochondrien, welche in den Mutanten das Fehlen des Malat-Ventils ausbalancieren könnten.

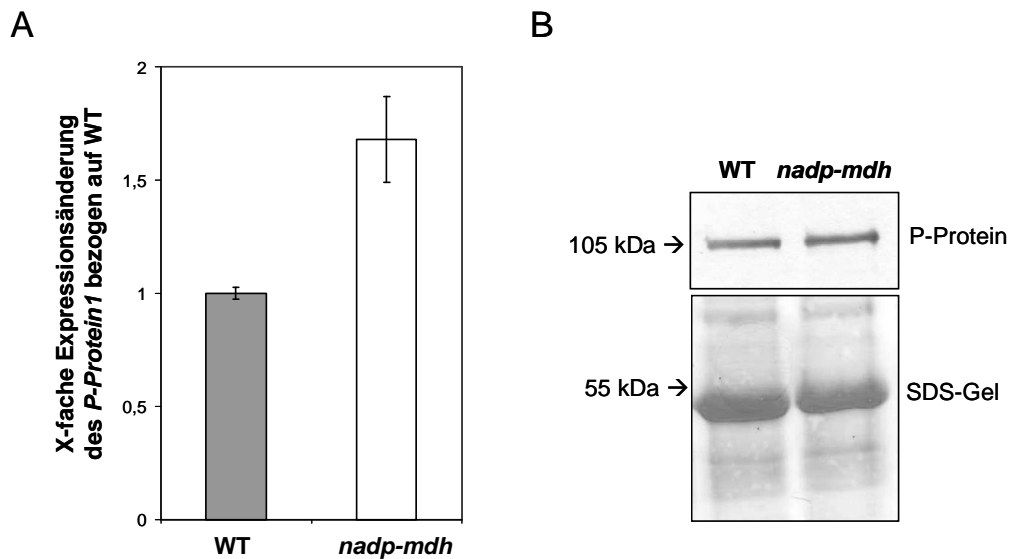


**Abb. 3.1.10: Northern-Blot-Analyse zum Expressionsvergleich von AOX1A in Blättern von ca. 11 Wochen alten *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen angezogen wurden und nach 7-stündiger Belichtungszeit entweder mit KL oder mit SL geerntet wurden.** Oben: Autoradiogramm, unten: RNA-Gel als Beladungskontrolle. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Hybridisierung des *Northern-Blots* mit der AOX1A (*A.t.*)-spezifischen Sonde erfolgte über Nacht bei 65 °C.

Wie bereits in Kap. 1.1 ausführlich beschrieben, werden die Photorespiration und der damit einhergehende Photorespirationsweg seit einigen Jahren in der Literatur als Mechanismus zum Schutz vor Überenergetisierung des Photosyntheseapparats beschrieben (KOZAKI & TAKEBA, 1996). Bei diesem energieverbrauchenden Stoffwechselweg, der sich über drei Zellkompartimente erstreckt, soll es zum Verbrauch von überschüssigem NADPH und ATP kommen, welches in der Lichtreaktion gebildet wurde (WINGLER *et al.*, 2000).

Während des Photorespirationswegs erfolgt in den Mitochondrien die Oxidation von zwei Molekülen Glycin zu einem Molekül Serin unter Freisetzung von CO<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Die dabei anfallenden Elektronen werden auf NAD<sup>+</sup> übertragen. In dieser Reaktion gebildetes NADH führt der mitochondrialen Atmungskette zusätzliche Elektronen zu. IGAMBERDIEV *et al.* berichteten 2001 von Gerste-Mutanten mit modifizierter Glycin-Decarboxylase-Aktivität. Die verringerte Rate an Photorespiration in diesen Mutanten führte unter photorespiratorischen Bedingungen zur Überreduktion bzw. Überenergetisierung der Chloroplasten. Darüber hinaus verfügten die Mutanten über eine verringerte Expression von AOX und über erhöhte NADP-MDH-Aktivitäten. Diese

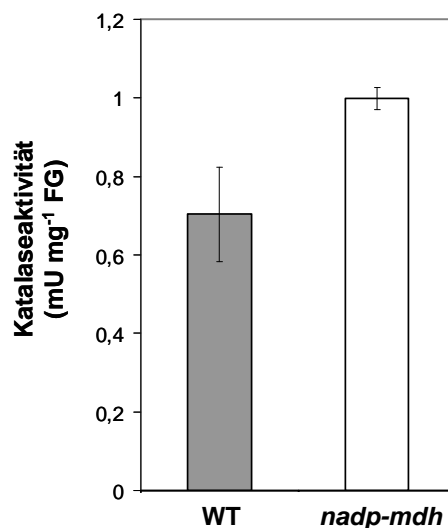
Zusammenhänge ließen vermuten, dass die Photorespiration ein alternativer elektronenverbrauchender Mechanismus in *nadp-mdh*-Pflanzen sein könnte. Um diese Hypothese zu untermauern, werden im Folgenden die Untersuchungen von verschiedenen katalytischen Schritten des Photorespirationswegs im Vergleich an Mutanten und WT-Pflanzen dargestellt.



**Abb. 3.1.11: Expressionsanalysen des *P*-Proteins, als Bestandteil des GDC-Enzymkomplexes in Blättern von ca. 11 Wochen alten *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach einer SL-Behandlung.** **A:** Densitometrische Auswertung der Gelelektrophorese der mittels RT-PCR amplifizierten cDNA-Fragmente zum Nachweis der *P-Protein1*-Expression. Es wurden jeweils 5 µg der extrahierten Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Davon wurde jeweils 1 µl als Matrize für die PCR eingesetzt, welche zum einen mit *P-Protein*-spezifischen Primern (26 Zyklen) und zum anderen, als interne Kontrolle, mit *UBQ1*-spezifischen Primern (26 Zyklen) durchgeführt wurden (siehe Tab. 2.4). Die Daten wurden jeweils auf den entsprechenden Bezugswert des WTs normalisiert (in diesem Fall immer gleich 1). Dargestellt sind die Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen von insgesamt drei voneinander unabhängigen Bestimmungen pro Genotyp. **B** *Western-Blot*-Analyse zum Expressionsvergleich des *P*-Proteins. Oben: Chemilumineszenznachweis, unten: SDS-Gel zur Beladungskontrolle. Es wurden jeweils 20 µg des extrahierten Gesamt-Proteins für eine SDS-PAGE (12 %-ig) eingesetzt. Nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der *Western-Blot* mit dem *P*-Protein-Antikörper (1:3000) und einem anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:30000; BioRad, München) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels *ECL*-Färbelösung (GE Healthcare, München) auf einem Röntgenfilm.

Zunächst wurde die Expression des *P*-Proteins als Teil des GDC in beiden Genotypen unter SL-Bedingungen verglichen. Von *A. thaliana* werden zwei Isoformen dieses Enzymkomplexes exprimiert, *GDC1* und *GDC2*, wobei *GDC1* im Blatt dominierend vorhanden ist. Für die Untersuchung auf Transkriptionsebene wurden RT-PCR-Analysen, wie in Kap. 2.3.5 beschrieben, mit den jeweiligen spezifischen Primern und

optimierter Zyklenanzahl (siehe Tab. 2.4) für die Isoform 1 des P-Proteins durchgeführt. Die Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese wurde dabei aus Blättern von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen extrahiert, welche vorher einer 7-stündigen SL-Behandlung ausgesetzt waren. In Abb. 3.1.11 A ist die densitometrische Auswertung der Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.3.5) der amplifizierten cDNA-Fragmente dargestellt. Diese weist auf ein deutlich erhöhtes Transkriptniveau des *P-Proteins1* in den Mutanten im Vergleich zu den WT-Pflanzen unter SL-Bedingungen hin. Auf Translationsebene sollte dieses Ergebnis mittels *Western-Blot*-Analysen verifiziert werden. Für diese Analyse wurde ebenfalls Gesamt-Protein aus Blättern beider Genotypen nach SL-Behandlung extrahiert. Für die Immundetektion wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das P-Protein in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Dieser wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bauwe der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Bei der Immundetektion konnten im Bereich des erwarteten Molekulargewichts, oberhalb der 95 kDa-Markerbande, diskrete Banden detektiert werden. Die Bandenstärken auf dem Röntgenfilm, unter Berücksichtigung der Kontrolle (SDS-Gel), lassen den Schluss auf eine minimal erhöhte Proteinmenge des P-Proteins in den *nadp-mdh*-Mutanten zu (siehe Abb. 3.1.11 B).



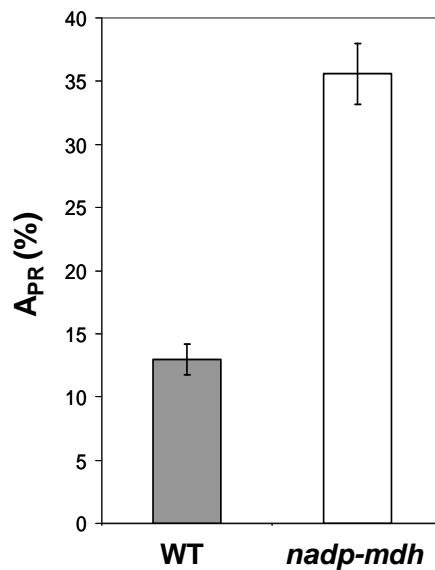
**Abb. 3.1.12: Katalaseaktivitäten von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach SL-Behandlung.** Die Aktivität der jeweiligen Blattextrakte wurde anhand des Abbaus von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 240 nm verfolgt. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten (n ≥ 3, ± Standardabweichung).

In Peroxisomen kommt es während des photorespiratorischen Wegs zur Oxidation von Glycolat zu Glyoxylat. Bei dieser Reaktion werden die Reduktionsäquivalente auf

molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht. Durch die in Peroxisomen vorhandene Katalase wird dieses wieder zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert. Um der Frage nachzugehen, ob eine SL-Behandlung in den *nadp-mdh*-Mutanten im Vergleich zu den WT-Pflanzen eine höhere Photorespirationsrate und damit eine erhöhte Rate der Katalase verursacht, wurden Katalaseaktivitätsmessungen, wie in Kap. 2.4.8.1 beschrieben, durchgeführt. Der gemessene Rohextrakt wurde dabei aus Blättern beider Genotypen extrahiert, welche vorher einer SL-Behandlung ausgesetzt waren. In den *nadp-mdh*-Pflanzen konnten interessanterweise deutlich höhere Katalaseaktivitäten nachgewiesen werden als in den entsprechenden WT-Proben. Während die Aktivitäten in den WT-Pflanzen durchschnittlich nur bei ca.  $0,7 \text{ mU mg}^{-1} \text{ FG}$  lagen, waren es in den Mutanten ca.  $1 \text{ mU mg}^{-1} \text{ FG}$  (siehe Abb. 3.1.12).

Weitere Untersuchungen einer möglicherweise erhöhten Photorespiration unter SL-Bedingungen wurden mit Hilfe des Gaswechsellmessgeräts *portable photosynthesis*-System LI-6400XT (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) durchgeführt. Wie in Kap. 2.5.2 ausführlich beschrieben, wurden an Blättern von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen  $A/C_i$ -Kurven bei  $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  gemessen. Diese ermöglichen die Berechnung der Netto-Photosynthese in Abhängigkeit zur  $\text{CO}_2$ -Konzentration. Die Messung der  $A/C_i$ -Kurven erfolgte sowohl bei *nadp-mdh*- als auch bei WT-Pflanzen vorerst unter normalen  $\text{O}_2$ -Bedingungen (21 %) und direkt im Anschluss, jeweils am gleichen Blatt, unter nahezu  $\text{O}_2$ -freien Bedingungen.  $A/C_i$ -Kurven in einem  $\text{O}_2$ -freiem Gasgemisch zeigen die maximale Carboxylierungsrate der RubisCO an, da Photorespiration aufgrund des  $\text{O}_2$ -Mangels nahezu ausgeschlossen werden kann. Diese ist vor allem in  $\text{C}_3$ -Pflanzen bei geringem  $\text{O}_2$ -Partialdruck höher als die Netto-Assimilationsrate unter normalen  $\text{O}_2$ -Bedingungen (21 %). Ein Vergleich der Netto-Assimilationsrate (bei  $\text{O}_2$  von 21 %) mit der maximalen Carboxylierungsrate ( $\text{O}_2$ -freie Bedingungen) sollte Aufschluss über die Photorespirationsrate geben (exemplarisch für jeden Genotyp im Anhang 8.3 dargestellt). Der in dieser Arbeit gewählte Photorespirationsparameter  $A_{\text{PR}}$  gibt die Differenz zwischen Netto-Assimilationsrate (bei  $\text{O}_2$  von 21 %) und der maximalen Carboxylierungsrate ( $\text{O}_2$ -freie Bedingungen) in Prozent, bezogen auf die maximale Carboxylierungsrate ( $\text{O}_2$ -freie Bedingungen), an.  $A_{\text{PR}}$  stellt demnach den Anteil der apparenten Photorespiration an der maximalen RubisCO-Verbrauchsrate dar. In Abb. 3.1.13 wird  $A_{\text{PR}}$  von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen bei  $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck von 400 ppm dargestellt (entspricht ungefähr der ambienten  $\text{CO}_2$ -Konzentration der Luft). Unter diesen Bedingungen war  $A_{\text{PR}}$  in den *nadp-mdh*-Pflanzen ca. doppelt so hoch wie bei den WT-Pflanzen. Dieses Ergebnis lässt auf einen deutlich

erhöhten Anteil an Photorespiration in den Mutanten unter SL-Bedingungen schließen. Sowohl die durch SL ausgelöste erhöhte Transkriptmenge von *AOX1A* in *nadp-mdh*-Mutanten und WT-Pflanzen als auch die erhöhte *P-Protein*-Expression, die gesteigerte Katalaseaktivität sowie ein höherer  $A_{PR}$ -Wert in den Mutanten geben deutliche Hinweise auf erhöhte Photorespirationsraten. Der photorespiratorische Weg übernimmt demnach in den *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen eine kompensierende Rolle.



**Abb. 3.1.13:**  $A_{PR}$  bei  $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einem  $C_i$ -Gehalt von 400 ppm; gemessen an Blättern von ca. 11 Wochen alten *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen angezogen wurden. Mit Hilfe des Gaswechsellmessgeräts wurde die Rate der  $\text{CO}_2$ -Assimilation in Abhängigkeit zur  $C_i$ -Konzentration bei einem  $\text{O}_2$ -Gehalt von 21% und unter  $\text{O}_2$ -freien Bedingungen gemessen. Hier abgebildet ist jeweils die Differenz beider Kurven, welche prozentual auf die jeweilige maximale Assimilationsrate unter anaeroben Bedingungen bezogen wurde. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  Standardabweichung).

Erhöhte Lichtintensitäten wirken sich insbesondere auf den Elektronendruck in den Elektronentransportketten der Chloroplastenmembran und auf den Redoxzustand im Chloroplastenstroma aus. Zum Schutz des Photosyntheseapparats besteht in den Chloroplasten ein kompliziertes Netzwerk von Mechanismen, welche der Entstehung von ROS entgegenwirken. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind ein Beweis für die Flexibilität und das koordinierte Zusammenspiel dieser Mechanismen.



### 3.2 Regulation der Expression der *NADP-MDH*

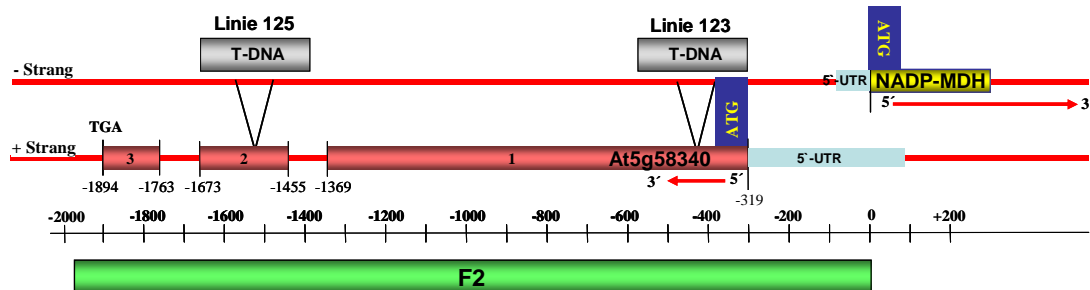
Die Aktivierung der NADP-MDH unterliegt einer lichtabhängigen Redoxmodulation durch das Fd-Trx-System und wird über das NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis feinreguliert. Abgesehen von diesen schnellen Änderungen des Aktivierungszustands bewirken verschiedene endogene und exogene Faktoren Veränderungen der Transkript- und Proteinmenge der NADP-MDH. Die Transkription der meisten Gene unterliegt einer komplexen und spezifischen Regulation. Da NADP-MDH in Chloroplasten wirksam ist, aber im Kern kodiert wird, muss ein fein abgestimmtes System bestehen, welches Änderungen, wie z.B. im Redoxzustand der Chloroplasten misst, und das Signal an den Zellkern übermittelt, wo es dann zu einer Änderung der Transkription kommt.

Wie bereits in Kap. 1.2 ausführlich beschrieben, verfügt das *NADP-MDH*-Gen nicht über einen Promotor, der in seinem Aufbau dem eines typischen RNA-Polymerase II-Typ-Promotors entspricht. Stattdessen befindet sich bereits 319 bp stromaufwärts des TSS des *NADP-MDH*-Gens das erste Exon des Gens At5g58340, welches auf dem entsprechenden Gegenstrang lokalisiert ist und für ein noch unbekanntes Protein kodiert. Außerdem konnten in der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens keine Consensus-Sequenzen, wie die TATA- oder die CCAAT-Box, identifiziert werden. Mit Hilfe von Promotoranalysen bzw. durch vergleichende Sequenzanalysen konnten Beril Becker bzw. Steffen Hameister Hinweise darauf erlangen, dass regulatorische Elemente möglicherweise im Laufe der Evolution in die kodierende Region der NADP-MDH verlagert wurden (HAMEISTER, 2005; BECKER, 2005; HAMEISTER *et al.*, 2007).

Ein Teilaspekt im Rahmen dieser Arbeit war es, die Hypothesen von Beril Becker und Steffen Hameister mit ergänzenden Experimenten zu untermauern. Im Fokus stand dabei die 5'-vorgelagerte Region des *NADP-MDH*-Gens. Es stellte sich die Frage, ob diese Region tatsächlich als Promotor des *NADP-MDH*-Gens fungiert. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst Pflanzen-Linien mit T-DNA-Insertionen in genau dieser Region identifiziert. Mögliche Promotoreigenschaften könnten dadurch zerstört werden, was Auswirkungen auf die Expression der *NADP-MDH* haben müsste (HAMEISTER *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde mit Hilfe des  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Reportergen-Systems eine mögliche Promotoraktivität des 5'-vorgelagerten Bereichs des *NADP-MDH*-Gens untersucht.

### 3.2.1 Auswirkungen von T-DNA-Insertionen in der vermuteten Promotorregion auf die Expression der *NADP-MDH*

Aufgrund von internen Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass regulatorische Elemente, die das komplexe Transkriptionsmuster der *NADP-MDH* in *A. thaliana* kontrollieren, im Laufe der Evolution in den kodierenden Bereich des Gens verlagert wurden (BECKER, 2005; HAMEISTER, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu ergänzende Untersuchungen durchgeführt. Es galt, *ko*-Mutanten mit T-DNA-Insertionen in der proximalen bzw. distalen Promotorregion des *NADP-MDH*-Gens auf eine möglicherweise veränderte Expression der *NADP-MDH* zu untersuchen.

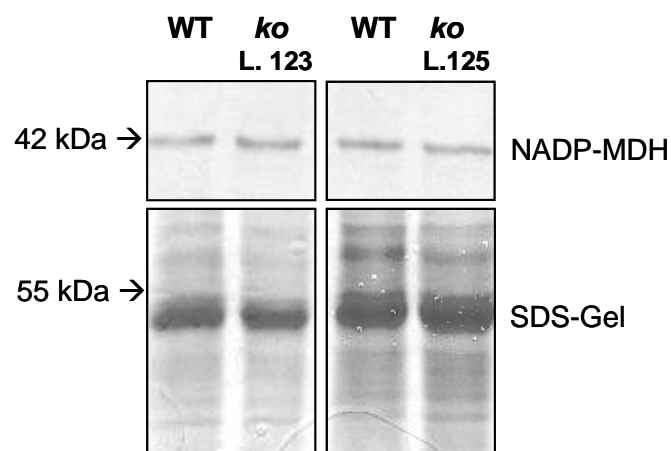


**Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung der 5'-stromaufwärts gelegenen Region des *NADP-MDH*-Gens (*At5g58330*).** Die ATG-Region des *NADP-MDH*-Gens wurde in der Skala auf 0 gesetzt. Exemplarisch wurde nur das erste Exon dieses Gens dargestellt (gelb). In der 5'-stromaufwärts gelegenen Region des *NADP-MDH*-Gens ist auf dem entsprechenden Gegenstrang das Gen *At5g58340* lokalisiert, welches für ein noch unbekanntes Protein kodiert. Dieses Gen ist mit negativen Zahlen gekennzeichnet. UTR: Untranslatierter Bereich. Die T-DNA-Insertion (grau) der Linie 123 befindet sich im 1. Exon, und die der Linie 125 im zweiten Exon des *At5g58340*-Gens. Die Sequenz des Promotorfragments F2 (1992 bp), welches mittels GUS-Reportergen-Analyse auf eine mögliche Promotoraktivität untersucht wurde, ist hier in grün gekennzeichnet (HAMEISTER *et al.*, 2007; modifiziert).

Zunächst wurden Pflanzen der Linie Salk 053119 (interne Bezeichnung Salk 123) und Pflanzen der Linie Salk 018118 (interne Bezeichnung Salk 125) auf ihre Homozygotie bezüglich der Fremd-DNA-Insertion in der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens überprüft. Das *Screening* mittels PCR-Analyse beider Linien wurde analog zum Verfahren für die *nadp-mdh*-Mutanten durchgeführt (siehe Kap. 3.1.1). In Abb. 3.2.1 ist die Position der T-DNA-Insertionen in beiden Linien als Ergebnis der Sequenzanalyse schematisch dargestellt. Sie zeigt das Gen *At5g58340*, welches für ein noch unbekanntes Protein kodiert und sich stromaufwärts des *NADP-MDH*-Gens befindet, sowie die Position der T-DNA beider Linien. Die T-DNA ist bei Linie 123 im ersten Exon (420 bp vor dem *TTS* des *NADP-MDH*-Gens) und bei Linie 125 im zweiten

Exon (1524 bp vor dem *TTS* des *NADP-MDH*-Gens) des *At5g58340*-Gens inseriert (HAMEISTER *et al.*, 2007).

Nach Anzucht beider homozygoten Linien unter Kurztagbedingungen und  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wiesen die Mutanten keine phänotypischen Unterschiede zu WT-Pflanzen auf, die unter gleichen Bedingungen angezogen wurden. Im Folgenden wurde Blattmaterial dieser Pflanzen bezüglich einer veränderten *NADP-MDH*-Expression mittels *Western-Blot*-Analysen untersucht. Für die Immundetektion wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die *NADP-MDH* aus Erbse eingesetzt. Dieser erkennt auch das Enzym aus *A. thaliana*. Der in Abb. 3.2.2 dargestellte *Western-Blot* weist bei allen getesteten Proben eine diskrete Bande in Höhe der 42 kDa-Markerbande auf. Weder bei Linie 123 noch bei Linie 125 sind Unterschiede in der Bandenstärke im Vergleich zur jeweiligen WT-Probe zu verzeichnen. Eine unveränderte *NADP-MDH*-Expression, trotz T-DNA-Insertionen in den klassischen proximalen und distalen Promotorregionen, unterstützt die These, dass regulatorische Elemente in diesen Bereichen fehlen (HAMEISTER *et al.*, 2007).



**Abb. 3.2.2: *Western-Blot*-Analyse zum Expressionsvergleich der *NADP-MDH* zwischen WT- und *ko*-Pflanzen mit T-DNA-Insertion im ersten (Linie 123) bzw. zweiten Exon (Linie 125) des *At5g58340*-Gens.** L: Linie; oben: Chemilumineszenznachweis, unten: SDS-Gel zur Beladungskontrolle. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden jeweils  $30 \mu\text{g}$  Gesamt-Protein aus Blättern auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde für die Immundetektion ein Antikörper gegen die *NADP-MDH* aus Erbse in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (BioRad, München) in einer Verdünnung von 1:15000. Die Detektion erfolgte mittels *ECL*-Färbelösung (GE Healthcare, München) auf einem Röntgenfilm (HAMEISTER *et al.*, 2007).

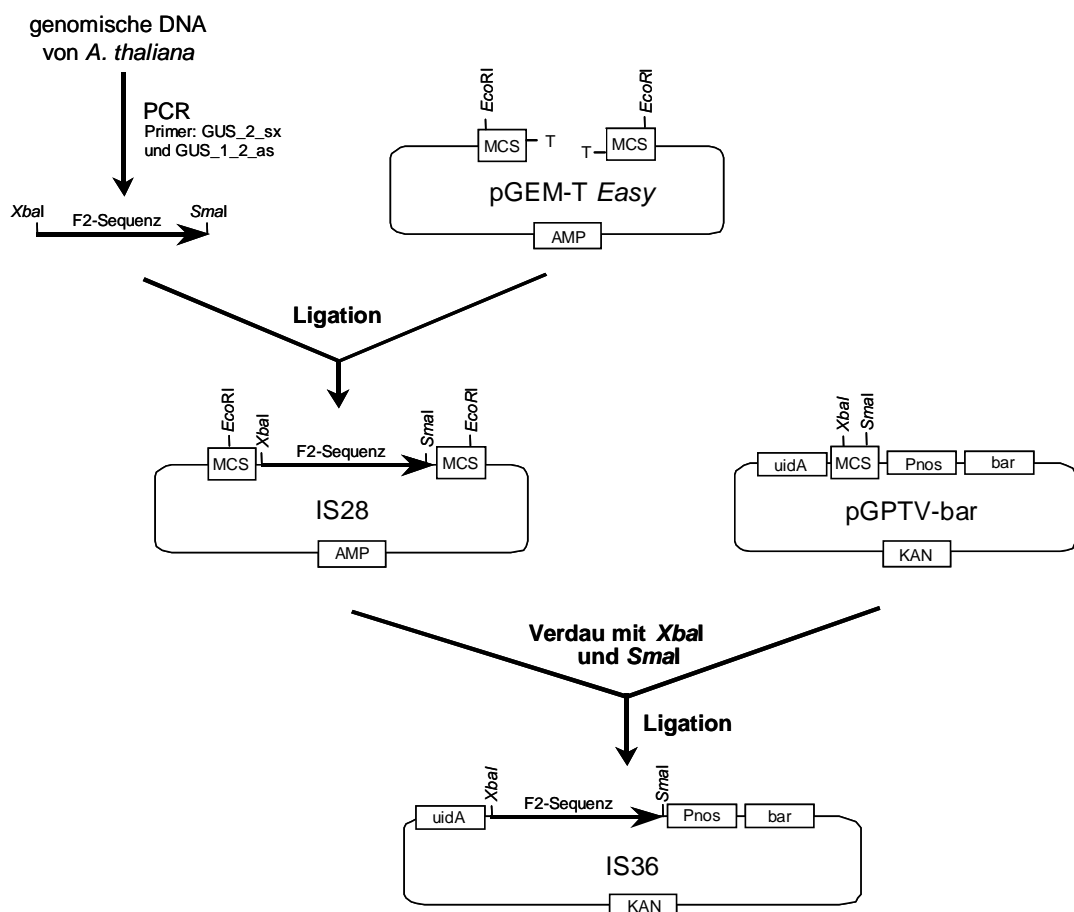
### 3.2.2 Untersuchung einer vermuteten Promotorregion mittels eines GUS-Reportergen-Konstrukts

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe des GUS-Reportergen-Systems in einem weiteren Ansatz untersucht werden, ob die 5'-vorgelagerte Region des *NADP-MDH*-Gens Promotoraktivität aufweist. Die Wirkung einer isolierten Promotorsequenz lässt sich durch Kopplung an ein Reportergen überprüfen. Reportergene kodieren Proteine, die sich in der Pflanze einfach nachweisen lassen. Ein häufig verwendetes Reportergen ist das Gen für das GUS-Protein aus *E. coli*. Dieses hydrolysiert X-Glucuronid zu einem blau gefärbten Hydrolyseprodukt, das sich mikroskopisch nachweisen lässt und in Pflanzen nicht vorkommt.

Als Promotorbereich für die im Folgenden beschriebenen GUS-Reportergen-Analysen wurde der 5'-stromaufwärts gelegene, 1992 bp große Sequenzabschnitt vor dem TSS des *NADP-MDH*-Gens gewählt. Dieser erstreckt sich über den gesamten kodierenden Bereich des At5g58340-Gens und wird im Folgenden als Promotorfragment F2 bezeichnet (siehe Abb. 3.2.1). Die amplifizierte Sequenz des F2-Abschnitts wurde in den binären Pflanzentransformationsvektor pGPTV inseriert, welcher durch einfache Klonierung die Erstellung eines Promotor-GUS-Konstrukts erlaubt (BECKER *et al.*, 1992). In Abb. 3.2.3 ist die detaillierte Klonierungsstrategie zur Herstellung des Promotor-GUS-Konstrukts mit dem F2-Sequenzabschnitt aus *A. thaliana* (pIS36) dargestellt. Eine detaillierte methodische Beschreibung zur Herstellung des Konstrukts pIS36 befindet sich in Kap. 2.3.18.

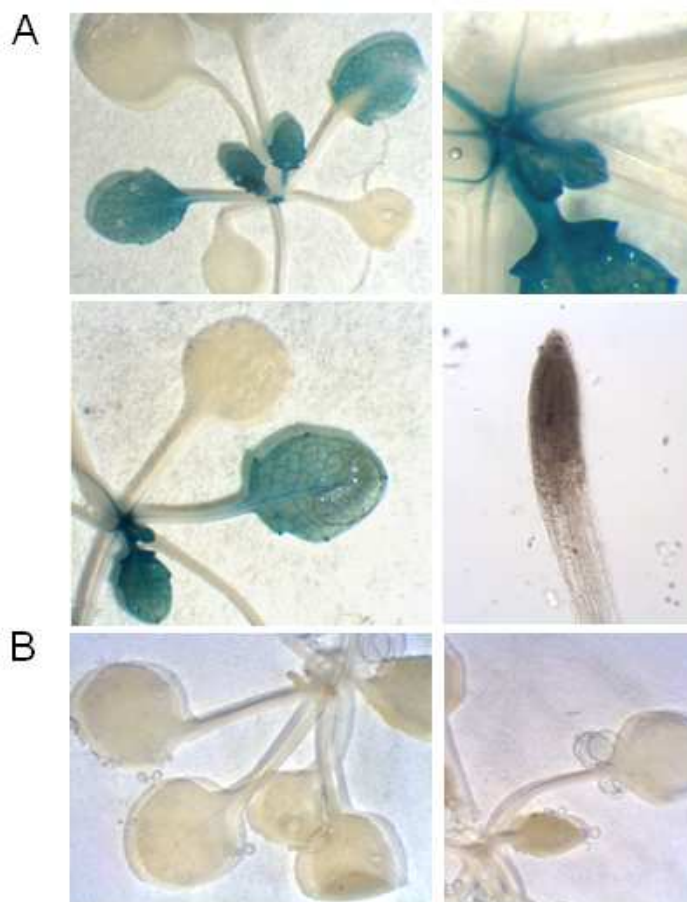
Das Konstrukt pIS36 wurde nach Fertigstellung in *A. tumefaciens*-Zellen transformiert (siehe Kap. 2.3.16). Der Nachweis einer erfolgreichen Transformation erfolgte mittels Kolonie-PCR (siehe Kap. 2.3.10). Um nun das F2-GUS-Konstrukt zur konstitutiven Expression in das Genom von *A. thaliana* zu integrieren, wurden wiederum WT-Pflanzen mittels dieser *A. tumefaciens*-Zellen mit dem pIS36-Konstrukt transformiert (*floral dip*; siehe Kap. 2.3.19). Nach dem Ausblühen und der Schotenbildung wurden deren Samen geerntet und auf MS-Agar ausgesät (siehe Kap. 2.2.4), welcher zur Selektion positiver Transformanden das Totalherbizid Glufosinat enthielt (40 µM; Handelsname WEEDEX®). Insgesamt wurden sechs resistente Keimlinge auf Erde umgesetzt. Nachdem die Pflanzen dieser Generation (T<sub>1</sub>) eine gewisse Größe erreicht hatten, konnten jeweils zwei Blätter für eine DNA-Isolierung entnommen werden. Die jeweilige DNA diente als Matrize für eine PCR-Analyse mit spezifischen pGPTV-Primern. Auf diese Weise konnte eine Insertion des Promotor-GUS-Konstrukts nachgewiesen werden. Von den Pflanzen, in denen ein

amplifiziertes Produkt in entsprechender Größe nachgewiesen werden konnte, wurde die Pflanze Nr. 1 für weitere Analysen verwendet (GUS2.1). Da die Transformation meist nur heterozygot erfolgt, sollte in der Folgegeneration ( $T_2$ ) dieser Pflanze ein homozygotes Individuum identifiziert werden. Dazu wurden insgesamt 14 Nachkommen ausgesät (GUS2.1.1-14). Zum schnelleren Ausblühen und Abreifen der Samen wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen angezogen. Die Samen der 14 Pflanzen wurden separat gesammelt und aliquote Anteile erneut auf MS-Selektionsmedium ausgesät. Eine Resistenz aller Nachkommen sollte Homozygotie der jeweiligen Mutterpflanzen ( $T_2$ -Generation) anzeigen. Dies war einzig bei der Pflanze Nr. 14 gegeben. Für die histochemische Lokalisation einer möglichen  $\beta$ -Glucuronidase-Expression wurden daher ausschließlich Nachkommen dieser Pflanze verwendet (GUS2.1.14).



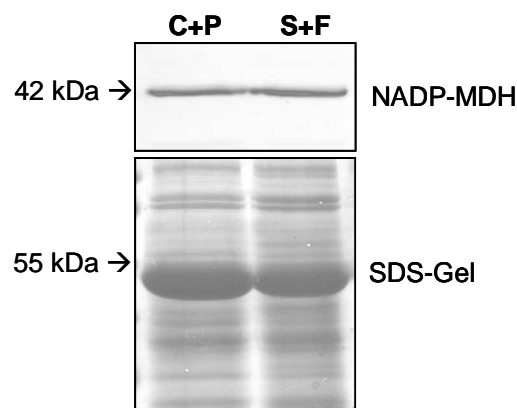
**Abb. 3.2.3: Strategie zur Klonierung des Promotor-GUS-Konstrukts (IS36) mit dem Sequenzabschnitt F2 (1992 bp) aus der 5'-vorgelagerten Region des NADP-MDH-Gens aus *A. thaliana*.** Die Herstellung des IS36-Konstrukts wird detailliert in Kap. 2.3.18 beschrieben. AMP: Ampicillin-Resistenz; KAN: Kanamycin-Resistenz; MCS: multiple cloning site; uidA:  $\beta$ -Glucuronidase-Gen; Pnos: Promotor der Nopalinsynthase; bar: Phosphinothricin-Acetyltransferase-Gen (verleiht Glufosinat-Resistenz).

Bei dem in dieser Arbeit stabil integrierten Fusionskonstrukt wird das GUS-Reportergen durch den Promotorbereich F2 kontrolliert. Sollte dieser Sequenzabschnitt Promotoraktivität aufweisen, würde es in den entsprechenden Geweben zur Expression des Reportergens kommen. Da dieses Enzym das farblose Substrat X-Gluc in ein indigoblaues Produkt umsetzt, könnte eine Aktivität leicht qualitativ nachgewiesen werden. Für die Lokalisation einer möglichen  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität wurde Saatgut der Linie GUS2.1.14 sowie von WT-Pflanzen als Kontrolle verwendet. Die Pflanzen wurden auf Erde ohne Selektionsdruck ausgesät und bis zu einem Alter von drei Wochen angezogen. Danach erfolgte die Färbung dieser Keimlinge nach KIM *et al.* (2006) in Anlehnung an JEFFERSON *et al.* (1987) (siehe Kap. 2.4.5) und die Analyse mit Hilfe eines Lichtmikroskops.



**Abb. 3.2.4: Histochemische Lokalisation der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in drei Wochen alten Arabidopsiskeimlingen mit homozygoter F2-GUS-Fusionskonstrukt-Insertion. A:** Die Transformanten wiesen eine Blaufärbung in den Sekundär- und Folgeblättern auf, während die Cotyledonen, die Primärblätter und das Wurzelgewebe keinerlei Färbung zeigten. **B:** WT-Keimlinge, die als Kontrolle dienten, blieben ungefärbt.

Die hier getesteten transgenen Keimlinge wiesen eine deutliche Blaufärbung in den Sekundär- und Folgeblättern auf, welche sich über die gesamte Blattspreite erstreckte. Jedoch blieben die Cotyledonen, die Primärblätter und das Wurzelgewebe ungefärbt (siehe Abb. 3.2.4). Die zur Kontrolle dienenden WT-Keimlinge wiesen keinerlei Blaufärbung auf. Diesen Ergebnissen zu Folge besitzt der ausgewählte, 1992 bp lange, 5'-stromaufwärts des *NADP-MDH*-Gens gelegene Sequenzabschnitt Promotoraktivität.



**Abb. 3.2.5: Western-Blot-Analyse zum Expressionsvergleich der *NADP-MDH* in Cotyledonen zusammen mit Primärblättern (C+P) und Sekundär- zusammen mit Folgeblättern (S+F) von drei Wochen alten WT-Keimlingen.** Oben: colorimetrischer Nachweis, unten: SDS-Gel zur Beladungskontrolle. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden jeweils 35 µg Gesamt-Protein auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde für die Immundetektion ein Antikörper gegen die *NADP-MDH* aus Erbse in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (BioRad, München) in einer Verdünnung von 1:3000. Die Detektion erfolgte mittels 4-Chloro-1-Naphthol-Färbung.

Mit Hilfe des GUS-Reportergen-Konstrukts konnte allerdings nicht entgültig geklärt werden, ob es sich beim F2-Sequenzabschnitt tatsächlich um den Promotor handelt, welcher die Expression des *NADP-MDH*-Gens reguliert. Falls es sich um Promotoraktivitäten der *NADP-MDH* handelt, sollte dies mit Hilfe von Expressionsanalysen nachweisbar sein. Zu diesem Zweck wurden *NADP-MDH*-Expressionsstudien mit separat voneinander geernteten Cotyledonen und Primärblättern sowie Sekundär- und Folgeblättern von 3 Wochen alten WT-Pflanzen in einem ersten Versuch mittels *Western-Blot*-Analyse durchgeführt. Für die Immundetektion wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die *NADP-MDH* aus Erbse eingesetzt. Der in Abb. 3.2.5 dargestellte *Western-Blot* weist in beiden Proben diskrete Banden gleicher Stärke in Höhe der 42 kDa-Markerbande auf. Zwischen der Probe aus Cotyledonen zusammen mit Primärblättern und der Probe aus

Sekundär- zusammen mit Folgeblättern konnten keine wesentliche Expressionsunterschiede der *NADP-MDH* auf Translationsebene nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wirft Zweifel auf, ob die Promotoraktivität des untersuchten Fragments F2, welche mittels GUS-Promotor-Analysen nachgewiesen wurde, in Verbindung mit der Expression des *NADP-MDH*-Gens steht. Zusätzliche Versuche zur genaueren Aufklärung stehen noch aus.

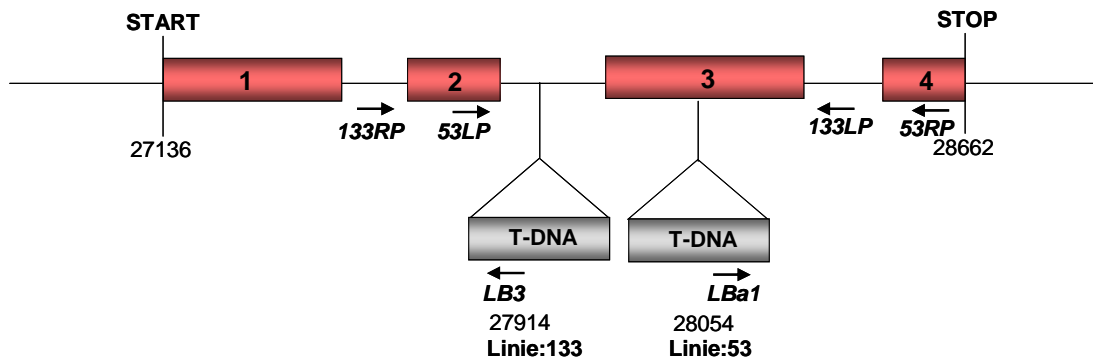
### **3.3 Phänotypische und physiologische Untersuchungen von *aox1a*-Mutanten nach Behandlung mit dem Inhibitor Antimycin A**

Seit einigen Jahren steht die Interaktion zwischen Chloroplasten und Mitochondrien als Hauptorte der Energieproduktion in Pflanzen im Fokus der Wissenschaft. Bestimmte Stoffwechselprozesse sollen dabei eine wichtige Rolle in der Feinregulation und Abstimmung von Photosynthese und Atmung übernehmen. Ein Ansatz dieser Arbeit zur Aufklärung des komplizierten Netzwerks, welches in *A. thaliana* für die Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase sorgt, war die Untersuchung von *ko*-Mutanten mit fehlender *AOX1A*-Expression.

In der Arbeitsgruppe standen bereits zwei voneinander unabhängige *AOX1A-ko*-Linien (im Folgenden als *aox1a* bezeichnet) zur Verfügung. Unter der Leitung von Dr. Vera Linke wurden von Pamela Niazi Pflanzen der Linie Salk 084897 (interne Bezeichnung Salk 53) und von Birgit Bachmann Pflanzen der Linie Sail 303 D04 (interne Bezeichnung Salk 133) auf ihre Homozygotie bezüglich der Fremd-DNA-Insertion überprüft (NIAZI, 2005; BACHMANN, 2007). In Abb. 3.3.1 ist die Position der T-DNA in den Linien 53 und 133 im Gen der *AOX1A* als Ergebnis der Sequenzanalyse schematisch dargestellt. Sie zeigt das Gen At3g22370, die Lage der T-DNA in beiden Linien und die Positionen der beim *Screenen* verwendeten Primer, welche als Pfeile dargestellt sind. Die T-DNA der Linie 53 ist im dritten Exon und der Linie 133 zwischen dem zweiten und dem dritten Exon inseriert. Es sei hier darauf hinzuweisen, dass auch eine Insertion der T-DNA in Intronbereiche zum Verlust der Genkontinuität führen kann, was durch Expressionsanalysen verifiziert wurde. In den identifizierten *ko*-Mutanten beider Linien konnte jeweils ein Fehlen der *AOX1A*-Expression nachgewiesen werden (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009). Dementsprechend wurden für alle folgenden Untersuchungen von *aox1a*-Mutanten Samen der getesteten Pflanzen der Linien 53 oder 133 verwendet. Signifikante Ergebnisse wurden mit *ko*-Pflanzen der jeweils



anderen, unabhängigen Linie verifiziert. Im weiteren Verlauf der Ergebnisdarstellung wird daher auf eine explizite Unterscheidung zwischen Mutanten der Linien 53 und 133 verzichtet.



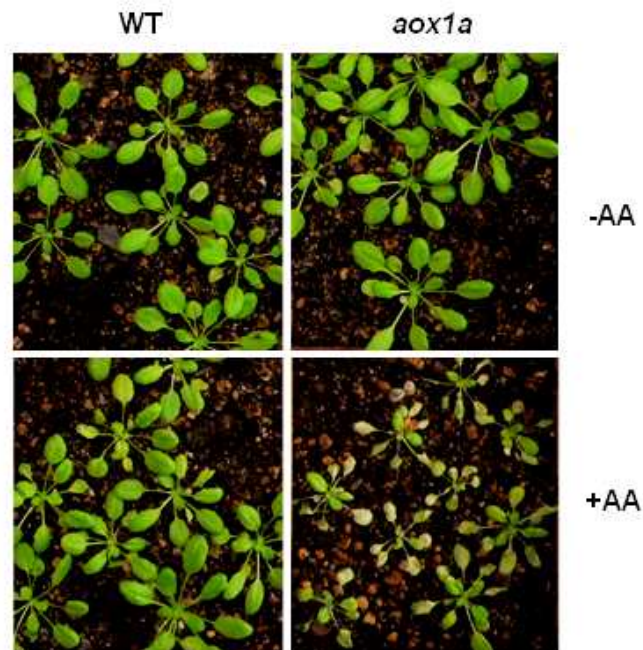
**Abb. 3.3.1: Schematische Darstellung der T-DNA-Lokalisation im AOX1A (A.t.)-Gen (At3g22370) der beiden *aox1a*-Linien 53 und 133 als Ergebnis der Sequenzanalysen.** Die Insertion der Linie 53 befindet sich im dritten Exon, während die Insertion der Linie 119 im zweiten Intron lokalisiert ist. Gen- und T-DNA-spezifische Primer, welche für die PCR-Analysen verwendet wurden, sind als Pfeile, Exons rot und T-DNAs grau dargestellt (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

### 3.3.1 Auswirkungen von Antimycin A auf den Phänotyp von *aox1a*- und WT-Pflanzen

Es konnte bereits bewiesen werden, dass es in Arabidopsis-WT-Pflanzen, die mit dem Inhibitor Antimycin A (AA) behandelt wurden, zu einer erhöhten Expression von AOX1A kommt (SAISHO *et al.*, 1997). AA bindet an Komplex III der mitochondrialen Atmungskette und blockiert die Übertragung von Elektronen vom Ubichinon auf Cytochrom c. Damit es nicht zu einer Überreduktion der Atmungskette kommt, werden dann die überschüssigen Elektronen durch AOX direkt auf Sauerstoff übertragen.

Unter normalen Wachstumsbedingungen (Kontrollbedingungen: Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) zeigten *aox1a*-Mutanten keinerlei Unterschiede zu WT-Pflanzen. Anders verhielt es sich nach einer AA-Behandlung. In Abb. 3.3.2 wird der Phänotyp von *aox1a*- im Vergleich zu WT-Pflanzen mit und ohne AA-Behandlung dargestellt. Fünf Wochen alte Arabidopsis-Pflanzen beider Genotypen wurden mit einer wässrigen Lösung jeweils mit und ohne Zusatz von  $20 \mu\text{M}$  AA besprüht. Sechs Tage nach der Behandlung wurde die Dokumentation vorgenommen. Deutliche Schädigungen des Gewebes konnten ausschließlich bei den *aox1a*-Pflanzen nach AA-Behandlung festgestellt werden. Bei WT-Pflanzen nach AA-Behandlung, den *aox1a*-Pflanzen und den WT-Pflanzen ohne

AA-Behandlung waren keine Unterschiede in der Entwicklung zu verzeichnen (siehe Abb. 3.3.2). Während Mitochondrien von WT-Pflanzen zwei Wege für den Transfer von Elektronen vom reduzierten Ubichinon auf molekularen Sauerstoff haben, nämlich den Cytochrom-Weg (CW) und den alternativen respiratorischen Weg (AW), sind *aox1a*-Pflanzen durch das Fehlen der Hauptisoform des Schlüsselenzyms des AWs in diesem Transfer deutlich eingeschränkt. Dieses Fehlen kann scheinbar durch den noch vorhandenen CW kompensiert werden. Entsprechend verhält es sich bei den WT-Pflanzen, die mit AA besprüht wurden. Der auf diese Weise inhibierte CW kann mit einer erhöhten Expression von *AOX1A* und damit durch den AW kompensiert werden. Erst die Unterbindung beider Wege führte zu nekrotischen Gewebeveränderungen (siehe Abb. 3.3.2).



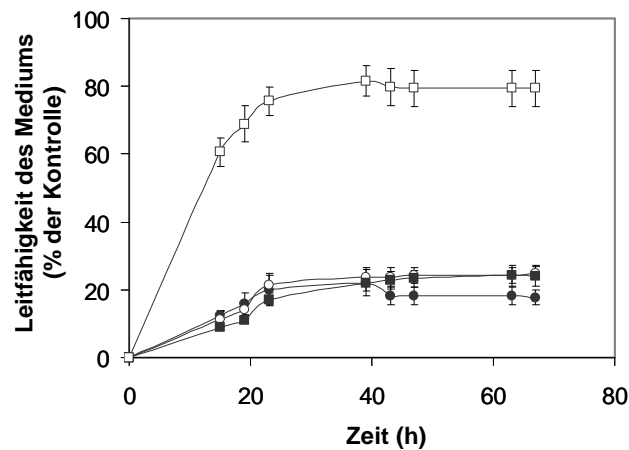
**Abb. 3.3.2: Phänotyp von fünf Wochen alten, unter Standardbedingungen angezogenen WT- und *aox1a*-Pflanzen, sechs Tage nach einer AA-Behandlung.** Zur Kontrolle wurden die Pflanzen entsprechend mit einer Lösung ohne AA behandelt (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

### 3.3.2 Auswirkungen von Antimycin A auf die Bildung von intrazellulären ROS in *aox1a*- und WT-Pflanzen

Da angenommen wurde, dass die nekrotischen Veränderungen der Blätter von *aox1a*-Pflanzen nach AA-Behandlung auf eine Membranschädigung durch ROS zurückzuführen sind, wurde in einem weiteren Versuch die Auswirkung von AA auf die

Membrandurchlässigkeit von Blattscheiben der *aox1a*- und WT-Pflanzen untersucht. Ausgestochene Blattscheiben wurden, wie in Kap. 2.2.3 beschrieben, für 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Ab- bzw. Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA inkubiert. Danach wurden sie separat in 5 ml bidestilliertes Wasser überführt. In einem Zeitverlauf von insgesamt 70 h wurde die Leitfähigkeit des Mediums mit Hilfe einer Leitfähigkeitsmeselektrode (CONMET 1; Hanna Instruments, Karlsruhe) bestimmt.

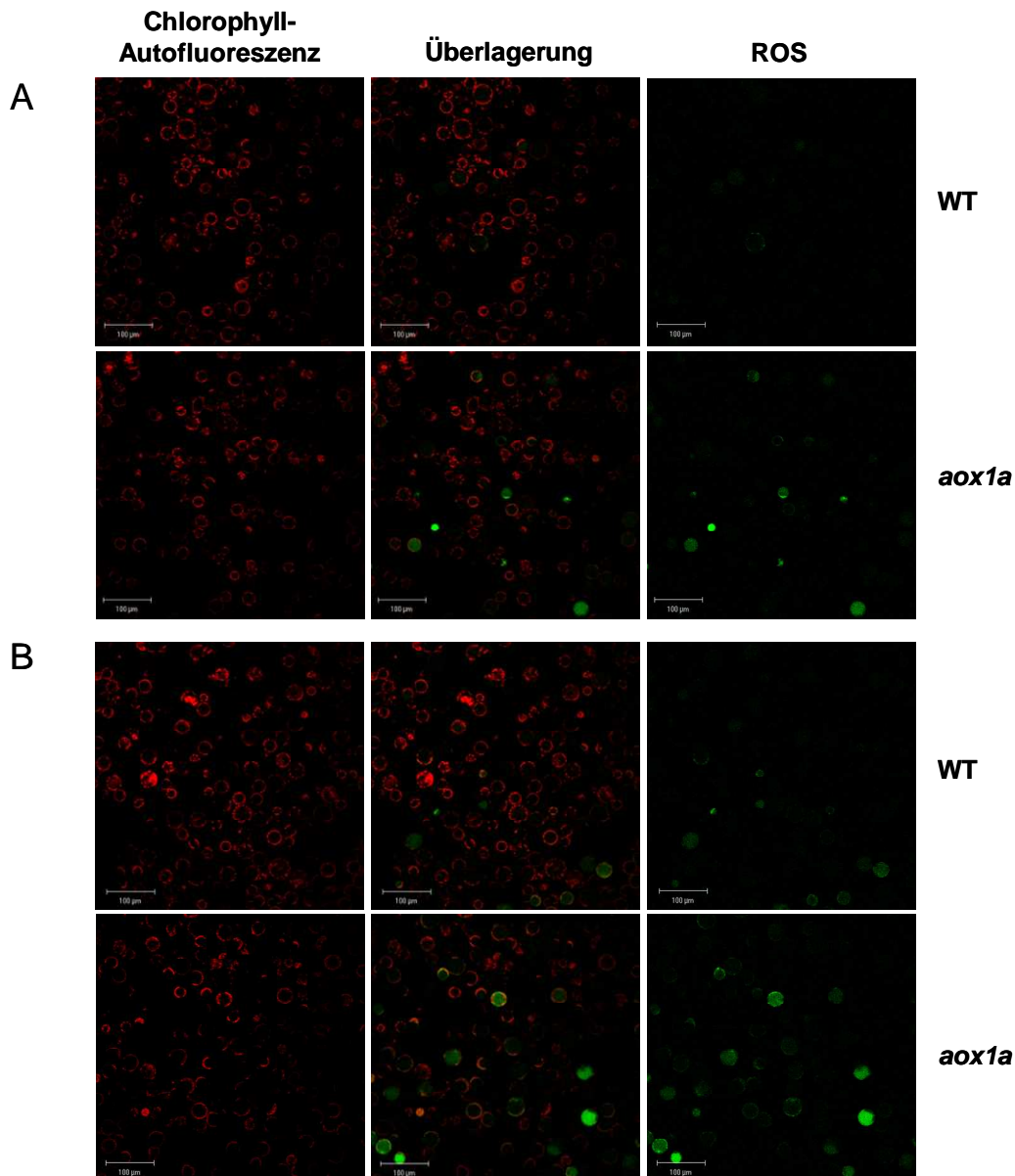
In Abb. 3.3.3 ist die Leitfähigkeit des Mediums in % in Abhängigkeit zur Zeit dargestellt. Als Maximalwert (100 %) diente dabei die Leitfähigkeit des Mediums, in dem Blattscheiben inkubiert wurden, nachdem sie in flüssigem Stickstoff eingefroren worden waren. Alle anderen Prozentwerte wurden entsprechend von diesem Wert abgeleitet. Bei den Blattscheiben der *aox1a*-Mutanten, die in AA vorinkubiert wurden, konnte eine deutlich erhöhte Membrandurchlässigkeit für Ionen ermittelt werden, die sich in der erhöhten Leitfähigkeit des Mediums widerspiegelt. Blattscheiben von WT-Pflanzen, die in AA vorinkubiert wurden, sowie Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen ohne AA-Behandlung wiesen keine Anzeichen für einen erhöhten Ionenverlust auf.



**Abb. 3.3.3: Leitfähigkeitsmessungen als Indikator für Ionendurchlässigkeit der Membranen von *aox1a*- und WT-Pflanzen.** Blattscheiben von WT- (ausgefüllte Symbole) und *aox1a*-Pflanzen (leere Symbole) wurden nach einer Vorinkubation von 6 h bei  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in Ab- (●, ○) und Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA (■, □) in 5 ml Wasser überführt. Gemessen wurde der Anstieg der Leitfähigkeit des Mediums im Zeitverlauf von 70 h. Es sind jeweils die Mittelwertwerte von fünf voneinander unabhängigen Messungen mit zugehörigem Standardfehler dargestellt. Als Maximalwert (100 %) wurde die Leitfähigkeit des Mediums angenommen, in dem Blattscheiben inkubiert wurden, nachdem sie in flüssigem Stickstoff eingefroren waren (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

Die Bildung von ROS ist eine unvermeidliche Konsequenz der aeroben Atmung. Da ROS aber zu irreversiblen Schäden z.B. von Membranen oder DNA führen können, ist

die Limitierung der ROS-Produktion von großer Bedeutung. Eine Überreduktion des mitochondrialen Ubichinonpools stellt eine der größten Quellen für ROS-Bildung dar (MØLLER, 2001). Um diese Überreduktion weitestgehend zu limitieren, wird u.a. AOX ab einem bestimmten Reduktionsgrad aktiviert, welches überschüssige Elektronen aus dem Ubichinonpool entsorgt und sie direkt auf Sauerstoff überträgt (MILLENAAR & LAMBERS, 2003).



**Abb. 3.3.4: Visualisierung von ROS in Mesophyllprotoplasten.** Mesophyllprotoplasten wurden aus ca. 11 Wochen alten *aox1a*- und WT-Pflanzen isoliert. Nach einer Belichtungszeit von 6 h bei  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in Ab- (A) oder Anwesenheit (B) von  $0,1 \mu\text{M}$  AA wurden die Protoplasten mit  $0,1 \mu\text{M}$  CM- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen *laser scanning*-Mikroskops. Die Autofluoreszenz der Chlorophylle wird rot und ROS (gefärbt mit CM- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) grün dargestellt. Zusätzlich wird die Überlagerung beider Signale gezeigt (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

Mit Hilfe des folgenden Versuchs sollte nun verifiziert werden, dass das Fehlen von AOX1A mit bzw. ohne AA-Behandlung im Vergleich zum entsprechenden WT zu einer erhöhten Bildung von ROS führt. Zu diesem Zweck wurden Mesophyll-Protoplasten aus Blättern beider Genotypen isoliert (siehe Kap. 2.5.3.1), welche dann in Ab- bzw. Anwesenheit von 0,1  $\mu\text{M}$  AA für 6 h bei 120  $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$  inkubiert wurden. Daraufhin wurden aliquote Anteile der Protoplastensuspension mit 0,1  $\mu\text{M}$  des membrandurchlässigen Färbemittels CM-H<sub>2</sub>DCF-DA versetzt. Dieses Reagenz fluoresziert, wenn es durch ROS oxidiert wird. Folglich konnte ROS mit Hilfe eines konfokalen *laser scanning*-Fluoreszenz-Mikroskops (LSM 510 META; Zeiss, Göttingen) detektiert werden (siehe Kap. 2.5.3.2). CM-H<sub>2</sub>DCF-DA-Fluoreszenz bzw. die Autofluoreszenz des Chlorophylls wurden nach Anregung bei 488 nm durch Emission von 500-530 nm (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA) bzw. 650-710 nm (Chlorophyll) visualisiert.

In Abb. 3.3.4 wird die Autofluoreszenz der Chlorophylle rot und ROS (gefärbt mit CM-H<sub>2</sub>DCF-DA) grün dargestellt. Zusätzlich wird die Überlagerung beider Signale abgebildet. Durch Autofluoreszenz sind alle Protoplasten in rot sichtbar, während sie nur teilweise grün gefärbt vorliegen. Es war auffällig, dass die Protoplasten von *aox1a*-Mutanten eine stärkere, durch ROS verursachte Fluoreszenz aufwiesen als Protoplasten von WT-Pflanzen. Dies galt besonders nach der Behandlung mit AA. In Anbetracht der Ergebnisse in Kap. 3.3.1 scheint es nur in Pflanzen, in denen AOX1A fehlt und zusätzlich der CW durch AA inhibiert wird, zu einer zellschädigenden Wirkung durch ROS zu kommen. Die in Abwesenheit von AA weitaus geringere Menge an ROS in den *aox1a*-Pflanzen kann offensichtlich ohne schädigende Konsequenzen in der Zelle abgebaut werden.

### **3.3.3 Analyse verschiedener Metabolitgehalte in *aox1a*- und WT-Pflanzen nach Antimycin A-Behandlung**

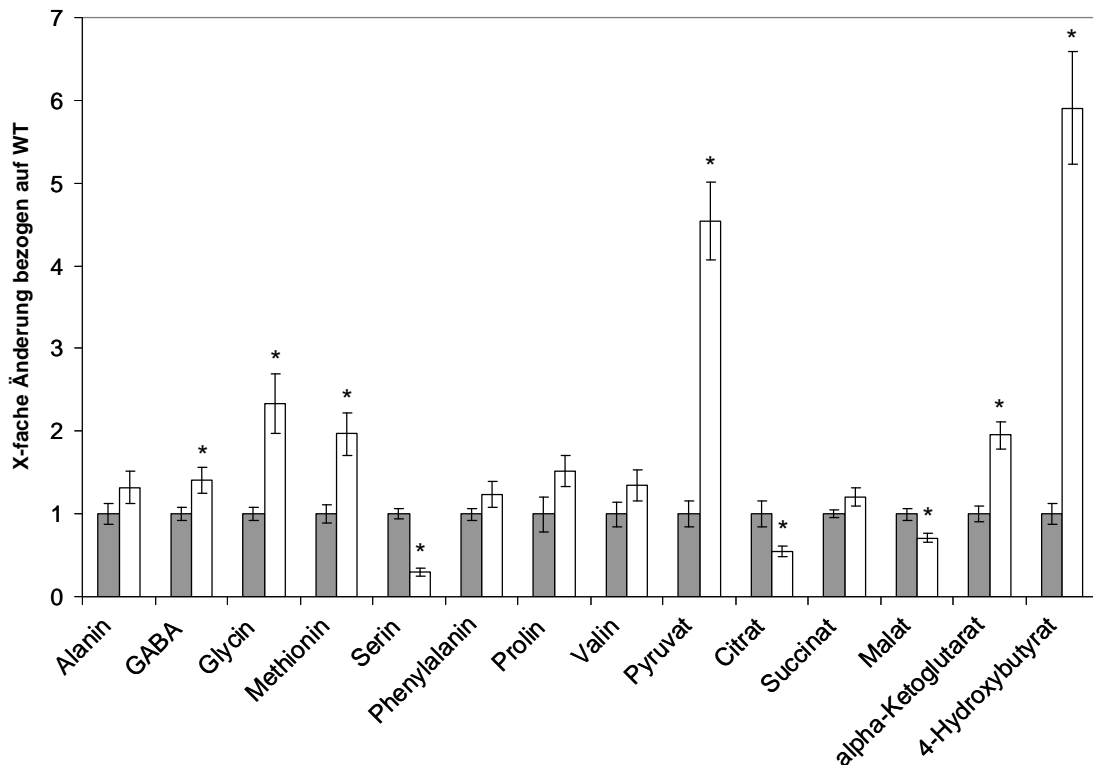
Anomalien von *ko*-Mutanten können Informationen über die physiologische Bedeutung des fehlenden Enzyms oder Aufschluss über Zusammenhänge im Stoffwechsel geben. Im Falle der *aox1a*-Mutanten gibt es während des Wachstums unter Kontrollbedingungen keine Unterschiede im Vergleich zum WT. Erst die Behandlung mit dem Inhibitor AA führte zu Gewebeveränderungen. Um weitere Informationen über die metabolischen Zusammenhänge dieses Phänotyps zu erhalten, wurde eine Analyse verschiedener Metabolitgehalte durchgeführt.

Eine Extraktion löslicher Metabolite wurde aus Blattscheiben von WT- und *aox1a*-Pflanzen vorgenommen, welche, wie in Kap. 2.2.3 beschrieben, 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Ab- bzw. Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA inkubiert wurden. Nachdem die Extrakte aus dem entsprechend behandelten Pflanzenmaterial hergestellt worden waren (siehe Kap. 2.4.6.1), wurden die Analysen mittels kombinierter GC/MS sowie die Kalkulation der Werte in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Alisdair Fernie am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm, Potsdam, nach LISEC *et al.* (2006) vorgenommen. Im Anhang 8.2 befinden sich die durchschnittlichen relativen Metabolitgehalte in Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen mit und ohne AA-Behandlung. Die Daten wurden jeweils auf die entsprechenden Bezugswerte des jeweiligen WT (in diesem Fall immer gleich 1) normalisiert.

Die größeren Unterschiede im Metabolitprofil zeichneten sich bei den Blattscheiben der *aox1a*- und WT-Pflanzen ab, die in Anwesenheit von AA vorinkubiert wurden. Für viele Metabolite konnten signifikante und sehr aufschlussreiche Abweichungen vom WT gemessen werden. In den *aox1a*-Pflanzen wurde ein signifikant höherer Gehalt der Aminosäuren  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA), Glycin und Methionin ermittelt (siehe Abb. 3.3.5). Der relative Seringehalt war jedoch niedriger als im entsprechenden WT. Indes konnten im Prolin-, Alanin-, Phenylalanin- und Valingehalt keine Änderungen vermerkt werden. Der Pyruvatgehalt war in den *ko*-Mutanten nach der AA-Behandlung vier Mal so hoch wie in den WT-Pflanzen (siehe Abb. 3.3.5). Gleichzeitig konnte bei der Analyse der Citrat-Zyklus-Intermediate eine signifikante Abnahme von Malat und Citrat sowie eine Zunahme von  $\alpha$ -Ketoglutarat gemessen werden. Interessanterweise kam es in *aox1a*- im Vergleich zu WT-Pflanzen nach einer AA-Behandlung zu einem sechsfachen relativen Anstieg des 4-Hydroxybutyratgehalts, einem Nebenprodukt des GABA-Katabolismus (siehe Abb. 3.3.5). In den Gehalten der Zucker Glucose, Fructose, Galactose und Raffinose gab es keine Unterschiede zu verzeichnen, während der Maltosegehalt anstieg (siehe Anhang 8.2; STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

Bezüglich der Metabolitgehalte in den Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen, die nicht mit AA vorinkubiert worden waren, waren einige Unterschiede zu verzeichnen. Die Citrat-Zyklus-Intermediate wie Citrat und Malat waren in der Mutante ebenfalls deutlich weniger enthalten, während das Niveau von Succinat und Fumarat unverändert blieb. Ohne AA-Behandlung wurden Gehalte von Glycin, Serin und Glycerat durch das Fehlen von AOX1A nicht beeinflusst. Bei der Analyse der Zucker wurde deutlich, dass der Gehalt an Trehalose und Melezitose in der Mutante im Vergleich zum WT deutlich reduziert wurde, während der Gehalt an Glucose, Fructose,

Saccharose, Raffinose und Ribose unverändert blieb (siehe Anhang 8.2; STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

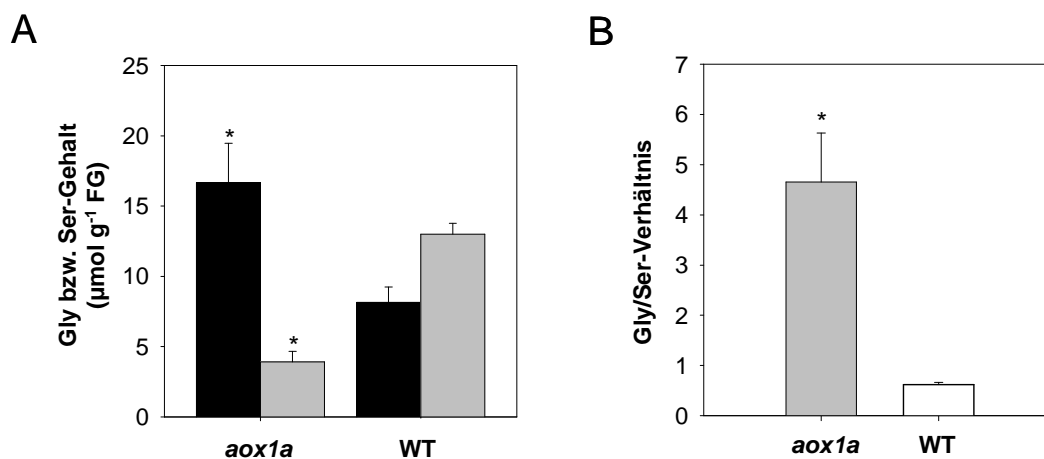


**Abb. 3.3.5: Relative Unterschiede verschiedener Metabolitgehalte zwischen *aox1a*- und WT-Pflanzen nach AA-Behandlung.** Lösliche Metabolite wurden aus Blattscheiben von WT- (graue Balken) und *aox1a*-Pflanzen (weiße Balken) extrahiert, welche 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA vorinkubiert wurden. Die Daten wurden jeweils auf den entsprechenden Bezugswert des WT (in diesem Fall immer gleich 1) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von insgesamt sechs voneinander unabhängigen Bestimmungen pro Genotyp. Ein Stern kennzeichnet die durch den *t*-Test errechnete Signifikanz der Unterschiede zum WT ( $P < 0.05$ ) (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

### 3.3.4 Auswirkungen von Antimycin A auf die Photorespiration in *aox1a*- und WT-Pflanzen

Anhand des Metabolitprofils (siehe Abb. 3.3.5) wurde deutlich, dass die Veränderungen des Gehalts von Serin und Glycin in *aox1a*-Pflanzen im Vergleich zu WT-Pflanzen nach AA-Behandlung einem entgegengesetzten Trend folgen. In Übereinstimmung mit der *cross over*-Theorie von ROLLESTON (1972) weisen solche Veränderungen oft auf eine Limitierung des GDC-katalysierenden Schritts hin. Wie bereits in Kap. 1.1 erwähnt, katalysiert die GDC während des photorespiratorischen Wegs in pflanzlichen Mitochondrien zusammen mit der Serin-Hydroxymethyl-

Transferase die Umwandlung von zwei Molekülen Glycin zu einem Molekül Serin (OLIVER, 1994). Dort werden zwei Moleküle Glycin unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_4^+$  zu einem Molekül Serin umgesetzt. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente werden auf  $\text{NAD}^+$  übertragen (DOUCE *et al.*, 1994). Das veränderte Verhältnis von Substrat zu Produkt könnte auf eine erhöhte Rate der Photorespiration zurückzuführen sein. Eine Quantifizierung der absoluten Serin- und Glycin-Gehalte wurde anhand von Kalibrierungskurven mit geeigneten Standards dieser Aminosäuren, wie von ROESSNER-TUNALI *et al.* (2003) beschrieben, durchgeführt. Dieses Verfahren erfolgte ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Alisdair Fernie am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm. Die daraus ermittelten absoluten Werte für die Gehalte an Glycin und Serin sowie die Glycin/Serin-Verhältnisse in beiden Genotypen nach AA-Behandlung sind in Abb. 3.3.6 dargestellt (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).



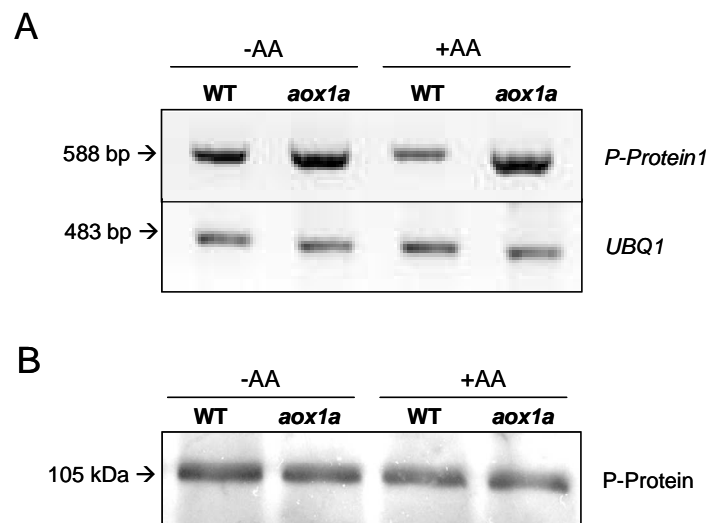
**Abb. 3.3.6: Vergleich der Glycin- und Serin-Gehalte in Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen, welche 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA inkubiert wurden.** **A:** Darstellung der absoluten Gehalte von Glycin (schwarze Balken) und Serin (graue Balken) in Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen nach AA-Behandlung. **B:** Darstellung des Glycin/Serin-Verhältnisses in Blattscheiben von *aox1a*-Mutanten (grauer Balken) und WT-Pflanzen (weißer Balken) nach AA-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von insgesamt sechs voneinander unabhängigen Bestimmungen pro Genotyp. Ein Stern kennzeichnet die durch den *t*-Test errechnete Signifikanz der Unterschiede zum WT ( $P < 0.05$ ) (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

Im Vergleich zum WT war der Gehalt an Glycin in den *aox1a*-Pflanzen signifikant höher, während der Serin-Gehalt signifikant niedriger war (siehe Abb. 3.3.6 A). Das Glycin/Serin-Verhältnis stieg in den Blattscheiben der Mutanten nach AA-Behandlung auf den Wert 4,6 an, während der Wert im WT nur 0,6 betrug (siehe Abb. 3.3.6 B).



In einem weiteren Ansatz sollte daraufhin untersucht werden, ob eine Limitierung des GDC-katalysierenden Schritts auf eine verminderte Enzymexpression oder auf ein erhöhtes Substratangebot zurückzuführen ist. Für die Analyse der Expression wurde an dieser Stelle das P-Protein1 gewählt, welches einen Teil des GDC1-Enzymkomplexes darstellt (Hauptisoenzym im Blatt). Zunächst wurde die Expression des *P-Proteins* auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Blattscheiben von WT- und *aox1a*-Pflanzen extrahiert, nachdem sie 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Ab- bzw. Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA inkubiert worden waren (siehe Kap. 2.2.3). Die RT-PCR wurde zum einen mit *P-Protein1*-spezifischen Primern und zum anderen als interne Kontrolle mit *UBQ1*-spezifischen Primern für 26 Zyklen durchgeführt. In Abb. 3.3.7 A ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Bei der PCR mit *UBQ1*-spezifischen Primern konnten mit der cDNA beider Genotypen jeweils mit und ohne AA-Vorbehandlung ähnlich starke Banden generiert werden. Bei der PCR mit *P-Protein1*-spezifischen Primern wurden unterschiedliche Produktmengen amplifiziert. In den *aox1a*-Pflanzen sowohl mit als auch ohne AA-Vorbehandlung konnten stärkere Signale als beim entsprechenden WT visualisiert werden. Unabhängig von einer AA-Wirkung konnte demnach auf transkriptioneller Ebene eine höhere Expression vom *P-Protein1* in den Mutanten im Vergleich zu den WT-Pflanzen nachgewiesen werden.

Um auch eine Aussage über die Expression des P-Proteins auf Proteinebene treffen zu können, wurde die Auswirkung von AA auf die Expression dieses Enzyms in *aox1a*- und WT-Pflanzen mittels *Western-Blot*-Analyse verglichen. Für die Analyse wurde Gesamt-Protein aus Blattscheiben beider Genotypen extrahiert, welche 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Ab- bzw. Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA inkubiert wurden. Für eine SDS-PAGE wurde jeweils  $40 \mu\text{g}$  Protein eingesetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe Kap. 2.4.4). Zur anschließenden Immundetektion wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das P-Protein eingesetzt. Dieser wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bauwe der Universität Rostock zur Verfügung gestellt und erkennt neben P-Protein1, als Hauptisof orm im Blatt, auch die Isoform P-Protein2. Bei der Immundetektion konnten oberhalb der 95 kDa-Markerbande diskrete Banden detektiert werden (siehe Abb. 3.3.7 B). Diese waren bei allen vier Proben in ähnlicher Intensität vorhanden. Das Fehlen von AOX1A sowie die Behandlung mit AA hatten demnach keinen größeren Einfluss auf die Menge des exprimierten P-Proteins, obgleich auf Ebene der Transkription bei den *ko*-Pflanzen eine Erhöhung sichtbar war (siehe Abb. 3.3.7 A).



**Abb. 3.3.7: Expressionsanalysen des *P-Proteins* als Bestandteil des GDC-Enzymkomplexes in Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen, welche 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Ab- bzw. Anwesenheit  $20 \mu\text{M}$  AA vorinkubiert wurden. **A:** Gelelektrophorese der mittels RT-PCR amplifizierten cDNA-Fragmente. Es wurden jeweils  $5 \mu\text{g}$  der extrahierten Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Davon wurde jeweils  $1 \mu\text{l}$  als Matrize für die PCR eingesetzt, welche zum einen mit *P-Protein1*-spezifischen Primern (R37 sense P1/2 und R107antisense P1; 26 Zyklen) und zum anderen als interne Kontrolle, mit *UBQ1*-spezifischen Primern (Nr. 215 und Nr. 216; 26 Zyklen) durchgeführt wurde. **B:** *Western-Blot-Analyse*. Es wurden jeweils  $40 \mu\text{g}$  des extrahierten Gesamt-Proteins für eine SDS-PAGE (12 %-ig) eingesetzt. Nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde der *Western-Blot* mit dem *P-Protein*-Antikörper (1:3000) und einem anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:30000) (BioRad, München) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels *ECL*-Färbelösung (GE Healthcare, München) auf einem Röntgenfilm (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).**

Aufgrund der in Abb. 3.3.7 dargestellten Analysen scheint sich das Verhältnis von Glycin zu Serin nicht durch eine verminderte Expression des *P-Proteins* in den *aox1a*-Pflanzen nach AA-Behandlung erhöht zu haben. Gründe dafür könnten eher in einem stark erhöhten Substratangebot oder auch in einem Mangel an  $\text{NAD}^+$  liegen, welches als Elektronenakzeptor in dieser Reaktion benötigt wird.

### 3.3.5 Auswirkungen einer Antimycin A-Behandlung auf photosynthetische Lichtnutzung in *aox1a*- und WT-Pflanzen

Da eine Abhängigkeit zwischen Chloroplasten und Mitochondrien im Licht bekannt ist, sollten in einem weiteren Versuch die Auswirkungen von AA auf den photosynthetischen Elektronentransport der *aox1a*-Mutanten untersucht werden. Dazu wurden an Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen mit und ohne AA-Vorbehandlung Chlorophyllfluoreszenzmessungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde hier, anders als bei den im Kap. 3.1.3.3 beschriebenen Messungen, das

Fluorometer *PAM-101* mit integriertem *PAM-103* (*flash trigger control*; Walz, Effeltrich), wie in Kap. 2.5.1 ausführlich beschrieben, verwendet. Anhand der Rohdaten wurden die jeweiligen Parameter bestimmt (siehe Kap. 2.5.1.2). Erläuterungen zur Bedeutung einzelner Parameter sind dem Kap. 3.1.3.3 zu entnehmen (pNP bezieht sich dabei genau wie NPQ auf die nicht-photochemische Löschung bzw. *quenching* der Anregungsenergie).

**Tab. 3.3.1: Effekt von AA auf verschiedene photosynthetische Parameter in WT- und *aox1a*-Pflanzen.** Die Messungen wurden an Blattscheiben mit Hilfe des Fluorometers *PAM-101* mit integriertem *PAM-103* (*flash trigger control*; Walz, Effeltrich) vorgenommen. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ,  $\pm$  Standardabweichung) (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

	-AA		+AA	
	WT	<i>aox1a</i>	WT	<i>aox1a</i>
$F_V/F_M$	$0,72 \pm 0,04$	$0,65 \pm 0,1$	$0,65 \pm 0,15$	$0,28 \pm 0,12$
qP	$0,96 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,2$	$0,93 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,11$
qNP	$0,45 \pm 0,08$	$0,33 \pm 0,09$	$0,45 \pm 0,17$	$1,87 \pm 1,15$
$\Phi_{II}$	$0,67 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,12$

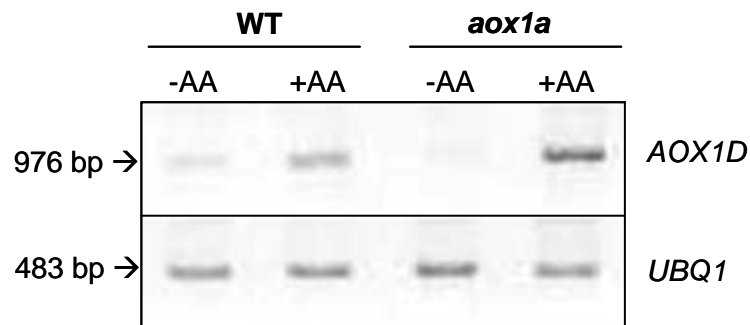
Zur Untersuchung der photosynthetischen Lichtnutzung wurden Blattscheiben von *aox1a*- und WT-Pflanzen verwendet, welche 6 h in Ab- bzw. Anwesenheit von AA (20  $\mu$ M) bei 120  $\mu$ E  $m^{-2} s^{-1}$  inkubiert wurden (siehe Kap. 2.2.3). Ohne AA-Behandlung zeigten *aox1a*- und WT-Pflanzen keine signifikanten Unterschiede in  $\Phi_{II}$ , qP, qNP und  $F_V/F_M$  (siehe Tab. 3.3.1). Es lässt sich also feststellen, dass der photosynthetische Elektronentransport durch das Fehlen von AOX1A allein nicht beeinflusst wird. Erst eine Behandlung mit AA hatte starke Auswirkungen auf den photosynthetischen Elektronentransport der *aox1a*-Pflanzen im Vergleich zum WT. Unter diesen Bedingungen kam es zu einem dramatischen Abfall des  $F_V/F_M$ -Verhältnisses von 0,65 im WT auf 0,28 in den Mutanten, was auf Photoinhibition hindeutet. Ein höherer Reduktionsgrad von  $Q_A$  des PSII (gezeigt durch qP) in den *aox1a*-Mutanten nach AA-Behandlung sowie eine niedrigere Quantenausbeute am PSII ( $\Phi_{II}$ ) bei steigendem qNP-Wert bestätigten diese Hypothese (siehe Tab. 3.3.1). Eine Abweichung von in der Literatur angegebenen „Normalwerten“ resultierte hier aus der Vorbehandlung, da diese Messungen üblicherweise direkt am Blatt (*in planta*) vorgenommen werden und nicht wie hier an vorinkubierten Blattscheiben. In diesem Fall stellen die Messungen des WTs, jeweils unter beiden Bedingungen, die Kontrolle dar.

Die hier dargestellten Ergebnisse geben Anzeichen für eine deutlich höhere Photoinhibition in den *aox1a*-Mutanten nach AA-Behandlung im Vergleich zu den WT-Pflanzen. Damit liegt die Vermutung nahe, dass AOX1A auch eine wichtige Rolle bei der Entsorgung überschüssiger Reduktionsäquivalente der photosynthetischen Elektronentransportkette übernimmt, was letztendlich zum Schutz des Photosyntheseapparats beiträgt.

### 3.3.6 Expressionsanalysen weiterer AOX-Isoformen in *aox1a*- und WT-Pflanzen nach Antimycin A-Behandlung

Wie bereits in Kap. 1.3 erwähnt, besitzt *A. thaliana* fünf verschiedene AOX-Isoformen, deren jeweilige Expression abhängig vom Entwicklungsstatus, Gewebetyp oder äußeren Einflüssen variieren kann (SAISHO *et al.*, 1997; CLIFTON *et al.*, 2006). Da AOX1A als Hauptisoform gilt und maßgeblich an Stressantworten beteiligt ist, war es nun interessant zu untersuchen, ob es in *aox1a*-Mutanten nach AA-Behandlung zu einer erhöhten Expression einer anderen AOX-Isoform kommt. Diese Frage stellte sich vor allem deshalb, weil die Mutanten unter normalen Wachstumsbedingungen keine Unterschiede zum WT zeigten, was auf eine Kompensation durch eine andere Isoform hindeutet. Da AOX2 in größerem Umfang nur in reifen und trockenen Samen exprimiert wird, wurden an dieser Stelle nur die Isoformen des AOX1-Typs (AOX1A-D) untersucht.

Der spezifische Nachweis der AOX-mRNA der verschiedenen Isoformen wurde mit Hilfe der RT-PCR-Analyse durchgeführt (siehe Kap. 2.3.5; Tab. 2.4). Gesamt-RNA wurde aus Blattscheiben von WT- und *aox1a*-Pflanzen extrahiert, welche 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Ab- bzw. Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  AA inkubiert wurden. Unterschiede zwischen *aox1a*-Mutanten und WT-Pflanzen wurden ausschließlich im Expressionsniveau der Isoform AOX1D detektiert. Ohne Vorinkubation mit AA war das Transkript von AOX1D kaum nachweisbar (siehe Abb. 3.3.8); durch eine AA-Behandlung wurde in beiden Genotypen die Expression von AOX1D induziert. Allerdings war ein deutlich stärkeres Signal bei den *aox1a*-Mutanten zu verzeichnen, was auf ein höheres Expressionsniveau in den Mutanten im Vergleich zu den WT-Pflanzen nach AA-Behandlung schließen lässt. Bei der PCR mit *UBQ1*-spezifischen Primern konnten in beiden Genotypen jeweils mit und ohne AA-Vorbehandlung ähnlich starke Banden generiert werden.



**Abb. 3.3.8: Gelelektrophorese der mittels RT-PCR amplifizierten cDNA-Fragmente zum Nachweis der *AOX1D*-Expression in *aox1a*- und WT-Pflanzen.** Gesamt-RNA wurde aus Blattscheiben beider Genotypen extrahiert, welche 6 h im Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ohne (-AA) bzw. mit Zugabe von  $20 \mu\text{M}$  AA (+AA) vorinkubiert wurden. Jeweils  $5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Davon wurde jeweils  $1 \mu\text{l}$  als Matrize für die PCR eingesetzt, welche zum einen mit *AOX1D*-spezifischen Primern (*AOX1D* for und *AOX1D* rew; 25 Zyklen) und zum anderen als interne Kontrolle mit *UBQ1*-spezifischen Primern (Nr. 215 und Nr. 216; 26 Zyklen) durchgeführt wurde (STRODTKÖTTER *et al.*, 2009).

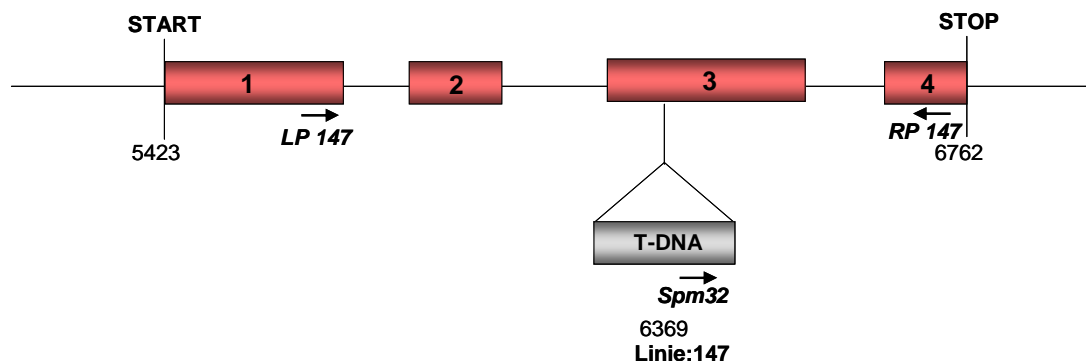
Es ist naheliegend, dass der Zusammenhang zwischen einer erhöhten *AOX1D*-Expression und dem Fehlen von *AOX1A* kompensatorische Gründe haben könnte. Darüber hinaus ist anzumerken, dass eine erhöhte Expression von *AOX1D* auch in seneszenten Blättern gefunden wurde und aufgrund dessen in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der Funktion von *AOX1D* und Seneszenz diskutiert wird (GUO *et al.*, 2004; SWIDZINSKI *et al.*, 2002; LIN & WU, 2004).

### 3.3.7 Identifizierung von *aox1a-aox1d*-Doppelmutanten

Im Kap. 3.3.6 wurde dargestellt, dass in den *aox1a*-Mutanten, die mit AA behandelt wurden, im Vergleich zum WT mit gleicher Behandlung die Expression von *AOX1D* deutlich höher war. Dies könnte kompensatorische und/oder durch Seneszenz hervorgerufene Gründe haben. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Ansatz verfolgt, in dem Doppelmutanten mit fehlender *AOX1A*- und *AOX1D*-Aktivität hergestellt werden sollten. Diese könnten wichtige Informationen über die physiologische Bedeutung beider Isoformen liefern.

In der Arbeitsgruppe stand bereits eine *AOX1D-ko*-Linie (*aox1d*) zur Verfügung. Unter der Leitung von Dr. Vera Linke wurden von Henning Metfies Pflanzen der Linie SM\_3\_24421 (interne Bezeichnung Salk 147) auf ihre Homozygotie bezüglich der Fremd-DNA-Insertion überprüft (METFIES, 2007). In Abb. 3.3.9 ist die Position der T-DNA in der Linie 147 im *AOX1D*-Gen als Ergebnis der Sequenzanalyse schematisch

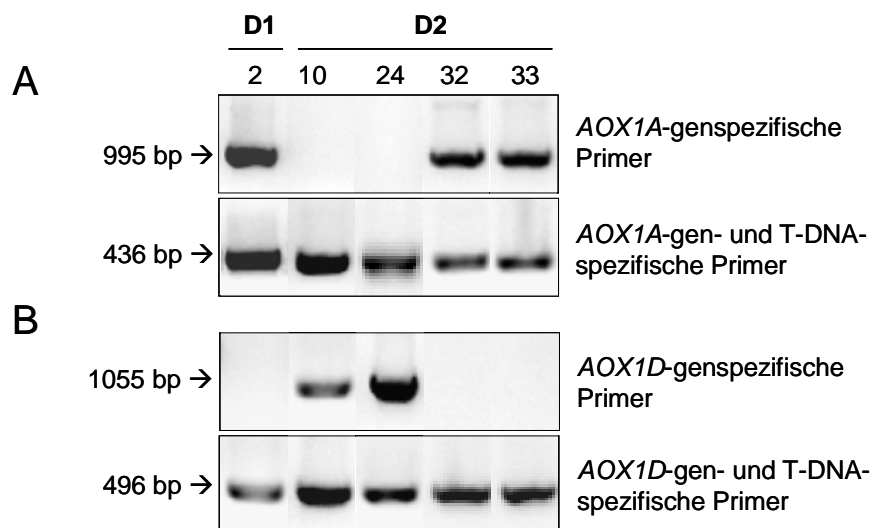
dargestellt. Sie zeigt das Gen At1g32350, die Lage der T-DNA und die Positionen der für das *Screenen* verwendeten Primer, welche als Pfeile dargestellt sind. Die T-DNA ist im dritten Exon inseriert. In ersten Anzuchten wurden keine phänotypischen Unterschiede zwischen WT- und *aox1d*-Pflanzen festgestellt. Diese *aox1d*-Mutanten der Linie 147 und die in Kap. 3.3 beschriebenen *aox1a*-Mutanten der Linie 133 wurden verwendet, um daraus, durch gegenseitige Bestäubung, Doppelmutanten hervorzubringen. Dazu wurden zum einen die *aox1a*-Mutanten (Nachkommen werden im Folgenden als D1-Linie bezeichnet) und zum anderen die *aox1d*-Mutanten als Mutterpflanze (Nachkommen werden im Folgenden als D2-Linie bezeichnet) verwendet. Nach dem Abreifen und der Aussaat der Samen wurden 36 Nachkommen der D1-Linie und 40 der D2-Linie mittels PCR-Analyse auf ihre T-DNA-Insertionen in beiden Genen überprüft. Die verwendeten Primer für den Nachweis der T-DNA-Insertion im *AOX1A*-Gen sind in Abb. 3.3.1 und die für den Nachweis im *AOX1D*-Gen in Abb. 3.3.9 als Pfeile dargestellt.



**Abb. 3.3.9: Schematische Darstellung der T-DNA-Lokalisation im *AOX1D* (*A.t.*)-Gen (*At1g32350*) der *aox1d*-Linie SM\_3\_24421 (interne Bezeichnung Linie 147) als Ergebnis der Sequenzanalysen.** Die Insertion der T-DNA befindet sich im dritten Exon; Gen- und T-DNA-spezifische Primer, welche für die PCR-Analysen verwendet wurden, sind als Pfeile, Exons rot und die T-DNA grau dargestellt.

Von den insgesamt 76 getesteten Pflanzen konnte keine mit T-DNA-Insertion in beiden Allelen beider Gene identifiziert werden. Einige Individuen wiesen allerdings Homozygotie bezüglich der T-DNA-Insertion in einem Gen aber Heterozygotie bezüglich der T-DNA-Insertion im jeweiligen anderen Gen auf. Zur Vereinfachung werden in Abb. 3.3.10 nur Ergebnisse der PCR-Analysen dieser Pflanzen dargestellt (alle anderen Pflanzen besaßen lediglich eine T-DNA in einem Allel der entsprechenden Gene). Mit genomischer DNA der Pflanze Nr. 10 und 24 der Linie D2 wurde bei der PCR mit einem *AOX1A*-gen- und einen T-DNA-spezifischen Primer ein

DNA-Fragment von 436 bp amplifiziert. Ein Produkt konnte ebenfalls mit dem *AOX1D*-gen- und dem entsprechenden T-DNA-spezifischen Primer generiert werden (496 bp). Daraus ließ sich schließen, dass in diesen Nachkommen eine T-DNA-Insertion in beide Gene erfolgt war. Bei weiteren PCR-Analysen wurde mit *AOX1D*-genspezifischen Primern ein Produkt amplifiziert (1055 bp), jedoch nicht bei Verwendung der *AOX1A*-genspezifischen Primer. Die Pflanzen Nr. 10 und 24 (Linie D2) besaßen also eine T-DNA-Insertion in beiden Allelen des *AOX1A*-Gens, jedoch nur in einem Allel des *AOX1D*-Gens. Bei Verwendung genomischer DNA der Pflanzen Nr. 2 der Linie D1 sowie Nr. 32 und 33 der Linie D2 konnten bei PCR-Analysen mit den jeweiligen gen- und T-DNA-spezifischen Primern ebenfalls Produkte in der erwarteten Größe amplifiziert werden; d.h. diese Pflanzen besaßen auch in mindestens einem Allel beider Gene eine Fremd-DNA-Insertion. Da bei der PCR-Analyse mit den jeweiligen genspezifischen Primern nur im Falle des *AOX1A*-Gens Produkte entsprechender Größe detektiert werden konnten, handelte es sich bei den Pflanzen Nr. 2 (Linie D1) sowie Nr. 32 und 33 (Linie D2) um homozygote Pflanzen bezüglich der T-DNA-Insertion im *AOX1D*-Gens, aber um heterozygote bezüglich der T-DNA-Insertion im *AOX1A*-Gen.



**Abb. 3.3.10: Agarosegelelektrophorese als Ergebnis einer PCR-Analyse zur Überprüfung der T-DNA-Insertion im *AOX1A*-Gen (A) und im *AOX1D*-Gen (B).** PCR-Analyse mit genomischer DNA der Nachkommen aus Kreuzungen von *aox1a*-Mutanten der Linie 133 mit *aox1d*-Mutanten der Linie 147. D1: *aox1a*-Mutante als Mutterpflanze; D2: *aox1d*-Mutante als Mutterpflanze; die Zahlen 2, 10, 24, 32 und 33 beziehen sich auf die Individuenummer der jeweils getesteten Pflanze. Primerkombinationen für T-DNA-Nachweis im *AOX1A*-Gen (At3g22370): LP133 und PP133 (genspezifisch) bzw. RP133 und LB 3 (gen- und T-DNA-spezifisch); Primerkombinationen für T-DNA-Nachweis im *AOX1D*-Gen (At1g32350): LP147 und PP147 (genspezifisch) bzw. RP147 und Spm32 (gen- und T-DNA-spezifisch).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Doppelmutanten mit homozygoter Fremd-DNA-Insertion in beiden Allelen des *AOX1A*- und des *AOX1D*-Gens identifiziert werden. Von den insgesamt 76 getesteten Pflanzen wurden die Samen der Pflanzen Nr. 2 (Linie D1), 10, 24, 32 und 33 (Linie D2) geerntet und für weitere Analysen verwahrt.

Der Wahrscheinlichkeit nach würde man unter den getesteten Individuen homozygote Mutanten beider Gene erwarten. Es ist also anzunehmen, dass das völlige Fehlen der *AOX1A*- und *AOX1D*-Aktivität für die Pflanzen letal ist. Dies wäre damit zu erklären, dass die erhöhte Expression von *AOX1D*, welche in AA-behandelten *aox1a*-Mutanten detektiert wurde, kompensatorische Gründe hat und nicht anderweitig kompensiert werden kann. Ausblickend sollte bei den Nachkommen der Pflanzen Nr. 2 (Linie D1), 10, 24, 32 und 33 (Linie D2), die jeweils mit sich selbst bestäubt werden, eine quantitative Analyse der Schoten sowie der darin enthaltenden Samen durchgeführt werden. Zusätzliche Analysen der Keimungsraten könnten Aufschluss über eine mögliche Letalität des Fehlens beider Isoformen geben.



## 4 Diskussion

### 4.1 Analyse der *nadp-mdh*-Mutanten

Ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Verbrauch von Reduktionsäquivalenten kann im Zellmetabolismus schnell zur Akkumulation von zellschädigenden ROS führen. Dies birgt besonders bei belichteten Pflanzen ein großes Gefahrenpotential. In einer natürlichen Umgebung sind Pflanzen ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Neben diurnalen oder saisonalen Veränderungen der Lichtqualität und Lichtquantität müssen sie vor allem in der Lage sein, sich auf schnelle Änderungen von Umwelteinflüssen einzustellen. So können sich, z.B. durch Wolken- oder Sonnenbewegungen, einstrahlende Lichtintensitäten innerhalb von wenigen Sekunden drastisch erhöhen. Um einer Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette vorzubeugen, verfügt die Pflanze u.a. über eine Reihe chloroplastidärer Schutzmechanismen, welche bei Einstrahlung überschüssiger Lichtenergie ablaufen können (NIYOI, 1999; EBERHARD *et al.*, 2008). Auf diese Weise wird die Entstehung von ROS minimiert und einer Photoinhibition entgegengewirkt.

Einen wichtigen Mechanismus zur Anpassung des ATP/NADPH-Verhältnisses in Chloroplasten stellt das Malat-Ventil dar. Eine NADP-abhängige Malatdehydrogenase (NADP-MDH) katalysiert dabei die Übertragung der Elektronen von NADPH auf Oxalacetat unter Bildung von Malat. Auf diese Weise wird NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor wieder bereitgestellt. So kann eine schädliche Überreduktion der Redoxüberträger der Photosynthesekette vermieden werden. Das entstandene Malat wird im Gegentausch mit Oxalacetat ins Cytosol transportiert (SCHEIBE, 2004). Um das komplizierte Netzwerk bestehend aus nicht-photochemischer Löschung, *poising* und antioxidativer Schutzmechanismen besser zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *nadp-mdh-ko*-Mutanten verwendet (siehe Kap. 3.1.1). Analysen dieser Mutanten sollen Aufschluss über mögliche weitere Funktionen des fehlenden Enzyms sowie über das Zusammenspiel verschiedener Schutzmechanismen geben.

#### 4.1.1 Phänotypischer Vergleich von *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen

Für einen ersten Vergleich wurden zeitgleich *nadp-mdh*-Mutanten und zur Kontrolle WT-Pflanzen ausgesät, pikiert und unter Kontrollbedingungen kultiviert. Überraschenderweise wurden keine Unterschiede in Wuchsform und Größe zwischen

*ko*- und WT-Pflanzen festgestellt (siehe Abb. 3.1.4). Auch die Bestimmung verschiedener physiologischer Parameter, wie spezifisches Frischgewicht, Wassergehalt, Chlorophyll a- und b-Gehalt sowie Proteingehalt, ergaben nahezu identische Ergebnisse für *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen (siehe Tab. 3.1.1). Sehr erstaunlich waren die Ergebnisse darauffolgender Wachstumsversuche mit verschiedenen Lichtintensitäten bzw. -spektren, schnell wechselnden Lichtintensitäten oder niedrigen Temperaturen, bei denen ebenfalls keine offensichtlichen Unterschiede zwischen beiden Genotypen zu erkennen waren (siehe Kap. 3.1.2). Selbst die Blühinduktion und die Entwicklung des Blütenstands schienen ungestört wie im WT zu verlaufen (siehe Abb. 3.1.5 C). Fehlende Veränderungen in der Pflanzenentwicklung sowie keine Anzeichen von oxidativen Stress deuten darauf hin, dass diese *ko*-Pflanzen das Fehlen des Malat-Ventils selbst unter hohen Lichtintensitäten mit Hilfe anderer Mechanismen erfolgreich ausbalancieren und ihre Redoxhomöostase aufrecht erhalten können. Besonders bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass es sich bei *NADP-MDH* um ein *single copy*-Gen handelt und demzufolge eine Kompensation durch weitere Isoformen in diesem Fall ausgeschlossen ist.

Zur Untersuchung des redoxregulierenden Netzwerks in *A. thaliana* wurden in der Vergangenheit zahlreiche Ansätze gewählt, bei denen redoxaktive Enzyme durch Mutationen z.B. überexprimiert oder ausgeschaltet wurden. Dabei hat sich herausgestellt, dass Pflanzen, insbesondere in Bezug auf die Photosynthese, über faszinierende Strategien verfügen, sich immer wieder anzupassen, um sich vor oxidativen Schäden zu schützen (HANKE *et al.*, 2009). Teilweise gehen diese Anpassungen mit großen morphologischen Veränderungen einher. So wurde 2008 von VOSS *et al.* demonstriert, wie *A. thaliana*-*Fd2*-T-DNA-Insertionslinien trotz des Verlusts des Haupt-Fd-Isoenzym im Blatt in der Lage waren, photoautotroph auf Erde zu wachsen und sich sogar fortzupflanzen. Diese Pflanzen wiesen allerdings niedrigere Wachstumsraten sowie geringere Chlorophyllgehalte auf. Bei *nadp-mdh*-Mutanten hingegen konnten bei Anzuchten unter Starklichtbedingungen keine phänotypischen Veränderungen festgestellt werden.

#### **4.1.2 Auswirkungen des Fehlens der NADP-MDH auf die photochemische Lichtnutzung**

Da die *nadp-mdh*-Mutanten selbst bei Anzucht unter Starklichtbedingungen keine offensichtlichen Anomalien entwickelten, stellte sich die Frage, welche Mechanismen das Fehlen des Malat-Ventils ausbalancieren und die Einstellung der Redox-

homöostase in diesen Pflanzen gewährleisten könnten. In einem ersten Versuch wurden (mit Hilfe eines Fluorimeters) Chlorophyllfluoreszenzmessungen an *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob Lichtintensitäten von  $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei den Mutanten andere Auswirkungen auf die photochemische Lichtnutzung bzw. den photosynthetischen Elektronentransport haben als bei WT-Pflanzen. Gleiche Verhältnisse von variabler zu maximaler Fluoreszenz ( $F_V/F_M$ ) und unveränderte  $\Phi_{II}$ -Werte in beiden Genotypen (siehe Tab. 3.1.2) machen deutlich, dass das Fehlen des Malat-Ventils auch unter Starklichtbedingungen nicht zu Photoinhibition führt. Des Weiteren zeigen vergleichbare  $\Phi_{II}$ -,  $qP$ - sowie NPQ-Werte (siehe Tab. 3.1.2) eine unveränderte photochemische Lichtnutzung in den Mutanten im Vergleich zum WT an. Auch der photosynthetische Elektronenfluss am PSII, gemessen mit dem ETR-Wert, war in *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen ähnlich (siehe Tab. 3.1.2).

Die *nadp-mdh*-Mutanten scheinen das Fehlen der NADP-MDH nicht mit einem erhöhten zyklischen Elektronentransport auszugleichen. In Folge eines erhöhten zyklischen Elektronentransports würde sich ein höherer  $\Delta\text{pH}$ -Wert über der Thylakoidmembran einstellen (JOHNSON, 2005). Dieser würde durch eine Erhöhung des NPQ-Werts angezeigt werden (KRAUSE & WEIS, 1991). Des Weiteren käme es im Falle von einsetzender Photoinhibition zu einer Verschiebung des Verhältnisses von variabler zu maximaler Fluoreszenz ( $F_V/F_M$ ) und zu veränderten  $\Phi_{II}$ -Werten (BJORKMANN & DEMMIG, 1987; GENTY *et al.*, 1989). Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen ergaben somit keinerlei Anzeichen für eine erhöhte Reduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette der Mutanten im Vergleich zum WT (siehe Tab. 3.1.2). Es lässt sich also festhalten, dass trotz hoher Lichtintensitäten kein Elektronenakzeptormangel am PSI der Pflanzen mit fehlendem Malat-Ventil besteht.

#### **4.1.3 Lichtakklimation von *nadp-mdh*-Mutanten zur Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase**

Eine Einstellung der Redoxhomöostase kann kurzfristig durch posttranslationale Mechanismen und durch metabolische Feinregulationen erreicht werden (SCHEIBE *et al.*, 2005). Länger andauernde Stressbedingungen können allerdings auch zu einer Veränderung der Genexpression führen. So können z.B. Veränderungen in Chloroplasten über retrograde Signale an den Zellkern vermittelt werden, um dort die Expression von Genen zu beeinflussen, die wiederum für chloroplastidäre Enzyme

kodieren (NOTT *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, welche Anpassungen im Stoffwechsel von *nadp-mdh*-Mutanten dafür sorgen, dass auch unter hohen Lichtintensitäten genügend Elektronenakzeptoren für die photosynthetische Elektronentransportkette bereitstehen, wurde eine 7-stündige Starklichtbehandlung von 750-800  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (als SL-Behandlung bezeichnet) gewählt. Ausschlaggebend bei dieser Behandlung war die Tatsache, dass sie in WT-Pflanzen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene zu einer erhöhten Expression der NADP-MDH führte (siehe Abb. 3.1.7). Demzufolge sollte die NADP-MDH unter diesen Bedingungen verstärkt beansprucht werden. In den *nadp-mdh*-Pflanzen müsste die SL-Behandlung daher zur Induzierung kompensierender Strategien führen.

#### 4.1.3.1 Unveränderte Aktivität des Beck-Halliwell-Asada-Wegs

*Nadp-mdh*-Mutanten, die vorher einer SL-Behandlung ausgesetzt worden waren, wurden auf metabolische Abweichungen untersucht. Analysen mittels *HPLC* ergaben dabei, dass die Gehalte an oxidiertem Glutathion (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) in den Mutanten nicht von denen im WT abwichen (siehe Abb. 3.1.8 B). Glutathion übernimmt neben einer Funktion als Cystein-Reserve auch eine wichtige Rolle beim Schutz der Pflanze vor oxidativen Schäden und bei der Redoxregulation (NOCTOR & FOYER, 1998; MULLINEAUX & RAUSCH, 2005). Unter anderem reagiert GSH dabei als nicht-enzymatisches Antioxidanz direkt mit ROS oder unterstützt die enzymatische Entgiftung von ROS als Reduktant von Dehydroascorbat im Beck-Halliwell-Asada-Weg (FOYER & HALLIWELL, 1976). Ein weiteres wichtiges Antioxidanz in Pflanzenzellen, welches ebenfalls im Beck-Halliwell-Asada-Weg als Reduktant wirkt, ist Ascorbat (GRODEN & BECK, 1979). Anhand des Metabolitprofils in Abb. 3.1.8 A, welches durch Analysen mittels GC/MS erstellt wurde, sind jedoch keine Unterschiede im L-Ascorbatgehalt zwischen *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach einer SL-Behandlung festzustellen.

Vorarbeiten von Beril Becker (BECKER, 2005) und bisher unveröffentlichte Analysen von Kooperationspartnern (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K.-J. Dietz der Universität Bielefeld sowie von Prof. Dr. E.-M. Aro der Universität von Turku, Finnland) zeigten, dass Enzyme, die im Beck-Halliwell-Asada-Weg wirksam sind, in den *nadp-mdh*-Mutanten im Starklicht nicht höher exprimiert werden. Diese Beobachtungen und die Untersuchungsergebnisse, dass in den *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen gleiche Mengenverhältnisse von GSH zu GSSG vorliegen, bilden einen weiteren Indikator dafür, dass in den Mutanten auch im SL keine Akzeptorlimitierung am PSI auftritt. Es

ist daher wahrscheinlich, dass andere kompensierende Mechanismen für die Oxidation von überschüssigem NADPH in den Chloroplasten der Mutanten dafür sorgen, NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor kontinuierlich wieder bereitzustellen.

#### 4.1.3.2 Unveränderte CO<sub>2</sub>-Assimilation

Im Licht führen Elektronen der photosynthetischen Elektronentransportkette zur Reduktion von Fd, von wo aus die Elektronen durch eine FTR direkt auf Trx übertragen werden können. Das reduzierte Trx kann dann zur Aktivierung redoxregulierter Enzyme führen (BUCHANAN, 1984). In Pflanzen wurden zwei Gruppen von Trx identifiziert, welche in Chloroplasten für eine lichtabhängige Regulation verschiedener, im Kohlenstoffmetabolismus involvierter Enzyme, einschließlich einiger Calvin-Zyklus-Enzyme, beteiligt sind: Trx f und Trx m (SCHÜRMAN & JACQUOT, 2000). So werden neben der NADP-MDH auch Enzyme wie die RubisCO-Aktivase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Phosphoribulokinase (PRK) oder die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) über das Fd-Trx-System unter Beteiligung von Trx f bzw. Trx m aktiviert (LEMAIRE *et al.*, 2007). Damit die NADP-MDH nicht mit Enzymen aus dem Calvin-Zyklus um den Erhalt von Reduktionsäquivalenten konkurriert, wirkt NADP<sup>+</sup> als spezifischer Effektor, hemmend auf die NADP-MDH-Aktivierung und auf die Aktivität. Auf diese Weise führt ein erhöhtes NADP<sup>+</sup>/NADPH-Verhältnis zur Absenkung der NADP-MDH-Aktivität (SCHEIBE & JACQUOT, 1983). Da ein Großteil der in der photosynthetischen Elektronentransportkette gebildeten Reduktionsäquivalente im Calvin-Zyklus verbraucht wird, stellte sich gleichwohl die Frage, ob das Fehlen der NADP-MDH unter hohen Lichtintensitäten Auswirkungen auf die CO<sub>2</sub>-Assimilation hat.

CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten in Abhängigkeit von der Lichtintensität, die mit Lichtintensitäten von 0-2000  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durchgeführt wurden, wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen auf (siehe Abb. 3.1.6). Bei der Analyse der Stoffwechselmetabolite mittels GC/MS wurden nach der SL-Behandlung in beiden Genotypen gleiche Saccharosegehalte ermittelt (siehe Abb. 3.1.8 A). In neueren Studien wird diskutiert, dass auch die Stärkesynthese einer Lichtregulation unterliegen könnte. Die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) katalysiert den limitierenden Schritt bei der Stärkesynthese. Bestimmend für die Aktivierung dieses Enzyms ist der Konzentrationsquotient von 3-Phosphoglycerat zu Phosphat (3-PGA/P<sub>i</sub>). Durch Analysen mit Kartoffelknollen (THIESSEN *et al.*, 2002; FU *et al.*, 1998) sowie *A. thaliana*-Blättern (HENDRIKS *et al.*, 2003) konnte unlängst auch demonstriert werden, dass dieses Enzym einer posttranslationalen Redox-Modifikation unterliegt. Das tetramere

Enzym wird dabei durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den zwei kleinen Untereinheiten (AGPB) inaktiviert. Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde auch der Stärkegehalt der *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach einer SL-Behandlung verglichen. Wie in Abb. 3.1.8 C dargestellt, wurden bei dieser Analyse keine signifikanten Abweichungen zwischen beiden Genotypen detektiert. Ähnliche CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten in Abhängigkeit von der Lichtintensität, unveränderte Gehalte der Photosyntheseendprodukte Saccharose und Stärke nach einer SL-Behandlung sowie gleiches Wachstumsverhalten unter SL-Bedingungen machen deutlich, dass überschüssige Reduktionsäquivalente in den Mutanten nicht durch eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Assimilation „entsorgt“ werden.

#### 4.1.3.3 Prolin als Redox-Puffer

Einem Metabolitprofil, welches durch Analysen mittels GC/MS erstellt wurde, ließen sich Differenzen zwischen *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen nach einer SL-Behandlung entnehmen. Während Glutamin, 5-Oxoprolin und Malat signifikante Abnahmen in den Mutanten aufwiesen, war der relative Gehalt an Aspartat und Prolin in den Mutanten nach der SL-Behandlung signifikant gestiegen (siehe Abb. 3.1.8 A). In den Mutanten liegt unter hohen Lichtintensitäten weniger Malat vor. Dies betrifft vor allem die Menge an in der Vakuole gespeichertem Malat, das den größten *Pool* darstellt. Aspartat wird aus Oxalacetat, dem Substrat der NADP-MDH gebildet. Dabei entsteht aus Oxalacetat und Glutamat durch eine Transaminierung durch die Glutamat-Oxalacetat-Aminotransferase Aspartat, welches die Vorstufe für fünf weitere Aminosäuren darstellt. Dazu kommen niedrigere Mengen an 5-Oxoprolin (auch als Pyroglutamat bezeichnet), einem Aminosäure-Derivat, und Glutamin (siehe Abb. 3.1.8 A), was insgesamt auf Veränderungen im Stickstoffmetabolismus der Mutanten hindeuten könnte.

Ein erhöhter Prolingehalt in den *nadp-mdh*-Mutanten nach einer SL-Behandlung im Vergleich zum WT (siehe Abb. 3.1.8 A) könnte auf eine Funktion des Prolins als Redox-Puffer bei extremen Umweltbedingungen zurückzuführen sein. Es wird angenommen, dass die Akkumulation von Prolin eine entscheidende Rolle bei der Erhöhung der Stressresistenz spielt. Bei Trockenheit sowie Salzstress soll es dabei als kompatible Substanz wirken (HARE & CRESS, 1997). Dabei wird Prolin eine Funktion als Schutzstoff zur Stabilisierung von Proteinstrukturen zugesprochen. Zudem könnte eine Akkumulation von Prolin eine Möglichkeit darstellen, den cytosolischen pH-Wert zu puffern und den Redoxstatus der Zelle zu stabilisieren (BELLINGER & LARHER, 1987;

HARE & CRESS, 1997). Prolin kann entweder aus Glutamat oder aus Ornithin gebildet werden, wobei die Synthese aus Glutamat als Hauptweg bei osmotischem Stress angenommen wird (VERBRUGGEN & HERMANS, 2008). Bei der Synthese von Prolin aus Glutamat werden zwei Moleküle NADPH verbraucht. Die Reduktionen werden von den Enzymen Prolin-5-Carboxylat-Synthase (P5CS) und Prolin-5-Carboxylat-Reduktase (P5CR) katalysiert. Ein hohes Niveau der Prolin-Synthese bei osmotischem Stress könnte das  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Verhältnis ausbalancieren (HARE & CRESS, 1997). Prolin-Biosynthese kann sowohl im Cytosol als auch in Plastiden, wie z.B. den Chloroplasten im grünen Gewebe, stattfinden. Es wird postuliert, dass P5CS dabei den limitierenden Schritt katalysiert. In *A. thaliana* konnten zwei P5CS-Isoenzyme identifiziert werden: P5CS1 und P5CS2. Es wurde nachgewiesen, dass es in den Mesophyllzellen bei osmotischem Stress zu einem erhöhten Import von P5CS1 in die Chloroplasten kommt (SZÉKELY *et al.*, 2008). Es wäre denkbar, dass bei der Akkumulation von Prolin in den *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen überschüssiges NADPH verbraucht wird, um  $\text{NADP}^+$  als Elektronenakzeptor bereitzustellen und eine Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette zu verhindern (siehe Abb. 4.1).

#### 4.1.3.4 Das NTRC-System als kompensierender *poising*-Mechanismus

Neben dem Beck-Halliwell-Asada-Weg gilt auch das NTRC-System als Mechanismus zur Beseitigung von Wasserstoffperoxid in Chloroplasten (SERRATO *et al.*, 2004). Die NTRC verfügt über eine NTR-Domäne am N-Terminus und eine Trx-Domäne am C-Terminus. Dadurch wird eine effiziente Reduktion der chloroplastidären 2-Cys Prx A und B unter Verbrauch von NADPH ermöglicht. Die reduzierten 2-Cys Prx übertragen die Elektronen auf Wasserstoffperoxid, wobei Wasser entsteht. Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen wurden in den *nadp-mdh*-Mutanten nach einer SL-Behandlung deutlich erhöhte Transkriptmengen des 2-Cys Prx B und leicht erhöhte Transkriptmengen der NTRC im Vergleich zu WT-Pflanzen nachgewiesen. Die Transkriptmengen des 2-Cys Prx A blieben jedoch unverändert (siehe Abb. 3.1.9 A). Auch die NTRC-Proteinmenge war in den Mutanten nach entsprechender Behandlung deutlich größer als in den WT-Pflanzen, während die Gesamtheit der 2-Cys Prx A und B-Proteinmenge in beiden Genotypen gleich geblieben ist (siehe Abb. 3.1.9 B). In der Gesamtheit deuten die Ergebnisse auf eine erhöhte Beanspruchung des NTRC-Systems in den *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen im Vergleich zu den WT-Pflanzen hin.

Da das NTRC-System in der Literatur als antioxidatives System beschrieben wird (SERRATO *et al.* 2004; RÉREZ-RIUZ *et al.*, 2006), könnte man vermuten, dass es in den *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen zu einer höheren Wasserstoffperoxid- bzw. ROS-Entwicklung kommt als in den WT-Pflanzen. Die Besonderheit des NTRC-Systems ist die Tatsache, dass es im Gegensatz zum FTR-Trx-System die Elektronen nicht vom Fd erhält, welches wiederum durch die photosynthetische Elektronentransportkette reduziert wird, sondern NADPH als Reduktant verwendet. Genau dieser Umstand ist Mittelpunkt eines Übersichtsartikels von SPINOLA *et al.* (2008). Die Autoren stellen darin verschiedene Hypothesen über mögliche Funktionen von NTRC bei der Bereitstellung von Elektronen mittels NADPH auf. So könnte NTRC z.B. als Verbindung zwischen 2-Cys Prx und APX bei der Reduktion von MDA oder DHA zu Ascorbat eine Rolle spielen.

Des Weiteren wird diskutiert, dass NTRC eine besondere Rolle bei der Eliminierung von ROS im Dunkeln spielen könnte, da unter diesen Bedingungen die Menge des reduzierten Fd an der photosynthetischen Elektronentransportkette rapide abfällt (SPINOLA *et al.* 2008). Das NTRC-System hätte so eine möglicherweise elementare Funktion in unbelichteten Chloroplasten. Obwohl die ROS-Entwicklung in belichteten Pflanzenzellen sehr viel höher ist, kann auch beim Wachstum unter Kurztagbedingungen, das heißt bei Unterschreiten einer kritischen Tageslänge, durch die Atmung während der Nacht oxidativer Stress aufgrund von ROS entstehen (BECHTHOLD *et al.*, 2004). Unter diesen Umständen könnten Reaktionen des oxidativen Pentose-Phosphat-Wegs (OPP), welche NADPH in nicht-photosynthetischen Plastiden bereitstellen (NEUHAUS & EMES, 2000), eventuell auch alternative Reduktionsäquivalente für die Eliminierung von ROS in Chloroplasten liefern. NTRC könnte dabei mit der Übertragung von Elektronen von NADPH auf 2-Cys Prx eine entscheidende Aufgabe übernehmen. Diese mögliche Funktion würde erklären, warum Stressbehandlungen bei anhaltender Dunkelheit auf Arabidopsis-T-DNA-Insertionslinien mit fehlender NTRC-Aktivität größere Auswirkungen haben als auf WT-Pflanzen (RÉREZ-RIUZ *et al.*, 2006). Hinweise für einen Zusammenhang zwischen OPP und NTRC bei der Beseitigung von ROS in Chloroplasten geben zudem die Ergebnisse von VOSS *et al.* (2008). Arabidopsis-Mutanten, denen das Hauptisoenzym von Fd (Fd2) im Blatt fehlt, wiesen nach einer Belichtung von mehreren Stunden höhere Expressionen von *NTRC* und *2-Cys Prx B* auf als die entsprechenden WT-Pflanzen. Erstaunlicherweise zeigten diese Mutanten nach der Belichtung von sieben Stunden auch erhöhte Aktivitäten der chloroplastidären Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), welche unter Bildung von NADPH die



erste Reaktion des OPPs katalysiert. Normalerweise wird der gleichzeitige Ablauf von OPP und Calvin-Zyklus in belichteten Chloroplasten dadurch verhindert, dass G6PDH im Licht über die Reduktion durch Trx inaktiviert wird. Bei den von Voss *et al.* (2008) beschriebenen Mutanten ist der photosynthetische Elektronentransport ins Stroma durch das Fehlen der Fd2-Isoform unterbrochen, was zu einem Mangel an freien Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH sowie einem niedrigeren Reduktionsgrad von Trx im Stroma führen könnte. Es wurde angenommen, dass diese Faktoren in den *Fd2-ko*-Mutanten selbst im Licht zu einer Aktivierung der G6PDH führen könnten. In diesen Pflanzen könnte die Bildung von NADPH über den OPP der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Eliminierung von ROS dienen. Dieses könnte durch die Katalyse von NTRC mit Hilfe von 2-Cys Prx B bewerkstelligt werden (Voss *et al.*, 2008).

In den Chloroplasten der *nadp-mdh*-Mutanten herrschen während einer SL-Behandlung eher gegenteilige Bedingungen, das heißt ein Überschuss an NADPH und ein erhöhter Redoxstatus von Trx. Eine gesteigerte Beanspruchung des NTRC-Systems in den *nadp-mdh-ko*-Pflanzen könnte demnach mehrere Auslöser haben. Falls es in den Mutanten im Vergleich zum WT unter SL-Bedingungen zu einer erhöhten ROS-Entwicklung käme, weil NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor am PSI fehlt, könnten ROS über das NTRC-System abgebaut werden, wodurch NADP<sup>+</sup> wieder als Elektronenakzeptor zur Verfügung gestellt werden würde. Auf diese Weise würden NTRC und chloroplastidäre 2-Cys Prx als antioxidatives System wirken. Es ist jedoch unklar, warum weder Enzyme noch Antioxidanzien des Beck-Halliwell-Asada-Wegs in den Mutanten unter SL-Bedingungen im Vergleich zu den WT-Pflanzen vermehrt vorkommen. Ein weiterer Auslöser für die gesteigerte Expression von *NTRC* und *2-Cys Prx B* könnte in einem erhöhten NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis liegen. Wasserstoffperoxid, welches während der SL-Behandlung in *nadp-mdh*-Mutanten potentiell im gleichen Maße entsteht wie in den WT-Pflanzen, könnte in den Mutanten vermehrt über das NTRC-System abgebaut werden, um ein Ungleichgewicht im NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis auszubalancieren und eine erhöhte ROS-Entwicklung zu verhindern (siehe Abb. 4.1). Auf diese Weise würde es nicht als antioxidatives, sondern als *poising*-System wirksam sein.

#### 4.1.3.5 Photorespiration als kompensierendes Ventil

Eine Inhibition von AOX bzw. das Fehlen der AOX1A-Isoform in den Mitochondrien führt im Licht zu einer Senkung der Photosyntheserate und zu einer Überreduktion der

photosynthetischen Elektronentransportkette (YOSHIDA *et al.*, 2007; PADMASREE & RAGHAVENDRA, 1999; STRODTKÖTTER *et al.*, 2009). Außerdem wurde demonstriert, dass die Menge und die Aktivität von AOX unter hohen Lichtintensitäten stark ansteigen (CLIFTON *et al.*, 2006). Diese Befunde sprechen dafür, dass AOX im Licht eine wichtige Rolle beim Verbrauch überschüssiger Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten zukommt. Bei *nadp-mdh*-Mutanten fehlt mit dem Malat-Ventil ein Hauptweg für den indirekten Transport von Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten ins Cytosol, von wo aus diese dann indirekt in die Mitochondrien transportiert werden könnten. Trotzdem erhöhte sich die *AOX1A*-Transkriptmenge unter SL-Bedingungen im Vergleich zu KL-Bedingungen in den *nadp-mdh*-Pflanzen in fast dem gleichen Maße wie in WT-Pflanzen (siehe Abb. 3.1.10). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Transport in die Mitochondrien bzw. die dortige Entsorgung von überschüssigen Reduktionsäquivalenten im SL in *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen gleichermaßen erfolgt und der Transport in den Mutanten demnach auf anderem Wege abläuft.

Im Photorespirationsweg findet in den Mitochondrien katalysiert durch GDC die Oxidation von zwei Molekülen Glycin zu einem Molekül Serin unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_4^+$  statt. Die gleichzeitig entzogenen Reduktionsäquivalente werden auf  $\text{NAD}^+$  übertragen. Das gebildete NADH kann u.a. Elektronen für die mitochondriale Atmungskette liefern. In Gerste-*ko*-Mutanten führte das Fehlen der mitochondrialen GDC unter photorespiratorischen Bedingungen zur Überreduktion bzw. Überenergetisierung der Chloroplasten. Außerdem verringerte sich die Expression von AOX, während die NADP-MDH-Aktivität anstieg (IGAMBERDIEV *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass Reduktionsäquivalente, die während des Photorespirationswegs bei der Oxidation von Glycin in die mitochondriale Atmungskette eingespeist werden, über den alternativen respiratorischen Weg (AW) abgeleitet werden können. Damit wäre die Photorespiration neben dem Malat-Ventil, in Verbindung mit dem Malat-Oxalacetat-*Shuttle* in die Mitochondrien oder externen NAD(P)H-Dehydrogenasen, ein weiterer wichtiger Mechanismus, überschüssige Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten in die Mitochondrien zu transportieren, um die Elektronen über den CW oder AW auf  $\text{O}_2$  zu übertragen.

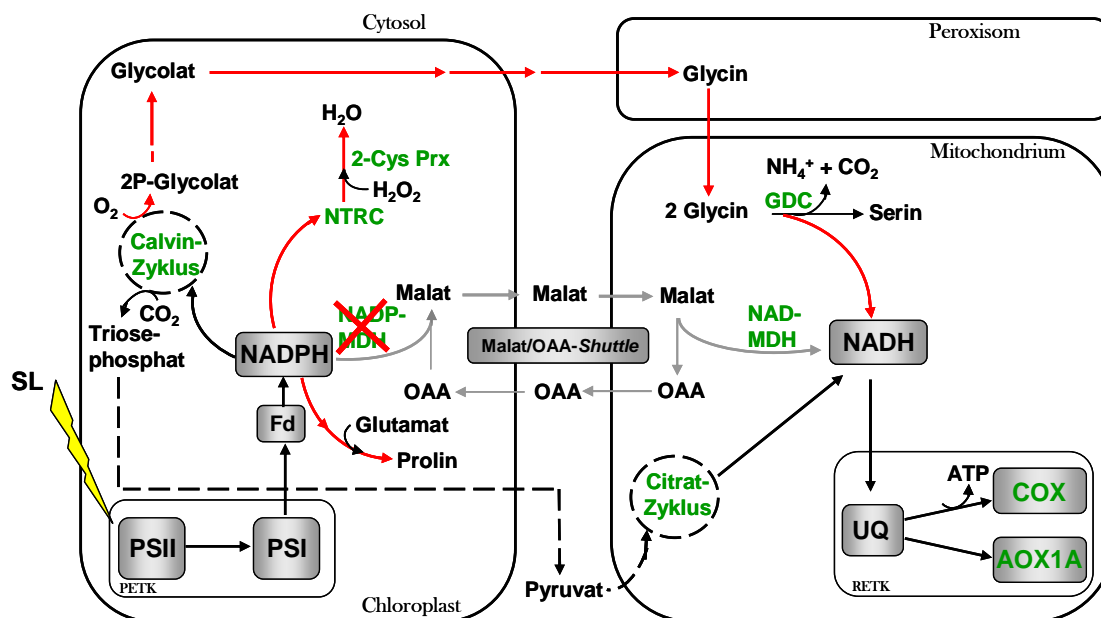
Photorespiration basiert auf der Oxygenierungsaktivität der RubisCO. Bei dieser Reaktion entstehen ein Molekül 3-Phosphoglycerat und ein Molekül 2-Phosphoglycolat. 2-Phosphoglycolat kann nicht direkt in den Calvin-Zyklus eingespeist werden, sondern wird in einer aufwendigen Reaktionskette, die sich über drei

Kompartimente erstreckt, wieder in 3-Phosphoglycerat umgewandelt (OGREN, 1984). Dieser Photorespirationsweg ist sehr energieaufwendig. Insgesamt wird beim Photorespirationsweg als Folge der RubisCO-Oxygenierungsaktivität mehr ATP und NAD(P)H verbraucht als im Calvin-Zyklus als Folge der RubisCO-Carboxylierungsaktivität. In *nadp-mdh*-Mutanten war bei einer Belichtung von  $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  der  $A_{\text{PR}}$ -Wert, das heißt der Anteil der apparenten Photorespiration an der maximalen RubisCO-Verbrauchsrate, deutlich höher als in den entsprechenden WT-Pflanzen (siehe Abb. 3.1.13). Zusätzlich wurden in den Mutanten nach einer SL-Behandlung erhöhte GDC-Transkriptmengen detektiert (Abb. 3.1.11). Eine Teilreaktion des photorespiratorischen Wegs ist die Oxidation von Glycolat zu Glyoxylat in den Peroxisomen. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird direkt in den Peroxisomen durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert. Untersuchungen der Katalaseaktivitäten in den *nadp-mdh*-Pflanzen nach einer SL-Behandlung ergaben, dass diese signifikant höher waren als in WT-Pflanzen nach gleicher Behandlung (siehe Abb. 3.1.12).

Zusammenfassend geben die Ergebnisse deutliche Hinweise auf erhöhte Photorespirationsraten in den *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen im Vergleich zum entsprechenden WT (siehe Abb. 4.1). Die Oxygenierungsaktivität wurde in der Vergangenheit eher als Relikt der evolutionären Entwicklung von RubisCO betrachtet, welche die Energieeffizienz der Photosynthese besonders in  $\text{C}_3$ -Pflanzen einschränkt. Es gab bereits viele Versuchsansätze, Pflanzen mit reduzierter Photorespirationsrate zu generieren, um Ernteerträge von  $\text{C}_3$ -Pflanzen wie z.B. Weizen und Reis erhöhen zu können. Diese führten bisher noch nicht zum erwünschten Erfolg (ANDREWS *et al.*, 2003; RAINES 2006; KHAN, 2007). Ein Grund dafür könnte in einer essentiellen Funktion des photorespiratorischen Wegs liegen, nämlich die photosynthetische Elektronentransportkette vor einer Überreduktion zu schützen (WU *et al.*, 1991; OSMOND *et al.*, 1997; KOZAKI & TAKEBA 1996, WINGLER *et al.*, 2000). So wurde bereits eine Reihe von *ko*-Pflanzen für Enzyme des Photorespirationswegs beschrieben, welche unter künstlich hohen  $\text{CO}_2$ -Bedingungen kultiviert werden konnten, aber unter einer natürlichen Luftzusammensetzung nicht einmal unter niedrigen Lichtintensitäten überleben konnten (z.B. BAUWE & KOLUKISAOGLU 2003; BOLDT *et al.*, 2005). In *nadp-mdh*-Pflanzen könnte der scheinbar „Energie-verschwendende“ Aspekt der Photorespiration einen essentiellen *poising*-Mechanismus darstellen, der unter SL-Bedingungen das Fehlen des Malat-Ventils kompensiert.

#### 4.1.3.6 Kompensierenden Strategien im Überblick

Die Redoxhomöostase wird in Pflanzen durch ein Netzwerk von Signalen kontrolliert, bei dem die Antwort auf einzelne Faktoren von den Interaktionen zwischen den regulatorischen Komponenten abhängig ist. Physiologische Veränderungen der *nadp-mdh*-Mutanten unter SL-Bedingungen könnten für eine veränderte Genexpression verantwortlich sein, welche die kompensierenden Reaktionswege induziert. Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette könnten dabei als Sensoren fungieren (PFANNSCHMIDT *et al.*, 1999; PFANNSCHMIDT, 2003). Eine Funktion bei der Signalübertragung und der Regulation könnten Metabolite, Antioxidanzien sowie ROS übernehmen (Foyer *et al.*, 2009).



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung von Reaktionswegen, die in *nadp-mdh*-Mutanten im Starklicht (SL) für den Erhalt der Redoxhomöostase sorgen.** Rote Pfeile symbolisieren verstärkt ablaufende, graue Pfeile nicht ablaufende Reaktionswege resultierend aus dem Fehlen der NADP-MDH-Aktivität. PETK: photosynthetische Elektronentransportkette; RETK: respiratorische Elektronentransportkette; UQ: Ubichinon; COX: Cytochrom c-Oxidase; OAA: Oxalacetat.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Bedeutung der NADP-MDH als Schlüsselenzym des Malat-Ventils mittels *ko*-Pflanzen näher zu beschreiben. Überraschenderweise bedeutete der Verlust des Enzyms keinerlei Anzeichen von oxidativem Stress unter den gewählten Versuchsbedingungen (Starklicht). Dieses Ergebnis ist umso erstaunlicher wenn man bedenkt, dass in *A. thaliana* nur eine Isoform des Enzyms existiert. Für die weiteren Analysen bedeutete dies, dass es

Mechanismen geben muss, die den Verlust der NADP-MDH ausgleichen können. In der Tat konnten im Rahmen dieser Arbeit drei mögliche Wege einer Kompensation identifiziert werden. Demnach ist zu vermuten, dass *nadp-mdh*-Mutanten durch eine erhöhte Beanspruchung des NTRC-Systems, höhere Photorespirationsraten und die Akkumulation von Prolin im SL für den Erhalt der Redoxhomöostase sorgen können (siehe Abb. 4.1). Die gewonnene Erkenntnis von drei potentiellen Kompensationsmechanismen bestätigt möglicherweise die wichtige Rolle der NADP-MDH, zeigt aber vor allem die Bedeutung eines regulatorischen Netzwerks zum Schutz des Redoxgleichgewichts. Somit konnte die Charakterisierung der *nadp-mdh*-Mutanten auf erstaunliche Art und Weise verdeutlichen, wie flexibel der Metabolismus von Pflanzen ist, um die Redoxhomöostase bei hohen Lichtintensitäten aufrecht zu erhalten und oxidative Schäden zu vermeiden.

## 4.2 Untersuchungen zur Promotorregion des *NADP-MDH*-Gens

Posttranslationale Regulationen erlauben schnelle Änderungen des Aktivierungsstatus der NADP-MDH. Länger andauernde Veränderungen verschiedener Umwelteinflüsse, wie höhere Lichtintensitäten oder niedrigere Temperaturen, führen unter Kurztagbedingungen nach einem anfänglich erhöhten Aktivierungsstatus der NADP-MDH auch zu einer erhöhten Expression bzw. Kapazität der NADP-MDH (SAVITCH *et al.*, 2001; BECKER *et al.*, 2006; siehe Abb. 3.1.7). In Arabidopsis wird die Expression des *NADP-MDH*-Gens nicht nur von Umwelteinflüssen beeinflusst, sondern scheint außerdem durch ein endogenes System der Pflanze kontrolliert zu werden. Studien von BECKER *et al.* (2006) lassen vermuten, dass die Tageslänge hierbei ein entscheidender Faktor ist. Da die NADP-MDH in Chloroplasten wirksam ist, aber das entsprechende Gen (At5g58330) im Kerngenom kodiert wird, geht man davon aus, dass Transkriptionsänderungen durch ein noch unbekanntes Signal aus den Chloroplasten an den Kern vermittelt werden. Aufgrund der „ungewöhnlichen“ Promotorstruktur des *NADP-MDH*-Gens stellt sich die Frage, wie das komplexe Expressionsmuster reguliert wird.

Das *NADP-MDH*-Gen verfügt nicht über einen Promotor, der in seinem Aufbau dem eines typischen RNA-Polymerase II-Typ-Promotors entspricht. Bioinformatische Analysen von HAMEISTER *et al.* (2007) ergaben, dass in der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens auf dem entsprechenden Gegenstrang ein Gen (At5g58340)

lokalisiert ist, welches für ein Protein mit noch unbekannter Funktion kodiert. Bioinformatische Datenbanken geben an, dass es sich dabei um ein DNA-Bindeprotein handelt, welches in transkriptionelle Regulationen involviert ist (*The Arabidopsis Information Resource, TAIR*; <http://www.arabidopsis.org/>). Das erste der insgesamt drei Exons des Gens At5g58340 beginnt bereits 319 bp stromaufwärts des TSS des *NADP-MDH*-Gens. Insgesamt beinhaltet das Gen 1575 bp und umfasst damit weite Teile der erwarteten *NADP-MDH*-Promotorregion (siehe Abb. 3.2.1). Außerdem fehlt in der 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens auch die TATA-Box als klassisches Element eines *Core*-Promotors. Dieses Fehlen der TATA-Box in Promotoren von *A. thaliana*-Genen ist nicht selten (HEHL *et al.*, 2004) und wurde vor allem bei *housekeeping*-Genen und Photosynthese-spezifischen Genen beschrieben (SHAHMURADOV *et al.*, 2005). In solchen Fällen wird die Transkription mittels anderer Faktoren eingeleitet (WIECZOREC *et al.*, 1998). WERNER *et al.* postulierten 1999 ein Modell mit vier *Core*-Promotortypen, welche eine Variabilität des „klassischen“ Promotormodells verdeutlicht. Demnach gibt es eine Einteilung in TATA-Box-*Core*-Promotor (ohne *INR* und *downstream*-Elemente), *INR*-*Core*-Promotor (ohne TATA-Box und *downstream*-Elemente), *composite*-*Core*-Promotor (nur TATA-Box und *INR*) sowie einem Null-*Core*-Promotor (nur *up*- und *downstream*-Elemente).

#### 4.2.1 Einfluss von T-DNA-Insertionen im Promotorbereich der *NADP-MDH*

HAMEISTER *et al.* (2007) belegten, dass der *NADP-MDH*-Promotorbereich innerhalb der von ihnen untersuchten Brassicaceen-Arten stark konserviert ist. Im Gegensatz dazu wurden in *Chlamydomonas* und einigen Poaceen-Arten typische Promotorelemente des *NADP-MDH*-Gens identifiziert. Interessanterweise besitzen diese in der 1200 bp langen 5'-vorgelagerten Region des *NADP-MDH*-Gens auf dem entsprechenden Gegenstrang kein weiteres Gen. Anders als bei Poaceen sind innerhalb der Brassicaceen-Arten die Introns des *NADP-MDH*-Gens stark konserviert (HAMEISTER *et al.*, 2007). In *A. thaliana* wurden mittels *Yeast-One-Hybrid*-Analysen für den 500 bp langen Abschnitt stromaufwärts der ATG-Sequenz des *NADP-MDH*-Gens nur drei putative DNA-Bindeproteine identifiziert, während 34 Bindeproteine für den kodierenden Bereich der *NADH-MDH* ermittelt wurden, unter anderem cytosolische Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Daher könnte eine cytosolische NAD-abhängige GAPDH unter bestimmten Umweltbedingungen einen Teil des Signalwegs darstellen, welcher in *A. thaliana* die erhöhte Expression der *NADP-MDH* und damit des Malat-Ventils induziert (HOLTGREFE *et al.*, 2008). In der

Literatur wurden bereits einige Beispiele für Transkriptionsfaktoren beschrieben, die innerhalb der kodierenden Region eines Gens binden. So z.B. auch für das *Fd1*-Gen, welches ein entscheidendes regulatorisches Element im kodierenden Bereich aufweist (DICKEY *et al.*, 1992). Im Falle der *NADP-MDH* lassen die Befunde insgesamt vermuten, dass regulatorische Elemente, die das komplexe Expressionsmuster dieses Gens in *A. thaliana* kontrollieren, im Laufe der Evolution in die kodierende Region verlagert wurden (HAMEISTER *et al.*, 2007). Ergänzende Studien hierzu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Homozygote Mutanten mit T-DNA-Insertionen im proximalen sowie im distalen Promotorbereich des *NADP-MDH*-Gens wurden hinsichtlich einer möglicherweise veränderten Expression der *NADP-MDH* untersucht. Die T-DNA der Linie 123 war dabei 420 bp und die T-DNA der Linie 125 1524 bp vor dem *TTS* des *NADP-MDH*-Gens inseriert (siehe Abb. 3.2.1). Transkriptionsfaktor-Datenbanken geben für den 1200 bp langen stromaufwärts des *NADP-MDH*-Gens gelegenen Bereichs eine Auswahl potentieller Bindestellen für Transkriptionsfaktoren an (HAMEISTER, 2005; *AthaMap*, <http://www.athamap.de>; siehe Anhang 8.4). Es ist daher zu vermuten, dass insbesondere die T-DNA-Insertion der Linie 123 zu einer Zerstörung von im entsprechenden Bereich liegenden regulatorischen Elementen führt, was die Expression des *NADP-MDH*-Gens beeinflussen würde. Mit Hilfe von *Western-Blot*-Analysen wurden jedoch weder in Pflanzen der Linie 123 noch in Pflanzen der Linie 125 Unterschiede in der *NADP-MDH*-Proteinmenge im Vergleich zum WT festgestellt (siehe Abb. 3.2.2). Beide Fremd-DNA-Insertionen scheinen also auf Translationsebene keinen Einfluss auf die Expression der *NADP-MDH* zu haben. Dieses Ergebnis untermauert die These, dass wichtige regulatorische Elemente im untersuchten Promotorbereich fehlen (HAMEISTER *et al.*, 2007).

In der Analyse der *NADP-MDH*-Promotorregion auf Transkriptionsfaktor-Bindemotive mit Hilfe einer Transkriptionsfaktor-Datenbank wurden potentielle Bindestellen für unterschiedliche Faktoren ermittelt. Den möglicherweise dort bindenden Transkriptionsfaktoren werden größtenteils Transkriptions-drosselnde oder verstärkende Eigenschaften zugeschrieben (HAMEISTER, 2005; *AthaMap*, <http://www.athamap.de>; siehe Anhang 8.4). Um detailliertere Aussagen über den Einfluss der T-DNA-Insertionen auf die *NADP-MDH*-Expression bei wechselnden Umwelteinflüssen treffen zu können, sind weitere Studien notwendig.

#### 4.2.2 Untersuchung der Promotoraktivität mittels GUS-Reportergen-Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des GUS-Reportergen-Systems untersucht, ob die 5'-vorgelagerte Region des *NADP-MDH*-Gens Promotoraktivität aufweist. Dafür wurde der 5'-stromaufwärts gelegene, 1992 bp große Sequenzabschnitt vor dem TSS des *NADP-MDH*-Gens gewählt. Dieser erstreckt sich über das gesamte Gen At5g58340 und wurde als Promotorfragment F2 bezeichnet (siehe Abb. 3.2.1). Die mit dem F2-GUS-Konstrukt transformierten Keimlinge wiesen nach der entsprechenden Behandlung eine deutliche Blaufärbung in den Sekundär- und Folgeblättern auf, welche sich über die gesamte Blattspreite erstreckte. Jedoch blieben die Cotyledonen, die Primärblätter und das Wurzelgewebe ungefärbt (siehe Abb. 3.2.4). Die Blaufärbung in den Sekundär- und Folgeblättern weist auf eine F2-vermittelte Glucuronidase-Aktivität hin. Hinsichtlich dieses Befunds weist der ausgewählte 1992 bp lange, 5'-stromaufwärts des *NADP-MDH*-Gens gelegene Sequenzabschnitt Promotoraktivität auf. Sollte es sich dabei um Promotoraktivität für das *NADP-MDH*-Gen handeln, würde man eine Korrelation zur *NADP-MDH*-Expression vermuten. Mittels *Western-Blot*-Analysen konnte allerdings beim Vergleich von Cotyledonen und Primärblättern mit Sekundär- und Folgeblättern kein signifikanter Unterschied in der *NADP-MDH*-Expression detektiert werden (siehe Abb. 3.2.5). Da sich veränderte Transkriptionsniveaus nicht zwangsläufig auf entsprechende Proteinmengen auswirken, wären zusätzliche Expressionsvergleiche auf Transkriptionsniveau von Vorteil. Eine hilfsweise Visualisierung von *NADP-MDH*-Genexpressionsdaten der Internetdatenbank *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.com>), welche mit Hilfe von *22K-Affymetrix Mikroarray Chips* erstellt wurden (ZIMMERMANN *et al.*, 2004), ist im Anhang 8.5 dargestellt. Für die Expression in Cotyledonen geben die Daten die höchsten Transkriptmengen wieder. Aufgrund der Diskrepanzen zwischen gewebespezifischen *NADP-MDH*-Expressionsanalysen (siehe Abb. 3.2.5; siehe Anhang 8.5) und der Lokalisation der Glucuronidase-Aktivität (siehe Abb. 3.2.4) bleibt die Frage unbeantwortet, ob es sich bei dem Sequenzbereich F2 um den „tatsächlichen“ Promotor des *NADP-MDH*-Gens handelt. Durchführungen weiterer Kontrollen sowie zusätzliche Versuche zur Klärung dieser Frage stehen noch aus.



### 4.3 Auswirkungen des Inhibitors Antimycin A auf den Stoffwechsel von *aox1a*- und WT-Pflanzen

AOX ist in Mitochondrien von Pflanzen, sowie einigen Pilzen und Protisten neben der Cytochrom c-Oxidase ein weiterer Bestandteil der Atmungskette. Beide Oxidasen konkurrieren um Elektronen, wodurch sich die mitochondriale Atmungskette auf Höhe des Ubichinon-Pools in den Cytochrom-Weg (CW) und den alternativen respiratorischen Weg (AW) verzweigt (HOEFNAGEL *et al.*, 1995). Der AW fungiert als nicht-Energie-konservierender Teil der Atmungskette, da im Gegensatz zum CW Membrankomplexe umgangen werden, an denen Protonen für die ATP-Bildung in den Intermembranraum gepumpt werden. AOX wird ab einem bestimmten Reduktionsgrad des Ubichinons aktiviert. Durch das Ableiten der Elektronen auf AOX wird der Reduktionsgrad des Ubichinon-Pools und folglich der gesamten mitochondrialen Atmungskette stabilisiert (HOEFNAGEL *et al.*, 1995; MILLENAAR *et al.*, 1998). Bisher schreibt man AOX drei Hauptfunktionen zu. Zum einen sorgt AOX für eine Kontinuität des Citrat-Zyklus, indem  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor regeneriert wird, auch wenn kein ATP-Bedarf in der Zelle besteht oder ADP für die Phosphorylierung bereitsteht (VANLERBERGHE & ORDOG, 2002). Zum anderen wird durch die Aktivität von AOX die Bildung von ROS vermieden, wenn der Elektronentransport über den CW limitiert ist (MAXWELL *et al.*, 1999; UMBACH *et al.*, 2005; AMIRSADEGHI *et al.*, 2006). Des Weiteren scheint AOX in belichteten Zellen eine wichtige Rolle beim Ableiten überschüssiger Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten zu übernehmen (PADMASREE & RAGHAVENDRA, 1999; YOSHIDA *et al.*, 2007, YOSHIDA *et al.*, 2008).

In *A. thaliana* wurden fünf Gene identifiziert, welche die verschiedenen Isoformen zweier Unterfamilien kodieren. Zu ihnen zählen *AOX1A*, *AOX1B*, *AOX1C*, *AOX1D* und *AOX2* (SAISHO *et al.*, 1997). *AOX1A* stellt dabei die Hauptisoform im Blatt dar und soll maßgeblich an Stressantworten beteiligt sein (CLIFTON *et al.*, 2006). Die *AOX1A*-Isoform lässt sich z.B. durch hohe Lichtintensitäten oder durch die Behandlung mit AA, einem Inhibitor des CWs, induzieren. Um die Funktion des *AOX1A*-Isoenzym im Stoffwechsel von *A. thaliana* genauer zu analysieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *aox1a-ko*-Mutanten untersucht. Damit sicher gestellt war, dass die Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen stattfinden, unter denen im WT eine erhöhte *AOX1A*-Aktivität bzw. Expression vorliegt, wurden die Mutanten entsprechend mit AA behandelt. Als Kontrolle diente dabei der WT nach gleicher Behandlung.

### 4.3.1 Phänotypischer Vergleich von *aox1a*- und WT-Pflanzen

Erste Anzuchten von *aox1a*- und WT-Pflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen (Kontrollbedingungen: Kurztag;  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wiesen keinerlei phänotypische Unterschiede zwischen beiden Genotypen auf. Dies könnte unter anderem auf die moderaten Lichtbedingungen zurückzuführen sein. Bereits eine Woche nach AA-Behandlung hingegen konnten bei den Mutanten deutliche Schädigungen des Gewebes festgestellt werden, während die entsprechenden WT-Pflanzen von der Behandlung unbeeinflusst blieben (siehe Abb. 3.3.2). Der durch die Behandlung inhibierte CW konnte in den WT-Pflanzen scheinbar mit einer erhöhten Expression von AOX1A kompensiert werden. Erst das Fehlen des AOX1A-Isoenzym, bei gleichzeitiger Inhibition des CWs, führte zu nekrotischen Gewebeveränderungen (siehe Abb. 3.3.2). Weitere Analysen ergaben, dass Blattscheiben von *aox1a*-Mutanten nach AA-Behandlung deutlich höhere Membrandurchlässigkeiten aufwiesen als Blattscheiben von WT-Pflanzen nach gleicher Vorbehandlung (siehe Abb. 3.3.3). Dieser Befund sowie die nekrotischen Blattveränderungen von *aox1a*-Keimlingen nach AA-Behandlung, könnten auf Membranschädigungen infolge von Lipidperoxidationen zurückzuführen sein, welche durch erhöhte ROS-Akkumulationen verursacht werden können (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; ESTERBAUER *et al.*, 1991; WITZ, 1989). Aus diesem Grund wurde eine ROS-Färbung von Mesophyll-Protoplasten von *aox1a*- und WT-Pflanzen nach entsprechenden Behandlungen vorgenommen. Die Analysen ergaben eine erhöhte ROS-Bildung in *aox1a*-Mutanten, sowohl mit als auch ohne AA-Behandlung, wobei die Signale bei den Proben nach AA-Behandlung deutlich stärker waren (siehe Abb. 3.3.4). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Fehlen der AOX1A-Isoform in *A. thaliana* auch ohne Inhibition des CW zu einer erhöhten ROS-Bildung führt. Jedoch scheinen die Pflanzen in der Lage zu sein, dieses ohne zellschädigende Konsequenzen abbauen zu können.

WATANABE *et al.* (2008) wiesen eine verstärkte Expression von AOX1A in Arabidopsis-WT-Pflanzen bei niedrigen Temperaturen nach und wählten daher diese Behandlung zur Analyse von Arabidopsis-*aox1a-ko*-Mutanten. Zwar zeigten *aox1a*-Mutanten und WT-Pflanzen bei Studien unter diesen Bedingungen keine phänotypischen Unterschiede, dennoch detektierten die Autoren u.a. erhöhte Transkriptmengen von Genen antioxidativer Systeme sowie Veränderungen im Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus. Zusätzlich wurden von GIRAUD *et al.* (2008) Versuche mit Arabidopsis-*aox1a-ko*-Mutanten durchgeführt, welche moderaten Lichtbedingungen in Verbindung mit Trockenstress ausgesetzt worden waren. Infolge dieser Behandlung

zeigten die *aox1a*-Mutanten bereits bei Anzuchtversuchen Stress-induzierte Anomalien. Neben einer auffälligen Akkumulation von Anthocyanen sowie einem reduzierten Wurzelwachstum wurden erhöhte Mengen von Superoxidradikalen in den Mutanten im Vergleich zum WT nachgewiesen. In der Vergangenheit wurden oft Versuchsansätze gewählt, in denen alle AOX-Isoformen spezifisch mit Salicylhydroxamsäure (SHAM) inhibiert wurden. Folgen dieser Inhibition konnten Aufschluss über die Funktionen von AOX im Allgemeinen geben (z.B. PADMASREE & RAGHAVENDRA, 1999; BARTOLI *et al.*, 2005). Anders sind Ansätze mit T-DNA-Insertionslinien, da diese durch „Ausschalten“ einzelner Gene eine gezielte Aufklärung der Funktionen einzelner Isoenzyme leisten können. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse, unter Berücksichtigung aktueller Literatur, geben eindeutige Hinweise auf eine besondere Funktion der AOX1A-Isoform in *A. thaliana* bei der Vermeidung einer ROS-Akkumulation unter Stressbedingungen (GIRAUD *et al.*, 2008; WATANABE *et al.*, 2008).

#### **4.3.2 Einfluss von Antimycin A auf verschiedene Metabolitgehalte in *aox1a*-Mutanten und WT-Pflanzen**

Analysen verschiedener Metabolite in Blattscheiben von *aox1a*-Mutanten sowie WT-Pflanzen, die vorher einer AA-Behandlung ausgesetzt worden waren, lassen auf signifikante Unterschiede im Stoffwechsel der Mutanten schließen. In den *aox1a*-Pflanzen wurde ein signifikant höherer Gehalt der Aminosäuren GABA und Methionin ermittelt, während im Prolin-, Alanin-, Phenylalanin- und Valingehalt keine Änderungen vermerkt wurden (siehe Abb. 3.3.5). Interessanterweise kam es in *aox1a*- im Vergleich zu WT-Pflanzen nach einer AA-Behandlung auch zu einem sechsfachen relativen Anstieg des 4-Hydroxybutyratgehalts (siehe Abb. 3.3.5), einem Nebenprodukt des GABA-Katabolismus. GABA wird hauptsächlich über einen Stoffwechselweg synthetisiert, der als GABA-*Shunt* bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um einen Nebenweg des Citrat-Zyklus, bei dem aus  $\alpha$ -Ketoglutarat Succinat gebildet wird. Katalysiert wird dieser Weg über eine cytosolische Glutamat-Decarboxylase und über die mitochondrialen Enzyme GABA-Transaminase und Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase. Im pflanzlichen Metabolismus wird diesem Reaktionsweg eine besondere Rolle zugeschrieben, da eine schnelle und beträchtliche Synthese von GABA als Antwort auf biotische sowie abiotische Stressfaktoren nachgewiesen wurde (BOWN & SHELP, 1997; SATYANARAYAN & NAIR, 1990; KINNERSLEY & TURANO, 2000). Es wurde angenommen, dass dabei sowohl ein Stress-induziertes Absinken des cytosolischen pH-Werts als auch ein Ansteigen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration zu einer erhöhten Aktivität der Calmodulin-abhängigen Glutamat-Decarboxylase führt. Infolgedessen soll es zur Akkumulation von GABA kommen (BOWN & SHELP, 1997; SNEDDEN & FROMM, 1999). Neuere Studien geben ebenfalls Hinweise darauf, dass GABA eine besondere Bedeutung als Signalmolekül bei der Stressantwort hat (BOUCHE & FROMM, 2004) sowie eine spezielle Funktion im Kohlenhydrat- und Stickstoff-Primärstoffwechsel übernimmt, insbesondere bei anaplerotischen Reaktionen (PLAXTON & PODESTÁ, 2006; FAIT *et al.*, 2008).

Der Pyruvatgehalt war in den *aox1a*-Mutanten nach der AA-Behandlung vier Mal so hoch wie in den WT-Pflanzen. Gleichzeitig konnte bei den Citrat-Zyklus-Intermediaten eine signifikante Abnahme von Malat und Citrat sowie eine Zunahme von  $\alpha$ -Ketoglutarat gemessen werden (siehe Abb. 3.3.5). Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass in *aox1a*-Mutanten mit AA-Behandlung erhebliche Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel vorliegen. Es ist denkbar, dass die Oxidation von NADH an der mitochondrialen Atmungskette der Mutanten bei Inhibition des CWs nicht mehr reibungslos ablaufen kann. Demnach wäre die Funktion des Isoenzym AOX1A unter Stressbedingungen elementar, um die Kontinuität des Citrat-Zyklus sicherzustellen.

#### **4.3.3 Auswirkung des Fehlens von AOX1A auf die Expression der übrigen AOX1-Isoformen**

*A. thaliana* besitzt fünf verschiedene AOX-Isoformen, deren jeweilige Expression abhängig von Entwicklungsstatus, Gewebetyp oder äußeren Einflüssen variieren kann (SAISHO *et al.*, 1997; CLIFTON *et al.*, 2006). Durch Transkriptanalysen der verbleibenden AOX1-Typ-Isoformen in *aox1a*-Mutanten, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, konnten ausschließlich Expressionsänderungen von AOX1D nachgewiesen werden. Während das AOX1D-Transkript in *aox1a*- und WT-Pflanzen ohne AA-Behandlung kaum detektierbar war, wurde die Expression in beiden Genotypen durch eine AA-Behandlung induziert. Ein wesentlich höheres Expressionsniveau war dabei in den Mutanten zu verzeichnen (siehe Abb. 3.3.8). Es ist wahrscheinlich, dass das AOX1D-Isoenzym in den *aox1a*-Mutanten eine kompensatorische Funktion übernimmt. Dies würde erklären, warum diese Pflanzen weder beim Wachstum unter normalen Lichtbedingungen (siehe Abb. 3.3.2) noch bei niedrigen Temperaturen (WATANABE *et al.*, 2008) phänotypische Auffälligkeiten aufwiesen. Zudem führten Versuche, *aox1a-aox1d*-Doppelmutanten zu generieren, bisher nicht zum Erfolg (siehe Abb. 3.3.10). Es ist also denkbar, dass Pflanzen, denen beide Isoformen fehlen, nicht lebensfähig sind, was die These von

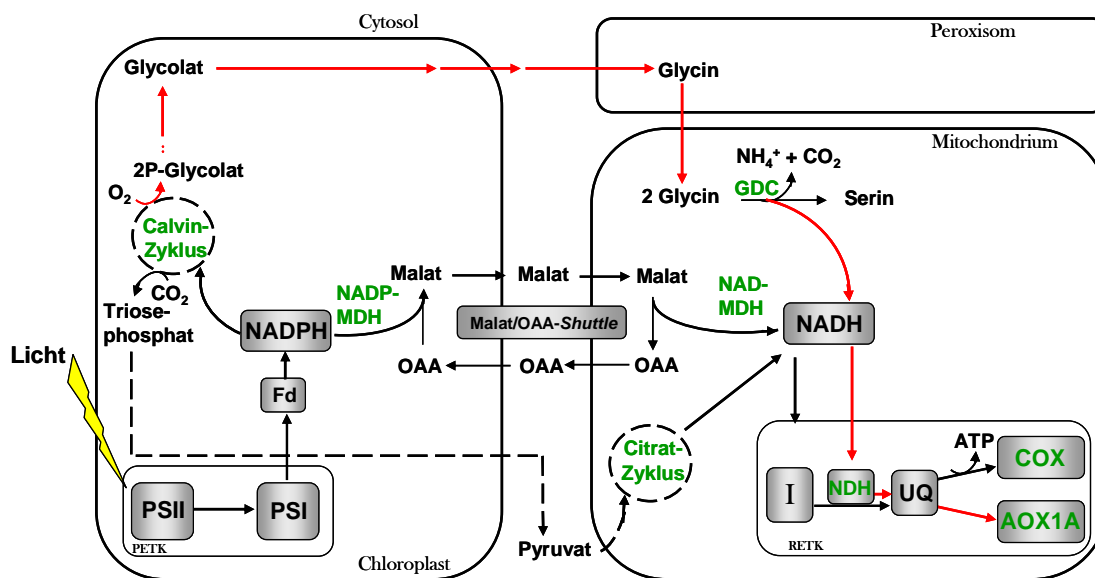
AOX1D als kompensierendes Isoenzym in *aox1a*-Mutanten unterstützen würde. Mehr Aufschluss darüber sollten weitere *aox1a-aox1d*-Kreuzungsversuche sowie genaue Analysen der Nachkommen geben.

Interessanterweise demonstrierten GRAY *et al.* (2004), dass die Zugabe organischer Säuren des Citrat-Zyklus und, unabhängig davon, eine gesteigerte mitochondriale ROS-Bildung zu erhöhten AOX1-Expressionen in Tabakzellen führen. Daraus wurde geschlossen, dass sowohl ein ROS-spezifischer als auch ein Metabolit-spezifischer Signalweg von den Mitochondrien zum Kern in Frage kommt, welcher die Transkription der kernkodierte AOX1 induziert. Die erhöhten Transkriptmengen von AOX1D in Arabidopsis-*aox1a*-Mutanten in Anwesenheit von AA (siehe Abb. 3.3.8) werfen die spannende Frage nach der Regulation der Expression dieser Isoform in *A. thaliana* auf. Von ansteigenden AOX1D-Transkriptmengen wurde bisher auch im Zusammenhang mit Seneszenz, Anpassung an Stickstoffangebot sowie abiotischem Stress berichtet (CLIFTON *et al.*, 2006; ESCOBAR *et al.*, 2006; ZSIGMOND *et al.*, 2008). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass für die erhöhte Expression der AOX1D-Isoform ROS und/oder Pyruvat als Signal an den Kern wirken könnten. Beides wurde nach einer AA-Behandlung in den *aox1a*-Mutanten im Vergleich zum WT in gesteigerten Mengen nachgewiesen (siehe Abb. 3.3.4 und 3.3.5). Aber auch GABA, welches ebenfalls in signifikant höheren Mengen vorlag, kommt als Signalmolekül für eine veränderte Genexpression in den Mutanten in Frage. Unterstützend für diese These ist, dass in seneszenten Arabidopsis-Blättern neben erhöhten Transkriptmengen der AOX1D-Isoform (CLIFTON *et al.*, 2006) auch eine Akkumulation von GABA nachgewiesen wurde (DIAZ *et al.*, 2005).

#### **4.3.4 Auswirkungen auf photosynthetische Lichtnutzung und Photorespiration**

Um im Licht eine Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette zu vermeiden und oxidativen Schäden entgegenzuwirken, ist es notwendig, dass überschüssige Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten abgeleitet werden (NIYOGI, 1999; NIYOGI, 2000). Diese könnten auf unterschiedlichen Wegen in die Mitochondrien transportiert werden. Die entsprechenden Elektronen können dort in die respiratorische Elektronentransportkette eingespeist werden, wo sie im CW der ATP-Gewinnung dienen oder im AW abgeleitet werden können. Es wird jedoch angenommen, dass speziell bei der „Entsorgung“ überschüssiger Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten der AW beansprucht

wird (RAGHAVENDRA & PADMASREE, 2003). Bisherige Studien mit transgenen Pflanzen lassen vermuten, dass in *A. thaliana* das AOX1A-Isoenzym dabei die entscheidende Funktion übernimmt (UMBACH *et al.*, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2007; YOSHIDA *et al.*, 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Chlorophyllfluoreszenzmessungen unterstützen diese These. In Blattscheiben von *aox1a*-Mutanten wurden dabei nach einer AA-Behandlung im Vergleich zum entsprechenden WT verstärkte Anzeichen für Photoinhibition nachgewiesen (siehe Tab. 3.3.1). Ferner detektierten GIRAUD *et al.* (2008) in *Arabidopsis-aox1a*-Mutanten, die Trockenstress und moderaten Lichtbedingungen ausgesetzt worden waren, eine erhöhte nicht-photochemische Löschung der einstrahlenden Lichtenergie. Interessanterweise wurden in diesen Pflanzen, nach entsprechender Behandlung, auch Transkriptänderungen als spezifische Antwort auf in Chloroplasten gebildeter ROS nachgewiesen.



**Abb. 4.3: Schematische Darstellung einiger Reaktionswege, die im Licht zur Produktion von Reduktionsäquivalenten in den Mitochondrien führen.** Rote Pfeile symbolisieren einen postulierten Stoffwechselweg über den AOX1A in *A. thaliana* unter photorespiratorischen Bedingungen dazu beitragen könnte, überschüssige Reduktionsäquivalente aus dem Chloroplasten zu „entsorgen“, um so die photosynthetische Elektronentransportkette vor Überreduktion zu schützen. PETK: photosynthetische Elektronentransportkette; RETK: respiratorische Elektronentransportkette; I: Komplex I; NDH: NADH-Dehydrogenase; UQ: Ubichinon; COX: Cytochrom c-Oxidase; OAA: Oxalacetat.

Die Photorespiration gilt als „energieableitender“ Mechanismus, der dazu beitragen kann, den Photosyntheseapparat vor Photoinhibition zu schützen (z.B. WU *et al.*, 1991; KOZAKI & TAKEBA, 1996; OSMOND *et al.*, 1997; WINGLER *et al.*, 2000). Im Photorespirationsweg findet in den Mitochondrien die Umsetzung von zwei Molekülen Glycin

zu einem Molekül Serin unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_4^+$  und der Reduktion von  $\text{NAD}^+$  statt. Diese Reaktion wird von GDC katalysiert. Das bei der Glycin-Oxidation entstehende NADH kann u.a. Elektronen für die mitochondriale Atmungskette liefern. In Gerste-Mutanten führte eine stark verringerte GDC-Aktivität unter photorespiratorischen Bedingungen zur Überreduktion bzw. Überenergetisierung der Chloroplasten. Darüber hinaus verfügten diese *gdc*-Mutanten über eine verringerte Expression von AOX (IGAMBERDIEV *et al.*, 2001), was auf eine enge Verbindung zwischen der mitochondrialen Glycin-Oxidation und der Expression von AOX hindeutet.

In den Blattscheiben von *aox1a*-Mutanten war das Glycin/Serin-Verhältnis nach AA-Behandlung um ein Vielfaches höher als im entsprechenden WT (siehe Abb. 3.3.6 B). Nach der *cross-over*-Theorie von ROLLESTON (1972) könnten solche Veränderungen auf eine Limitierung des GDC-katalysierenden Schritts hindeuten. Expressionsanalysen ergaben, dass die Limitierung nicht in Folge einer verringerten GDC-Expression stattfindet (siehe Abb. 3.3.7 A und B). Eine weitere Ursache könnte zum einen die Inhibition von GDC aufgrund von oxidativem Stress sein (TAYLOR *et al.*, 2002) und zum anderen im Elektronenakzeptormangel für die Glycin-Oxidation liegen. Letzteres wäre vor allem durch das Fehlen von AOX1A begründet. Immerhin diskutierten RASMUSSEN *et al.* bereits 2004 die Existenz eines Teilabschnitts der mitochondrialen Atmungskette, bestehend aus „alternativen“ NAD(P)H-Dehydrogenase und AOX, in dem spezifisch Elektronen aus überschüssigen Reduktionsäquivalenten der Chloroplasten eingespeist werden. In Kartoffelpflanzen konnte bereits eine mitochondriale NADH-Dehydrogenase identifiziert werden, deren Expression lichtabhängig ist und einem diurnalen Rhythmus unterliegt (SVENSSON & RASMUSSEN, 2001). Diese könnte demnach mit Photosyntheseprozessen in Verbindung stehen. RASMUSSEN *et al.* (2004) postulierten weiter, dass der von ihnen vermutete Elektronentransportweg insbesondere unter photorespiratorischen Bedingungen bei der Bereitstellung von  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor für die Glycin-Oxidation eine wichtige Aufgabe übernimmt. Auf diese Weise würde AOX erheblich dazu beitragen, dass der Photorespirationsweg kontinuierlich ablaufen kann und eine Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette verhindert wird (siehe Abb. 4.3). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse untermauern diese These und geben Hinweise darauf, dass diese Funktion in *A. thaliana* insbesondere von der Isoform AOX1A erfüllt wird. Mit diesem Modell wäre auch die postulierte Aufgabe von AOX bei der Optimierung der Photosynthese durch Ableiten überschüssiger Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten zu erklären. Dabei scheint die Verbindung zwischen Redoxzustand der Chloroplasten und der

Beanspruchung von AOX möglicherweise größtenteils, aber nicht ausschließlich, über den Photorspirationsweg zu bestehen. Interessanterweise geben Versuchsansätze unter photorespiratorischen Bedingungen, in denen jedoch der Photorespirationsweg entweder durch Mutation oder durch entsprechende Behandlungen eingeschränkt wurde, Anzeichen für eine erhöhte Beanspruchung des Malat-Ventils bzw. eine erhöhte Malat-Oxidation in den Mitochondrien (GARDESTRÖM *et al.*, 2002; IGAMBERDIEV *et al.*, 2001; KEYS & LEEGOOD, 2002).



## 5 Zusammenfassung

Neben dem förderlichen Effekt der Energiegewinnung stellt die Nutzung des Sonnenlichts auch Risiken für Pflanzen dar, insbesondere bei hohen Lichtintensitäten. Um die Balance aus Nutzen und Schaden der Lichtenergie gewährleisten zu können und sich schnell auf sich ändernde Lichtbedingungen einstellen zu können, verfügen Pflanzen über eine Vielzahl von Schutzmechanismen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe transgener Pflanzen die Rollen der chloroplastidären NADP-abhängigen Malatdehydrogenase (NADP-MDH) und der mitochondrialen Alternativen Oxidase (AOX) im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. näher zu charakterisieren. Die Analyse von *nadp-mdh-knockout (ko)*-Mutanten hat dabei auf erstaunliche Art und Weise verdeutlicht, wie flexibel der Metabolismus der Pflanze ist, um die Redoxhomöostase bei hohen Lichtintensitäten aufrecht zu erhalten und oxidative Schäden zu vermeiden. Überraschenderweise wurden bei diesen Mutanten selbst beim Wachstum unter hohen Lichtintensitäten keine Unterschiede zu entsprechenden Wildtyp (WT)-Pflanzen sichtbar. Jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit drei kompensatorische Stoffwechselwege aufgedeckt werden, welche die *nadp-mdh-ko*-Pflanzen unter Starklichtbedingungen vor Photoinhibition schützen. So können die Mutanten durch eine erhöhte Aktivität des NTRC-Systems, höhere Photorespirationsraten und die Akkumulation von Prolin im Starklicht für den Erhalt der Redoxhomöostase sorgen und den Verlust der NADP-MDH ausgleichen. Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Regulation der *NADP-MDH*-Expression durchgeführt. Die dazu durchgeführten Analysen der Promotorregion des *NADP-MDH*-Gens (At5g58330) bestätigten die Hypothese, dass regulatorische Elemente, die das komplexe Expressionsmuster der *NADP-MDH* in *A. thaliana* kontrollieren, im Laufe der Evolution in die kodierende Region des Gens verlagert wurden. In einem weiteren Ansatz wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *aox1a-ko*-Mutanten untersucht. Eine Inhibition des Cytochrom-Wegs unter Verwendung von Antimycin A (AA), welches in WT-Pflanzen die Expression von AOX1A induziert, führte zu erheblichen Differenzen zwischen *aox1a-ko*-Mutanten und WT-Pflanzen. Zusammenfassend geben die Befunde eindeutige Hinweise darauf, dass die AOX1A-Isoform in *A. thaliana* insbesondere unter Stressbedingungen eine entscheidende Aufgabe bei der „Entsorgung“ überschüssiger Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten übernimmt. Auf diese Weise kommt der AOX1A-Isoform eine besondere Bedeutung bei der Optimierung der Photosyntheserate bzw. dem Schutz der photosynthetischen Elektronentransportkette vor Überreduktion zu. Des Weiteren wurde herausgefunden,

dass das Fehlen des AOX1A-Isoenzym nach AA-Behandlung in *A. thaliana* zu einer erhöhten Expression der AOX1D-Isoform führt.

## 6 Summary

Plants need to balance between efficient energy conversion and avoidance of overreduction and subsequent damage development especially in high-light conditions. Therefore plants possess several photoprotective mechanisms to respond to changing environmental conditions. In this study, transgenic mutant plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh were used to get more insight into the roles of chloroplast NADP-dependent malate dehydrogenase (NADP-MDH) and of mitochondrial alternative oxidase (AOX) in metabolism. In a first approach *nadp-mdh*-knockout (ko) plants were characterized. Surprisingly, even when cultivated under high-light conditions, *nadp-mdh*-ko mutants had no altered phenotype in comparison to the wildtype (WT). Further analysis revealed three alternative compensatory strategies in *nadp-mdh*-ko plants, which protect the chloroplasts from photoinhibition under high-light conditions. Higher activity of the NTRC system, proline accumulation as well as increased photorespiration rates are able to maintain redox homeostasis in the mutants and can compensate for the lack of the malate valve under high-light conditions. In a second approach the promoter region of the *NADP-MDH* gene (At5g58330) was analyzed to get more information about the regulation of *NADP-MDH* expression. The results corroborate the hypothesis, that regulatory elements, that control the complex transcription pattern of *NADP-MDH* in *A. thaliana*, were shifted into the coding region of the gene during evolution. In addition, we analyzed *aox1a*-ko mutants of *A. thaliana*. Restriction of electron flow through the cytochrome pathway by antimycin A (AA), which induces *AOX1A* in the WT, led to pronounced differences between WT and *aox1a*-ko mutants. In summary the results suggest that in stress conditions the *AOX1A* isoform plays a significant role in dissipating excess reducing equivalents from the chloroplasts. Thus *AOX1A* is important for optimizing photosynthetic performance and preventing overreduction of the photosynthetic electron transport chain in *A. thaliana* in stress conditions. Furthermore, the *AOX1D* isoform is induced in the *aox1a*-ko mutants when treated with AA.



## 7 Literaturverzeichnis

- Affourtit, C., Albury, M.S., Crichton, P.G. & Moore, A.L.** (2002) Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* **510**, 121-126
- Allen, J.F.** (1995) Thylakoid protein phosphorylation, state 1- state 2- transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene. *Physiol. Plant.* **39**, 196-205
- Amirsadeghi, S., Robson, C.A., McDonald, A.E. & Vanlerberghe, G.C.** (2006) Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1509-1519
- Anderson, J.M.** (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 93-136
- Andersson, M.E. & Nordlund, P.** (1999) A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett.* **449**, 17-22
- Andrews, T.J. & Whitney, S.M.** (2003) Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 159-169
- Apel, K. & Hirt, H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399
- Aro E.-M., Virgin, I. & Andersson, B.** (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 113-134
- Asada, K.** (1980) Formation and scavenging of superoxide in chloroplasts, with relation to injury by sulfur dioxide. *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.* **11**, 165-179
- Asada, K.** (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 1419-1431
- Asada, K. & Takahashi, M.** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond C.B. & Arntzen C.J. eds. *Photoinhibition: Topics in photosynthesis*. Vol. 9, Elsevier, Amsterdam, 227-287
- Asada, K., Urano, M. & Takahashi, M.** (1973) Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **36**, 257-266
- Atkin, O.K., Millar, A.H., Gardeström, P. & Day, D.A.** (2000) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants. In: Leegood, R.C., Sharkey, T.D. & von Caemmerer, S., eds. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 153-175

- Bachmann, B.** (2007) Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinien für die 1A-Isoform der Alternativen Oxidase. Masterarbeit, AG Pflanzenphysiologie, Universität Osnabrück
- Backhausen, J.E., Emmerlich, A., Holtgreffe, S., Horton, P., Nast, G., Rogers, J.J.M., Müller-Röber, N. & Scheibe, R.** (1998) Transgenic potato plants with altered expression levels of chloroplast NADP-malate dehydrogenase: interactions between photosynthetic electron transport and malate metabolism in leaves and in isolated intact chloroplasts. *Planta* **207**, 105-114
- Backhausen, J.E., Kitzmann, C. & Scheibe, R.** (1994) Competition between electron acceptors in photosynthesis: regulation of the malate valve during CO<sub>2</sub> fixation and nitrite reduction. *Photosynth. Res.* **42**, 75-86
- Baier, M. & Dietz, K.-J.** (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J.* **12**, 179-190
- Bartoli, C.G., Gomez, F., Gergoff, G., Guiamét, J.J. & Puntarulo, S.** (2005) Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *J. Exp. Bot.* **56**, 1269-1276
- Batz, O., Scheibe, R. & Neuhaus, H.E.** (1995) Purification of chloroplasts from fruits of green-pepper (*Capsicum annuum* L.) and characterization of starch synthesis. Evidence for a functional hexose-phosphate translocator. *Planta* **196**, 50-57
- Bauwe, H. & Kolukisaoglu, U.** (2003) Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *J. Exp. Bot.* **54**, 1523-1535
- Bechtold, U., Murphy, D.J. & Mullineaux, P.M.** (2004) Arabidopsis peptide methionine sulfoxide reductase 2 prevents cellular oxidative damage in long nights. *Plant Cell* **16**, 908-919
- Becker, B.** (2005) Regulation der chloroplastidären NADP-abhängigen Malatdehydrogenase und deren Einfluss auf die Induktion von *poising*-Mechanismen in *A. thaliana*. Dissertation, AG Pflanzenphysiologie, Universität Osnabrück
- Becker, B., Holtgreffe, S., Jung, S., Wunrau, C., Kandlbinder, A., Baier, M., Dietz, K.J., Backhausen, J.E. & Scheibe, R.** (2006) Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) plants under long- and short-day conditions. *Planta* **224**, 380-393
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. & Masterson, R.** (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1195-1197
- Bellinger, Y. & Larher, F.** (1987) Proline accumulation in higher plants: a redox buffer. *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* **6**, 23-27
- Berkemeyer, M., Scheibe, R. & Ocheretina, O.** (1998) A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. *J. Biol. Chem.* **273**, 27927-27933

- Berthold, D.A., Andersson, M.E. & Nordlund, P.** (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 241-254
- Birnboim, H.C. & Doly, R.W.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523
- Björkman, O. & Demmig, B.** (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77-K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**, 489-504
- Boldt, R., Edner, C., Kolukisaoglu, U., Hagemann, M., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Morgenthal, K. & Bauwe, H.** (2005) d-Glycerate 3-kinase, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in Arabidopsis, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* **17**, 2413-2420
- Borecky, J., Nogueira, F.T., de Oliveira, K.A., Maia, I.G., Vercesi, A.E. & Arruda, P.** (2006) The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J. Exp. Bot.* **57**, 849-864
- Bouche, N. & Fromm, H.** (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* **9**, 110-115
- Bown, A.W. & Shelp, B.J.** (1997) The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* **115**, 1-5
- Bradford, M.M.** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Brooks, A. & Farquhar, G.D.** (1985) Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light: estimates from gas-exchange experiments on spinach. *Planta* **165**, 397-406
- Buchanan, B.B.** (1984) The ferredoxin/thioredoxin system: a key element in the regulatory function of light in photosynthesis. *BioScience* **34**, 378-383
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-378
- Burnette, W.N.** (1981) Western blotting - electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein-A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
- Church, G.M. & Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995
- Clifton, R., Millar, A.H. & Whelan, J.** (2006) Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 730-741
- Clough, S.J. & Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743

- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 2110-2114
- Considine, M.J., Holtzapffel, R.C., Day, D.A., Whelan, J. & Millar, A.H.** (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. Plant Physiol. **129**, 949-953
- Del Longo, O.T., Gonzales, C.A., Pastori, G.M. & Trippi, V.S.** (1993) Antioxidant defence under hyperoxigenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with different sensitivity to drought. Plant Cell Physiol. **34**, 1023-1028
- Demmig-Adams, B. & Adams, W.W.** (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. Trends Plant Sci. **1**, 21-26
- Diaz, C., Purdy, S., Christ, A., Morot-Gaudry, J.-F., Wingler, A. & Masclaux-Daubresse, C.** (2005) Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach. Plant Physiol. **138**, 898-908
- Dickey, L.F., Gallo-Meagher, M. & Thompson, W.F.** (1992) Light regulatory sequences are located within the 5' portion of the Fed-1 message sequence. EMBO J. **11**, 2311-2317
- Dietz, K.-J., Jacob, S., Oelze, M.-L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M., Baier, M. & Finkemeier, I.** (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. J. Exp. Bot. **57**, 1697-709
- Douce, R., Bourguignon, J., Macherel, D. & Neuburger, M.** (1994) The glycine decarboxylase system in higher plant mitochondria: structure, function and biogenesis. Biochem. Soc. T. **22**, 184-188
- Eberhard, S., Finazzi, G. & Wollman, F.-A.** (2008) The dynamics of photosynthesis. Annu. Rev. Genet. **4**, 463-515
- Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N. & Hatch, M.D.** (1985) Pyruvate, P<sub>i</sub> 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
- Escobar, M.A., Geisler, D.A. & Rasmusson, A.G.** (2006) Reorganization of the alternative pathways of the Arabidopsis respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. Plant J. **45**, 775-788
- Esterbauer, H., Schauer, R.J. & Zollner, H.** (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. Free Radic. Biol. Med. **11**, 81-128
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G. & Fernie, A.R.** (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. Trends Plant Sci. **13**, 14-19
- Finnegan, P.M., Soole, K.L. & Umbach, A.L.** (2004) Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. In: Day, D.A., Millar, A.H. & Whelan, J., eds. Plant Mitochondria: From Genome to Function. Advances in Photosynthesis and Respiration. Vol. 17, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 163-230



- Foyer, C.H. & Halliwell, B.** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25
- Foyer, C.H. & Noctor, G.** (2002) Photosynthetic nitrogen assimilation: interpathway control and signaling. In: Foyer, C.H. & Noctor, G. eds. *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism*. Vol. 12, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-22
- Foyer, C.H. & Noctor, G.** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* **28**, 1056–1071
- Foyer, C.H., Noctor, G., Buchanan, B., Dietz, K.J. & Pfannschmidt, T.** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 861-905
- Fu, Y., Ballicora, M.A., Leykam, J.F. & Preiss, J.** (1998) Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **273**, 25045-25052
- Gardeström, P., Igamberdiev, A.U. & Raghavendra, A.S.** (2002) Mitochondrial functions in light and significance to carbon–nitrogen interactions. In: Foyer, C.H. & Noctor, G., eds. *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon Metabolism*. Vol. 12, Dordrecht: Kluwer Academic Press, pp. 151-172
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Gerard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P.I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y. & Jacquot, J.P.** (2004) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 14545-14550
- Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R.** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **990**, 87-92
- Gietl, C.** (1992) Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular location and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *BBA Bioenergetics* **1100**, 217-234
- Giraud, E., Ho, L.H.M., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.-F., Howell, K.A., Ivanova, A., Pogson, B.J., Millar, A.H. & Whelan, J.** (2008) The absence of alternative oxidase1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol.* **147**, 595-610
- Giraud, E., Van Aken, O., Ho, L.H.M. & Whelan, J.** (2009) The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of alternative oxidase1a. *Plant Physiol.* **150**, 1286-1296
- Gray, G.R., Maxwell, D.P., Villarimo, A.R. & McIntosh, L.** (2004) Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species. *Plant Cell Rep.* **23**, 497-503
- Groden, D. & Beck, E.** (1979) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **546**, 426-435

- Guo, Y., Cai, Z. & Gan, S.** (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell Environ.* **27**, 521-549
- Häder, D.P.** (1999) Photosynthese. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Haehnel, W.** (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 659-593
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** (1989) Protection against oxidants in biological systems: The super oxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press, pp. 86-123
- Hameister, S.** (2005) Vergleichende Untersuchungen zur Regulation der MDH-Expression bei Brassicaceen. Diplomarbeit, AG Pflanzenphysiologie, Universität Osnabrück
- Hameister, S., Becker, B., Holtgreffe, S., Strodtkötter, I., Linke, V., Backhausen, J.E. & Scheibe, R.** (2007) Transcriptional regulation of NADP-dependent malate dehydrogenase: comparative genetics and identification of DNA-binding proteins. *J. Mol. Evol.* **65**, 437-455
- Hanahan, D.** (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plants. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanke, G.T., Holtgreffe, S., König, N., Strodtkötter, I., Voss, I. & Scheibe, R.** (2009) Use of transgenic plants to uncover strategies for maintenance of redox-homeostasis during photosynthesis. In: Jacquot, J.-P. eds. *Advances in Botanical Research: Oxidative Stress and Redox Regulation in Plants*. Vol. 52, pp. 207-251
- Hare, P.D. & Cress, W.A.** (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* **21**, 79-102
- Heber, U. & Walker, D.** (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* **100**, 1621-1626
- Heldt, H.W.** (1976) Metabolite transport in intact spinach chloroplasts. In: Barber, J., eds. *The Intact Chloroplast*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 215-234
- Hehl, R., Steffens, N.O. & Wingender, E.** (2004) Isolation and analysis of gene regulatory sequences. In: *Handbook of Plant Biotechnology*, Klee, H., & Christou, P., eds. Wiley and Sons Ltd., pp. 81-102
- Hendriks, J.H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M. & Geigenberger, P.** (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiol.* **133**, 838-849
- Hill, R. & Bendall, F.** (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature* **186**, 136-137
- Höfgen, R. & Willmitzer, L.** (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9877

- Hoefnagel, M.H., Millar, A.H., Wiskich, J.T. & Day, D.A.** (1995) Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 394-400
- Holtgreve, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., Wojtera, J., Lindermayr, C. & Scheibe, R.** (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol. Plant.* **133**, 211-228
- Igamberdiev, A.U., Bykova, N.V., Lea, P.J. & Gardeström, P.** (2001) The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: a study with barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiol. Plant.* **111**, 427-438
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W.** (1987) Beta-glucuronidase (GUS) as a sensitive and versatile gene fusion marker in plants. *J. Cell. Biochem.* **6**, 3901-3907
- Johansson, K., Ramaswamy, S., Saarinen, M., Lemaire-Chamley, M., Issakidis-Bourguet, E., Miginiac-Maslow, M. & Eklund, H.** (1999) Structural basis for light activation of a chloroplast enzyme: The structure of Sorghum NADP-malate dehydrogenase in its oxidized form. *Biochemistry* **38**, 4319-4326
- Johnson, G.N.** (2005) Cyclic electron transport in C<sub>3</sub> plants: fact or artefact? *J. Exp. Bot.* **56**, 407-416
- Keys, A.J. & Leegood, R.C.** (2002) Photorespiratory carbon and nitrogen cycling: evidence from studies of mutant and transgenic plants. In: Foyer, C.H. & Noctor, G. eds. *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon Metabolism*. Vol. 12, Kluwer Academic Publishers, pp. 115-134
- Khan, M.S.** (2007) Engineering photorespiration in chloroplasts: a novel strategy for increasing biomass production. *Trends Biotechnol.* **25**, 437-440
- Kim, K.-W., Franceschi, V.R., Davin, L.B. & Lewis, N.G.** (2006)  $\beta$ -Glucuronidase as reporter gene – Advantages and limitations. In: Salinas, J. & Sanchez-Serrano, J.J. eds. *Methods in Molecular Biology. Arabidopsis protocols*. Vol. 323, second edition, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 263-273
- Kinnersley, A.M. & Turano, F.J.** (2000) Gamma-aminobutyric acid (GABA) and plant response to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 479-509
- Kok, B.** (1956) On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochem. Biophys. Acta* **21**, 234-244
- Koncz, C. & Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396
- Kozaki, A. & Takeba, G.** (1996) Photorespiration protects C<sub>3</sub> plants from photooxidation. *Nature* **384**, 557-560
- Krause, G.H. & Weis, E.** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313-349

- Krömer, S.** (1995) Respiration during photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 45-70
- Krömer, S. & Scheibe, R.** (1996) Function of the chloroplastic malate valve for respiration during photosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 761-766
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lambers, H.** (1982) Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting in higher plants. *Trends Plant Sci.* **5**, 160-167
- Lance, C. & Rustin, P.** (1984) The central role of malate in plant metabolism. *Physiol. Vég.* **22**, 625-641
- Leegood, R.C., Lea, P.J., Adcock, M.D. & Häusler, R.E.** (1995) The regulation and control of photorespiration. *J. Exp. Bot.* **46**, 1397-414
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtke, H.** (1977) RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751
- Lemaire, S.D., Michelet, L., Za-Vagnini, M., Massot, V. & Issakidis-Bourguet, E.** (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Curr. Genet.* **51**, 343-365
- Lin, J.F. & Wu, S.H.** (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *Plant J.* **39**, 612-628
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. & Fernie, A.R.** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protoc.* **1**, 387-396
- Lottspeich, F. & Zorbas, H.** (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- MacPherson, K.H., Ashton, A.R., Carr, P.D., Trevanion, S.J., Verger, D. & Ollis, D.L.** (1998) Crystallization and preliminary crystallographic studies of chloroplast NADP-dependent malate dehydrogenase from *Flaveria bidentis*. *Acta Crystallogr.* **54**, 654-656
- Martinoia, E. & Rentsch, D.** (1994) Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 447-467
- Maxwell, K. & Johnson, G.N.** (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**, 659-668
- Maxwell, D.P., Wang, Y. & McIntosh, L.** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8271-8276
- Meeuse, B.D.** (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26**, 117-126
- Meeuse, B.J.D. & Raskin, I.** (1988) Sexual reproduction in the Arum lily family, with emphasis on thermogenicity. *Sex. Plant Reprod.* **1**, 3-15

- Mehler, A.H.** (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. **33**, 65-77
- Metfies, H.** (2007) Funktionsanalysen von Isoformen der Alternativen Oxidase und ihre Rolle bei oxidativem Stress in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, AG Pflanzenphysiologie, Universität Osnabrück
- Miginiac-Maslow, M., Johansson, K., Ruelland, E., Issakidis-Bourguet, E., Schepens, I., Goyer, A., Lemaire-Chamley, M., Jacqout, J.-P., Le Maréchal, P. & Decottignies, P.** (2000) Light-activation of NADP-malate dehydrogenase: a highly controlled process for an optimized function. Physiol. Plant. **110**, 322-329
- Millenaar, F.F., Benschop, J., Wagner, A.M. & Lambers, H.** (1998) The role of the alternative oxidase in stabilizing the *in vivo* reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. Plant Physiol. **118**, 599-607
- Millenaar, F.F. & Lambers, H.** (2003) The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. Plant Biol. **5**, 2-15
- Mitchell, P.** (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. Science **206**, 1148-1159
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. **9**, 490-498
- Møller, I.M.** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **52**, 561-591
- Møller, I.M. & Lin, W.** (1986) Membrane-bound NAD(P)H dehydrogenases in higher plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. **37**, 309-334
- Møller, I.M. & Rasmusson, A.G.** (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. Trends Plant Sci. **3**, 21-27
- Moore, A.L., Umbach, A.L. & Siedow, J.N.** (1995) Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. J. Bioenerg. Biomembr. **27**, 367-377
- Mullineaux, P.M. & Rausch, T.** (2005) Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. Photosynth. Res. **86**, 459-474
- Munekaga, Y., Hashimoto, M., Miyaka, C., Tomizawa, K.I., Endo, T., Tasaka, M. & Shikanai, T.** (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. Nature **429**, 579-582
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. & Nambara, E.** (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. Plant J. **41**, 697-709

- Neuburger, M., Bourguignon, J. & Douce, R.** (1986) Isolation of a large complex from the matrix of pea leaf mitochondria involved in the rapid transformation of glycine into serine. *FEBS Lett.* **207**, 18-22
- Neuburger, M., Day, D.A. & Douce, R.** (1985) Transport of  $\text{NAD}^+$  in Percoll-purified potato-tuber mitochondria: inhibition of  $\text{NAD}^+$  influx and efflux by N-4-azido-2-nitrophenyl-4-aminobutyryl-3'- $\text{NAD}^+$ . *Plant Physiol.* **78**, 405-410
- Neuhaus, H.E. & Emes, M.J.** (2000) Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 111-140
- Niazi, P.S.** (2005) Rolle der NADP-Malatdehydrogenase und der Alternativen Oxidase bei der Interaktion zwischen Chloroplasten und Mitochondrien im Licht. Masterarbeit, AG Pflanzenphysiologie, Universität Osnabrück
- Niyogi, K.K.** (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 333-359
- Niyogi, K.K.** (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 455-460
- Noctor, G. & Foyer, C.H.** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249-279
- Nott, A., Jung, H.S., Koussevitzky, S. & Chory, J.** (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 739-759
- Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Gibon, Y. & Fernie, A.R.** (2008) The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* **59**, 1675-1684
- Ogren, W.L.** (1984) Photorespiration: pathways, regulation, and modification. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 415-442
- Okegawa, Y., Kagawa, Y., Kobayashi, Y. & Shikanai, T.** (2008) Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **49**, 825-834
- Oliver, D.J.** (1994) The glycine decarboxylase multienzyme complex from plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 323-337
- Oliver, S.N., Lunn, J.E., Urbanczyk-Wochniak, E., Lytovchenko, A., Faix, B., van Dongen, J.T., Fernie, A.R. & Geigenberger, P.** (2008) Decreased expression of cytosolic pyruvate kinase in potato tubers leads to a decline in the level of organic acids resulting in an *in vivo* repression of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* **148**, 1640-1654
- Osmond, C.B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O. & Leegood, R.** (1997) Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* **2**, 119-121
- Padmasree, K., Padmavathi, L. & Raghavendra, A.S.** (2002) Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 71-119

- Padmasree, K. & Raghavendra, A.S.** (1999) Importance of oxidative electron transport over oxidative phosphorylation in optimizing photosynthesis in mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum* L). *Physiol. Plant.* **105**, 546-553
- Pérez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M. & Cejudo, F.J.** (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**, 2356-2368
- Pfannschmidt, T.** (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* **8**, 33-41
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A. & Allen, J.F.** (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**, 625-628
- Plaxton, W.C. & Podestá, F.E.** (2006) The functional organization and control of plant respiration. *Crit. Rev. Plant Sci.* **25**, 159-198
- Polle, A.** (1996) Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Bot. Acta* **109**, 84-89
- Raghavendra, A.S. & Padmasree, K.** (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci.* **8**, 546-553
- Raines, C.A.** (2006) Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C<sub>3</sub> carbon fixation cycle. *Plant Cell Environ.* **29**, 331-39
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L. & Elthon, T.E.** (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 23-39
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Sweet, C.R., Lennon, A.M., Rauch, G.S. & Siedow, J.N.** (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria: identification of the cysteine residue involved in  $\alpha$ -keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 30750-30756
- Roessner-Tunali, U., Hegemann, B., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruedigam, C., Granot, D. & Fernie, A.R.** (2003) Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol.* **133**, 84-99
- Rolleston, F.S.** (1972) A theoretical background to the use of measured intermediates in the study of the control of intermediary metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **5**, 47-75
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, J., Higuichi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A.** (1987) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N. & Hirai, A.** (2001) ATP synthesis inhibitors as well as respiratory inhibitors increase steady-state level of alternative oxidase mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* **158**, 241-245
- Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. & Nakazono, M.** (1997) Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 585-596

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Saradadevi, K. & Raghavendra, A.S.** (1992) Dark respiration protects photosynthesis against photoinhibition in mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* **99**, 1232-1237
- Satyanarayan, V. & Nair, P.M.** (1990) Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* **29**, 367-375
- Savitch, L.V., Barker-Astrom, J., Ivanov, A.G., Hurry, V., Öquist, G., Huner, N.P.A. & Gardeström, P.** (2001) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* results in incomplete recovery of photosynthetic capacity, associated with an increased reduction of the chloroplast stroma. *Planta* **214**, 295-303
- Scheibe, R.** (1987) NADP-malate dehydrogenase in C<sub>3</sub> plants: regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiol. Plant.* **71**, 393-400
- Scheibe, R.** (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.* **120**, 21-26
- Scheibe, R., Backhausen, J.E., Emmerlich, V. & Holtgreffe, S.** (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J. Exp. Bot.* **56**, 1481-1489
- Scheibe, R. & Jacquot, J.P.** (1983) NADP regulates the light activation of NADP-dependent malate dehydrogenase. *Planta* **157**, 548-553
- Scheibe, R., Kampfenkel, K., Wessels, R. & Tripiet, D.** (1991) Primary structure and analysis of the location of the regulatory disulfide bond of pea chloroplast NADP-malate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 1-8
- Scheibe, R. & Stitt, M.** (1988) Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation, Q<sub>A</sub> reduction and O<sub>2</sub> evolution in spinach leaves. *Plant. Physiol. Biochem.* **26**, 473-481
- Schmid, M., Uhlentaut, N.H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D. & Lohmann, J.U.** (2003) Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* **130**, 6001-6012
- Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W.** (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* **10**, 51-62
- Schulte, M., van Ballmoos, P., Rennenberg, H. & Herschbach, C.** (2002) Live-long growth of *Quercus ilex* L. at natural CO<sub>2</sub> springs acclimates sulfur, nitrogen and carbohydrate metabolism of the progeny to elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ.* **25**, 1715-1727
- Schupp, R. & Rennenberg, H.** (1988) Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant Sci.* **57**, 113-117
- Schürmann, P. & Jacquot, J.-P.** (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 371-400



- Seidel, T., Kluge, C., Hanitzsch, M., Ross, J., Sauer, M., Dietz, K.-J. & Gollack, D.** (2004) Colocalization and FRET-analysis of subunits c and a of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in living plant cells. *J. Biotech.* **112**,165-175
- Serrato, A.J., Pérez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C. & Cejudo, F.J.** (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 43821-43827
- Shahmuradov, I.A., Solovyev, V.V. & Gammerman, A.J.** (2005) Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucl. Acids Res.* **33**, 1069-1076
- Shyam, R., Raghavendra, A.S. & Sane, P.V.** (1993) Role of dark respiration in photoinhibition of photosynthesis and its reactivation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiol. Plant.* **88**, 446-452
- Siedow, J.N. & Umbach, A.L.** (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell.* **7**, 821-831
- Siedow, J.N. & Umbach, A.L.** (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 432-439
- Siefermann-Harms, D.** (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* **69**, 561-568
- Sieger, S.M., Kristensen, B.K., Robson, C.A., Amirsadeghi, S., Eng, E.W., Abdel-Mesih, A., Møller, I.M. & Vanlerberghe, G.C.** (2005) The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *J. Exp. Bot.* **56**, 1499-1515
- Sims, D.A. & Gamon, J.A.** (2002) Relationship between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.* **81**, 337-354
- Singh, K.K., Shyam, R. & Sane, P.V.** (1996) Reactivation of photosynthesis in the photoinhibited green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: role of dark respiration and light. *Photosynth. Res.* **49**, 11-20
- Snedden W.A. & Fromm H.** (1999) Regulation of the  $\gamma$ -aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium/calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress. In: Lerner, H.R. eds. *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., pp. 549-574
- Spinola, M.C., Perez-Ruiz, J.M., Pulido, P., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Gonzalez, M. & Cejudo, F.J.** (2008) NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. *Physiol. Plant.* **133**, 516-524
- Strodtkötter, I., Padmasree, K., Dinakar, C., Speth, B., Niazi, P.S., Wojtera, J., Voss, I., Do, P.T., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Linke, V., Raghavendra, A.S. & Scheibe, R.** (2009) Induction of the AOX1D isoform of alternative oxidase in *A. thaliana* T-DNA insertion lines lacking isoform AOX1A is insufficient to optimize photosynthesis when treated with antimycin A. *Mol. Plant* **2**, 284-297

- Svensson, A.S. & Rasmusson, A.G.** (2001) Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *Plant J.* **28**, 73-82
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J. & Leaver, C.J.** (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **30**, 431-446
- Swindell, S.** (2003) Shining light on the evolution of photosynthesis. *T.J.* **17**, 74-84
- Székely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C. & Szabados, L.** (2008) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* **53**, 11-28
- Taniguchi, M., Taniguchi, Y., Kawasaki, M., Takeda, S., Kato, S., Sato, S., Tabata, S., Miyake, H. & Sugiyama, T.** (2002) Identifying and characterising plastid 2-oxalglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **43**, 706-717
- Taylor, N.L., Day, D.A. & Millar, A.H.** (2002) Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 42663-42668
- Tiessen, A., Hendriks, J.H.M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E.M. & Geigenberger, P.** (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox-modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* **14**, 2191-2213
- Umbach, A.L., Fiorani, F. & Siedow, J.N.** (2005) Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol.* **139**, 1806-1820
- van Kooten, O. & Snell, J.F.H.** (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* **25**, 147-150
- Vanlerberghe, G.C. & McIntosh, L.** (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 703-734
- Vanlerberghe, G.C. & Ordog, S.H.** (2002) Alternative oxidase: integrating carbon metabolism and electron transport in plant respiration. In: Foyer, C.H. & Noctor, G., eds. *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism*. Vol.12, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp 173-191
- Verbruggen, N. & Hermans, C.** (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**, 739-739
- Voss, I., Koelmann, M., Wojtera, J., Holtgreffe, S., Kitzmann, C., Backhausen, J.E. & Scheibe, R.** (2008) Knockout of major leaf ferredoxin reveals new redox-regulatory adaptations in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **133**, 584-598
- Walker, D.A.** (1988) The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Oxygraphics Ltd, Sheffield

- Watanabe, C.K., Hachiya, T., Terashima, I. & Noguchi, K.** (2008) The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of antioxidant defense systems in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ.* **31**, 1190-1202
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M. & Meyerowitz, E.M.** (2004) Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **16**, 1314-1326
- Werner, T.** (1999) Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm. Genome* **10**, 168-175
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X. & Tora, L.** (1998) Function of TAFII-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **393**, 187-191
- Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P. & Leegood, R.C.** (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 1517-1529
- Witz, G.** (1989) Biological interactions of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 333-349
- Wu, J., Neimanis, S. & Heber, U.** (1991) Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Bot. Acta* **104**, 283-291
- Yoshida, K., Terashima, I. & Noguchi, K.** (2007) Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. *Plant Cell Physiol.* **48**, 606-614
- Yoshida, K., Watanabe, C., Kato, Y., Sakamoto, W. & Noguchi, K.** (2008) Influence of chloroplastic photo-oxidative stress on mitochondrial alternative oxidase capacity and respiratory properties: a case study with *Arabidopsis* yellow variegated 2. *Plant Cell Physiol.* **49**, 592-603
- Zambryski, P.C.** (1992) Chronicles from the *Agrobacterium* cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 465-490
- Zhang, X., Feng, B., Zhang, Q., Zhang, D., Altman, N. & Ma, H.** (2005) Genome-wide expression profiling and identification of gene activities during early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **58**, 401-419
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. & Gruissem, W.** (2004) Genevestigator. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621-2632
- Zsigmond, L., Rigó, G., Szarka, A., Székely, G., Ötvös, K., Darula, Z., Medzihradszky, K.F., Koncz, C., Koncz, Z. & Szabatos, L.** (2008) *Arabidopsis* PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* **149**, 1721-1737



## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
$\alpha^{32}\text{P}$	radioaktives Phosphat ( $^{32}\text{P}$ -Isotop)
$\alpha$ -KT	$\alpha$ -Ketoglutarat
$\Delta\text{pH}$	transmembraner Protonengradient
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
$\phi\text{I}$	Quantenausbeute von PS I
$\phi\text{II}$	Quantenausbeute von PS II
A	$\text{CO}_2$ -Assimilationsrate bzw. Photosyntheserate
AA	Antimycin A
ADP	Adenosindiphosphat
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
AGPB	kleine Untereinheit der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
AL	aktinisches Licht
Amp	Ampicillin
AOX	Alternative Oxidase
$A_{\text{PR}}$	apparenter prozentualer Anteil der Photorespiration an der maximalen RubisCO-Verbrauchsrate
APS	Ammoniumperoxidisulfat
APX	Ascorbatperoxidase
<i>A. t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
AW	alternativer respiratorischer Weg
BCIP	5-Brom-4-Chlorindolylgalactosid
bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder ( <i>bovine</i> )-serumalbumin
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus
cDNA	copy-DNA
Chl	Chlorophyll
$C_i$	$\text{CO}_2$ -Konzentration im substomatären Raum
CM-H <sub>2</sub> DCF-DA	5 (und 6)-Chloromethyl-2',7-dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
COX	Cytochrom c-Oxidase
CW	Cytochrom-Weg
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxycytidintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>nucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxynukleotidtri-phosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
$e^-$	Elektron
E	Extinktion
EA	Enzymaktivität
ECL	enhanced chemiluminescence
ED	Emitter-Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtOH	Ethanol
ETR	Elektronentransportrate
F	steady-state Chlorophyllfluoreszenz im aktinischem Licht
$F_0$	Chlorophyllfluoreszenz im Grundzustand
$F_0'$	Grundfluoreszenz im Licht-adaptierten Zustand
FAD	Flavinadenindinukleotid

Fd	Ferredoxin
$F_M$	maximale Fluoreszenz
$F_M'$	maximale Fluoreszenz im Licht-adaptierten Zustand
FNR	Ferredoxin-NADP-Reduktase
FR	Fernrotes Licht
FTR	Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase
$F_V/F_M$	Verhältnisses von variabler zu maximaler Fluoreszenz
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GABA	$\gamma$ -Amino-Buttersäure
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GDC	Glycin-Decarboxylase
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GSX	Gesamt-Glutathion
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
INR	Initiationsregion ( <i>initiation region</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
IRGA	Infrarot-Gasanalytoren
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KL	Kontrolllicht
ko	<i>knockout</i>
LHC	Lichtsammelkomplex ( <i>light harvesting complex</i> )
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDA	Monodehydroascorbat
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
ML	Messlichtimpulse
MPI	Max-Planck-Institute
mRNA	Boten- ( <i>messenger</i> ) RNA
MS	Murashige & Skoog
MSP	Mangan-stabilisierendes Enzym
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der jeweiligen Wiederholungen
NAD(H)	(reduziertes) Nicotinamidadenosindinukleotid
NADP(H)	(reduziertes) Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblau Tetrazoliumsalz
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDH	NADH-Dehydrogenase
NEM	N-Ethylmaleimid
NIR	Nitritreduktase
NPQ	nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung ( <i>non-photochemical quenching</i> )
NR	Nitratreduktase
NTRC	chloroplastidäre NADPH-Thioredoxin-Reduktase
OAA	Oxalacetat
OD	optische Dichte
OPP	oxidativer Pentose-Phosphat-Weg
ox	oxidiert
P5CR	Prolin-5-Carboxylat-Reduktase
P5CS	Prolin-5-Carboxylat-Synthase
P680	Chlorophyll a-Dimer im Reaktionszentrum von PS II
P700	Chlorophyll a-Dimer im Reaktionszentrum von PS I
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAM	Pulsamplitudenmoduliertes Chlorophyllfluoreszenzdetektionssystem
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>chain reaction</i> )
PETK	photosynthetische Elektronentransportkette
3-PGA	3-Phosphoglycerat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phaeo	Phaeophytin
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PQ	Plastoquinon
PQH <sub>2</sub>	Plastohydrochinon
PRK	Phosphoribulokinase
Prx	Peroxiredoxin
PS	Photosystem
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
Q <sub>A</sub>	primärer Chinonakzeptor von PS II
Q <sub>B</sub>	sekundärer Chinonakzeptor von PS II
qNP	nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung ( <i>non-photochemical quenching</i> )
qP	photochemische Fluoreszenzlöschung ( <i>photochemical quenching</i> )
r	Resistenzgen
red	reduziert
RETK	respiratorische Elektronentransportkette
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>nucleic acid</i> )
RNase A	Ribonuklease A
ROS	reaktionsfreudige Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RubisCO	Ribulose-1,5-bisPhosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
SDS	Natrium ( <i>sodium</i> ) -dodecylsulfat
SHAM	Salicylhydroxamsäure
SL	Starklicht
SOD	Superoxid-Dismutase
SP	sättigender Lichtpuls
Spec	Spectinomycin
SSC	Natriumcitrat ( <i>sodium salt citrate</i> )
TBE	Tris gepuffertes ( <i>buffered</i> ) EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung ( <i>buffered saline</i> )
TBST	Tris gepufferte Salzlösung ( <i>buffered saline</i> ) mit Tween
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
T <sub>i</sub> -Plasmi	tumorinduzierendes Plasmid
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
Trx	Thioredoxin
TSS	Transkriptionsstartpunkt ( <i>transcription start site</i> )
U	Unit(s) (= μmol Substratumsatz min <sup>-1</sup> )
UBQ	Ubiquitin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UQ	Ubichinon
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
UWBC	<i>University of Wisconsin Biotechnology Center</i>
v	Volumen ( <i>volume</i> )
var.	Varietät ( <i>variety</i> )
Vol	Volumen ( <i>volume</i> )
w	<i>weight</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-glucuronid

YT                yeast trypton

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Tymin
U	Uracil



## 8.2 Metabolic profiling

**Metabolic profiling der *nadp-mdh*-Mutanten** (Fettdruck kennzeichnet die durch den *t*-Test errechnete Signifikanz der Unterschiede zum WT ( $P < 0.05$ )).

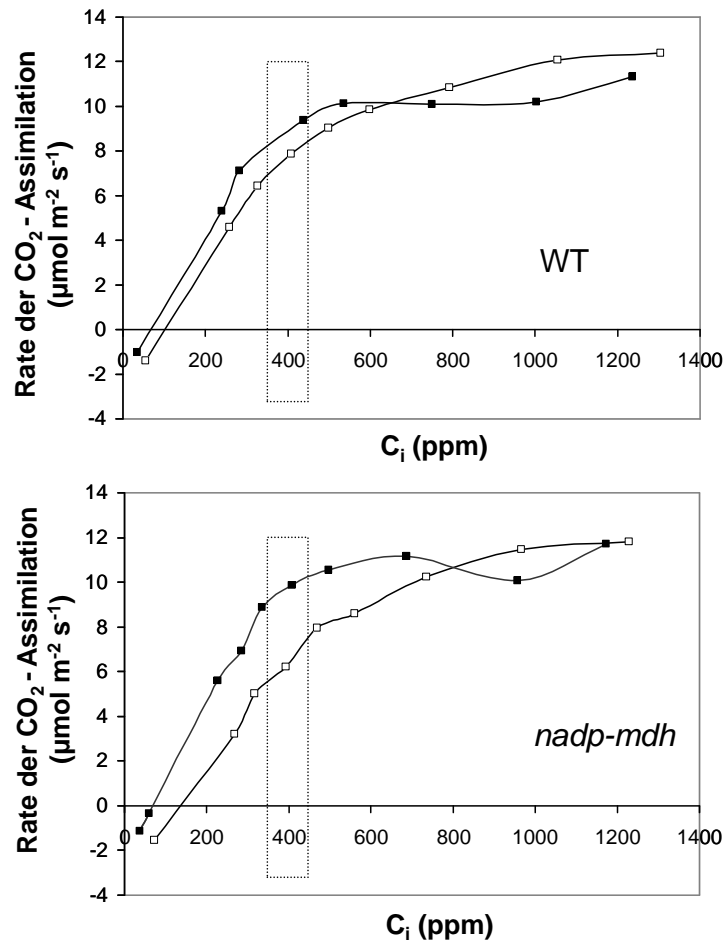
	7h KL		7h SL	
	WT	<i>nadp-mdh-ko</i>	WT	<i>nadp-mdh-ko</i>
<b>Amino acid</b>				
Alanine	1,00 ± 0,21	0,71 ± 0,19	1,00 ± 0,24	0,76 ± 0,10
Asparagine	1,00 ± 0,12	0,83 ± 0,07	1,00 ± 0,10	0,83 ± 0,11
Aspartate	1,00 ± 0,12	1,03 ± 0,06	1,00 ± 0,13	<b>1,52 ± 0,13</b>
β-Alanine	1,00 ± 0,22	0,83 ± 0,20	1,00 ± 0,12	1,04 ± 0,21
GABA	1,00 ± 0,09	0,96 ± 0,14	1,00 ± 0,06	1,20 ± 0,10
Glutamate	1,00 ± 0,16	1,07 ± 0,07	1,00 ± 0,14	1,19 ± 0,18
Glutamine	1,00 ± 0,21	0,99 ± 0,07	1,00 ± 0,17	<b>0,36 ± 0,05</b>
Glycine	1,00 ± 0,29	0,74 ± 0,14	1,00 ± 0,12	0,87 ± 0,06
Hydroxyroline	1,00 ± 0,04	1,14 ± 0,11	1,00 ± 0,09	0,89 ± 0,07
Isoleucine	1,00 ± 0,17	0,80 ± 0,13	1,00 ± 0,11	1,32 ± 0,25
Methionine	1,00 ± 0,27	1,79 ± 0,25	1,00 ± 0,23	1,01 ± 0,11
Phenylalanine	1,00 ± 0,06	1,01 ± 0,07	1,00 ± 0,13	1,07 ± 0,19
Proline	1,00 ± 0,24	1,02 ± 0,14	1,00 ± 0,07	<b>2,36 ± 0,40</b>
5-Oxoproline	1,00 ± 0,17	1,03 ± 0,06	1,00 ± 0,14	<b>0,52 ± 0,06</b>
Serine	1,00 ± 0,26	0,89 ± 0,11	1,00 ± 0,16	1,30 ± 0,14
Threonine	1,00 ± 0,20	0,93 ± 0,13	1,00 ± 0,13	1,11 ± 0,16
Tyrosine	1,00 ± 0,09	1,01 ± 0,06	1,00 ± 0,14	0,91 ± 0,11
Valine	1,00 ± 0,17	0,92 ± 0,21	1,00 ± 0,06	1,09 ± 0,13
<b>Acids</b>				
L-Ascorbate	nd	nd	1,00 ± 0,22	0,62 ± 0,11
Benzoate	1,00 ± 0,18	0,75 ± 0,14	1,00 ± 0,18	1,03 ± 0,06
Citrate	1,00 ± 0,12	1,15 ± 0,09	1,00 ± 0,13	1,71 ± 0,37
Dehydroascorbate	1,00 ± 0,13	1,37 ± 0,12	1,00 ± 0,15	1,29 ± 0,19
Fumarate	1,00 ± 0,17	0,69 ± 0,08	1,00 ± 0,09	0,95 ± 0,06
	nd	nd	nd	nd
Glycerate	1,00 ± 0,29	1,25 ± 0,31	1,00 ± 0,06	0,84 ± 0,05
Malate	1,00 ± 0,11	0,95 ± 0,14	1,00 ± 0,11	<b>0,69 ± 0,07</b>
FA 18:0	1,00 ± 0,06	0,85 ± 0,04	1,00 ± 0,08	0,93 ± 0,04
Phosphate	1,00 ± 0,33	0,72 ± 0,15	1,00 ± 0,38	1,36 ± 0,24
Pyruvate	1,00 ± 0,30	0,93 ± 0,25	1,00 ± 0,18	0,78 ± 0,03
Sinapate	1,00 ± 0,19	1,01 ± 0,10	1,00 ± 0,17	0,77 ± 0,13
Succinate	1,00 ± 0,23	0,90 ± 0,17	1,00 ± 0,09	<b>1,79 ± 0,23</b>
Threonate	1,00 ± 0,11	<b>0,69 ± 0,07</b>	1,00 ± 0,01	0,91 ± 0,10
<b>Sugars</b>				
Fructose	1,00 ± 0,21	0,90 ± 0,11	1,00 ± 0,21	1,23 ± 0,14
Galactose	1,00 ± 0,10	1,18 ± 0,10	1,00 ± 0,13	1,01 ± 0,14
Glucose	1,00 ± 0,12	1,07 ± 0,06	1,00 ± 0,34	1,15 ± 0,18
Maltose	1,00 ± 0,09	0,91 ± 0,14	1,00 ± 0,37	0,57 ± 0,20
Raffinose	1,00 ± 0,14	0,74 ± 0,07	1,00 ± 0,16	0,68 ± 0,06
Ribose	1,00 ± 0,05	1,15 ± 0,07	1,00 ± 0,05	0,97 ± 0,04
Sucrose	1,00 ± 0,09	0,86 ± 0,06	1,00 ± 0,08	1,08 ± 0,11
Trehalose	1,00 ± 0,11	0,94 ± 0,07	1,00 ± 0,30	0,56 ± 0,14
Xylose	1,00 ± 0,12	1,12 ± 0,09	1,00 ± 0,10	0,84 ± 0,06
<b>Sugar alcohols</b>				
Galactinol	1,00 ± 0,13	0,71 ± 0,07	1,00 ± 0,14	<b>0,61 ± 0,07</b>
Glycerol	1,00 ± 0,19	0,73 ± 0,19	1,00 ± 0,24	1,23 ± 0,14

Inositol, myo-	1,00 ± 0,11	0,92 ± 0,07	1,00 ± 0,11	0,94 ± 0,04
Maltitol	1,00 ± 0,13	1,08 ± 0,07	1,00 ± 0,15	0,72 ± 0,09
<b>N- compounds</b>				
Putrescine	1,00 ± 0,14	0,82 ± 0,10	1,00 ± 0,12	1,06 ± 0,16

**Metabolic profiling der *aox1a*-Mutanten** (Fettdruck kennzeichnet die durch den *t*-Test errechnete Signifikanz der Unterschiede zum WT ( $P < 0.05$ )).

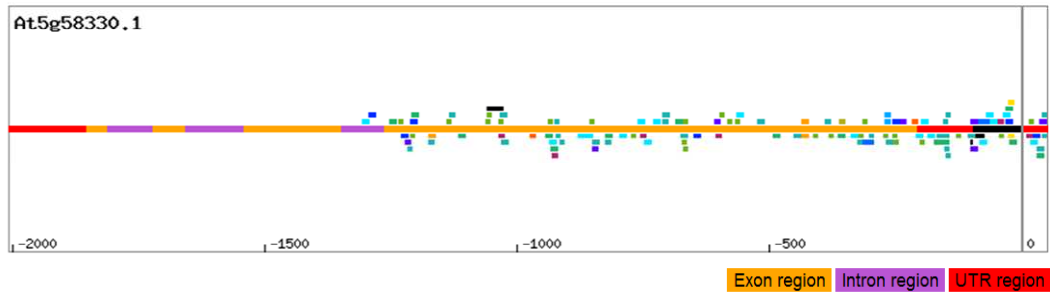
	-AA		+AA	
	WT	<i>aox1a-ko</i>	WT	<i>aox1a-ko</i>
<b>Amino acids</b>				
Alanine	1.00 ± 0.75	0.72 ± 0.09	1.00 ± 0.12	1.32 ± 0.20
Asparagine	1.00 ± 0.18	0.88 ± 0.18	1.00 ± 0.09	0.77 ± 0.09
Aspartate	1.00 ± 0.15	0.77 ± 0.09	1.00 ± 0.13	<b>0.43 ± 0.03</b>
β-Alanine	1.00 ± 1.01	<b>0.61 ± 0.06</b>	1.00 ± 0.08	1.34 ± 0.16
GABA	1.00 ± 0.53	0.83 ± 0.09	1.00 ± 0.08	<b>1.41 ± 0.15</b>
Glutamate	1.00 ± 0.11	<b>0.66 ± 0.08</b>	1.00 ± 0.07	<b>0.47 ± 0.07</b>
Glutamine	1.00 ± 0.20	0.75 ± 0.14	1.00 ± 0.09	<b>0.32 ± 0.04</b>
Glycine	1.00 ± 1.12	1.43 ± 0.20	1.00 ± 0.08	<b>2.33 ± 0.36</b>
Hydroxyproline	1.00 ± 0.81	0.78 ± 0.07	1.00 ± 0.11	0.84 ± 0.09
Isoleucine	1.00 ± 0.61	<b>1.53 ± 0.05</b>	1.00 ± 0.13	1.29 ± 0.08
Leucine	1.00 ± 0.47	0.77 ± 0.11	1.00 ± 0.16	1.57 ± 0.21
Methionine	1.00 ± 0.82	0.91 ± 0.10	1.00 ± 0.11	<b>1.97 ± 0.26</b>
Phenylalanine	1.00 ± 0.84	0.80 ± 0.09	1.00 ± 0.07	1.24 ± 0.16
Proline	1.00 ± 1.90	0.62 ± 0.08	1.00 ± 0.21	1.52 ± 0.19
5-Oxoproline	1.00 ± 0.97	0.76 ± 0.13	1.00 ± 0.09	<b>0.29 ± 0.05</b>
Serine	1.00 ± 0.68	0.93 ± 0.10	1.00 ± 0.06	<b>0.30 ± 0.05</b>
Threonine	1.00 ± 0.70	0.97 ± 0.10	1.00 ± 0.08	0.88 ± 0.10
Tyrosine	1.00 ± 0.69	1.23 ± 0.17	1.00 ± 0.12	1.50 ± 0.22
Valine	1.00 ± 0.89	1.40 ± 0.18	1.00 ± 0.15	1.35 ± 0.19
O-Acetyl-serine	1.00 ± 0.87	0.99 ± 0.09	1.00 ± 0.15	0.66 ± 0.11
Ornithine	1.00 ± 0.82	1.05 ± 0.15	1.00 ± 0.09	<b>1.45 ± 0.14</b>
Tryptophan	1.00 ± 0.48	0.96 ± 0.23	1.00 ± 0.07	1.37 ± 0.16
<b>Acids</b>				
L-Ascorbate	1.00 ± 0.50	0.85 ± 0.05	1.00 ± 0.09	1.06 ± 0.12
Benzoate	1.00 ± 0.92	0.94 ± 0.07	1.00 ± 0.06	1.12 ± 0.09
Citrate	1.00 ± 1.95	<b>0.23 ± 0.03</b>	1.00 ± 0.16	<b>0.55 ± 0.06</b>
Dehydroascorbate	1.00 ± 0.59	0.90 ± 0.10	1.00 ± 0.11	0.84 ± 0.05
Fumarate	1.00 ± 0.35	0.91 ± 0.07	1.00 ± 0.06	0.96 ± 0.11
2-Oxoglutarate	1.00 ± 0.79	1.27 ± 0.17	1.00 ± 0.09	<b>1.95 ± 0.17</b>
FA 18:0	1.00 ± 0.51	0.94 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.06 ± 0.11
Glycerate	1.00 ± 0.58	0.99 ± 0.09	1.00 ± 0.07	<b>1.71 ± 0.20</b>
Malate	1.00 ± 0.86	<b>0.59 ± 0.07</b>	1.00 ± 0.07	<b>0.71 ± 0.05</b>
Phosphate	1.00 ± 0.60	<b>0.58 ± 0.07</b>	1.00 ± 0.16	0.70 ± 0.12
Pyruvate	1.00 ± 0.10	1.05 ± 0.10	1.00 ± 0.16	<b>4.54 ± 0.47</b>
Succinate	1.00 ± 0.69	0.82 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.21 ± 0.11
Threonate	1.00 ± 1.01	0.84 ± 0.08	1.00 ± 0.13	0.87 ± 0.09
4-Hydroxybutyrate	1.00 ± 0.58	1.45 ± 0.22	1.00 ± 0.13	<b>5.91 ± 0.68</b>

### 8.3 Carboxylierungseffizienzen



Carboxylierungseffizienzen von 11 Wochen alten *nadp-mdh*- und WT-Pflanzen bei einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 21 % (○) und unter O<sub>2</sub>-freien Bedingungen (●) bei 800 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Gemessen wurde die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate in Abhängigkeit zur C<sub>i</sub>-Konzentration bei 800 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> jeweils am gleichen Blatt von *nadp-mdh*-Pflanzen (unten) und WT-Pflanzen (oben) die unter Kontrollbedingungen angezogen wurden.

## 8.4 Transkriptionsfaktor-Bindemotive

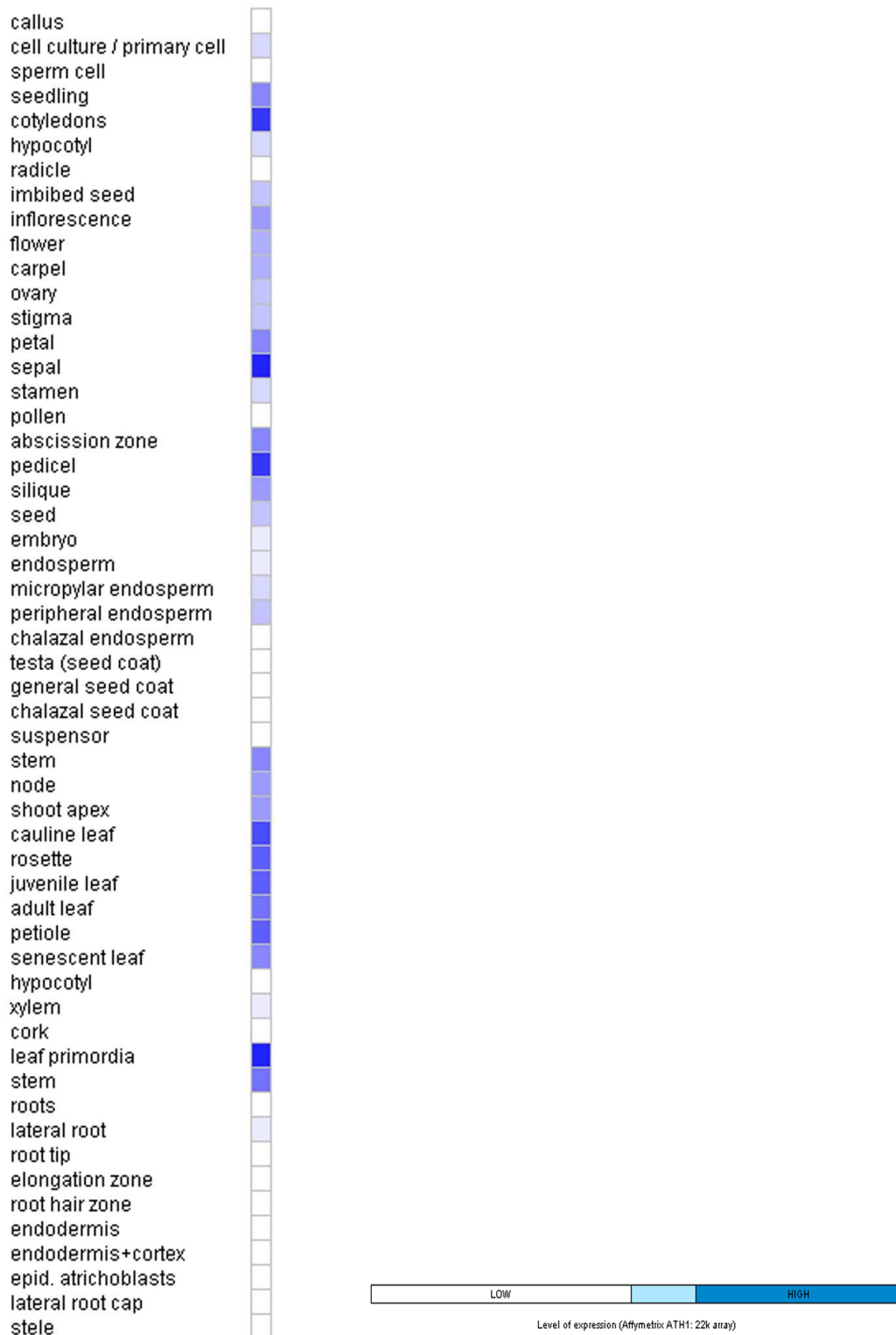


Farbliegende entsprechender Transkriptionsfaktor-Bindemotive:

■ - other	■ ABI3/VP1	■ AP2/EREBP	■ bHLH	■ bZIP
■ C2C2(Zn) Dof	■ C2C2(Zn) GATA	■ C2H2(Zn)	■ CAMTA	■ E2F/DP
■ GARP	■ GARP/ARR-B	■ GATA	■ HD-HOX	■ HD-KNOTTED
■ HD-PHD	■ HD-ZIP	■ MADS	■ MYB	■ NAC
■ SBP	■ small RNAs	■ TCP	■ Trihelix	■ WRKY(Zn)

Analyse der 2000 bp langen Promotorregion des *NADP-MDH*-Gens (At5g58330) auf Transkriptionsfaktor-Bindemotive mit Hilfe der Transkriptionsfaktor-Datenbank *AthaMap* (<http://www.athamap.de>).

## 8.5 Gewebespezifische Genexpressionsdaten



Visualisierung von gewebespezifischen *NADP-MDH*-Genexpressionsdaten der Internetdatenbank *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.com>), welche mit Hilfe von *22K-Affymetrix Mikroarray Chips* erstellt wurden.



## 9 Publikationen

**Hameister, S., Becker, B., Holtgreffe, S., Strodtkötter, I., Linke, V., Backhausen, J.E. & Scheibe, R.** (2007) Transcriptional regulation of NADP-dependent malate dehydrogenase: comparative genetics and identification of DNA-binding proteins. *J. Mol. Evol.* **65**, 437-455

**Strodtkötter, I., Padmasree, K., Dinakar, C., Speth, B., Niazi, P.S., Wojtera, J., Voss, I., Do, P.T., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Linke, V., Raghavendra, A.S. & Scheibe, R.** (2009) Induction of the AOX1D isoform of alternative oxidase in *A. thaliana* T-DNA insertion lines lacking isoform AOX1A is insufficient to optimize photosynthesis when treated with antimycin A. *Mol. Plant* **2**, 284-297

**Hanke, G.T., Holtgreffe, S., König, N., Strodtkötter, I., Voss, I. & Scheibe, R.** (2009) Use of transgenic plants to uncover strategies for maintenance of redox-homeostasis during photosynthesis. In: Jacquot, J.-P. eds. *Advances in Botanical Research: Oxidative Stress and Redox Regulation in Plants*. Vol. 52, pp. 207-251





## 10 Lebenslauf

### Zur Person:

Name: Inga Strodtkötter  
Geburtsort: Haselünne  
Geburtsdatum: 13.05.1979  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1985 - 1989 Paulus-Grundschule Haselünne  
1989 - 1991 Orientierungsstufe Haselünne  
1991 - 1995 Realschule Haselünne  
Abschluss: Erweiterter Sekundarabschluss I  
1995 - 1998 Fachgymnasium Wirtschaft, Berufsbildende Schulen Meppen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Wissenschaftliche Ausbildung:

10/1998 - 09/1999 Diplom-Studiengang Volkswirtschaftslehre an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

10/1999 - 06/2005 Diplom-Studiengang Biologie an der Universität Osnabrück. Prüfungsfächer: Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie und Neurobiologie

[09/2004 - 06/2005] Diplomarbeit zum Thema: „Proteinchemische und molekularbiologische Charakterisierung von mitochondrialen Proteinen mit vermuteter Dicarbonsäure-Transportfunktion aus *Arabidopsis thaliana*“ in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie der Universität Osnabrück  
Abschluss: Diplom-Biologin  
(Note 1,2 - mit Auszeichnung)

07/2005 - 10/2005 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück

seit 11/2005 Doktorandin im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück (AG Pflanzenphysiologie) gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (EM 166/1-1 & -2: „Untersuchungen zur Malathomöostase in Höheren Pflanzen“) und Mitteln des Frauenförderpools der Universität Osnabrück



## 11 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Renate Scheibe für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, ihren fachlichen Rat, ihre Diskussionsbereitschaft und letztendlich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich für die schöne Zeit während der *Gordon Research Conference*.

Bei Prof. Dr. Karlheinz Altendorf möchte ich mich ebenfalls für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Vera Linke für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für ihre äußerst kompetente Betreuung sowie für die vielen effektiven, wissenschaftlichen Gespräche. Ich danke insbesondere für grenzenlose Loyalität, Hilfsbereitschaft und letztendlich für die nützlichen Ratschläge bei der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme bedanken. Vielen Dank für die Unterstützung, fachliche Beratung, Hilfestellung bei der Laborarbeit und natürlich für die schöne Zeit. Ich danke insbesondere Dr. Simone Holtgreffe, Dr. Guy T. Hanke und Dr. Jan E. Backhausen für die vielen Diskussionen, Anregungen und praktischen Hilfestellungen, Silke Walter für die Unterstützung bei der GSH-Bestimmung mittels *HPLC*, Hans-Martin Leffers für die ständige Hilfsbereitschaft, Kirsten Jäger und Heike Wolf-Wibbelmann für die Pflege und Anzucht der Pflanzen und Heike Schwiderski, die sich immer großartig um das „Drumherum“ gekümmert hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an Ingo Voß, Dr. Joanna (Asia) Wojtera und Nicolas König, die mich während meiner gesamten Zeit in der Pflanzenphysiologie begleitet haben, mit denen ich erleben durfte wie perfekte Teamarbeit funktioniert und die mir immer sehr viel Kraft gegeben haben. Die gemeinsame Zeit mit Euch wird mir fehlen!

Bei unseren Kooperationspartnern Dr. Kollipara Padmasree und Prof. Dr. Agepati S. Raghavendra (*Department of Plant Sciences, School of Life Sciences, University of Hyderabad, India*) sowie Dr. Alisdair Fernie, Dr. Adriano Nunes-Nesi und Dr. Thi Phuc Do (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm, Potsdam) möchte ich mich herzlich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bezüglich der gemeinsamen Publikation bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Eva-Mari Aro, Dr. Saijaliisa Kangasjärvi und Dr. Paula Mulo (*Plant Physiology and Molecular Biology, Department of Biology, University of Turku, Finland*) sowie Prof. Dr. Karl-Josef Dietz und Dr. Marie-Luise Oelze (Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld) für das Interesse an diesem Projekt und für die Durchführung zusätzlicher Expressionsstudien.

Zudem danke ich den Studenten Corinna Wehmeyer, Birgit Bachmann, Tatjana Goss, Anna-Lena Schön, Jennifer Selinski, Anne Hüning, Janina Schlüter und David Bartholomäus, die während ihres Studiums mit mir gemeinsam an diesem interessanten Projekt gearbeitet haben.

Dr. Steffen Hameister danke ich für die Hilfe bei den mikroskopischen Aufnahmen der „GUS-Pflanzen“. Außerdem bin ich dankbar für die gute Freundschaft, den oftmals aufbauenden Gesprächen und für die Unterstützung beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Sabine Heuer, Marion Grave, Corinna Wehmeyer, Birgit Bachmann und Dr. Asia Wojtera möchte ich mich für eine unvergesslich schöne gemeinsame Laborzeit bedanken!

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von finanziellen Mitteln und der Zentralen Kommission für Gleichstellung der Universität Osnabrück für die finanzielle Hilfe während der Fertigstellung meiner Dissertation.

Ich möchte mich ganz besonders bei Uwe Hebbelmann bedanken, der immer unterstützend an meiner Seite stand, immer ein offenes Ohr für mich hatte und der mir so manches Mal neuen Mut gemacht hat. Ich danke auch für die große Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern, denen ich dafür danken möchte, dass sie immer an mich geglaubt haben. Meiner ganzen Familie danke ich von Herzen, dass sie mir Rückhalt gegeben hat und immer für mich da war!

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)