

Projekt Forskerspirer 2023	
Titel	Optimering af afgrødeudbytte gennem genmodificering af Rubisco activases 3'UTR
Identifikationskode	IH43
Navn	Isabella Holmgren
Gymnasium	Kruses Gymnasium
Fagområde	NAT-projekt

Indholdsfortegnelse

Indledning	2
Problemformulering, formål og relevans	2
Afgrænsning	3
Teori	3
<i>CO₂-fiksering - kort fortalt - og Rubisco-aktivering</i>	3
<i>Rubisco activase - fotosyntesens redningsmand</i>	4
<i>Kort om 3'UTR og regulering/modning af præ-mRNA</i>	5
Sammenligning af OsrcaA1 og OsrcaA2	6
Metode	6
<i>CRISPR-Cas9</i>	6
<i>Levering af vektor med A. Tumefaciens</i>	7
Fremgangsmåde	7
<i>Fase 1 - Design af CRISPR gRNA</i>	7
<i>Fase 2 - Transformation af planten</i>	8
<i>Fase 3 - Selektion af planten og dyrkning</i>	8
<i>Fase 4 - Måling af fotosynteserate og vækst</i>	8
Budget	8
Tidsramme	9
Konklusion og perspektivering	9
Tak	10
Bibliografi	10

Indledning

Der er 8 milliarder mennesker på kloden, og alle disse mennesker har behov for mad. I takt med at befolkningstallet stiger, må vores landbrug kunne følge med. En fremtidig udfordring i dette henseende er de hurtigt stigende temperaturer overalt på kloden, der har stor indflydelse på landbruget. Mere konkret er en af problematikkerne, at vores nuværende afgrøder ikke er tilpasset disse øgede temperaturer, og planternes enzymer og processer i fotosyntesen vil derfor ikke fungere optimalt, når den globale temperatur stiger endnu mere. Dette vil følgelig have konsekvenser for afgrødeudbyttet, idet fotosyntesen har stor betydning for vækstraten i planter. Ved højere fotosynteserater ses også større blade, tykkere rødder etc.,¹ forudsat at planten har næring nok til rådighed. Man mener, at synderne bag fotosyntesens varmebetingede inhibering skyldes at elektrontransport forstyrres, hvilket sker ved høje temperaturer ($>40C^\circ$)² samt det lave temperatur optimum for enzymet Rubisco activase (RCA), der står for at vedligeholde det carbonbindende enzym Rubisco i dets aktive stadie, så denne kan blive ved at fikserer CO_2 . Tidligere studier har blandt andet vist, at ved moderate temperaturer ($>33C^\circ$) er varmebetinget inhibering den begrænsende faktor for fotosyntesen i ris af arten *Oryza Sativa*³. *O. sativa* er af særlig interesse eftersom det er den mest dyrkede rissort i verden og udgør en vigtig fødekilde for mere end halvdelen af verdenspopulationen⁴.

Jeg vil derfor i mit projekt beskrive hvordan man forhåbentlig kan optimere afgrødeudbytte af ris af arten *O. sativa* ved at gøre denne plantes Rubisco activase, som jeg fortløbende vil referer til som RCA, mere varmestabil.

Problemformulering, formål og relevans

Formålet med mit projekt er at øge Rubisco-aktivering i *O. sativa* ved moderate temperaturer ($33C^\circ$ - $40C^\circ$) for at øge afgrødeudbytte. I den forbindelse vil jeg undersøge, om 3'UTR-længden har en sammenhæng med varmestabilitet. Tidligere studier har vist, at man ved at øge varmetolerancen af RCA i planten *Arabidopsis thaliana* kan øge fotosyntese og vækstrate ved moderat varmestress.⁵ En plante vil desuden have flere isoformer af RCA, og studier af RCA i både *Arabidopsis* og bomuld viser, at des kortere 3'-UTR i det kodende gen for RCA, des mere varmestabil en isoform.⁶

Derfor vil jeg med mit projekt undersøge: *Kan man øge fotosynteseraten i en specifik afgrøde, Oryza sativa, ved at forkorte 3'-UTR i genet for RCA's lille isoform (gen: OsrcaA2)?*

Jeg vil desuden have for øje, om en succesfuld genmodificering vil have effekt i det miljø afgrøden dyrkes i i mit forsøgsdesign. Altså om der er effekt i praksis eller kun i laboratoriet. Jeg har valgt *O. sativa* som min målplante eftersom den er så vigtig en afgrøde for så mange menneske, men også fordi der kun kodes for RCA i ét enkelt gen modsat i fx hvede.⁷

¹ (Faster plant growth through more efficient photosynthesis, 2020)

² (Mark A. Stidham)

³ (Andrew P. Scafaro, 2016)

⁴ (Uniprot.org, u.d.)

⁵ (Itzhak Kurek, 2007)

⁶ (Inosha Wijewardene, 2021)

⁷ (Inosha Wijewardene, 2021)

Mit projekt er relevant, fordi klimafordringernes hastige fremtræden bibringer forandringer og udfordringer inden for landbruget, som kan lede til madmangel, særligt i betragtning af den voksende verdensbefolkning. Mit projekt har til formål at imødegå disse udfordringer.

Afgrænsning

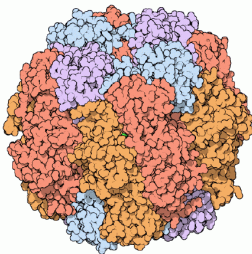
Jeg vil i løbet af mit projekt ikke komme ind på de etiske dilemmaer, der opstår i henhold til brug af genteknologi og GMO, idet projektet ellers bliver alt for omfangsrigt.

Jeg går ikke i detaljen med under hvilke miljømæssige forhold, ris vokser bedst, i beskrivelsen af dette projekt såsom jordtype og specifikke mængder næringsvæske.

Teori

CO₂-fiksering - kort fortalt - og Rubisco-aktivering

En del af de stofskifteprocesser, der foregår under fotosyntesen i C₃-planter, kaldes samlet set for Calvin-cyklussen. Det er i Calvin-cyklussen, at den atmosfæriske CO₂ bindes og omdannes til G3P (glyceraldehyd 3-fosfat), der kan omdannes til blandt andet sukker i form af glukose gennem en række af forskellige reaktioner. Første trin i denne cyklus er, at få fikseret den atmosfæriske CO₂, hvilket foretages af enzymet ribulose- 1,5-bifosfat carboxylase/oxygenase, som jeg fremover vil referere til som Rubisco, der er det mest udbredte protein i naturen⁸. Enzymet består af 8 store subunits (RbcL) og 8 små subunits (RbcS) der er arrangeret som vist på figur 1.

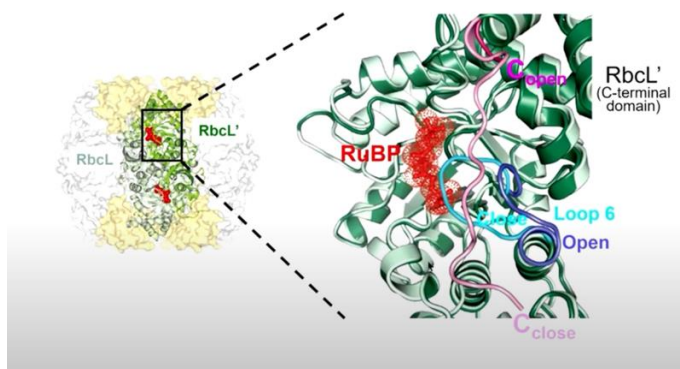


Figur 1) Blå og lilla indikerer RbcS, orange og rød viser RbcL.⁹

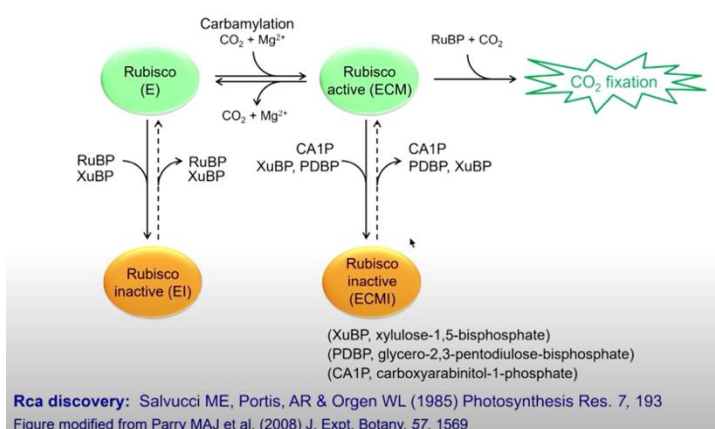
Rubisco fikserer CO₂ ved først at carboxylerer sukkerfosfaten ribulose1,5-bifosfat (RuBP). Før carboxyleringen af RuBP kan finde sted, skal det aktive sæde i Rubisco carbamyleres, ved at et ikke-substrat CO₂-molekyle bindes til en lysin-aminosyre i det aktive sæde, så der dannes en carbamat-forbindelse, der derefter stabiliseres af en Mg²⁺-ion. I hver RbcL-dimer befinder der sig to aktive sæder, der som følge af binding med RuBP undergår et konformationskifte, der sørger for at holde det aktive sæde lukket. Af særlig betydning er, at Loop 6 i den ene af de to subunits udstrækkes således, at den fastholder RuBP, hvorefter det lukkede stadie af det aktive sæde stabiliseres ved at den fleksible C-terminal hale positioneres henover RbcL og fastholder loop 6.

⁸ (Javaid Y. Bhat, 2017)

⁹ (Protein Data Bank, u.d.)



Figur 2) Figuren viser det aktive sæde i RCA og hvordan RuPB (rød) fastholdes. Markeret med lyserød er den fleksible C-terminalhale, Loop 6 er markeret med cyanblåt og lilla for at illustrerer konformationsændringen der finder sted.¹⁰



Dog forholder det sig sådan, at hvis ikke det aktive sæde er carbamylet, vil RuBP i stedet binde langsomt, men kraftigt til Rubisco og skabe et inaktiv substrat-enzymkompleks.¹¹ Udover RuBP, er der yderligere en række sukkerfosfater, der kan gå ind og blokerer det aktive sæde i Rubisco, som følge af fejl i carboxyleringsprocessen.

Figur 3) Figuren viser der forskellige enzymsubstratkomplekser der kan opstå i forbindelse med binding af RuBP til Rubisco, samt reaktionerne der medfører disse komplekser. Apoenzymet Rubisco (E) skal binde til cofaktorer for at opnå dets aktive form (ECM). Både E og ECM kan inaktiveres ved binding af sukkerfosfater (EI og ECMI).¹²

Til at imødegå dette problem er chaperonen Rubisco activase (RCA), der står for at vedligeholde Rubisco aktivering ved at fjerne disse inhibitorer.

Rubisco activase - fotosyntesens redningsmand

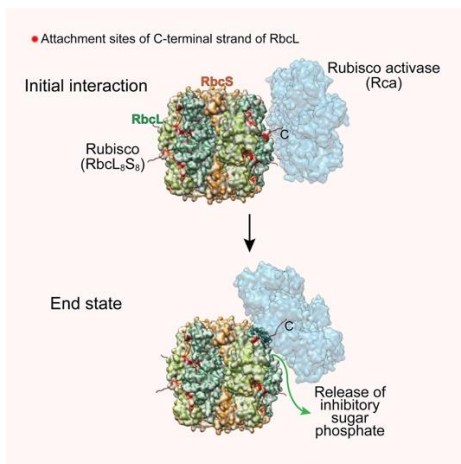
Rubisco activase er et protein i AAA+-familien (ATPases associated with various cellular activities). Hvis en plante ikke udtrykte RCA, ville den have kraftigt besværet vækst. Selve mekanismen bag RCA's interaktion med Rubisco består i, at RCA rekonfigurerer det aktive sæde i Rubisco, således at det bundne sukkerfosfat kan frigives. Dette sker gennem hydrolyse af ATP til ADP. RCA er opbygget som en hexamer med en central pore. Ifølge artiklen "Mechanism of Enzyme Repair by the AAA⁺ Chaperone Rubisco Activase" (2017), interagerer RCA med Rubisco fra siden og placerer den centrale pore hen over det aktive sæde, således at C-terminalen i RbcL kan hives ind i poren og åbne det aktive sæde, så det bundne sukkerfosfat frigøres. Det

¹⁰ (hayer-Hartl, 2021)

¹¹ (Sharwoo, 2016)

¹² (hayer-Hartl, 2021)

er desuden af særlig betydning, at RCA kun interagerer med strukturen i det aktive sæde og lige omkring, og derved undgår at forstyrre den resterende struktur af Rubisco.



Figur 4) Figuren viser, hvordan Rubisco activase interagerer med Rubisco.¹³

RCA spiller en kritisk rolle i fotosyntesen, men dets funktion hæmmes ved høje temperaturer, da RCA har et særligt lavt temperaturoptimum ved omkring 42°C¹⁴, hvor det begynder at denaturere. RCA begynder ligefrem at dissociere allerede ved typisk mellem 30-40°C¹⁵ og danner som følge heraf inaktive aggregater. Naturligt vil en plante have flere RCA isoformer, der opererer bedst ved forskellige temperaturer. I *O. sativa* koder et enkelt gen i nucleolus for to RCA isoformer, en stor og en lille, som jeg fremover vil referere til som henholdsvis RCA_L og RCA_S. En undersøgelse af ris og dens varmetilpasning under varmetress har vist, at ris der var blevet akklimatiseret efter at have været udsat for varmetress over en periode på 4 dage udtrykte en større ratio RCA_L i forhold til mængden af Rubisco. Transgene planter, der overudtrykte RCA_L, udviste desuden øget tolerance over for højere temperaturer og bedre vækst ved disse forhold i forhold til transgene planter, der overudtrykte RCA_S. Ved normale temperaturer var der større tilstedeværelse af RCA_S. RCA-isoformen spiller altså forskellige roller afhængig af temperaturen¹⁶. Derudover reguleres de to isoformer forskelligt. RCA_L reguleres af ATP/ADP-rationen og redoxstadiet i chloroplasten, hvorimod RCA_S ikke reguleres af redox-stadiet.¹⁷

Kort om 3'UTR og regulering/modning af præ-mRNA

De forskellige isoformer af RCA i *O. sativa* skyldes alternativ splicing af præ-mRNA'en, der afskrives fra genet for RCA. Når præ-mRNA afskrives vil der være dele der indeholder kodende materiale for aminosyresekvenser og dele der ikke gør. Et eksempel på genmateriale, der ikke bliver transskriberet til aminosyrer, er 3'UTR (3' UnTranslated Region), der er placeret efter stopcodonet i den kodende region (CDS; CoDing Sequence) og før poly-A-halen i 3' enden af mRNA. 3'-UTR spiller til gengæld en stor rolle i modningen af præ-mRNA, da de indeholder såkaldte cis-elementer, der blandt andet regulerer

¹³ (Javaid Y. Bhat, 2017)

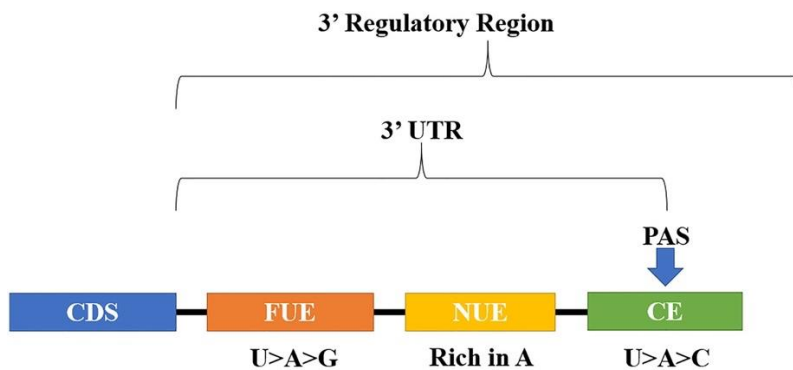
¹⁴ (Yan-Ping Cen, 2005)

¹⁵ (Yan-Ping Cen, 2005)

¹⁶ (Dun Wang, 2010)

¹⁷ (Wataru Yamori, 2012)

polyadelyring, proteinfunktion, lokalisering, mRNA stabilitet og afskrivningsfaktorer. I planter vil der i 3'-UTR være forskellige cis-elementer, og den specifikke funktion af disse er ikke forstået til fulde endnu.



Figur 5) Her ses en figur over inddelingen af cis-elementer i planterens 3'-UTR. UE, far upstream element; NUE, near upstream element; CE, cleavage element; PAS, polyadenylation site; CDS, coding sequence; 3'UTR, 3' untranslated region.¹⁸

In vitro undersøgelser har vist at deletion af cis-elementerne NUE og FUE fører til valg af uvante PAS.¹⁹

Ydermere har undersøgelser i *Arabidopsis* vist, at mRNA med kortere 3'-UTR er mere stabile under varmetress end mRNA med længere 3'-UTR in vivo.²⁰

Sammenligning af OsrcaA1 og OsrcaA2

Jeg har sammenlignet generne for mRNA'en af RCA_L på 1623 bp (gen:OsrcaA1) og RCA_S 1706 (gen: OsrcaA2), der indeholder både 5'- og 3'-UTR foruden CDS. Af de to har RCA_S den længste 3'-UTR, hvilket stemmer overens med hypotesen om, at der er en sammenhæng mellem længden af 3'-UTR og varmostabiliteten af det afskrevne protein. Ved at foretage et alignment på de to gener, har jeg identificeret at i OsrcaA2 er et gensegment på 85 nukleotider, der ikke findes i OsrcaA1 som indeholder et stopcodon tæt ved starten. Det betyder derfor både at proteinsekvensen er forlænget med enkelte aminosyrer og at 3'-UTR i RCA_S er noget længere end i RCA_L.

Metode

Jeg vil gå bruge en deduktiv tilgang i min undersøgelse. Jeg vil undersøge om jeg kan øge varmostabiliteten af RCA_S ved at foretage klip i en 3'-UTR i mRNA, der koder for RCA_S og derved forhåbentlig øge Rubisco-aktiveringen i *O.Sativa* og derigennem øge fotosynteserate og derfor høstudbytte.

Dette vil jeg opnå ved via CRISPR-Cas9 foretage en excision i OsrcaA2 i 3'-UTR.

CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 kan bruges til at lave målrettede dobbeltstrengede brud i DNA, hvorved man kan klippe et stykke genmateriale ud. Cas9-enzymet kan klippe så præcist, fordi det indeholder et stykke gRNA (guide RNA) med en specifik nukleotidsekvens, der er korresponderende til der, man ønsker at klippe. Cellen vil

¹⁸ (Willian Souza Bernardes, 2020)

¹⁹ (Willian Souza Bernardes, 2020)

²⁰ (Benjamin P. DeRidder, 2012)

dernæst selv reparere brud med egne reparationsmekanismer, der indtræder som følge af det inducerede dobbeltstrengede brud. gRNA har en sekvens på 20 nukleotider, der genkender målsøgte DNA-sekvenser. Denne sekvens i gRNA er det muligt at designe efter eget behov. Dog kræver en succesfuld gensplejsning, at der befinder sig en PAM-sekvens (5'-NGG-3') i den målsøgte DNA på den modsatte streng end de 20 eftersøgte nukleotider som gRNA korresponderer med.²¹ Cas9 vil klippe DNA strengen over ved position 3 efter PAM-sekvensen.

Levering af vektor med *A. Tumefaciens*

For at få introduceret CRISPR-værktøjet til cellerne i planten vil jeg gøre brug af *Agrobacterium* medieret transformation.

Agrobacterium tumefaciens er en bakterie, der kan overføre en del af dets såkaldte Ti-plasmid (Tumor-inducing plasmid) til planteceller og derved få disse til at udtrykke generne i plasmidet. Ved kontakt mellem plantecellen og bakterien sker en bakteriel overførsel af DNA til plantecellen, hvorefter denne DNA vil kunne blive optaget i plantecellens genom. Man kan udnytte denne evne ved at udskifte de Tumor-inducerende gener i Ti-plasmidet med et donergen, for den egenskab man ønsker at give planten via rekombinant DNA-teknik. I mit forsøg ønsker jeg at inkorporere CRISPR-Cas9 til plantecellerne.

Denne teknik har dog den ulempe, at generne indsættes et vilkårligt sted i plantens genom og derved risikerer at ødelægge vitale gener som planten kan dø til følge af.²²

Fremgangsmåde

Fase 1 - Design af CRISPR gRNA

Da jeg ønsker at skære et stykke af genmaterialet ud, skal jeg foretage to klip.

Nedenstående figur viser et udsnit af alignment mellem *OsrcaA2*(nederst) og *Osrca1* (øverst).

²¹ (Biotech Academy, u.d.)

²² (Lone Als Egebo, 2019)

AB034698.1	CGACGCCATGAAGACTGGTTCTTCTACG-----	1343
AB034748.1	CGACGCCATGAAGACTGGTTCTTCTACGGTCTGCGCCATCCAGCTGAATAAAAGATCT *****	1380
AB034698.1	-----GGCAAG	1349
AB034748.1	CTAGCTATTCGCATCCCATCGATGCATCGTAGGCGGCCTGCATAGGAGGAGGAGGCAAG *****	1440
AB034698.1	GAGCACAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGCACCGACCCTGTTGCCAAGA	1409
AB034748.1	GAGCACAGCAAGCAGGTAACCTGCCTGTGCCGGAAGGTTGCACCGACCCTGTTGCCAAGA *****	1500
AB034698.1	ACTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTTTACACCTTTAAGCAGGCC	1469
AB034748.1	ACTTCGACCCAACGGCGAGGAGCGACGACGGCAGCTGCCTTTACACCTTTAAGCAGGCC *****	1560

Jeg har udvalgt to mulige PAM-sekvenser, som jeg formoder er placeret omkring FUE. Disse valg af PAM-sekvenser betyder, at jeg ville skulle bruge gRNA med sekvenserne henholdsvis 5'GCATCGTAGGCGGCCTGCAT-3' og 5'-GGTAACCTGCCTGTGCCGGA-3'

Der bestilles nu T-DNA-vektorer med CRISPR-konstrukter med de ønskede gRNA-sekvens indført.

Fase 2 - Transformation af planten

Risplanter dyrkes og transformeres, når de er i en vækstfase, hvor de er mest muligt modtagelige overfor transformationen. A. Tumefaciens inokuleres og planterne dyrkes nu på et vækstmedie.

Fase 3 - Selektion af planten og dyrkning

Planterne selekteres. Transformerede planter skal nu dyrkes under optimale forhold samt ikke-transformerede planter, der fungerer som kontroller. Planterne vandes med vækstvand i et kontrolleret miljø for at afkræfte at eventuel manglende effekt skyldes mangel på nitrogen, vand eller lys.

Derudover skal andre transformerede planter sideløbende dyrkes under de forhold, der ville være på en almen kinesisk mark og vandes og gødes efter samme facon.

Planterne udsættes for varrestress dagligt imens de dyrkes.

Fase 4 - Måling af fotosynteserate og vækst

Måling af vækst bedømmes ud fra bladlængde, der måles jævnligt.

Måling af fotosynteserate måles ved at undersøge gasudvekslingen, der sker i bladene efter en periode på 4 dage med varrestressbehandling af 4 timer om dagen.

Budget

Materialer	Pris (DKK)
Risfrø (100 styks) Fra Amazon.com	39,19 (Originalpris 5,25 €)
T-DNA-Vektor med brugerdefineret gRNA Fra genscript	Ukendt
Vækstmedier (Agar) Fra Thermo Fisher Scientific	2.658,00

Agrobacterium Tumefaciens-stamme Fra Thermo Fisher Scientific	4.155,00
Lerjord (under antagelse af at 100 risplanter kan dyrkes på 0,5 m²)²³ Fra min have	0
Hydroponisk næring Fra kridtvejsplanter.dk	45 pr. flaske

Der er ikke taget højde for gebyrer ift. forsendelse i dette skema.

Jeg antager, at jeg vil have adgang til et laboratorium på min skole med basale redskaber til brug i et forsøg som fx pipetter, petriskåle og kulturrør.

Jeg håber på at kunne låne udstyr i institut for Plante- og Miljøvidenskab, sektion for Afgrødevidenskab i KU til måling af gasudveksling i bladene som udtryk for fotosynteseraten samt til groning af planterne som fx et vækstkammer, hvor det vil være muligt at styre miljømæssige faktorer.

Tidsramme

Procedure	Forventet tid
Transformation af plante	1 dag
Selektion	2-4 uger
Groning af hele planter	3-4 måneder
Groning af planter under varrestressbehandling	4 dage
Måling af fotosynteserate via måling af gasudveksling	1 dag
I alt	Omtrent 5 måneder og en uge

Tidsrammen tager udgangspunkt i, at alle materialer allerede er skaffet.

Konklusion og perspektivering

Jeg forventer efter mit forsøg at se en ændring i fotosynteseraten i mine målplanter. Ideelt vil denne ændring indebære øget fotosynteserate som følge af en øget varrestabilitet i RCA_s. Dog er der den mulige ulempe herved, at plantens evne til at vedligeholde net-fotosynteseraten i ris ved normale temperaturer mindskes som følge af indgrebet. Man vil derfor kunne forske videre i, om ændringen er holdbar i det lange løb eller om man kan tage forbehold for ned sat fotosynteserate ved normale temperaturer.

Selv hvis der ikke observeres øget fotosyntese ved moderate temperaturer i forsøget, vil man muligvis kunne bruge informationen til at få bedre indblik i funktionen af det stykke DNA, jeg vil fjerne og rollen det spiller i reguleringen af RCA_s. Hvis forsøget mislykkes, er det i forbindelse med metode værd at kigge på, om man kan gøre brug af andre Cas9-enzymmer med andre PAM-sekvenser for en splejse et alternativt gensegment ud.

Forhåbentlig kan dette forsøg være med til at give et større indblik i, hvordan man kan gøre afgrøder mere varmeresistente og bidrage til en mere sikker fremtid.

²³ (Brian Dunn)

Tak

Tusind tak til Eva Rosenqvist, lektor ved institut for Plante- og Miljøvidenskab, Sektion for Afgrødevidenskab for at sætte tid af til at snakke med mig, samt at vise mig, hvordan man kan måle fotosynteseraten af planter mm.

Derudover en stor tak til Kira Ekberg, min lærer i bioteknologi for at ville bruge tid uden for skolen på at svare på mine spørgsmål om transformation af planter.

Endnu en stor tak til min forskerspirekoordinator Lone Holm for støtte og vejledning.

Bibliografi

Andrew P. Scafaro, A. G.-S. (2016). Heat tolerance in a wild *Oryza* species is attributed to maintenance of Rubisco activation by a thermally stable Rubisco activase ortholog. *New Phytologist*.

Benjamin P. DeRidder, M. E. (2012). Changes at the 3'-untranslated region stabilize Rubisco activase transcript levels during heat stress in *Arabidopsis*. *Springer Link*.

Biotech Academy. (u.d.). Hentet fra Cas9 og DNA identifikation:

<https://www.biotechacademy.dk/undervisning/gymnasiale-projekter/crispr-cas9/cas9-og-dna-identifikation/>

Brian Dunn, T. D. (u.d.). *Rice plant population guide*. Department of Primary Industries.

Cellular machineries devoted to rubisco — the most abundant enzyme. (2021).

Dun Wang, X.-F. L.-J.-P.-J.-A. (2010). Two Rubisco activase isoforms may play different roles in photosynthetic heat acclimation in the rice plant. *Physiologia Plantarum*.

Faster plant growth through more efficient photosynthesis. (2020). Hentet fra Wageningen University & Research: <https://weblog.wur.eu/spotlight/faster-plant-growth-through-more-efficient-photosynthesis/>

Faster plant growth through more efficient photosynthesis. (6. marts 2020). Hentet fra Wageningen University & Research: <https://weblog.wur.eu/spotlight/faster-plant-growth-through-more-efficient-photosynthesis/>

hayer-Hartl, M. (2021). *Cellular machineries devoted to rubisco — the most abundant enzyme*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Inosha Wijewardene, G. S. (2021). Enhancing crop yield by using Rubisco activase to improve photosynthesis under elevated temperatures. *Stress Biology*.

Itzhak Kurek, T. K. (2007). Enhanced Thermostability of *Arabidopsis* Rubisco Activase Improves Photosynthesis and Growth Rates under Moderate Heat Stress. *Plant Cell*.

Javaid Y. Bhat, G. M.-P.-C.-H. (2017). Mechanism of Enzyme Repair by the AAA+ Chaperone Rubisco Activase. *Molecular Cell*.

Lone Als Egebo, J. S. (2019). *Bioteknologi A. nucleus*.

Mark A. Stidham, 2. E. (u.d.). emperature Dependence of Photosynthesis in *Agropyron smithii* Rydb. 1. *Plant physiology*.

Protein Data Bank. (u.d.). Hentet fra Molecule of the Month: Rubisco: <https://pdb101.rcsb.org/motm/11>

Sharwoo, R. E. (2016). Engineering chloroplasts to improve Rubisco catalysis: prospects for translating improvements into food and fiber crops. *Tansley review*.

Uniprot.org. (u.d.). Hentet fra Proteomes · *Oryza sativa* subsp. *indica* (Rice): <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000007015>

Wataru Yamori, C. M. (2012). Rubisco activase is a key regulator of non-steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *the plant journal*.

Willian Souza Bernardes, M. M. (2020). Plant 3' Regulatory Regions From mRNA-Encoding Genes and Their Uses to Modulate Expression. *frontiers*.

Yan-Ping Cen, R. F. (2005). The Regulation of Rubisco Activity in Response to Variation in Temperature and Atmospheric CO₂ Partial Pressure in Sweet Potato. *Plant physiology*.