

Funktionelle Charakterisierung der mitochondrialen
GDC- und SHM-Genfamilien in *Arabidopsis thaliana*
durch Komplementation mit heterologen Genen

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



Vorgelegt von **Nadja Engel**
Geboren am 03.09.1979 in Rostock

April 2010

Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. habil. Hermann Bauwe
 Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzenphysiologie
 e-mail: hermann.bauwe@uni-rostock.de

 Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. habil. Birgit Piechulla
 Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie
 e-mail: birgit.piechulla@uni-rostock.de

Die öffentliche Verteidigung fand am 09.08.2010 an der Universität Rostock statt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Photosynthese und Photorespiration in C ₃ -Pflanzen.....	1
1.2. Mutanten des C ₂ -Zyklus.....	5
1.3. Glycin-Decarboxylase (GDC)	6
1.3.1. GDC in <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.4. Photosynthese und Photorespiration in C ₄ -Pflanzen.....	11
1.4.1. Photorespiration in C ₄ -Pflanzen.....	13
1.4.2. C ₃ -C ₄ -intermediäre Pflanzen.....	14
1.5. Gentechnische Modifikationen der Photorespiration	16
 2. ZENTRALE FRAGESTELLUNGEN	 18
 3. MATERIAL UND METHODEN	 19
3.1. Material.....	19
3.1.1. Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
3.1.2. Enzyme.....	19
3.1.3. Größenstandards für die Gelelektrophorese.....	19
3.1.4. Verwendete Reaktionskits.....	20
3.1.5. Verwendete Plasmide	20
3.1.6. Pflanzenmaterial und Anzucht.....	20
3.1.7. Bakterienstämme.....	21
3.1.8. Oligonukleotide	22
3.1.9. Programme und Internetsoftware.....	23
3.2. Methoden.....	24
3.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	24
3.2.1.1. Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	24
3.2.1.2. cDNA-Synthese	25
3.2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese	26
3.2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26

3.2.1.5.	Sequenzierung.....	27
3.2.1.6.	Restriktionsanalysen.....	27
3.2.1.7.	Ligation.....	27
3.2.1.8.	Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	28
3.2.1.9.	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	28
3.2.1.10.	Floral-Dip-Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3.2.2.	Pflanzenphysiologische Methoden.....	29
3.2.2.1.	Chlorophyllbestimmung.....	29
3.2.2.2.	Metabolitmessungen.....	30
3.2.2.3.	Gaswechselanalysen.....	30
3.2.2.4.	Histochemischer β -Glucuronidase (GUS)-Test.....	30
3.2.3.	Immunolokalisation.....	31
3.2.3.1.	Einbettung in Technovit.....	31
3.2.3.2.	Herstellung von Blattquerschnitten.....	31
3.2.3.3.	Immunohistologischer Nachweis.....	32
3.2.4.	Biochemische Methoden.....	32
3.2.4.1.	Proteinisolation.....	32
3.2.4.2.	Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	33
3.2.4.3.	SDS-PAGE.....	33
3.2.4.4.	Western Blot.....	34
3.2.4.5.	Chromatographische Aufreinigung von Proteinen.....	34
4.	ERGEBNISSE.....	35
4.1.	Isolierung und Charakterisierung der GDC- und SHM-Mutanten.....	36
4.1.1.	P-Protein-Mutanten.....	36
4.1.2.	T-Protein-Mutanten.....	37
4.1.3.	H-Protein-Mutanten.....	40
4.1.4.	SHM-Mutanten.....	41
4.1.5.	Phänotypische Charakterisierung der isolierten Mutanten.....	43
4.1.6.	Expressionsprofile der mitochondrialen GDC- und SHM-Gene.....	45
4.1.7.	Veränderungen der Metabolitgehalte in den GDC- und SHM-Mutanten.....	47
4.1.8.	Photosynthetische Leistung.....	50
4.1.9.	Chemische Komplementation.....	52
4.2.	Komplementation der GDC-Mutanten.....	54
4.2.1.	Analyse der <i>Flaveria anomala</i> GDC-Promotoren.....	54
4.2.2.	Komplementation der T-Protein-Mutante <i>Atgldt1-1</i>	56

4.2.3.	Komplementation der P-Protein-Nullmutante	58
4.2.4.	Charakterisierung der komplementierten Mutante P*	59
4.2.4.1.	Phänotypische Charakterisierung	59
4.2.4.2.	Genotypische Charakterisierung	61
4.2.4.3.	Physiologische Charakterisierung	63
4.2.4.4.	Herstellung eines spezifischen P-Protein-Antikörpers	65
4.2.4.5.	Immunohistologische Analysen	67
4.3.	Komplementation der <i>Atshm1-1</i>-Mutante.....	69
4.3.1.	Vergleichende Analyse von AtSHM1 und AtSHM2	69
4.3.2.	Klonierung der SHM1/2-Chimären-Konstrukte.....	73
4.3.3.	Charakterisierung der SHM1/2-Chimäre.....	73
5.	DISKUSSION	76
5.1.	Die Sonderstellung der GDC- und SHM-Isoformen.....	76
5.1.1.	Die Reduktion der GDC- oder SHM-Aktivität	76
5.1.2.	GDC- und SHM-Nullmutanten sind unter Hoch-CO ₂ nicht lebensfähig.....	79
5.1.2.1.	Die Interaktion mit dem C ₁ -Stoffwechsel.....	80
5.1.2.2.	Die Interaktion mit dem N-Metabolismus.....	81
5.1.3.	Die Gewebespezifität der GDC- und SHM-Isoformen	83
5.2.	Die Komplementation der GDC-Mutanten.....	85
5.2.1.	Die Optimierung der P*-Mutante	88
5.3.	Die Komplementation der SHM-Mutante	90
5.4.	Ausblick	91
6.	ZUSAMMENFASSUNG	92
7.	LITERATURVERZEICHNIS	93
8.	ANHANG	106
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	106
8.2.	Erklärungen	108
8.2.1.	Anteilerklärung für Nadja Engel	108

8.2.2.	Erklärung zur Selbständigkeit	109
8.2.3.	Danksagung	110
8.3.	Publikationsliste	111
8.4.	Präsentationen und Vorträge auf Tagungen	112
8.5.	Lebenslauf	113
9.	ERGÄNZENDES MATERIAL (AUF BEILIEGENDER CD).....	114
9.1.	Publikationen von Nadja Engel (im PDF-Format)	114
9.2.	Sequenzen	114
9.3.	Mutanten	114
9.4.	Leere Vektoren	114
9.5.	Plasmidkarten.....	115
9.6.	Marker und Standards.....	115
9.7.	HPLC-Analysen der Aminosäuren.....	115
9.8.	Gaswechselanalysen.....	115
9.9.	Genevestigator-Daten	115
9.10.	Messung der Chloroplasten	115

1. Einleitung

1.1. Photosynthese und Photorespiration in C₃-Pflanzen

Die oxygene Photosynthese ist der wichtigste Prozess der Kohlenstofffixierung auf unserem Planeten. In höheren Pflanzen kann man drei Varianten der CO₂-Fixierung unterscheiden, die als C₃-, C₄- und CAM- (crassulacea acid metabolism) Typen bezeichnet werden. Der C₃-Stoffwechsel repräsentiert den meist verbreiteten und ursprünglichen Weg der CO₂-Assimilation. Ungefähr 90 % aller Landpflanzen und somit viele agronomisch genutzte Arten, wie Soja, Reis, Weizen und Gerste, gehören dem C₃-Typ an. C₃-Pflanzen besitzen einen Chloroplastentyp, in dem alle photosynthetischen Reaktionen der Licht- und Dunkelprozesse ablaufen, so dass CO₂ mit Hilfe von Lichtenergie zu reduzierten Kohlenstoffverbindungen konvertiert wird.

Das primäre Enzym der CO₂-Fixierung in C₃-Pflanzen ist die Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco), die den Transfer von CO₂ auf den Akzeptor Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP) katalysiert. C₄- und CAM-Pflanzen nutzen ein zweites carboxylierendes Enzym, die Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxylase, die anstelle von Rubisco die primäre CO₂-Fixierung übernimmt. In C₃-Pflanzen ergibt die Carboxylierung von RuBP zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3-PGA), die im Calvin-Zyklus zu Triosephosphat umgesetzt werden oder der Regenerierung des CO₂-Akzeptors RuBP dienen. Die Triosephosphate können aus den Chloroplasten ins Zytosol exportiert werden, um zu Saccharose (als Hauptkohlenstofftransportform) umgesetzt zu werden, oder im Chloroplasten verbleiben zum Aufbau von transitorischer Stärke (Sonnewald *et al.*, 1994). Die CO₂-Fixierung durch Rubisco ist in der heutigen O₂-haltigen Atmosphäre durch deren enzymatische Bifunktionalität eingeschränkt. Neben CO₂ kann auch O₂ an das aktive Zentrum der Rubisco binden. Diese Oxygenierung resultiert in der Umsetzung von RuBP zu jeweils einem Molekül PGA und 2-Phosphoglycolat (2-PG). Dem Calvin-Zyklus kann das 2-PG nicht direkt zugeführt werden, sondern es muss zunächst über den photorespiratorischen Zyklus unter Verbrauch von ATP und NADPH zu 3-PGA umgesetzt werden. Die Balance zwischen Carboxylierung und Oxygenierung ist sowohl vom CO₂/O₂-Verhältnis in den Blättern und als auch von der Lufttemperatur abhängig (Laing *et al.*, 1974). Typische K_m-Werte der Rubisco liegen für CO₂ bei 10-20 µM und für O₂ bei 400-600 µM. Unter ambienten Bedingungen beträgt die Konzentration von CO₂ 11 µM und die von O₂ 253 µM (Woodrow und Berry, 1988).

Der photorespiratorische Zyklus wird auch als C₂-Zyklus bezeichnet (Tolbert, 1997). Durch den C₂-Zyklus werden zwei Moleküle 2-PG zu einem Molekül 3-PGA und CO₂ umgesetzt und somit eine

Akkumulation von 2-PG vermieden, die sich auf die Zelle toxisch auswirken kann (Husic *et al.*, 1987; Ogren, 1984; Leegood *et al.*, 1995). Das 2-PG inhibiert die Triosephosphat-Isomerase, ein Enzym des Calvin-Zyklus und muss daher umgehend verstoffwechselt werden (Husic *et al.*, 1987; Norman und Colman, 1991). Die primären Reaktionen des C₂-Zyklus erstrecken sich über vier Zellkompartimente (Chloroplast, Peroxisom, Mitochondrium; Zytosol). Ein Schema des pflanzlichen C₂-Zyklus ist in der Abb. 1 dargestellt.

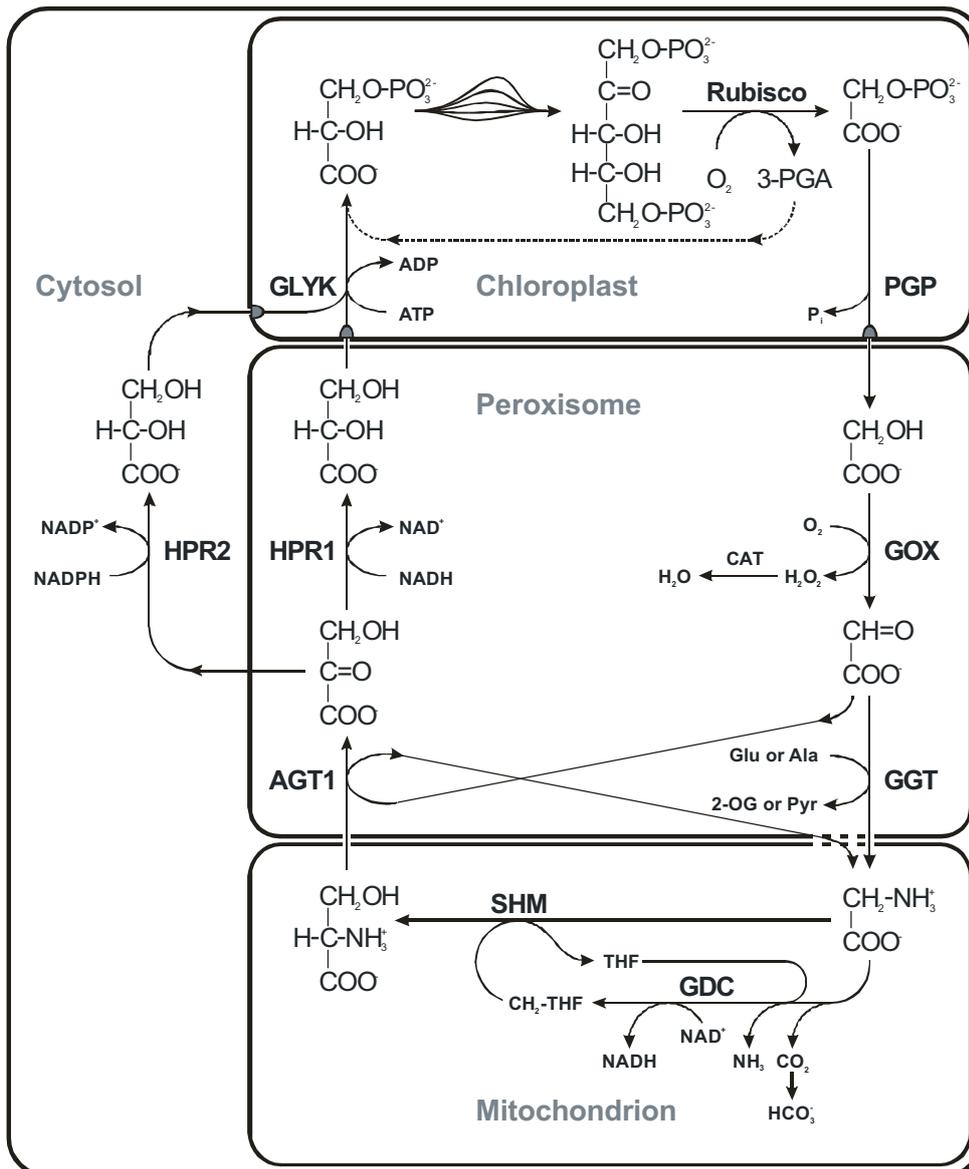


Abb. 1 Schema des pflanzlichen C₂-Zyklus. Die zentralen Enzyme des C₂-Zyklus: Rubisco Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, PGP Phosphoglykolat-Phosphatase, GOX Glykolat-Oxidase, CAT Katalase, GGT Glu:Glyoxylat Aminotransferase, GDC Glycin-Decarboxylase, SHM Serin-Hydroxymethyltransferase, AGT1 Serin: Glyoxylat Aminotransferase, HPR1-2 3-Hydroxypropionat-Reduktase, GLYK D-Glycerat-3-Kinase. Quelle: www.biologie.uni-rostock.de/pflanzenphysiologie.

In der Eingangsreaktion des pflanzlichen C₂-Zyklus wird durch die Oxygenasereaktion der Rubisco 2-PG im Chloroplasten gebildet, welches unmittelbar durch die 2-Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP) dephosphoryliert und zu Glykolat hydrolysiert wird. Das Glykolat wird in die Peroxisomen transportiert und durch die Glykolat-Oxidase (GOX) zu Glyoxylat oxidiert. Das gebildete Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wird durch die Katalase (CAT) zu Wasser umgesetzt. Durch die Serin: Glyoxylat Aminotransferase (AGT1) oder die Glutamat: Glyoxylat Aminotransferase (GGT) wird Glyoxylat zu Glycin transaminiert. Nach dem Transport des Glycins in das Mitochondrium werden zwei Moleküle Glycin durch die Reaktionen der Glycin-Decarboxylase (GDC) und der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHM) in Serin konvertiert. Dabei entstehen CO₂ und NH₃. Das Serin wird zurück in die Peroxisomen transportiert und von der AGT1 zu 3-Hydroxypyruvat und Glycin umgesetzt. Anschließend reduziert die 3-Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR) im Peroxisomen (HPR1) oder im Zytosol (HPR2) das 3-Hydroxypyruvat zu D-Glycerat (Timm *et al.*, 2008). Das Glycerat wird nach der Translokation in den Chloroplasten von der D-Glycerat-3-Kinase (GLYK) zu 3-PGA phosphoryliert. Damit ist der C₂-Zyklus geschlossen, und 3-PGA kann in den Calvin-Zyklus eingehen.

Die Oxygenierung von RuBP bedeutet eine Verminderung der CO₂-Fixierung für die Pflanzen, die durch den C₂-Zyklus minimiert wird. Bis zu 75 % des Kohlenstoffs aus dem Nebenprodukt 2-PG kann dem Calvin-Zyklus zurückgeführt werden, die verbleibenden 25 % gehen als CO₂ durch die Decarboxylierung des Glycins im Mitochondrium verloren. Dieser Verlust wird durch erhöhte Temperaturen gesteigert, da die Präferenz der Rubisco zu O₂ ebenfalls zunimmt (Wingler *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird im Mitochondrium als Folge der GDC-Reaktionen NH₃ freigesetzt, das im Zuge des photorespiratorischen Stickstoffkreislaufes durch die Glutamin-Synthetase (GS-2) und die Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase (Fd-GOGAT) reassimiliert wird (Keys *et al.*, 1999; Keys, 2006; Rachmilevitch *et al.*, 2004). Als Konsequenz wird häufig postuliert, dass Photorespiration ein verschwenderischer Prozess ist, da Kohlenstoff und Stickstoff verloren gehen. Folglich wird die Produktion von Kohlenhydraten und Biomasse in den Pflanzen reduziert. Diese Effekte der Photorespiration können durch erhöhte CO₂-Konzentrationen, z. B. in einer Klimakammer oder einem Gewächshaus revertiert werden, die aber auf dem Feld nicht realisierbar sind (Arp *et al.*, 1998).

In der Realität weist der C₂-Zyklus viele positive Aspekte auf. Hierbei stellt die Verwertung und somit auch die Entgiftung von 2-PG die Hauptaufgabe des C₂-Zyklus dar. Durch den Verbrauch von NADPH und ATP wird die Bildung freier Radikale durch Reaktionen mit Sauerstoff vermieden, die zur Schädigung der Zelle führen können (Osmond *et al.*, 1997). Weiterhin werden Akzeptoren für den linearen Elektronentransport regeneriert, wodurch der C₂-Zyklus eine Schutzfunktion ausübt. Jüngste Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass Photorespiration auch entscheidend für die Vermeidung

von Photoinhibition ist. Beeinträchtigungen des C₂-Zyklus verursachen eine Hemmung der „de novo“ Synthese des D1 Proteins, so dass die Reparatur von PSII unterdrückt wird (Takahashi *et al.*, 2007).

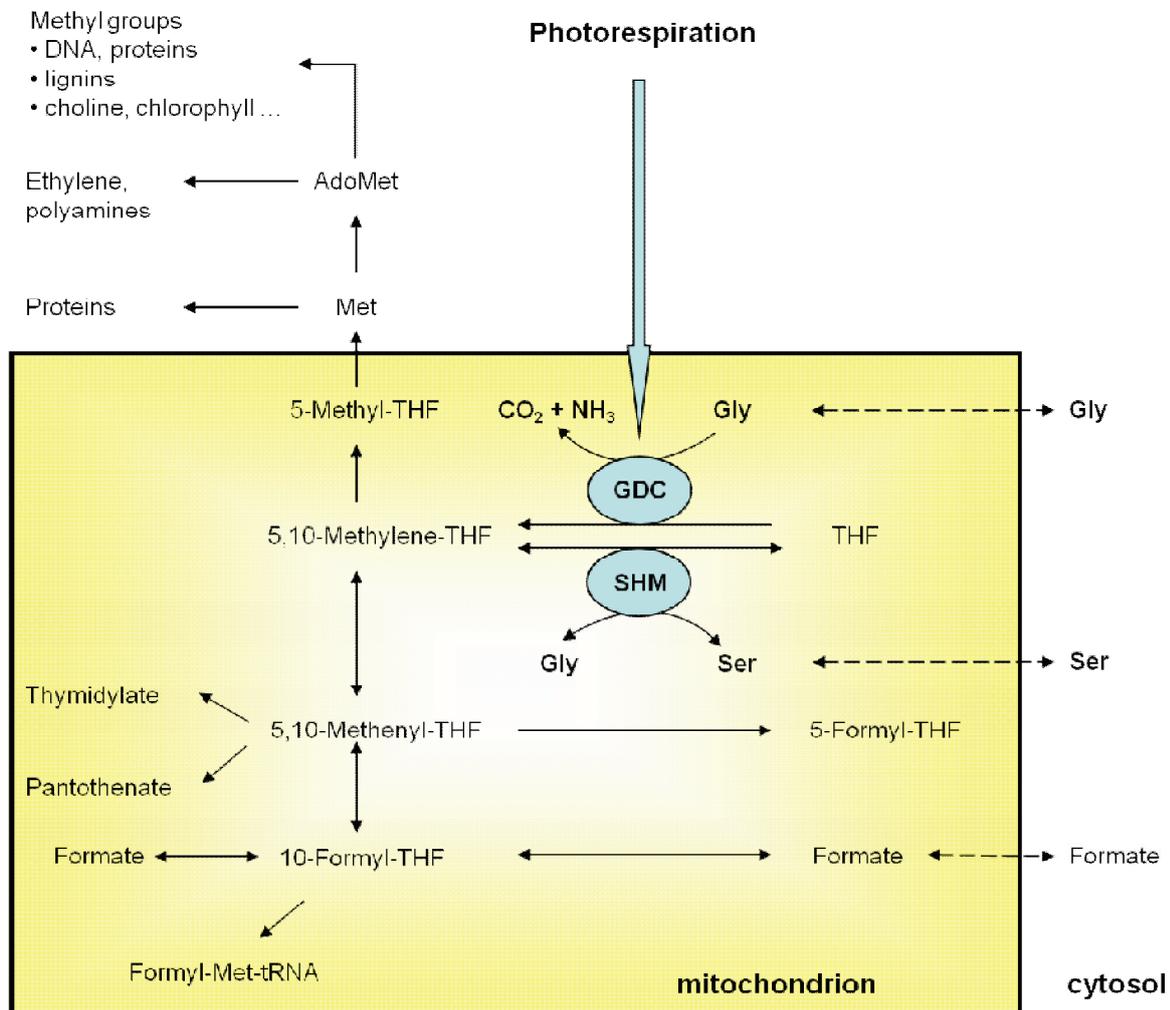


Abb. 2 Die wichtigsten mitochondrialen folatabhängigen Reaktionen des C₁-Stoffwechsels und dessen Verbindung zur Photorespiration über den GDC und die SHM. Modifiziert nach De-Crecy-Lagard *et al.*, 2007.

Neben der Regeneration von Kohlenstoff und der Vermeidung von Photoinhibition ist der C₂-Zyklus bedeutsam für die Synthese von Metaboliten, die für weitere Stoffwechselwege bereitgestellt werden müssen. So garantiert z. B. die Serin-Hydroxymethyltransferase (SHM) die Glycin-Serin-Interkonversion und somit die Verfügbarkeit von Aminosäuren, die essentiell für die Synthese von Chlorophyll, Tryptophan, Phosphatidylcholin, Ethanolamin und Glutathion sind (Noctor und Foyer, 1998; Winkler *et al.*, 2000). Eine andere wichtige Funktion des photorespiratorischen C₂-Zyklus ist die Bereitstellung von aktiven C₁-Einheiten, die über die Reaktionen des mitochondrialen GDC-Komplexes in Zusammenarbeit mit der SHM realisiert wird. Diese C₁-Einheiten werden in vielen Biosynthesen benötigt, wie z.B. Methionin, Pyrimidinen und Purinen (Bauwe und Kolukisaoglu, 2003).

In der Abb. 2 ist die direkte Beziehung zwischen Photorespiration und C_1 -Stoffwechsel aufgezeigt. Auffallend ist die Funktion von N^5 , N^{10} -Methylen Tetrahydrofolat als zentrale C_1 -Komponente zwischen C_2 -Zyklus und einer Reihe synthetischer Wege (Hanson und Roje, 2001).

Photorespiration in Pflanzen bedeutet einen Nettoverlust von Kohlenstoff, steht aber auch im Zusammenhang mit dem Metabolismus der Ein-, Zwei- und Dreikohlenstoffverbindungen sowie dem Stickstoffhaushalt. Die genauen Funktionen der Photorespiration müssen noch weiter erforscht werden, um die Dimension für den gesamten pflanzlichen Stoffwechsel und das Pflanzenwachstum abzuschätzen. Aber letzten Endes ermöglicht es nur der C_2 -Zyklus, dass die Photosynthese in einer Sauerstoff-haltigen Atmosphäre ablaufen kann.

1.2. Mutanten des C_2 -Zyklus

Der photorespiratorische C_2 -Zyklus wurde in den letzten Jahren durch gentechnische Ansätze näher analysiert. In den 80er Jahren setzte die Arbeitsgruppe Somerville (USA) den Startpunkt und nutzte als erste *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus. Durch diese Arbeitsgruppe wurde eine Sammlung von Mutanten angelegt, die durch EMS (Ethylmethansulfonat) mutagenisiert wurden. Die Selektion der photorespiratorischen Mutanten erfolgte durch deren Abhängigkeit von erhöhten CO_2 -Konzentrationen. Denn Mutanten, die im C_2 -Zyklus beeinträchtigt sind, zeigen in normaler Luft (ca. 0,04 % CO_2) Wachstumsretardationen und können nur unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen (0,5 bis 2 % CO_2) normal wachsen (Somerville und Ogren, 1982). Dieses Phänomen wird auch als „photorespiratorischer Phänotyp“ bezeichnet. Nach dem Wachstum in CO_2 -angereicherter Luft wurden die putativen Mutanten an Normalluft adaptiert. Chlorotische und morphologisch auffällige Individuen wurden ausgewählt und nachfolgend biochemisch analysiert. Dieses führte zur Isolation der ersten photorespiratorischen Mutante mit einem Defizit in der 2-Phosphoglykolat-Phosphatase (Somerville und Ogren, 1979). Wenig später wurden Mutanten der Serin: Glyoxylat Aminotransferase, Glycin-Decarboxylase, Serin-Hydroxymethyltransferase und Glutamat-Synthase identifiziert (Ogren, 1984; Somerville, 1982; Somerville und Ogren, 1980). Diese ersten C_2 -Zyklus Mutanten bewiesen, dass das durch die Oxygenaseaktivität der Rubisco entstehende Glykolat den Eintrittspunkt in den photorespiratorischen Zyklus markiert und dass die Photorespiration bedeutsam für das Pflanzenwachstum unter ambienten Bedingungen ist.

In den folgenden Jahren wurden nahezu alle photorespiratorischen Gene und die korrespondierenden Mutanten charakterisiert. Zur Erzeugung der Mutanten wurde neben der chemischen EMS-Mutagenese auch die Integration von T-DNA verwendet. T-DNA-Insertionslinien bieten den Vorteil, dass der Leserahmen eines Gens gezielt und vollständig unterbrochen wird. Das

letzte unbekannte Enzym des C₂-Zyklus, die D-Glycerat-3-Kinase, wurde durch Boldt *et al.* (2005) beschrieben. Wie viele andere photorespiratorische Mutanten sind auch Knock-out-Mutanten der Glycerat-Kinase (*glyk*) in normaler Luft nicht überlebensfähig und zeigen ein chlorotisches Erscheinungsbild, das in einer Hoch-CO₂-Atmosphäre revertiert werden kann.

Weitgehend offen sind die Fragen nach der Natur und der Regulation der Transporter, die für die Substratbewegung zwischen dem Chloroplast, Peroxisom und Mitochondrium verantwortlich sind. Außerdem wurde diskutiert, ob die Photosyntheseleistung der Pflanzen gesteigert werden kann, wenn die Photorespiration unterdrückt wird. Dies ist allerdings nach der Analyse der Mutanten auszuschließen. Es existieren jedoch Ansätze, den C₂-Zyklus so zu reorganisieren, dass eine Verminderung der Kohlenstoffverluste möglich erscheint (Kebeish *et al.*, 2007).

Ein zentrales Enzym des C₂-Zyklus ist die mitochondriale Glycin-Decarboxylase (GDC), ein Multienzymkomplex, der den Abbau von Glycin zu CO₂ und NH₃ katalysiert. Bisher wurden nur GDC-Knock-down-Mutanten von Gerste (Wingler *et al.*, 1997) und Kartoffel (Heinike *et al.*, 2001) generiert und analysiert. Kartoffelpflanzen mit reduziertem P-Proteingehalt zeigen ein reduziertes Wachstum und erhöhte Glycinkonzentrationen, sind aber unter ambienten Bedingungen lebensfähig. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, GDC-Nullmutanten zu isolieren und die damit verbundenen Konsequenzen für den pflanzlichen Stoffwechsel zu ermitteln.

1.3. Glycin-Decarboxylase (GDC)

In C₃-Pflanzen akkumuliert photorespiratorisches Glycin als Intermediat des C₂-Zyklus nach Belichtung und Aufzucht in ambienter Luft. Der Großteil dieses Glycins wird durch die Reaktionen der Glycin-Decarboxylase in Kooperation mit der Serin-Hydroxymethyltransferase in den Mitochondrien direkt zu Serin umgesetzt. Der mitochondriale Glycin-Decarboxylase-Komplex besteht aus vier Komponenten, die als P-Protein (Pyridoxal-5-Phosphat abhängige eigentliche Glycin-Decarboxylase), T-Protein (Tetrahydrofolat(THF)-Aminomethyl-Transferase), H-Protein (identifiziert als Wasserstoffträger mit kovalent gebundenem Liponsäureamid) und L-Protein (Dihydroliponsäureamid-Dehydrogenase) bezeichnet werden (Abb. 3). Die GDC ist ein Hauptbestandteil der pflanzlichen Mitochondrien in Blättern und macht über ein Drittel des löslichen Proteins in den Mitochondrien bei C₃-Pflanzen aus (Oliver und Raman, 1995). Die GDC-Untereinheiten dissoziieren sehr leicht. Daher konnte noch kein intakter GDC-Komplex gereinigt werden, so dass das Vorliegen eines Komplexes im engeren Sinne umstritten ist. Stattdessen wurden die vier Komponenten separat gereinigt und anschließend zur Bildung eines aktiven „Komplexes“ genutzt (Bourguignon, 1988).

Die Glycin-Decarboxylase ist ubiquitär in allen Organismen vorhanden. Im Menschen verursacht eine Mutation des GDC Komplexes die fatale genetische Erkrankung: Nonketotische Hyperglycinämie (Kume *et al.*, 1988). Die Glycin-Decarboxylase oxidiert Glycin zu CO_2 , NH_3 und dem C_1 -Derivat $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methylen-Tetrahydrofolat. Das $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methylen-Tetrahydrofolat wird unter der Verwendung eines weiteren Moleküls Glycin durch die Reaktion der SHM zu Serin umgesetzt (Abb. 3). Die Gleichungen der Teil- und Gesamtreaktionen :

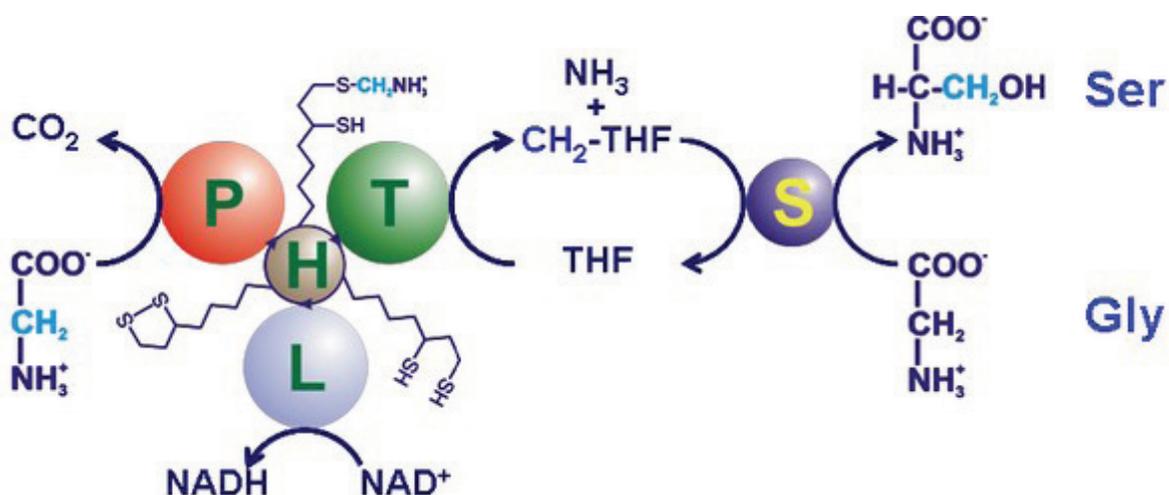
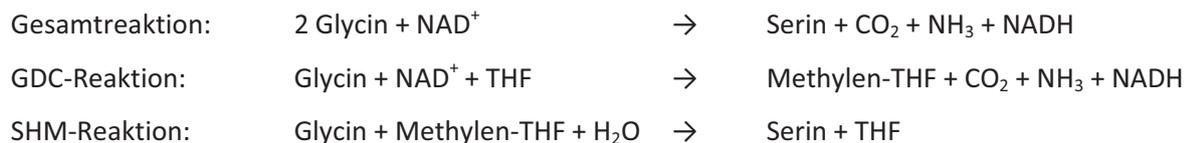


Abb. 3 Der Reaktionsmechanismus der Glycin-Decarboxylase (GDC) in Kooperation mit der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHM). Die Untereinheiten werden wie folgt abgekürzt: P: P-Protein, T: T-Protein, L: L-Protein, H: H-Protein, S: SHM. Der Startpunkt der GDC-Reaktionen wird mit der Decarboxylierung des Glycins durch das P-Protein gesetzt. Der Liponsäurerest des H-Proteins verbindet die Intermediate mit den Reaktionszentren des P-, T- und L-Protein. Quelle: www.biologie.uni-rostock.de/pflanzenphysiologie.

Die Reaktion der GDC beginnt mit der Bildung einer Schiff'schen Base zwischen dem Pyridoxal des P-Proteins und der Aminogruppe des Glycins. Durch Decarboxylierung des Glycylrestes wird CO_2 freigesetzt und das verbleibende Methylamin auf den Liponsäurerest des H-Proteins übertragen (Oliver, 1994). Nachdem das H-Protein sich zum aktiven Zentrum des T-Proteins bewegt hat, wird die Methylen-Gruppe des Glycins auf THF übertragen, so dass $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methylen-Tetrahydrofolat entsteht und NH_3 freigesetzt wird. Durch die Reaktion der SHM wird Serin produziert, in dem ein zweites Molekül Glycin, $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Methylen-Tetrahydrofolat und H_2O zu Serin und THF umgesetzt werden. Über

das L-Protein wird die Dihydroliponsäure wieder zu Liponsäure oxidiert unter der Reduktion von NAD zu NADH, und ein neuer GDC-Zyklus kann beginnen. In diesem Modell (Abb. 3) fungiert der Liponsäurerest des H-Proteins als schwingender Arm zwischen den aktiven Zentren der anderen drei Untereinheiten, so dass die Intermediate enzymgebunden bleiben.

P-Protein

Das P-Protein agiert als enzymatisch aktive Decarboxylase und wird deshalb oft als Glycin-Decarboxylase terminiert. Das P-Protein stellt in den meisten Organismen ein Homodimer von ca. 200 kDa dar. Darüber hinaus bindet das P-Protein das Toxin Victorin (Wolpert *et al.*, 1994). Das Produkt der Decarboxylierung von Glycin ist CO₂ und nicht Bikarbonat. Neben der Decarboxylierung kann aktives P-Protein auch einen sogenannten Bikarbonataustausch durchführen, der zur Messung der P-Protein-Aktivität genutzt wird (Hasse *et al.*, 2007).

T-Protein

Das T-Protein ist ein Monomer des GDC-Komplexes und reagiert als Aminomethyl-Transferase, welche THF und das am H-Protein haftende Methylamin als Co-Substrat benötigt. Die molekulare Masse beträgt ca. 41 kDa. Sequenzähnlichkeiten zu der Formyltetrahydrofolat-Synthase wurden nachgewiesen. Die Reaktion des T-Proteins resultiert in der Produktion von N⁵, N¹⁰-Methylen-Tetrahydrofolat und NH₃. Wenn THF als Substrat fehlt, ergibt die T-Protein-Reaktion Formaldehyd und NH₃.

H-Protein

Das H-Protein wurde erstmals aus Erbse gereinigt und kristallisiert (Sieker *et al.*, 1991; Pares *et al.*, 1994). In der Interaktion mit den drei GDC-Komponenten wirkt das H-Protein als Co-Substrat und stellt selbst ein nicht-enzymatisches Protein dar. Die molekulare Masse beträgt 14 kDa. Die Lipoylierung des H-Proteins erfolgt im Mitochondrium durch die Lipoat-Ligase. Oft wird das H-Protein als zentraler Kern zur Ausbildung des GDC-Komplexes beschrieben (Oliver *et al.*, 1994; Douce *et al.*, 2001).

L-Protein

Das L-Protein, eine Dihydroliponsäureamid-Dehydrogenase, ist ein Homodimer von ca. 100 kDa und enthält FAD als Co-Enzyme (Bauwe und Kolukisaoglu, 2003). Der letzte Schritt der GDC-Reaktion wird durch das L-Protein katalysiert. Das reduzierte H-Protein wird oxidiert und simultan FAD zu FADH₂

reduziert. Die Strukturaufklärung des L-Proteins erfolgte durch Faure *et al.*, 2000. Neben der Rolle im GDC besitzt das L-Protein die gleiche Funktion auch in anderen Multienzymkomplexen, die als Pyruvat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und Verzweigtketten- α -Ketosäure-Dehydrogenase bezeichnet werden.

SHM

Die SHM (Serin-Hydroxymethyltransferase) ist keine Untereinheit der GDC, kooperiert aber mit der Glycin-Decarboxylase in Mitochondrien durch die Produktion von THF, das als Substrat für die GDC-Reaktion dient. Die SHM ist ein Tetramer und setzt sich aus 53 kDa Untereinheiten zusammen, die Pyridoxal-5-Phosphat als Co-Faktor benötigen. Die reversible Konversion von Glycin und N⁵, N¹⁰-Methylen-Tetrahydrofolat zu Serin und THF wird durch die SHM gewährleistet (Mouillon *et al.*, 1999). Neben der Funktion im photorespiratorischen Zyklus ist die SHM auch eine wichtige Quelle für Einkohlenstoffverbindungen, die auch in anderen Zellkompartimenten (Zytosol, Chloroplast, Zellkern) essentiell für viele Biosynthesen sind. In diesen Kompartimenten ist die rückläufige Reaktion zu Glycin dominant, so dass N⁵, N¹⁰-Methylen-Tetrahydrofolat (CH₂-THF) aus Serin produziert wird und unmittelbar zu Methyl-, Methenyl- und Formyl-THF umgesetzt werden kann (siehe Abb. 2). THF-Derivate stellen die Ausgangsstoffe für viele Biosynthesen dar, wie z. B. die Synthese von Methionin, Purin, Pyrimidinen und Fetten (Hanson *et al.*, 2000; Hanson und Roje, 2001; De Crecy-Largard *et al.*, 2007).

Die vier Proteine der GDC und die SHM sind kerncodiert und besitzen N-terminale Sequenzen, die eine mitochondriale Lokalisation garantieren. In der mitochondrialen Matrix erfolgt der Zusammenbau des GDC-Komplexes spontan. Es handelt sich um lösliche Proteine, die in großen Mengen vorliegen. Die Stabilität des vermuteten Komplexes ist nur bei hohen Konzentrationen der Einzelkomponenten gewährleistet (Oliver *et al.*, 1990). Wenn die Proteinkonzentration unter 0,25 mg ml⁻¹ sinkt, dissoziiert der Komplex. Die Stöchiometrie des Komplexes wurde als 4P:27H:9T:2L ermittelt. Durch heterologe Expression und anschließender Reinigung konnten die GDC-Untereinheiten von vorwiegend bakteriellen Genen isoliert werden. Bisher konnte die Kristallstruktur vom eukaryotischen H-, T- und L-Protein (Pares *et al.*, 1994; Okamura-Ikeda *et al.*, 2005; Faure *et al.*, 2000) bestimmt werden. Die Struktur des P-Proteins liegt nur vom Eubakterium *Thermus thermophilus* vor, eine Überexpression oder Reinigung von enzymatisch aktivem eukaryotischen P-Protein ist jedoch noch nicht gelungen (Nakai *et al.*, 2005). Im heutigen Modell der GDC fungieren die H-Protein Dimere als zentraler Kern, in dem jedes Dimer mit jeweils einem Monomer der größeren Untereinheiten interagiert (Oliver, 1994).

1.3.1. GDC in *Arabidopsis thaliana*

In den 80er Jahren wurden die ersten photorespiratorischen *Arabidopsis*-Mutanten durch die Arbeitsgruppe Somerville isoliert und charakterisiert (Somerville und Ogren, 1982). Heute ist *Arabidopsis* als Modelorganismus in den Pflanzenwissenschaften etabliert und die Verfügbarkeit der kompletten Genomsequenz (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; www.Arabidopsis.org), T-DNA-Insertionsmutanten und die einfache Transformierbarkeit ermöglichen eine schnelle Isolation von definierten Mutanten und deren Charakterisierung. Die annotierten *Arabidopsis*-Gene für die GDC-Komponenten und SHM-Genfamilie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Merkmale der GDC- und SHM-Gene und deren korrespondierende Proteine in *Arabidopsis thaliana*; verändert nach Bauwe und Kolukisaoglu, 2003.

Proteins	Symbol	TAIR-Code	Length (aa)	Molecular mass	Localization	References
H-protein	AtGLDH1	At2g35370	165	17947.0	mitochondrion	Srinivasan and Oliver, 1992
	AtGLDH2	At2g35120	156	17099.9	mitochondrion	
	AtGLDH3	At1g32470	166	17897.0		
L-protein	AtmLPD1	At3g17240	507	53985.7	mitochondrion	Lutzinger and Oliver, 2001
	AtmLPD2	At1g48030	507	53987.6	mitochondrion	Lutzinger and Oliver, 2001
P-protein	AtGLDP1	At4g33010	1037	112924.3	mitochondrion	Engel <i>et al.</i> , 2007
	AtGLDP2	At2g26080	1044	113774.8	mitochondrion	Engel <i>et al.</i> , 2007
T-protein	AtGLDT1	At1g11860	408	44444.5	mitochondrion	Engel <i>et al.</i> , 2008
SHM	AtSHM1	At4g37930	517	57400.2	mitochondrion	McClung <i>et al.</i> , 2000; Voll <i>et al.</i> , 2006
	AtSHM2	At5g26780	517	59129.4	mitochondrion	
	AtSHM3	At4g32520	529	57982.2	chloroplast	Voll <i>et al.</i> , 2006
	AtSHM4	At4g13930	471	51717.5	cytosol	
	AtSHM5	At4g13890	470	52260.8	cytosol	
	AtSHM6	At1g22020	599	66646.3	-----	
	AtSHM7	At1g36370	598	66293.0	-----	

In meinen Arbeiten stehen die Gene, die das P- und T-Protein kodieren, im Vordergrund. Für die Herstellung einer Nullmutante in der Glycin-Decarboxylase müssen entweder die zwei P-Protein-Gene (*AtGLDP1* und *AtGLDP2*) oder das T-Protein Gen (*AtGLDT1*) durch T-DNA-Insertion in ihrem Leserahmen unterbrochen werden oder durch RNAi-Technik die Transkripte herunter reguliert werden. Der Knock-out des L-Proteins (zwei Gene) ist nicht sinnvoll, da es an anderen Multienzymkomplexen beteiligt ist. Die Herstellung einer H-Protein-Nullmutante ist schwer zu realisieren, da in *Arabidopsis* drei Gene für das H-Protein kodieren.

Darüber hinaus wurden die mitochondrialen Isoformen der Serin-Hydroxymethyltransferase (*AtSHM1* und *AtSHM2*) untersucht, da diese mit dem Glycin-Decarboxylase-Komplex kooperieren. Im Fokus standen die Isolierung der SHM-Nullmutanten und deren physiologische Charakterisierung.

1.4. Photosynthese und Photorespiration in C₄-Pflanzen

Die C₃-Photosynthese entwickelte sich vor 3,5 Milliarden Jahren in einer nahezu O₂-freien Atmosphäre. Das primäre Enzym der CO₂-Assimilation, Rubisco, ist enzymatisch sehr effektiv bei hohen CO₂-Konzentrationen. In einer Atmosphäre mit steigenden O₂-Konzentrationen, hohen Temperaturen und unter Wassermangel wird die Oxygenierung der Rubisco und somit die Photorespiration begünstigt (Sage, 2004). Die C₄-Photosynthese stellt einen CO₂-Konzentrierungsmechanismus dar, durch den die Oxygenasereaktion der Rubisco in C₄-Pflanzen weitgehend unterdrückt wird. Zur Realisierung der CO₂-Konzentrierung sind biochemische, physiologische und anatomische Modifikationen der C₄-Pflanzen erforderlich. Um Rubisco vom atmosphärischen Sauerstoff zu trennen, erfolgt die primäre CO₂-Fixierung im Mesophyll durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC). Die PEPC besitzt einen erheblich niedrigeren Km-Wert für CO₂ und somit eine höhere Affinität zu CO₂ als Rubisco, so dass die Kohlenstofffixierung auch bei geringen Blatt-CO₂-Gehalten abläuft. Über Oxalacetat (OAA), Malat oder Aspartat wird der fixierte Kohlenstoff in die Bündelscheidenzellen transportiert und dort decarboxyliert und anschließend über die Rubisco als sekundäres Enzym der CO₂-Assimilation refixiert. Die Produkte der primären CO₂-Fixierung sind 4-Kohlenstoffverbindungen, die den Namen C₄ ableiten. Das typische Blatt einer C₄-Pflanze setzt sich aus zwei verschiedenen photosynthetischen Zelltypen zusammen: den Mesophyll- und Bündelscheidenzellen. Das Arrangement der Blattzellen wird als „Kranzanatomie“ (Haberlandt, 1904) beschrieben und ist essentiell für den funktionsfähigen C₄-Zyklus.

Biochemisch unterscheidet man drei Typen der C₄-Photosynthese: den NAD-ME-, NADP-ME- und PCK-Typ, die nur den ersten enzymatischen Schritt zum OAA teilen. In Pflanzen des NAD-ME-Typs wird OAA in Malat konvertiert und dieses in den Bündelscheidenzellen decarboxyliert (Abb. 4). Das

freigesetzte CO₂ wird durch Rubisco refixiert und findet Eingang in den Calvin-Zyklus. Das verbleibende Pyruvat wird zurück in die Mesophyllzellen transportiert, reagiert dort mit ATP und wird durch die Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase zu PEP regeneriert. Im NAD-ME- und PCK-Typ dient Aspartat als intermediärer Kohlenstoffträger zwischen dem Mesophyll und den Bündelscheidenzellen. Durch die Transaminierung von OAA wird Aspartat generiert (Sage, 2004).

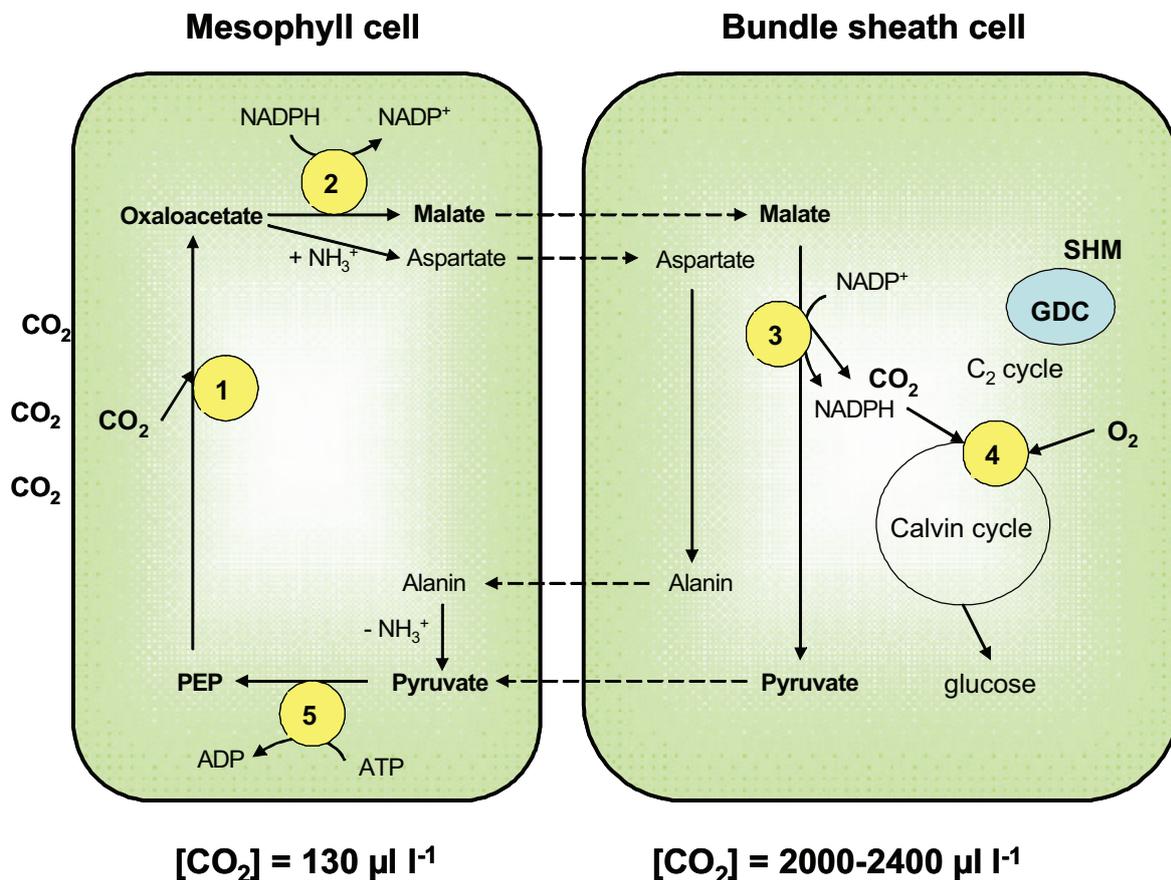


Abb. 4 Vereinfachte Reaktionen der C₄-Photosynthese beim NAD-ME- und NADP-ME-Typ. Hohe CO₂-Konzentrationen akkumulieren in den Bündelscheidenzellen, so dass der C₄-Zyklus als CO₂-Pumpe wirkt. 1: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC); 2: Malatdehydrogenase; 3: NAD- oder NADP-Malatenzym; 4: Rubisco; 5: Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase; PEP: Phosphoenolpyruvat, GDC: Glycin-Decarboxylase; SHM: Serin-Hydroxymethyltransferase. Modifiziert nach Sage (2004).

Das evolutionäre Ziel des C₄-Weges war es, CO₂ in unmittelbarer Umgebung von Rubisco zu konzentrieren. Rubisco fungiert als sekundäres kohlenstoffassimilierendes Enzym, welches nur in den Bündelscheidenzellen der C₄-Pflanzen lokalisiert ist (Abb. 4). Der CO₂-Gehalt in den Bündelscheidenzellen ist circa 10-20fach (2000 µl l⁻¹) höher, im Vergleich mit C₃-Chloroplasten (130 µl l⁻¹), so dass der C₄-Zyklus als CO₂-Pumpe wirkt (Ehrlinger *et al.*, 1991). Dadurch wird nahezu keine

Oxygenaseaktivität der Rubisco in C₄-Pflanzen detektiert und die Photorespiration unterdrückt. Somit besitzen C₄-Pflanzen eine hohe Affinität für CO₂ und einen niedrigen, weitgehend temperaturunabhängigen CO₂-Kompensationspunkt, der häufig unter der Nachweisgrenze liegt. Die C₄-Photosynthese benötigt durch die Transport- und Konzentrierungsarbeit mehr biochemische Energie, zwei zusätzliche ATP, um ein Molekül CO₂ zu reduzieren, und ein weiteres, um PEP aus Pyruvat zu regenerieren. Der erhöhte Energieverbrauch verringert den energetischen Wirkungsgrad unter nicht photorespiratorischen Bedingungen.

1.4.1. Photorespiration in C₄-Pflanzen

Obwohl Rubisco strikt in den Bündelscheidenzellen lokalisiert und CO₂ in unmittelbarer Umgebung von dieser konzentriert ist, existieren Hinweise, dass auch C₄-Pflanzen photorespirieren (Furbank und Badger, 1989). Die Existenz der Photorespiration in C₄-Pflanzen wird durch den Fakt untermauert, dass alle notwendigen Enzyme, wie z. B. GDC und SHM in den Bündelscheidenzellen detektiert wurden. Der finale Beweis für die Funktionalität der Photorespiration in C₄-Pflanzen wurde durch Zelitch *et al.* (2009) erbracht. Sowohl Reis- als auch Maismutanten mit reduzierten Glykolat-Oxidase-Aktivitäten zeigten einen unerwarteten photorespiratorischen Phänotyp (Zelitch *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009).

Keine der GDC Untereinheiten wurde ursprünglich im Mesophyll nachgewiesen (Morgan *et al.*, 1993; Ueno, 2001). Allerdings ist in kürzlich erschienenen Studien die Präsenz der GDC-Komponenten (P-, T-, L- und SHM-Protein) im Mesophyll einiger C₄-Arten beschrieben worden. Nur für das H-Protein wurde eine ausschließliche Lokalisation in den Bündelscheidenzellen bestätigt (Paryz und Jastrzebski, 2007). Diese Ergebnisse ähneln Untersuchungen an *Moricandia arvensis*, einer C₃-C₄ intermediären Pflanze. In *M. arvensis* ist das P-Protein strikt auf die Bündelscheidenzellen beschränkt (Morgan *et al.*, 1993). Dennoch sind C₄-Pflanzen nicht in der Lage, Glycin in den Mesophyllzellen zu oxidieren, wenn eine der GDC-Komponenten fehlt. Das Vorhandensein einiger GDC-Untereinheiten in den Mesophyllzellen kann mit deren Beteiligung an weiteren Enzymkomplexen und der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Proteinen erklärt werden. So ist zum Beispiel das L-Protein auch eine Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, und das T-Protein weist strukturelle Ähnlichkeiten zu der Formyltransferase auf. Darüber hinaus existiert eine Verbindung in der transkriptionellen Regulation des H-Proteins und der Rubisco, so dass bei einigen C₄-Arten die Expression beider Proteine im Mesophyll unterdrückt wird (Srinivasan und Oliver, 1995; Kopriva *et al.*, 1995; Bourguignon *et al.*, 1996; Bauwe und Kolukisaoglu, 2003; Paryz und Jastrzebski, 2007).

Dem photorespiratorischen Stoffwechsel wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung des C₄-Weges zugeschrieben (Sage, 2004). Für den Umbau zur C₄-Photosynthese mussten viele adaptive Schritte erfolgen. Die korrekte Kompartimentierung der C₄-Enzyme wird durch die neuen organ- und zellspezifischen Expressionsmuster und die neuen kinetischen und regulatorischen Eigenschaften gewährleistet (Ku *et al.*, 1996). Darüber hinaus waren Veränderungen der Blattanatomie notwendig. C₃-Pflanzen besitzen ebenfalls Bündelscheidenzellen, welche aber gewöhnlich kleiner sind und nur wenige Chloroplasten enthalten. In *Arabidopsis thaliana* umgeben die Bündelscheidenzellen die Leitbündel mit einer Zellschicht von 6 bis 12 Zellen. Die Bündelscheiden-Chloroplasten in *Arabidopsis* erscheinen kleiner als die im Mesophyll, sind aber intakt. Dadurch machen die Bündelscheidenzellen in *Arabidopsis* ca. 15% aller chloroplasten-haltigen Zellen im Blatt aus (Kinsman und Pyke, 1998). Für die neue Stoffwechselsituation in C₄-Pflanzen muss die Anzahl der Chloroplasten und Mitochondrien in den Bündelscheidenzellen signifikant steigen (Sage, 2004).

1.4.2. C₃-C₄-intermediäre Pflanzen

Einige Pflanzen zeichnen sich durch physiologische Eigenschaften aus, die eine intermediäre Stellung zwischen C₃- und C₄-Pflanzen einnehmen, sogenannte C₃-C₄-intermediäre Pflanzen und daher von speziellem Interesse für die Erforschung der C₄-Evolution sind (Monson *et al.* 1986). Bisher sind über 30 Arten bekannt, die als C₃-C₄-intermediär beschrieben werden können, z. B. in den Gattungen *Panicum*, *Mollugo*, *Flaveria*, *Moricandia* und *Alternanthera*. Untersuchungen der C₃-C₄-intermediären Pflanzen wiesen auf CO₂-Kompensationspunkte (Γ) hin, die zwischen denen von C₃-Pflanzen (30-60 $\mu\text{l l}^{-1}$) und C₄-Pflanzen (<10 $\mu\text{l l}^{-1}$) liegen (Ku *et al.*, 1996). Der Γ -Wert ist ein deutliches Indiz für eine höhere CO₂-Affinität und somit eine reduzierte Photorespirationsrate in C₃-C₄-intermediären Pflanzen. Die Blattanatomie, die primären photosynthetischen Produkte und die Lokalisation der photorespiratorischen Enzyme lassen sich nicht eindeutig der C₃- oder C₄-Photosynthese zuordnen (Kennedy und Laetsch, 1974). Die Mesophyllzellen sind wie bei C₃-Pflanzen in Schichten angeordnet. Die Leitbündel hingegen sind von einer chloroplastenreichen Scheide umgeben, die der Kranzanatomie der C₄-Pflanzen ähnelt. Diese Bündelscheidenzellen weisen eine große Anzahl von Organellen (Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen) auf. Einige der C₃-C₄-Pflanzen sind bis zu einem gewissen Ausmaß in der Lage, CO₂ in Malat oder Aspartat zu fixieren (Monson *et al.*, 1986). Die Funktionalität des C₄-Zyklus konnte in den meisten Arten aber nicht nachgewiesen werden (Rawsthorne, 1992). Ein limitierter C₄-Zyklus wurde in den *Flaveria* Arten: *F. brownii*, *F. palmeri* und *F. vaginata* nachgewiesen (Bassüner *et al.*, 1984; Edwards und Ku, 1987; Moore *et al.*, 1989).

Die Gattung *Flaveria* eignet sich besonders gut für Untersuchungen zur C₄-Evolution, da sie Vertreter beinhaltet, die C₃-, C₄- und C₃-C₄-Photosynthese betreiben.

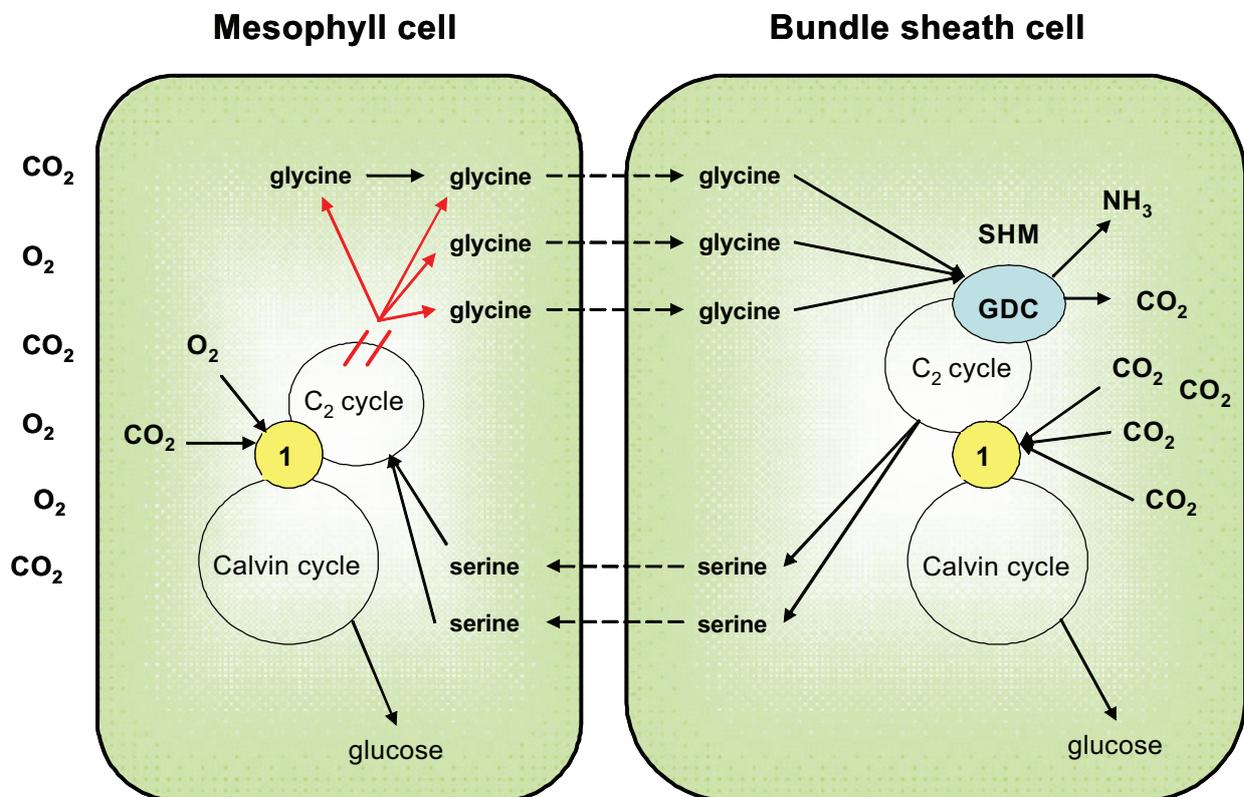


Abb. 5 Ein Modell des CO₂-Konzentrierungsmechanismus der C₃-C₄-intermediären Pflanzen. In den Mesophyllzellen wird durch die Rubisco sowohl CO₂ als auch O₂ umgesetzt. Durch das Fehlen der GDC akkumuliert Glycin, welches in die Bündelscheidenzellen gelangt und durch die GDC decarboxyliert wird. Das freigesetzte CO₂ wird über die Rubisco refixiert und so dem Calvin-Zyklus zugeführt. 1: Rubisco. Modifiziert nach Rawsthorne *et al.*, 1988.

Nach Rawsthorne *et al.*, 1988 wurde ein Modell (Abb. 5) für den photorespiratorischen Metabolismus der C₃-C₄-intermediären Pflanzen entwickelt. Da Rubisco in den intermediären Spezies sowohl in den Mesophyll- als auch den Bündelscheidenzellen vorliegt, wird in beiden Zelltypen photorespiratorisches 2-PG produziert. Durch die Abwesenheit der GDC und der assoziierten Serin-Hydroxymethyltransferase im Mesophyll verläuft der C₂-Zyklus nur bis zum Intermediat Glycin. Glycin akkumuliert in Blättern der intermediären Art *Moricandia arvensis* (L.) DC um das 2 - 4 fache (Rawsthorne und Hylton, 1991). Durch Diffusion gelangt das Glycin in die Mitochondrien der Bündelscheidenzellen und wird dort durch die stark exprimierte GDC zu CO₂ und Serin decarboxyliert. Die Mitochondrien sind eng mit den Chloroplasten assoziiert, so dass das freigesetzte CO₂ dort unverzüglich durch die Rubisco refixiert und somit der CO₂-Verlust durch Diffusion minimiert wird. Ungefähr 70 bis 90 % des photorespiratorischen CO₂ werden im Calvin-Zyklus wiederverwertet

(Bauwe *et al.*, 1987). Das entstandene Serin wird bis zu einem gewissen Maß ins Mesophyll zurücktransportiert, um die Kohlenstoff- und Stickstoffbalance zu gewährleisten. In C_3 - C_4 -intermediären Pflanzen dient Glycin als Transportmolekül für CO_2 zum Calvin-Zyklus, um es dort anzureichern. Demnach handelt es sich bei der C_3 - C_4 -intermediären Photosynthese um einen eigenständigen, einfacheren CO_2 -Konzentrierungsmechanismus (Abb. 5).

Durch eine vergleichende Betrachtung des C_4 -Zyklus (Abb. 4) mit der C_3 - C_4 -intermediären Photosynthese (Abb. 5) wird deutlich, dass in beiden Fällen die GDC in den Mitochondrien der Bündelscheidenzellen lokalisiert ist. Daher wird postuliert, dass sich die C_4 -Photosynthese über den C_3 - C_4 -intermediären Weg entwickelt hat und die Relokalisierung der GDC aus dem Mesophyll in die Bündelscheidenzellen der erste evolutionäre Schritt zur Ausbildung des C_4 -Syndroms darstellt (Edwards und Ku, 1987; Edwards *et al.*, 2001; Sage, 2004).

Die Verlagerung der GDC in die Bündelscheidenzellen erfolgte schrittweise. In der C_3 - C_4 -intermediären Art *Moricandia arvensis* wurde lediglich das P-Protein in den Bündelscheidenzellen detektiert, signifikante Mengen an H-, T- und L-Protein liegen noch im Mesophyll vor (Morgan *et al.*, 1993; Ueno *et al.*, 2003). Hingegen sind in den C_3 - C_4 -intermediären Arten der Gattung *Flaveria* und *Panicum* alle vier GDC-Untereinheiten in den Bündelscheiden lokalisiert. Die vollständige Verlagerung der GDC in den Bündelscheidenzellen konnte aber noch nicht gezeigt werden. Es ist denkbar, dass eine geringe GDC-Aktivität im Mesophyll notwendig ist, um die Produktion von THF-Derivaten zu gewährleisten (siehe Abb. 2).

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse sollte in dieser Arbeit das P-Protein aus dem Mesophyll in die Bündelscheiden von *Arabidopsis* verlagert werden, um eine C_3 - C_4 -ähnliche Stoffwechselsituation zu simulieren.

1.5. Gentechnische Modifikationen der Photorespiration

Die Photorespiration resultiert aus der Oxygenase-Aktivität der Rubisco und führt zu einer Reduktion der netto CO_2 -Assimilation und somit Produktivität der Pflanzen. Durch die Entwicklung eines Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismus in C_4 -Pflanzen wurde die Photorespiration nahezu unterdrückt, aber nicht eliminiert. Diese evolutionäre Anpassung an erhöhte O_2 -Konzentrationen hat eine gesteigerte Photosyntheseleistung und Wassernutzungseffizienz unter stark photorespiratorischen Bedingungen zur Folge. Besonders bei hohen Temperaturen und Trockenheit, Faktoren, die die Photorespiration begünstigen, verlieren viele agronomisch genutzte C_3 -Pflanzen, wie Weizen oder Reis, Kohlenstoff im Zuge des C_2 -Zyklus.

Daraus resultierend wurde versucht, C₃-Pflanzen genetisch so zu modifizieren, dass der C₂-Zyklus optimiert wird. Mehrere Ansätze bieten sich zu diesem Zwecke an: z. B. die genetische Manipulation der Rubisco, um die Oxygenase-Reaktion zu minimieren oder auszuschalten und analog die Affinität der Rubisco zu CO₂ zu erhöhen. Die Rubisco von verschiedenen Spezies zeigt erhebliche Unterschiede in der Spezifität für CO₂ und O₂ (Jordan *et al.*, 1981). So beinhalten z. B. Rotalgen eine Rubisco, die sich durch einen sehr niedrigen Km für CO₂ von 6-7 µM auszeichnet (Uemura *et al.*, 1997). Deshalb wurden Versuche unternommen, effizientere Rubisco-Varianten in Chloroplasten höherer Pflanzen zu integrieren (Andrews und Whitney, 2003). Zusätzlich wäre aber auch eine Modifikation der Rubisco-Aktivase nötig, um die Erkennung der Rubisco-Chimäre zu ermöglichen (Spreitzer *et al.*, 2002). Ein anderer Ansatz zielt auf die Integration des C₄-Syndroms in das Genom von kommerziell genutzten C₃-Pflanzen ab, um die photorespiratorische CO₂-Freisetzung zu minimieren. Matsuoka *et al.* (2001) unternahmen den Versuch, den C₄-Zyklus in Reis zu reproduzieren, in dem die stillen C₄-Gene des Reises durch die aktiven Gegenstücke aus Mais ersetzt wurden. Das intakte Mais-Gen der PEPC wurde in Reis transformiert. Die Transformanten zeigten eine reduzierte O₂-Empfindlichkeit der Photosynthese, verursacht durch die Phosphatlimitierung (Agarie *et al.*, 2002). Die Umstellung des C₃-Stoffwechsels zum C₄-Metabolismus erfordert viele molekularbiologische Eingriffe. Darüber hinaus benötigt der C₄-Zyklus mehr Energie und rentiert sich erst bei hohen Temperaturen. Daher wird in der letzten Zeit versucht, die Eigenschaften der C₃-C₄-intermediären Pflanzen auf C₃-Nutzpflanzen zu übertragen. Durch die Verlagerung der GDC-Aktivität aus den Mesophyllzellen der C₃-Pflanzen in die Bündelscheidenzellen soll ein einfacher CO₂-Konzentrierungsmechanismus etabliert werden. Als erster Schritt wurde eine Reduktion der GDC-Aktivität in den Mesophyllzellen von Kartoffel und Tabak durch die Herstellung von P-Protein Antisense-Pflanzen erreicht, die eine Abnahme der GDC-Aktivität von 70-75 % in Blättern aufwiesen und Glycin stark akkumulierten (Heinicke *et al.* 2001). Die Kartoffelpflanzen mit reduziertem P-Protein Gehalt zeigten einen chlorotischen Phänotyp, und der Chlorophyllgehalt der Blätter war um ein Drittel erniedrigt. Die ektopische Komplementation der Antisense-Pflanzen mit heterologen Genen aus einer C₃-C₄-intermediären Art konnte noch nicht verwirklicht werden.

Auf einem anderen Wege ist es bereits gelungen, den photorespiratorischen Kohlenstoffverlust in *Arabidopsis thaliana* zu mindern. Durch die Integration eines bakteriellen Weges zum Abbau des photorespiratorischen Glykolats (bestehend aus Glykolat-Dehydrogenase, Glyoxylat-Carboligase und Tartronsäure-Semialdehyd-Reduktase) in den Chloroplasten von *Arabidopsis* konnte eine signifikante Steigerung der Photosynthese und Produktivität erreicht werden (Kebeish *et al.*, 2007). Die Übertragung dieser Modifikation auf C₃-Kulturpflanzen wäre ein enormer Erfolg für die pflanzenphysiologische Forschung.

2. Zentrale Fragestellungen

- a.) Welche stoffwechselphysiologischen Konsequenzen hat der Knockdown und der Knockout der GDC und mitochondrialen SHM in *Arabidopsis thaliana*?
- b.) Können die *Arabidopsis* GDC- und SHM-Mutanten mit heterologen Genen komplementiert werden?
- c.) Vermitteln die GDC-Promotoren der C₃-C₄-intermediären Art *Flaveria anomala* in *Arabidopsis* Bündelscheidenspezifität?
- d.) Kann durch die Verlagerung des P-Proteins in die Bündelscheidenzellen von *Arabidopsis* die Stoffwechselsituation von C₃-C₄-intermediären Pflanzen simuliert werden?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und allgemein gebräuchlichen Verbrauchsmaterialien entsprachen einem analytischen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Biometra (Göttingen), BioRad Laboratories GmbH (München), Boehringer Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Heraeus (Osterode), Hettich Zentrifugen (Tuttlingen), Invitrogen (Leck, NL), Kodak (Stuttgart), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Millipore (Eschborn), New England BioLabs (Frankfurt), PeqLab (Erlangen), Promega (Madison, USA), QIAGEN (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Schott Glaswerke (Mainz), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), Sorvall (Bad Homburg), Whatman (Maidstone, GB).

3.1.2. Enzyme

Desoxyribonuklease I, RNase frei (MBI Fermentas)

H MinusM-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas)

Restriktionsenzyme (MBI Fermentas; New England BioLabs)

T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)

3.1.3. Größenstandards für die Gelelektrophorese

100 bp Marker (MBI Fermentas)

1 kb Leiter (MBI Fermentas)

3.1.4. Verwendete Reaktionskits

NucleoSpin[®] Extract II PCR clean-up and gel extraction (Macherey-Nagel)

NucleoSpin[®] RNA Plant Kit (Macherey-Nagel)

RevertAid H Minus cDNA synthesis kit (MBI Fermentas)

Taq PCR Master Mix Kit (Quiagen)

Technovit 8100 (Heraeus Kulzer)

3.1.5. Verwendete Plasmide

pBin19 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=genomes.figgrp.6063>)

pCal-n (<http://stratagene.com>)

pCAMBIA1302 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>)

pCAMBIA2300 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>)

pGEMT-Easy (<http://www.promega.com>)

pGreen0179 (<http://www.pgreen.ac.uk/pGreenII/pGreenII.htm>)

pGreen0229 (<http://www.pgreen.ac.uk/pGreenII/pGreenII.htm>)

pGreen35S (<http://www.pgreen.ac.uk/pGreenII/pGreenII.htm>)

pHUE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/53987034?report=DocSum>)

3.1.6. Pflanzenmaterial und Anzucht

Das in dieser Arbeit verwendete Samenmaterial (Tabelle 2) wurde von dem Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC; <http://Arabidopsis.info/>), *Arabidopsis* Biological Resource Centre, der Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library und der Wisconsin T-DNA-Kollektion (Mollier *et al.*, 1995; Bechtold und Pelletier, 1998; Campisi, 1999; Sessions *et al.*, 2002) bezogen.

Die *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) Ökotypen Columbia (Columbia-0; Col0) und Wassilewskija (Wassilewskija-2; Was-2) wurden als wildtypische Kontrollen verwendet.

Zur Stratifikation wurden die Samen für zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Die Sämlinge und Pflanzen wurden bei 12-h-Licht (100-150 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/12-h-Dunkel-Zyklus (22 °C/18 °C) auf einem Erde-Vermiculit-Gemisch (4:1) in Percival Wachstumskammern angezogen. Die Düngung erfolgte alle 14 Tage mit 0,1 % Wuxal (Aglukon Spezialdünger GmbH, Düsseldorf, Germany).

Für die Sterilanzucht keimten die Samen auf ½-MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) inklusive von Vitaminen, 1 % Saccharose und 0,8 % Agar. Die Pflanzen wurden alle drei Wochen auf neues MS-Medium umgesetzt.

Für einige Experimente wurden die Pflanzen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (0,9 % CO₂) bei 12/12-h Licht/Dunkel-Zyklus (100-150 µE m⁻²s⁻¹, 22 °C/18 °C) in SANYO Wachstumskammern kultiviert.

Tabelle 2 Verwendete T-DNA-Insertionslinien.

Bezeichnung	Gen-Lokus	Ökotyp	Nummer	Kollektion	Literatur
<i>Atgldp1-1</i>	At4g33010	Col0	19865	Tom-Jack	Campisi (1999), Engel (2007)
<i>Atgldp1-2</i>	At4g33010	Was-2	N5528	INRA	Bechtold (1993), Engel (2007)
<i>Atgldp1-3</i>	At4g33010	Col0	SALK_110091	SALK	Engel (2007)
<i>Atgldp2-2</i>	At2g26080	Col0	888.D09	SAIL	Engel (2007)
<i>Atgldp2-3</i>	At2g26080	Col0	1261.C02	SAIL	Engel (2007)
<i>Atgldp2-4</i>	At2g26080	Col0	SALK_104518	SALK	Engel (2007)
<i>Atgldt1-1</i>	At1g11860	Col0	WiscDS Lox 366A11-085	Wisc	Engel (2008)
<i>Atgldt1-2</i>	At1g11860	Col0	SALK_147634	SALK	-----
<i>Atgldt-putative</i>	At1g60990	Col0	SALK_124765	SALK	-----
<i>Atshm1-1</i>	At4g37930	Col0	SALK_083735	SALK	Voll (2006)
<i>Atshm2-2</i>	At5g26780	Col0	SALK_096265	SALK	Voll (2006)

3.1.7. Bakterienstämme

Escherichia coli (*E. coli*)-Stämme:

BL21 StarTM (DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)
DH5 alpha	F- endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 deoR nupG lacZdeltaM15 hsdR17
XL1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proABlacIqZ_M15 Tn10 (Tetr)]

Agrobacterium tumefaciens-Stämme:

GV2260	pGV2260 (pTiB6S3_T-DNA) in C58C1; Rif ^r , Carbr
GV3101	pMP90 (pTiBo542_T-DNA); Rif ^r , Gentr
GV3101+ pSOUP	pMP90 (pTiBo542_T-DNA) pSOUP in C58C1; Rif ^r , Gentr, Tetr

3.1.8. Oligonukleotide**Tabelle 3** Verwendete Oligonukleotid-Primer.

Primer	Sequenz	R-Nummer
SALK-LB	AAT CAG CTG TTG CCC GTC TCA CTG GTG AA	R175
TJLB1	GAACATCGGTCTCAATGCAAAAGGGGAAC	R5
SAIL-LB	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTGCTTCC	R247
40s16forward	GGCGACACAACCAGCTACTGA	R176
40s16revers	CGGTAACCTCTTCTGGTAACGA	R177
AtGLDT1Screen-S	AAG AAG CTC CAG TGG CAA AGA CTC AAC	R489
AtGLDT1Screen-A	ACA AAG TCA TGG ACG AAG GAG ACA CAC	R490
AtGLDT1-1A	GTC CCT TTT GCC ATT GAT AGC AAC	R498
AtGLDT1-RNAi-BamHI-S	AAG GAT CCG ATG AGC ATG CTG TGG ATC TAG	R972
AtGLDT1-RNAi-BglIII-S	AAA GAT CTG ATG AGC ATG CTG TGG ATC TAG	R973
AtGLDT1-RNAi-Sall-AS	AAG TCG ACA GTC TTG TGC TGA CCT GAC TTC	R974
AtGLDT1-RNAi-XhoI-AS	AAC TCG AGA GTC TTG TGC TGA CCT GAC TTC	R975
AtGLDH-RNAi-BamHI-5	AAG GAT CCT ATC ACC AAT CTC AGG TG	R1098
AtGLDH -RNAi-Sall-3	AAG TCG ACT CGC AGA ACT TGG TGT AT	R1099
AtGLDH -RNAi-BglIII-5	AAA GAT CTT ATC ACC AAT CTC AGG TG	R1100
AtGLDH -RNAi-XhoI-3	AAC TCG AGT CTGC AGA ACT TGG TGT AT	R1101
Shm1-S	GCCTCATGAAAGAATCATGGCACTTG	R20
Shm1-A	GTTCTTGACTTCATGGTTTCTTTCTC	R383
Shm2-S	GGWCATCTTTCTCATGGTTATCAG	R21

Shm2-A	CTACTCTTTGTATCTCATCGTCTC	R168
Shm1_promtp_BamHI	AAGGATCCCCACCAAGAGCAAACGAATAACAGCAG	R782
Shm1-promtp_EcoRI	AGAATTCGTAACATGAAGTGGATCGAATAAGAGG	R783
Shm2_cod_EcoRI	AAGAATTCATGTCGTCTTTATCAACCGCAGCTATG	R784
Shm2_cod_XhoI	AACTCGAGCTCTTTGTATCTCATCGTCTCTTTCTC	R785
FaGLDP-Pro-EcoRV-S	AAGATATCACGCCACGCTTTCTACTTTTAAAC	P105
FaGLDP-Pro-NcoI-A	AACCATGGGGTGTATGATGGGCTTTAATGGG	P102
FaGLDP-Pro-BamHI-A	AAGGATCCGGTGTATGATGGGCTTTAATGGG	P93
FaGLDP-cDNA-BamHI-S	AAGGATCCATGGAGCGTGCACGCAGGCTAGCTATG	P107
FaGLDP-cDNA-SacI-A	AAGAGCTCTTAAGCAGTAGCTTCTGCTTTCTCATAC	P108
FaGLDP-Pro-EcoRV-S	AAGATATCACGCCACGCTTTCTACTTTTAAAC	P105
FAgdcH-S	CTTCCACAGCCAATGCTCTA	R901
FAgdcH-AS	TCGGACAACCTCGAGTTCAC	R902

3.1.9. Programme und Internetsoftware

Statistische Analysen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2007 angefertigt. Für die Erstellung von Vektorkarten, Alignments und Sequenzanalysen wurden die Programme Clone Manager 5 und BioEdit verwendet.

Die Bildbearbeitung erfolgte mit Microsoft PowerPoint 2007 und CorelDraw 12.

Die *Arabidopsis* Transkriptdaten wurden der Internetsoftware „Genevestigator“ entnommen (www.genevestigator.ethz.ch/at). Für weitere Untersuchungen, Analysen und Literaturrecherchen wurde auf die Softwaretools der Internetseiten NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) und ExPASy (www.expasy.org) zurückgegriffen.

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

DNA-Isolation

Für die DNA-Isolation wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Destroy-Stick oder Mörser in 500 µl 2x CTAB homogenisiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 68 °C wurden die Proben mit 3 µl RNaseA (90 U/ml) versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 VT Cl. Die Proben wurden gründlich gemischt und 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 1 VT Isopropanol versetzt und 15 min auf Eis gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 20 min. Das Pellet wurde in 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und zum Trocknen unter die Laminarbox gestellt. Nach 15 min wurde die isolierte DNA in 50 µl 10 mM Tris-HCL und 0,1 mM EDTA (pH 8,0) gelöst und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

Chloroform/Isoamylalkohol (C/I):	24 VT	Chloroform
	1 VT	Isoamylalkohol
2x CTAB-Puffer:	2 %	CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)
	1,4 M	NaCl
	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	20 mM	EDTA

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Nucleospin® RNA Plant Kit (Macherey-Nagel). Im ersten Arbeitsschritt wurde der alternative RAP-Puffer verwendet.

Plasmid-Isolation (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Die Bakterien (*E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*) wurden in LB-Medium mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angezogen. Jeweils 2 ml jeder Bakterienkultur wurden bei 12000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 100 ml Lösung 1 gelöst und anschließend mit 200 µl Lösung 2 und 150 µl Lösung 3 behandelt. Nach 15 min auf Eis wurde die Probe mit 1 VT PCI gefällt. Die obere Phase wurde dann mit 2 VT 96 % Ethanol auf Eis für 30 min gefällt. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde in 20 µl 0,1xTE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Lösung 1:	25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 50 mM Glucose	LB-Medium:	10 g/l Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt
Lösung 2:	1 % (w/v) SDS 0,2 M NaOH	PCI:	25 VT Phenol 24 VT Chloroform 1 VT Isoamylalkohol
Lösung 3:	3 M KCH ₃ COO, pH 4,8	0,1x TE:	10 mM Tris HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA

Reinigung von DNA- und PCR-Fragmenten

Die Reinigung von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Extract II PCR clean-up and gel extraction (Macherey-Nagel) nach beiliegendem Protokoll.

3.2.1.2. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 2,5 µg RNA eingesetzt und nach dem Protokoll des RevertAid H Minus cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Quantifizierung, der Reinheitsüberprüfung und Fragment-Größenbestimmung von DNA und RNA. Die Gele bestanden aus 1 % Agarose in 1x TAE und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Die Agarose wurde im TAE-Puffer geschmolzen, nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt und je nach Probenanzahl in verschiedenen große Gelkammern gegossen. Vor dem Probenauftrag wurde jede Probe mit 0,2 VT Stopplösung vermischt. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-100 V in 1x TAE-Puffer.

50x TAE-Puffer: 2 mM Tris/Acetat, pH 8,3
 10 mM Na₂EDTA

Stopplösung: 10 mM Tris-HCL, pH 7,5
 1 mM EDTA
 0,2 % (v/v) Bromphenolblau
 30 % (v/v) Glycerin

3.2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Ansätze wurden nach dem Protokoll des Taq PCR Master Mix Kit (Quiagen) zusammengestellt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (Mastercycler gradient, Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Programmierung des Gerätes richtete sich nach der Fragmentgröße, Amplifikatmenge und den verwendeten Primern.

Ein Standardprogramm für Amplifikate der Größe 500-1000 bp:

Denaturierung:	94 °C	2 min	} 35 Zyklen
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	58 °C	1 min	
Elongation:	72 °C	1 min	
Elongation:	72 °C	4 min	

Die Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.2.1.5. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) ausgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Analyse-Software BioEdit oder CloneManager überprüft.

3.2.1.6. Restriktionsanalysen

DNA-Restriktionen durch spezifische Restriktionsendonukleasen wurden nach folgendem Standardansatz zusammengestellt:

50-500 ng	Plasmid-DNA
2 µl	10x Reaktionspuffer
0,2 µl	10 U/µl Restriktionsenzym
Σ 20 µl	H ₂ O

Der Restriktionsansatz inkubierte für 2 h bei 37 °C. Individuelle Ansätze und Doppelspaltungen wurden nach den Tabellen der Fermentas-Seite (www.fermentas.com) durchgeführt.

3.2.1.7. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit folgendem Standardansatz realisiert:

30 ng	Vektor-DNA
300 ng	Insert-DNA
1 µl	10x Ligase-Puffer
1 µl	T4-DNA-Ligase
Σ 20 µl	H ₂ O

Die Ligation inkubierte bei ca. 10 °C für 2 - 20 h im Kühlschrank. Für die *E. coli*-Transformation wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

3.2.1.8. Transformation kompetenter Bakterienzellen

Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch kompetente 100 µl *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Danach wurden 5 µl Ligationsansatz oder 0,5 µl Plasmid-DNA vorsichtig in die Zellen gegeben, invertiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für 60 sec ausgeführt und die transformierten Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C im Schüttelschrank (180 UpM) geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut (ca. 2 h) und mit 5 µl der Plasmid-DNA versetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 min auf Eis. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend einem Hitzeschock bei 37 °C für 5 min ausgesetzt. Nachdem 1 ml YEB-Medium dem Ansatz zugefügt wurde, schloss sich eine vierstündige Inkubation bei 28 °C im Schüttelschrank (180 UpM) an. Die Zellen wurden auf YEB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

YEB-Medium (pH 7,2):	2 g/l	Hefe-Extrakt
	5 g/l	Pepton
	5 g/l	Saccharose
	5 g/l	Fleischextrakt

3.2.1.9. Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Überexpression des *F. anomala* P-Proteins (PFAG) wurde die cDNA in den Expressionsvektor pHUE kloniert. Für die Reinigung wurde der PFAG-pHUE-Klon in 1 l LB-Medium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD) von 2,0 kultiviert und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Die Überexpression erfolgte über Nacht bei RT. Die Zellen wurden in modifiziertem LEW-Puffer aufgenommen und mit Lysozym bei 4 °C für 30 min inkubiert und durch Ultraschall lysiert. Nach einer Zentrifugation (10000 g, 15 min, 4 °C) wurde das Lysat einer chromatographischen Reinigung mit Ni-NTA (Nickel-Trinitrioloessigsäure) nach dem Protokoll der Firma USB, Ohio, USA (http://www.usbweb.com/brief_proto/78796b.pdf) unterzogen.

LEW-Puffer (pH 8,0):	50mM NaH ₂ PO ₄	Elutionspuffer (pH 8,0):	50mM NaH ₂ PO ₄
	300mM NaCl		300mM NaCl
	1 mg/ml Lysozym		250mM Imidazol

3.2.1.10. Floral-Dip-Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *A. thaliana* erfolgte über den Agrobacterium-vermittelten Gentransfer nach der Blütentauchmethode („floral dip“) von Clough und Bent (1998). Die noch geschlossenen Blüten wurden in eine Agrobacterium-Suspension getaucht. Dazu wurden 50 ml Agrobacterium-Übernachtskultur bei 12000 rpm abzentrifugiert und das Sediment in 50 ml 5 % Saccharoselösung und 50 µl Silvet gelöst. Nach dem Eintauchen der Blüten in die Lösung wurden diese auf Papierhandtüchern ca. 10 min getrocknet. Die behandelten Pflanzen wurden mit einer Plastikhaube abgedeckt und weiter in den Klimaschränken kultiviert.

3.2.2. Pflanzenphysiologische Methoden

3.2.2.1. Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung wurde nach Porra (1998) durchgeführt. Dafür wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt und in 2 ml einer gepufferten Acetonlösung gemörsert. Danach wurden Pistel und Mörser dreimal mit 1,5 ml derselben Lösung gewaschen. Das Homogenat inklusiver der drei Waschungen wurde bei 4 °C bei 2500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Volumen von 8 ml aufgefüllt und bei folgenden Wellenlängen (nm) am Photometer vermessen: 646, 647, 663, 750. Die Konzentration der Chlorophylle und Pigmente in µg/mg wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = 12,25 \times (E_{663} - E_{750}) - 2,55 \times (E_{647} - E_{750})$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = 20,31 \times (E_{647} - E_{750}) - 4,91 \times (E_{663} - E_{750})$$

$$\text{Chl a+b } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = 17,76 (E_{647} - E_{750}) + 7,34 \times (E_{663} - E_{750})$$

$$E^{\text{car}} = E_{480} + 0,114 E_{663} - 0,638 E_{646}$$

Acetonlösung (gepuffert):	80 %	Aceton
	2,5 mM	Na ₂ PO ₄ , pH 7,8

3.2.2.2. Metabolitmessungen

Aminosäurebestimmung

Für die Aminosäurebestimmung wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1,8 ml 80 % Ethanol für 30 min geschüttelt. Nach der Zentrifugation (30 min, 4 °C, 20000 rpm) wurde der Überstand in der Speed vac vakuumgetrocknet und in 8 mM Na₂PO₄ (pH 6,8) und 2,5 % Tetrahydrofuran gelöst. Die einzelnen Aminosäuren wurden durch HPLC getrennt und wie bereits beschrieben (Hagemann *et al.*, 2005), quantifiziert.

Metabolitbestimmung

Die Metabolomanalysen für WT und die P-Protein-Mutanten wurden ausführlich in Engel *et al.* (2007) beschrieben.

3.2.2.3. Gaswechsellanalysen

Die Gaswechsellanalysen der P-Protein-Mutanten wurden wie bereits beschrieben (Pärnik und Keerberg, 2007; Engel *et al.*, 2007), durchgeführt. Für die anderen transgenen Pflanzen erfolgte die Messung der Netto-Photosyntheserate und des CO₂-Kompensationspunktes am LI-6400 Portable Photosynthesis System (LICOR, USA). Dazu wurden *Arabidopsis*-Pflanzen (ca. 10 Wochen alt) verwendet, deren Rosetten vollständig ausgebildet waren, aber noch keine Infloreszenzen ausgebildet hatten. Die Messbedingungen betragen 400 µL L⁻¹ CO₂, 21 % O₂, 300 µmol s⁻¹ Flussrate, 250 µE m⁻² s⁻¹ Lichtintensität (Rot-Blau LED Lichtquelle) und 25 °C Kammertemperatur. Große intakte Blätter wurden in eine spezifische Kammer (Leaf Chamber Fluorometer) eingespannt und verblieben ca. 20 min in dieser zur Adaption an die neuen Bedingungen, bis alle relevanten Messwerte wie Photosyntheserate oder Transpirationsrate konstant waren. Anschließend wurden A-C_i-Kurven mit der internen Licor-Software (LI-6400 Version 5.3) bei verschiedenen Lichtintensitäten (250, 500 oder 1000 µE m⁻² s⁻¹) aufgezeichnet und mit den Programmen Li-6400FileEx und Microsoft-Excel ausgewertet.

3.2.2.4. Histochemischer β-Glucuronidase (GUS)-Test

Das GUS-Gen kodiert eine β-Glucuronidase. Der Nachweis der Genaktivität erfolgt wie bei dem LacZ-System über ein chromogenes Analogon – dem X-Gluc. Das Enzym β-Glucuronidase hydrolysiert das

synthetische Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronsäure (X-Gluc) in Glucuronsäure und einen Indoxylrest, der spontan zu dem unlöslichen indigoblauen Farbstoff oxidiert wird. Von den transgenen Promotor-GUS-Pflanzen wurden in der Mitte der Lichtperiode 2 - 3 Blätter geerntet und sofort in den X-Guc-Puffer überführt. Mittels Vakuuminfiltration für 30 min wurde die Lösung vollständig in die Blätter gesogen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 - 16 h im Dunkeln. Anschließend wurden mit 70 % Ethanol bei 70 °C vollständig die pflanzlichen Pigmente entfernt. Die gefärbten Blätter wurden in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

X-Gluc-Puffer:	100 mM	Na ₂ PO ₄ pH 7,0 (Na ₂ HPO ₄ , pH 8,84 und NaH ₂ PO ₄ , pH 4,18)
	10 mM	EDTA, pH 8
	5 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆]III
	5 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆]II
	0,1 % (v/v)	Triton X-100
	1 mM	X-Gluc (kurz vor Gebrauch zugeben)

3.2.3. Immunolokalisation

3.2.3.1. Einbettung in Technovit

Zur Einbettung des Pflanzenmaterials wurde das Kunstharz Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) verwendet. Die Fixierung, Entwässerung, Infiltration und Einbettung erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll. Das Pflanzenmaterial wurde in der Mitte der Lichtperiode geerntet, in der Fixierungslösung in 3 x 4 mm große Stücke geschnitten und vakuuminfiltriert. Als Einbettformen dienten 0,2 ml Eppendorfgefäße.

3.2.3.2. Herstellung von Blattquerschnitten

Die Blattquerschnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (Olympus Cut 4060, America Inc.) hergestellt. Die 3 - 5 μ m dünnen Schnitte wurden mit einem Pinsel aufgefangen und auf einen beschichteten Objektträger (Adhäsionswirkung) mit 1 x PBS übertragen. Die Schnitte trockneten bei 37 °C für 2 h. Nicht sofort benötigte Schnitte wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.3.3. Immunohistologischer Nachweis

Die Objektträger mit den getrockneten Schnitten wurden 20 min in 1 x PBS inkubiert, mit 0,1 M NH_4Cl blockiert und 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Mit 5 % BSA (w/v) für 30 min wurden die Bindungsstellen blockiert. Danach wurden die Proteine mit dem primären Antikörper (GDC- oder SHM-Antikörper; 1:250 gelöst in 5 % BSA) bei 4 °C für 16 h immunmarkiert. Die Schnitte wurden dreimal mit 0,1 % BSA und zweimal mit 1 % BSA gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (AlexaFluor 488 Goat anti Rabbit IgG (H+L 2mg/ml); 1:500; Molecular Probes) für 90 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nur noch im Dunkeln ausgeführt. Zum Schluss wurden die Schnitte viermal mit 1 x PBS gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 20 μl einer 75%-igen Glycerinlösung eingeschlossen. Die Fluoreszenz wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.

1 x PBS: 135 mM	NaCl	1,5 mM	KH_2PO_4
3 mM	KCl	8 mM	Na_2HPO_4

3.2.4. Biochemische Methoden

3.2.4.1. Proteinisolation

Isolation pflanzlicher Proteine

In der Mitte der Lichtperiode wurden 100 mg Blattmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Destroy-Stick in 200 μl Aufschlusspuffer auf Eis homogenisiert. Die Proben wurden bei 4 °C für 10 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß bei -20 °C gelagert.

Aufschlusspuffer:	25 mM	HEPES, pH 7,0
	0,5 mM	EDTA
	8 mM	DTT
	1 mM	PMSF
	1 mM	Pefablock

Isolation bakterieller Proteine

Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (2 min, 20000 rpm, 4 °C) pelletiert und in vorgekühlten 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,8) und 1 mg/ml Lysozym für 30 min bei 4 °C resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung (sechs mal 10 s, 90 W, 4 °C). Durch eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 30 min bei 4 °C wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen separiert und anschließend nach der Zugabe von 50 % Glycerin bei -20 °C gelagert.

3.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) und beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomassie® brilliant blue G-250“ an Proteine in saurer Lösung.

3.2.4.3. SDS-PAGE

Die 12- oder 15%igen SDS-Gele wurden in einer Elektrophoresekammer (Mini-Protean® Cell System, Bio-Rad) nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurden pro Tasche 5 bis 20 µg Proteinextrakt aufgetragen. Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese zunächst ca. 20 min bei 100 V gestartet, bis sich die Proben vollständig im Sammelgel befanden. Danach wurde eine Spannung von 150 V angelegt, bis die Blaufront das Ende des Trenngels erreichte. Das Proteingel wurde durch Coomassie®-Brilliantblau G-250 gefärbt oder zur immunologischen Detektion auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (3.2.4.4).

Sammelgel (5%): 0,125 M Tris-HCL, pH 6,8

0,1 % (w/v) SDS

5 % (w/v) Acrylamid

0,05 % (w/v) APS

0,1 % (w/v) TEMED

Trenngel (12%): 0,375 M Tris-HCL, pH 6,8

0,1 % (w/v) SDS

12 % (w/v) Acrylamid

0,05 % (w/v) APS

0,05 % (v/v) TEMED

Laufpuffer: 50 mM Tris-HCL

380 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

3.2.4.4. Western Blot

Der Western Blot dient der Identifikation und Quantifizierung eines spezifischen Proteins in komplexen Proteingemischen. Dazu wird das Trenngel nach der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) elektrotransferrt. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 1 mA pro cm² Membran. Für den immunologischen Nachweis spezifischer Proteine wurde die Membran über Nacht in 5%iger Magermilchlösung inkubiert und anschließend 1 h mit dem primären Antikörper (Verdünnungen variierten von 1: 1000 bis 1:5000) inkubiert. Die Membran wurde fünfmal mit TBS gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit IgG-Peroxidase) für 1 h inkubiert. Zum Schluss wurde fünfmal mit TBS gewaschen.

Das Zielprotein auf der Membran wird durch die Peroxidase des sekundären Antikörpers nachgewiesen, indem Luminol durch H₂O₂ oxidiert und somit zur Lichtemission angeregt wird (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Die Lichtemission wird mit einem Blaulicht empfindlichen Film detektiert.

Transferpuffer:	25 mM Tris-HCL	TBS:	50 mM Tris-HCL, pH 7,5
	192 mM Glycin		150 mM NaCl
	10 % (v/v) Methanol		

3.2.4.5. Chromatographische Aufreinigung von Proteinen

Zur Aufreinigung von Histidin-getagten Proteinen wurden die Zellkulturen, unter 3.2.4.1 beschrieben, bearbeitet. Das Lysat wurde für die Affinitätschromatographie verwendet, die nach dem Protokoll „Protocol for purification of His-tagged proteins under native conditions“ (Invitrogen) durchgeführt wurde. Das His-getagte Protein konnte durch Waschungen des Säulenmaterials mit 300 - 500 mM Imidazol gewonnen werden. Zur Überprüfung der Elutionen wurde eine SDS-PAGE angefertigt. Die Elutionen wurde nach der Zugabe von 50 % Glycerin bei -20 °C gelagert.

4. Ergebnisse

Sowohl Glycin als auch Serin sind wichtige Intermediate der Photorespiration. Für deren enzymatische Umsetzung sind die GDC- und mitochondrialen SHM-Isoformen zwingend notwendig. Daher werden in dieser Arbeit die GDC- und SHM-Genfamilien aus *A. thaliana* charakterisiert. Dazu werden Knockdown- und Knockout-Mutanten der entsprechenden Gene isoliert und charakterisiert. Mittels Komplementationsstudien werden die spezifischen Funktionen der GDC- und mitochondrialen SHM-Isoformen näher analysiert. Durch die Steigerung der GDC-Aktivität in den Blättern von *A. thaliana* kann die Flussrate über den GDC erhöht werden. In einem weiteren Experiment wird versucht, die P-Proteinaktivität aus dem Mesophyll in die Bündelscheidenzellen von *Arabidopsis* zu verlagern, um die Stoffwechselsituation einer C₃-C₄-intermediären Pflanze zu imitieren.

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert. Die Publikationen sind der beiliegenden CD zu entnehmen (siehe 9). In dem folgenden Ergebnisteil werden die essentiellen Daten dieser Veröffentlichungen sowie nicht publizierte Ergebnisse präsentiert.

Publikationen:

1. **Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu Ü, Morgenthal K, Weckwerth W, Pärnik T, Keerberg O, Bauwe H** (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under non-photorespiratory conditions. *Plant Physiology* 144: 1328-1335
2. **Engel N, Eisenhut M, Qu N, Bauwe H** (2008) *Arabidopsis* mutants with strongly reduced levels of the T-protein subunit of glycine decarboxylase. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Conference of Photosynthesis*, Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., and Osmond, C. B. (Eds) Springer: 819- 822
3. **Engel N, Ewald R, Zrenner R, Hagemann M and Bauwe H** (2010) The presequence of *Arabidopsis* Ser hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria and hence complementation of the *shm1* allele. Submitted to: *Plant Physiology*.

4.1. Isolierung und Charakterisierung der GDC- und SHM-Mutanten

Als Grundlage für diese Arbeit wurden T-DNA-Insertionsmutanten für das P-, T- sowie das mitochondriale SHM-Protein isoliert und charakterisiert. Darüber hinaus wurden RNAi-Pflanzen mit reduzierten H- und T-Protein-Gehalten erzeugt und analysiert.

4.1.1. P-Protein-Mutanten

In *Arabidopsis* kodieren zwei Gene für das P-Protein, die als *AtGLDP1* (At4g33010) und *AtGLDP2* (At2g26080) bezeichnet werden. In Engel *et al.* (2007) wird die Isolation und Charakterisierung der Einzelmutanten *Atgldp1-1*, *Atgldp1-2*, *Atgldp2-1*, *Atgldp2-2*, *Atgldp2-3* und *Atgldp2-4* sowie der Doppelmutante *Atgldp1-1* x *Atgldp2-2* beschrieben. Die Doppelmutante besitzt kein endogenes P-Protein mehr und wird daher auch als P-Protein-Nullmutante bezeichnet.

Transkriptanalysen mit der Software „Genevestigator“ (Abb. 13) sowie RT-PCR Analysen (Abb. 6) belegten, dass die Gene *AtGLDP1* und *AtGLDP2* in allen Organen von *Arabidopsis* exprimiert werden. Allerdings waren die *AtGLDP1* Transkriptmengen in den photosynthetisch aktiven Geweben höher. Das Gen *AtGLDP2* wird stärker in den Wurzeln transkribiert. Trotz der Expressionsunterschiede wurde gezeigt, dass die korrespondierenden P-Proteine einander ersetzen können. Die Redundanz wurde insbesondere durch die Phänotypen der Einzelmutanten, biochemische Analysen, Serin-Glycin-Verhältnisse und Gaswechselfdaten bewiesen (Engel *et al.*, 2007). Unter ambienten Bedingungen zeigen die jeweiligen homozygoten Einzelmutanten keinen photorespiratorischen Phänotyp (Abb. 12). Nur unter photorespiratorischen Bedingungen ($800-1000 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) konnte festgestellt werden, dass *AtGLDP1*, wie durch die Expressionsdaten angedeutet, stärker am photorespiratorischen Umsatz beteiligt ist, da in der Einzelmutante *Atgldp1-1* ein erhöhtes Glycin-Serin-Verhältnis festgestellt wurde (Engel *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zu den Einzelmutanten ist die P-Protein-Doppelmutante sowohl unter ambienten als auch nicht-photorespiratorischen Bedingungen (0,9 % CO₂) nicht lebensfähig. Die Doppelmutante zeigt eine verzögerte Keimung und entwickelt sich nur bis zum Kotyledonenstadium (Abb. 12). Aufgrund der Letalität in diesem frühen Entwicklungsstadium konnten bisher keine weiteren Untersuchungen an der Doppelmutante durchgeführt werden. Diese Ergebnisse zeigen jedoch sehr deutlich, dass der GDC in Pflanzen neben der Photorespiration andere lebenswichtige Aufgaben erfüllt.

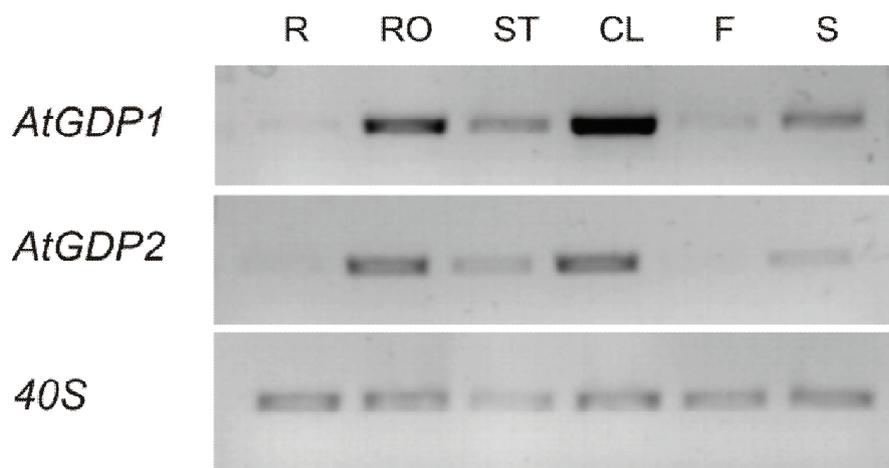


Abb. 6 Nachweis der *AtGLDP1*- und *AtGLDP2*-Transkripte in allen Geweben von *Arabidopsis* mittels RT-PCR. Von folgenden Organen wurde RNA isoliert: RT: Wurzeln; RL: Rosettenblätter; ST: Stengel; CL: Hochblätter; FL: Blüten; SI: Schoten. Als konstitutiv exprimierte Kontrolle wurde die mRNA von At2g09990 (S16) verwendet. Die Abbildung stammt aus der Publikation Engel *et al.*, 2007.

4.1.2. T-Protein-Mutanten

Für das mitochondriale T-Protein in *Arabidopsis* wurde in der Datenbank TAIR ein Gen annotiert (*AtGLDT1*; At1g11860). Zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien (*Atgldt1-1*, WiscDS Lox 366A11-085; *Atglt1-2*, SALK_147634) wurden zur Isolation homozygoter T-Protein-Mutanten verwendet. Die Linie *Atglt1-1* trägt die T-DNA-Insertion in der Promotorregion, ungefähr 400 bp stromaufwärts vom Translationsstart (Engel *et al.*, 2008). In *Atgldt1-2* liegt die T-DNA in dem ersten Exon des T-Proteingens. Von beiden Linien wurden homozygote Pflanzen selektiert, die für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurden. Der *AtGLDT1*-Nachweis und die Überprüfung der Zygotie der T-DNA-Insertion erfolgte durch PCR mit den Primerkombinationen AtGLDT1Screen-S/ AtGLDT1Screen-A und AtGLDT1Screen-S/ SALK-LB (Abb. 7). Die homozygote Linie *Atgldt1-2* wird auch als T-Protein-Nullmutante bezeichnet, da diese kein endogenes T-Protein mehr enthält.

Darüber hinaus wurden acht RNAi-Linien mit reduziertem T-Protein-Gehalt erzeugt (Engel *et al.*, 2008). Zur Amplifikation der sense und antisense RNAi-Fragmente wurden die AtGLDT-RNAi-Primer (siehe 3.1.8) verwendet. Die transgenen Linien T-RNAi-4 und T-RNAi-5 wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Phänotypen der T-Protein-Mutanten sind in der Abb. 12 dargestellt. Sowohl die T-DNA-Insertionsmutante *Atgldt1-1* als auch die RNAi-Linie T-RNAi-4 sind unter ambienten Bedingungen zu kultivieren, zeigen aber ein verzögertes Wachstum und eine gelbliche Verfärbung der Blätter. Hingegen ist die homozygote *Atgldt1-2*-Mutante nur unter Hoch-CO₂ und auf

MS-haltigem Medium zu isolieren. Diese Mutante erreicht nur das Kotyledonenstadium und stirbt dann ab.

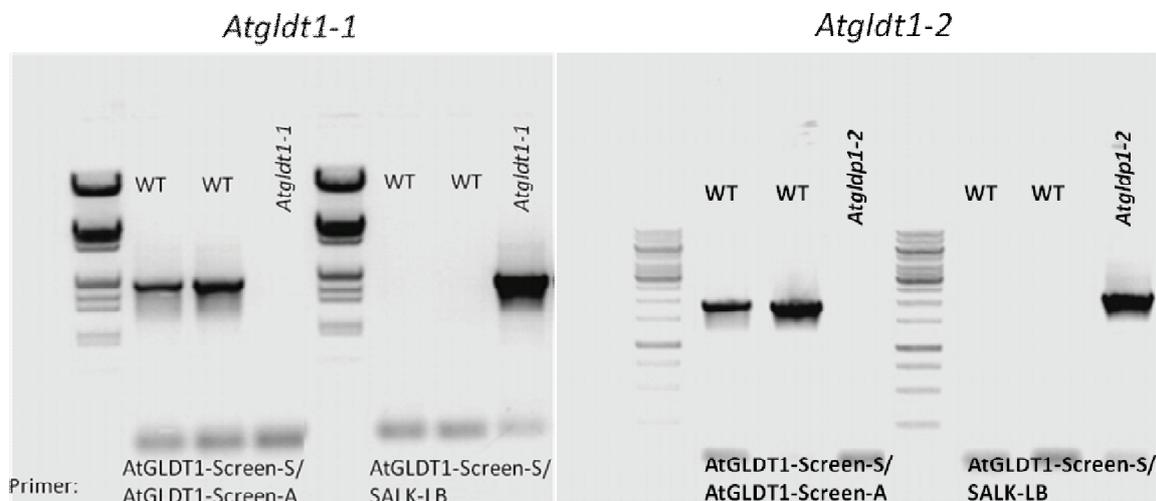


Abb. 7 Nachweis des T-Protein-Gens *AtGLDT* und Überprüfung der Zygotie der T-DNA-Insertion in Wildtyp (WT) und den Mutanten *Atgldt1-1* und *Atgldt1-2* durch PCR. Nur in der Wildtyp-Kontrolle ist das intakte *AtGLDT*-Gen nachweisbar. Die T-DNA-Insertion liegt in den Mutanten *Atgldt1-1* und *Atgldt1-2* homozygot für beide Allele vor.

Neben dem mitochondrialen T-Protein (*AtGLDT1*; *At1g11860*) wurde ein Gen für eine weitere Aminomethyltransferase in den Chloroplasten annotiert (*At1g60990*), die zunächst als T-Protein-like-Protein bzw. putatives T-Protein bezeichnet wird. Für dieses putative T-Protein wurde auch eine entsprechende Insertionsmutante (SALK_124765) bestellt und angezogen. Es war nicht möglich, homozygote Individuen für die T-DNA-Insertion zu isolieren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Knock-out dieser putativen Aminomethyltransferase letal ist. Um nachzuweisen, dass es sich bei diesem Protein um eine enzymatisch aktive Aminomethyltransferase handelt, wurde versucht, die *Synechocystis* T-Protein-Mutante $\Delta gcvT$ (Eisenhut *et al.* 2006) mit der cDNA von *At1g60990* zu komplementieren ($\Delta gcvT$ -ATpr2). Analog dazu wurden auch die zu kodierenden Bereiche von *AtGLDT1* und dem *F. anomala* T-Protein (TFAG) zur Komplementation der bakteriellen T-Protein-Mutante hinzugezogen (Engel *et al.*, 2008). Diese Komplementationsexperimente wurden von Marion Eisenhut durchgeführt. Nur die Isoformen *AtGLDT1* und TFAG revertierten den Phänotyp der $\Delta gcvT$ -Mutante bzgl. des Wachstums auf erhöhten externen Glycinkonzentrationen (Engel *et al.*, 2008). Somit konnte nachgewiesen werden, dass dieses putative T-Protein im *Synechocystis* GDC-Komplex nicht enzymatisch aktiv ist. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von *AtGLDT1*, TFAG und dem putativen T-Protein zeigen große Sequenzidentitäten zwischen den mitochondrialen Isoformen *AtGLDT1* und TFAG (Abb. 8). Hingegen weist die chloroplastidäre Isoform nur geringfügige Identitäten auf und besitzt eine N-terminale Verlängerung um 13 Aminosäuren.

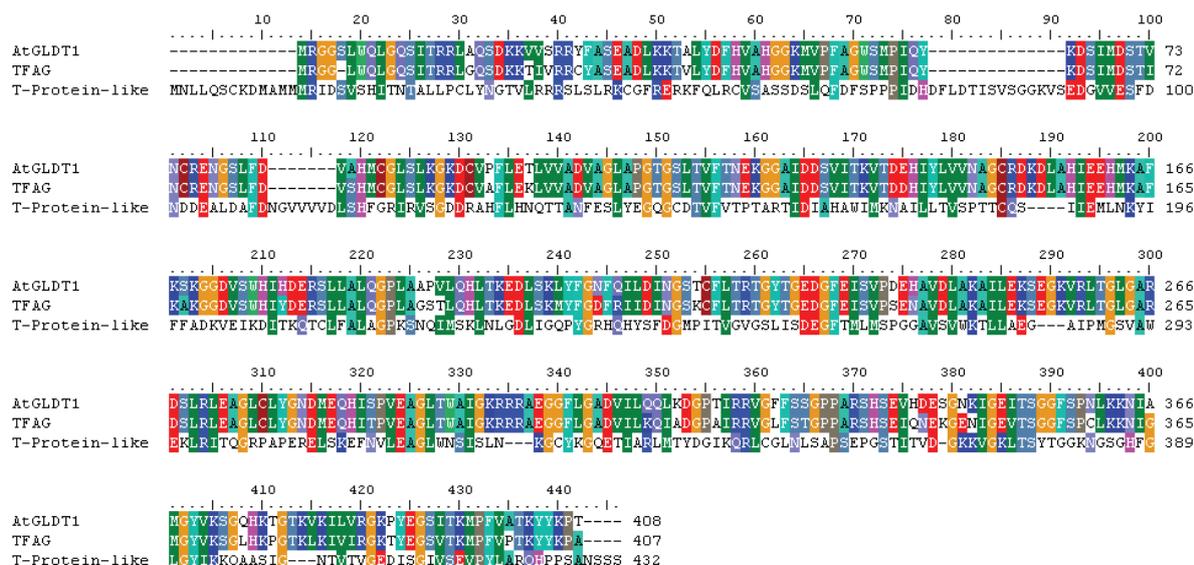


Abb. 8 Vergleich der Aminosäuresequenzen von den mitochondrialen T-Proteinen AtGLDT1 und TFAG (*F. anomala* T-Protein) mit dem T-Protein-like Protein bzw. putativem T-Protein (At1g60990).

Des Weiteren zeigten Western Blot Analysen der komplementierten *Synechocystis* T-Protein-Mutanten $\Delta gcvT$ -ATpr2, dass das *Arabidopsis* T-Protein-like-Protein mit dem T-Protein-Antikörper, der gegen das T-Protein aus Erbse generiert worden ist, nachweisbar ist (Abb. 9). Dieser Befund verdeutlicht, dass die T-Proteine aus *Arabidopsis* AtGLDT1 und das T-Protein-like Protein sowie das *Synechocystis* T-Protein strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, die es dem T-Protein-Antikörper aus Erbse ermöglichen, mit diesen Proteinen zu interagieren.

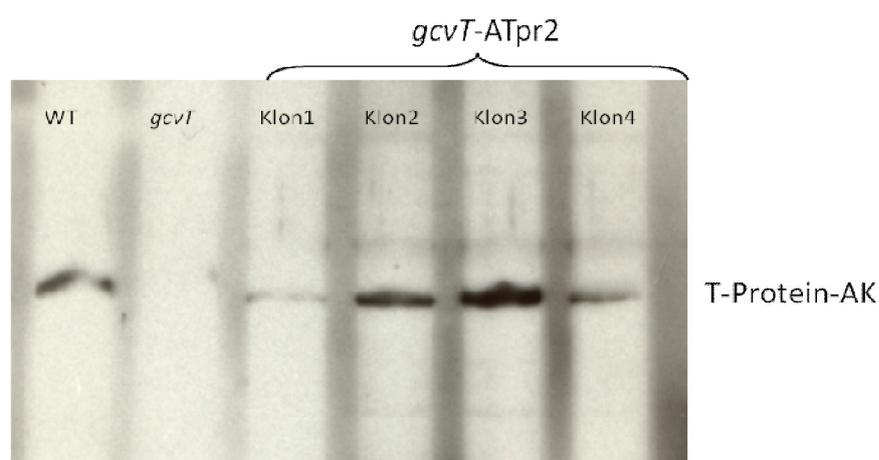


Abb. 9 Western Blot zum Nachweis der T-Proteine in *Synechocystis* Wildtyp (WT), der *Synechocystis* T-Protein defizienten Mutante (*gcvT*) und den mit dem *Arabidopsis* T-Protein-like-Protein komplementierten *Synechocystis* Mutanten ($\Delta gcvT$ -ATpr2).

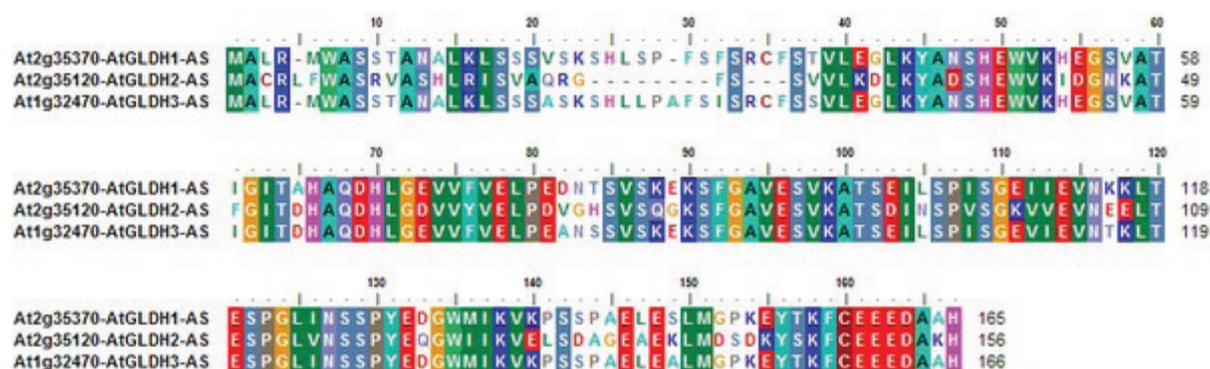
In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob es sich bei dem chloroplastidären T-Protein-like Protein um eine enzymatisch aktive Aminomethyltransferase handelt. Dazu bietet es sich an, dieses Protein heterolog in *E. coli* zu exprimieren und spezifische enzymatische Messungen bezüglich der Aminomethyltransferase-Aktivität durchzuführen. Ebenso sollte versucht werden, die *Atgldt1-1*-Mutante mit dem T-Protein-like-Protein in Fusion mit einem mitochondrialen Transitpeptid zu komplementieren, um eine Aminomethyltransferase-Aktivität *in vivo* nachzuweisen.

4.1.3. H-Protein-Mutanten

Da das *Arabidopsis* H-Protein von drei Genen (*AtGLDH1*, *At2g35370*; *AtGLDH2*, *At2g35120*; *AtGLDH3*, *At1g32470*) kodiert wird, wurde ein RNAi-Konstrukt gegen *AtGLDH1* und *AtGLDH3* generiert. Im Gegensatz zu *AtGLDH2* werden diese H-Proteine vorwiegend in photosynthetisch aktiven Organen exprimiert (Abb. 13) und stellen somit potentielle H-Proteine für den photorespiratorischen Umsatz über die GDC dar. Sequenzanalysen mit der Software „BioEdit“ zeigten 95 % Identität der Aminosäuren von *AtGLDH1* und *AtGLDH3* (Abb. 10). Das H-Protein *AtGLDH2* weist hingegen Unterschiede im N-terminalen Bereich, dem putativen Transitpeptid, auf. Elf Aminosäuren fehlen *AtGLDH2* im Bereich zwischen den Aminosäuren 24-36. Zur Reprimierung der Expression von *AtGLDH1* und *AtGLDH3*, aber nicht *AtGLDH2* wurde ein Bereich in der genomischen Sequenz von *AtGLDH1* ausgewählt, der eine Sequenzübereinstimmung zu *AtGLDH3* und eine möglichst geringe Identität zu *AtGLDH2* aufweist.

Zur Herstellung des RNAi-Konstrukts wurde ein 171 bp Fragment des dritten Exon von *AtGLDH1* in sense und antisense Orientierung mit dem *St-GA20ox* Intron (Chen *et al.*, 2003) fusioniert und in den Vektor pUC-RNAi kloniert (Abb. 10). Die *AtGLDH*-RNAi-Primer sind 3.1.8 zu entnehmen. Die RNAi-Kassette wurde zwischen dem 35S-Promotor und dem Nopalinsynthase-Terminator des binären Vektor pGreen0179 ligiert. Das fertige RNAi-Konstrukt wurde über Agrobakterium-vermittelten Gentransfer in wildtypische *Arabidopsis*-Pflanzen (Col0) transformiert. Es wurden vier transgene Linien (*AtGLDH*-RNAi 1-4) isoliert. Der Phänotyp von *AtGLDH*-RNAi 1 ist der Abb. 12 zu entnehmen.

A



B

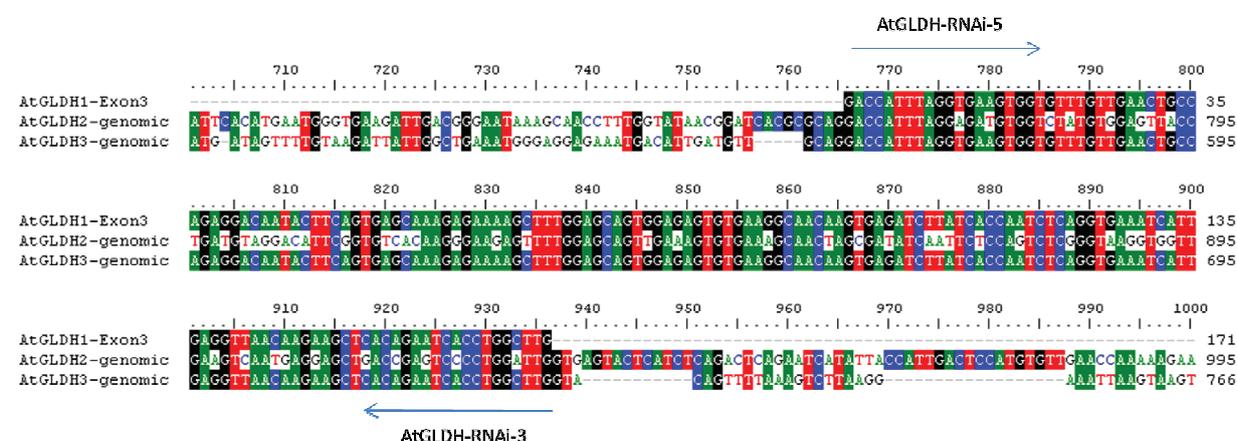


Abb. 10 Analyse der Sequenzähnlichkeiten (Alignments) der H-Proteine und AtGLDH1-3 (A) und DNA-Sequenzvergleich des Exon 3 von AtGLDH1 mit der genomischen DNA von AtGLDH2 und AtGLDH3 für die Herstellung des RNAi-Konstrukts (B) mit der Software BioEdit.

4.1.4. SHM-Mutanten

Die Isolierung und Charakterisierung der SHM-Mutanten *Atshm1-1* (SALK_083735) und *Atshm2-2* (SALK_096265) wurde bereits beschrieben (Engel, 2004; Voll *et al.*, 2006). In diesen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die photorespiratorische Konversion von Glycin zu Serin vorwiegend durch die AtSHM1 erfolgt. Das Gen der AtSHM2 wird im Gegensatz zur AtSHM1, die besonders in photosynthetisch aktivem Gewebe vorliegt, in den heterotrophen Organen exprimiert (Abb. 13). Diese beiden mitochondrialen SHM-Isoformen weisen im Gegensatz zu den P-Protein-Isoformen keine Redundanz auf. Nur die *Atshm1-1*-Mutante zeigt einen photorespiratorischen Phänotyp, der unter erhöhten CO₂-Bedingungen wieder revertiert werden kann (Abb. 12).

Im Vergleich mit den P- und T-Protein-Nullmutanten wurde auch eine SHM-Doppelmutante (*Atshm1-1* x *Atshm2-2*) erzeugt, in der beide mitochondrialen SHM-Isoformen AtSHM1 und AtSHM2 nicht mehr funktionell sind. Die T-DNA-Einzelmutanten *Atshm1-1* und *Atshm2-2* wurden gekreuzt. In der F2-Generation wurden 11 von 30 Individuen isoliert, die homozygot für die *Atshm1-1* und heterozygot für die *Atshm2-2* Mutationen waren. Der Gennachweis (AtSHM1: Shm1-S/ Shm1-A; AtSHM2: Shm2-S/ Shm2-A) und die Zygote der T-DNA-Insertion (AtSHM1: Shm1-S/ SALK-LB; AtSHM2: Shm2-S/ SALK-LB) wurden durch PCR überprüft (Abb. 11). Die Primerkombinationen sind 3.1.8 zu entnehmen. In der F3-Generation wurden auf MS-Medium unter 0,9 % CO₂ doppel-homozygote Linien isoliert. Das Erscheinungsbild der SHM-Doppelmutante ähnelt dem der P- und T-Protein-Nullmutanten und ist gegenüber der Einzelmutante *Atshm1-1* deutlich verstärkt (Abb. 12). Bei einer Aufzucht auf Erde erreicht die SHM-Doppelmutante nur das Vierblattstadium, wenn die Lichtintensitäten deutlich reduziert sind. Dies kann z. B. durch Beschattung von Nachbarpflanzen erfolgen. Eine vollständige Rosette kann diese Doppelmutante aber nur bei einer Kultivierung auf MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,9 % CO₂ ausbilden.

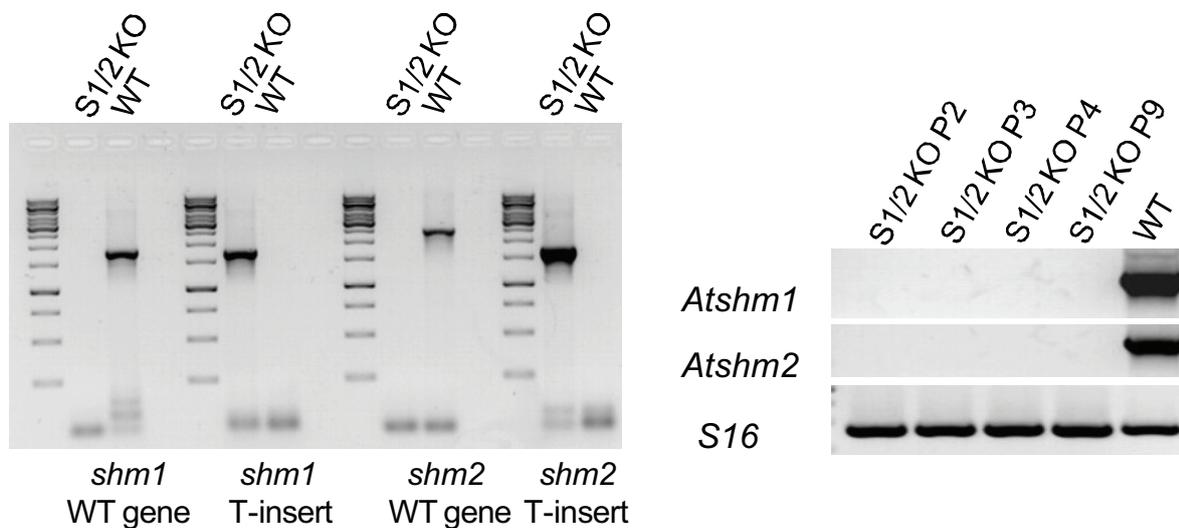


Abb. 11 Genotyp der mitochondrialen SHM-Doppelmutante (S1/2 KO). Links: PCR mit der isolierten genomischen DNA der Doppelmutante *Atshm1-1* x *Atshm2-2* (S1/2 KO) und des Wildtyp (WT). Die intakten AtSHM1 und ATSHM2 Gene sind nur im WT präsent. Die T-DNA-Insertionen in den AtSHM1 und ATSHM2 Genen wurden nur in der Doppelmutante S1/2 KO detektiert. Rechts: RT-PCR Analysen zeigen keine AtSHM1- und ATSHM2-Transkripte in der Doppelmutante (Pflanzen 2, 3, 4 und 9).

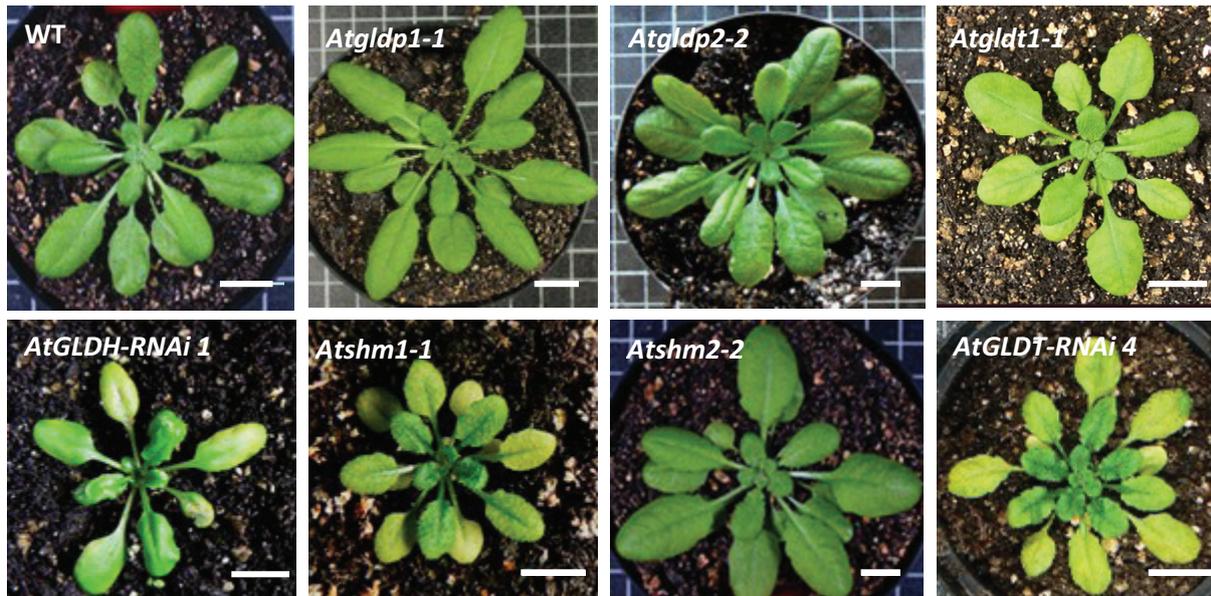
4.1.5. Phänotypische Charakterisierung der isolierten Mutanten

Für die phänotypische Charakterisierung wurden die GDC- und SHM-Einzelmutanten zunächst unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (0,9 % CO₂) angezogen und nach vier Wochen in ambienter Luft inkubiert. Nach ca. zwei Wochen unter photorespiratorischen Bedingungen sollte ein entsprechender Phänotyp bei den Mutanten sichtbar sein. In der Abb. 12 sind die Einzelmutanten im Vergleich zum WT dargestellt. Die Mutanten *Atgldt1-1*, *AtGLDT-RNAi-4*, *AtGLDH-RNAi-1* und *Atshm1-1* zeigen sowohl in ihrem Wachstum als auch im Erscheinungsbild deutliche Unterschiede. Während die jungen Blätter noch keine morphologischen Besonderheiten zeigen, weisen ältere Rosettenblätter chlorotische Bereiche und eine Gelbfärbung auf. Dieses Erscheinungsbild kann unter erhöhten CO₂-Bindungen revertiert werden. Daher kann man von einem typischen photorespiratorischen Phänotyp sprechen. Bei den Mutanten *Atgldp1-1*, *Atgldp2-2* und *Atshm2-2* sind keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen erkennbar. Für die P-Protein-Mutanten wurde bereits Redundanz nachgewiesen, so dass auch keine signifikante Veränderung im Erscheinungsbild der Einzelmutanten zu erwarten war (Engel *et al.* 2007). Das Ausbleiben des photorespiratorischen Phänotyps bei *Atshm2-2* begründet sich darauf, dass AtSHM1 und AtSHM2 nicht redundant sind und dass AtSHM2 vermutlich für die Glycin-Serin-Interkonversion in heterotrophem Gewebe verantwortlich ist. Demnach führen nur die starken Reduktionen der GDC- oder SHM-Aktivitäten in photosynthetisch aktiven Geweben zu einem photorespiratorischen Phänotyp, der auch für andere C₂-Zyklus Mutanten beschrieben wurde (z. B. Schwarte *et al.*, 2007 und Boldt *et al.* 2005).

Im Kontrast zu den Einzelmutanten steht der Phänotyp der P-, T- und mitochondrialen SHM-Nullmutanten. Diese Nullmutanten konnten nur auf MS-Medium unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen (0,9 % CO₂) isoliert werden. Die P- und T-Protein-Nullmutanten waren noch keimungsfähig, starben aber im Kotyledonenstadium ab. Diese Letalität konnte auch nicht durch eine Reduktion der Lichtintensität umgangen werden. Die mitochondriale SHM-Nullmutante erreichte auch nur das Kotyledonenstadium bei einer Anzucht auf Erde, war aber bei reduzierten Lichtverhältnissen, z. B. durch Beschattung von heterozygoten Nachbarpflanzen bis zum Vierblattstadium, lebensfähig (Abb. 12). In dieser Entwicklungsstufe war die Chlorophyllsynthese stark beeinträchtigt, so dass die Blätter der SHM-Nullmutante gelblich blieben und dann abstarben. Im Gegensatz zu den P- und T-Protein-Nullmutanten kann die SHM-Nullmutante auf MS-Medium mit 1 % Saccharose und unter 0,9 % CO₂ bis zur vollständigen Ausbildung der Rosette herangezogen werden. Diese Nullmutante ist auch in der Lage Blüten zu bilden, die aber keine fertilen Samen hervorbringen. Das vollständige Ausschalten der mitochondrialen GDC- oder SHM-Aktivität ist somit nicht vereinbar mit dem pflanzlichen Stoffwechsel und kann nicht durch andere Reaktionen im

pflanzlichen Stoffwechsel kompensiert werden. Durch die Letalität der Nullmutanten unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen wurde bewiesen, dass die GDC- und SHM-Reaktionen noch an anderen Stoffwechselprozessen beteiligt sind, die lebensnotwendig für das Wachstum und die Entwicklung sind.

A Einzelmutanten



B Nullmutanten



Abb. 12 Erscheinungsbild der GDC- und SHM-Einzelmutanten (A) sowie der Nullmutanten ohne endogene GDC bzw. mitochondriale SHM (B). A: Die homozygoten Einzelmutanten wurden vier Wochen unter 0,9 % CO₂ auf Erde angezogen und anschließend unter normalen Luftbedingungen für zwei Wochen inkubiert. Der weiße Balken entspricht 1 cm. B: Die Nullmutanten wuchsen auf MS-Medium mit 1 % Saccharose unter 0,9 % CO₂. Durch Beschattung von Nachbarpflanzen war die *shm1-1 x shm2-2*-Mutante bis zum Vierblattstadium lebensfähig.

4.1.6. Expressionsprofile der mitochondrialen GDC- und SHM-Gene

Mit Hilfe der Internetsoftware „Genevestigator“ ist es möglich, gewebe- und organspezifische Transkriptdaten verschiedener *Arabidopsis*-Gene miteinander zu vergleichen. Durch diese Analyse erhält man einen Überblick über die Expressionsprofile der einzelnen Gene und kann Rückschlüsse auf den Wirkungsort der entsprechenden Proteine ziehen.

Die Transkriptprofile der annotierten GDC- und mitochondrialen SHM-Gene sind der Abb. 13 zu entnehmen. Deutlich ist zu erkennen, dass die Expressionsmuster der GDC- und SHM-Gene nicht uniform sind. Da es sich um photorespiratorische Gene handelt, ist zu erwarten, dass eine starke Expression in allen photosynthetisch aktiven Organen auftritt. Dies trifft jedoch nicht auf alle GDC- und SHM-Gene zu. In den grünen und schnell wachsenden Geweben (Keimling, Rosetten- und Hochblätter, Stängel, Infloreszenz) werden hohe Transkriptmengen der Gene *AtGLDP1*, *AtGLDP2*, *AtGLDT1*, *AtGLDH1*, *AtGLDH3* sowie *AtSHM1* angezeigt. Die Gene, die für die Proteine *AtGLDH2* und *AtSHM2* kodieren, werden vorwiegend in heterotrophen Geweben, wie Wurzel, Hypokotyl, Xylem und Samen transkribiert. Daraus lässt sich schließen, dass die GDC- und SHM-Aktivität nicht nur für den photorespiratorischen Umsatz benötigt wird, sondern auch für den primären Kohlen- und Stickstoffhaushalt in nicht-grünem Gewebe. Mit Ausnahme des T-Proteins wird jede GDC-Untereinheit und auch die mitochondriale SHM von mindestens zwei Genen kodiert. Man kann postulieren, dass jeweils eine der Isoformen für den GDC- oder SHM-Umsatz im photosynthetisch aktiven oder heterotrophen Gewebe verantwortlich ist. Dementsprechend werden die Gene *AtGLDP1*, *AtGLDP2*, *AtGLDT1*, *AtGLDH1*, *AtGLDH3* und *AtSHM1* zur Gruppe 1 zusammengefasst, da diese eine vorrangige Expression im grünen Gewebe aufweisen. Die Gene *AtGLDH2* und *AtSHM2* wurden aufgrund ihrer starken Expression im heterotrophen Gewebe in eine separate Gruppe eingeordnet (Gruppe 2). Das Gen *AtGLDP2* nimmt eine Sonderstellung ein, da moderate Transkriptmengen sowohl im auto- als auch heterotrophen Gewebe vorliegen. Dieses zweite P-Protein wurde dennoch in die Gruppe 1 eingeordnet, da die Redundanz mit *AtGLDP1* nachgewiesen wurde (Engel *et al.*, 2007).

Darüber hinaus wurde mit der Genevestigator-Software gezeigt, dass die Gene der Gruppe 1 eine lichtinduzierte Transkriptionssteigerung, eine Reprimierung der Expression bei osmotischen Stress und Nitratmangel aufweisen (siehe 9). Dies deutet ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen der CO₂-Assimilation der Pflanzen und der Expression der Gruppe 1-Gene hin.

Weiterhin ist die hohe Expressionsrate der GDC- und SHM-Gene in den Keimlingen, besonders in den Kotyledonen, und während der Blütenentwicklung (Sepalen, Pedicel, Schoten) auffällig. Dieser Befund impliziert, dass die GDC- und SHM-Reaktionen auch in anderen Entwicklungsstadien der

Pflanze benötigt werden. Somit lässt sich ein Rückschluss auf die Letalität der P-, T- und SHM-Nullmutanten ziehen, denn diese Pflanzen besitzen keine endogene und funktionelle GDC oder SHM im Kotyledonenstadium.

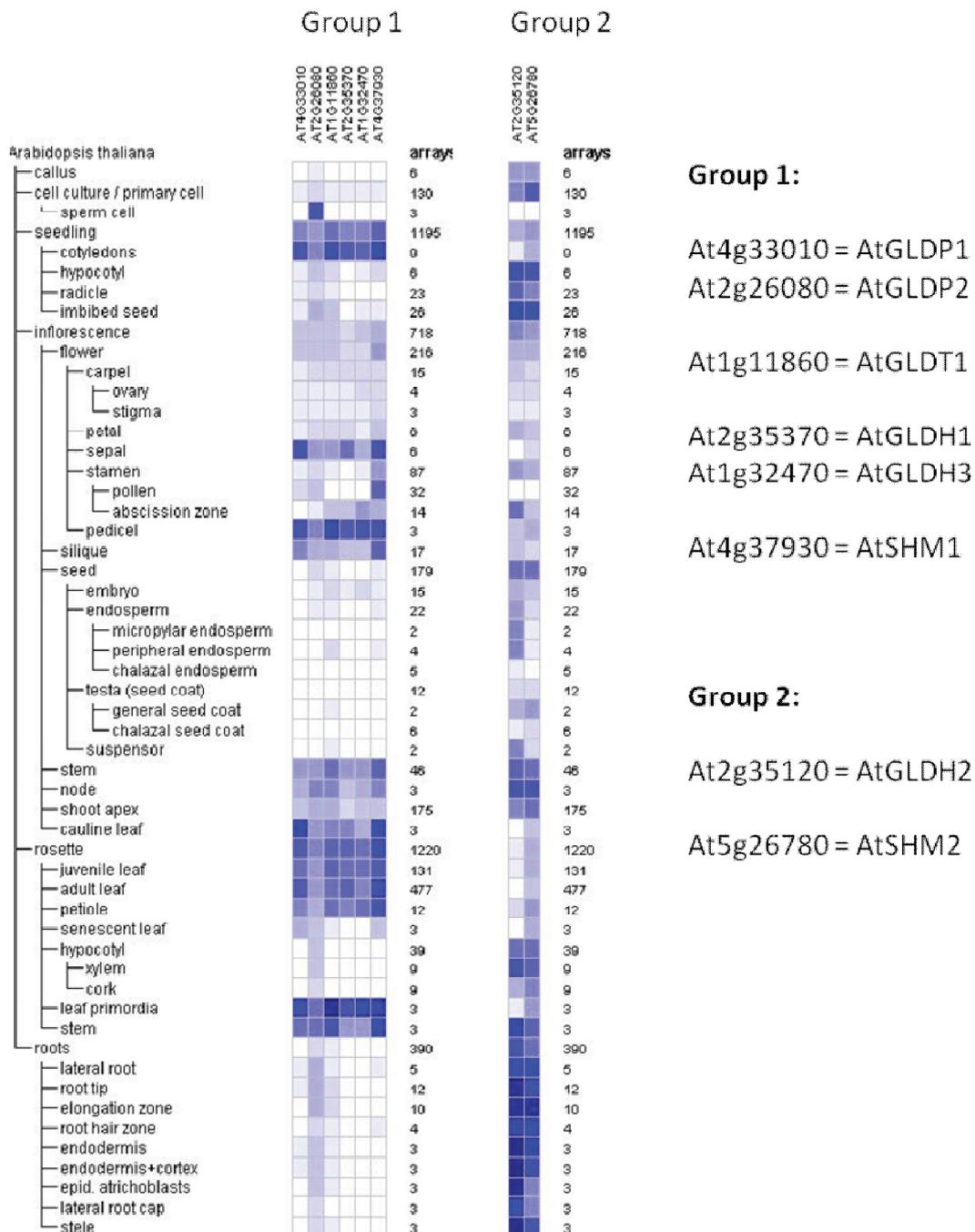
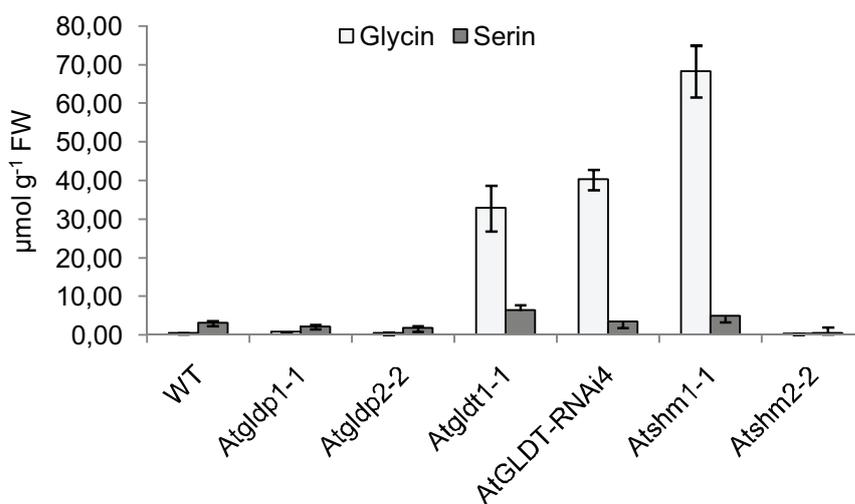


Abb. 13 Relative Transkriptmengen der GDC- und mitochondrialen SHM-Gene in verschiedenen Organen von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col0). Die Grafik wurde mit der im Internet verfügbaren Software Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) erstellt. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Transkriptstärke.

4.1.7. Veränderungen der Metabolitgehalte in den GDC- und SHM-Mutanten

Mit Hilfe von Metabolitanalysen wurden sowohl die Einzelmutanten als auch die Nullmutanten stoffwechselphysiologisch charakterisiert. Durch HPLC-Analysen wurden die Konzentrationen der löslichen Aminosäuren im Blatt bestimmt. Besondere Bedeutung lag in diesem Zusammenhang auf den Konzentrationen der Aminosäuren Glycin, Serin, Glutamat und Glutamin. Die Ergebnisse der Einzelmutanten sind in Abb. 14 dargestellt.

A



B

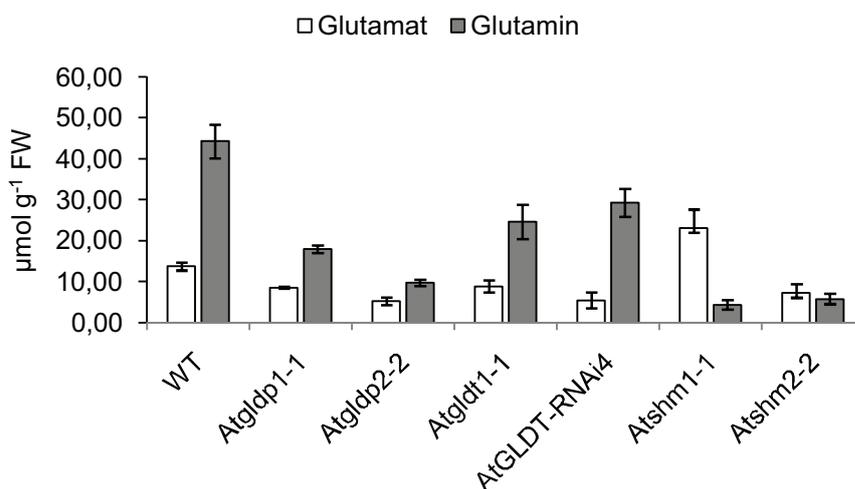


Abb. 14 Konzentrationsbestimmung ausgewählter löslicher Aminosäuren der GDC- und SHM-Einzelmutanten aus Blättern, die in der Mitte der Lichtperiode geerntet wurden. A: Die Glycin- und Serinkonzentrationen. B: Die Glutamat- und Glutaminkonzentrationen. Für die Messungen wurden die Pflanzen sieben Tage in ambienter Luft kultiviert und intakte Rosettenblätter des gleichen Wachstumsstadiums verwendet.

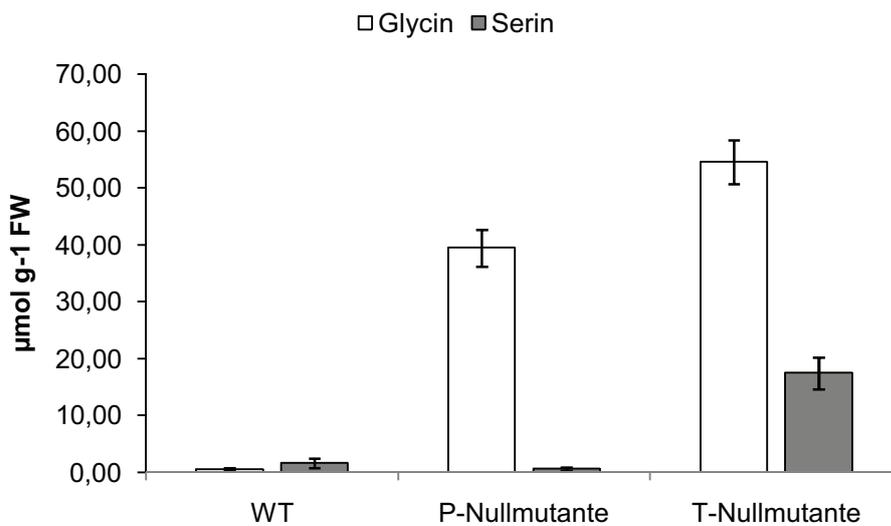
Deutlich ist zu erkennen, dass die Einzelmutanten *Atgldt1-1*, *AtGLDT-RNAi* und *Atshm1-1* große Mengen Glycin (70 - 150fach) in der Mitte der Lichtphase akkumulieren. Die Glycinakkumulation korreliert mit den Phänotypen der Mutanten. Je mehr Glycin in den Blättern der Einzelmutanten angereichert wird, desto ausgeprägter ist der photorespiratorische Phänotyp. Somit besteht ein Zusammenhang zwischen den Chlorosen, der gelblichen Verfärbung der Blätter und der Glycinmenge. Im Gegensatz zu den Glycingehalten sind die Serinkonzentrationen in den Einzelmutanten kaum beeinflusst. Nur in den Mutanten *Atgldt1-1*, *AtGLDT-RNAi* und *Atshm1-1* ist der Seringehalt 1,5 - 2fach erhöht.

Da über die GDC-Reaktionen NH_3 freigesetzt wird, war es auch von Interesse, die Glutamat- und Glutaminkonzentrationen der Blattextrakte zu erfassen. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Glutamatkonzentrationen der Einzelmutanten leicht reduziert. Nur die *Atshm1-1* Mutante zeigt eine Verdoppelung der Glutamatmenge. Die Glutamingehalte der Einzelmutanten waren signifikant reduziert (20 - 70 %) im Vergleich mit dem korrespondierenden Wildtyp. Eine Reduktion der GDC-Aktivität in Blättern der Einzelmutanten bewirkt eine starke Akkumulation von Glycin und eine leichte Reduktion der Glutamat- und Glutamingehalte.

Von den GDC-Nullmutanten wurde ebenfalls eine Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen vorgenommen. Diese Ergebnisse konnten mit denen der Einzelmutanten nicht kombiniert werden, da die Nullmutanten auf MS-Medium angezogen wurden und nur das Kotyledonenstadium erreichten. In der Abb. 15 sind die Gehalte der Aminosäuren Glycin, Serin, Glutamat und Glutamin in den P- und T-Protein Nullmutanten dargestellt. Die P- und T-Protein-Nullmutanten akkumulieren im großen Maße Glycin, die P-Protein-Nullmutante um das 65fache und die T-Protein-Nullmutante um das 90fache. Diese Werte sind jedoch geringer im Vergleich zu denen der Einzelmutanten *Atgldt1-1*, *AtGLDT-RNAi* und *Atshm1-1*. Zu erwarten wäre eine noch stärkere Anreicherung von Glycin, da kein Umsatz mehr über die GDC erfolgen kann.

Allerdings war das Probenmaterial nicht vergleichbar. Bei den letalen Mutanten ist nicht abzuschätzen, ob die geernteten Kotyledonen bereits abgestorben oder noch stoffwechselphysiologisch aktiv waren. Somit besteht die Möglichkeit, dass bereits Material für die Untersuchung verwendet wurde, das sich in der Seneszenz oder im Abbauprozess befand. Dennoch waren die Glycingehalte relativ hoch. Ähnlich wie bei den Einzelmutanten veränderte sich der Serinspiegel nur geringfügig. Nur in der T-Protein-Nullmutante war die Serinkonzentration um das 10fache erhöht. Die Glutamatkonzentrationen variierten in den GDC-Nullmutanten nur geringfügig im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch akkumulierte Glutamin um das 2-3fache in den Nullmutanten und steht daher im Kontrast zu den Werten der Einzelmutanten, in denen Glutamin signifikant reduziert vorliegt.

A



B

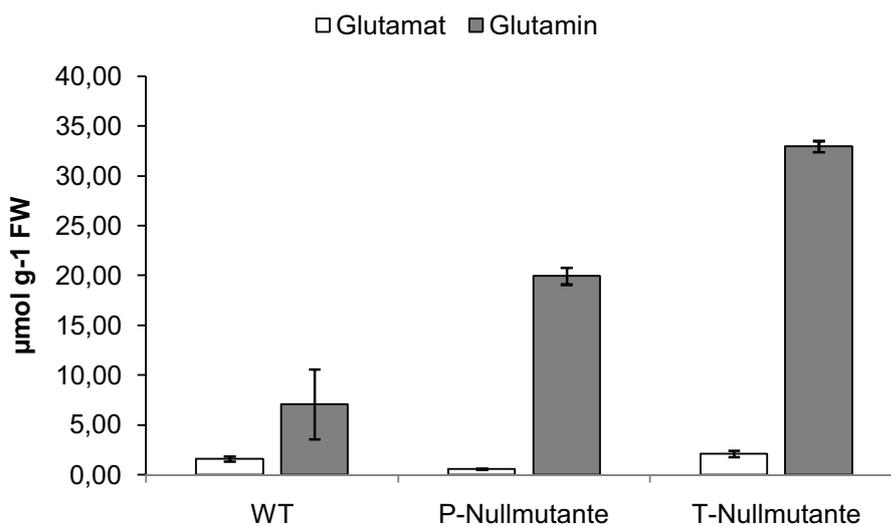


Abb. 15 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen der letalen P- und T-Protein-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Sowohl die Nullmutanten als auch der korrespondierende Wildtyp wurden auf MS-Medium unter 0,9 % CO_2 angezogen A: Die Glycin- und Serinkonzentrationen. B: Die Glutamat- und Glutaminkonzentrationen.

Die Aminosäurebestimmungen der Einzel- und Nullmutanten zeigen deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen der blattspezifischen Glycinmenge und dem Erscheinungsbild der Mutanten besteht. Die Veränderungen in den Glutamat- und Glutamingehalten implizieren, dass durch die Reduktion oder Inhibierung der GDC- und SHM-Aktivitäten auch der Stickstoffhaushalt der transgenen Pflanzen beeinflusst wurde.

4.1.8. Photosynthetische Leistung

Da die GDC- und SHM-Nullmutanten nur bis zum Kotyledonenstadium wuchsen, war von diesen Pflanzen keine Bestimmung der CO₂-Assimilation möglich. Um die Auswirkungen der reduzierten GDC-Aktivität auf die photosynthetische Leistung zu erfassen, wurden Gaswechsellanalysen mit den P- und T-Protein-Einzelmutanten durchgeführt. Die Photosyntheserate der *Atgldp1-1*-Mutante war unverändert im Vergleich zum WT (*Atgldp1-1*: $6,72 \pm 0,25$; WT: $6,84 \pm 0,26$ CO₂ m⁻² s⁻¹) und wurde in Engel *et al.* 2007 beschrieben. In der Abb. 16 sind die ermittelten Photosyntheseraten und CO₂-Kompensationspunkte der T-Protein-Mutanten bei zwei Lichtintensitäten (250 und 1000 µE) graphisch dargestellt. Die Photosyntheseraten der T-Protein-Mutanten sind im Vergleich mit dem korrespondierenden Wildtyp signifikant reduziert (Abb. 16). Durch die Erhöhung der Lichtintensität auf 1000 µE wurde die Wildtyp CO₂-Assimilationsrate minimal gesteigert. Hingegen sank die Photosyntheserate der *Atgldt1-1*-Mutanten und blieb bei den T-Protein-RNAi-Pflanzen unverändert. Die CO₂-Kompensationspunkte der T-Protein-Einzelmutanten sind der Abb. 16 zu entnehmen. Am CO₂-Kompensationspunkt (Γ) entspricht die CO₂-Fixierung eines Blattes genau der CO₂-Freisetzung durch die Photorespiration und des Citratzyklus, dessen CO₂-Freisetzung bei Belichtung aber zu vernachlässigen ist. Der CO₂-Kompensationspunkt der T-Protein-Einzelmutanten ist höher als im Wildtyp und verändert sich nur unwesentlich bei einer Belichtung von 1000 µE. Dies würde für gesteigerte Photorespirationsraten sprechen bzw. verdeutlichen, dass das freigesetzte CO₂ im geringeren Maße als im Wildtyp refixiert werden kann.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Mutanten mit reduziertem T-Protein-Gehalt eine reduzierte CO₂-Assimilationsrate aufweisen. Die P-Protein Einzelmutanten zeigten keine Beeinträchtigung der photosynthetischen Leistung. Da die photosynthetische Leistung unmittelbar von der Leistung des Photosyntheseapparates abhängig ist, wurden von Blättern der T-Protein Mutante *Atgldt1-1* Chlorophyllbestimmungen durchgeführt (Abb. 17). Die Gehalte an Chlorophyll a und b sind in der Einzelmutante um 50 % bzw. 30 % reduziert. Hingegen sind die Carotinoidkonzentrationen nicht verändert. Die starke Reduktion der Chlorophyllgehalte spiegelt sich in dem chlorotischen Phänotyp der *Atgldt1-1*-Mutante wieder. Demnach besteht ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der GDC-Aktivität im Blatt und den stark erniedrigten Chlorophyllkonzentrationen.

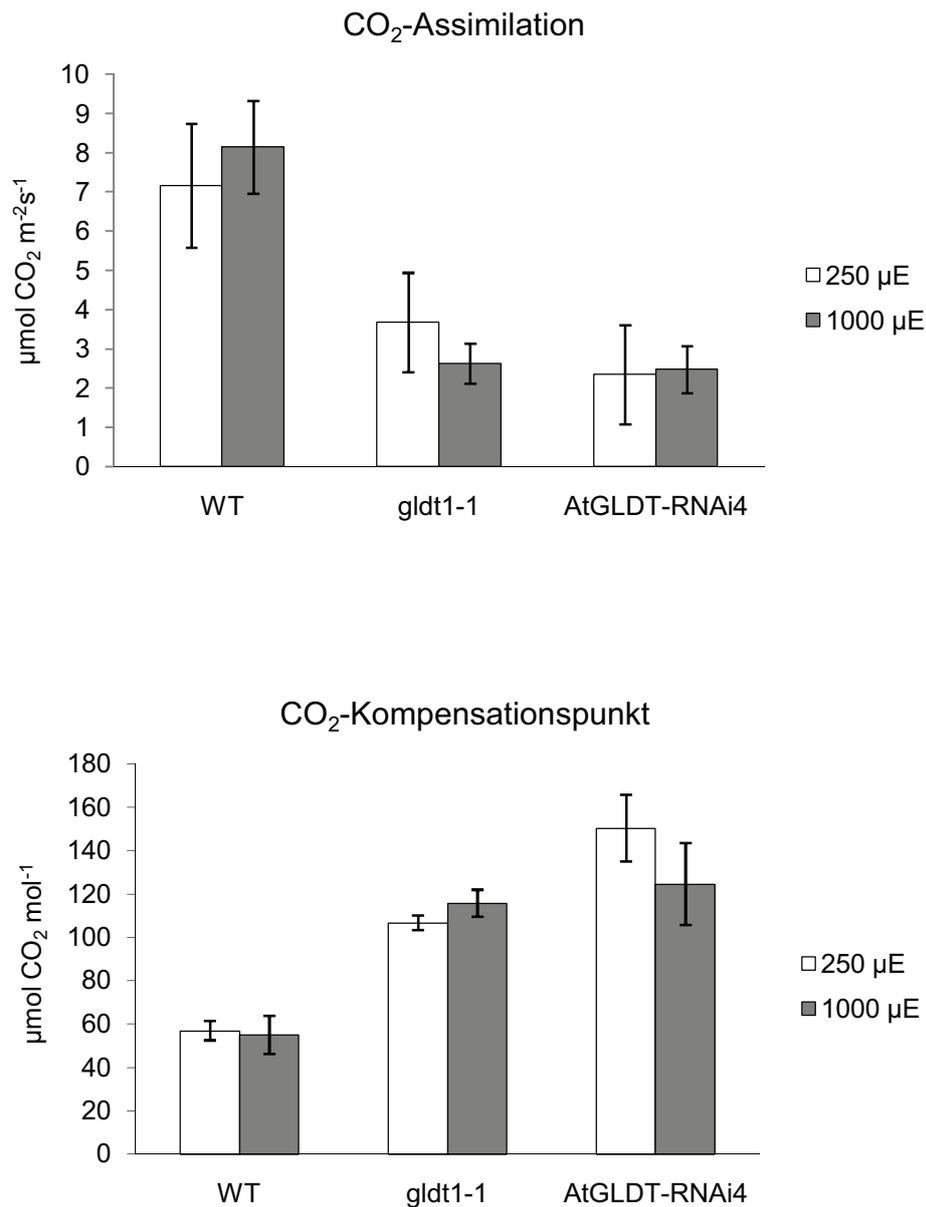


Abb. 16 Photosyntheseparameter in WT und T-Protein Einzelmutanten (*Atgldt1-1*; *AtGLDT-RNAi4*) bei zwei Lichtintensitäten (250 und 1000 µE). A: CO₂-Assimilationsraten. B: CO₂-Kompensationspunkte.

Insbesondere die geringen Gehalte an Chlorophyll a in den Blättern der Mutante lassen darauf schließen, dass eine Schädigung des Photosystem II (PSII) vorliegt oder die Synthese bzw. die Reparatur des PSII negativ beeinflusst wird. Aufgrund der reduzierten Chlorophyllgehalte ist auch eine verringerte CO₂-Assimilation erklärbar.

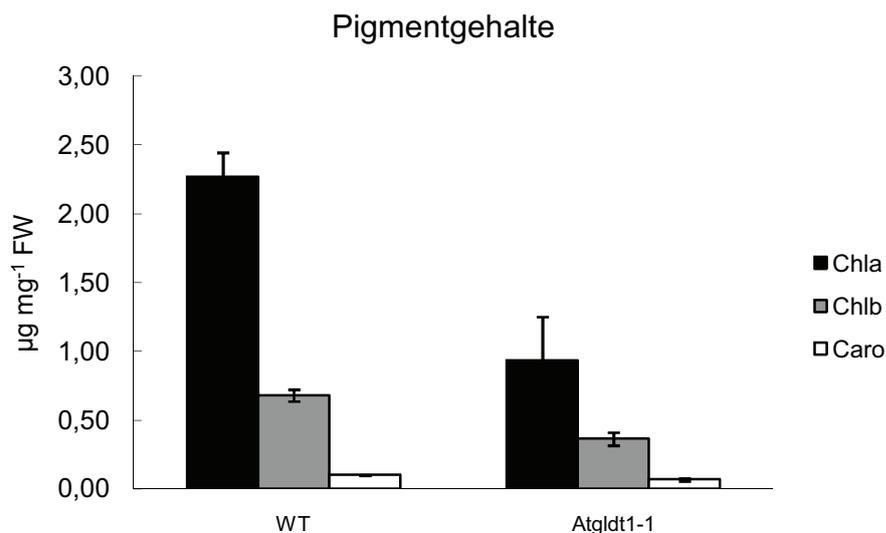


Abb. 17 Chlorophyll- und Carotinoidgehalte der T-Protein-Mutante *Atgldt1-1* im Vergleich zum Wildtyp (WT)

4.1.9. Chemische Komplementation

Als mögliche Ursache für den chlorotischen Phänotyp und die Reduktion der Chlorophyll-Konzentrationen wird die hohe Glycinkkumulation in den Einzelmutanten *Atgldt1-1* und *Atsh1-1* vermutet. Derart stark erhöhte Glycinkonzentrationen können toxisch auf den pflanzlichen Stoffwechsel wirken, indem hohe Glycinmengen z. B. freie Magnesiumionen komplexieren, die u. a. für die Chlorophyllsynthese bedeutsam sind (Eisenhut *et al.*, 2007). Daher wurde versucht, die oben genannten Einzelmutanten chemisch zu komplementieren. Die Komplementation mit Mg-haltigen MS-Medium (0 - 1 mM Mg²⁺) verbesserte nicht das Erscheinungsbild der Mutanten und wird daher nicht weiter beschrieben. Eine weitere Möglichkeit, die Glycintoxizität zu vermindern, stellt die Komplementation mit Natriumbenzoat dar. In der Humanmedizin wird Natriumbenzoat als Therapeutikum gegen die Stoffwechselerkrankung Nonketotische Hyperglycinämie (NKH) eingesetzt. Diese Erbkrankheit beruht zu 85 % auf einer Mutation des P-Proteins und zu 15 % auf einer des T-Proteins, die sich in einem stark erhöhten Glycinspiegel im Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit der Patienten äußert (Kure *et al.*, 1997; Tada 1993). Durch eine Verabreichung von Natriumbenzoat wird das toxisch wirkende Glycin gebunden und als Hippursäure ausgeschieden.

Die Entgiftung mit Natriumbenzoat lässt sich natürlich nicht uneingeschränkt auf Pflanzen übertragen, aber ein Vorversuch mit *Arabidopsis* Wildtyppflanzen und den Einzelmutanten (*Atgldt1-1* und *Atsh1-1*) zeigt, dass Natriumbenzoat über die Wurzel aufgenommen werden kann. Denn bei Konzentrationen von 500 – 800 µM Natriumbenzoat im Medium konnte für die Glycin-

akkumulierende *Atshm1-1*-Mutante eine signifikante Verbesserung des Phänotyps nachgewiesen werden (Abb. 18). Im Gegensatz zum Kontrollansatz bei 0 μM Natriumbenzoat, bei dem die *Atshm1-1*-Mutante weißlich erschien und im Kotyledonenstadium verharrete, konnte bei den erhöhten Natriumbenzoatkonzentrationen (200- 800 μM) eine vermehrte Chlorophyllsynthese und somit ein gelblich bis grünliches Erscheinungsbild nachgewiesen werden. Allerdings zeigt der Wildtyp unter diesen hohen Natriumbenzoatkonzentrationen auch einen verschlechterten Phänotyp, der darauf schließen lässt, dass Natriumbenzoat toxisch auf die Pflanzen wirkt.

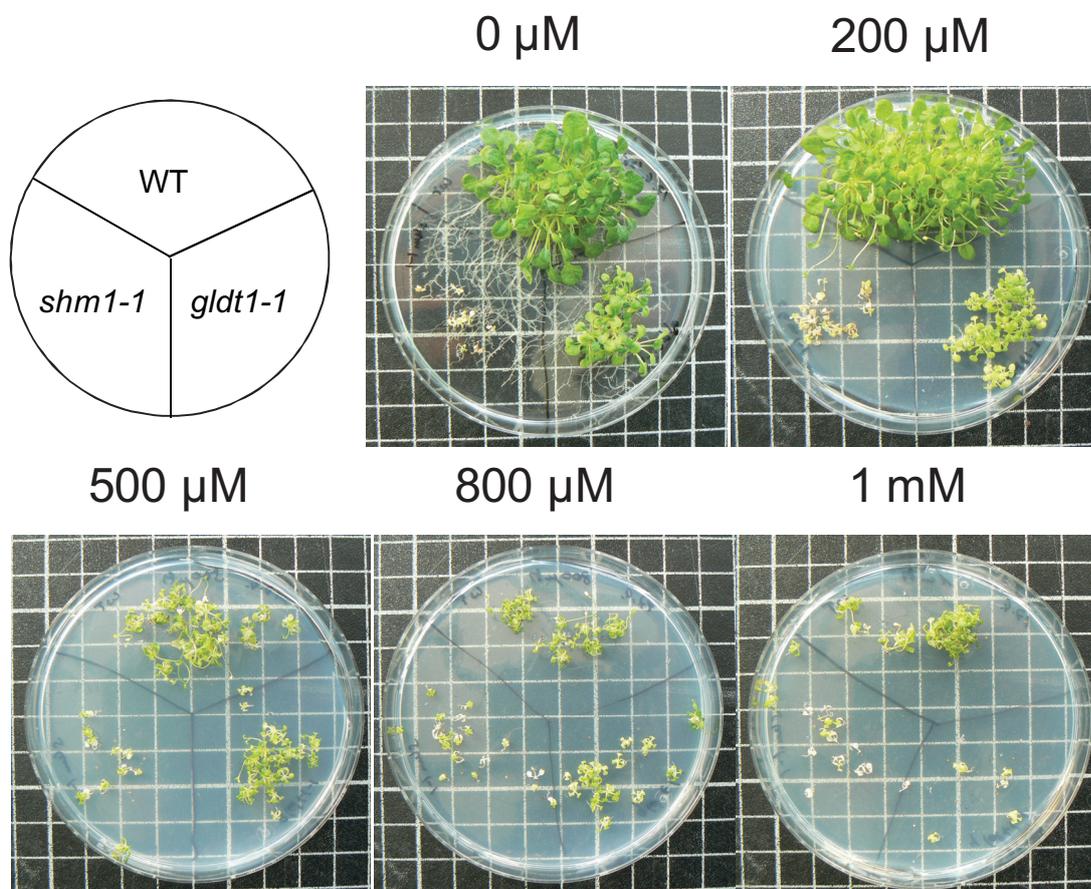


Abb. 18 Chemische Komplementation von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen (Col0) und den Knockdown-Mutanten *shm1-1* und *gldt1-1* mit verschiedenen Konzentrationen von Natriumbenzoat unter ambienten Bedingungen. Ab einer Konzentration von 200 μM Natriumbenzoat im Medium ist eine toxische Wirkung auf den Wildtyp (WT) und die *gldt1-1*-Mutante erkennbar. Im Gegensatz dazu verbessert sich der Phänotyp der *shm1-1*-Mutante bei Konzentration zwischen 500 – 800 μM Natriumbenzoat. Die *shm1-1* Pflanzen sind wesentlich grüner und größer im Vergleich zur Kontrolle ohne Natriumbenzoat.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass zum einem Natriumbenzoat toxisch auf die Pflanzen wirkt, aber auch freies Glycin in den Pflanzen komplexieren kann. Denn durch das verbesserte Erscheinungsbild der *Atshm1-1*-Mutante unter 500 μ M Natriumbenzoat wurde verdeutlicht, dass zumindest ein Teil des photorespiratorischen Glycins gebunden und somit die Toxizität vermindert wurde.

Die chemische Komplementation mit Natriumbenzoat sollte durch weitere Experimente ergänzt werden, um nachzuweisen, inwiefern sich die hohen Glycinkonzentrationen der GDC- und SHM-Mutanten auf den Phänotyp und die Chlorophyllgehalte im Blatt auswirken. Dadurch könnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Letalität der Nullmutanten auf die starke Glycinakkumulation zurückzuführen ist oder durch die Beeinträchtigung anderer Prozesse hervorgerufen wird.

4.2. Komplementation der GDC-Mutanten

Für die funktionelle Untersuchung der GDC- und mitochondrialen SHM-Isoformen in *Arabidopsis* wurden Komplementationsanalysen mit heterologen Genen durchgeführt. Für diese Analysen wurden die T-Protein-Mutante *Atgldt1-1* sowie die P-Protein-Nullmutante ausgewählt. Beide Mutanten sollten mit den heterologen Genen aus *Flaveria anomala* komplementiert werden. Dazu wurde zunächst die Gewebespezifität der *Flaveria anomala* GDC-Promotoren mittels Promotor-GUS-Fusionen überprüft.

4.2.1. Analyse der *Flaveria anomala* GDC-Promotoren

Die *Flaveria anomala* GDC-Gene wurden bereits kloniert und charakterisiert (Chu, 1996; Chu *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Nan and Bauwe, 1998; Cossu, 1997; Cossu and Bauwe, 1998). Zur Überprüfung der bündelscheidenspezifischen Expression des *F. anomala* P-Protein-(FaGLDP)-Promotors wurde der komplette genomische Bereich (-4500 bp) stromaufwärts des Translationsstartes mit dem β -Glucuronidase-Gen (*uidA*) fusioniert (Abb. 19). Analog erfolgte die GUS-Fusion mit den *F. anomala* T- und H-Protein-Promotoren (FaGLDT, FaGLDH).

Diese Konstrukte wurden zuvor in der Arbeitsgruppe Bauwe kloniert und standen für die Pflanzentransformation zur Verfügung. Zusätzlich wurde ein am 5'-Ende verkürztes FaGLDP-Promotor-Fragment mit der Länge von 1768 bp mittels PCR amplifiziert (Primer: FaGLDP-Pro-EcoRV-S

und FaGLDP-Pro-NcoI-A) und über die Schnittstellen *EcoRV* und *NcoI* in den Vektor pCAMBIA1305.1 kloniert. Die vier GUS-Konstrukte wurden in wildtypische *Arabidopsis*-Pflanzen (Col0) transformiert.

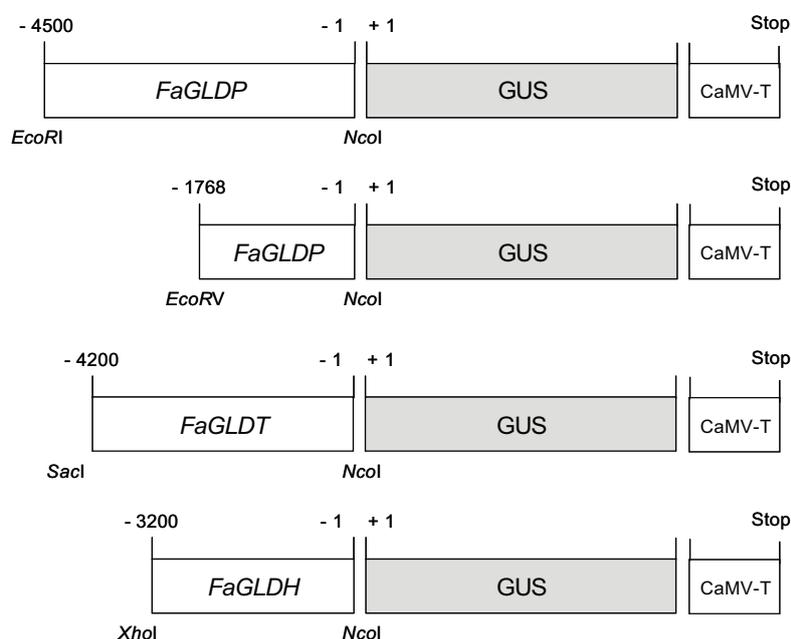


Abb. 19 Schematische Darstellung der Promotor-GUS-Konstrukte. Die *Flaveria anomala* GDC-Promotoren (FaGLDP: P-Protein, FaGLDT: T-Protein, FaGLDH: H-Protein) wurden mit dem β -Glucuronidase-Gen (GUS) fusioniert.

Die histochemische Analyse der Expression des vollständigen FaGLDP₄₅₀₀-Promotors zeigte eine Blaufärbung in den Leitbündeln und leitbündelnahen Zellen von *Arabidopsis*. Keine sichtbare Blaufärbung wurde in den interkostalen Bereichen innerhalb der Mesophyll-, Epidermiszellen und Trichomen detektiert (Abb. 20). Der verkürzte Promotor FaGLDP₁₇₆₈-Promotor vermittelte ein identisches Expressionsverhalten im Vergleich mit der kompletten Variante (Abb. 20). Somit beinhalten die 1768 bp des FaGLDP-Promotors alle nötigen Informationen, um eine Leitbündel- und bündelscheidenspezifische Expression in *Arabidopsis* zu erzeugen.

Im Gegensatz zu dem FaGLDP-Promotor vermitteln die *F. anomala* T- und H-Protein-Promotoren keine eindeutige Präferenz für die Leitbündel oder die Bündelscheiden in *Arabidopsis* (Abb. 20 E, F). Die Blaufärbung ist im ganzen Blatt zu erkennen.

Diese Promotor-GUS-Analysen verdeutlichen, dass lediglich der *F. anomala* P-Protein-Promotor eine Expression in den Leitbündeln und Bündelscheidenzellen von *Arabidopsis* vermittelt. Nur mit der Expression des *F. anomala* P-Proteins in der *Arabidopsis* P-Protein-Nullmutante ist eine ektopische Komplementation möglich. Durch die Komplementation der T-Protein-Mutante *Atgldt1-1* mit dem *F. anomala* T-Protein kann eine Überexpression des T-Proteins im gesamten Blatt erreicht werden.

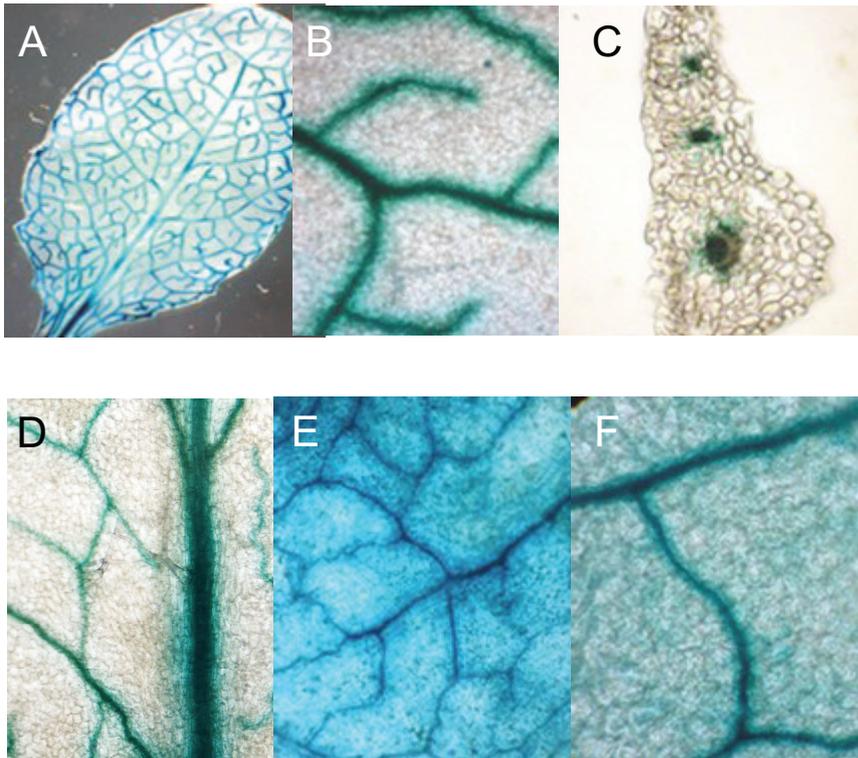


Abb. 20 Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität in *Arabidopsis*-Blättern der Promotor-GUS-Pflanzen. A-C: FaGLDP₄₅₀₀::GUS. D: FaGLDP₁₇₆₈::GUS. E: FaGLDT::GUS F: FaGLDH::GUS.

4.2.2. Komplementation der T-Protein-Mutante *Atgldt1-1*

Die Komplementation der *Atgldt1-1*-Mutante mit dem *F. anomala* T-Protein (TFAG) wurde in Engel *et al.*, 2008 beschrieben. Die transgenen Linien wurden als *Atgldt1-1* + TFAG bezeichnet. Der photorespiratorische Phänotyp von *Atgldt1-1* wurde durch die Expression des *F. anomala* T-Proteins revertiert, so dass diese komplementierten Pflanzen nicht mehr vom Wildtyp zu unterscheiden waren (Abb. 21). Auch die Glycin- und Seringehalte in den Blättern von *Atgldt1-1* + TFAG entsprachen dem WT-Niveau (siehe Engel *et al.*, 2008).

Mittels Immunolokalisationsstudien gegen das T-Protein konnte die Überexpression des T-Proteins im gesamten Blatt der transgenen Linie *Atgldt1-1* + TFAG nachgewiesen werden (Abb. 21). In dieser komplementierten Mutante wurde eine höhere Anzahl von fluoreszierenden Punkten im Mesophyll detektiert. Im Mesophyll von *Atgldt1-1* waren weniger T-Protein-Signale im Vergleich zum WT und *Atgldt1-1* + TFAG sichtbar. Hingegen zeigte die Immunmarkierung des T-Proteins in den Leitbündeln von *Atgldt1-1* keine Veränderungen im Vergleich zum WT. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion des T-Proteins in *Atgldt1-1* vorwiegend die photosynthetisch-aktiven Gewebe betrifft.

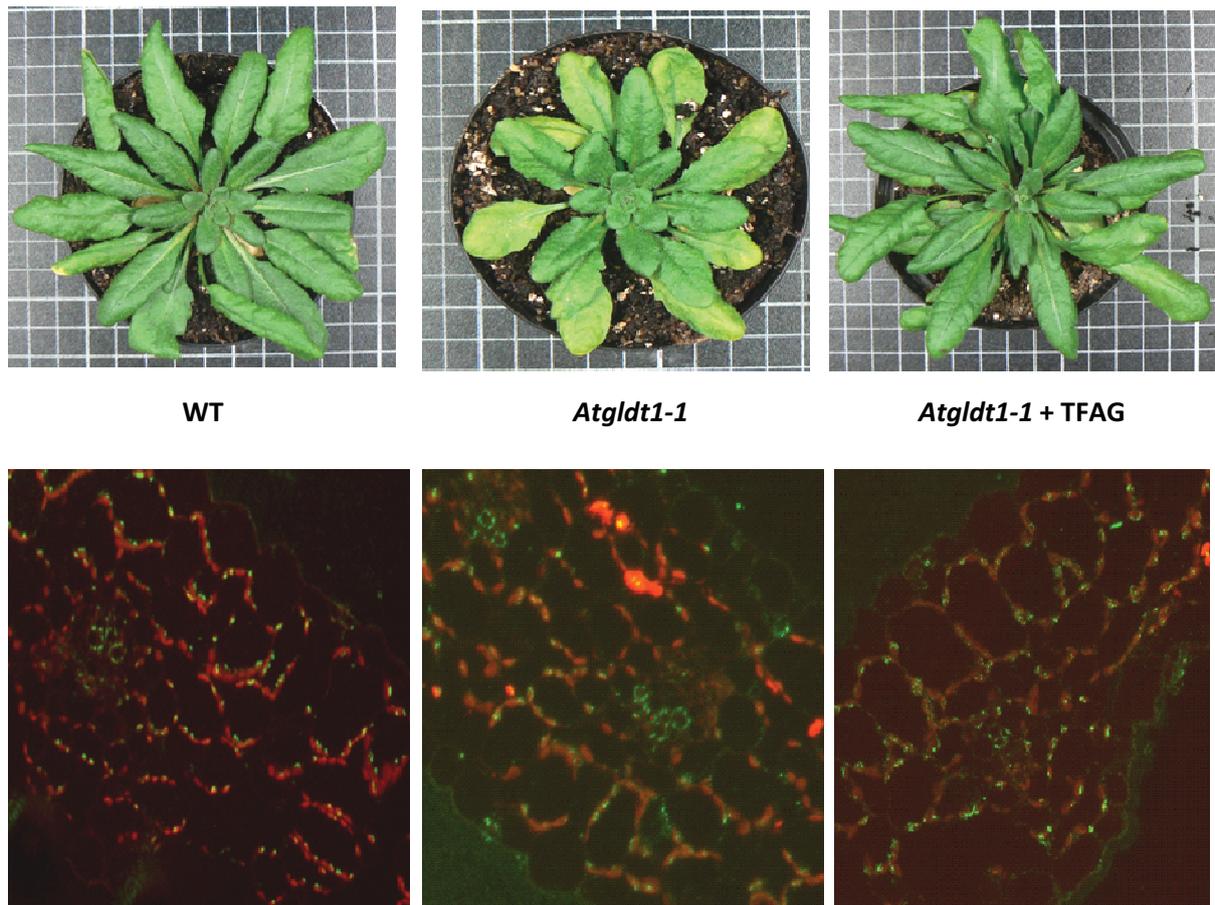


Abb. 21 Erscheinungsbild und Immunofluoreszenz der T-Protein-Mutante (*Atgldt1-1*) und der komplementierte Mutante (*Atgldt1-1* + TFAG) im Vergleich zum Wildtyp (WT). Obere Reihe: Die Mutante *Atgldt1-1* zeigt einen photorespiratorischen Phänotyp mit der typischen Gelbfärbung der älteren Blätter. Die komplementierte Mutante (*Atgldt1-1* + TFAG) ist visuell nicht vom WT zu unterscheiden. Alle Pflanzen sind 10 Wochen alt und wurden unter ambienten Bedingungen (12 h/ 12 h Licht/Dunkel) kultiviert. Untere Reihe: Immunofluoreszenz gegen das T-Protein. Ungefähr 3 - 5 μm dicke Blattquerschnitte von 10 Wochen alten Pflanzen wurden mit einem spezifischen T-Protein-Antikörper aus Erbse markiert. Die sekundäre Markierung erfolgte mit AlexaFluor 488. Rotfärbung entspricht der Autofluoreszenz der Chloroplasten. Grüne Signale zeigen das T-Protein. Die Immunofluoreszenzstudien wurden am MPI in Golm durchgeführt.

Auffällig waren die vergrößerten Chloroplasten sowohl im Mesophyll und den leitbündelnahen Zellen der transgenen Linie *Atgldt1-1* + TFAG im Vergleich zum Wildtyp, so dass die Oberflächeninhalte der Chloroplasten ermittelt wurden. Dazu wurden Länge und Breite der Chloroplasten ($n=15$) vermessen und die Flächeninhalte errechnet. In der Abb. 22 sind die Flächeninhalte der Chloroplasten von den Mutanten *Atgldt1-1*, *Atgldt1-1* + TFAG im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Es besteht eindeutig eine Korrelation zwischen den T-Protein-Gehalten und der Größe der Chloroplasten. Dieses Ergebnis

deutet daraufhin, dass die GDC-Aktivität und somit auch der photorespiratorische Umsatz im Zusammenhang mit der Chlorophyllsynthese und Größe der Chloroplasten steht.

Surface Area of Chloroplasts

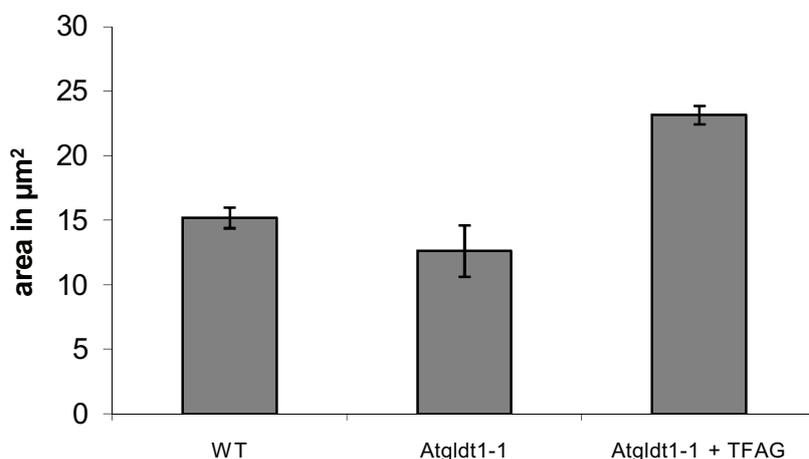


Abb. 22 Die Oberflächeninhalte der Chloroplasten von Mesophyll- und leitbündelnahen Zellen in Wildtyp (WT), *Atgldt1-1* und *Atgldt1-1* + TFAG. Die Ausmessung der Länge und Breite der Chloroplasten (n = 15) erfolgte an 3 - 5 µm Blattquerschnitten, die in Technovit 8100 eingebettet wurden. Für dieses Experiment wurden zehn Wochen alte Blätter in der Mitte der Lichtperiode geerntet.

4.2.3. Komplementation der P-Protein-Nullmutante

Für die Komplementation der P-Protein-Nullmutante wurde der FaGLDP₄₅₀₀-Promotor (Primer: FaGLDP-Pro-EcoRV-S und FaGLDP-Pro-BamHI-A) mit der *F. anomala* P-Protein cDNA (FaGLDP-cDNA) fusioniert, die durch RT-PCR mit den Primern FaGLDP-cDNA-BamHI-S und FaGLDP-cDNA-SacI-A amplifiziert wurde (Abb. 23). Das Konstrukt wurde in den binären Vektor pGreen0179 kloniert. Zur Transformation konnte auf Grund der Letalität im Kotyledonenstadium nicht direkt die P-Protein-Nullmutante verwendet werden. Stattdessen wurde die *Atgldp1-1* x *Atgldp2-2* Vorläufermutante genutzt, die homozygot für die T-DNA in *Atgldp1-1* und heterozygot in *Atgldp2-2* ist (Engel *et al.*, 2007). Die Samen der F₂-Generation wurden auf MS-Medium ausgesät, keimten und wuchsen in 0,9 % CO₂ angereicherter Luft. In sechs von ungefähr 100 untersuchten Pflanzen wurde das FaGLDP-Konstrukt (FaGLDP::FaGLDP-cDNA) nachgewiesen, die homozygot für die T-DNA in *Atgldp1-1* und heterozygot in *Atgldp2-2* waren. Die Pflanzen der F₂-Generation wurden geselbstet. Die Pflanzen der F₃-Generation wurden ebenfalls auf MS-Medium in 0,9 % CO₂ angezogen.

4.2.4. Charakterisierung der komplementierten Mutante P*

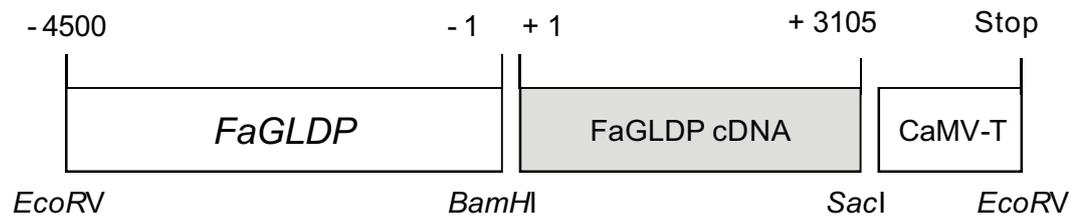
4.2.4.1. Phänotypische Charakterisierung

In der F3-Generation wurden zwei verschiedene Pflanzentypen identifiziert: phänotypisch unauffällige ($\frac{3}{4}$ P) zu 95 % und in dem Wachstum verzögerte Pflanzen mit gelblich verfärbten Blättern (P*) zu 5 %. Die kleinen, gelblichen Pflanzen wurden vereinzelt und wuchsen weiterhin auf MS-Medium unter 0,9 % CO₂. Die putativen P*-Pflanzen zeigten im Kotyledonenstadium ein deutlich verändertes Erscheinungsbild, das sich in einem hellen Mesophyll ohne Chlorophyll und grünen Leitbündeln manifestierte (Abb. 23). Da die Chlorophyllsynthese nur in den Leitbündeln und leitbündelnahen Zellen erfolgte, ist zu schlussfolgern, dass die GDC-Aktivität in diesen Zellen durch die Expression des *F. anomala* P-Proteins wiederhergestellt und der letale Effekt einer fehlenden GDC-Komponente kompensiert werden konnte. Während des weiteren Wachstums der P*-Mutante begann das Mesophyllgewebe kontinuierlich mehr Chlorophyll zu synthetisieren. Im Sechsstadium war das Mesophyll bereits gelblich und bis zur Ausbildung der Rosette vollständig grün (Abb. 23). Die komplett entwickelte Rosette zeigt nur noch geringe phänotypische Veränderungen im Gegensatz zu den Wildtyp- und $\frac{3}{4}$ -Pflanzen. Nur die Ränder der älteren Blätter verfärbten sich gelb und wurden chlorotisch.

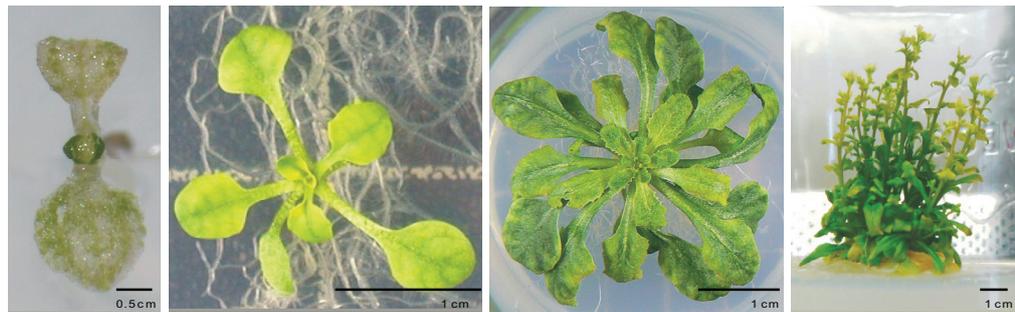
Die P*-Mutante war in der Lage, nach ca. zehn Wochen auf MS-Medium und unter 0,9 % CO₂ Infloreszenzen zu bilden. Die Blüten waren aber morphologisch verändert (Abb. 23). Besonders die Fruchtblatt- und Staubblätter sowie die Petalen waren stark verformt. Das Fruchtblatt ist weißlich verfärbt, das Filament der Staubblätter verdreht, und die Antheren sind wesentlich kleiner und dunkel verfärbt. Die Konsequenz der anormalen Blütenformation ist die fehlende Samen- und Schotenbildung und somit die Sterilität der P*-Mutante. Die Wachstumsretardierung und die fehlende Chlorophyllsynthese im Kotyledonenstadium sowie die veränderte Blütenentwicklung und Sterilität belegen, dass die P-Protein Aktivität in P* nicht ausreicht, um die wildtypische Stoffwechselsituation wiederherzustellen.

Dies könnte daran liegen, dass insbesondere in den Kotyledonen und während der Blütenentwicklung große Mengen an Folatderivaten benötigt werden, die in P* während dieser Entwicklungsphasen unzureichend vorliegen, da die GDC-Aktivität und somit die Methylen-THF-Produktion limitiert ist (Jabrin *et al.*, 2003; siehe Abb. 2).

A



B



C

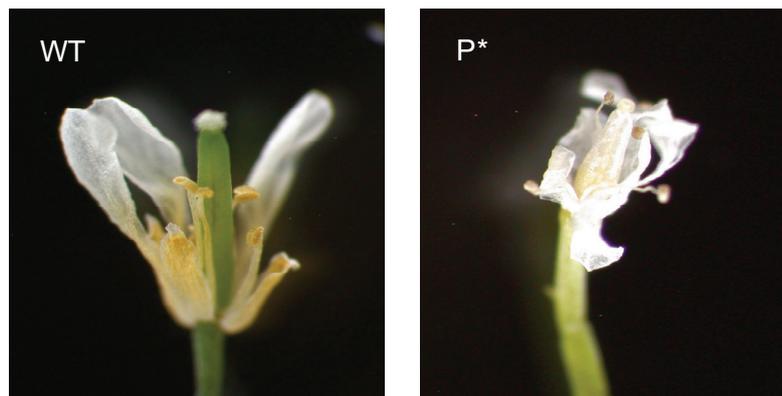


Abb. 23 Schematische Darstellung des Konstrukts zur Komplementation der P-Protein-Nullmutante (FaGLDP::FaGLDP-cDNA) und das Erscheinungsbild der komplementierten Mutante P*. A: Schematische Struktur des Plasmids FaGLDP::FaGLDPcDNA. B: Das Erscheinungsbild der P*-Mutante während verschiedener Entwicklungsstufen. Links: Kotyledonenstadium, Mitte-Links: Sechs-Blatt-Stadium, Mitte-Rechts: vollständig ausgebildete Rosette, Rechts: Ausbildung der Infloreszenzen. C: Morphologische Veränderungen der Blüte der P*-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp (WT). Links: Normal aussehende WT-Blüte, Rechts: retardierte P*-Blüte.

4.2.4.2. Genotypische Charakterisierung

Durch PCR-Analysen wurde das Fehlen des intakten Gens von *Atgldp1* und *Atgldp2* sowie deren Transkripte in der P*-Mutante nachgewiesen (Abb. 24). Das *F. anomala* P-Protein-Gen wurde nur in den *F. anomala* DNA-Extrakten nachgewiesen und nicht in den transgenen P*-Pflanzen. Das Komplementationskonstrukt (FaGLDP::FaGLDP-cDNA) wurde ebenfalls mittels PCR detektiert und lag nur mit der entsprechenden Größe in den P*-Mutanten vor, da hier spezifische Bereiche der cDNA amplifiziert wurden. In der *F. anomala* DNA-Extrakten wurde ebenfalls ein Fragment für das FaGLDP-Konstrukt detektiert, das aber wesentlich größer war, da die Primer an die genomischen Bereiche gebunden hatten und somit auch Intronbereiche amplifiziert wurden. Die P*-Mutanten besitzen demnach kein intaktes endogenes *Arabidopsis* P-Protein-Gen mehr. Die Bereitstellung eines P-Proteins kann nur über die Expression des integrierten *F. anomala* P-Protein-Konstrukts erfolgen.

Durch Western Blot-Analysen wurden die blattspezifischen GDC- und SHM-Proteingehalte der P*-Mutante mit denen von wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen (WT), der Vorläufermutante *Atgldp1-1* x *Atgldp2-2* ($\frac{3}{4}$ P) und *Flaveria anomala* (F. a.) verglichen. Im Western Blot mit P*-Extrakten wurde ein deutliches Signal für das P-Protein erhalten, so dass die erfolgreiche Expression des FaGLDP::FaGLDP-cDNA Konstrukts auch auf dieser Ebene bestätigt wurde. Im Gegensatz zu den Gehalten an T-, H- und SHM-Protein waren P-Proteingehalte in den Blättern der transgenen Pflanzen P* und $\frac{3}{4}$ P signifikant reduziert (Abb. 24). Die *F. anomala* Blattextrakten enthielten deutlich mehr T- und H-Proteinmengen und reduzierte SHM-Proteinkonzentrationen im Vergleich zum *Arabidopsis* Wildtyp. Der hohe H-Proteingehalt in *F. anomala* lässt vermuten, dass in dieser C₃-C₄-intermediären Art hohe H-Proteinkonzentrationen für den GDC-Umsatz nötig sind. Schließlich spiegeln die Konzentrationen der GDC-Untereinheiten in *Arabidopsis* und *F. anomala* die verschiedenen Stoffwechselsituationen bezüglich des photorespiratorischen Zyklus in C₃- und C₃-C₄-intermediären Pflanzen wider.

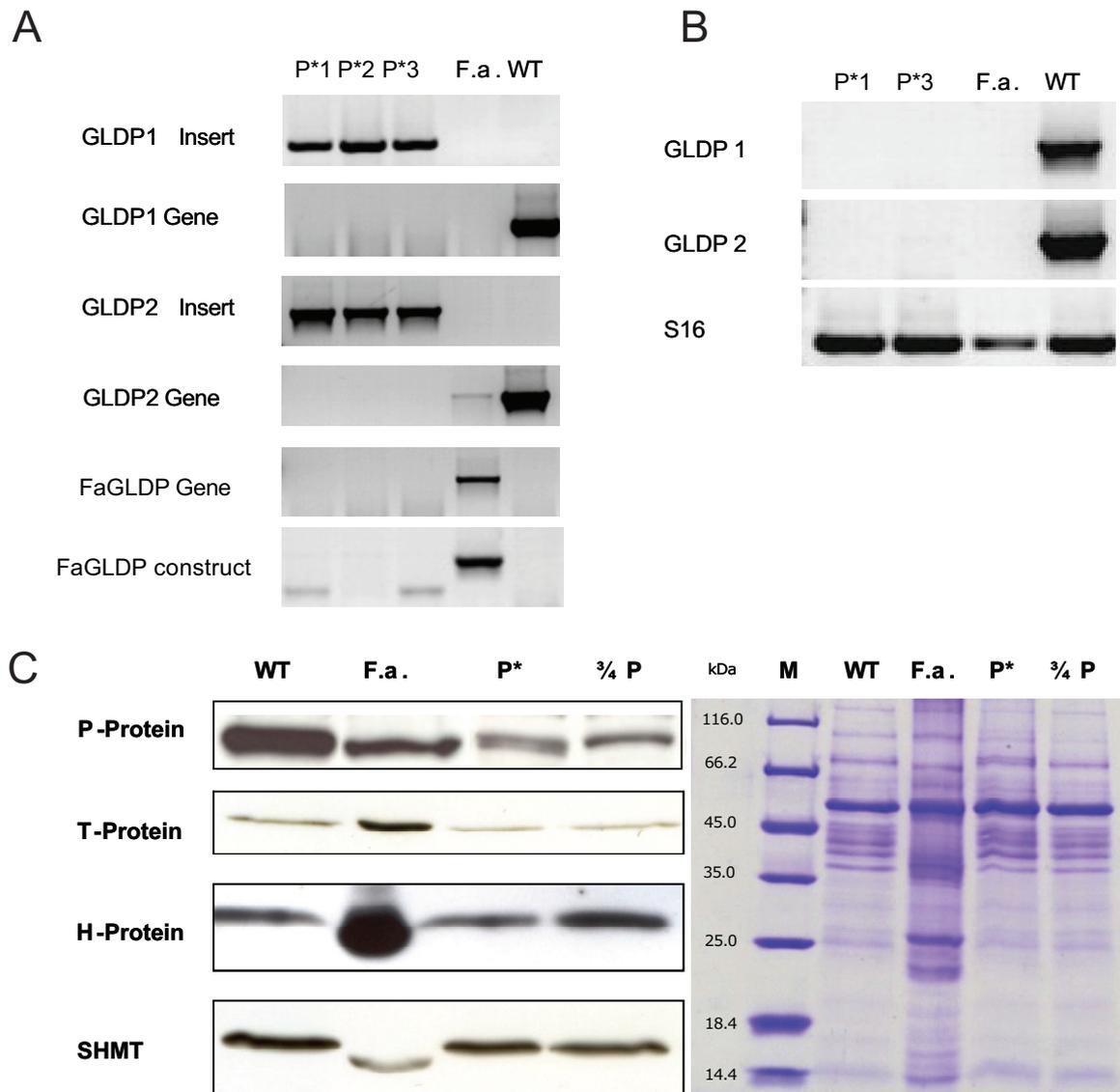


Abb. 24 Genotypische Analysen der komplementierten P*-Mutante. A: PCR mit genomischer DNA von drei unabhängigen P*-Linien (P*1-3), *Flaveria anomala* (F. a.) und Wildtyp (WT). Es konnte kein intaktes AtGLDP1 und AtGLDP2 Gen in den P*-Mutanten nachgewiesen werden. Das FaGLDP-Konstrukt konnte nur in P*1 und P*3 detektiert werden. B: Transkripte der *Arabidopsis* P-Protein Isoformen AtGLDP1 und AtGLDP2 waren in den P*-Mutanten nicht detektierbar. C: Western Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die GDC-Untereinheiten (P-, T- und H-Protein) und das SHM-Protein in Wildtyp (WT), *Flaveria anomala* (F. a.), der P*-Mutante (P*) und der Vorläufermutante (¼ P). Zehn Mikrogramm der löslichen Blattproteinextrakte wurden pro Spur des 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetragen. Der P-Proteingehalt in P* ist signifikant reduziert, die Konzentrationen der anderen GDC-Untereinheiten blieben unverändert.

4.2.4.3. Physiologische Charakterisierung

Um die stoffwechselphysiologische Situation der P*-Mutante zu betrachten, wurden die blattspezifischen Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC bestimmt (Abb. 25). Dafür wurde das 8 bis 10 Wochen alte Blattmaterial der Mutanten (P*, ¾ P) und des korrespondierenden Wildtyp (WT) in der Mitte der Lichtperiode geerntet und die löslichen Aminosäuren nach der Methode 3.2.2.2 extrahiert. Sowohl Wildtyp als auch Mutanten wurden auf MS-Medium unter 0,9 % CO₂ kultiviert.

Die Glycinkonzentration der P*-Mutante ist im Gegensatz zum WT und der ¾ P-Mutante 84fach erhöht. Diese Erhöhung des Glycinspiegels zeigt, dass nicht das gesamte photorespiratorische Glycin durch das *F. anomala* P-Protein decarboxyliert wird. Der Seringehalt in der P*-Mutante ist ebenfalls leicht erhöht. Möglicherweise akkumuliert Serin in den Bündelscheiden, hervorgerufen durch die gesteigerte GDC-Aktivität in diesem Gewebe und gelangt nicht in ausreichendem Maße in das Mesophyll zurück. Prinzipiell wird angenommen, dass der Glycin- und Serintransport in C₃-C₄-intermediären Pflanzen passiv durch einen Konzentrationsgradienten erfolgt. Die erhöhten Seringehalte in den Bündelscheiden der C₃-C₄-intermediären Pflanzen sind daher für die Rückdiffusion in das Mesophyll notwendig, wo das Serin wieder in den photorespiratorischen Zyklus eingehen kann.

Neben Glycin und Serin werden auch weitere Aminosäuren durch die Stoffwechselsituation in P* beeinflusst. Signifikant reduzierte Gehalte der Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Phenylalanin, Aspartat, Histidin und Alanin wurden in den Blattextrakten der P*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp detektiert.

Die erniedrigten Gehalte an Glutamin und Glutamat in der P*-Mutante können darauf zurückgeführt werden, dass weniger NH₃ durch die GDC-Reaktionen produziert wird und somit auch weniger Stickstoff über das GS/GOGAT-System refixiert werden kann. Weiterhin beinhaltet die P*-Mutante reduzierte Mengen an Phenylalanin, Alanin, Histidin und Aspartat. Für die Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin in Pflanzen werden L-Glutamat und L-Aspartat als Aminodonoren benötigt. Zur Synthese von Histidin sind sowohl Glutamat als auch Glutamin essentiell. Alanin wird durch die Reaktion der Alaninaminotransferase katalysiert, die Pyruvat und Glutamat zu Alanin und 2-Oxoglutarat umsetzt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das photorespiratorische NH₃ eine wichtige Stickstoffquelle im pflanzlichen Stoffwechsel darstellt. Eine Limitierung der Aminosäuren Glutamin und Glutamat bewirkt somit auch eine Reduktion des gesamten Aminosäurepools in der P*-Mutante.

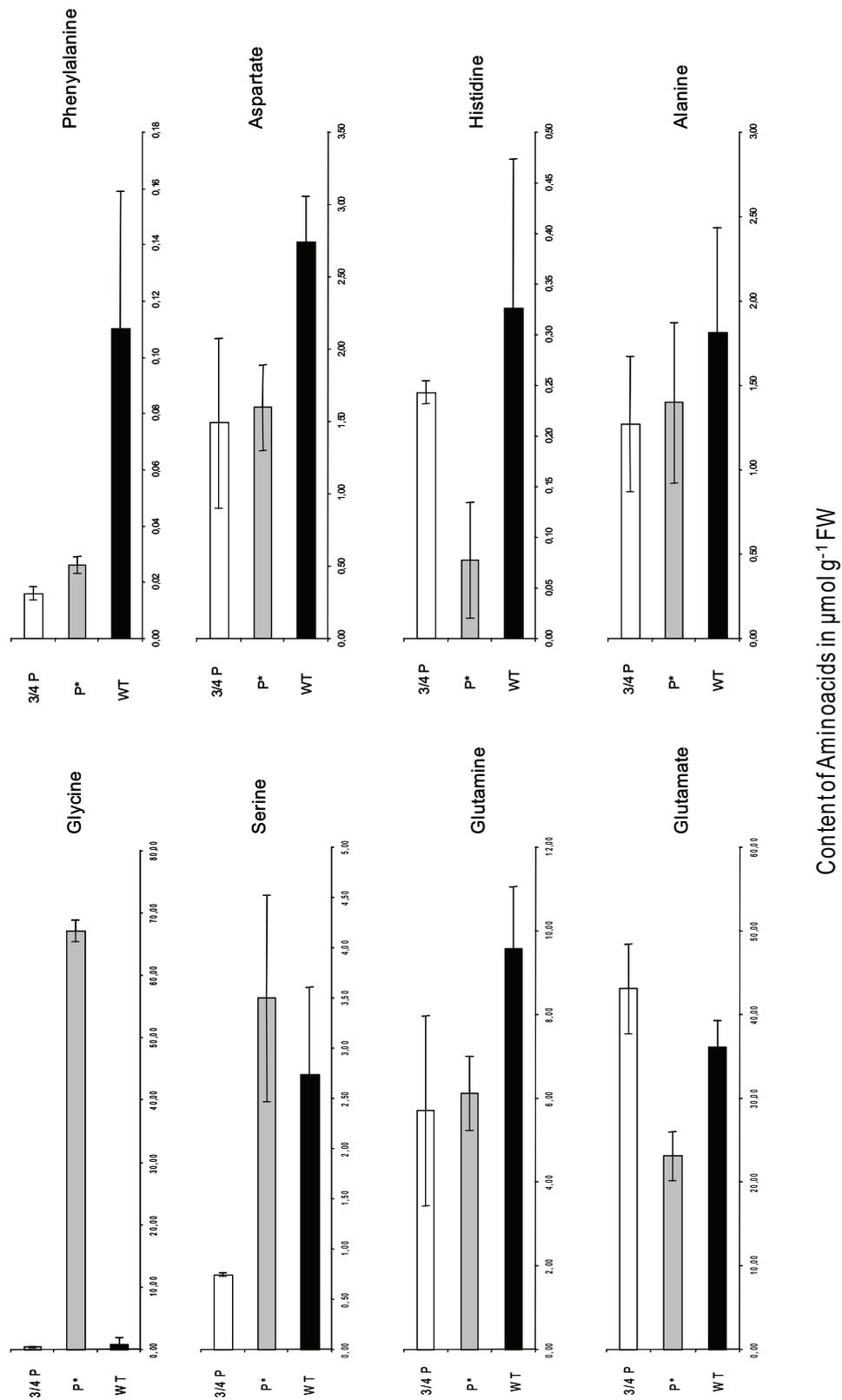


Abb. 25 Ausgewählte Aminosäuregehalte von Blattextrakten der P*- und 3/4 P-Mutanten im Vergleich mit dem korrespondierenden Wildtyp (WT). Die Glycinkonzentration in der P*-Mutante ist signifikant erhöht. Die Glutamat- und Glutamingehalte sind deutlich reduziert in P*.

4.2.4.4. Herstellung eines spezifischen P-Protein-Antikörpers

Um in der P*-Mutante die Verlagerung des P-Proteins aus dem Mesophyll in die leitbündelnahen Zellen von *Arabidopsis thaliana* nachzuweisen, sollte ein spezifischer *F. anomala* P-Protein-Antikörper hergestellt werden. Dazu wurde die cDNA des *F. anomala* P-Protein-Gens in den Überexpressionsvektor pHUE über die Schnittstelle SacI kloniert (PFAG-pHUE-Klon). Die Überexpression und Aufreinigung des *F. anomala* P-Proteins erfolgte nach 3.2.1.9. In der Abb. 26 sind in einer SDS-PAGE die aufgereinigten Elutionen im Vergleich mit einem BSA-Standard dargestellt, um die Proteinmenge der Elutionen abzuschätzen. Die Elutionen wurden lyophilisiert und zur Herstellung des spezifischen P-Protein-Antikörpers an die Firma „Seqlab“ (Göttingen, Deutschland) verschickt. Nach dem Erhalt der Blutungen wurden diese mittels Western Blot auf Blattextrakte von *F. anomala* und *A. thaliana* getestet (Abb. 26). Alle Blutungen zeigten eine spezifische Reaktion mit den pflanzlichen P-Proteinen. Es sind nahezu keine Nebenbanden sichtbar. Somit eignet sich der *F. anomala* P-Protein-Antikörper für Immunlokalisationsstudien.

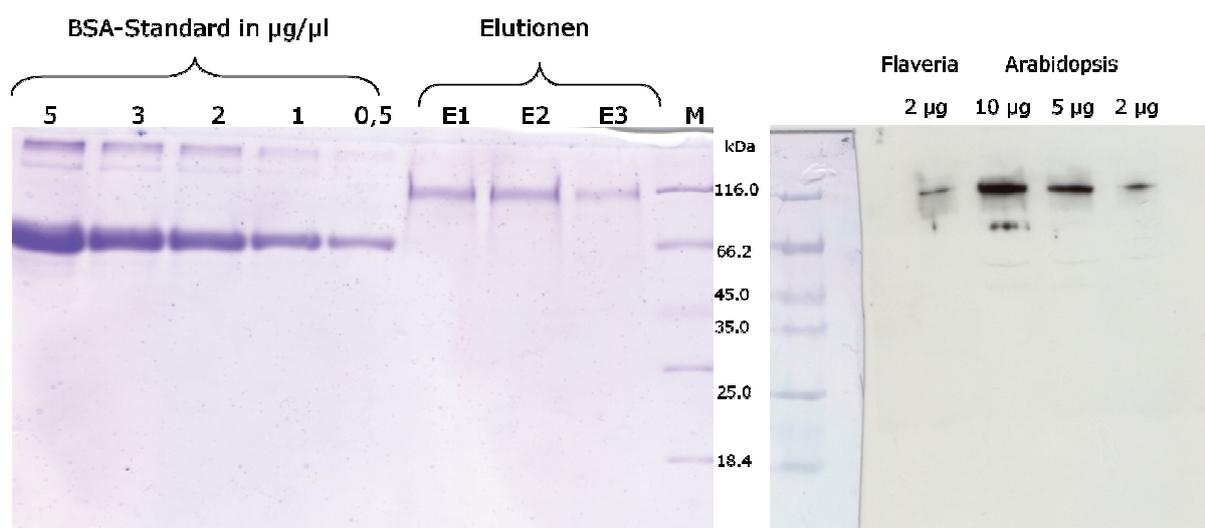


Abb. 26 Links: SDS-PAGE der *F. anomala* P-Protein-Elutionen (E1-E3) nach chromatographischer Aufreinigung über Ni-NTA im Vergleich mit einem selbst generierten BSA-Standard. Rechts: Western Blot zur Detektion der *F. anomala* und *A. thaliana* P-Proteine mit der finalen Blutung des neuen *F. anomala* P-Protein-Antikörpers.

Darüber hinaus wurde auch die P-Protein-Aktivität der gereinigten Elutionen nach der in Hasse et al. (2007) beschriebener Methode bestimmt. Für alle drei Elutionen konnte keine P-Protein-Aktivität nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die *F. anomala* cDNA des PFAG-pHUE-Klons mutiert ist. Daher wurde in einem nächsten Schritt die komplette cDNA sequenziert. Durch die Sequenzierungen des Überexpressionskonstrukts konnte ein Basenaustausch lokalisiert werden, der

in der großen Domäne des β -Stranges lokalisiert ist und somit die Bindung des Pyridoxal-5-Phosphats beeinträchtigt (Abb. 27). Durch den Basenaustausch wurde die Aminosäure an der Position 769 von einem Cystein zu einem Phenylalanin geändert. Die Veränderung der Aminosäuresequenz könnte die ausbleibende P-Protein-Aktivität erklären.

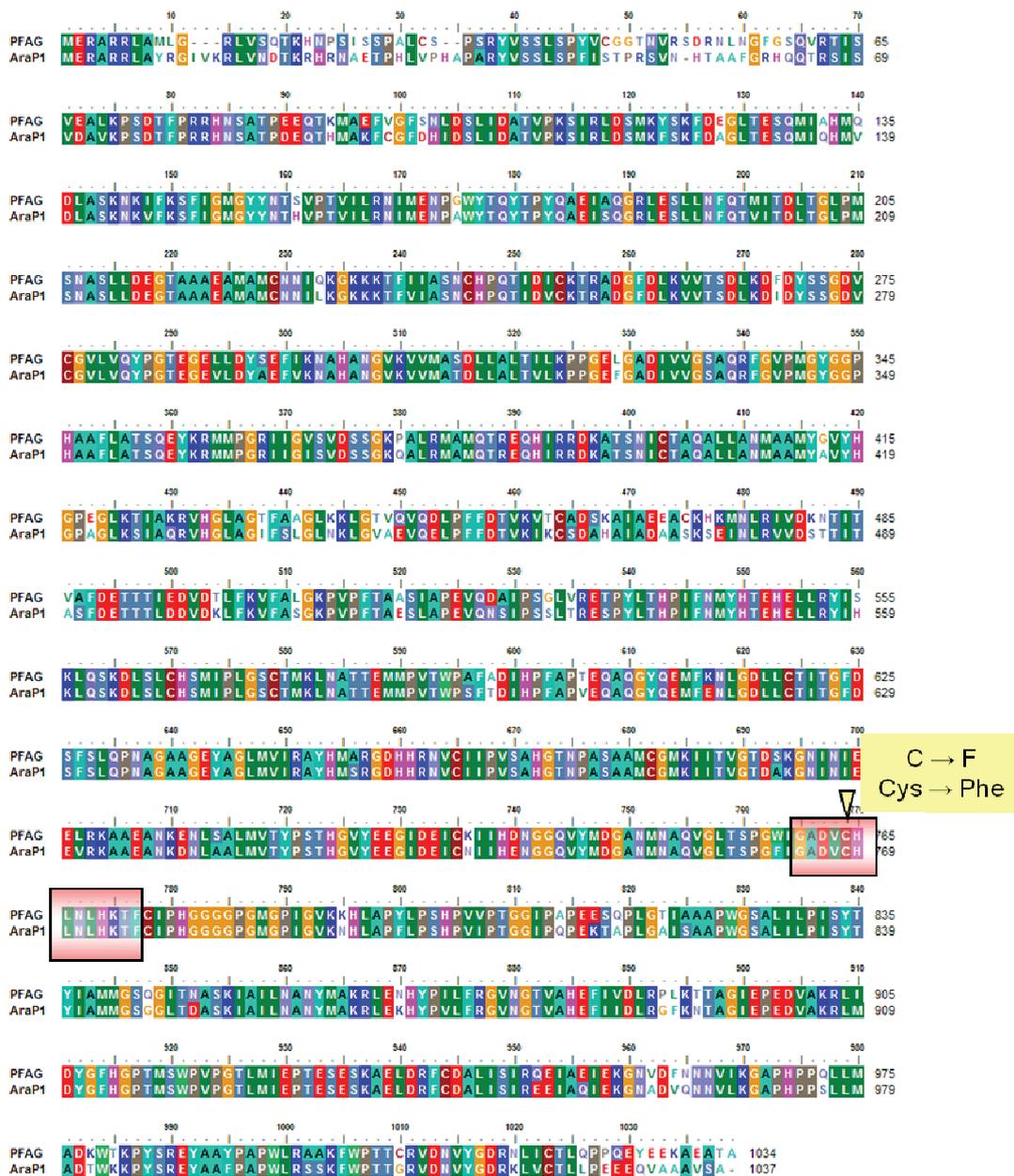


Abb. 27 Sequenzvergleich der Aminosäuren des *F. anomala* P-Proteins (PFAG) und AtGLDP1 (AraP1). Der gelbe Pfeil verweist auf die Mutation im überexprimierten *F. anomala* P-Protein, die zu Veränderung der Aminosäuresequenz vom Cys zum Phe an der Position 769 führt.

4.2.4.5. Immunohistologische Analysen

Die Promotor-GUS-Analysen des *F. anomala* P-Protein-Promotors zeigten eine ausschließliche Blaufärbung in den Leitbündeln und Bündelscheidenzellen von *Arabidopsis* (Abb. 20). Um die Verlagerung des P-Proteins aus dem Mesophyll in die Bündelscheiden *in vivo* nachzuvollziehen, wurden Immunofluoreszenz-Markierungs-Analysen durchgeführt.

Von den eingebetteten Blattstücken von *Flaveria anomala*, *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col0) und der P*-Mutante wurden 3-5 µm dicke Querschnitte angefertigt und in Helllichtaufnahmen deren Intaktheit überprüft (Abb. 28). In dem Querschnitt der C₃-C₄-intermediären Pflanze *Flaveria anomala* sind die Leitbündel von großen Bündelscheidenzellen umgeben, die viele Chloroplasten beinhalten (Abb. 28). Diese Blattanatomie wird als Kranz-ähnlich bezeichnet. Der *Arabidopsis* Blattquerschnitt weist die typische C₃-Anatomie auf. Die Bündelscheidenzellen der *Arabidopsis* WT-Blätter umgeben ebenfalls die Leitbündel, aber beinhalten weniger Chloroplasten und Mitochondrien (Kinsman und Pyke, 1998).

Durch die Markierung des P-Proteins mit einem spezifischen Antikörper gegen FaGLDP und einem sekundären grün-fluoreszierenden Antikörper (AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG) konnten grüne Signale in den *Arabidopsis* und *F. anomala* Querschnitten detektiert werden (Abb. 28). Die grün fluoreszierenden Punkte wiesen eine Größe von 0,5 bis 2 µm auf, die dem typischen Durchmesser von pflanzlichen Mitochondrien entsprechen. In *Arabidopsis* WT-Pflanzen wurden die Signale sowohl im Mesophyll als auch den Bündelscheidenzellen und dem Xylem nachgewiesen. Die Expression des P-Proteins im Xylem, einem nicht photosynthetisch aktivem Gewebe, deutet daraufhin, dass die GDC-Aktivität in diesem Gewebe wichtig für den C₁-Stoffwechsel ist. Die Xylem-spezifische Expression des H- und T-Proteins wurde bereits in Pappel gezeigt (Rajinikanth *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte eine direkte Assoziation der Fluoreszenz des mitochondrialen P-Proteins mit den Chloroplasten detektiert werden. Eine enge räumliche Nachbarschaft von Chloroplasten und Mitochondrien ist essentiell für die Transportprozesse der photorespiratorischen Intermediate.

Die *F. anomala* Querschnitte zeigten eine spezifische Fluoreszenz für das P-Protein in den Bündelscheidenzellen (Abb. 28). Die mitochondrialen Signale in den Bündelscheidenzellen waren vorwiegend zentripetal angeordnet und eng mit den Chloroplasten assoziiert. Allerdings wurden auch P-Protein-Signale im Mesophyll und Xylem erfasst, die in ihrer Intensität und Anzahl geringer waren. Die meisten P-Protein-Signale befanden sich aber in den Bündelscheidenzellen von *F. anomala*, die als grün-fluoreszierender Ring um die Leitbündel zu erkennen waren. Die P-Protein-Signale in den Mesophyllzellen waren diffus und nicht in jeder Zelle sichtbar. Dieses Ergebnis widerspricht den Immuno-Gold-Markierungsexperimenten verschiedener *Flaveria* Arten und

untermauert die Vermutung, dass ein Grundumsatz des GDC in den Pflanzen nötig ist, um dem Stoffwechsel aktive C₁-Einheiten zur Verfügung zu stellen (Hylton *et al.*, 1988; Morgan *et al.*, 1993).

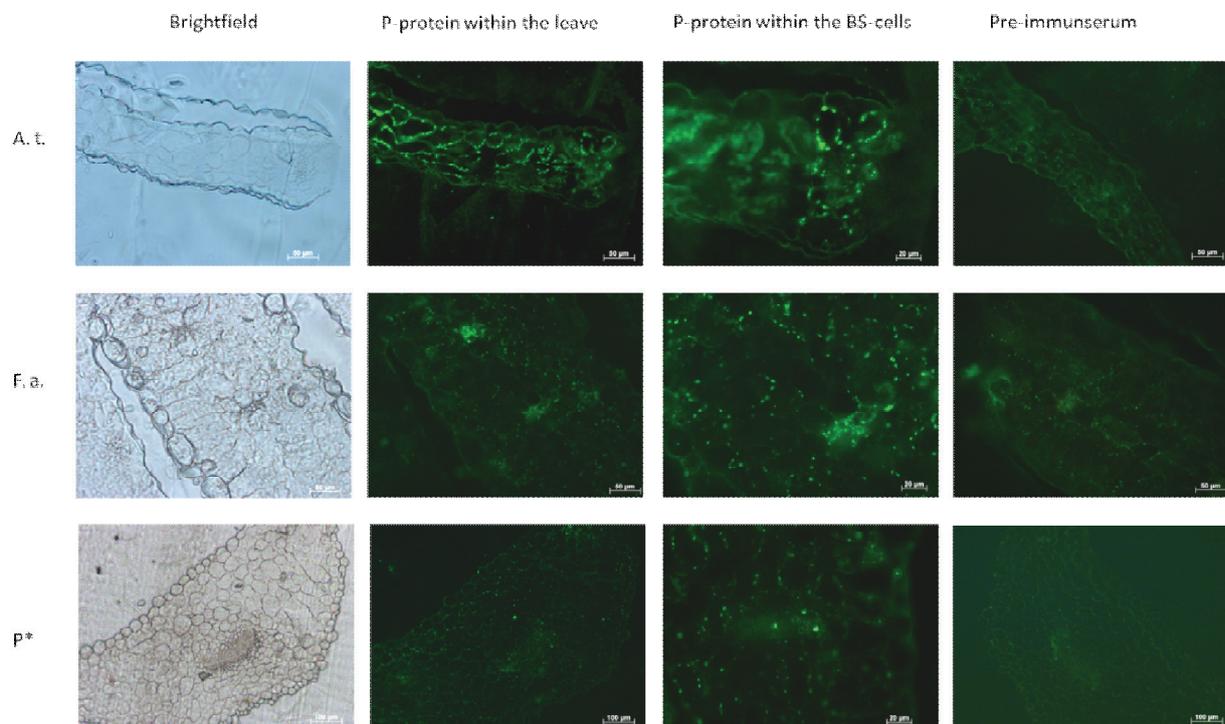


Abb. 28 Die Immunlokalisation des P-Proteins in *Arabidopsis* (*A. t.*) Wildtyp, *Flaveria anomala* (*F. a.*) und in der komplementierten P*-Mutante mit einem primären Antikörper gegen FaGLDP und den sekundären Antikörper AlexaFluor 488. Die Blattquerschnitte sind 3 bis 5 µm dick. Helllichtaufnahmen zeigen die Blattstruktur inkl. der Leitbündel. Die grünen Signale entsprechen dem P-Protein. In *Arabidopsis* wurde die Fluoreszenz im Mesophyll, den Leitbündeln und Bündelscheidenzellen (BS) detektiert. In *F. anomala* ist das P-Protein vorwiegend in den Bündelscheidenzellen sichtbar, aber auch vereinzelt in dem Mesophyll und den Leitbündeln. In der P*-Mutante ist das mitochondriale P-Protein vorrangig in den Bündelscheidenzellen lokalisiert. Vereinzelt Signale sind aber auch im Mesophyll und Xylem nachzuweisen.

In ähnlicher Weise erschienen die Blattquerschnitte der komplementierten P*-Mutante (Abb. 28). Die mitochondrialen P-Protein-Signale wurden primär in den Bündelscheidenzellen detektiert und im geringeren Ausmaß in dem Mesophyll und Xylem. Die Intensität und Quantität der Signale ist aber wesentlich geringer als in den *F. anomala* Schnitten, und auch die zentripetale Ausrichtung der Signale in Bündelscheidenzellen wurde nicht erreicht. Die schwächeren Signale korrespondieren mit dem erheblich geringeren P-Protein-Gehalt in den P*-Pflanzen im Vergleich zu *F. anomala* (Abb. 24). Im Kontrast zu den Promotor-GUS-Studien (Abb. 20) zeigen die immunhistologischen Aufnahmen keine exklusive Lokalisation des P-Proteins in den Leitbündeln und Bündelscheidenzellen der P*-

Mutante. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass der FaGLDP-Promotor in *Arabidopsis* nur eine Präferenz für die Bündelscheiden vermittelt. Eine vergleichende Betrachtung der mitochondrialen P-Protein-Signale in der C₃-Pflanze *Arabidopsis* mit denen in der C₃-C₄-intermediären Pflanze *Flaveria anomala* und der P*-Mutante zeigt, dass eine minimale GDC-Aktivität im Mesophyll anscheinend notwendig ist.

4.3. Komplementation der *Atshm1-1*-Mutante

Die Einzelmutanten *Atshm1-1* und *Atshm2-2* zeigen unterschiedliche Phänotypen beim Wachstum in ambianter Luft. Während die *Atshm1-1* ein typisches photorespiratorisches Erscheinungsbild aufweist, konnten bei der *Atshm2-2*-Mutante keine visuellen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 12). Die Expressionsdaten deuten darauf hin, dass *Atshm2* vorwiegend in den heterotrophen Organen, wie der Wurzel, exprimiert wird und im Gegensatz dazu die Transkripte der *Atshm1* präferenziell in den grünen Geweben synthetisiert werden (Abb. 13). Durch die Herstellung der *Atshm1-1* x *Atshm2-2*-Doppelmutante konnte gezeigt werden, dass beide mitochondrialen AtSHM-Isoformen für das Wachstum benötigt werden. Die Doppelmutante konnte nur unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (0,9 % CO₂, MS-Medium inkl. Saccharose und Vitamine) angezogen werden, zeigte starke Wachstumsretardationen und war nicht in der Lage fertile Samen zu produzieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das AtSHM2-Protein auch in geringen Mengen im Blatt vorhanden ist und teilweise die AtSHM1 ersetzen kann. Außerdem ist es möglich, dass *AtSHM1* und *AtSHM2* spezifische Targeting-Sequenzen besitzen, die eine unterschiedliche Lokalisation der AtSHM-Proteine sowohl im Blatt als auch im Mitochondrium vermitteln. Um diese Vermutungen zu überprüfen, wurde die *Atshm1-1*-Mutante mit einem Chimären-Konstrukt, bestehend aus dem Promotor und der Targeting-Sequenz des *AtSHM1*-Gens und der cDNA für das reife AtSHM2-Protein, komplementiert.

4.3.1. Vergleichende Analyse von AtSHM1 und AtSHM2

In der Arbeit von Voll *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass AtSHM2 nicht die Funktionen von AtSHM1 übernehmen kann. Dieses Ergebnis war überraschend, denn die Genomanalyse verwies auf große Sequenzähnlichkeiten und die mitochondriale Lokalisation der beiden Isoformen. Um abzuschließen, dass AtSHM2 nicht enzymatisch inaktiv im Mitochondrium vorliegt, wurden sowohl die AtSHM1 als auch die AtSHM2 heterolog in *E. coli* überexprimiert. Dazu wurden die cDNAs ohne die

mitochondrialen Transitpeptide in Vektor pCal-n kloniert und die rekombinanten Proteine über das N-terminale Calmodulin-bindende Protein gereinigt. Beide gereinigten Proteine zeigten SHM-Aktivität in *in vitro* Enzymmessungen (Abb. 29).

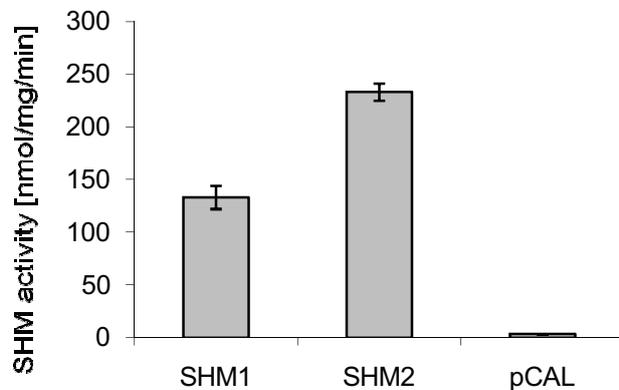


Abb. 29 Bestimmung der SHM-Aktivität von den rekombinanten AtSHM1- und AtSHM2-Proteinen nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Reinigung.

Die geringere Aktivität von AtSHM1 lässt sich auf den geringeren Reinheitsgrad des rekombinanten Proteins im Vergleich zum AtSHM2-Eluat zurückführen. Die gemessene Aktivität bestätigt jedoch, dass es sich bei AtSHM2 um eine enzymatisch aktive Serin-Hydroxymethyltransferase handelt. Demnach muss ein anderer Grund existieren, warum AtSHM2 nicht die *AtshM1-1*-Mutante komplementieren kann. Eine weitere Möglichkeit liegt in den unterschiedlichen Expressionsmustern (Abb. 13). Bereits durch eigene RT-PCR-Analysen, ergänzt durch die Genevestigator Ergebnisse, wurde nachgewiesen, dass die Transkripte von *AtSHM1* vorwiegend in den grünen Organen vorliegen und *AtSHM2* stärker in den heterotrophen Organen, wie der Wurzel, exprimiert wird. Diese verschiedenen Expressionsprofile deuten daraufhin, dass die zwei mitochondrialen AtSHM-Isoformen Unterschiede in ihren Promotorregionen und den Transitpeptidsequenzen aufweisen. Durch die Erstellung von SHM/GFP-Fusions-Konstrukte (35S::SHM1::GFP und 35S::SHM2::GFP) wurde überprüft, ob die Transitpeptidsequenzen der AtSHM-Gene eine mitochondriale Lokalisation vermitteln. Diese Konstrukte wurden mit Hilfe von Partikel-Bombardierungsexperimenten zur transienten Expression des GFP-Fusion-Proteins in Epidermiszellen von *Arabidopsis* verwendet (Abb. 30). Dieser Versuch zeigte, dass die cDNAs von AtSHM1 und AtSHM2 eine GFP-Lokalisation im Mitochondrium vermitteln bzw. eine räumliche Assoziation mit diesem Zellkompartiment in *Arabidopsis* Epidermiszellen (Abb. 30 C - D). Als zytosolische Kontrolle wurde der leere Vektor pCambia1302 eingesetzt (Abb. 30 A). Die mitochondriale Kontrolle ist mit dem mitochondrialen Marker DHODH-DsRed unter der Kontrolle des 35S-Promotors erstellt worden (Abb. 30 B). Die

AtSHM1- und AtSHM2-GFP-Konstrukte führten zu kleinen fluoreszierenden Punkten, die der Größe von Mitochondrien entsprachen. Dieses Experiment bestätigt die Lokalisation der beiden AtSHM-Proteine im Mitochondrium, gibt aber keine Auskunft darüber, ob die Proteine in das Mitochondrium transportiert werden oder nur oberflächenassoziiert vorliegen. Um zu beweisen, ob eine unterschiedliche Lokalisation im Mitochondrium die Ursache für die ausbleibende Komplementation und die verschiedenen Phänotypen von *Atshm1-1* und *Atshm2-2* ist, wurden eine SHM1/2-chimäre Pflanzen generiert.

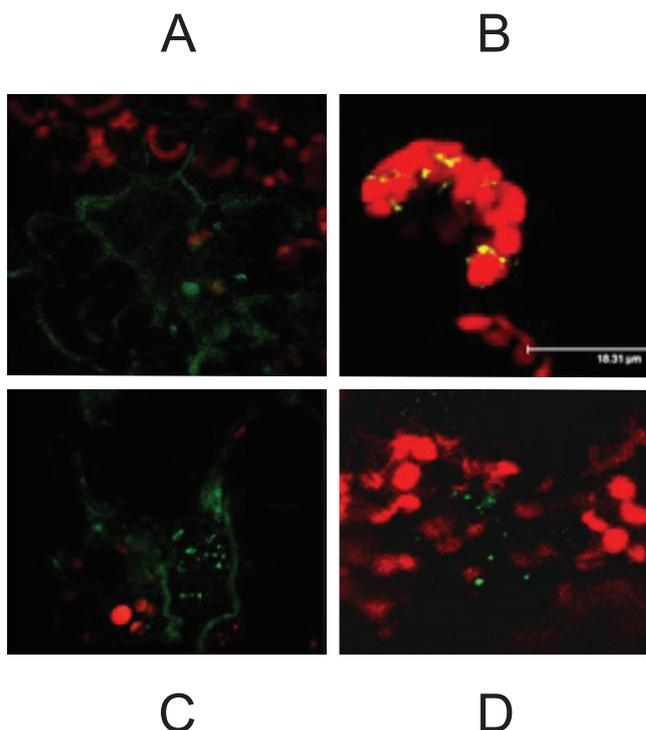


Abb. 30 Mitochondriale Lokalisation von AtSHM1 und AtSHM2 nach der GFP-Fusion mit den jeweiligen Transitpeptid-Sequenzen in Epidermiszellen von *Arabidopsis*. A: Zytosolische Kontrolle mit dem leeren Vektor pCAMBIA1302. B: Mitochondriale Kontrolle mit dem Marker DHODH-DsRed. C: 35S::SHM1::GFP. D: 35S::SHM2::GFP. Durch die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie wurden die grünen GFP-Signale (A, C, D) und die gelben DsRed-Signale (B) zusammen mit der roten Autofluoreszenz der Chloroplasten sichtbar gemacht.

Die mitochondriale Lokalisation wurde durch Immunlokalisationsstudien an Blattquerschnitten von wildtypischen Pflanzen und den Einzelmutanten *Atshm1-1* und *Atshm2-2* verifiziert (Abb. 31). Darüber hinaus wurde durch dieses In-situ-Nachweisverfahren der SHM-Proteine deutlich, dass SHM1 und SHM2 im pflanzlichen Blatt unterschiedlich stark exprimiert und lokalisiert sind. Im wildtypischen Blatt und in *Atshm2-2* wurden grün fluoreszierende Punkte im gesamten Mesophyll und auch in den Leitbündeln detektiert. Hingegen wies die *Atshm1-1*-Mutante nur vereinzelte Signale

im Mesophyll und eine signifikante SHM-Menge in den Leitbündeln, insbesondere im Xylem auf. Dieser Befund korreliert mit den elektronischen Expressionsdaten (Abb. 13). AtSHM1 wird vornehmlich in photosynthetisch-aktivem und AtSHM2 in heterotrophem Gewebe exprimiert.

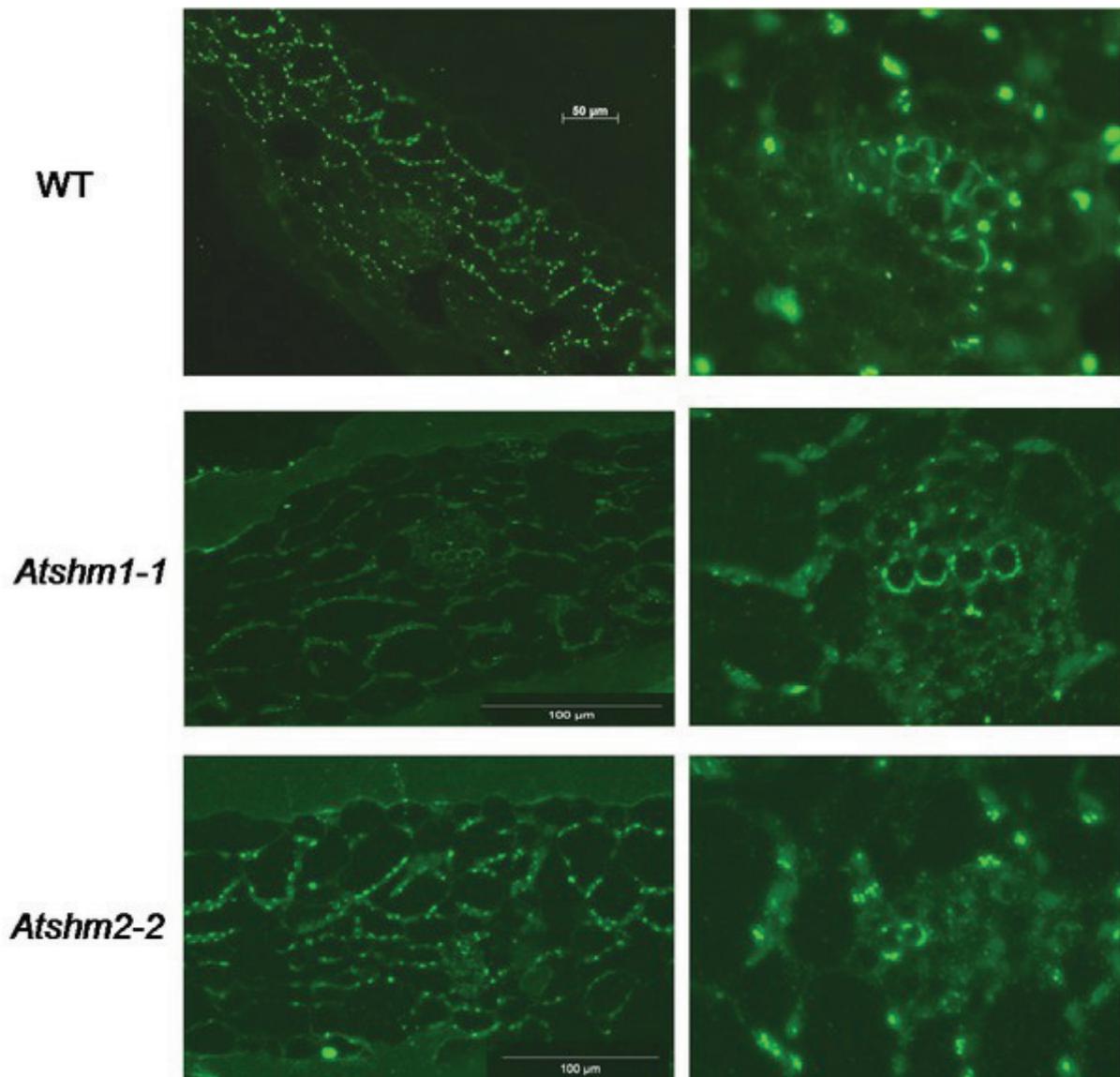


Abb. 31: Immunolocalisationsanalysen der SHM-Proteine in *Arabidopsis* Wildtyp (WT), *Atshm1-1* und *Atshm2-2*. Die Blattquerschnitte (3-5 μm) wurden mit dem primären Antikörper SHM α und dem sekundären, grün fluoreszierenden Antikörper AlexaFluor 488 behandelt. Die grün-fluoreszierenden Punkte zeigen das immunmarkierte SHM-Protein im gesamten Blattquerschnitt (links) und in den vergrößerten Leitbündeln (rechts).

4.3.2. Klonierung der SHM1/2-Chimären-Konstrukte

In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine Komplementation mit der AtSHM2 cDNA in Fusion mit dem 35S- oder nativen *Atshm1*-Promotor den Phänotyp der *Atshm1-1*-Mutante nicht revertieren konnte (Voll *et al.*, 2006). Daher wurde in dieser Arbeit ein Konstrukt generiert, das den nativen *AtSHM1*-Promotor plus die native N-terminale mitochondriale Transitpeptid-Sequenz (mTP) der *AtSHM1* enthielt. Der *AtSHM1*-Promotor inklusive der Targeting-Sequenz wurde in „frame“ mit der *AtSHM2*-cDNA für das reife Protein ohne endogenes Transitpeptid über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* kombiniert (Abb. 32 A). Sowohl der *AtSHM1*-Promotor als auch die *AtSHM2*-cDNA wurden über PCR amplifiziert (Primer für *AtSHM1*-Promotor + mTP: Shm1_promtp_BamHI und Shm1_promtp_EcoRI; *AtSHM2*-cDNA: Shm2_cod_EcoRI und Shm2_cod_XhoI; siehe 3.1.8) und über die angegebenen Schnittstellen in den binären Vektor pGreen0229 kloniert. Das chimäre Konstrukt pGreenII0229Shm1promtpShm2cod wurde in den Agrobakterium Stamm GV3101-pSoup transformiert und mittels „Floral-Dip“-Transformation in die *Atshm1-1*-Mutante integriert.

4.3.3. Charakterisierung der SHM1/2-Chimäre

Die transgenen Pflanzen wuchsen unter 0,9 % CO₂ und wurden mit BASTA selektiert. Der Genotyp wurde mittels PCR analysiert, um nachzuweisen, dass der *Atshm1-1*-Hintergrund und das integrierte Konstrukt vorhanden sind (Abb. 32 C). Durch die Expression des chimären Konstrukts konnte der photorespiratorische Phänotyp der *Atshm1-1*-Mutante vollständig revertiert werden (Abb. 32 B). Im Kontrast zur *Atshm1-1*-Mutante und der 35S-Komplemenande (*Atshm1-1* + 35:SHM2) konnte die SHM1/2-Chimäre in normaler Luft wachsen und wies keine chlorotischen Veränderungen der Blätter auf. Die SHM1/2-Chimäre zeigte in ambienter Luft ein normales Glycin-Serin-Verhältnis von ungefähr 0,20, welches mit dem Glycin-Serin-Verhältnis des Wildtyps von 0,15 zu vergleichen ist. Im Gegensatz dazu akkumuliert die *Atshm1-1*-Mutante in normaler Luft die ca. 150 - 200fachen Mengen an Glycin, so dass das Glycin-Serin-Verhältnis bei ungefähr 15 liegt (Abb. 32 B). Diese Glycinanreicherung ist auf die Unterbrechung der Glycin-Serin-Interkonversion aufgrund der Abwesenheit von AtSHM1 im Mitochondrium zurückzuführen. Der revertierte Phänotyp und das normale Glycin-Serin-Verhältnis beweisen, dass eine funktionelle AtSHM im Mitochondrium der SHM1/2-Chimäre vorliegt und dass eine Komplementation mit dem AtSHM2-Protein nur gelingt, wenn eine Fusion mit dem N-terminalen Transitpeptid der AtSHM1 erfolgt ist. Die funktionelle Komplementation wird zusätzlich durch Gaswechsel- und SHM-Aktivitätsmessungen belegt (Abb. 33). Die Rosettenblätter S1/2-

chimären Pflanzen weisen eine deutlich gesteigerte SHM-Aktivität (Abb. 33 A) und Photosyntheserate (Abb. 33 B) im Vergleich zur Einzelmutante *Atshm1-1* auf.

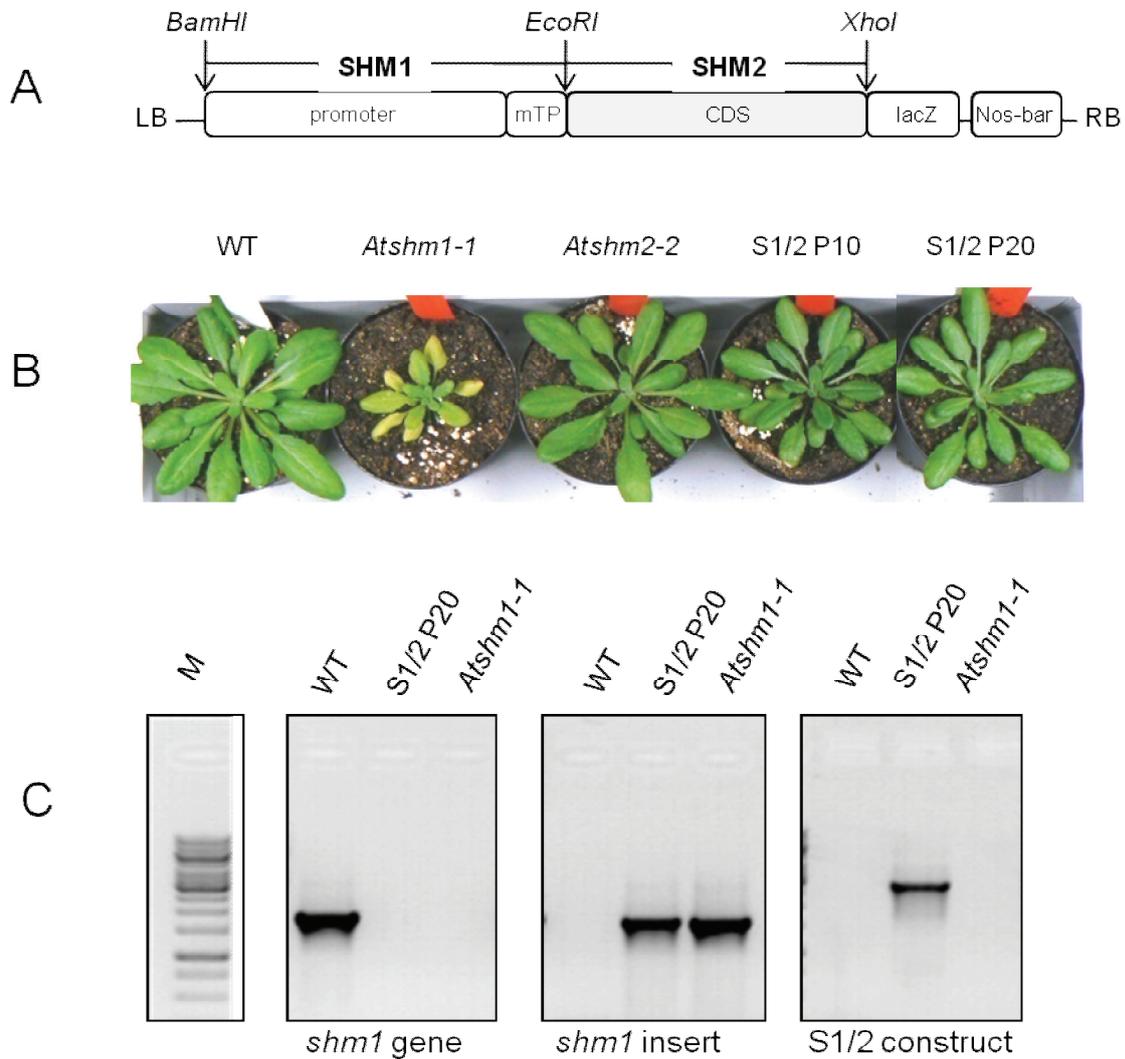


Abb. 32 Phänotyp und Genetik der SHM1-2-Chimären (S1/2) im Vergleich mit dem Wildtyp (WT) und der *Atshm1-1*- bzw. *Atshm2-2*-Mutante. **A:** Schematische Darstellung des SHM1-2-chimären Konstruktes inkl. der Restriktionsschnittstellen. **B:** Erscheinungsbild der acht Wochen alten *Atshm1-1*+SHM1P/T:SHM2 (S1/2) chimären Pflanzen in ambien- ter Luft im Vergleich mit dem WT und den Einzelmutanten. Die Pflanzen wurden sechs Wochen unter 0,2 % CO₂ angezogen und anschließend zwei Wochen in ambien- ter Luft adaptiert. **C:** Die Genotypen von WT, S1/2 und *Atshm1-1* wurden mittels PCR verifiziert. Die S1/2-Chimären und *Atshm1-1* beinhalten im Vergleich zum WT kein intaktes SHM1-Gen. Das chimäre Konstrukt wurde ausschließlich in den S1/2-chimären Pflanzen nachgewiesen.

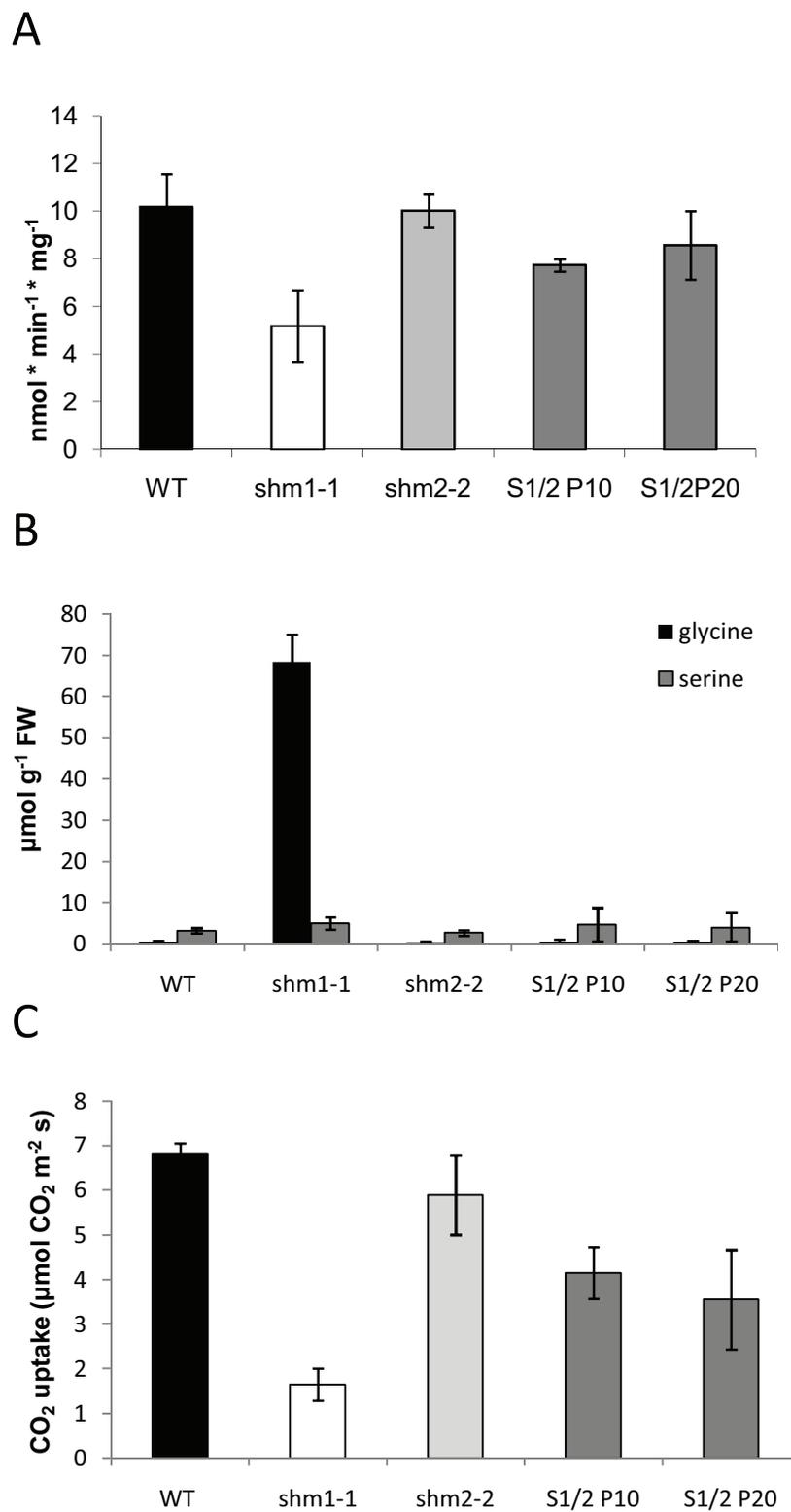


Abb. 33 Darstellung der physiologischen Parameter der S1/2-chimären Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp (WT) und den Einzelmutanten (*Atshm1-1* und *Atshm2-2*). A: SHM-Aktivität von Blattextrakten, die in der Mitte der Lichtperiode geerntet wurden. B: Die Glycin- und Seringehalte der Rosettenblätter verifiziert durch HPLC-Analysen. C: Photosyntheseraten ermittelt durch Gaswechselanalysen.

5. Diskussion

5.1. Die Sonderstellung der GDC- und SHM-Isoformen

Die in den Publikationen und dem Ergebnisteil zusammengefassten Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Knockout der GDC oder mitochondrialen SHM in *Arabidopsis* weiterreichende Folgen hat als das Ausschalten anderer photorespiratorischer Gene. Die GDC-Nullmutanten erreichten unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (0,9 % CO₂) nur das Kotyledonenstadium und starben dann ab. Die SHM-Nullmutante konnte nur auf MS-Medium durch den Zusatz von 1 % Saccharose unter 0,9 % CO₂ angezogen werden. Bei einer Anzucht auf Erde war diese Mutation ebenfalls letal. Die Letalität der P-, T- und SHM-Nullmutanten impliziert, dass diese Enzyme neben dem C₂-Zyklus in andere Stoffwechselprozesse involviert sind. Dabei ist insbesondere eine Verbindung zum C₁-Stoffwechsel anzunehmen. Dadurch besitzen diese photorespiratorischen Enzyme eine Funktion in der Interaktion zwischen dem C₁- und C₂-Stoffwechsel in Pflanzen. Nicht nur die Metabolisierung des photorespiratorischen Glycins wird über den GDC und die SHM realisiert, sondern auch die Produktion von Folatderivaten, die offensichtlich während der Keimlings- und Blütenentwicklung benötigt werden. Darüber hinaus wird durch die Kooperation von GDC und SHM photorespiratorisches CO₂ und NH₃ freigesetzt. Die Refixierung des Stickstoffs (in Form von NH₃) ist dabei essentiell für den pflanzlichen Stickstoffhaushalt (Rachmilevitch *et al.*, 2004), und eine Limitierung der GDC-Aktivität schlägt sich in signifikant reduzierten Konzentrationen vieler Aminosäuren, aber besonders im Glutamin- und Glutamatspiegel, nieder.

5.1.1. Die Reduktion der GDC- oder SHM-Aktivität

Zur Charakterisierung der mitochondrialen GDC- und SHM-Genfamilie wurden sowohl Knockdown- als auch Knockout-Linien in den entsprechenden Genen isoliert oder generiert. Durch die Abstufung der GDC- und SHM-Aktivitäten in den einzelnen Mutanten können die Auswirkungen für den pflanzlichen Stoffwechsel gut analysiert und interpretiert werden.

Transgene Linien mit reduzierten GDC- oder SHM-Gehalten (z. B. *Atgldt1-1* und *Atshm1-1*) zeigten unter ambienten Bedingungen ein im Wachstum verzögertes und chlorotisches Erscheinungsbild, das unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (0,9 % CO₂) wieder revertiert werden konnte. Damit weisen diese Pflanzen den typischen photorespiratorischen Phänotyp auf. Wie erwartet, wurde in diesen Pflanzen unter photorespiratorischen Konditionen eine starke Glycinakkumulation (60-100fach)

beobachtet. Die Stärke der Glycinakkumulation korrelierte mit den reduzierten Chlorophyllgehalten der Blätter. Bereits durch Untersuchungen an Kartoffel P-Protein-Antisenselinien konnte ein Zusammenhang zwischen der Glycinakkumulation und dem Chlorophyllgehalt nachgewiesen werden (Heineke *et al.*, 2001; Antonicelli, 2005). Zumindest für die T-DNA-Insertions-Linie *Atgldt1-1* wurde mittels Chlorophyllbestimmungen gezeigt, dass die Chlorophyllgehalte in der glycinakkumulierenden Mutante deutlich niedriger waren als im korrespondierenden Wildtyp. Eine vergleichende Betrachtung der isolierten Mutanten bezüglich der internen Glycinkonzentration und dessen Erscheinungsbild lassen den Schluss zu, dass die Wachstumsretardationen, Chlorosen und reduzierten Chlorophyllgehalte mit den Glycingehalten korrelieren. Um diesen Befund zu verdeutlichen, sind in der Tabelle 4 die Glycingehalte, die Glycin/Serin-Verhältnisse, das Wachstum der Blattrosette und die Ausprägung der Chlorosen in den Mutanten mit reduzierten GDC- und SHM-Gehalten einander gegenübergestellt. Mit steigendem Glycingehalt vermindert sich das Rosettenwachstum der Mutanten deutlich. Auch die Ausprägung der Chlorosen nimmt mit steigender Glycinkonzentration zu. In der *Atgldt1-1*-Mutante wurden Chlorosen und eine gelbliche Verfärbung ausschließlich in den älteren Rosettenblättern detektiert. Hingegen zeigten die Linien *T-RNAi4* und *Atshm1-1* mit den stärksten Glycinakkumulationen auch Chlorosen in mittleren Blättern. Allerdings wurden in keinem Fall chlorotische Veränderungen in sehr jungen Blättern beobachtet.

Tabelle 4 Vergleichende Betrachtung der internen Glycinkonzentration (C_{Glycin} in $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW), Glycin/Serin-Verhältnis, des Rosettenwachstums und die Ausprägung der Chlorosen (- keine Chlorosen vorhanden; + wenige Chlorose in älteren Blättern; ++ viele Chlorosen, auch in mittleren Blättern der Rosette) in den Mutanten mit reduzierten GDC- oder SHM-Gehalten. Die transgenen Linien keimten und wuchsen zwei Wochen in 0,9 % CO_2 angereicherter Atmosphäre und wurden dann unter ambienten Bedingungen für 10 Tage kultiviert.

Linie	Wildtyp	<i>Atgldp2-2</i>	<i>Atshm2-2</i>	<i>Atgldp1-1</i>	<i>Atgldt1-1</i>	<i>T-RNAi 4</i>	<i>Atshm1-1</i>
C_{Glycin}	$0,46 \pm 0,1$	$0,49 \pm 0,3$	$0,37 \pm 0,2$	$0,75 \pm 0,1$	$32,89 \pm 2,8$	$40,34 \pm 2,6$	$68,39 \pm 6,7$
Glycin/Serin	~ 0,147	~ 0,281	~ 0,725	~ 0,344	~ 5,091	~ 11,512	~ 13,835
Wachstum	100%	100%	100%	96%	75%	60%	20%
Chlorosen	-	-	-	-	+	++	++

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die GDC- und SHM-Aktivitäten in den jüngeren Blättern und somit schnell wachsendem autotrophen Gewebe wesentlich höher sind, als in den älteren Blättern. Bereits durch Untersuchungen an P-Protein-Antisense-Linien wurde eine reduzierte GDC-Aktivität in älteren Blättern nachgewiesen (Antonicelli, 2005). Es kann also vermutet werden, dass die Expression zumindest des P-Proteins nicht nur lichtinduziert ist, sondern auch in Abhängigkeit

von dem Blattalter reguliert wird. Auch durch Promotoranalysen der *F. anomala* GDC-Gene konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des P-Protein-Promotors mit dem Blattalter abnimmt (Chu, 1996). Unter der Voraussetzung, dass sich diese Regulationsmechanismen auf die anderen GDC-Gene übertragen lassen, könnte man den typischen chlorotischen Phänotyp der GDC- und SHM-Mutanten erklären. Denn die hohe GDC-Aktivität in jungen Geweben verhindert eine starke und damit toxisch wirkende Glycinakkumulation, so dass die jungen Blätter grün erscheinen. Selbst eine Reduktion der GDC- oder SHM-Aktivität um bis zu 90 %, wie in der *Atshm1-1*-Mutante, ist unzureichend um den photorespiratorischen Fluss in jungen Blättern zu unterbrechen. Da auch in jüngeren Blättern Glycin in der Lichtphase akkumuliert, kann man davon ausgehen, dass zum einem keine toxischen Konzentrationen erreicht werden und zum anderen das photorespiratorische Glycin in ausreichendem Maße in der Dunkelphase abgebaut werden kann. Eine reduzierte Expression der GDC- bzw. SHM-Isoformen in älteren Blättern führt dann zu einem noch stärkeren Anstau von Glycin. Dieses Glycin und wahrscheinlich weitere photorespiratorische Intermediate, wie z. B. Glyoxylat oder Glykolat, werden nur unzureichend verstoffwechselt und überschreiten die Toxizitätsgrenze, so dass die älteren Blätter vergilben und schließlich absterben. Die inhibitorische Wirkung von 2-Phosphoglykolat auf Enzyme, wie Rubisco oder die Triosephosphat-Isomerase, wurde bereits nachgewiesen (Husic *et al.*, 1987; Norman und Colman, 1991). Ob die Glycintoxizität die alleinige Ursache für das Erscheinungsbild der Mutanten ist, kann allerdings nicht beantwortet werden. Für Cyanobakterien wurde bereits nachgewiesen, dass intrazelluläres Glycin toxisch wirkt, indem es bivalente Kationen wie Mg^{2+} chelatiert, die für die Chlorophyllsynthese unerlässlich sind (Eisenhut *et al.*, 2007). Versuche, die *Arabidopsis* GDC- und SHM-Mutanten mit externem Magnesium zu komplementieren, waren nicht erfolgreich. Dennoch ist vorstellbar, dass ähnliche Komplexierungsmechanismen in den Pflanzen stattfinden und somit auch weitere Prozesse beeinträchtigt werden, wie z. B. die Mg-abhängige Chlorophyllsynthese. Daher kann man postulieren, dass die Glycinakkumulation die Chlorophyllsynthese negativ beeinflusst. Somit lassen sich auch die geringeren Chlorophyllgehalte der *Atgldt1-1*-Mutante erklären. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, beeinflusst eine Reduktion der GDC- oder SHM-Aktivität auch den C_1 -Stoffwechsel der Pflanze, der durch die Bereitstellung von Methylgruppen ebenfalls wichtig für die Chlorophyllsynthese ist. Inwiefern die verringerten Chlorophyllgehalte von dem verminderten C_1 -Stoffwechsel oder der intrazellulären Glycinkonzentration abhängig sind oder indirekte Effekte einer Blattschädigung darstellen, konnte aber nicht endgültig geklärt werden.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der photorespiratorische Umsatz an die photosynthetische Leistung der Pflanzen gekoppelt ist. Denn ein verminderter photorespiratorischer Fluss, z. B. hervorgerufen durch eine erniedrigte GDC-Aktivität, korreliert mit einer Reduktion der CO_2 -

Assimilationsraten, die durch Gaswechsellmessungen bestimmt wurden und sich letztlich durch eine Reduktion der Kohlenhydratsynthese auszeichnet (Antonicelli, 2005; Engel *et al.*, 2007; Timm *et al.*, 2008). Somit kann man feststellen, dass die Regeneration von 3PGA durch den pflanzlichen C₂-Zyklus bedeutsam für den Durchsatz im Calvin-Zyklus ist und beide Zyklen einander bedingen. Eine Limitierung des photorespiratorischen Flusses durch die Reduktion der GDC- oder SHM-Aktivitäten bewirkt einen ansteigenden Mangel an 3PGA im Calvin-Zyklus und nachfolgend eine geringere Saccharose- und Stärkesynthese in den transgenen Pflanzen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die hohen Glycinmengen im Blatt anscheinend nicht durch andere Stoffwechselprozesse verarbeitet werden können, so dass der Glycinabbau über die GDC und mitochondrialen SHM-Isoformen den wichtigsten Weg der Glycindetoxifizierung darstellt.

5.1.2. GDC- und SHM-Nullmutanten sind unter Hoch-CO₂ nicht lebensfähig

Die Mutanten *Atshm1-1* und *Atgldt1-1* zeigen einen typischen photorespiratorischen Phänotyp. Allerdings ist in diesen Mutanten die SHM- bzw. GDC-Aktivität nicht vollständig gehemmt. Durch die Generierung von Doppelmutanten (*Atshm1-1* x *Atshm2-2*; *Atgldp1-1* x *Atgldp2-2*) wurden GDC- und SHM-Nullmutanten erzeugt. Im Gegensatz zu den Mutanten mit reduziertem GDC- oder SHM-Gehalt sind die GDC- und SHM-Nullmutanten bei einer Anzucht auf Erde sowohl in ambienter als auch in CO₂-angereicherter Luft (0,9 % CO₂) über das Kotyledonenstadium hinaus nicht überlebensfähig. Die Letalität in diesem frühen Entwicklungsstadium unterscheidet diese Nullmutanten von allen anderen untersuchten photorespiratorischen Mutanten. Zum Beispiel sind die Mutanten, in denen die 2-Phosphoglykolat-Phosphatase (Schwarte *et al.*, 2007) oder die Glycerat-Kinase (Boldt *et al.*, 2005) durch T-DNA-Insertionen ausgeschaltet wurden, unter Standardbedingungen nicht lebensfähig, aber unter erhöhten CO₂-Konzentrationen vital. Dieser photorespiratorische Phänotyp trifft nicht auf die Mutanten ohne endogene mitochondriale GDC- oder SHM-Aktivität zu. Daher können GDC- oder SHM-defiziente Mutanten nicht durch eine konventionelle Hoch-CO₂/Niedrig-CO₂-Selektion isoliert werden, wie es früher für *Arabidopsis*- und andere photorespiratorische Mutanten beschrieben wurde (Blackwell *et al.*, 1988; Somerville, 2001). Weiterhin kann man spekulieren, dass alle vitalen GDC-defizienten Mutanten, von denen früher berichtet wurde, noch eine Restaktivität der GDC bzw. SHM aufweisen.

Dieses Ergebnis beweist, dass es sich bei den GDC- und SHM-Nullmutanten nicht um ausschließliche photorespiratorische Mutanten handelt.

Die Letalität dieser Nullmutanten lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen. Zum einem wirken die hohen Glycinkonzentrationen toxisch auf den pflanzlichen Stoffwechsel, da hohe

Glycinmengen, z. B. freie Magnesiumionen, komplexieren können. Zum anderen scheint die Einschränkung der Produktion von Methyl-THF, als Quelle aktiver C₁-Einheiten, für die Letalität entscheidend zu sein. Die Glycinakkumulation sollte durch ein Wachstum unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (nicht photorespiratorischen Bedingungen) zu vermeiden sein. Aber weder die Anzucht unter 0,9 % CO₂, noch eine chemische Komplementation mit Mg-Ionen, wie es für eine GDC-defiziente *Synechocystis*-Mutante gezeigt wurde, konnte die Glycingehalte reduzieren und somit den letalen Phänotyp aufheben (Eisenhut *et al.*, 2007). Der Mangel an Methyl-THF sollte durch eine chemische Komplementation mit verschiedenen Zusätzen, wie Formiat, Methionin oder Formaldehyd, kompensiert werden (Engel *et al.*, 2007). Eine Revertierung des Phänotyps bei den Knockdown-Pflanzen bzw. die Verhinderung der Letalität bei den Nullmutanten konnte auf diesem Wege nicht erzielt werden, was in der eventuell unzureichenden Aufnahme- oder Transportkapazität begründet sein könnte.

5.1.2.1. Die Interaktion mit dem C₁-Stoffwechsel

Auch wenn der stoffwechselphysiologische Hintergrund der Letalität noch nicht eindeutig ermittelt werden konnte, so deutet das Absterben der GDC- und SHM-Nullmutanten im Kotyledonenstadium darauf hin, dass besonders der Mangel an C₁-Derivaten ein weiteres Wachstum verhindert. Auch die Transkriptdaten, die der Internetsoftware Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) entnommen wurden, implizieren, dass die GDC- und mitochondrialen SHM-Proteine nicht nur im C₂-Zyklus eine Rolle spielen (Engel *et al.*, 2007; Abb. 13). Sowohl im Keimlingsstadium, in den Kotyledonen als auch in bestimmten Blütenorganen und den Wurzeln wurden signifikante Transkriptmengen der GDC-Untereinheiten und mitochondrialen SHM-Isoformen nachgewiesen. Da diese Pflanzenorgane nicht photosynthetisch aktiv sind, ist eine starke Expression der GDC und mitochondrialen SHM-Isoformen in diesen Organen ein Hinweis für ihre Beteiligung an anderen stoffwechselphysiologischen Prozessen, wie z. B. dem C₁-Stoffwechsel. Unterstützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen des Folatstoffwechsels in Keimlingen und Kotyledonen von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen, die belegen, dass während der Keimlingsentwicklung große Mengen an Folaten benötigt werden und eine Inhibition der *de novo* Synthese von THF die Keimlingsentwicklung blockiert (Jabrin *et al.*, 2003; Collakova *et al.*, 2008). In Keimlingen und meristematischem Gewebe werden große Mengen von Folaten synthetisiert, um den Bedarf für die Nukleotidsynthese und Methylierungsreaktionen sicherzustellen. Ein weiteres Indiz für die Verbindung zwischen GDC und C₁-Stoffwechsel lieferte die Isolation einer 10-Formyl-THF-Deformylase-Nullmutante (*purU*), die eine 70fache Glycinakkumulation aufweist und deren Phänotyp unter nicht photorespiratorischen

Bedingungen revertierbar ist (Collakova *et al.*, 2008). Des Weiteren zeigte diese Mutante auch Veränderungen in der Embryonalentwicklung und war nicht in der Lage, lebensfähige Samen zu produzieren. Daher lassen sich phänotypische Parallelen zu den GDC- und SHM-Nullmutanten ziehen, die ebenfalls in der Keimlingsentwicklung und der Samenreifeung beeinträchtigt sind. Somit bilden die Folatsynthese und folglich auch die GDC- und SHM-Reaktionen die Basis für den Übergang vom heterotrophen zum autotrophen Wachstum und sichern sowohl den photorespiratorischen Durchsatz als auch die Bereitstellung von C₁-Derivaten für viele Biosynthesen, wie die Purin- und Methioninsynthese.

Somit wurde gezeigt, dass sowohl der GDC als auch die mitochondrialen SHM Isoformen nicht nur in den C₂-Zyklus, sondern auch in den C₁-Stoffwechsel involviert sind und dass das gebildete Methylen-THF die Hauptquelle aktiver C₁-Körper im pflanzlichen Mitochondrium darstellt. Die Ergebnisse bestätigen die These von Mouillon *et al.* (1999), dass die mitochondrialen GDC- und SHM-Reaktionen nicht durch andere Stoffwechselprozesse kompensiert werden können. Der Mangel an mitochondrialen Methylen-THF kann nicht durch GDC-unabhängige Stoffwechselwege, wie dem C₁-THF-Synthase-System, ausgeglichen werden (Wingler *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003). Auch die Reaktionen der SHM-Isoformen im Zytosol und Chloroplasten (Umsatz von Serin zu Glycin unter der Bildung von Methylen-THF) können den mitochondrialen C₁-Mangel nicht kompensieren, da anscheinend die Transportprozesse von Methylen-THF ins Mitochondrium limitiert sind.

5.1.2.2. Die Interaktion mit dem N-Metabolismus

Neben der Verbindung zum C₁-Stoffwechsel besteht auch eine direkte Interaktion mit dem pflanzlichen Stickstoffhaushalt. Durch die Reaktionen der GDC werden äquimolare Mengen an CO₂ und NH₃ im Mitochondrium freigesetzt, die durch den Calvin-Zyklus und den „photorespiratorischen Stickstoffzyklus“ reassimiliert werden (Rachmilevitch *et al.*, 2004; Keys, 2006). Da in C₃-Pflanzen die Umsetzung von Glycin zu Serin durch die GDC- und SHM-Reaktionen sehr hohe Raten erreicht, nimmt die Produktion von NH₃ in den Mitochondrien einen großen Stellenwert im pflanzlichen Stickstoffhaushalt ein. Die Reassimilation des photorespiratorischen NH₃ über die Glutaminsynthase und Glutamatsynthase (GS/GOGAT) übersteigt sogar die Raten *der de novo* Stickstoffassimilation nach Stickstoffaufnahme über die Wurzel (Keys *et al.*, 1999; Keys, 2006). Daher war es sinnvoll, auch die Glutamin- und Glutamatgehalte in den GDC- und SHM-Mutanten zu bestimmen (4.1.7). Konzentrationsveränderungen dieser beiden Aminosäuren wurden sowohl in den Einzelmutanten als auch in den Nullmutanten detektiert. Mit Ausnahme der *Atshm1-1*-Mutante waren die Glutamin- und Glutamatkonzentrationen in allen Einzelmutanten mehr oder weniger stark reduziert. Nur in

Atshm1-1 lagen höhere Glutamatmengen im Vergleich zum Wildtyp vor. Die P- und T-Protein-Nullmutanten zeigten keine signifikanten Veränderungen im Glutamatspiegel, aber eine deutliche Erhöhung der Glutamingehalte. Es konnte gezeigt werden, dass Kartoffelpflanzen mit reduziertem P- und SHM-Gehalt eine erhöhte Nitratreduktase-Aktivität aufweisen (Antonicelli, 2005). Dieser Befund impliziert, dass durch den verringerten N-Fluss durch das GS/GOGAT-System ein N-Mangel vorgetäuscht wird, so dass die Nitratassimilation über die Wurzeln der transgenen Pflanzen gesteigert wird. Die erhöhte Stickstoffassimilation über die Wurzel kann den N-Mangel der GDC- und SHM-Einzelmutanten bei einem Wachstum auf Erde unter ambienten Bedingungen nicht kompensieren, so dass die Glutamin- und Glutamatkonzentrationen unterhalb des Wildtyp-Niveaus lagen. Da die Nullmutanten auf MS-Medium wuchsen, konnte mehr Stickstoff über die Wurzel aufgenommen werden, so dass die Glutamingehalte deutlich gesteigert waren. Inwiefern sich der N-Mangel auf den Phänotyp der Mutanten auswirkt, konnte aber nicht analysiert werden. Allerdings zeigten Untersuchungen, dass Kartoffelpflanzen mit reduziertem P- und SHM-Gehalt eine verbessertes Wachstum und weniger Chlorosen bei einer Kultivierung auf MS-Medium mit 10 mM NO_3^- aufwiesen (Antonicelli, 2005). Der Zusammenhang zwischen der mitochondriale GDC- und SHM-Aktivität und dem Kohlenstoff- bzw. Stickstoffkreislauf bedarf noch weiterer Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf die metabolischen Unterschiede im auto- und heterotrophen Gewebe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ersten pflanzlichen GDC- und SHM-Nullmutanten isoliert. Die Letalität dieser Nullmutanten bestätigt die bereits veröffentlichten Thesen, dass die Reaktionen der GDC in Kooperation mit der mitochondrialen SHM neben der Photorespiration an anderen Prozessen beteiligt sind. Eine Reduktion der GDC- oder SHM-Aktivität beeinflusst nachweislich den C_1 -Metabolismus und den N-Haushalt der transgenen Linien. Im nicht-photosynthetisch aktiven Gewebe stellen die mitochondrialen GDC- und SHM-Reaktionen den einzigen Weg des Glycinkatabolismus und somit die Hauptquelle für aktive C_1 -Einheiten dar (Mouillon *et al.*, 1999). Die Eliminierung der GDC- oder mitochondrialen SHM-Aktivität kann nicht durch andere Prozesse kompensiert werden. Die hohen Flussraten über den C_2 -Zyklus und besonders die Glycin-Serin-Interkonversion über den GDC und die SHM erzeugten im Laufe der Evolution von C_3 -Pflanzen eine Beteiligung an anderen Stoffwechselwegen, so dass der photorespiratorische Zyklus nicht separat vom restlichen pflanzlichen Stoffwechsel zu betrachten ist. Für Cyanobakterien konnte bereits eine Kooperation des C_2 -Zyklus mit dem bakteriellen Glycerat-Weg und der Decarboxylierung über Oxalat und Format nachgewiesen werden (Eisenhut *et al.*, 2006 und 2007). Eine Beteiligung des pflanzlichen C_2 -Zyklus an weiteren Stoffwechselwegen ist daher ebenso möglich. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Regulation der Glycingehalte in Pflanzen mit der Biosynthese von Purinen (Zrenner *et al.*, 2006), Glutathion (Kopriva *et al.*, 2004), Glycinbetain (Sakamoto *et al.*, 2002) und anderen methytreichen

sekundären Metaboliten assoziiert ist. Darüber hinaus wurde dem Glycin auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion für die Regulation von intrazellulärem Kalzium zugeschrieben (Dubos *et al.*, 2003). In Zukunft sollte die Rolle der mitochondrialen GDC und SHM für den pflanzlichen Metabolismus und die Signaltransduktion im photosynthetischen und heterotrophen Gewebe näher untersucht werden.

5.1.3. Die Gewebespezifität der GDC- und SHM-Isoformen

Die Phänotypen der Einzelmutanten (Abb. 12), sowie die organ- und gewebespezifischen Expressionsprofile (Abb. 13), deuten auf eine Spezialisierung der mitochondrialen GDC- und SHM-Isoformen im auto- und heterotrophen Gewebe hin. In der Tabelle 5 sind die relativen Transkriptgehalte der GDC- und mitochondrialen SHM-Isoformen in ausgewählten auto- und heterotrophen Geweben dargestellt.

Tabelle 5 Relative Transkriptmengen der mitochondrialen GDC- und SHM-Isoformen in ausgewählten Organen und Geweben. Die relative Expressionsstärke korreliert mit der Anzahl der Kreuze: - keine oder minimale Expression; x geringe Expression; xx mittelstarke Expression; xxx sehr starke Expression.

Gruppen		Autotrophes Gewebe		Heterotrophes Gewebe			
		Blatt	Blüte	Wurzel	Kotyledonen	Xylem	Samen
Gruppe 1	AtGLDP1	xxx	xx	-	xxx	-	-
	AtGLDP2	xx	xx	xx	xx	xx	x
	AtGLDH1	xxx	x	-	xxx	-	-
	AtGLDH3	xxx	x	-	xxx	-	-
	AtSHM1	xxx	xx	-	xxx	-	-
Gruppe 2	AtGLDH2	-	xx	xxx	x	xx	xx
	AtSHM2	x	xx	xxx	x	xx	xx

Mit Ausnahme des T-Proteins, das in *Arabidopsis* nur durch ein Gen kodiert (At1g118600) wird, werden die anderen GDC-Untereinheiten durch mindestens zwei Gene kodiert. Die Redundanz der zwei *Arabidopsis* P-Proteine (AtGLDP1 und AtGLDP2) wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt (Engel

et al., 2007). Dennoch konnte gezeigt werden, dass AtGLDP1 stärker am photorespiratorischen Umsatz beteiligt ist, da die Einzelmutante *Atgldp1-1* unter Hochlicht und somit stark photorespiratorischen Bedingungen höhere Glycinmengen akkumuliert (Engel *et al.*, 2007). Die zweite P-Protein Isoform AtGLDP2 wird mit einer relativ konstanten Expressionsstärke sowohl in den photosynthetisch aktiven als auch heterotrophen Geweben exprimiert und sichert so die P-Protein-Aktivität in nahezu der gesamten Pflanze. Bereits die Expressionsmuster der beiden P-Protein-Isoformen lassen auf eine Tendenz bezüglich der Gewebespezifität schließen. So wird bei genauerer Betrachtung der Expressionsprofile deutlich, dass jeweils eine der GDC- oder SHM-Isoformen verstärkt in den autotrophen oder heterotrophen Geweben exprimiert wird. Demnach lassen sich die mitochondrialen GDC- und SHM-Isoformen in zwei Gruppen einteilen (Tabelle 5). Gruppe 1 beinhaltet die Isoformen, die vornehmlich in den photosynthetisch aktiven Organen, wie Blätter, Stengel und Infloreszenzen, exprimiert werden: AtGLDP1, AtGLDP2, AtGLDT1, AtGLDH1, AtGLDH3 und AtSHM1. In die Gruppe 2 sind die Isoformen einzuordnen, die auch eine starke Expression in heterotrophen Geweben, wie Wurzel, Hypokotyl, Xylem und Samen, zeigen: AtGLDH2 und AtSHM2. Auffällig ist auch die starke Expression der Gene der Gruppe 1 in den Kotyledonen und der Gruppe 2 in den Samen. Demnach ist die Genexpression beider Gruppen für die Keimlingsentwicklung bedeutsam. Diese Erkenntnis gibt einen weiteren Hinweis auf die Letalität der GDC- und SHM-Nullmutanten und liefert auch eine mögliche Erklärung für die Wachstumsretardationen der P*-Mutante im Kotyledonenstadium. Vermutlich muss das verwendete *F. anomala* P-Protein-Gen (PFAG) in die Gruppe 2 eingeordnet werden, so dass die PFAG-Expression im Kotyledonenstadium limitiert ist. Zur Überprüfung der Theorie sollten Expressionsstudien der mitochondrialen GDC- und SHM-Untereinheiten von *F. anomala* durchgeführt werden, denn für *F. anomala* existieren noch keine frei zugänglichen Expressionsprofile. Diese Expressionsstudien sind auch im Hinblick auf die Optimierung der P*-Komplementation nützlich.

Die gewebespezifischen Expressionsmuster verdeutlichen, dass die mitochondriale GDC- oder SHM-Aktivität in photosynthetisch und nicht-photosynthetisch aktiven Geweben für das Wachstum der Pflanze wichtig ist. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen der H- und T-Protein-Genfamilie in Pappel gestützt, in denen eine funktionelle Spezialisierung der Isoformen zum einem für den photorespiratorischen Umsatz in Blättern und zum anderen für den C₁-Stoffwechsel in Wurzeln, Xylem und Lignin-produzierendem Gewebe nachgewiesen wurde (Wang *et al.* 2004, Rajinikanth et al. 2007). Die gewebespezifische Expression der Isoformen beruht auf einer Modifikation der Promotor- und Transitpeptidsequenzen. Die Xylem-spezifischen GDC-Untereinheiten der Pappel weisen eine oder mehrere AC-Elemente in der Promotorregion auf, die typisch für die transkriptionelle Regulation vieler Lignin- und Flavonoid-Synthese-Gene sind (Rajinikanth et al. 2007). Die Promotor-

und Transitpeptidsequenzen der *Arabidopsis* GDC-Untereinheiten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. Aber für die mitochondrialen Isoformen AtSHM1 und AtSHM2 wurden Hinweise gefunden, die auf eine Modifikation des Transitpeptids hinweisen (4.3). Die Komplementationsexperimente von Voll *et al.* (2006) bestätigten, dass AtSHM2 den photorespiratorischen Phänotyp von *Atsh1-1* nicht revertieren kann, obwohl beide Proteine SHM-Aktivität in *in vitro* Messungen zeigen (Abb. 29). Daher wurde ein chimäres Konstrukt generiert, das die AtSHM2-cDNA mit dem endogenen AtSHM1-Promotor und der AtSHM1-Transitpeptidsequenz fusioniert (4.3.2). Die erhaltenen SHM1/2-Chimären zeigen unter ambienten Bedingungen keinen photorespiratorischen Phänotyp. Durch die Isolation und Charakterisierung der SHM1/2-Chimäre und der SHM-Nullmutante konnte bewiesen werden, dass es sich bei AtSHM1 und AtSHM2 um funktionelle Serin-Hydroxymethyltransferasen handelt und die gewebespezifische Expression sowie Funktion durch unterschiedliche Promotoren und Transitpeptide determiniert wird.

Die Expressionsanalysen bestätigen, dass mit Ausnahme von AtGLDT1 in *Arabidopsis* photorespiratorische und nicht-photorespiratorische GDC- und SHM-Isoformen vorhanden sind. Durch phylogenetische Analysen konnten diese gewebespezifischen Isoformen auch in Pappel, Erbse und Reis nachgewiesen werden (Rajinikanth *et al.*, 2007).

5.2. Die Komplementation der GDC-Mutanten

Die Optimierung der photosynthetischen Leistung und die Steigerung der Biomasseproduktion von Kulturpflanzen ist seit geraumer Zeit ein bedeutsames Anliegen vieler Pflanzenphysiologen. Die Übertragung der stoffwechselphysiologischen Vorteile von C_4 - oder C_3 - C_4 -intermediären Pflanzen auf landwirtschaftlich genutzte C_3 -Pflanzen ist eine Möglichkeit, dieses Vorhaben zu realisieren. Denn C_4 - und C_3 - C_4 -intermediären Pflanzen zeichnen sich im Vergleich zu C_3 -Pflanzen durch eine höhere photosynthetische Leistung und Wassernutzungseffizienz bei hohen Temperaturen und Trockenheit aus (Monson und Jaeger, 1991; Sage, 2004). Durch die Verlagerung der GDC-Aktivität in die Bündelscheidenzellen von C_3 - C_4 -intermediären Pflanzen entstand eine primäre CO_2 -Pumpe, die eine höhere CO_2 -Konzentration für Rubisco in den Bündelscheidenchloroplasten erzeugt, sowie eine höhere Reassimilationskapazität für photorespiratorischen CO_2 zur Folge hat und so den Kohlenstoffverlust im Zuge der Photorespiration minimiert. Die Nachbildung dieses CO_2 -Konzentrierungsmechanismus in einer C_3 -Pflanze könnte zum einen die Photosyntheseeffizienz steigern und zum anderen Einblicke in die Evolution der C_4 -Photosynthese ermöglichen. Als evolutionärer Ausgangspunkt der Transition von der C_3 zur C_3 - C_4 -intermediären Photosynthese wurden die Repression der P-Protein-Synthese im Mesophyll und die Steigerung der P-Protein-

Aktivität in den Bündelscheiden vermutet (Morgan *et al.*, 1993; Rawsthorne und Bauwe, 1998; Sage, 2004).

Die Verlagerung der GDC aus dem Mesophyll in die Bündelscheidenzellen von *Arabidopsis* soll einen wesentlichen Schritt der C₄-Evolution nachbilden (Sage, 2004). Dabei sollte eine für C₃-C₄-intermediäre Pflanzen charakteristische Stoffwechselsituation simuliert werden. Diese erste Voraussetzung wurde mit der Erzeugung der P-Protein-Nullmutante (*Atgldp1-1* x *Atgldp2-2*) geschaffen (Engel *et al.*, 2007). Des Weiteren musste die Bündelscheidenspezifische Expression des P-Proteins gewährleistet werden. Dazu wurde ein Konstrukt generiert, das den endogenen *Flaveria anomala* P-Protein-(PFAG)-Promotor in Fusion mit der *F. anomala* P-Protein-cDNA enthielt. Promotor-GUS-Studien des PFAG-Promotors ergaben eine deutliche Blaufärbung in den Leitbündeln, Bündelscheiden und assoziierten Zellen von wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen. Im Mesophyll war keine Blaufärbung und somit keine PFAG-Promotor-Aktivität detektierbar. Mit diesem Komplementationskonstrukt wurde die zweite Voraussetzung geschaffen, um das P-Protein präferenziell in den leitbündelnahen Zellen der P-Protein-Nullmutante zu exprimieren. Die Komplementation der P-Protein-Nullmutante mit diesem Konstrukt resultierte unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (1 % CO₂) und einer Anzucht auf Saccharose-haltigem MS-Medium in einer lebensfähigen transgenen Pflanze (P*). Die P*-Mutante zeigte einen auffälligen Phänotyp. Besonders im Kotyledonenstadium und während der Blütenentwicklung wurden starke metabolische Beeinträchtigungen sichtbar. Die Ausbildung der Chloroplasten erfolgte im Zweiblattstadium der P*-Mutante ausschließlich in der Umgebung der Leitbündel und nicht im Mesophyll. Im Zuge der weiteren Entwicklung wurden Chlorophylle auch im Mesophyll synthetisiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die P-Protein-Aktivität im Kotyledonenstadium limitierend ist. In der vollständig entwickelten P*-Mutante hingegen genügt die verbleibende P-Protein-Aktivität, um keine deutlichen phänotypischen Veränderungen zu detektieren. Erst während der Blütenentwicklung wurden weitere morphologische Besonderheiten sichtbar. Im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp waren insbesondere Frucht- und Staubblätter sowie die Petalen stark verformt und wiesen eine weißliche Verfärbung auf. Aus diesen morphologischen Besonderheiten kann geschlossen werden, dass während der Keimlings- und Blütenentwicklung eine höhere und nicht nur auf die Leitbündel assoziierte P-Protein- und somit auch GDC-Aktivität essentiell für das Wachstum der Pflanzen ist. Diese Vermutung wird auch durch Expressionsstudien untermauert, die hohe P-Protein-Transkriptmengen während dieser Entwicklungsstufen und in den jeweiligen Organen, wie z. B. den Kotyledonen und Sepalen, anzeigen (Abb. 13). Die erzielten Erkenntnisse aus den Untersuchungen der GDC- und SHM-Nullmutanten sowie der P*-Mutante verdeutlichen, dass die

GDC-Aktivität im heterotrophen Gewebe für das Wachstum und den pflanzlichen Stoffwechsel ebenso notwendig ist, wie für den photorespiratorischen Umsatz in autotrophen Organen.

Neben der phäno- und genotypischen Charakterisierung der P*-Mutante wurden auch Immunolokalisationsstudien des P-Proteins durchgeführt. Diese Untersuchungen dienten zum Nachweis der Verlagerung des P-Proteins in die leitbündelnahen Zellen der P*-Mutante. Die Analyse der P*-Mutante zeigte wenige P-Protein-Signale im Mesophyll und eine Anreicherung der Signale in den Bündelscheiden und assoziierten Zellen. Diese Verteilung der P-Protein-Signale war überraschend, denn die Promotor-GUS-Analysen zeigten eine ausschließliche Expression des *F. anomala* P-Proteins in den Leitbündeln und leitbündelnahen Zellen. Daher wurden zum Vergleich auch Immunolokalisationsstudien von *F. anomala* Blattquerschnitten hinzugezogen, die erstaunlicherweise eine gleichartige Verteilung der P-Protein-Signale ergaben. Im Gegensatz zu den Promotor-GUS-Analysen zeichnen sich die Immunolokalisationsstudien (Abb. 28) durch eine höhere Sensitivität aus, die es ermöglicht, geringe Proteingehalte zu detektieren. Für die Erforschung der Transition von der C₃- zur C₄-Photosynthese stellt die Immunolokalisation die Methode der Wahl dar, insbesondere um die Verlagerung einzelner Proteine nachzuweisen.

Meine Ergebnisse zeigen, dass die C₃-C₄-intermediäre Pflanze *F. anomala* keine ausschließliche Expression des P-Proteins in den Bündelscheiden besitzt, sondern auch einen geringen P-Protein-Gehalt im Mesophyll aufweist. Dieses Ergebnis widerspricht den bereits veröffentlichten Immunogold-Lokalisationsstudien, die eine ausschließliche P-Protein-Lokalisation in den Bündelscheiden von *F. anomala* zeigten (Hylton *et al.*, 1988; Morgan *et al.*, 1993). Daher ist davon auszugehen, dass die vollständige Verlagerung des P-Proteins in die Bündelscheidenzellen von *F. anomala* noch nicht abgeschlossen ist. Damit wird die intermediäre Stellung von *F. anomala* untermauert, denn auch Rubisco wurde sowohl im Mesophyll als auch in den Bündelscheiden nachgewiesen (Bauwe, 1984). In weiteren Experimenten sollte geprüft werden, wie sich die Verteilung der anderen GDC-Untereinheiten in *F. anomala* und der P*-Mutante verhält. Ergänzend zu diesen Ansätzen sollten auch Immunolokalisationsstudien von weiteren Flaveria-Arten z. B. *F. pringlei* (C₃) und *F. trinervia* (C₄) durchgeführt werden. Möglicherweise ist eine minimale GDC-Aktivität auch im Mesophyll von C₄-Pflanzen nötig, um die Bereitstellung von C₁-Derivaten für andere Lebensprozesse zu sichern. Vor kurzem wurde für die C₄-Pflanzen *Zea mays*, *Panicum milliaceum* und *Panicum maximum* gezeigt, dass Mesophyll-Mitochondrien von etiolierten Blättern Glycin in geringen Raten oxidieren können und alle GDC-Untereinheiten sowie die SHM in diesen Mitochondrien enthalten sind (Paryz und Jastrzebski, 2007). Darüber hinaus waren die P- und T-Protein-Konzentrationen in den Mitochondrien etiolierter Blätter signifikant höher als in den grünen Blättern von *Z. mays*. Erst in den vollentwickelten Blättern von *Z. mays* wurde kein Glycin mehr in

den Mesophyllzellen oxidiert. Aus den Befunden an *Z. mays* und der P*-Mutante können folgende Vermutungen abgeleitet werden. Zum ersten: sowohl in etiolierten Blättern als auch in Kotyledonen sind höhere GDC-Aktivitäten nötig als in ausgewachsenen, grünen Blättern von C₃- und C₄-Pflanzen. Zum zweiten: in einigen C₃-C₄-intermediären und C₄-Pflanzen sind noch GDC-Untereinheiten, wie z. B. das P- und T-Protein, im Mesophyll vorhanden. Und zum dritten: die GDC oder einzelne Untereinheiten sind noch an anderen Prozessen, wie dem C₁-Stoffwechsel, in dem Mesophyll der Pflanzen beteiligt, um z. B. Folatderivate für die Chlorophyllsynthese oder den Purinstoffwechsel bereitzustellen (Abb. 2).

Eine Verlagerung des P-Proteins in die Bündelscheiden von *Arabidopsis* ist demnach nicht ausreichend, um eine ähnliche Stoffwechselsituation wie der der C₃-C₄-intermediären Pflanze *F. anomala* zu imitieren oder eine primäre CO₂-Pumpe zu etablieren. Die möglichen Ursachen für diese unvollständige Komplementation sind vielfältig. So sind z. B. die anatomischen Voraussetzungen für die Glycin-Serin-Diffusion zwischen Mesophyll und Bündelscheiden in einer C₃-Pflanze möglicherweise nicht gegeben, so dass das photorespiratorische Glycin nicht vollständig in die Bündelscheiden der P*-Mutante gelangt und im Mesophyll toxische Glycinkonzentrationen akkumulieren (Raghavendra, 1980; Dengler 1994; Ehleringer *et al.*, 1997; Sage, 2004). Dies scheint insbesondere während der Keimlingsentwicklung von Bedeutung zu sein, in der hohe Flussraten über den GDC erforderlich sind. Zum anderen genügt die GDC-Aktivität in den leitbündelnahen Zellen der P*-Mutante nicht, um das gesamte photorespiratorische Glycin aus dem Mesophyll zu decarboxylieren. Es besteht die Möglichkeit, dass das *F. anomala* P-Protein mit den endogenen GDC-Untereinheiten der P*-Mutante nicht die gleichen enzymatischen Umsätze erreicht wie der komplette *F. anomala* GDC-Komplex. Bisher ist die heterologe Expression eines enzymatisch aktiven, eukaryotischen P-Proteins nicht gelungen, so dass *in vitro* Aktivitätstests mit dem *Arabidopsis* oder *F. anomala* P-Protein noch nicht durchgeführt werden konnten.

5.2.1. Die Optimierung der P*-Mutante

Mit der P*-Mutante wurde erstmalig eine transgene Pflanze generiert, die stark reduzierte P-Proteingehalte im Mesophyll und erhöhte P-Protein-Konzentrationen in den leitbündelnahen Zellen aufweist. In zukünftigen Experimenten sollte der C₁-Stoffwechsel in der P*-Mutante näher analysiert werden, um die Interaktion zwischen den GDC-Reaktionen und dem Folatmetabolismus aufzudecken. In diesem Zusammenhang könnte auch die Verbindung zur Chlorophyllsynthese aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte versucht werden, die GDC-Aktivität in leitbündelnahen Zellen der P*-Mutante zu steigern.

Letztlich kann die schrittweise Rekonstitution der C₄-Evolution in einer C₃-Pflanze helfen, die anatomischen, genetischen und biochemischen Modifikationen aufzuklären, die für die Verlagerung der Photorespiration in die Bündelscheiden notwendig sind. Die präferenzielle Verlagerung der P-Protein-Aktivität in die Bündelscheiden ist nur einer von vielen Schritten, um die stoffwechselphysiologische Leistung der C₃-C₄-intermediären Pflanzen zu erreichen. Sage (2004) schlägt ein Modell der C₄-Evolution vor, das sich aus sieben Phasen zusammensetzt. Für die Etablierung einer photorespiratorischen Pumpe werden die anatomische Präkonditionierung und die Erhöhung der Bündelscheiden-Organellen vorausgesetzt. Insbesondere die Verringerung der Distanz zwischen Mesophyll und Bündelscheiden ist bedeutsam, um eine schnelle Diffusion der Metabolite zu ermöglichen (Raghavendra, 1980). Da diese Bedingungen in der P*-Mutante nicht geschaffen wurden, ist es wahrscheinlich, dass die Glycindiffusion in die Bündelscheiden limitiert ist. Durch Kinsman und Pyke (1998) wurde gezeigt, dass *Arabidopsis* eine gut ausgebildete Bündelscheide aufweist, deren Chloroplasten 15 % des gesamten Blattes ausmachen. Die Anzahl der Organellen in den Bündelscheiden der P*-Mutante scheint also nicht den limitierenden Faktor darzustellen. Dies wird auch durch den Phänotyp der P*-Mutante bestätigt. Denn die Bündelscheiden- und leitbündelnahen Zellen der P*-Mutante stellen den Ausgangspunkt der Chlorophyllsynthese dar und sichern durch deren photosynthetischen Umsatz das Überleben der P*-Mutante in den frühen Entwicklungsstufen. In Sage (2004) wird auch vermutet, dass durch einen erhöhten photorespiratorischen Umsatz in den Bündelscheiden die Anzahl und Größe der Chloroplasten zunimmt und schließlich zu einer Vergrößerung der Bündelscheidenzellen führen könnte. Dies würde bedeuten, dass erst durch die Verlagerung der GDC-Aktivität sich die typische Kranz-Anatomie ausbilden kann.

Diese Behauptung wird durch ein weiteres Experiment innerhalb dieser Arbeit gestützt. Die *Atgldt1-1*-Mutante wurde mit dem *F. anomala* T-Protein (TFAG) komplementiert und näher charakterisiert (Engel *et al.*, 2008). Mittels Immunolokalisationsstudien gegen das T-Protein konnte die Überexpression des T-Proteins im gesamten Blatt der transgenen Linie (*Atgldt1-1* + TFAG) nachgewiesen werden. Auffällig waren die vergrößerten Chloroplasten sowohl im Mesophyll als auch leitbündelnahen Zellen der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp, so dass die Oberflächeninhalte der Chloroplasten ermittelt wurden. In der Abb. 22 sind die Flächeninhalte der Chloroplasten von den Mutanten *Atgldt1-1*, *Atgldt1-1* + TFAG im Vergleich mit dem Wildtyp dargestellt. Es besteht eindeutig eine Korrelation zwischen den T-Protein-Gehalten und der Größe der Chloroplasten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die GDC-Aktivität und somit auch der photorespiratorische Umsatz im Zusammenhang mit der Chlorophyllsynthese und Größe der Chloroplasten stehen. In sich anschließenden Experimenten sollte auch die Anzahl und Größe der

Organellen in der P*-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp betrachtet werden. Wenn durch die präferenzielle Verlagerung der GDC-Aktivität in die Bündelscheiden die Chloroplastengröße in diesen Zellen zunimmt, könnte das einen weiteren Hinweis auf die Entwicklungsabfolge der C₄-Photosynthese liefern und die Theorie bestätigen, dass die Steigerung der GDC-Aktivität in den Bündelscheiden die Ausbildung der Kranz-Anatomie begünstigt.

Auf der Basis der erzielten Ergebnisse sollte als erstes versucht werden, die GDC-Aktivität in den Bündelscheiden der P*-Mutante zu erhöhen, indem das *F. anomala* H- oder T-Protein in diesem Zelltyp überexprimiert wird. Da die P*-Mutante in der Keimlingsentwicklung beeinträchtigt ist, sollten während dieser Entwicklungsstufe Metabolituntersuchungen durchgeführt werden, die Rückschlüsse auf die Veränderung des Stoffwechsels ermöglichen.

5.3. Die Komplementation der SHM-Mutante

Die Analyse der mitochondrialen SHM-Isoformen (AtSHM1; AtSHM2) zeigte, dass es sich bei beiden Proteinen um enzymatisch-aktive Serin-Hydroxymethyltransferasen handelt. Aber nur die Mutation in *AtSHM1* führte zu einem photorespiratorischen Phänotyp. Daher wurde überprüft, ob die zwei SHM-Isoformen im Mitochondrium lokalisiert sind. Durch die Generierung von GFP-Fusionsproteinen konnte die vorhergesagte, mitochondriale Lokalisation beider Isoformen bestätigt werden. Dennoch war es nicht möglich, den Phänotyp der *Atshm1-1*-Mutante durch eine Überexpression von AtSHM2 unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors zu revertieren (Voll *et al.*, 2006). Um die ausbleibende Komplementation zu erklären, wurden Immunolokalisationsstudien an den Einzelmutanten (*Atshm1-1*; *Atshm2-2*) mit einem spezifischen SHM-Antikörper durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein chimäres Konstrukt hergestellt, das zur Komplementation der *Atshm1-1*-Mutante verwendet wurde. Mit Hilfe der Immunolokalisationsanalysen wurde eine abweichende Gewebe-spezifische Lokalisation der mitochondrialen Isoformen nachgewiesen. Wie bereits durch die Transkriptanalysen (Abb. 13) angedeutet, wird AtSHM1 vorwiegend in den Mesophyllzellen exprimiert. Hingegen liegt AtSHM2 im Mesophyll reduziert vor und akkumuliert in den Leitbündeln. Die Komplementation der *Atshm1-1*-Mutante mit dem chimären Konstrukt resultierte in transgenen Linien, die visuell nicht vom Wildtyp zu unterscheiden waren. Auch physiologische Untersuchungen, wie z. B. Gaswechsel-Analysen und die Bestimmung der Glycin-Serin-Ratio, bestätigten die Revertierung des *Atshm1-1*-Phänotyps. Dieses Experiment verdeutlicht, dass AtSHM1 und AtSHM2 mit Ausnahme ihrer Funktion im C₁-Stoffwechsel redundant sind. Des Weiteren wurde durch diese Daten bewiesen, dass die N-terminalen Sequenzen nicht nur die mitochondriale Lokalisation verschlüsseln, sondern auch die Gewebespezifität.

Sowohl die funktionelle Charakterisierung der mitochondrialen SHM-Isoformen als auch die Komplementationsexperimente verdeutlichen eindrucksvoll, dass die SHM-Aktivität in auto- und heterotrophen Gewebe zwingend notwendig ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Transkriptanalysen, die unter 5.1.3 diskutiert wurden. Dadurch ist von einer Spezialisierung der SHM-Isoformen für den photorespiratorischen Zyklus oder dem C₁-Stoffwechsel auszugehen. Ähnliche Resultate wurden bereits für die H-Protein-Isoformen in Pappel beschrieben (Rajinikanth *et al.*, 2007).

5.4. Ausblick

Der photorespiratorische Zyklus wird aufgrund seiner energieverbrauchenden Reaktionen und durch den Verlust von Kohlenstoff in Form von CO₂ als „verschwenderischer“ Prozess bezeichnet. Die Eliminierung der Photorespiration führt aber zu keiner Steigerung der photosynthetischen Leistung von C₃-Pflanzen, sondern beeinträchtigt das Wachstum und die Fertilität. Daher gilt es zu überdenken, ob die Limitierung des photorespiratorischen Metabolitflusses zu einer effektiveren CO₂-Assimilation in C₃-Pflanzen führen könnte, denn selbst in C₄-Pflanzen beträgt die Photorespiration ungefähr 2 - 5 % der Netto-CO₂-Fixierung unter ambienten CO₂-Konzentrationen (Sage, 2001). Dennoch gelang es, den mitochondrialen Schritt im photorespiratorischen Glykolatmetabolismus durch die Integration eines metabolischen Nebenweges zu umgehen. Durch den Einbau des Glycerat-Weges aus *E. coli* in die Chloroplasten von *Arabidopsis* konnte eine erhöhte Biomasseproduktion erzielt werden (Kebeish *et al.*, 2007). Da die Generierung einer chloroplastidären CO₂-Pumpe die Steigerung der CO₂-Assimilation ermöglicht, könnte die Nachbildung des CO₂-Konzentrationsmechanismus einer C₃-C₄-intermediären Pflanze zu ähnlich vielversprechenden Resultaten führen. Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass noch weitere Grundlagenforschung nötig ist, um die Wechselwirkung zwischen der Photorespiration mit dem pflanzlichen Stoffwechsel besser verstehen zu können. Denn die photorespiratorischen Intermediate sind auch Substrate für eine Vielzahl von primären und sekundären Stoffwechselwegen und direkt in die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation von Genen, wie denen vom Kohlenstoff- und Stickstoffkreislauf, eingebunden.

In zukünftigen Untersuchungen sollte sich insbesondere mit der Relevanz der mitochondrialen GDC- und SHM-Reaktionen für das auto- und heterotrophe Gewebe von C₃- und C₄-Pflanzen beschäftigt werden, um die Bedeutung für den C₁- und N-Haushalt in den jeweiligen Geweben zu analysieren. Darüber hinaus ist die evolutionäre Transition von der C₃- zur C₄-Photosynthese näher zu erforschen, denn erst wenn die evolutionäre Abfolge der einzelnen Schritte bekannt ist, kann eine zielgerichtete Nachbildung des CO₂-Konzentrationsmechanismus in einer C₃-Pflanze erfolgen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ersten *Arabidopsis* GDC- und mitochondrialen SHM-Nullmutanten isoliert, die sich durch ihre Letalität im Kotyledonenstadium von anderen photorespiratorischen Mutanten abgrenzen. Physiologische Untersuchungen an Mutanten mit reduziertem GDC- und SHM-Gehalt zeigten eine Verbindung zwischen den GDC- und SHM-Reaktionen und dem C₁- und N-Metabolismus. Insbesondere die limitierte Bereitstellung von aktiven C₁-Einheiten während der Keimung und der Blütenentwicklung führen zu Wachstumsretardationen, reduzierten Chlorophyllgehalten und Sterilität. Ähnliche phänotypische Merkmale zeigte auch die P*-Mutante, die durch eine Komplementation der *Arabidopsis* P-Protein-Nullmutante mit dem *F. anomala* P-Protein generiert wurde. In der P*-Mutante wurde die P-Protein-Aktivität präferenziell in die leitbündelnahen Zellen verlagert, so dass der GDC-Umsatz im Mesophyll stark reduziert ist. Sowohl der Phänotyp als auch die stoffwechselphysiologischen Untersuchungen der P*-Mutante verdeutlichen, dass die präferenzielle Verlagerung der GDC-Aktivität in die Bündelscheiden nicht ausreicht, um einen primären CO₂-Konzentrierungsmechanismus ähnlich dem von C₃-C₄-intermediären Pflanzen zu imitieren. Daher sollte in zukünftigen Experimenten versucht werden, die Komplementation der P*-Mutante zu optimieren, indem z. B. weitere GDC-Untereinheiten in die leitbündelnahen Zellen verlagert werden. Dadurch wäre die Nachbildung der Stoffwechselsituation einer C₃-C₄-intermediären Pflanze in der C₃-Pflanze *Arabidopsis* vermutlich zu verwirklichen und unter Umständen könnte damit auch eine Strategie für ein optimiertes Pflanzenwachstum entwickelt werden.

Die Reduktion oder Eliminierung der GDC-Aktivität führt zu starken metabolischen Beeinträchtigungen der Pflanzen. Durch die Überexpression des *F. anomala* T-Proteins in der *Atgldt1-1*-Mutante konnte der photorespiratorische Phänotyp revertiert werden. Diese transgenen Linien zeichneten sich durch größere Chloroplasten im Mesophyll aus, die aber zu keiner Steigerung der photosynthetischen Leistung führten. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die GDC-Aktivität durch die Überexpression einzelner GDC-Komponenten gesteigert werden kann. In zukünftigen Experimenten sollte dieses Phänomen verifiziert werden.

7. Literaturverzeichnis

Agarie S, Miura A, Sumikura R, Tsukamoto S, Nose A, Arima S, Matsuoka M, Miyao-Tokutomi M (2002) Overexpression of C4 PEPC caused O₂-insensitive photosynthesis in transgenic rice plants. *Plant Sci* **162**: 257-265

Andrews TJ and Whitney SM (2003) Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **414**: 159–169

Antonicelli GE (2005) Änderung der Glycinderboxylase- und Serinhydroxymehtyltransferase-Aktivität in Blättern: Wirkungen auf die Photosynthese und den Stickstoff- und Kohlenstoff-Metabolismus. PhD thesis, Universität Göttingen, Deutschland

Arp WJ, Van Mierlo JEM, Berendse F & Snijders W (1998) Interactions between elevated CO₂ concentration, nitrogen and water: Effects on growth and water use for six perennial plant species. *Plant Cell Environ* **21**, 1-11

Baldy P, Cavalié G (1984) Compartmentation of photorespiratory enzymes in a C4 photosynthesis plant, *Zea mays*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **114**: 255-259

Bassüner B, Keerberg O, Bauwe H, Pärnik T, Keerberg H (1984) Photosynthetic CO₂ metabolism in C3-C4 intermediate and C4 species of *Flaveria* (Asteraceae). *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **179**: 631-634

Bauwe H (1984) Photosynthetic enzyme activities and immunofluorescence studies on the localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves of C3, C4 and C3–C4 intermediate species of *Flaveria* (Asteraceae). *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **179**:253–268

Bauwe H, Keerberg O, Bassüner R, Pärnik T, Bassüner B (1987) Reassimilation of carbon dioxide by *Flaveria* (Asteraceae) species representing different types of photosynthesis. *Planta* **172**: 214-218

Bauwe H, Kolukisaoglu U (2003) Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *J Exp Bot* **54**: 1523-1535

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

Bechtold N, Pelletier G (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**: 259–266

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523

Blackwell RD, Murray AJS, Lea PJ (1990) Photorespiratory mutants of the mitochondrial conversion of glycine to serine. *Plant Physiology* **94**: 1316-1322

Blackwell RD, Murray AJS, Lea PJ, Kendall A, Hall NP, Turner JC, Wallsgrave RM (1988) The value of mutants unable to carry out photorespiration. In: Govindjee, Bohnert HJ, Bottomley W, Bryant DA, Mullet JE, Ogren WL, Pakrasi H, Somerville CR, eds. *Molecular biology of photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 677-698

Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W (2005). D-Glycerate 3-kinase, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* **17**:2413–20

Bourguignon J, Merand V, Rawsthorne S, Forest E, Douce R (1996) Glycine decarboxylase and pyruvate-dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria—evidence from mass-spectrometry and primary-structure analysis. *Biochem J* **313**: 229–234

Bourguignon J, Neuburger M and Douce R (1988) Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria. Properties of the forward reaction catalysed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase. *Biochem J* **255** (169–178)

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254

Campisi L, Yang YZ, Yi Y, Heilig E, Herman B, Cassista AJ, Allen DW, Xiang HJ, Jack T (1999) Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant J* **17**: 699–707

Chen S, Hofius D, Sonnewald U, Börnke F (2003) Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *Plant J* **36**:731–740

- Chu CC** (1996) Molecular structure and expression patterns of glycine decarboxylase genes from *Flaveria pringlei* (C3) and *Flaveria anomala* (C3-C4). PhD thesis, University of Halle, Deutschland
- Chu CC, Nan Q, Bauwe H** (1998) The GDCSH gene encoding H-protein of the glycine cleavage system in the C3-C4 intermediate plant *Flaveria anomala*. (Accession No. Z99530) *Plant Physiology* **116**: 445
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Collakova E, Goyer A, Naponelli V, Krassovskaya I, Gregory JF, Hanson AD, Shachar-Hill Y** (2008) *Arabidopsis* 10-Formyl tetrahydrofolate deformylases are essential for photorespiration. *Plant Cell* **20**: 1818-1832
- Cossu R** (1997) Charakterisierung der Glycindecarboxylase-Gene von *Flaveria trinervia* (C4) und ihre Expression in transgenen *Nicotiana tabacum*, *Flaveria pubescens* und *Solanum tuberosum*. PhD thesis. Universität Hannover, Hannover, Germany
- Cossu R and Bauwe H** (1998) The GDCSH gene encoding T-protein of the glycine cleavage system in the C4 plant *Flaveria trinervia* (Accession No. Z99769). *Plant Physiology* **116**: 446
- De Crecy-Largard V, El Yacoubi E, De La Garza RD, Noiriel A, Hanson AD** (2007) Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations. *BMC Genomics* **8**: 245
- Dengler N, Dengler R, Donnely P, Hattersley P** (1994) Quantitative leaf anatomy of C3 and C4 grasses (Poaceae): Bundle sheath and mesophyll surface area relationships. *Ann Bot* **73**: 241-255
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rebeille F** (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci* **6**:167-176
- Dubos C, Huggins D, Grant GH, Knight MR, Campbell MM** (2003) A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *Plant J* **35**: 800-810
- Edwards GE, Francheschi VR, Ku MSB, Voznesenskaya EV, Pyankov VI, Andreo CS** (2001) Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C4 plants. *J Exp Bot* **52**:577–590
- Edwards GE, Furbank RT, Hatch MD, Osmond CB** (2001) What does it take to be C4? Lessons from the evolution of C4 photosynthesis. *Plant Physiol* **125**: 46-49

Edwards GE, Ku MSB (1987) Biochemistry of C3-C4 intermediates. In: Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry of plants, Vol. 10*. New York, NY, USA: Academic Press, 275–325

Ehleringer JR, Cerling TE, Helliker BR (1997) C4 photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecologia* **112**:285–99

Ehleringer JR, Sage RF, Flanagan LB, Pearcy RW (1991) Climate change and the evolution of C4 photosynthesis. *Trends Ecol Evol* **6**: 95-99

Eisenhut M, Appel J, Ruth W, Bauwe H, Hagemann M (2007) Complete decarboxylation of glyoxylate via formate represents the third route for phosphoglycolate metabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803

Eisenhut M, Bauwe H, Hagemann M (2007) Glycine accumulation is toxic for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, but can be compensated by supplementation with magnesium ions. *FEMS Microbiol Lett* **277**:232-237

Eisenhut M, Kahlon S, Hasse D, Ewald R, Lieman-Hurwitz J, Ogawa T, Ruth W, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M (2006) The Plant-Like C2 Glycolate Cycle and the Bacterial-Like Glycerate Pathway Cooperate in Phosphoglycolate Metabolism in Cyanobacteria. *Plant Physiol* **142**: 333-342

Engel N (2004) Funktionelle Analyse und Charakterisierung der SHMT-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit. Universität Rostock, Deutschland

Engel N, Eisenhut M, Qu N, Bauwe H (2008) *Arabidopsis* mutants with strongly reduced levels of the T-protein subunit of glycine decarboxylase. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Conference of Photosynthesis*, Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., and Osmond, C. B. (Eds) Springer: 819- 822

Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu U, Morgenthal K, Weckwerth W, Parnik T, Keerberg O, Bauwe H (2007) Deletion of Glycine Decarboxylase in *Arabidopsis* Is Lethal under Nonphotorespiratory Conditions. *Plant Physiol* **144**: 1328-1335

Faure M, Bourguignon J, Neuburger M, Macherel D, Sieker L, Ober R, Kahn R, Cohen-Addad C and Douce R (2000) Interaction between the lipoamide-containing h-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylating multienzyme system. 2. Crystal structures of H- and L-protein. *Eur J Biochem* **267**: 2890-2898

Furbank RT, Jenkins CL, Hatch MD (1989) CO₂ concentrating mechanism of C₄ photosynthesis. Permeability of isolated bundle sheath cells to inorganic carbon. *Plant Physiol* **91**: 1364-1371

Haberlandt GF (1904) *Physiologische Pflanzenanatomie*. Wilhelm Engelmann, Leipzig

Hagemann M, Vinnemeier J, Oberpichler I, Boldt R, Bauwe H (2005) The glycine decarboxylase complex is not essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Biol (Stuttg)* **7**: 15-22

Hanson AD, Gage D, Shachar-Hill Y (2000) Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends Plant Sci* **5**:206–13

Hanson AD, Roje S (2001). One-carbon metabolism in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**:119–37

Hasse D, Mikkat S, Hagemann M, Bauwe H (2009) Alternative splicing produces an H-protein with better substrate properties for the P-protein of glycine decarboxylase. *FEBS Journal*, accepted

Hasse D, Mikkat S, Thrun HA, Hagemann M, Bauwe H (2007) Properties of recombinant glycine decarboxylase P- and H-protein subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Lett* **581**: 1297-1301

Hatch MD (1987) C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica Biophysica Acta* **895**: 81-106

Heineke D, Bykova N, Gardestrom P, Bauwe H (2001) Metabolic response of potato plants to an antisense reduction of the P-protein of glycine decarboxylase. *Planta* **212**:880-887

Husic DW, Husic HD, Tolbert NE (1987) The oxidative photosynthetic carbon cycle or C₂ cycle. *CRC Crit Rev Plant Sci* **5**:45-100

Hylton CM, Rawsthorne S, Smith AM, Jones DA, Woolhouse HW (1988) Glycine decarboxylase is confined to the bundle-sheath cells of leaves of C₃-C₄ intermediate species. *Planta* **175**: 452-459

Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, Douce R, Rébeillé F (2003) One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol* **131**(3):1431-9

Jordan DB, Ogren WL (1981) Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* **291**: 513-515

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

Kennedy RA, Laetsch WM (1974) Plant species intermediate for C₃, C₄ photosynthesis. *Science* **184**: 1087-1089

Keys AJ (1999) Biochemistry of photorespiration and the consequences for plant performance. In *Plant Carbohydrate Biochemistry*, ed. JA Bryant, MM Burrell, NJ Kruger, pp. 147–61. Oxford, UK: BIOS Scientific

Keys AJ (2006) The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C₃ higher plants. *Photosynth Res* **87**(2):165-75

Kikuchi G (1973) The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol Cell Biochem* **1**: 169-187

Kinsman EA, Pyke KA (1998) Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in *Arabidopsis* leaves. *Development* **125**: 1815-1822

Kopriva S, Hartmann H, Massaro G, Hönicke P, Rennenberg H (2004) Regulation of sulfate assimilation by nitrogen and sulfur nutrition in poplar trees. *Trees* **18**: 320-326

Kopriva S, Turner SR, Rawsthorne S, Bauwe H (1995) T-protein of the glycine decarboxylase multienzyme complex: evidence for partial similarity to formyltetrahydrofolate synthetase. *Plant Mol Biol* **27**:1215–20

Ku MS, Kano-Murakami Y, Matsuoka M (1996) Evolution and expression of C₄ photosynthesis genes. *Plant Physiol* **111**: 949-957

Ku MS, Monson RK, Littlejohn RO, Nakamoto H, Fisher DB, Edwards GE (1983) Photosynthetic Characteristics of C₃-C₄ Intermediate Flaveria Species : I. Leaf Anatomy, Photosynthetic Responses to O₂ and CO₂, and Activities of Key Enzymes in the C₃ and C₄ Pathways. *Plant Physiol* **71**(4):944-948

- Kume A, Kure S, Tada K, Hiraga K** (1988) The impaired expression of glycine decarboxylase in patients with hyperglycinemias. *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 292-297
- Kure S, Tada K, Narisawa K** (1997) Nonketotic hyperglycinemia: biochemical, molecular, and neurological aspects. *Jpn J Hum Genet* **42**:13-22
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Laing WA, Ogren WL & Hageman RH** (1974) Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂, and ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. *Plant Physiol* **54**, 678-685
- Laubner M** (1999) Untersuchungen von transgenen Solanaceen mit Veränderungen im Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel. PhD thesis Universität Göttingen
- Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, Häusler RE** (1995) The regulation and control of photorespiration. *J Exp Bot* **46**: 1397–1414
- Li R, Moore M, King J** (2003) Investigating the regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **44**: 233–241
- Lutzinger I, Oliver DJ** (2001) Characterization of two cDNAs encoding mitochondrial lipoamide dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 615-623
- Matsouka M, Furbank RT, Fukayama H, Miyao M** (2001) Molecular engineering of C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **52**: 297–314
- McClung CR, Hsu M, Painter JE, Gagne JM, Karlsberg SD, Salome PA** (2000) Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway: circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiol* **123**: 381–392
- Mollier P, Montoro P, Delarue M, Bechtold N, Bellini C, Pelletier G** (1995) Promoterless GusA expression in a large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by the in-planta infiltration method. *C R Acad Sci III* **318**: 465–474
- Monson RK, Jaeger CH** (1991) Photosynthetic characteristics of C₃-C₄ intermediate *Flaveria floridana* (Asteraceae) in natural habitats: Evidence of advantages to C₃-C₄ photosynthesis at high leaf temperature. *American Journal of Botany* **78**: 795-800

- Monson RK, Moore BD, Ku MSB, Edwards GE** (1986) Co-function of C3- and C4-photosynthetic pathways in C3, C4 and C3-C4 intermediate *Flaveria* species. *Planta* **168**: 493-502
- Moore BD, Ku MSD, Edwards GE** (1989) Expression of C4-like photosynthesis in several species of *Flaveria*. *Plant Cell Environ* **12**: 541-549
- Morgan CL, Turner SR, Rawsthorne S** (1993) Coordination of the cell-specific distribution of the four subunits of glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase in leaves of C3-C4 intermediate species from different genera. *Planta* **190**: 468-473
- Mouillon JM, Aubert S, Bourguignon J, Gout E, Douce R, Rebeille F** (1999) Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J* **20**:197-205
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473–497
- Nakai T, Nakagawa N, Maoka N, Masui R, Kuramitsu S and Kamiya N** (2005) Structure of P-protein of the glycine cleavage system: implications for non-ketotic hyperglycinemia. *EMBO J* **24**: 1536
- Nan Q, Bauwe H** (1998) The GDCSP gene encoding P-protein of the glycine cleavage system in the C3-C4 intermediate plant *Flaveria anomala*. (Accession No. Z99762). *Plant Physiology* **116**: 445
- Nan Q, Chu CC, Bauwe H** (1998) The GDCST gene encoding T-protein of the glycine cleavage system in the C3-C4 intermediate plant *Flaveria anomala* (Accession No. Z71184). *Plant Physiology* **116**: 446
- Noctor G, Foyer CH** (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Norman EG, Colman B** (1991) Purification and Characterization of Phosphoglycolate Phosphatase from the Cyanobacterium *Coccochloris peniocystis*. *Plant Physiol* **95**:693-698
- Ogren WL** (1984) Photorespiration: pathways, regulation and modification. *Ann Rev Plant Phys* **35**: 415-442
- Okamura-Ikeda K, Hosaka H, Yoshimura M, Yamashita E, Toma S, Nakagawa A, Fujiwara K, Motokawa Y, Taniguchi H** (2005) Crystal structure of human T-protein of glycine cleavage system at 2.0 Å resolution and its implication for understanding non-ketotic hyperglycinemia. *J Mol Biol* **351**: 1146–1159

Oliver DJ (1994) The glycine decarboxylase complex from plant mitochondria. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**:323–37

Oliver DJ, Neuburger M, Bourguignon J, Douce R (1990) Interaction between the Component Enzymes of the Glycine Decarboxylase Multienzyme Complex. *Plant Physiol* **94**: 833-839

Oliver DJ, Raman R (1995) Glycine decarboxylase: protein chemistry and molecular biology of the major protein in leaf mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **27**: 407–14

Osmond B, Badger M, Maxwell K, Björkman O, Leegood R (1997) Too many photos: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Science* **2**: 119–121

Pares S, Cohen-Addad C, Sieker L, Neuburger M, Douce R (1994) Xray structure determination at 2.6-Å resolution of a lipoate-containing protein: the H-protein of the glycine decarboxylase complex from pea leaves. *Proc Natl Acad Science USA* **91**: 4850-4853

Pärnik T, Keerberg O (2007) Advanced radiogasometric method for the determination of the rates of photorespiratory and respiratory decarboxylations of primary and stored photosynthates under steady-state photosynthesis. *Physiol Plant* **129**: 34–44

Parys E, Jastrzebski H (2007) Mitochondria from leaf mesophyll cells of C4 plants are deficient in the H protein of glycine decarboxylase complex. *J Plant Physiol* **165**: 1061-1069

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**:384–394

Qu N and Bauwe H (1998) The GDCSP gene encoding P-protein of the glycine cleavage system in the C3-C4 intermediate plant *Flaveria anomala* (Accession No. Z99762). *Plant Physiol* **116**:445

Rachmilevitch S, Cousins AB, Bloom AJ (2004) Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *PNAS* **101**:11506-11510

Raghavendra AS (1980) Characteristics of plant species intermediate between C3 and C4 pathways of photosynthesis: their focus of mechanism and evolution of the C4 syndrome. *Photosynthetica* **14**: 271- 273

Rajinikanth M, Harding SA, Tsai CJ (2007) The glycine decarboxylase complex multienzyme family in *Populus*. *J Exp Bot* **58**: 1761-1770

Rawsthorne S (1992) C₃-C₄ photosynthesis. Linking physiology to gene expression. *Plant J* **2**: 267-274

Rawsthorne S and Bauwe H (1998) C₃-C₄ intermediate photosynthesis. *In: Photosynthesis, a comprehensive treatise*. Raghavendra A.S. (ed.) Cambridge University Press, pp. 150–162

Rawsthorne S and Hylton CM (1991) The relationship between the post-illumination CO₂ burst and glycine metabolism in leaves of C₃ and C₃-C₄ intermediate species of *Moricandia*. *Planta* **186**:122–126

Rawsthorne S, Hylton CM, Smith AM, Woolhouse HW (1988) Photorespiratory metabolism and immunogold localization of photorespiratory enzymes of C₃ and C₃-C₄ intermediate species of *Moricandia*. *Planta* **173**: 298-308

Rawsthorne S, Morgan CL, O'Neill CM, Hylton CM, Jones DA, Frean ML (1998) Cellular expression pattern of the glycine decarboxylase P protein in leaves of an intergenic hybrid between the C₃-C₄ intermediate species *Moricandia nitens* and the C₃ species *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* **96**: 922–927

Sage RF (2001) Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C₄ photosynthetic syndrome. *Plant Biol* **3**: 202-213

Sage RF (2004) The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist* **161**: 341-370

Sakamoto T, Murata N (2002) Regulation of desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr Opin Microbiol* **5**: 208-210

Sakamoto W, Tamura T, Hanba-Tomita Y, Murata M (2002) The VAR1 locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2002, **8**:769-80

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

Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Karagiri F,

Glazebrook J, Law M, Goff SA (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985-2994

Sieker L, Cohen Addad C, Neuburger M, Douce R (1991) Crystallographic data for H-protein from the glycine decarboxylase complex. *J Mol Biol* **220**: 223-4

Somerville CR (1984) The analysis of photosynthetic carbon dioxide fixation and photorespiration by mutant selection. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* (ed. B.J. Mifflin), Oxford University Press, Oxford. Vol I, pp. 103-131

Somerville CR (1984) The analysis of photosynthetic carbon dioxide fixation and photorespiration by mutant selection. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* **1**:102-133

Somerville CR (2001) An early *Arabidopsis* demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. *Plant Physiol* **125**:20-24

Somerville CR, Ogren WL (1979) A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Nature* **280**: 833–836

Somerville CR, Ogren WL (1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2684–2687

Somerville CR, Ogren WL (1981) Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiol* **67**: 666–671

Somerville CR, Ogren WL (1982) Genetic modification of photorespiration. *Trends in Biochemical Sciences* **7**: 171-174

Somerville CR, Ogren WL (1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochem J* **202**:373-380

Sonnewald U, Lerchl J, Zrenner R, Frommer W (1994) Manipulations of sink-source relations in transgenic plants. *Plant Cell Environ* **17**, 649-658

Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 449–475

Srinivasan R, Oliver DJ (1992) H-protein of the glycine decarboxylase multienzyme complex: complementary DNA encoding the protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **98**: 1518-1519

Srinivasan R, Oliver DJ (1995) Light-dependent and tissue-specific expression of the H-protein of the glycine decarboxylase. *Plant Physiol* **109**: 161–8

Tada K (1993) Molecular lesion and pathophysiology of hyperglycinemia: glycine cleavage system, physiology and pathology. *Seikagaku* **65**: 248-259

Takahashi S, Bauwe H, Badger M (2007) Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **144**: 487–94

Takahashi S, Murata N (2006) Glycerate-3-phosphate, produced by CO₂ fixation in the Calvin cycle, is critical for the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 198–205

Timm S, Nunes-Nesi A, Parnik T, Morgenthal K, Wienkoop S, Keerberg O, Weckwerth W, Kleczkowski LA, Fernie AR, Bauwe H (2008) A Cytosolic Pathway for the Conversion of Hydroxypyruvate to Glycerate during Photorespiration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 2848-59

Tolbert NE (1997) The C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 1-25

Uemura K, Anwaruzzaman, Miyachi S, Yokota A (1997) Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Thermophilic Red Algae with a Strong Specificity for CO₂ Fixation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **233**: 568-571

Ueno O (2001) Ultrastructural localization of photosynthetic and photorespiratory enzymes in epidermal, mesophyll, bundle sheath, and vascular bundle sheath cells of the C₄ dicot *Amaranthus viridis*. *J Exp Bot* **52**: 1003–13

Ueno O, Bang SW, Wada Y, Kondo A, Ishihara K, Kaneko Y, Matsuzawa Y (2003) Structural and biochemical dissection of photorespiration in hybrids differing in genome constitution between *Diplotaxis tenuifolia* (C₃-C₄) and *Raphanus sativus* (C₃). *Plant Physiol* **132**: 1550-1559

Voll LM, Jamai A, Renne P, Voll H, McClung CR, Weber AP (2006) The photorespiratory *Arabidopsis* *shm1* mutant is deficient in SHM1. *Plant Physiol* **140**: 59-66

- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Artyusheva EG, Freitag H, Edwards GE** (2002) Proof of C4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J* **31**: 649-662
- Wang HL, Postier BL, Burnap RL** (2004) Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *J Biol Chem* **279**: 5739-5751
- Westhoff P, Gowik U** (2004) Evolution of c4 phosphoenolpyruvate carboxylase. *Genes and proteins: a case study with the genus Flaveria*. *Ann Bot (Lond)* **93**: 13-23
- Wingler A, Lea PJ, Leegood RC** (1997) Control of photosynthesis in barley plants with reduced activities of glycine decarboxylase. *Planta* **202**: 171-178
- Wingler A, Lea PJ, Leegood RC** (1999) Photorespiratory metabolism of glyoxylate and formate in glycine-accumulating mutants of barley and *Amaranthus edulis*. *Planta* **207**: 518-526
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC** (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1517-1529
- Wolpert TJ, Navarre DA, Moore DL, Macko V** (1994) Identification of the 100 kDa victorin binding protein from oats. *The Plant Cell* **6**: 1141-1155
- Woodrow IE and Berry JA** (1988) Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* **39**: 533-594
- Xu H, Zhang J, Zeng J, Jiang L, Liu E, Peng C, He Z, Peng X** (2009) Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice. *J Exper Botany* **60**: 1799-1809
- Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP** (2009) High Glycolate Oxidase Activity is Required for Survival of Maize in Normal Air. *Plant Physiol*
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R** (2006) Pyrimidine and Purine Biosynthesis and Degradation in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 805-836

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

2-PG	2-Phosphoglykolat
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AtGLDH	<i>A. thaliana</i> H-Protein
AtGLDP	<i>A. thaliana</i> P-Protein
AtGLDT	<i>A. thaliana</i> T-Protein
AtSHM	<i>A. thaliana</i> Serinhydroxymethyltransferase
BSA	Bovine Serum Albumin
CaMV	Cauliflower-Mosaik-Virus
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
Col	Columbia
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
GDC	Glycin-Decarboxylase
GGAT	Glyoxylat:Glutamat-Aminotransferase
GGT	Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase
Glyk	Glyceratkinase
GOGAT	Glutamin:Oxoglutarat-Aminotransferase
GOX	Glycolatoxidase
GS	Glutaminsynthetase
HFAG	<i>Flaveria anomala</i> H-Protein
HPLC	high performance liquid chromatography
HPR	Hydroxypyruvatreduktase
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid

Kan	Kanamycin
Km	Michaelis Konstante
mcs	multiple cloning site
ME	Malatenzym
M-MLV-RT	Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger (Boten-) RNA
MS	Murashige und Skoog (Medium)
OAA	Oxalacetat
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PFAG	<i>Flaveria anomala</i> P-Protein
PGA	3-Phosphoglycerat
PGLP	Phosphoglycolatphosphatase
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rif	Rifampicin
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SGAT	Serin: Glyoxylat-Aminotransferase
SHM	Serin-Hydroxymethyltransferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFAG	<i>Flaveria anomala</i> T-Protein
THF	Tetrahydrofolat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactopyranosid
Γ	CO ₂ -Kompensationspunkt

8.2. Erklärungen

8.2.1. Anteilserklärung für Nadja Engel

Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu Ü, Morgenthal K, Weckwerth W, Pärnik T, Keerberg O, Bauwe H (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under non-photorespiratory conditions. *Plant Physiology* 144: 1328-1335

- Charakterisierung der P-Protein Einzel- und Doppelmutanten
- Isolierung der P-Protein-Doppelmutante
- Nachweis der P-Protein-Gene und jeweiligen Insertionen mittels PCR
- Transkriptanalysen mittels RT-PCR
- Proteinanalysen mittels Western Blot
- HPLC-Analysen zur Bestimmung der löslichen Aminosäuren im Blatt
- Fotografische Aufnahmen der Pflanzen mit Unterstützung von Herrn Prof. Bauwe
- Mitarbeit am Manuskript

Engel N, Eisenhut M, Qu N, Bauwe H (2008) *Arabidopsis* mutants with strongly reduced levels of the T-protein subunit of glycine decarboxylase. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Conference of Photosynthesis*, Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., and Osmond, C. B. (Eds) Springer: 819- 822

- Pflanzenanzucht, Probennahme, Phänotypische Charakterisierung
- Isolierung und Charakterisierung der Insertionsmutante *Atgldt1-1*
- Generierung und Charakterisierung der T-Protein-RNAi-Pflanzen
- Komplementation mit heterologen T-Protein-Genen
- Transkriptanalysen mittels RT-PCR
- Proteinanalysen mittels Western Blot
- HPLC-Analysen zur Bestimmung der löslichen Aminosäuren im Blatt
- Mitarbeit am Manuskript

8.2.2. Erklärung zur Selbständigkeit

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Nadja Engel

Rostock, den 09.04.2010

8.2.3. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **Prof. Hermann Bauwe** bedanken, der mir die Gelegenheit gegeben hat, ein so spannendes Thema im Rahmen meiner Dissertation zu bearbeiten. Das Thema der ektopischen Komplementation der P-Protein-Nullmutante hat mich von Beginn an fasziniert, gestaltete sich allerdings des Öfteren sehr schwierig in der Umsetzung. Nichts desto trotz hatte Herr Prof. Bauwe immer ein offenes und kritisches Ohr für mich, so dass ich mit seinen umfassenden Ratschlägen immer wieder auf den richtigen Weg geführt wurde. Darüber hinaus ließ Herr Prof. Bauwe mir sehr viel Freiraum in der Umsetzung meiner Ideen, die sich in meinem Kopf viel zu oft ansammelten. Geschickt und immer anspornend wurde ich auf die wesentlichen Dinge meiner Dissertation zurückgeführt. Durch die selbstständige Arbeitsweise und den positiven Druck hat Herr Prof. Bauwe mir nicht nur den Weg zu meiner Dissertation geebnet, sondern auch viel Erfahrung für meine persönliche Zukunft mitgegeben, für die ich mich herzlich bedanken möchte.

Herrn Prof. Hagemann möchte ich für sein außergewöhnliches Engagement, die fachlichen Gespräche, Aufmunterungen und den Hinweis „Los, fertig werden!!!“ sehr danken.

Frau Dr. Evghenia Maximova danke ich für die sympathische und aufschlussreiche Hilfestellung bei der Einführung in die Arbeiten der Immunolokalisation und bei der Einbettung von Blattmaterial.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Pflanzenphysiologie möchte ich ein herzliches Dankeschön für das gute Arbeitsklima und die regen Diskussionen dalassen. Insbesondere mit **Marion Eisenhut, Ralph Ewald** und **Stefan Timm** war es immer eine schöne, entspannte und lustige Zeit während und nach der Arbeit.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an **Kathrin Jahnke**, die immer mit einem Lächeln auf dem Gesicht mich und meine Arbeit unterstützt hat. Ohne Kathrin wäre vieles nicht zu schaffen gewesen.

Danke auch an **Ursula** und **Claudia**, die mich tatkräftig unterstützt haben.

Meiner Familie, meinem Mann, meinen Freunden und Tieren danke ich heute und in Zukunft für alles was sie getan und gesagt bzw. nicht gesagt haben. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

8.3. Publikationsliste

Konferenzbeiträge:

1. Engel N, Qu N, Bauwe H (2007) Relocation of photorespiratory CO₂ release from the mesophyll to the bundle sheath of a C₃ plant. *Photosynthesis Research* 91: 221 (conference abstract)

Publikationen:

1. Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu Ü, Morgenthal K, Weckwerth W, Pärnik T, Keerberg O, Bauwe H (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under non-photorespiratory conditions. *Plant Physiology* 144: 1328-1335
2. Engel N, Eisenhut M, Qu N, Bauwe H (2008) *Arabidopsis* mutants with strongly reduced levels of the T-protein subunit of glycine decarboxylase. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Conference of Photosynthesis*, Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., and Osmond, C. B. (Eds) Springer: 819- 822
3. Engel N, Ewald R, Zrenner R, Hagemann M and Bauwe H (2010) The presequence of *Arabidopsis* Ser hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria and hence complementation of the *shm1* allele. Submitted to *Plant Physiology*.

Manuskripte:

1. Engel N and Bauwe H (2010) Ectopic expression of the *Flaveria anomala* P-protein gene, a C₃-C₄ intermediate plant, into the lethal *Arabidopsis* P-protein mutant.

8.4. Präsentationen und Vorträge auf Tagungen

19. Molekularbiologische Tagung, Dabringhausen, Deutschland, 2006

Nadja Engel, Üner Kolukisaoglu, Hermann Bauwe: Knock-out der Glycinecarboxylase in *Arabidopsis* ist letal - auch bei hoher CO₂-Konzentration. (Poster)

Pflanzenphysiologische Tagung, Wallenfells, Deutschland, 2007

Nadja Engel, Nan Qu, Üner Kolukisaoglu, Ralph Ewald, Hermann Bauwe: Eingriffe in die Photorespiration. (Vortrag)

14th International Congress of Photosynthesis, Glasgow, Scotland, 2007

Nadja Engel, Marion Eisenhut, Nan Qu and Hermann Bauwe: Complementation of *Arabidopsis* and *Synechocystis* mutants defective in T-protein of glycine decarboxylase. (Poster)

21. Molekularbiologische Tagung, Dabringhausen, Deutschland, 2009

Nadja Engel und Hermann Bauwe: Partielle Komplementation der P-Protein-Nullmutante in *Arabidopsis thaliana*. (Poster)

8.5. Lebenslauf

Persönliche Daten	geb. 03.09.1979 in Rostock ledig
Schulbildung	
Sept. 1986 – Juli 1988	46. Oberschule in Rostock
Sept. 1988 – Juli 1991	Mathias – Thesen – Oberschule mit erweitertem Fremdsprachenunterricht in Rostock
Sept. 1991 – Juli 1998	Gymnasium am Goetheplatz in Rostock mit Abschluss der Hochschulreife
Beruflicher Werdegang	
Okt. 1998 – Dez. 2004	Studium der Biologie an der Universität Rostock in der Abteilung Pflanzenphysiologie (Universitätsprofessor Dr. rer. nat. habil. Hermann Bauwe) mit Diplomabschluss
März 2005 – Mai 2010	Promotionsstudent an der Universität Rostock in der Abteilung Pflanzenphysiologie (Universitätsprofessor Dr. rer. nat. habil. Hermann Bauwe)
Juli 2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitätsklinik Rostock in der Abteilung Zellbiologie (PD. Dr. Barbara Nebe)
Auszeichnungen	
März 1997	1. Platz beim Landeswettbewerb „Jugend forscht“ in Mecklenburg Vorpommern
Juli 1997	Sonderpreis beim Bundeswettbewerb „Jugend forscht“ und Teilnahme am London International Youth Forum
März 2006	Gewinn des Reinhold von Sengbusch-Preises in Dabringhausen
Wissenschaftliche Zusammenarbeit	
August 2007 und März 2008	Forschungsaufenthalt am MPI Golm zur Einführung in die Immunlokalisation

9. Ergänzendes Material (auf beiliegender CD)

9.1. Publikationen von Nadja Engel (im PDF-Format)

a.) Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu Ü, Morgenthal K, Weckwerth W, Pärnik T, Keerberg O, Bauwe H (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under non-photorespiratory conditions. *Plant Physiology* 144: 1328-1335

b.) Engel N, Eisenhut M, Qu N, Bauwe H (2008) *Arabidopsis* mutants with strongly reduced levels of the T-protein subunit of glycine decarboxylase. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Conference of Photosynthesis*, Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., and Osmond, C. B. (Eds) Springer: 819- 822

c.) Engel N, Qu N, Bauwe H (2008) Relocation of photorespiratory CO₂ release from the mesophyll to the bundle sheath of a C₃ plant. *Photosynthesis Research* 91: 221 (conference abstract)

d.) Engel N, Ewald R, Zrenner R, Hagemann M and Bauwe H (2010) The presequence of *Arabidopsis* Ser hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria and hence complementation of the *shm1* allele. Submitted to *Plant Physiology*.

9.2. Sequenzen

Die Sequenzen der mitochondrialen GDC- und SHM-Gene von *Arabidopsis thaliana* und *Flaveria anomala* im rtf-Format.

9.3. Mutanten

Darstellung der verwendeten *Arabidopsis* GDC- und SHM-Insertionslinien inkl. des Insertionsortes und der verwendeten Primerpaare im word- bzw. rtf-format. Photos von allen gezeigten Phänotypen.

9.4. Leere Vektoren

pBin19, pCAL-n, pCAMBIA, pGEM-T, pGreen, pHUE

9.5. Plasmidkarten

Alle verwendeten Konstrukte im Clone-Manager-Format inkl. graphischer Darstellung.

9.6. Marker und Standards

Alle verwendeten DNA- und Proteinstandards

9.7. HPLC-Analysen der Aminosäuren

Alle Rohdaten der HPLC-Analysen der löslichen Aminosäuren in den verwendeten Mutanten.

9.8. Gaswechselanalysen

Alle Rohdaten der Gaswechselanalysen von den verwendeten Mutanten.

9.9. Genevestigator-Daten

Abbildungen der Genevestigator-Daten.

9.10. Messung der Chloroplasten

Excel-Tabelle der vermessenen Chloroplasten der T-Protein-Mutanten.