

„Photorespiration in *Arabidopsis thaliana*:  
Das Hydroxypyruvat reduzierende System – Beteiligung alternativer  
Enzyme und zytosolischer Reaktionen“



Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. Nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Diplom-Biologe

**Stefan Timm**

aus Kühlungsborn

Rostock, 20.10.2009

(Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2009)

Betreuer: Universitätsprofessor Dr. Hermann Bauwe

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Bauwe (Universität Rostock)

Apl. Prof. Dr. Martin Hagemann (Universität Rostock)

PD Dr. Alisdair R. Fernie (MPI Golm)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Stefan Timm, Adriano Nunes-Nesi, Tiit Pärnik, Katja Morgenthal, Stefanie Wienkoop, Olav Keerberg, Wolfram Weckwerth, Leszek A. Kleczkowski, Alisdair R. Fernie and Hermann Bauwe** (2008) A Cytosolic Pathway for the Conversion of Hydroxypyruvate to Glycerate during Photorespiration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **20**: 1-12

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
2.1. Die Photosynthese.....	4
2.2. Die Photorespiration.....	7
2.2.1. Biochemie der Photorespiration.....	8
2.2.2. Mutanten und Genetik der Photorespiration.....	10
2.2.3. Assoziierte Prozess und Manipulation der Photorespiration.....	13
2.3. Kenntnisstand zu pflanzlichen Hydroxypyruvat-Reduktasen.....	14
2.4. Zielstellung dieser Arbeit.....	17
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1. Material.....	19
3.1.1. Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.2. Apparaturen, Geräte und Zubehör.....	19
3.1.3. Reaktionskits.....	20
3.1.4. Verwendete Enzyme.....	21
3.1.5. Größenstandards für Elektrophoresen.....	21
3.1.6. Verwendete Oligonukleotide.....	21
3.1.7. Verwendete Plasmide.....	22
3.1.8. Pflanzenmaterial und Anzucht.....	24
3.1.9. Bakterienstämme.....	24
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Isolation von genomischer DNA.....	25
3.2.2. Isolation von Plasmid DNA.....	25
3.2.3. Isolation von RNA.....	26
3.2.4. Herstellung von cDNA.....	26
3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
3.2.6. Trennung von Nukleinsäuren.....	28

3.2.7. Isolation von Knock-out Mutanten.....	28
3.2.8. Reinigung von Nukleinsäuren.....	29
3.2.9. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	29
3.2.10. Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	29
3.2.11. Restriktionsverdau von DNA.....	29
3.2.12. Proteinisolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
3.2.13. Reinigung und Identifikation der AtHPR2.....	30
3.2.14. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
3.2.15. Heterologe Überexpression und Reinigung spezifischer Proteine.....	31
3.2.16. Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	32
3.2.17. Immunologische Nachweistechiken (Western-Blot) .....	33
3.2.18. Chlorophyllbestimmung .....	35
3.2.19. Aminosäureanalyse (HPLC) .....	36
3.2.20. Metabolomanalyse (GC-MS) .....	36
3.2.21. <sup>13</sup> C-Markierungsexperimente .....	36
3.2.22. Standardmessung des CO <sub>2</sub> -Austausches (Licor 6400).....	37
3.2.23. Standardmessung der Chlorophyll-Fluoreszenz (Imaging-PAM).....	37
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1. Transkriptionelle Regulation der C2-Zyklus Gene .....	39
4.2. Die AtHPR1-Mutanten – Eine Ausnahme im C2-Zyklus .....	42
4.3. Identifikation der alternativen AtHPR2.....	45
4.4. Ist die HPR2 funktionell am C2-Zyklus beteiligt?.....	47
4.5. HPR-Doppel-Knock-out führt zur erhöhten Sauerstoffsensivität.....	51
4.6. Die photorespiratorische 3HP-Umsetzung erfolgt durch HPR1 und HPR2 .....	57
4.7. Mutation der HPRs führt zum Anstau photorespiratorischer Intermediate .....	59
4.8. Mutation der HPRs führt zu Änderungen des photorespiratorischen <sup>13</sup> C-Fluxes.....	61
4.9. Der Ausfall der HPR1 und der HPR2 führt zur drastischen Reduktion der photosynthetischen Leistung.....	62
4.10. Sind weitere Enzyme an der 3HP-Umsetzung beteiligt? .....	64

4.11. Einzel-Mutation der HPR3 zieht keine phänotypischen Folgen nach sich.....	68
4.12. Mutation der HPRs führt zu Änderungen des Aminosäurehaushaltes .....	72
4.13. Der Ausfall aller 3 HPRs führt zu weiterer Reduktion der photosynthetischen Leistung und zu verminderter PSII-Aktivität.....	74
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>80</b>
5.1. Die <i>At</i> HPR1-Insertionsmutanten – Eine Ausnahme unter der bisher bekannten Mutanten im C2-Zyklus .....	81
5.2. Identifikation der <i>At</i> HPR2 und die Beteiligung an der Photorespiration .....	83
5.3. Die HPR-Doppelmutante – weitere Alternativen für die 3HP-Umsetzung? .....	85
5.4. Rolle der HPRs in <i>Arabidopsis</i> .....	87
5.5. Ausblick .....	90
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>101</b>
7.1. Gesamtübersicht der Gaswechselfmessungen .....	101
7.2. Gesamtübersicht der HPLC-Analysen .....	103
7.3. Erweiterte Übersicht der Metabolomanalysen .....	105
7.4. Gesamtübersicht der Chlorophyllbestimmungen.....	107
7.5. Abbildungsverzeichnis .....	108
7.6. Tabellenverzeichnis .....	110
7.7. Abkürzungsverzeichnis .....	111
7.8. Danksagung .....	114
7.9. Erklärung .....	115
7.10. Lebenslauf .....	116

## 1. Zusammenfassung

Das bifunktionale Enzym Rubisco, eines der am häufigsten vorkommenden Proteine auf der Welt (Ellis, 1979), katalysiert sowohl die Carboxylierung als auch die Oxygenierung von Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP). Die Reaktion mit  $\text{CO}_2$  führt zur Bildung von 2 Molekülen 3 Phosphoglycerat (3PGA), welche in den Calvin-Zyklus eingehen und der Kohlenstoffassimilierung dienen. Die Reaktion mit Sauerstoff hingegen führt lediglich zur Bildung von einem Molekül 3PGA und zur Produktion eines Moleküls 2 Phosphoglykolat (2PG). Dieses Intermediat kann nicht direkt metabolisiert werden und ist toxisch für die Zellen, da es verschiedene Enzyme des Calvin-Zyklus inhibiert (Husic *et al.*, 1987; Norman und Colman, 1991). Durch die Photorespiration (C2-Zyklus) wird 2PG zu 3PGA recycelt und somit für die Zelle wieder nutzbar gemacht (Tolbert, 1997). Pflanzen bei denen an diesem Stoffwechselweg beteiligte Enzyme mutiert sind, können nicht mehr unter Normalluftbedingungen, sondern nur in Gegenwart erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen ( $> 0,15\%$ ) wachsen. Die Revertierung des letalen Effektes unter Normalluftbedingungen durch  $\text{CO}_2$ -Zugabe stellt den charakteristischen, photorespiratorischen Phänotyp dar (Somerville, 2001).

Die einzige Ausnahme von der bisher geltenden Regel scheint die Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR) zu sein. Mutation der peroxisomalen HPR1 (At1g68010), einem der Schlüsselenzyme des pflanzlichen C2-Zyklus, führt nicht zum letalen Phänotyp unter Normalluftbedingungen. Die korrespondierenden Mutanten (*hpr1-1* und *hpr1-2*) zeigen nur eine geringe Beeinflussung im Wachstum. Die photosynthetische Leistung ist zu etwa 25 % reduziert, sowie der Gehalt an Hydroxypyruvat (3HP) lediglich um das 8fache erhöht. Auf Enzymebene zieht der Ausfall der HPR1 drastische Konsequenzen nach sich, da es zu einer über 95 %igen Reduktion der HPR-Aktivitäten kommt, wobei die NADH-abhängige 3HP-Reduktion am stärksten betroffen ist. Dennoch wird deutlich, dass die Pflanzen noch um die 5 % Restaktivität besitzen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass es weitere Enzyme in den Pflanzen geben muss, welche zum Umsatz von 3HP befähigt sind. Da es jedoch im Peroxisom keine weiteren 3HP-umsetzenden Enzyme gibt, sprechen die gefundenen Ergebnisse für extraperoxisomale Reaktionen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Aufklärung dieser kompensatorischen Prozesse.

Unter Zuhilfenahme der *AtHPR1*-Mutanten und dem Einsatz verschiedener biochemischer Methoden der Proteinreinigung, wurde die HPR-Restaktivität aus den Pflanzen gereinigt und das korrespondierende Gen identifiziert. Durch Überexpression des identifizierten Leserahmens konnte gezeigt werden, dass das korrespondierende Protein in der Lage ist 3HP umzusetzen und somit funktionell als HPR agieren kann. Mutation der *AtHPR2* (At1g79870) führt zu keinen phänotypisch sichtbaren Veränderungen, jedoch zeigen die Pflanzen einen erhöhten  $\text{CO}_2$ -Kompensationspunkt und leicht erhöhte Gehalte an 3HP. Diese

Effekte sind im Vergleich zu den *AtHPR1*-Mutanten allerdings schwächer, was verdeutlicht, dass die HPR1 in *Arabidopsis* das Hauptenzym für die photorespiratorische 3HP-Umsetzung ist. Die Beeinflussung der photosynthetischen Leistung und des photorespiratorischen  $^{13}\text{C}$ -Fluxes zeigen allerdings, dass die *AtHPR2* funktionell an der Photorespiration beteiligt ist. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Photorespiration nicht, wie bisher angenommen, nur in den Chloroplasten, den Peroxisomen und den Mitochondrien stattfindet, sondern auch zytosolische Reaktionen beteiligt sind.

Da beide Einzelmutanten keinen klaren photorespiratorischen Phänotyp zeigen wird deutlich, dass die Gene vermutlich redundant sind. Die Kombination der HPR1- und der HPR2-Mutation führt zu drastischen Effekten. Die korrespondierende Doppelmutante zeigt eine stark erhöhte Sauerstoffsensitivität, sowie eine deutliche Reduktion des Wachstums. Die Pflanze ist zwar noch in der Lage unter Normalluftbedingungen zu wachsen, bildet jedoch unter diesen Bedingungen keine fertilen Samen mehr aus. Weiterhin ist die photosynthetische Leistung deutlich verringert, die Gehalte photorespiratorischer Intermediate klar erhöht und die HPR-Aktivitäten in den Pflanzen stark reduziert. Die beschriebenen Erscheinungen lassen sich durch die Anzucht unter erhöhten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen vollständig revertieren, was dafür spricht, dass alle gefundenen Effekte auf die Störung der Photorespiration zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse verdeutlichen weiterhin, dass beide HPRs an der Photorespiration beteiligt sind und die Hauptenzyme der 3HP-Umsetzung in *Arabidopsis* darstellen. Der genaue Mechanismus, welche den photorespiratorischen Flux durch das Peroxisom oder das Zytosol leitet ist bisher unbekannt. Eine entscheidende Rolle bei der Regulation spielt vermutlich die Verfügbarkeit von Redoxäquivalenten im Peroxisom.

Die Fähigkeit der HPR1/2-Doppelmutante unter Normalluftbedingungen zu wachsen legt nahe, dass in *Arabidopsis* mindestens ein weiteres Enzym vorhanden sein könnte, welches zum Umsatz von 3HP befähigt ist. Ausgehend von den HPR1- und HPR2-Proteinsequenzen wurde in der *Arabidopsis* Datenbank ein Sequenzvergleich (BLAST) durchgeführt und weitere Proteine identifiziert, welche potentiell in der Lage sind als HPR zu fungieren. Durch Überexpression des durch den Leserahmen At1g12550 (HPR3) kodierten Proteins konnte gezeigt werden, dass dieses ebenfalls in der Lage ist 3HP umzusetzen. Die Mutation der *AtHPR3* führt zu keinen phänotypisch sichtbaren Effekten. Die Kombination der HPR1-, HPR2- und HPR3-Mutation hingegen zieht eine weitere Reduktion der Wachstums und der photosynthetischen Leistung nach sich. Da jedoch die HPR1/2-Doppelmutante schon einen deutlichen zeigt, ist davon auszugehen, dass der Beitrag der HPR3 zur Photorespiration als eher gering einzuschätzen ist. Dennoch ist auch die HPR-Triple-Mutante noch in der Lage unter photorespiratorischen Bedingungen zu wachsen, was vermuten lässt, dass mindestens ein weiteres Enzym in *Arabidopsis* zum Umsatz von 3HP existiert. Weiterhin ist auch

denkbar, dass nicht der gesamte, in den C2-Zyklus eingehende Kohlenstoff zu 3PGA recycelt werden muss oder weitere Nebenwege existieren. Die Bedingungen, unter denen solche Nebenwege aktiv sind oder eine Rolle spielen sind bisher noch unklar und bedürfen weiterer Analysen. Am Beispiel der photorespiratorischen 3HP-/Glycerat-Interkonversion wird somit deutlich, dass der pflanzliche C2-Zyklus flexibler ist als bisher angenommen und dass das Zytosol als viertes subzelluläres Kompartiment ebenfalls berücksichtigt werden muss.

## 2. Einleitung

### 2.1. Die Photosynthese

Alle Lebewesen bestehen aus energiereichen, organischen Substanzen. Für deren Herstellung gibt es zwei Möglichkeiten, die heterotrophe und die autotrophe Lebensweise. Die heterotrophen Lebewesen, zu denen auch wir Menschen zählen, sind nicht in der Lage diese Verbindungen selber herzustellen und somit auf die externe Versorgung angewiesen. Durch die Aufnahme und anschließende Oxidation der organischen Verbindungen, gewinnen sie die notwendige Energie, welche für alle Lebensprozesse erforderlich ist. Höhere Pflanzen, Algen und einige Prokaryoten zählen zu den autotrophen Lebewesen. Sie sind in der Lage durch die Photosynthese aus anorganischen Verbindungen wie  $\text{CO}_2$ , Sulfat und Nitrat organische herzustellen, wobei sie das Sonnenlicht als Energiequelle nutzen. Neben der Produktion von energiereichen, organischen Verbindungen setzen photosynthetische Organismen Sauerstoff durch die Spaltung von Wasser frei, ohne den das heutige Leben nicht möglich wäre. Die Photosynthese stellt somit den essentiellsten biogeochemischen Prozess dar, von dem jegliches Leben auf der Erde auf direkte oder indirekte Weise abhängig ist.

Der Prozess der Photosynthese findet bei Pflanzen in den Chloroplasten statt und lässt sich in zwei Teile untergliedern, Licht- und Dunkelreaktion. In Abbildung 2-1 ist der Zusammenhang zwischen den beiden Reaktionen schematisch dargestellt. In der Lichtreaktion (Thylakoid-Reaktion) entsteht zum einen Reduktionskraft in Form von Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat (NADPH) und zum anderen chemische Energie als Adenosintriphosphat (ATP). Die notwendige Sonnenenergie für die Spaltung von Wasser wird vornehmlich durch Chlorophylle und Carotenoide nutzbar gemacht. Diese Chromophoren sind in Proteinkomplexen gebunden und befinden sich in den Thylakoidmembranen. Dort bilden sie spezielle Antennen, die auch als *light harvesting complexes* (LHC) bezeichnet werden oder sind mit Elektronen-Transportern in den Photosystemen assoziiert. In Pflanzen kommen diese in zwei Formen vor, welche sich vor allem in den Absorptionseigenschaften ihrer Reaktionszentren unterscheiden. Das Photosystem II (PSII) hat ein Absorptionsmaximum bei 680 nm, das PSI hingegen bei 700 nm. Beide Photosysteme sind Bestandteile einer Elektronentransportkette und dienen dazu, mit Hilfe der Lichtenergie Elektronen anzuregen und auf  $\text{NADP}^+$  zu übertragen, wobei Reduktionskraft (NADPH) entsteht. Die dabei abgegebenen Elektronen werden durch die Spaltung des Wassers ersetzt. An der Membran wird gleichzeitig ein Protonengradient aufgebaut, der der Konservierung von chemischer Energie in Form von ATP dient.

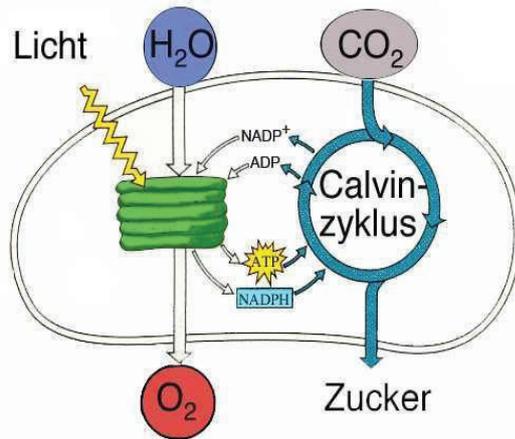


Abbildung 2-1 Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese.

Die Absorption der Sonnenenergie führt zur Auslösung einer Elektronentransportkette in den Thylakoiden. Dabei wird NADP<sup>+</sup> reduziert und ATP gebildet. Des Weiteren wird aus der Spaltung des Wassers Sauerstoff frei. In der Dunkelreaktion wird CO<sub>2</sub> durch die Rubisco fixiert und Zucker hergestellt. Dabei werden die lichtabhängig gebildeten Reduktionsäquivalente und ATP verwendet.

In der Dunkelreaktion werden die erzeugten Reduktionsäquivalente (NADPH) und die chemische Energie (ATP) für die Fixierung von CO<sub>2</sub> verwendet (Lawlor, 2001). Dieser Prozess findet im Stroma der Chloroplasten statt und wird auch als Calvin-Zyklus (C<sub>3</sub>-Zyklus) bezeichnet. Das entscheidende Enzym für diesen 3-Schrittprozess ist die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco, EC 4.1.1.39). Durch die Carboxylierungsreaktion des Enzyms (Schritt 1) wird CO<sub>2</sub> auf das primäre Akzeptormolekül Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) übertragen, wobei ein instabiles C<sub>6</sub>-Intermediat entsteht. Dieses Molekül zerfällt anschließend in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3-PGA). Unter der Verwendung der in der Lichtreaktion gebildeten NADPH- und ATP-Moleküle wird nun 3-PGA zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) umgewandelt und dient als Grundgerüst für die Herstellung von Zuckern und verschiedener anderer Makromoleküle. Die Synthese der Kohlenhydrate (Schritt 2) beginnt mit der Umwandlung der G3P-Moleküle in Dihydroxyacetonphosphate (DHAP) durch die Triosephosphat-Isomerase. Die beiden Triosen G3P und DHAP kondensieren zu Fruktose-1,6-bisphosphat, welches anschließend in Fruktose-6-Phosphat (F6P) umgesetzt wird. Das erzeugte F6P bildet den Ausgangspunkt für die Synthese verschiedener Kohlenhydrate. Weiterhin ist für den stetigen Ablauf des photosynthetischen Prozesses die Regeneration von RuBP (Schritt 3) essentiell. Durch eine Reihe von Reaktionen werden ein Teil des zuvor gebildeten Fruktose-6-Phosphats und eine Vielzahl an G3P-Moleküle verwendet, um den primären Akzeptor zu regenerieren. In der Dunkelreaktion entstehen zusätzlich die Moleküle NADP<sup>+</sup> und Adenosindiphosphat (ADP), welche somit ebenfalls regeneriert und der Lichtreaktion erneut zugeführt werden können. Die Abbildung 2-2 zeigt einen schematischen Überblick der im C<sub>3</sub>-Zyklus ablaufenden Reaktionen.

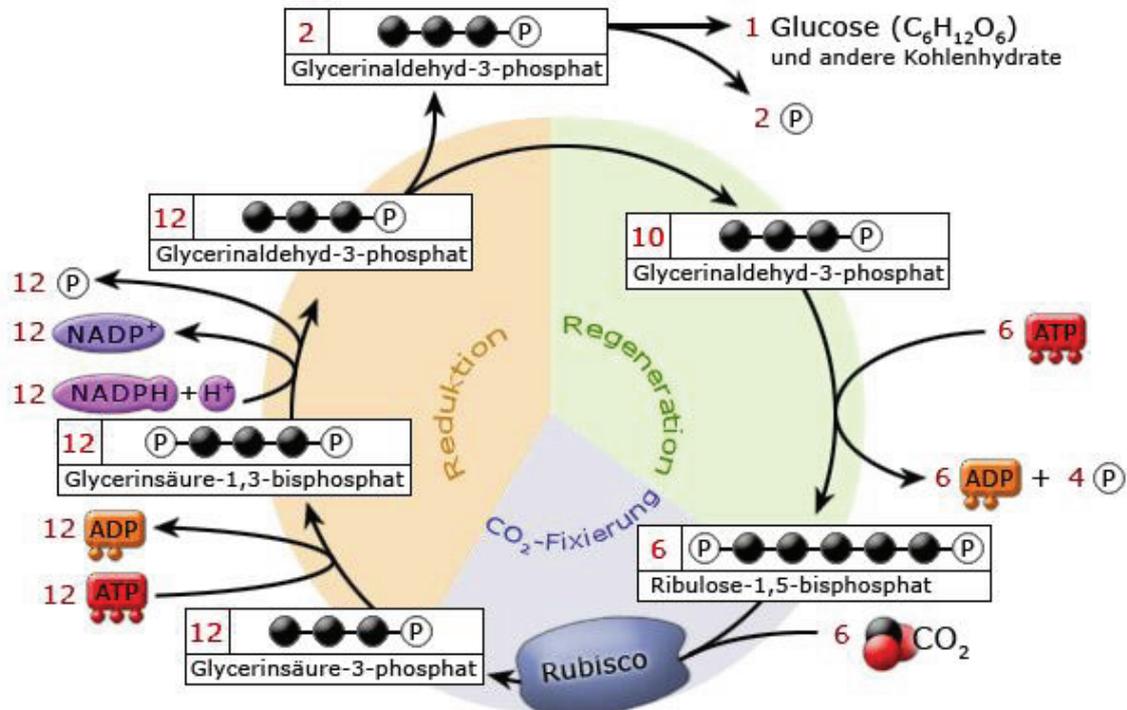


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus.

Durch die Carboxylierungsreaktion der Rubisco werden 2 Moleküle 3-PGA gebildet, welche während des C3-Zyklus fixiert und zu RuBP recycelt werden. Der Energieaufwand zur Fixierung von 6 CO<sub>2</sub>-Molekülen beträgt 18 ATP und 12 NADPH. Der Zyklus lässt sich in 3 Teile untergliedern. (1) CO<sub>2</sub>-Fixierung – aus Kohlendioxid und Ribulose-1,5-Bisphosphat entstehen 2 Moleküle 3-PGA. (2) Reduktion des 3-PGA zu Triosephosphaten, unter Verwendung der in der Lichtreaktion gebildeten NADPH und ATP Moleküle. (3) Regeneration des primären Akzeptormoleküls, sowie Synthese von Stärke in den Chloroplasten (Die Grafik wurde entnommen von: [www.lukashensel.defotosek.jpg.jpg](http://www.lukashensel.defotosek.jpg.jpg)).

Die Rubisco stellt das Schlüsselenzym für die Photosynthese dar und ist der Ausgangspunkt für die Synthese von organischem Kohlenstoff auf der Erde. Wie zuvor beschrieben, ist sie in der Lage atmosphärisches CO<sub>2</sub> in einer irreversiblen Reaktion zu fixieren, was den Aufbau von Biomasse ermöglicht. Das Enzym ist eines der größten in der Natur vorkommenden Proteine und besteht in Pflanzen und Cyanobakterien aus 16 Untereinheiten, 8 kleine und 8 große Monomere. Bei der Größe der Untereinheiten gibt es je nach Spezies unterschiedliche Molekularmassen von 12 bis 18 kDa für die kleinen und 51 bis 58 kDa für die großen Untereinheiten. Die aktiven Zentren der Rubisco befinden sich in den großen Untereinheiten und man nimmt an, dass die kleinen für die Komplexbildung notwendig sind (Heldt, 2003). Jedoch besteht die Rubisco einiger Prokaryoten lediglich aus großen Untereinheiten, was darauf schließen lässt, dass die kleinen nicht unbedingt notwendig sind. Allerdings ist das mengenmäßig meistvertretende Enzym auf der Erde (Ellis, 1979) nicht perfekt. Neben der zuvor beschriebenen Carboxylierungsreaktion katalysiert die Rubisco ebenfalls eine Oxygenierungsreaktion (Bowes *et al.*, 1971). Die Oxygenierung des RuBP liefert lediglich ein Molekül 3-PGA und ein Molekül 2-Phosphoglykolat (2-PG). Das 2-PG kann nicht in den

Calvin-Zyklus eingehen und ist toxisch, da es z.B. die Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1) inhibiert (Husic *et al.*, 1987; Norman und Colman, 1991). Dieses toxische Nebenprodukt wird durch die Photorespiration (C2-Zyklus, 2-PG Stoffwechsel) abgebaut. CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> konkurrieren vermutlich um die gleiche Bindungsstelle und inhibieren die jeweils andere Reaktion. Als das Protein vor rund 3,5 Milliarden Jahren entstand (Sage, 2004), spielte die Oxygenaseaktivität keine Rolle, da zu diesem Zeitpunkt kein Sauerstoff in der Erdatmosphäre vorhanden war. Es bestand somit kein Selektionsdruck gegen diese Funktion. Durch eine steigende Anzahl von Sauerstoffproduzenten veränderte sich vor ca. 500 Millionen Jahren die Situation (Sharkey, 2001). Der O<sub>2</sub> Gehalt stieg und die CO<sub>2</sub> Konzentration sank, so dass der Anteil der Oxygenasereaktion zunahm und die Photosyntheseleistung sank. Die Affinität der Rubisco für CO<sub>2</sub> ist zwar deutlich höher als die für O<sub>2</sub>, jedoch weist die heutige Atmosphäre einen solch hohen O<sub>2</sub>-Gehalt auf, dass ca. jede 3. bis 4. Reaktion der Rubisco eine Oxygenierung ist. Ein weiterer Faktor der sich negativ auf die Rubisco auswirkt ist die Temperatur. Steigt diese an, nimmt die Geschwindigkeit der Oxygenasefunktion schneller zu, als die der Carboxylierungsreaktion. In den meisten Fällen wirkt sich die künstliche Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre positiv auf das Pflanzenwachstum aus, da sich die Oxygenaseaktivität auf diesem Wege unterdrücken lässt. Jedoch ist dieser Fakt nur für die Anzucht in geschlossenen Räumen interessant und für das Wachstum auf dem Feld nicht zu realisieren.

## 2.2. Die Photorespiration

Die Photorespiration oder auch der pflanzliche C2-Zyklus (Tolbert, 1997) ist einer der Hauptstoffwechselwege im pflanzlichen Primärstoffwechsel. Seinen Ursprung findet der C2-Zyklus in der oben beschriebenen Bifunktionalität der Rubisco, die bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff 2-Phosphoglykolat (2-PG) produziert. Dieses Nebenprodukt ist toxisch wenn es von der Zelle nicht abgebaut wird, da es verschiedene Enzyme des Calvin-Zyklus inhibiert (Husic *et al.*, 1987; Norman und Colman, 1991). Durch die Photorespiration wird 2-PG wieder zu 3-PGA regeneriert und dem Calvin-Zyklus zur Verfügung gestellt. Dabei werden ca. 75 % des primär verloren gegangenen Kohlenstoffs zurückgewonnen. Neben dieser Auffüllreaktion dient die Photorespiration der Entgiftung von toxischen Intermediaten (Eisenhut *et al.*, 2007) und dem Schutz vor Photoinhibition (Takahashi *et al.*, 2007). Weitere diskutierte Funktionen sind die Beteiligung am Aminosäure-Metabolismus (Keys, 2006), der C1-Biosynthese und der Stressabwehr (Wingler *et al.*, 2000 und Moreno *et al.*, 2005). Diese Eigenschaft macht den C2-Zyklus zu einem essentiellen Stoffwechselweg, der überlebenswichtig für die Pflanzen in der heutigen Atmosphäre ist.

### 2.2.1. Biochemie der Photorespiration

Der pflanzliche C2-Zyklus erfordert das Zusammenspiel von mindestens 11 Enzymen, welche in 3 verschiedenen, subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Chloroplast, Peroxisom und Mitochondrium). Durch die Oxygenasefunktion der Rubisco kommt es zur Bildung von 2-PG im Chloroplasten, welches ohne den C2-Zyklus als Kohlenstoff verloren gehen und die Zelle vergiften würde. Das 2-PG wird zu Beginn durch die chloroplastidäre Phosphoglykolat-Phosphatase (PGLP, EC 3.1.3.18) dephosphoryliert und zu Glykolat hydrolysiert. Das Glykolat wird anschließend in die Peroxisomen transportiert und von der Glykolat-Oxidase (GOX, EC 1.1.3.15) zu Glyoxylat (Glx) oxidiert. Bei der Glykolat-Oxidase handelt es sich um ein Flavinmononukleotid (FMN) abhängiges Enzym. Es überträgt Elektronen vom Glykolat auf Sauerstoff, wodurch es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), in Form von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) kommt. Das anfallende  $H_2O_2$  wird gleichzeitig durch die peroxisomale Katalase (CAT, EC 1.11.1.6) zu  $H_2O$  entgiftet. Die Katalase nimmt somit eine wichtige Nebenfunktion im C2-Zyklus ein, da sie für eine Balance zwischen photorespiratorischer  $H_2O_2$  Produktion und dessen Entgiftung sorgt (Queval *et al.*, 2007). Da Wasserstoffperoxid an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, ist dieses Gleichgewicht sehr wichtig für den Zellhaushalt und vor allem bei der Stressabwehr. Glyoxylat kann im Folgenden entweder durch die Serin:Glyoxylat Aminotransferase (AGT1, EC 2.6.1.45) oder die Glutamat:Glyoxylat Aminotransferase (GGT, EC 2.6.1.4) zu Glycin transaminiert werden. Glycin wird anschließend in die Mitochondrien transportiert, wo zwei Moleküle durch das Zusammenwirken der Glycin-Decarboxylase (GDC, EC 1.4.4.2) und der Serinhydroxymethyltransferase (SHMT1, EC 2.1.2.1) zu Serin umgesetzt werden. Während dieser Reaktion werden  $NH_3$  und  $CO_2$  freigesetzt. An dieser Stelle wird deutlich, dass der photorespiratorische Kohlenstoffmetabolismus im Blatt mit dem Stickstoffmetabolismus gekoppelt ist. Da vor allem bei hohen Flussraten die Freisetzung von  $NH_3$  sehr hoch sein kann, ist die Reassimilation ein sehr wichtiger Prozess. Die hierfür verantwortlichen Enzyme sind zum einen die Glutamin-Synthetase (GS-2, EC 6.3.1.2) und zum anderen die Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1). Der Prozess ist sehr effizient und essentiell für die Aufrechterhaltung des Stickstoffhaushaltes in Pflanzen (Mattson *et al.*, 1997; Jamai *et al.*, 2009). Die Freisetzung von  $CO_2$  während der GDC-Reaktion stellt allerdings einen Verlust an primär fixiertem Kohlenstoff da. Darüber hinaus werden für die Refixierung von  $NH_3$  und  $CO_2$  große Mengen an ATP und NADH benötigt. Das erzeugte Serin wird anschließend zurück in die Peroxisomen transportiert und durch die AGT1 zu 3-Hydroxypyruvat (3-HP) umgewandelt. Die Hydroxypyruvatreduktase (HPR, EC 1.1.1.29) reduziert das 3-HP dort NADH-abhängig zu D-Glycerat. Die dafür benötigten Reduktionsäquivalente (NADH) werden durch das Malat/Oxalacetat-Shuttle zur Verfügung gestellt, da die Membran der Peroxisomen dafür nicht permeabel ist. Glycerat wird

anschließend in den Chloroplasten eingeschleust, durch die Glyceratkinase (GLYK, EC 2.7.1.31) zu 3-PGA phosphoryliert und im Folgenden im Calvin-Zyklus zu Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP) umgesetzt. Die Rückgewinnung des primär verloren gegangenen Kohlenstoffs beträgt allerdings nur 75 %, da 25 % des eingehenden Kohlenstoffs durch die GDC-Reaktion als CO<sub>2</sub> freigesetzt werden. Die Abbildung 2-3 zeigt eine schematische Übersicht der Prozesse des pflanzlichen C2-Zyklus.

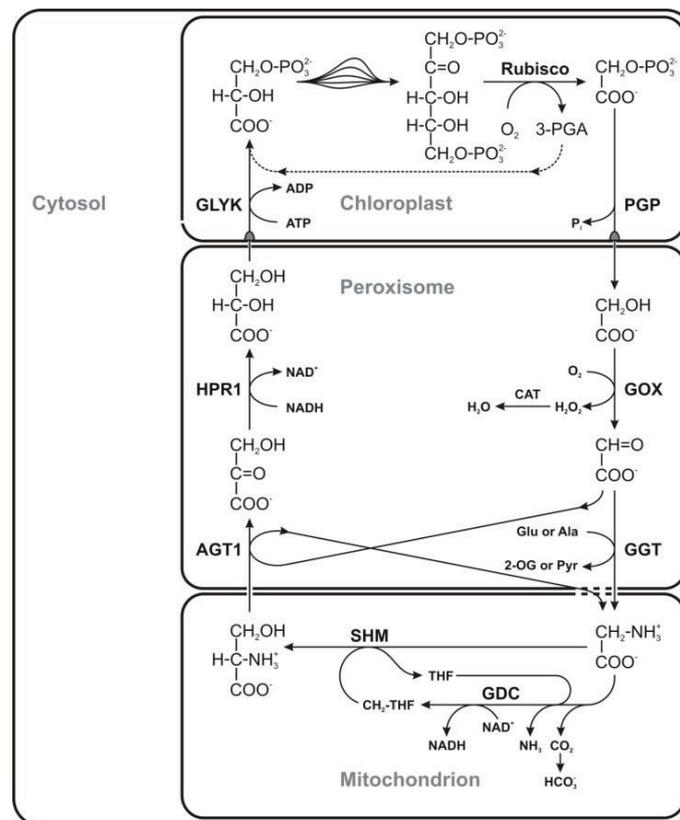


Abbildung 2-3 Schema des pflanzlichen C2-Zyklus

Die einzelnen Reaktionen finden in 3 subzellulären Kompartimenten statt, den Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien. Dargestellt sind die Kernenzyme des Zyklus (Rubisco Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, PGP 2-Phosphoglykolat-Phosphatase, GOX Glykolat-Oxidase, CAT Katalase, GGT Glu:Glyoxylat Aminotransferase, GDC Glycin-Decarboxylase, SHM Serin-Hydroxymethyltransferase, AGT1 Serin:Glyoxylat Aminotransferase, HPR1 3-Hydroxypyruvat-Reduktase, GLYK D-Glycerat-3-Kinase).

Durch die intensive Analyse des pflanzlichen C2-Zyklus konnte in den vergangenen Jahren nicht nur ein wesentlicher Fortschritt über die beteiligten Enzyme, sondern auch über die Transportprozesse gewonnen werden. Wie bereits erwähnt erfordert der C2-Zyklus durch seine subzelluläre Kompartimentierung auch das Vorhandensein verschiedener Metabolitranslokatoren (ca. 14-18 für einen funktionellen C2-Zyklus). Von der geforderten Anzahl an Membrantransportern sind bis jetzt lediglich 4 bekannt. Zum Einen ein Porin-

ähnlicher-Kanal in der Peroxisomenmembran, welcher die Diffusion von anionischen C2-Zyklus Metaboliten wie z.B. Glykolat, Glycerat, Glutamin, Malat, Oxalacetat und  $\alpha$ -Ketoglutarat erlaubt. Dieser kommt jedoch nicht für Zwitterionen wie Glycin und Serin in Frage. Zum Anderen konnte in der Chloroplastenmembran ein Glykolat/Glycerat-Transporter biochemisch charakterisiert und zwei Dicarboxylat-Transporter (Somerville und Ogren, 1983) identifiziert werden. Jedoch ist anhand der Anzahl bisher identifizierter Transporter zu erkennen, dass die genauen Prozesse nach wie vor nicht gut verstanden und das Wissen über die Transportprozesse sehr limitiert ist (Reumann und Weber, 2006).

### 2.2.2. Mutanten und Genetik der Photorespiration

Die Photorespiration und alle beteiligten Enzyme stellen seit Jahren ein wichtiges Untersuchungsobjekt für die Wissenschaft dar. Die ersten *Arabidopsis*-Mutanten mit defekter Photorespiration konnten durch Sommerville und Ogren mittels einer chemischen Mutagenese-Methode isoliert werden (Somerville, 2001). Dabei werden *Arabidopsis*-Samen mit Ethylmethansulfonat (EMS) behandelt. Diese Substanz ist mutagen und führt zu zufälligen Mutationen in DNA-Doppelsträngen. In den meisten Fällen führen diese Veränderungen bei der DNA-Replikation zu Punktmutationen, welche dann bei der Translation des entsprechenden Gens zu fehlerhaften Proteinen führen können. Des Weiteren machte man sich den Vorteil zu Nutze, dass Mutanten im C2-Zyklus letal sind, wenn sie in Normalluft angezogen werden (Somerville, 2001). Durch Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft (> 0,15 %) und somit der Verminderung der Oxygenasefunktion der Rubisco ist es jedoch möglich, die Mutanten zu kultivieren. Werden die entsprechenden Pflanzen unter diesen Bedingungen angezogen, sind sie von Wildtyppflanzen nicht zu unterscheiden. Nach Transfer in normale Luft, zeigen sie jedoch deutliche Mangel- und Stresserscheinungen, sowie Chlorosen. Werden die Mutanten nach Eintritt der negativen Erscheinungen wieder in erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentrationen überführt, revertieren sie und wachsen normal. Diese Eigenschaft wird als photorespiratorischer Phänotyp bezeichnet. Nach Verifizierung des entsprechenden Phänotyps mussten anfänglich jedoch eine Vielzahl an Experimenten durchgeführt werden, um den exakten Gendefekt durch Markeranalysen zu identifizieren. Bei der phänotypischen Charakterisierung bediente man sich vor allem radioaktiver Markierungsexperimente und Enzym-Essays, wodurch im Laufe der Jahre einige Mutanten für photorespiratorische Enzyme und Transporter verschiedener Pflanzenarten isoliert und identifiziert werden konnten (z.B. Gerste, Tabak und Erbse).

Deutlich vereinfacht hat die Isolierung und Charakterisierung von Mutanten die Etablierung einer weiteren Methode der Mutagenese, dem *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltem T-DNA-Genstransfer (Somerville, 2001). Das pflanzenpathogene Ackerbakterium zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, auf natürlichem Wege DNA stabil und an zufälligen Orten ins

Genom pflanzlicher Zellen übertragen zu können. Dabei wichtig sind lediglich spezielle Grenzbereiche der T-DNA, der so genannten Border-Sequenzen (LB – left border und RB – right border). In der Regel führt die Insertion der T-DNA in einen codierenden Genbereich zum vollständigen Verlust der Genaktivität und somit dazu, dass das entsprechende Protein nicht mehr gebildet wird (Lindsey *et al.*, 1996). Da auch diese Methode nicht zielgerichtet ist, sind zur Lokalisation der Fragmente Kenntnisse über die T-DNA und das Wirtsgenoms unerlässlich. Da es sich bei *Arabidopsis* jedoch um einen Organismus mit vollständig bekannter Genomsequenz handelt (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), stehen alle dafür notwendigen Informationen zur Verfügung. Mittlerweile sind für fast jedes der ca. 30000 Gene von *Arabidopsis* Mutanten generiert worden. Diese sind frei verfügbar und können aus so genannten 'Stock Centers', wie z.B. dem SALK-Institut (La Jolla, USA) bestellt werden. Diese Tatsache bildet den Ausgangspunkt für die reverse Genetik, da man gezielt veränderte Genotypen herstellen (Alonso *et al.*, 2003) und somit auf die Funktion des defekten Gens Rückschlüsse ziehen kann. Durch diesen Ansatz ist es in den letzten Jahren gelungen, die Gene der am C2-Zyklus beteiligten Enzyme zu identifizieren (siehe Tabelle 2-1) und für die meisten definierte Mutanten zu isolieren. Ausgehend von einem exakten Gendefekt kann dann der Verlust des codierenden Proteins biochemisch untersucht und der resultierende Phänotyp aufgeklärt werden.

Die *Arabidopsis*-Mutanten mit einem Gendefekt in der PGLP1, GGT1, SHM1, AGT1 und GLYK (Schwarte und Bauwe 2007, Igarashi *et al.*, 2003, Voll *et al.*, 2006, Liepman und Olsen, 2001 und Boldt *et al.*, 2005) zeigen den zuvor beschriebenen photorespiratorischen Phänotyp und sind somit eindeutig im C2-Zyklus defekt. Die Mutation in den entsprechenden Genen ist unter Normalluft letal, kann jedoch durch erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Luft revertiert werden. Das lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Proteine ausschließlich an der Photorespiration beteiligt sind. Bei den Komponenten der GDC zeigt sich hingegen ein deutlicher Unterschied. Hierbei handelt es sich um einen Multienzymkomplex, der sich aus 4 verschiedenen Untereinheiten, dem P, T, H und L Protein zusammensetzt. Erschwerend kommt hinzu, dass für einige der Untereinheiten mehrere Gene kodieren, die sich gegenseitig ersetzen. Der vollständige Verlust des P-Proteins, welches in *Arabidopsis* durch 2 Gene kodiert wird, ist letal (Engel *et al.*, 2007). Auch die Anzucht unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (1 %) führt nicht zur Revertierung dieses Phänotyps, was darauf schließen lässt, dass die Glycinecarboxylase auch an anderen Prozessen außerhalb der Photorespiration beteiligt ist. Die wichtigste Funktion hierbei ist die Beteiligung am C1-Stoffwechsel, in dem die GDC durch die Bereitstellung von Methylentetrahydrofolat (M-THF) involviert ist. Pflanzen mit reduzierten T-Protein-Gehalten zeigen deutliche Stresserscheinungen und Chlorosen, lassen sich jedoch durch erhöhte CO<sub>2</sub>-Gehalte teilweise komplementieren (Engel *et al.*, 2008). Der vollständige Knock-out des

T-Proteins ist jedoch ebenfalls letal in *Arabidopsis*, was die Vermutung von weiteren, essentiellen Funktionen des GDC für die Pflanze unterstützt. Der gleiche Sachverhalt trifft auch auf die H- und L-Protein-Untereinheiten zu. Für beide Proteine existieren Isoformen in heterotrophen Geweben, was die Beteiligung an anderen Prozessen in der Zelle verdeutlicht. Das Problem der Redundanz führt darüber hinaus dazu, dass bisher keine *Arabidopsis* Mutanten der Glykolat-Oxidase (GOX) mit photorespiratorischem Phänotyp isoliert werden konnten. In *Arabidopsis* kodieren 5 Gene für dieses Protein und die entsprechenden Einzelmutanten zeigen keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Spitschak, Diplomarbeit, 2007). Dass die GOX jedoch eine essentielle Funktion im pflanzlichen C2-Zyklus einnimmt konnte interessanterweise zunächst an der C4-Pflanze Mais und später auch bei Reis gezeigt werden. In beiden Fällen führt eine Reduktion der GOX-Gehalte, durch induzierbare RNAi-Systeme, zum beschriebenen photorespiratorischen Phänotyp (Zelitch *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009). Vor allem der Befund aus Mais lässt darauf schließen, dass die Bedeutung der Photorespiration für Pflanzen universeller ist als bisher vermutet. Lange Zeit nahm man an, dass C4-Pflanzen aufgrund der besonderen Form der Photosynthese und der Anreicherung von CO<sub>2</sub> in unmittelbarer Nähe zur Rubisco keine Photorespiration betreiben oder dieser Stoffwechselweg nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Der Befund, dass reduzierte Gehalte der Glykolat-Oxidase in Mais einen photorespiratorischen Phänotyp nach sich ziehen, lässt dagegen vermuten, dass die vorliegende Meinung jedoch nicht umfassend genug ist. Eine weitere Ausnahme stellt die peroxisomale HPR1 dar, welche in *Arabidopsis* durch ein *single copy*-Gen kodiert wird. Da in früheren Screeningexperimenten keine Mutante für dieses Gen isoliert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass der vollständige Verlust entweder letal ist oder dieser Schritt umgangen werden kann. Allerdings konnte Ende der 80iger Jahre eine Gerste-Mutante mit reduzierten HPR-Aktivitäten isoliert werden. Neben dieser Eigenschaft wiesen weitere Indizien wie z.B. ein Anstau des Serins darauf hin, dass es sich hierbei um eine Mutante mit Defekt in der peroxisomalen HPR handelt. Allerdings ist der genaue Gendefekt in dieser Pflanze bis heute ungeklärt (Murray *et al.*, 1989; Kleczkowski *et al.*, 1990).

Tabelle 2-1 Zusammenfassung der am C2-Zyklus beteiligten Gene

Dargestellt sind die beteiligten Enzyme und deren kodierende Gene in *Arabidopsis thaliana*. Für die fett gedruckten Genloci konnte die Beteiligung an der Photorespiration experimentell eindeutig nachgewiesen werden.

Enzym	Gen	TAIR Code	Lokalisation	Referenz
2PG Phosphatase	AtPGLP1	<b>At5g36790</b>	Chloroplast	Schwarte und Bauwe, 2007
Glykolat Oxidase	AtGOX1 AtGOX2 AtGOX3 AtHAOX1 AtHAOX2	At3g14420 At3g14415 At4g18360 At3g14130 At3g14150	Peroxisom Peroxisom Peroxisom Peroxisom Peroxisom	Reumann <i>et al.</i> , 2004
Ser:Glx Aminotransferase	AtAGT1	<b>At2g13360</b>	Peroxisom	Liepmann und Olson, 2001
Glu:Glx Aminotransferase	AtGGT1	<b>At1g23310</b>	Peroxisom	Igarashi <i>et al.</i> , 2003
GDC P-Protein	AtGLDP1 AtGLDP2	At4g33010 At2g26080	Mitochondrium Mitochondrium	Engel <i>et al.</i> , 2007
GDC H-Protein	AtGLDH1 AtGLDH2 AtGLDH3	At2g35370 At2g35120 At1g32470	Mitochondrium Mitochondrium Mitochondrium	Srinivasan und Oliver, 1992
GDC T-Protein	AtGLDT1	<b>At1g11860</b>	Mitochondrium	Engel <i>et al.</i> , 2008
GDC L-Protein	AtGLDL1 AtGLDL2	At3g17240 At1g48030	Mitochondrium Mitochondrium	Lutziger und Oliver, 2001
Ser:Hydroxymethyltransferase	AtSHM1 AtSHM2	<b>At4g37930</b> At5g26780	Mitochondrium Mitochondrium	Voll <i>et al.</i> , 2006
Hydroxypyruvat-Reduktase	AtHPR1	<b>At1g68010</b>	Peroxisom	Timm <i>et al.</i> , 2008
Glycerat-Kinase	AtGLYK	<b>At1g80380</b>	Chloroplast	Boldt <i>et al.</i> , 2005

### 2.2.3. Assoziierte Prozesse und genetische Manipulation der Photorespiration

Ein weiteres Ziel der Forschung am pflanzlichen C2-Zyklus stellt die Identifizierung assoziierter Prozesse und alternativer Enzyme dar. Bisher konnte zusätzlich zur peroxisomalen Glykolat-Oxidase, eine Glykolat-Dehydrogenase in Mitochondrien gefunden werden, welche funktionell an der Photorespiration beteiligt sein könnte (Bari *et al.*, 2004; Niessen *et al.*, 2007). Auch für Glyoxylat wurden eine Reihe weiterer Umsatzmöglichkeiten

vermutet. Dieses Intermediat kann unter anderem durch die NADPH-abhängige Glyoxylat-Reduktase in Glykolat zurück reduziert werden (Tolbert *et al.*, 1970; Kleczkowski *et al.*, 1986, 1990). Weitere Möglichkeiten sind entweder die Oxidation zu Oxalat (Richardson und Tolbert, 1961; Halliwell und Butt, 1974) oder die Decarboxylierung zu Format (Zelitch, 1972). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Akkumulation der Ferredoxin-abhängigen Glutamat-Synthase im Mitochondrium für die Aktivität der photorespiratorischen Serinhydroxymethyltransferase erforderlich ist (Jamai *et al.*, 2009). Einige photorespiratorische Metabolite, wie zum Beispiel Glycin, dienen als Vorstufen für die Synthese anderer Stoffwechselprodukte wie Glutathion (Noctor *et al.*, 1998, 1999). Diese und weitere Möglichkeiten sprechen für die Flexibilität und Offenheit des photorespiratorischen Metabolismus (Wingler *et al.*, 2000).

Ein weiteres wichtiges Ziel der Wissenschaft ist seit langem die Verbesserung der Photosyntheseleistung. Hierbei bietet unter anderem auch die Photorespiration einen möglichen Ansatzpunkt. So konnten Kebeish und Mitarbeiter 2007 zeigen, dass die Integration eines bakteriellen Glyceratweges (bestehend aus Glykolat-Dehydrogenase, Glyoxylat-Carboligase und Tartronsäure-Semialdehyd-Reduktase) in den Chloroplasten zur Steigerung des Wachstums von *Arabidopsis* führt. Durch die Einführung des alternativen Weges in den Chloroplasten, sollte zum einen den Fluss durch die GDC und dem damit verbundenen CO<sub>2</sub>-Verlust im Mitochondrium reduziert und zum anderen CO<sub>2</sub> in unmittelbarer Nähe zur Rubisco freigesetzt werden. Die erzeugten Pflanzen zeigten ein schnelleres Wachstum, gesteigerte Biomasse und enthielten mehr lösliche Zucker. Diese Eigenschaften sprechen für eine reduzierte Photorespiration und eine erhöhte Photosyntheseleistung (Kebeish *et al.*, 2007). Die Unterstützung des C2-Zyklus wirkt sich dementsprechend positiv auf die pflanzliche Produktivität aus. Der Versuch die Photorespiration vollständig zu unterdrücken oder zu eliminieren ist bisher nicht gelungen. Weiterhin unterstreicht die zuvor genannte Tatsache eines funktionell aktiven C2-Zyklus in C4-Pflanzen und die essentielle Funktion der Photorespiration in Cyanobakterien (Eisenhut *et al.*, 2008) die Wichtigkeit dieses Stoffwechselweges für alle oxygene Photosynthese betreibende Organismen.

### **2.3. Kenntnisstand zu pflanzlichen Hydroxypyruvat-Reduktasen**

Die meisten Landpflanzen produzieren täglich große Mengen an Hydroxypyruvat (3HP) durch die Photorespiration. Nach der generell akzeptierten Meinung, wird dieses vorrangig durch die peroxisomale HPR1 (HPR1; EC 1.1.1.29) metabolisiert. Die HPR1 stellt somit eines der Schlüsselenzyme des pflanzlichen C2-Zyklus da. Sie ist allerdings nicht nur an der Photorespiration beteiligt, sondern ein ubiquitäres Enzym im Primärstoffwechsel vieler pro- und eukaryotischer Organismen (Säugetiere, Pflanzen und Bakterien). Zum Beispiel ist es in

methano- und methylo-trophen Bakterien am Serin-Weg (Hanson und Hanson, 1996; Vorholt, 2002) beteiligt. Bei anderen Bakterien spielt das Enzym im Abbau von Tartrat eine wichtige Rolle (Kohn, 1968). In Tieren ist die enzymatische Reaktion der HPR in der Glukoneogenese zu finden (Xue *et al.*, 1999). Im Menschen ist die HPR vor allem im Zytosol der Leber zu finden, wo sie den Umsatz von Glyoxylat zu Glykolat, sowie die Reduktion von 3HP zu D-Glycerat (NADH-abhängig) gewährleistet. Eine Dysfunktion führt hier zu schweren Schädigungen der Niere und zur Bildung von Nierensteinen (Leumann und Hoppe, 2001), was die Wichtigkeit dieses Enzyms hervorhebt.

Die pflanzliche Hydroxypyruvat-Reduktase stellt eines der am besten beschriebenen Enzyme da. In den 50iger Jahren wurde es erstmals gereinigt, kristallisiert und charakterisiert (Stafford *et al.*, 1954; Zelitch, 1955; Zelitch und Gotto, 1962). Neben der Reduktion von 3HP ( $K_m \sim 0,1 \text{ mM}$ ) konnte ebenfalls ein enzymatischer Umsatz von Glyoxylat (Glx,  $K_m \sim 20 \text{ mM}$ ) gemessen werden. Aufgrund der Nebenreaktion mit Glx wurde es zu Beginn als Glyoxylat-Reduktase (GR) bezeichnet. Da für diese Reaktion ein sehr hoher  $K_m$ -Wert festgestellt werden konnte, wurde dieser Reaktion keine physiologische Relevanz für den pflanzlichen Stoffwechsel zugeschrieben (Givan und Kleczkowski, 1992). Das Substrat der HPR1 entsteht während des C2-Zyklus durch Transaminierung von Serin. Hierfür verantwortlich ist die Serin:Glyoxylat Aminotransferase (AGT1; siehe Abbildung 2-3). Die native HPR1 besteht aus zwei identischen Untereinheiten von 41-44 kDa und verwendet NADH als präferenziellen Co-Faktor. Sie ist peroxisomal lokalisiert und trägt die hierfür typische PTS1-Lokalisationssequenz (SKL am C-Terminus, Reumann, 2004a; Reumann *et al.*, 2004b). In diesem subzellulären Kompartiment bildet sie zusammen mit der Glykolat-Oxidase, der Katalase und der Malat-Dehydrogenase einen Multienzymkomplex. Dieser sorgt für einen optimalen Fluss der Metabolite durch das Peroxisom und vermeidet dabei die übermäßige Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) (Reumann, 2000). Die Malat-Dehydrogenase (pMDH, in *Arabidopsis* durch 2 Gene codiert) als Bestandteil dieses Komplexes übernimmt ebenfalls eine sehr wichtige Aufgabe, da sie das benötigte NADH für die Reduktion von 3HP zur Verfügung stellt. Es ist die gängige Meinung, dass die Membran der Peroxisomen nicht durchlässig für größere Moleküle wie NADH oder Acetyl-CoA ist, sowie der oben erwähnte Porin-artige Kanal ebenfalls nicht für den NADH Transport in Frage kommt (Reumann und Weber, 2006). Somit ist anzunehmen, dass der Malat-Shuttle der einzige Weg für die NADH-Versorgung der Peroxisomen ist. Malat wird hierbei aus dem Zytoplasma in die Peroxisomen transportiert und durch die pMDHs zu Oxaloacetat oxidiert, wobei NADH entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass die pMDHs für die optimale Funktion der Photorespiration hilfreich, jedoch nicht essentiell ist. Die entsprechende Doppelmutante in beiden pMDH-Genen ist in Normalluft lebensfähig und nur gering in ihrer photosynthetischen Leistung beeinflusst. Mögliche Ursachen hierfür könnten zum einen

alternative Mechanismen für die Versorgung an Reduktionsäquivalenten sein oder dass die HPR-Reaktion komplett umgangen werden kann (Pracharoenwattana *et al.*, 2007; Cousins *et al.*, 2008).

Die HPR1 wird in *Arabidopsis* durch ein single-copy-Gen codiert, wie auch in Reis und vielen anderen Pflanzen (Greenler *et al.*, 1989 und Hayashi *et al.*, 1996). Einige Abweichungen konnten unter anderem bei Saubohne und Kürbis beobachtet werden. Im Genom der Saubohne liegen für die HPR1 zwei Gene vor. Es wurde beschrieben, dass eines der beiden entsprechenden Proteine spezifisch mit dem Syringolid-Elicitor-Rezeptor-P34 Komplex interagiert und vermutlich eine Rolle in der Pathogenantwort spielt. Die genauen Mechanismen sind bisher jedoch ungeklärt (Okinaka *et al.*, 2002). Eine weitere Abweichung konnte am Kürbis gezeigt werden. Resultierend aus der prä-mRNA eines single-copy Gens entstehen hier zwei alternative Splice-Formen der HPR1, wobei nur eine der beiden Isoformen ein peroxisomales Targeting-Signal trägt. Als das entscheidende Signal für den Prozess konnte Licht identifiziert werden. Die Autoren gehen davon aus, dass beide HPR-Isoformen an der Photorespiration beteiligt sind. Neben der peroxisomalen Form könnte die zytosolische eine Art Überflussventil darstellen, wenn bei hohen Lichtintensitäten viel 3HP gebildet wird und aus dem Peroxisom austritt. Die alternative HPR könnte dort das 3HP zu D-Glycerat umsetzen und nach dem Transport in den Chloroplasten dem C2-Zyklus wieder zur Verfügung stellen. Die genauen Verhältnisse konnten bisher noch nicht geklärt werden. (Mano *et al.*, 1997, 1999, 2000). Dieser Befund scheint jedoch nicht typisch für die HPR1 zu sein, da es in *Arabidopsis* nicht nachgewiesen werden konnte (Mano *et al.*, 1997) und auch für keine andere Pflanzenspezies gezeigt wurde.

Wie bereits erwähnt konnte bis heute keine *Arabidopsis*-Mutante für die HPR1 isoliert werden. Die Tatsache, dass während der ersten großen Screeningexperimente durch Sommerville und Mitarbeiter keine HPR-Mutante identifiziert wurde, könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die Mutation in diesem Gen auch unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen letal sein oder ein Gendefekt phänotypisch unauffällig. Allerdings konnten Murray und Mitarbeiter 1989 eine Gerste-Mutante (*Hordeum vulgare* L.; LaPr 88/29) isolieren, die viele Eigenschaften einer HPR1 Mutante aufweist. LaPr 88/29 zeigt eine deutliche Reduktion der HPR-Aktivität. Der Umsatz von 3HP mit den beiden Co-Faktoren NADH (5 %) und NADPH (19 %), ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Markierungsexperimente mit L-[U-<sup>14</sup>C]Serin und <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ergaben, dass es in dieser Mutante zu Beeinflussungen im photorespiratorischen C2-Zyklus kommt. Jedoch ist die Pflanze immer noch in der Lage CO<sub>2</sub>-Fixierungsraten von ca. 75 % des Wildtyps zu erreichen, was sich auch im Wachstum der Pflanze widerspiegelt. Die Mutante ist auch unter Normalluftbedingungen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die Autoren haben in Folge ihrer Ergebnisse darauf geschlossen, dass es einen alternativen Abbauweg für 3HP bzw.

alternative Enzyme mit HPR-Aktivität in Gerste geben muss (Murray *et al.*, 1989; Kleczkowski *et al.*, 1990). Diese Hypothese unterstreichen einige Arbeiten an Spinat, wo durch biochemische Reinigung ein alternatives, 3HP umsetzendes Enzym gefunden werden konnte (HPR2; EC 1.1.1.81). Die HPR2 arbeitet im Gegensatz zur HPR1 unter Verwendung von NADPH als präferenziellem Co-Faktor und ist im Zytosol lokalisiert. Das Enzym ist mit 38 kDa je Untereinheit etwas kleiner und kann Glyoxylat als alternatives Substrat umsetzen (etwa ein Viertel der Aktivität mit 3HP). Eine sehr spezifische Eigenschaft der HPR2 stellt die starke Inhibierung durch Oxalat dar. Da die HPR1 nur im geringen Ausmaß durch diesen Inhibitor beeinflusst wird, kann so zwischen den beiden Isoformen unterschieden werden. Durch immunologische Studien konnte die HPR2 auch in anderen Pflanzenspezies, wie Erbse und Weizen nachgewiesen werden (Kleczkowski und Randall, 1988a; Kleczkowski *et al.*, 1988b, 1991). Auch hier wurde angenommen, dass bei hohem photorespiratorischen Umsatz 3HP aus den Peroxisomen austritt, von der zytosolischen HPR2 umgesetzt und dem Zyklus erneut zurückgeführt wird. Somit wäre durch das Vorhandensein der HPR2 eine Art Überflussventil auch in anderen Pflanzen Spezies möglich. Nichts desto trotz findet diese Hypothese in der aktuellen Wissenschaft wenig Akzeptanz (Wingler *et al.*, 2000; Siedow und Day, 2001; Reumann und Weber, 2006). Auch in der zuvor beschriebenen Gerste-Mutante (LaPr88/28) konnte die HPR2 immunologisch nachgewiesen werden (Kleczkowski *et al.*, 1990). Ein Problem bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Mutante stellt allerdings der Aspekt dar, dass der exakte genetische Defekt bis heute nicht identifiziert wurde. Durch die gegenwärtig vorliegenden EST-Datenbanken (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/>) kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Gerste multiple Gene für die HPR1 vorliegen und somit nicht eindeutig geklärt ist, auf welches Gen die beschriebenen Befunde zurück zu führen sind. Des Weiteren ist für die alternative HPR2 bisher in keiner Pflanzenspezies das Gen identifiziert worden und somit keine Mutante verfügbar.

#### **2.4. Zielstellung dieser Arbeit**

In voran gegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe war es bereits gelungen, genetisch definierte *AtHPR1*-Mutanten (*hpr1-1* und *hpr1-2*) zu isolieren. Da die HPR1 in *Arabidopsis* durch ein *single-copy*-Gen codiert wird, handelt es sich bei beiden unabhängigen Linien um vollständige Nullmutanten. Die Pflanzen sind in der Lage unter Normalluftbedingungen zu wachsen und stellen somit eine hochinteressante Ausnahme unter den Photorespirationsmutanten dar (Timm; Diplomarbeit, 2006). Dieser Befund zeigt, dass das bisherige Fehlen einer HPR-Mutante nicht mit deren Letalität erklärt werden kann. Vielmehr ergeben sich daraus klare Hinweise, dass es zusätzlich zur HPR1-Reaktion kompensatorische Prozesse für den 3HP-Umsatz geben muss. Unter Zuhilfenahme dieser Mutanten sollte im Folgenden das Hydroxypyruvat-reduzierende System genauer

charakterisiert werden. Im Vordergrund stand dabei die Identifikation alternativer, 3HP reduzierenden Enzyme. Es ist mir gelungen eine alternative HPR2 aus *Arabidopsis* biochemisch zu reinigen und das entsprechende Gen zu identifizieren (Timm; Diplomarbeit, 2006).

Im Weiteren Fortlauf dieser Arbeit sollte die wichtige Frage geklärt werden, ob die HPR2 funktionell an der Photorespiration beteiligt ist bzw. welche Rolle sie im pflanzlichen Stoffwechsel einnimmt. Dieser Fragestellung sollte unter Verwendung von reverser Genetik, sowie verschiedener biochemischer und physiologischer Methoden nachgegangen werden. Ein wichtiger Teil der Untersuchung nahm die phänotypische und biochemische Charakterisierung der Mutanten ein. Darüber hinaus sollten Stoffflussuntersuchungen durch den C2-Zyklus durchgeführt werden. Die beiden Enzyme sollten ebenfalls heterolog überexprimiert und biochemisch charakterisiert werden. Die auf dieser Weise erzeugten Daten sollten klären, welche bisher unbekannt Mechanismen den HPR1-Defekt kompensieren. Dabei wurden neue Erkenntnisse zum Ablauf der Photorespiration und deren Vernetzung mit anderen pflanzlichen Stoffwechselwegen erwartet.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den nachfolgenden Firmen bezogen und wiesen mindestens den Reinheitsgrad *p.a.* auf: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Applichem (Darmstadt), BioRad Laboratories GmbH (München), Boehringer Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Duchefa (Haarlem, NL), Invitrogen (Leck, NL), Kodak (Stuttgart), MBI Fermentas (St. Leon Rot), New England BioLabs (Frankfurt), PeqLab (Erlangen), Pharmacia (Freiburg), Promega (Madison, USA), QIAGEN (Hilden), Sigma-Aldrich (Steinheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, allgemeinen Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Applied Biosystems (Darmstadt), Biometra (Göttingen), BioRad Laboratories GmbH (München), Eppendorf (Hamburg), Fuji (Düsseldorf), Heraeus (Osterode), Kodak (Stuttgart), Millipore (Eschborn), MWG Biotech (München), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg), Schott Glaswerke (Mainz), Sorvall (Bad Homburg), Whatman (Maidstone, GB).

##### 3.1.2 Apparaturen, Geräte und Zubehör

Tabelle 3-1 Verwendete Geräte und Apparaturen

Gerät und Zubehör	Hersteller
<b>Fotodokumentation</b>	
UV-Tisch	Vilber Lourmat (Frankreich)
<b>FPLC-Systeme</b>	
ÄKTAprima plus	GE Healthcare (Freiburg)
Pharmacia LKB UV-M II	Pharmacia (Freiburg)
<b>Gelelektrophorese-Apparaturen</b>	
Agarosegel-Apparaturen	Bio-RAD (München)
2D-Page	Bio-RAD (München)
Power Supply (Power Pac 300)	Bio-RAD (München)
<b>HPLC-System</b>	
Shimadzu automated HPLC-System	Shimadzu (Japan)

<b>Klimaschränke</b>	
Conviron PGR 15	CLF Plant climatic (Emersacker)
Sanyo Modell 350	Ewald Innovationstechnik GmbH (Bad Nenndorf)
Percivall AR-75L	CLF Plant climatic (Emersacker)
<b>PAM-System</b>	
Imaging-PAM (M-Serie)	Walz Mess- und Regeltechnik (Effeltrich)
<b>pH-Meter</b>	
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments (Rumänien)
<b>Photometer</b>	
Lambda 35 UV/VIS Spectrometer	Perkin Elmer (USA)
CARY 50 UV-Visible Spectrophotometer	Varian (Australien)
Einwegküvetten	Sarstedt (Nürnberg)
Quarzküvetten	Hellma (Müllheim)
<b>Photosynthesemessgerät</b>	
Licor Li-6400	Licor Biosciences (Lincoln, USA)
<b>Speed-Vac</b>	
Con-1000 Speed Vac	Fröbel Labor Geräte (Lindau, Deutschland)
<b>Thermocycler</b>	
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf AG (Hamburg)
PTC-100, Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc. (USA)
<b>Zentrifugen und Rotoren</b>	
Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
Sigma 3K30 - Laborzentrifuge	Vataris (Baar, Schweiz)
Sorvall RC 6 Plus	Sorvall (Bad Homburg)

### 3.1.3 Reaktionskits

Tabelle 3-2 Verwendete Reaktionskits

<b>Art des Kits</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendungszweck</b>
PlantRNA-Kit	Macherey-Nagel (Düren)	Isolierung von RNA
paqGOLD Gel Extraction Kit	PaqLab (Erlangen)	Aufreinigung PCR Produkte
Qiagen Plasmid Mini Kit (100)	Qiagen (Hilden)	Aufreinigung von Plasmiden

### 3.1.4 Verwendete Enzyme

Tabelle 3-3 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
CIAP-Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNAseI	Fermentas (St. Leon-Rot)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
Reverse Transkriptase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot),
Ribonuklease A	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-Polymerase	Qiagen (Hilden)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)

### 3.1.5 Größenstandards für Elektrophoresen

Tabelle 3-4 Verwendete Größenstandards für Elektrophoresen

Marker	Hersteller
100 bp Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
1 kb Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
HPLC-Standard, 21 proteinogene AS + Glycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

### 3.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 3-5 Verwendete Oligonukleotide.

Die aufgeführten Oligonukleotide dienten dem Screening von Mutanten, der Expressionsanalyse und der Klonierung zu Überexpressionszwecken. Die angegebenen Nummern entsprechen der institutsinternen Liste. Die fettgedruckten und unterstrichenen Nukleotide zeigen das Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen an.

Primernamen	Sequenz	Stock (PUR)
40s16forward	GGCGACACAACCAGCTACTGA	R176
40s16revers	CGGTA <sup>u</sup> ACTCTTCTGGTAACGA	R177
mLB1	AATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAA	R175
Ds5-2	CCGTTTTGTATATCCCGTTTCCGT	R576

SALK-LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	R295
HPR1-S	TAGCACAAAACCGATGCCTGGAAC	R379
HPR1-A	GTTTCCATGTCACAGTTGTTCTC	R380
HPR1pBA5'	<b>AACTCGAG</b> ATGGCGAAACCGGTGTCCATTGAA	R686
HPR1pBA3'	<b>AACTCGAG</b> TCATAGCTTCGAAACAGGCAATCC	R687
HPR2-S1	CTTCTGGACTTCTCCGGAGAAATC	R666
HPR2-A1	CCAAATCCCAAATGTGTCACATGAC	R668
HPR2SpeI-BegI	<b>ACTAGT</b> GGAGATATGGAATCAATCGGAGTCC	R659
HPR2KpnI-EndI	<b>GGTACC</b> TCAGACGACCGGAGTCAGAAGTGATTTC	R660
HPR3-S1	TTCTGACTCGTGAATTCCGTACTC	R665
HPR3-A1	ACATCYAAACCAGCACCACCAATC	R669
HPR3pHUE-Beg	CT <b>CCGCGG</b> TGGTATGGCGGAATCTTCAGAG	R987
HPR3pHUE-End	<b>CCGCGG</b> TCATCAATCCAATTGAACCGGAGA	R988

### 3.1.7 Verwendete Plasmide

Die folgenden Plasmide sind in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommen und dienen der Sub-Klonierung und der Überexpression von Hydroxypyruvat-Reduktasen.

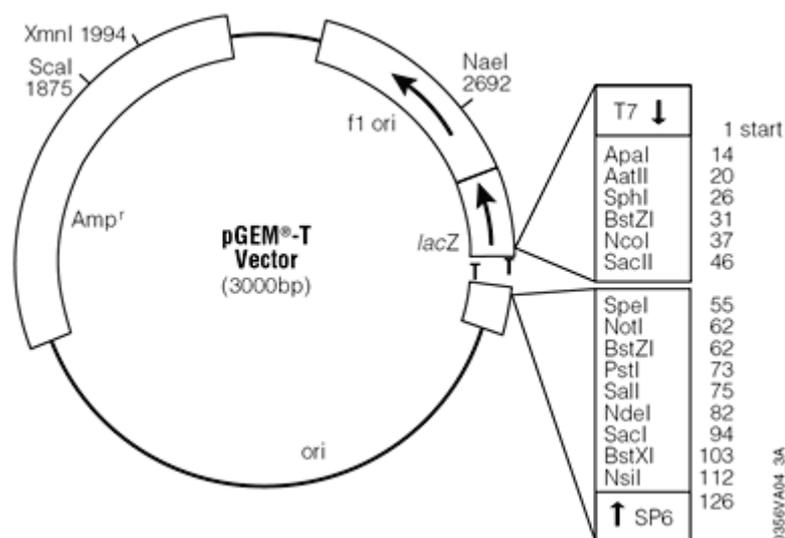


Abbildung 3-1 Struktur des pGEMT-Vektors (Promega)

Der Vektor diente der Sub-Klonierung von Fragmenten. Die Ligation der Fragmente erfolgt dabei über, durch in der PCR-Reaktion generierte, überhängende Adenin-Reste. Der Vektor liegt linear vor und zeichnet sich durch überhängende Thymin-Reste aus, was die Ligation der Fragmente ermöglicht.

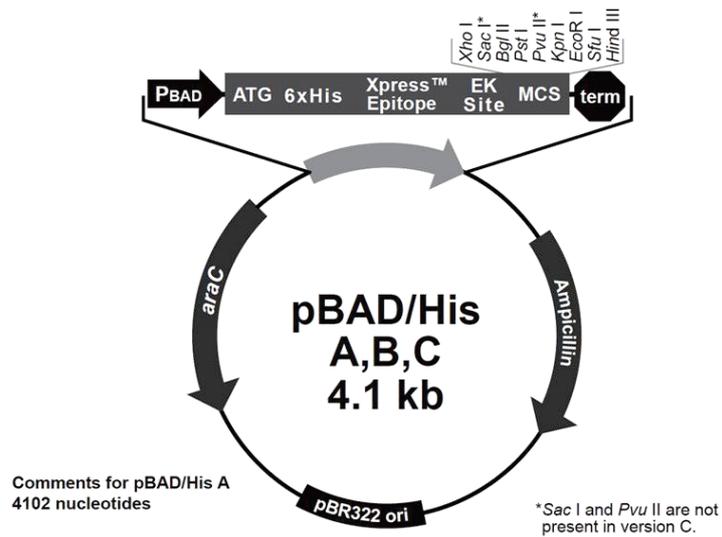


Abbildung 3-2 Struktur des pBAD/HisA-Vektors (Invitrogen)

Der Vektor diente der Überexpression von Hydroxypyruvat-Reduktasen (HPR1 und HPR2). Dabei entsteht ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag, der die Reinigung des rekombinanten Proteins über Affinitätschromatographie ermöglicht.

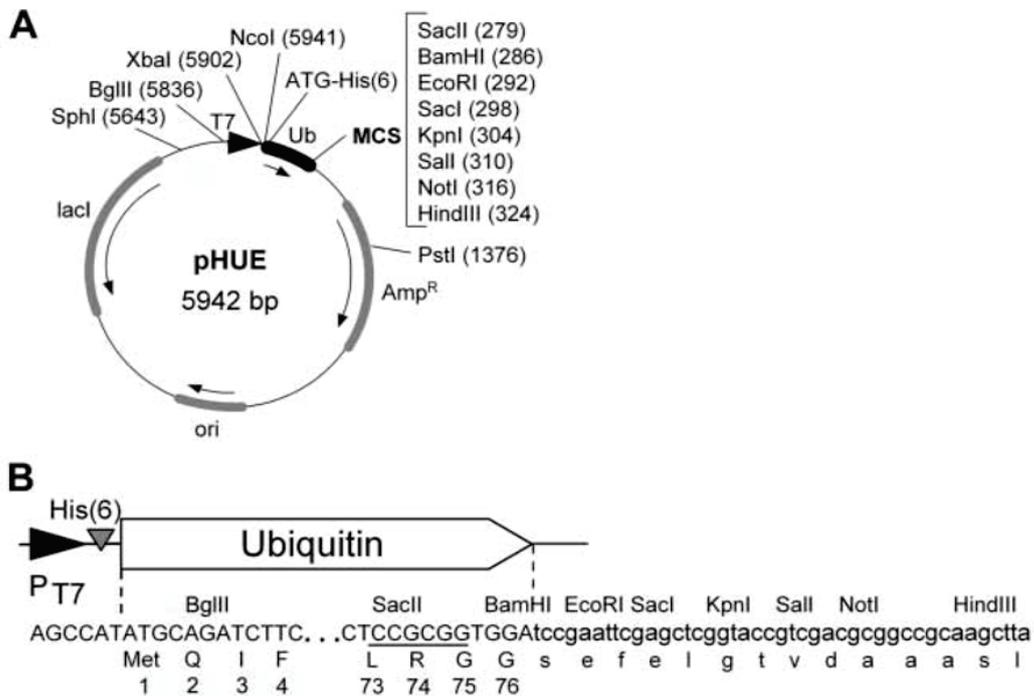


Abbildung 3-3 Struktur des pHUE-Vektros (Catanzariti *et al.*, 2004)

Der Vektor dient der Überexpression von Hydroxypyruvat-Reduktasen (HPR3). Dabei entsteht ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag, der die Reinigung des rekombinanten Proteins über Affinitätschromatographie ermöglicht.

### 3.1.8 Pflanzenmaterial und Anzucht

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen entsprechen den Ökotypen Columbia 0 (col.0) und *Landsberg erecta* (Ler). Die Insertionslinien (SALK und Gene Trap) wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (Alonso *et al.*, 2003; Sundaresan *et al.*, 1995) bezogen.

Die Aussaat der Samen erfolgte auf einem Erde-Vermiculit-Gemisch, im Verhältnis von 4:1 (Mini Tray; Einheitserdewerk Uetersen). Dieses Erdgemisch wurde im Vorfeld mit Wasser und 0,2 % Wuxal-Flüssigdünger (Aglukon) gestaut, bis das Kultursubstrat vollständig gesättigt war. Zur Synchronisation der Keimung erfolgte eine 2 tägige Stratifikation bei 4° C.

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in normaler Luft (380 bis 400  $\mu\text{L/L CO}_2$ ) oder unter erhöhten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen (0,15 bzw. 1 %), in dafür vorgesehenen Pflanzenanzuchtskammern (Conviron, Percivall bzw. Sanyo). Falls nicht anderes erwähnt, erfolgte die Anzucht dabei mit einer Standard-Photoperiode (Tag/Nacht) von 10 h/14 h, einer Temperatur von 22/18°C und einer Lichtintensität von ca. 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### Tabelle 3-6 Verwendete Insertionslinien

In der Tabelle sind die zum Einsatz gekommenen Insertionslinien dargestellt. Unter Linie sind die Originalbezeichnungen des Stock-Centers angegeben, sowie die Arbeitsbezeichnung unter dem Eintrag Bezeichnung.

Locus	Linie	Bezeichnung
At1g68010 (AtHPR1)	SALK_067724	<i>hpr1-1</i>
At1g68010 (AtHPR1)	SALK_143584	<i>hpr1-2</i>
At1g79870 (AtHPR2)	GT.89166	<i>hpr2-1</i>
At1g79870 (AtHPR2)	SALK_105883	<i>hpr2-2</i>
At1g12550 (AtHPR3)	SALK_019014	<i>hpr3-1</i>
At1g12550 (AtHPR3)	SALK_143689	<i>hpr3-1</i>

### 3.1.9 Verwendete Bakterienstämme

#### *Escherichia coli*

**TOP10**  $F^-$  *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsd RMS-mrcBC*)  $\Phi 80$ *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*, **Invitrogen**

**BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3)**  $F^-$  *ompT* *hdsS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-*) *gal* *dcm* *rne131* (DE3), **Invitrogen**

<b>XL1-Blue</b>	$F^-$ , <i>Tn10</i> , <i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup></i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , $\Delta(lacZ)M15/recA1$ , <i>endA1</i> , <i>gyrA96(Nal<sup>r</sup>)</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>)</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <b>Invitrogen</b>
<b>LMG194</b>	<i>F-mcrA (mrr-hsdRMS-mrcBC)</i> 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74</i> <i>recA1</i> , <i>deoR</i> <i>araD139 (ara-leu)7697</i> <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <b>Invitrogen</b>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1. Isolation von genomischer DNA

Die DNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der modifizierten Methode von Murray und Thompson (1980). Das Pflanzenmaterial (100 mg) wurde in Eppendorf-Gefäßen, unter Zugabe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Mörser homogenisiert. Nach kurzem Antauen erfolgte die Lyse durch Zugabe von 500 µl 2x CTAB (2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCL, pH 8,0, 20 mM EDTA). Bei der sich anschließenden 30-minütigen Inkubation bei 68 °C wurden die Proben mehrmals gevortext, um eine optimale Durchmischung und Lysierung der Proben zu gewährleisten. Durch die Zugabe von 5 µl RNaseA (5 mg/ml) und Inkubation bei 37 °C (15 min) vermeidet man die Verunreinigung durch RNA. Dann wurde der Ansatz mit 1 VT (500 µl) CI (24 VT Chloroform; 1 VT Isoamylalkohol) versetzt, 1 min durch Schütteln gemischt und bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, welche die genomische DNA beinhaltet, wurde ohne Verletzung der Interphase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die abgenommene Phase wurde anschließend mit 1 VT (400 µl) Isopropanol gemischt und auf Eis gefällt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol überschichtet. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt (10 min bei maximaler Geschwindigkeit) wurde das Pellet gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde folgend in 50 µl Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und bei 68 °C inkubiert, bis die isolierte DNA vollständig gelöst war. Die DNA kann sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

### 3.2.2. Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mittels einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979). Die Übernachtskultur einer einzelnen Bakterienkolonie (5 ml LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum) wurde in ein Eppendorfgefäß (2 x 2 ml) überführt und in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung 1 (25 mM Tris-HCl, 15 mM EDTA, 50 mM

Glukose) resuspendiert. Durch die Zugabe von 200 µl Lösung 2 (1 % SDS, 0,2 N NaOH) und das vorsichtige invertieren der Suspension, wurden die Bakterienzellen lysiert und die DNA denaturiert. Nach einer Inkubation auf Eis (5 Minuten) wurden 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, 20 ml reine Essigsäure, auf 100 ml) hinzugegeben und vorsichtig durchmischt. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Durch die Neutralisierung mit Lösung 3 erreicht man eine Renaturierung der Plasmid-DNA. Die chromosomale DNA liegt weiterhin denaturiert vor, da aufgrund ihrer Größe die Stränge nicht wieder hybridisieren können. Die Suspension wurde mit 1 VT PCI versetzt (450 µl), ausgeschüttelt und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit 96 %-igem Ethanol auf Eis gefällt (mindestens 20 min). Anschließend erfolgten ein Zentrifugationsschritt und die Waschung der Zellpellets mit 70 %-igem Ethanol (200 µl). Die Proben wurden ein letztes Mal für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter laminarem Luftstrom getrocknet. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde in 20 µl TE-RNase aufgenommen und unter Schütteln gelöst, bevor sie bei -20 °C gelagert werden oder für einen Restriktionsverdau eingesetzt werden konnte.

### **3.2.3. Isolation von RNA**

Die Isolation von RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant Kit von Macherey-Nagel, unter Einhaltung des mitgelieferten Protokolls.

### **3.2.4. Herstellung von cDNA**

Für Expressionsanalysen von Genen mittels RT-PCR, wird cDNA als Template benötigt. Die cDNA wird durch die virale, Reverse Transkriptase synthetisiert, wobei RNA als Matrize dient. Die cDNA-Synthese wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Im Vorfeld wurde die Konzentration der RNA mit Hilfe des Photometers bestimmt und die entsprechende Menge in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Gegebenenfalls wurde die RNA mit Hilfe der Con 1000 Speed Vac der Firma Fröbel eingeeengt, da für die cDNA-Synthese-Reaktion ein Reaktionsansatz von 20 µl vorgeschrieben ist.

Für die Erststrang-Synthese wurden 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) zu maximal 12 µl RNA-Lösung pipettiert, sodass der Ansatz ein Gesamtvolumen von 13 µl besitzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 70 °C wurde das Gemisch sofort auf Eis gestellt und mit 4,0 µl 5x Erststrangpuffer und 2,0 µl 10 mM dNTP-Mix versehen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl M-MuLV<sup>6</sup> Reverse Transkriptase verblieben die Proben für 60 min bei 42 °C. Durch die Inkubation der Proben bei 70 °C (10 Minuten) wurde die Reaktion abgestoppt. Die so hergestellte cDNA kann bei -20 °C gelagert oder sofort weiter verwendet werden.

### 3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR dient dem spezifischen Nachweis von bestimmten DNA-Fragmenten. Dabei kann, ausgehend von sehr geringen Mengen an Start-DNA, das gewünschte Fragment bis ins millionenfache vervielfältigt werden. Je nach Fragestellung dient das angereicherte Fragment dann zum Gennachweis, der Stärke der Expression oder zur Klonierung spezifischer Gene.

Das Reaktionsprinzip der PCR ähnelt der Replikation der DNA in der Zelle. Ausgehend von einer DNA-Matrize und einem spezifischen Primerpaar, das an den sense- bzw. antisense-Strang hybridisiert, wird die von den Primern flankierte Sequenz exponentiell amplifiziert. Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt, der Denaturierung (ca. 94 °C), wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Beim Annealing, dem zweiten Schritt (ca. 55 °C), hybridisieren die Oligonukleotid-Primer mit den beiden Matrizensträngen und dienen der DNA-Polymerase im dritten Schritt, der Elongation (ca. 70 °C), als Startmoleküle. Dieser Zyklus wird je nach Reaktion 25 - 35-mal wiederholt. In dieser Kettenreaktion wird das gewünschte DNA-Fragment millionenfach amplifiziert. Die Taq-DNA-Polymerase stammt aus einem *E. coli*-Stamm, der ein Plasmid mit dem klonierten Gen der *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase trägt. Diese hitzestabile DNA-Polymerase hat die PCR sehr vereinfacht und verbessert. Das Bakterium *Thermus aquaticus* lebt im Wasser bei einer Temperatur von 75 °C. Seine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) hat ein Temperaturoptimum von 72 °C und ist selbst bei der Denaturierungstemperatur von ca. 94 °C noch stabil.

In den meisten Fällen wurde der Mastermix (enthält Reaktionspuffer, dNTPs, Taq-Polymerase und MgCl<sub>2</sub>) der Firma Quiagen für die PCR-Reaktionen verwendet, weil damit die besten Ergebnisse erzielt wurden. Für den Mastermix ergab sich folgendes Pipettierschema:

#### 20 µl-Ansatz:

- 10,0 µl Mastermix
- 7,0 µl PCR-Wasser
- 1,0 µl Primer 1 (12 pmol, antisense, Oligonucleotid)
- 1,0 µl Primer 2 (12 pmol, antisense, Oligonucleotid)
- 1,0 µl DNA, bzw. cDNA

Die Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge auf Eis miteinander gemischt und sofort in den PCR-Cycler gegeben.

### 3.2.6. Trennung von Nukleinsäuren

Die Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Dabei bewegen sich negativ geladene DNA-Moleküle von der Anode zur Kathode. Die Laufgeschwindigkeit richtet sich dabei nach der Größe der DNA-Fragmente, der Stromstärke und der Agarosekonzentration.

Die Agarose (1 %, in 1xTAE) wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit 0,005 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt. Dieser Farbstoff interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA und bildet dabei einen Nukleinsäure-Ethidiumbromid-Komplex. Der Farbstoff wird durch Licht der Wellenlänge 254-366 nm angeregt und emittiert folgend im orange-roten Bereich (590 nm). Resultierend daraus ist die DNA, unter einem UV-Tisch, zu visualisieren (Lottspeich und Zorbas *et al.*, 1998). Die DNA-Proben (PCR- oder Restriktions-Verdau-Produkte) wurden mit 5 % (v/v) Ladepuffer (Loading Dye) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach dem Anlegen der Spannung (je nach Gelgröße zwischen 80 und 120 V) erfolgte die Trennung der Fragmente, welche an Hand einer mitgeführten Marker-DNA (Lambda DNA *EcoRI* + *HindIII*-Marker, 100 bp- oder 1 kB-Ladder) ihrer Größe nach identifiziert werden konnten.

### 3.2.7. Isolation von Knock-out Mutanten

Die entsprechenden Insertionslinien wurden zunächst unter Standardbedingungen angezogen und dem ersten Screening unterzogen. Dazu wurde Blatt-DNA isoliert, um die Insertion in den einzelnen Genen via PCR nachzuweisen (1 min 94 °C, 1 min 58 °C, 1,5 min 72 °C, 35 Zyklen). Für diese Reaktion wurden jeweils ein genspezifischer Primer und ein Insertionsspezifischer (R175 für HPR1, R576 für HPR2 und R295 für HPR3) Primer verwendet. Bei vorhandener Insertion wurde im Anschluss die Zygotie der Pflanzen mit genspezifischen Primern (R379/R380 für HPR1, R666/R668 für HPR2 und R665/R669 für HPR3; Tabelle 3-5) überprüft. Falls in der F1-Generation keine homozygoten Pflanzen gefunden werden konnten, wurden heterozygote Pflanzen in die nächste Generation gebracht und erneut der Screening unterzogen.

Nach Identifikation homozygoter Pflanzen wurde aus den entsprechenden Pflanzen RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert, um den Knock-out Nachweis auf Transkriptebene durchzuführen. Dabei sollte mit den genspezifischen Primern (R379/R380 für HPR1, R666/R668 für HPR2 und R665/R669 für HPR3) kein Fragment, der entsprechenden Größe (478 bp für HPR1, 942 bp für HPR2 und 972 bp für HPR3) mehr nachzuweisen sein. Als Kontrollen wurden dazu cDNA aus dem Wildtyp und ein konstitutiv exprimiertes (*At2g09990*, R176/177, 432 bp) Gen herangezogen.

### 3.2.8. Reinigung von Nukleinsäuren

Die nach PCR bzw. Restriktionsverdau sowie einer Agarose-Gel-Elektrophorese notwendige Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde mit dem paqGOLD Gel Extraction Kit (PqLAB) nach beiliegendem Protokoll durchgeführt.

### 3.2.9. Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von spezifischen DNA-Fragmenten zu Überexpressionszwecken erfolgte über einen Zwischenschritt. Dabei wurden in der PCR generierte Fragmente aufgereinigt und in den pGEMT-Vektor kloniert. Dabei macht man sich den Vorteil zu Nutze, dass die Taq-Polymerase, bei verlängerten Elongationszeiten, überhängende Adenin-Reste an den Fragmenten produziert. Der Subklonierungsvektor liegt linear vor und ist mit überhängenden Thymin-Resten ausgestattet. So ist es möglich, das interessierende Fragment in den Vektor zu ligieren. Dazu wurden 3 µl des gereinigten Fragmentes mit 0,5 µl pGEMT unter Zugabe von 1 µl Ligationspuffer und 1 µl T4-Ligase zusammengefügt und auf 10 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Dieser Ansatz im Anschluss über Nacht bei 4 °C inkubiert und am folgenden Tag nach *E. coli* transformiert.

### 3.2.10. Transformation von *Escherichia coli*

Zu Beginn der Transformation wurde ein Aliquot kompetente Zellen (Stamm richtet sich nach Verwendungszweck) auf Eis aufgetaut. Im Anschluss erfolgten die Zugabe der zu transformierenden DNA (1 µl für Retransformationen oder 10 µl bei Transformation von Ligationsansätzen) und das Mischen des Ansatzes. Dieser verblieb dann für 30 min auf Eis. Nach der Inkubation erfolgten der Hitzeschock im Heizblock (42 °C, für 60 s) und eine erneute Inkubation auf Eis (5 min). Der Ansatz wurde anschließend mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 1 Stunde (37 °C) geschüttelt. Nach der Inkubation erfolgte das Ausstreichen der Zellen auf LB-Agar (inklusive des entsprechenden Antibiotikums) und die Inkubation der Platten bei 37 °C (über Nacht). Die Analyse der gewachsenen Klone erfolgte am nächsten Tag durch die Isolation der Plasmide und der sich anschließenden Restriktionsanalyse.

### 3.2.11. Restriktionsverdau von DNA

Die Analyse der klonierten und transformierten Konstrukte erfolgte über einen Restriktionsverdau. Dabei wurden die isolierten Plasmide nach der Isolation mit spezifischen Restriktionendonukleasen überprüft, ob sie das entsprechende Fragment enthalten oder bei unidirektionaler Klonierung (an beiden Enden das gleiche Restriktionsenzym), ob das Fragment in der richtigen Orientierung im Vektor vorliegt. Dabei waren die Ansätze wie folgt zusammengesetzt: 2 µl des zu analysierenden Plasmides wurde mit 2 µl 10 x Puffer versetzt (je nach Enzym) und 0,2 µl Enzym hinzugegeben. Der Ansatz wurde auf ein Gesamtvolumen

von 20 µl mit Wasser aufgefüllt und für 1–2 Stunden bei den jeweilig optimalen Temperaturen inkubiert. Bei Restriktionen mit mehreren Enzymen erfolgte die Anpassung des Ansatzes über die Menge des Wassers. Nach der Inkubationszeit erfolgte das Abstoppen der Reaktion über die Temperatur oder der Zugabe eines Stopp-Mixes (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin). Die Ansätze wurden folgen durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### **3.2.12. Proteinisolation aus *Arabidopsis thaliana***

Das Pflanzenmaterial (100 mg) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem vorgekühlten Mörser zerkleinert. Im Anschluss erfolgte, unter weiterem homogenisieren, die Zugabe von 10 µl NaHSO<sub>3</sub> + Pefablock (60 mM NaHSO<sub>3</sub>, 6 mM Pefablock, im Verhältnis von 1:1), 10 µl PMSF (30 mM, in Isopropanol) und 200 µl EDTA-Tris-HCl (75 mM Tris-HCl, 1,5 mM EDTA, pH 7,5). Die Suspension wurde folgend bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert (4 °C, 10 min) und der resultierende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser diente dann zu Proteinbestimmung und weiteren Experimenten, wie z.B. Enzym-Aktivitätsmessungen oder zum Anfertigen eines Western-Blots.

### **3.2.13. Reinigung und Identifikation der *AtHPR2***

Die Reinigung der HPR2 erfolgte aus der *AtHPR1*-defizienten-Mutante. Dazu wurden bis zu 800 mg Blattmaterial mit der doppelten Menge an vorgekühltem Aufarbeitungspuffer (25 mM HEPES-KOH, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM KCl, 10 mM β-Mecaptoethanol, 0,1 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid und 10 % Glycerin, pH 7,6) homogenisiert. Die Reinigung des Enzyms erfolgte nach der Methode von Kleczkowski und Randall (1988). Die Fraktion des finalen Reinigungsschrittes wurde via SDS-PAGE analysiert und die Spinat-HPR2-homologe Bande per Western-Blot identifiziert. Die Identifikation des Gens erfolgte über Nano-Liquid Chromatographie-MS/MS-Analyse (Wienkoop *et al.*, 2004a; Boldt *et al.*, 2005).

### **3.2.14. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die denaturierende Elektrophorese im Polyacrylamidgel wurde eingesetzt, um die Proteine und Proteinbestandteile in Proteinlösungen zu visualisieren sowie die Reinheit der einzelnen Fraktionen der Chromatographien zu überprüfen. Zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurde das Mini-Protean<sup>®</sup>3 Elektrophoresis Cell System (BIO-RAD) verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970). Beim Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Der Lauf durch das Trenngel wurde bei 120 V durchgeführt bis die Bromphenolblau-Lauffront das Ende des Gels erreicht und herausgelaufen war.

Pro Tasche im SDS-Gel wurden jeweils ca. 10 µg Protein aufgetragen. Dazu wurde anhand der zu vor bestimmten Proteinkonzentration (Bradford, 1976) das jeweilige Volumen errechnet, mit einem halben Volumen dreifach Lämmli-Puffer versetzt (zur Spaltung der Wasserstoff- und Schwefelbrücken) und für ca. 10 min bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben auf das Gel geladen. Zur Abschätzung der Molekularmasse wurden 5 µl Protein-Standard (Unstained Protein Molecular Weight Marker, FERMENTAS) mitgeführt. Die Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel wurden mit dem Farbstoff Coomassie®-Brilliantblau G-250 sichtbar gemacht.

### 3.2.15. Heterologe Überexpression und Reinigung spezifischer Proteine

Für die Herstellung der rekombinanten Proteine wurden von den Nukleotidsequenzen der Kandidatengene spezifische Primer abgeleitet, mit denen aus Blatt-cDNA von *A. thaliana* ein PCR-Fragment amplifiziert wurde. Durch die Einführung spezifischer Restriktionsschnittstellen in die Primer, wurde die Klonierung der Fragmente ermöglicht. Wie oben beschrieben erfolgte zuerst die Subklonierung der Fragmente in pGEMT, um diese zu vermehren und eine bessere Restriktion zu gewährleisten. Die so gewonnenen Fragmente wurden zur Kontrolle sequenziert und anschließend in die Überexpressionsvektoren pBAD/HisA (HPR1 und HPR2) bzw. pHUE (HPR3) kloniert. Dieses Überexpressions- und Reinigungssystem beruht auf der Bildung eines Fusionsproteins mit einem HisTag, was die Reinigung über Affinitätschromatographie erlaubt. Anschließend erfolgte die Transformation der positiven Konstrukte in LMG194- (pBAD/HisA) bzw. BL21-Zellen (pHUE).

Zur Überexpression wurde von den positiven Klonen eine Vorkultur angesetzt (5 ml LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin) und bei 37°C geschüttelt, bis die Zellen die logarithmische Phase erreicht haben. Diese Kulturen dienten dann zum Animpfen der Überexpressionskulturen (1 l LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin). Die Expression erfolgte nach Erreichen der OD<sub>600</sub> von 1 und der Zugabe der Induktoren (0,02 % L-Arabinose für pBAD/HisA und 4 mM IPTG für pHUE). Die Überexpression erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur (ca. 20 °C).

Zur Messung der Enzymaktivitäten erfolgte die Reinigung der rekombinanten Proteine über Affinitätschromatographie. Dazu wurden die Übernachtskulturen abzentrifugiert (8000 x g, 3 °C), die Überstände verworfen und die Pellets in Homogenisationspuffer (20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4) aufgenommen. Im Anschluss erfolgten die Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) und eine halbstündige Inkubation auf Eis. Danach schloss sich eine Ultraschallbehandlung an (5 x 20 Sekunden) und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20000 x g, 4 °C). Der resultierende Überstand (Lysat) diente zur Reinigung der rekombinanten Enzyme.

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer HisTrap-Säule (Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 5 ml. Die Säule lag fertig gepackt vor und wurde an die FPLC (Pharmacia) angeschlossen und gemäß den Angaben des Herstellers äquilibriert. Das Reinigungsprinzip beruht auf der Bindung des (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Säulenmatrix. Die Lysate wurden aufgetragen (1 ml/min) und die Säule im Anschluss mit Homogenisationspuffer gewaschen (mindestens 5-mal Säulenvolumen). Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte durch Erhöhung der Imidazolkonzentration im binären Gradienten (0-250 mM, 250 mM Imidazol in Homogenisationspuffer). Die Reinheit der Proteine wurde anschließend durch eine SDS-PAGE überprüft.

### 3.2.16. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der HPR-Enzymaktivität erfolgte unter Verwendung eines optisch-enzymatischen Aktivitätstestes. Dabei wird in einer NADH/NADPH-abhängigen Reaktion das charakteristische Absorptionsmaximum beider Substanzen, im UV-Bereich von 340 nm verfolgt. Die Veränderung der Absorption bei dieser Wellenlänge im Verlauf der katalytischen Reaktion, kann im Testansatz gemessen werden und dient somit als direktes Maß für die Aktivität des Enzyms. Um eine Sättigung des Enzyms zu erreichen, wurden die Substrate dem Messansatz im Überschuss zugegeben (Richter, 1998). Die optisch-enzymatischen Tests wurden mit dem Cary-50-Spektralphotometer (Varian) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 30 °C in Plastik-Küvetten. Hierzu wurden alle Komponenten des Testansatzes pipettiert, gut gemischt und für ca. 2 min im Photometer inkubiert, um den Ansatz auf 30 °C zu temperieren. Dann wurde die Messung begonnen und die Einstellung einer konstanten Nulllinie abgewartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Substrat (3HP/Glx) eingeleitet. Zur Auswertung der Messungen wurde die Cary-WinUV-Software verwendet. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$U \left[ \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \right] = \frac{\Delta E \left[ \text{min}^{-1} \right] \cdot V_{\text{Reaktionsansatz}} \left[ \text{ml} \right]}{\varepsilon \left[ \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \right] \cdot d_{\text{Küvette}} \left[ \text{cm} \right] \cdot v_{\text{Probe}} \left[ \text{ml} \right] \cdot c_{\text{Protein}} \left[ \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right]}$$

U	spezifische katalytische Aktivität
$\Delta E$	Absorptionsänderung bei 340 nm
V	Volumen des Reaktionsansatzes
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient für NADH ( $6,22 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^2$ )
d	Schichtdicke der Küvette
v	Probenvolumen
c	Proteinkonzentration der Probe

Die Messung der HPR- und GR-Enzymaktivitäten, wurden nach der in der Literatur beschriebenen Methoden durchgeführt (Kleczkowski *et al.*, 1986; Kleczkowski und Randall, 1988). Die Messung der HPR-Aktivität erfolgte in einem 0,1 M MES-Puffer (pH 6,5) und die Messung der GR-Aktivität in einem 0,1 M MOPS-Puffer (pH 7,1). Für die jeweiligen Messungen wurden Stammlösungen der Substrate (3HP/Glx, 20 mM) und der Co-Substrate (NADH/NADPH, 3,75 mM) hergestellt. Die Zusammenstellung des Messansatzes erfolgte nach dem folgenden Schema: 850 µl des Puffers, 50 µl des zu vermessenden Extraktes und 50 µl der entsprechenden Co-Substrat-Stammlösung wurden zusammen pipettiert und eine ca. 2 minütige Inkubation durchgeführt. Der Start der Messung erfolgte durch die Zugabe von 50 µl der jeweiligen Substrat-Stammlösung.

### 3.2.17. Immunologische Nachweistechiken (Western-Blot)

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden diese unter Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran transferiert und dadurch immobilisiert (Towbin *et al.*, 1979). Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene, primäre Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase usw.) gekoppelt ist, detektiert.

Für diese Arbeit wurde ein LKB Nova Blot (Semi-dry Elektrobloetter) der Firma Pharmacia verwendet. Als Stromstärke wurden 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gel für eine Stunde angelegt. Der Blot wurde anschließend abgebaut, die Membran kurz in TBS gewaschen und die Qualität des Blots (Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran) mittel Ponceau-Färbung überprüft. Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran zuerst in 5 %iger Magermilch-Lösung, für mindestens 1 h (4°C) geblockt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem proteinspezifischen, primären Antikörper (1 h bei RT, Verdünnung 1:500). Nach der Inkubation wurde die Membran 3×10 min in TBST gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) – HRP Conjugate, BIO-Rad, 1 h) und die Waschung der Membran (3×10 Minuten). Die Einleitung der Nachweisreaktion erfolgte durch die Zugabe der ECL-Reagenzien. Dazu wurden Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 gemischt auf die Membran gegeben. Die Membran wurde nachfolgend mit einer Folie abgedeckt und in eine Entwicklungskassette gelegt. Die Entwicklung wurde in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm durchgeführt. In Abwandlung dieser Methode erfolgte auch der Nachweis mit alkalischer Phosphatase (sekundärer Antikörper war ein Anti-Rabbit IgG Whole molecule Alkaline Phosphatase Conjugate, Sigma). Die Entwicklung wurde hierbei mit NBT-BCIP-Lösung statt ECL-Reagenzien durchgeführt. Die Membran wurde nach der Inkubation mit

dem zweiten Antikörper 3-mal gewaschen und 10 min in einem Detektionspuffer (Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, pH 9,5) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in eine Schale überführt und mit 20-30 ml NBT-BCIP-Lösung (NBT 93,75 mg; BCIP 47 mg; DMSO 3,35 ml; H<sub>2</sub>O 1,65 ml; 200 µl NBT-BCIP/10 ml Detektionspuffer) übergossen und im Dunklen geschüttelt. Sobald die gewünschte Bandenstärke erreicht war, wurde die Reaktion mit A. dest. gestoppt und die Membran zum Trocknen gelegt.

Die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Antikörper gegen die HPR1 und HPR2 wurden mit den aus Spinat (*Spinacia oleracea*) gereinigten Proteinen produziert (Kleczkowski *et al.*, 1986; Kleczkowski und Randall, 1988).

ECL-Lösungen:

Lösung I (50 ml):

Reagenzien	Konzentration Stammlösung	Finale Konzentration	Stammlösung für 50 ml Lsg.
Luminol	250 mM	2,5 mM	0,5 ml
p-Coumaric Acid	90 mM	400 µM	0,22 ml
Tris-HCl, pH 8,5	1 M	100 mM	5 ml

Lösung II (50 ml):

Reagenzien	Konzentration Stammlösung	Finale Konzentration	Stammlösung für 50 ml Lsg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 %	5,4 mM	0,305 ml
Tris-HCl pH 8,5	1 M	100 mM	5 ml

### 3.2.18. Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung der Chlorophyll (Chl) a- und b-Gehalte erfolgte nach der Methode von Porra *et al.* (2002). Die Extraktion erfolgte dabei unter Schwachlicht, um die Licht assoziierte Degradation der Chlorophylle (Photooxidation) zu minimieren. Die Ernte des Blattmaterials (50 mg, 5 Wiederholungen je Linie) erfolgt in der Mitte der Lichtperiode, wobei die Mittelrippe und Sprosse der Blätter ausgespart blieben. Die Aufarbeitung erfolgte in vorgekühlten Mörsern, wobei die entsprechende Menge des Blattmaterials in wässriger Acetonlösung (80 % Aceton, 2,5 mM Natrium-Phosphat, pH 7,8) gemörsert wurde. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 2500 x g für 10 min, bei 4 °C. Die

resultierenden Überstände würde auf 8 ml aufgefüllt und dienen der Messung eines diskontinuierlichen Spektrums (480, 646, 647, 654, 663, 664 und 750 nm). Die Berechnung der Chlorophyllgehalte erfolgte nach folgenden Formeln und der Berücksichtigung der eingesetzten Frischmasse und des eingesetzten Acetonvolumens:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = 12,25 \times (E_{663}-E_{750}) - 2,55 \times (E_{674}-E_{750})$$

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

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

### 3.2.19. Aminosäureanalyse (HPLC)

Die Methode der High-Pressure-Liquid-Chromatographie (HPLC, Shimadzu) diente in diesem Fall der Bestimmung der absoluten Aminosäurekonzentrationen in den zu untersuchenden Pflanzenlinien. Die Probenahme erfolgte zur Mitte der Lichtperiode, wobei je 100 mg der einzelnen Linien (n = 5) verwendet wurden. Das Blattmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss erfolgte die schrittweise Homogenisation und Aufnahme in 1,8 ml 80 %-igem Ethanol. Nach einer 30 minütigen Schüttelphase erfolgte ein Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 rpm, Tischzentrifuge), der zur Abtrennung von Zell- und Gewebetrümmern diente. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in einer SpeedVac eingeengt. Das getrocknete Pellet wurde im Anschluss in 1 ml Puffer A gelöst und steril filtriert, um die HPLC-Säule vor Verunreinigungen zu schützen. Für die Analyse wurde eine 1:50 Verdünnung der Extrakte eingesetzt, um eine optimale Konzentration der Aminosäuren zu gewährleisten.

Vor der jeweiligen Analyse erfolgte die Reinigung der HPLC-Anlage durch die sich abwechselnde Spülung der Pumpen mit dem Puffer A und Puffer B. Die Kalibrierung der Säule wurde folgend mit dem Proben-Puffer A durchgeführt. Die hergestellten Extrakte wurden in die HPLC-Vials überführt und dienen der Analyse. Die Derivatisierung (Vorsäulenderivatisierung) der Aminosäuren erfolgte unter Zugabe von 50 µl OPA-Reagenz, zu jeweils 50 µl der Extrakte. 10 µl der derivatisierten Proben wurden auf die Säule appliziert und bei einem binären Gradienten aus Puffer A und B (bis der Anteil von Puffer B 100 % betrug) laufen gelassen. Dadurch erreichte man ein verzögertes Ablösen der Aminosäuren von der Säulenmatrix, sodass die einzelnen Aminosäuren hintereinander als Peak erschienen. Die Detektion der Aminosäuren erfolgte beim Austreten aus der Säule durch eine Fluoreszenzanregung mit einer Xenon-Lampe. Der Zeitpunkt des Austritts der Aminosäuren aus der Säule (Retentionszeit) und ein Aminosäurestandard (Sigma-Aldrich) ermöglichten eine genaue Identifikation des Aminosäurepeaks.

### 3.2.20. Metabolomanalysen (GC-MS)

Um die einzelnen Metabolite aus Pflanzen untersuchen zu können, ist es notwendig, dass diese möglichst schonend aus der Pflanze extrahiert werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probenahme schnell und genau erfolgt. Schwankungen und Ungenauigkeiten hierbei können zu erheblichen Fehlern in der Auswertung führen. Die Extraktion und Analyse der Metabolite erfolgte nach Lisec *et al.* (2006), wobei die beschriebene Methode für Intermediate der Photorespiration optimiert worden ist.

Extraktion: Für die Analyse wurde 50 mg Blattmaterial von den Pflanzen gewonnen und schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Homogenisierung erfolgte unter Verwendung einer Retschmühle, wobei die Proben mit vorgekühlten Stahlkugeln versetzt und im Anschluss geschüttelt wurden (2 min, 30 l/s). Zum Abstoppen der Enzymaktivitäten erfolgte die Zugabe von 600 µl N, N-Dimethylformamide (100 %, -20 °C). Als interner Standard für die polare Phase, erfolgte die Zugabe von 5 µl <sup>13</sup>C-Sorbitol (2 mg/10 ml Stocklösung in Wasser). Ebenfalls wurden 400 µl Wasser zugegeben und das resultierende Gemisch für 10 min bei 4 °C geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (8 min, 14000 rpm, 4 °C) wurde die flüssige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Xylen versetzt. Nach einer 10 minütigen Schüttelphase und einer erneuten Zentrifugation (3 min, 14000 rpm, 4 °C) wurde die organische Phase verworfen und jeweils 2 Aliquots der Probe (400 µl) in der SpeedVac getrocknet. Falls die Proben nicht gleich zur Derivatisierung eingesetzt wurden, wurden die resultierenden Pellets zum Schutz mit Argon überschichtet und bei -80 °C gelagert.

Derivatisierung: Die Derivatisierung ist nötig, um die Metabolite bei der später folgenden Gaschromatographie gasflüchtig zu machen und in der sich anschließenden Massenspektrometrie (GC-MS) detektieren zu können. Bei einer längeren Lagerung wurden die zu derivatisierenden Proben erneut in der SpeedVac getrocknet. Zur weiteren Aufarbeitung wurden den Proben 20 µl Methoxyaminhydrochlorid (40 mg/ml in Pyridin) zugegeben und für 90 min bei 30 °C inkubiert. Um eventuelle Verluste zu minimieren und ein homogenes Gemisch zu erzeugen, erfolgte ein kurzer Zentrifugationsschritt, um sich am Deckel befindende Tropfen zu setzen. Danach erfolgte die Zugabe von 180 µl Derivatisierungsreagenz (MSTFA) und 10 µl Alkan-Mix als Marker für die polare Phase. Daran schloss sich eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C an, sowie eine kurze Zentrifugation und der Transfer des Gemisches in die GC-Vials. Die Proben stehen nach diesen Schritten für die Analytik bereit.

Analytik: Die wie oben beschrieben vorbereiteten Proben wurden anschließend mittels Gaschromatographie und sich daran anschließender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse erfolgte nach Lisec *et al.* (2006).

### 3.2.21. <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente

Für manche Analysen des Metaboloms stellen Ansätze unter Verwendung von Isotopen eine sensitivere Methode zur Determination dar. Dabei ging es nicht um die Bestimmung der steady-state Gehalte der einzelnen Metabolite der Photorespiration sondern um den Einbau eines markierten Substrates in Intermediate des pflanzlichen C2-Zyklus. Dazu wurden die Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen (Tag-/Nacht-Zyklus: 10 h/14 h, Tag-/Nacht-Temperatur: 20/18 °C, Lichtintensität: ca. 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bis zum Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) angezogen und für die Probenahme verwendet. Dazu wurden Blattplättchen von den Pflanzen gewonnen und in 10 mM MES-KOH-Lösung (pH 6,5, 10 mM [U-<sup>13</sup>C]-Glukose) inkubiert, um den Einbau der <sup>13</sup>C markierten Glukose über den Transpirationsstrom zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte für 2 h, bei einer Lichtintensität von 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Häufigkeit des <sup>13</sup>C wurde nach Roessner-Tunali *et al.* (2004) und Sweetlove *et al.* (2006) bestimmt. Die Akkumulation des Isotops wurde wie von Sienkiewicz-Porzucek *et al.* (2008) beschrieben bestimmt.

### 3.2.22. Standardmessungen des CO<sub>2</sub>-Austausches (Licor 6400)

Die Messungen von photosynthetischen Parametern, wie der Photosyntheserate und dem CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt erfolgte mit dem Licor Li-6400-Gaswechselsystem. Dabei erfolgten die Messungen an Pflanzen, die unter Normalluft bis zur vollständigen Entwicklung der Rosettenblätter (Wachstumsstadiums 5.1 nach Boyes *et al.*, 2001) angezogen worden sind. In einigen Fällen war es aufgrund der Beeinträchtigung des Wachstums von Mutanten nötig, dass die Pflanzen bis zu diesem Stadium unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen angezogen worden sind, um das Wachstum zu synchronisieren. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden diese dann auf Normalluft transferiert und nach einer einwöchigen Adaptationsphase den Messungen unterzogen. Für die Messungen wurden die Blätter der Pflanzen, in eine zum System gehörende Fluorometer-Blattkammer (LCF: leaf chamber fluorometer) eingespannt, welche mit einem Infrarot-Gasanalysator (IRGA: infrared-gas analyzer) verbunden ist. Nach einer Adaptationsphase von ca. 20 min erfolgte die jeweilige Bestimmung der Parameter mit einer Lichtintensität (PPFD: *photosynthetic photon flux density*) von 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , welche durch eine im System integrierte rot/blau LED-Lichtquelle ausgestrahlt wird. Die Standardmessungen erfolgten unter Normalluft (21 % Sauerstoff, 380  $\mu\text{l/L CO}_2$ ) und mit einer Blatttemperatur von 25 °C. In einigen Fällen wurden Versuche zur Sauerstoffinhibierung durchgeführt, wobei alle Parameter der Messung wie oben beschrieben verblieben und lediglich die Konzentration des Sauerstoffs in der Messluft verändert wurden (10 %, 30 % bzw. 40 %). Die Berechnung der Photosyntheserate und des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes sowie die statistische Auswertung erfolgten mit dem Programm Excel.

### 3.2.23. Standardmessung der Chlorophyll-Fluoreszenz (Imaging-PAM)

Die Messung der Chlorophyll a Fluoreszenz erfolgte auf der Oberseite der Blattoberfläche, mit einem Imaging-PAM (M-Serie) Pulse Amplitude Modulations Chlorophyll Fluorometer (Walz, Schreiber *et al.*, 1986). Die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) wurde mit reguliertem, schwachem Rot-Licht gemessen. Zuvor wurden die zu vermessenen Pflanzen für mindestens 10 min dunkeladaptiert. Die maximale Fluoreszenz wurde zum einem im dunkeladaptierten Zustand ( $F_m$ ) und während der Belichtung ( $F_m'$ ) gemessen, welche durch einen Lichtsättigungspuls induziert wurde ( $5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , für 0,8 s). Der  $F_v/F_m$  Index, als Maß für die PS II-Aktivität wurde nach der Formel:  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m'$  berechnet. Die maximale Quantenausbeute des PSII ( $Y_{\text{PSII}}$ ) wurde berechnete nach der Formel:  $Y_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$ , wobei  $F_s$  die steady state Fluoreszenz angibt. Darauf basierend wurden die absoluten Eletronentransportraten um das PSII bei einer gegebenen Lichtintensität durch die Formel:  $\text{ETR} = Y_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times 0,84 \times 0,5$  berechnet. Die angegebenen Faktoren beruhen aus der Annahme, dass 84 % des eingestrahnten Lichts vom Blatt absorbiert werden (Faktor 0,84) und das zum Transport eines Elektrons durch beide Photosysteme 2 Quanten nötig sind (Faktor 0,5).

## 4. Ergebnisse

In photosynthetischen Organismen ist die Rubisco das Schlüsselenzym für die Fixierung von CO<sub>2</sub>. Durch die Carboxylierungsreaktion wird CO<sub>2</sub> auf das primäre Akzeptormolekül Ribulose-1,5-Bisphosphat übertragen, wodurch 2 Moleküle 3-PGA entstehen. Diese gehen in den Calvin-Zyklus ein und werden für den Aufbau von organischen Substanzen verwendet. Wie bereits erwähnt, kann O<sub>2</sub> ebenfalls an das aktive Zentrum der Rubisco binden, wodurch die Oxygenase Funktion abläuft. Durch die Oxygenasefunktion der Rubisco entsteht lediglich ein Molekül 3-PGA und ein Molekül 2-PG. Dieses Metabolit ist toxisch und wird durch die Photorespiration in 3-PGA umgewandelt. Neben dieser Auffüllreaktion für den Calvin-Zyklus dient die Photorespiration der Entgiftung weiterer, toxischer Intermediate (Eisenhut *et al.*, 2007) und dem Schutz vor Photoinhibition (Takahashi *et al.*, 2007). Ein wichtiges Intermediat der Photorespiration ist das 3HP, welches durch Transaminierung von Serin gebildet wird. Es ist die generell akzeptierte Meinung, dass 3HP ausschließlich durch die peroxisomale HPR1, unter Verwendung des Co-Faktors NADH, zu D-Glycerat reduziert wird. Vorarbeiten lieferten jedoch einige Hinweise, dass neben der HPR1 weitere Enzyme beim 3HP-Umsatz mitwirken. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Verhältnisse genauer zu beleuchten und das Hydroxypyruvat-reduzierende System in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* detailliert zu charakterisieren.

### 4.1. Transkriptionelle Regulation der C2-Zyklus Gene

Eine Möglichkeit um unbekannte photorespiratorische Enzyme zu finden liegt in der Durchführung von Expressionsstudien. Da die Photorespiration eng mit der Photosynthese gekoppelt ist, liegt es nahe, dass die Gene des C2-Zyklus vorrangig in photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert sind. In heterotrophen Geweben hingegen sollten die entsprechenden Transkripte nur in sehr geringem Umfang vorkommen, wenn deren Funktion ausschließlich photorespiratorisch ist. Die Expression der photosynthetischen Gene wird durch Licht induziert (Raman und Oliver, 1997) und *in silico* Analysen ergaben, dass auch photorespiratorische Gene und damit assoziierte, Co-reguliert sind (Reumann und Weber, 2006). Dieses Charakteristikum könnte für die Identifizierung bisher unbekannter Komponenten der Photorespiration, wie z.B. alternativer 3HP-umsetzender Enzyme, genutzt werden. Die Abbildung 4-1 zeigt eine *in silico* Analyse der Expression von 10 Genen des C2-Zyklus, deren photorespiratorische Funktion klar nachgewiesen werden konnte (siehe auch Tabelle 2-1).

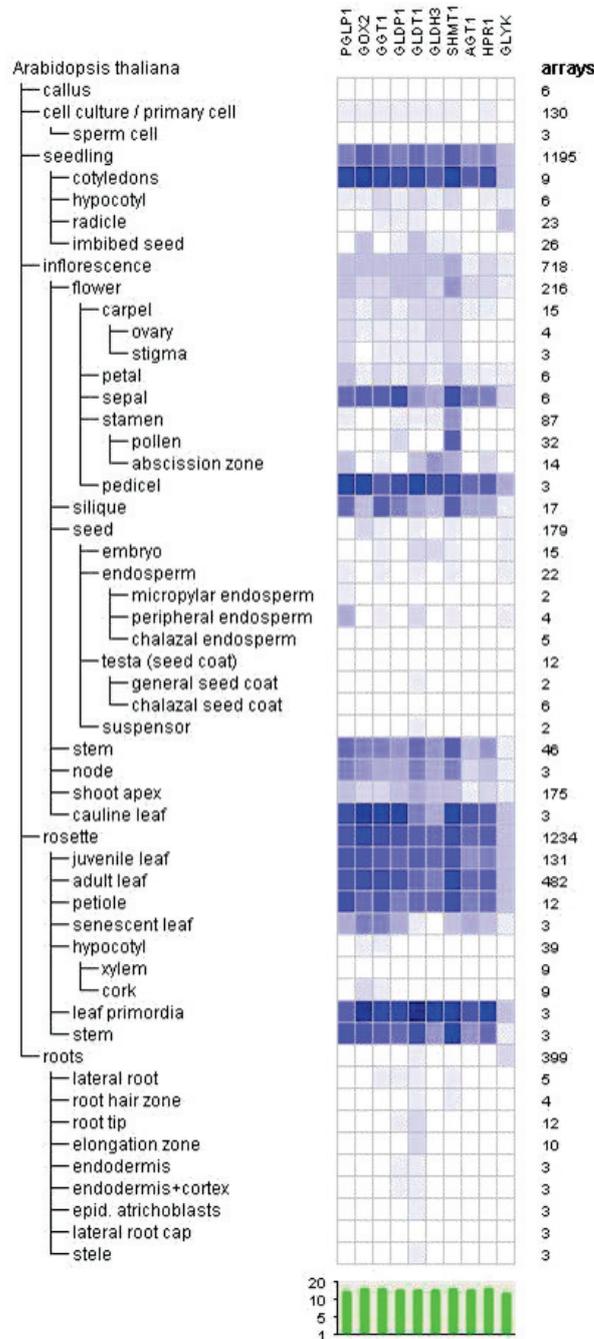


Abbildung 4-1 Expressionsmuster photorespiratorischer Gene.

Vergleich der Expression ausgewählter Gene der Photorespiration in Abhängigkeit verschiedener Entwicklungsstadien. PGLP1 2-Phosphoglykolat-Phosphatase, GOX2 Glykolat-Oxidase, GGT1 Glu:Glyoxylat Aminotransferase, GLDP1 Glycin-Decarboxylase; P-Protein1, GLDT Glycin-Decarboxylase; T-Protein, GLDH Glycin-Decarboxylase; H-Protein, SHMT1 Serin-Hydroxymethyltransferase 1, AGT1 Serin:Glyoxylat Aminotransferase, HPR1 3-Hydroxypyruvat Reduktase, GLYK D-Glycerat-3-Kinase, (Abbildung erstellt mit: <https://www.genevestigator.com>).

Die Abbildung zeigt, dass die 10 untersuchten, photorespiratorischen Gene dem gleichen Expressionsmuster wie typische Photosynthesegene folgen. Sie sind vor allem in photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert und zeigen die stärkste Expression im

Keimling, der sich entwickelnden Rosette und der sich entwickelnden Blüte. Im Gegensatz zu den photosynthetischen Geweben, ist die Abundanz in heterotrophen Geweben, wie z.B. der Wurzel, sehr gering bzw. nicht nachzuweisen. Ausnahme hierbei bilden unter anderem einige GDC-Untereinheiten, was darauf schließen lässt, dass die Funktion der entsprechenden Proteine nicht nur auf die Beteiligung am C2-Zyklus beschränkt ist. Diese Annahme lässt sich auch durch Studien an Mutanten der GDC belegen, da Knock-out Mutanten des P- und T-Proteins auch unter nicht photorespiratorischen Bedingungen letal sind (Engel *et al.*, 2007, 2008).

Wie in der Abbildung 4-1 sichtbar, folgt die Expression der HPR1 dem typischen Muster für photorespiratorische Gene. Um diese *in silico* Analyse zu unterstützen, wurde anschließend die Expression der HPR1 auch *in planta*, durch eine gewebsspezifische Expressionsanalyse mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurde RNA aus den einzelnen Organen von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (col.0) isoliert und die entsprechende cDNA hergestellt. Diese diente dann als Template für die durchgeführte RT-PCR. Die Abbildung 4-2 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

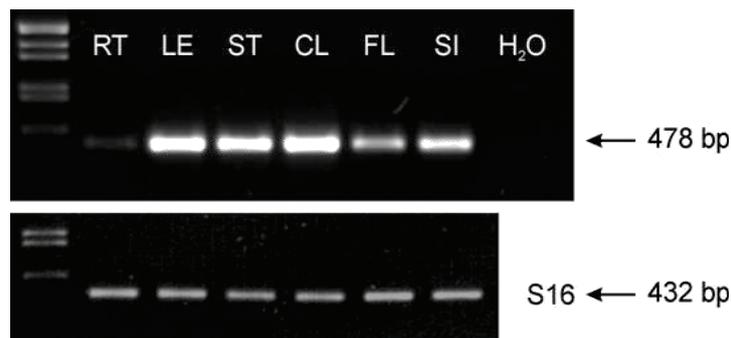


Abbildung 4-2 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der AtHPR1.

Die Expression der AtHPR1 erfolgt vorrangig in photosynthetisch aktivem Gewebe. Die RNA wurde aus den entsprechenden Organen des *Arabidopsis* Wildtyps (col.0) isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Als interne Kontrolle diente die S16 RNA. (RT – Wurzeln, LE – Rosettenblätter, ST – Stängel, CL – Hochblätter, FL – Blüte, SI – Schoten, H<sub>2</sub>O – Wasserkontrolle).

Wie anhand der gewebsspezifischen Expressionsanalyse zu erkennen ist, ist das Transkript der AtHPR1 bevorzugt in grünen, photosynthetisch aktiven Organen exprimiert. In der Wurzel lässt sich das Transkript ebenfalls nachweisen, jedoch ist die Stärke der Expression hier deutlich reduziert. Das Vorhandensein des Transkriptes in heterotrophen Gewebe lässt darauf schließen, dass die AtHPR1 neben der Photorespiration unter Umständen noch an anderen Stoffwechselwegen beteiligt ist. Als mögliche Funktionen können die eingangs benannten Reaktionen im Serin-Weg (Hanson und Hanson, 1996; Vorholt, 2002) oder der Glukoneogenese (Xue *et al.*, 1999) in Frage kommen.

#### 4.2. Die AtHPR1-Mutanten – Eine Ausnahme im C2-Zyklus

Die Isolation von T-DNA-Insertionslinien bietet eine gute Möglichkeit, Gene und deren Funktion zu untersuchen. Durch die Insertion können spezifisch einzelne Gene inaktiviert und der resultierende Verlust genauer untersucht werden (Alonso *et al.*, 2003). Für die meisten Kernenzyme der Photorespiration konnten bisher definierte Mutanten, in verschiedenen Pflanzenspezies und darunter auch für *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Die einzige Ausnahme bildet bis heute die peroxisomale HPR1, da für dieses Gen bisher keine exakte Geninaktivierung gezeigt werden konnte. Wie zuvor beschrieben sind Mutanten im C2-Zyklus unter Normalluftbedingungen nicht lebensfähig, lassen sich jedoch durch Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft kultivieren. Dieser spezifische Phänotyp bietet eine einfache Möglichkeit photorespiratorische Mutanten zu identifizieren (Somerville, 2001). Da es sich bei der AtHPR1 (At1g68010, *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) um ein Schlüsselenzym des pflanzlichen C2-Zyklus handelt, welches darüber hinaus durch ein *single-copy* Gen codiert wird (Mano *et al.*, 1997), erfolgte die Isolation der T-DNA-Insertionslinien unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (1 % CO<sub>2</sub>). Die primäre Identifikation und Bereitstellung der Linien erfolgte durch die NASC-Datenbank (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center). Die beiden Linien werden im Folgenden als *hpr1-1* und *hpr1-2* bezeichnet. Die Abbildung 4-3 zeigt einen Überblick über die Genstruktur der AtHPR1 und die entsprechenden Positionen der inserierten T-DNA Fragmente.

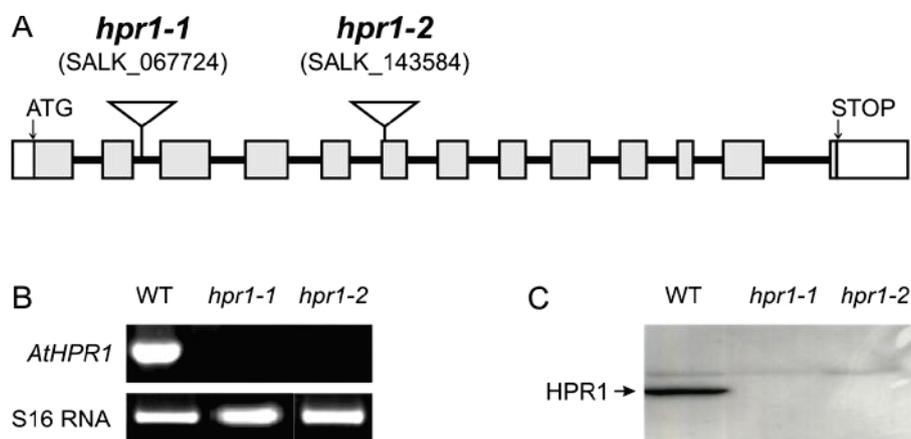


Abbildung 4-3 Isolation der AtHPR1-Insertionsmutanten.

Die Insertion führt in beiden Fällen zum vollständigen Verlust der Genaktivität. (A) Struktur des AtHPR1 Gens und die dazugehörige Position der T-DNA-Insertionen in beiden unabhängigen Linien. Die Linie *hpr1-1* trägt die Insertion im zweiten Intron, die Linie *hpr1-2* im sechsten Exon. (B) Anhand der RT-PCR ist zu sehen, dass in beiden Insertionslinien kein HPR1-Transkript mehr nachzuweisen ist. Die cDNA wurde aus Blättern isoliert und der Wildtyp zum Vergleich herangezogen. Als interne Kontrolle diente die S16 RNA. (C) Das HPR1-Protein lässt sich ebenfalls in beiden Linien nicht nachweisen (spezifischer Spinat-HPR1 Antikörper).

Im Anschluss an die erfolgreiche Isolierung von homozygoten Pflanzen, erfolgte die phänotypische Charakterisierung der *AtHPR1*-Mutanten. Dabei sollte festgestellt werden, ob der vollständige Ausfall der HPR1 ebenfalls den beschriebenen, photorespiratorischen Phänotyp nach sich zieht. Die isolierten Insertionslinien sowie die entsprechende Wildtyp-Kontrolle (*col.0*) wurden dazu unter kontrollierten Bedingungen angezogen und das Wachstum miteinander verglichen. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte hierbei zum einen unter nicht photorespiratorischen und zum anderen unter photorespiratorischen Bedingungen. Dabei stellte sich heraus, dass unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen keine phänotypischen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den HPR1-Insertionslinien zu erkennen sind (Daten nicht gezeigt). Im klaren Gegensatz zu den bisher isolierten C2-Zyklus-Mutanten (Somerville, 2001) ist es allerdings möglich, diese Pflanzen auch unter Normalluftbedingungen zu kultivieren. Damit nehmen die *AtHPR1* Insertionslinien eine Sonderstellung unter den bisher bekannten C2-Zyklus-Mutanten ein. Die Keimung der Insertionslinien erfolgt dem Wildtyp synchron, jedoch zeigen die Pflanzen im Anschluss ein geringfügig verlangsamtes Wachstum und leicht hellere Blätter. Nach ca. 3-4 Wochen sind diese Effekte jedoch vernachlässigbar und die Pflanzen von der Kontrolle nicht zu unterscheiden. Eine sehr interessante Eigenschaft der HPR-Mutanten ist allerdings die Tatsache, dass deren Phänotypen in Abhängigkeit von der Lichtperiode weniger bzw. stärker vom Wildtyp abweichen. Erfolgt die Kultivierung der Linien unter Langtagbedingungen (Tag-/Nacht-Zyklus von 16 h/8 h), wird der anfänglich sichtbare Wachstumsunterschied schnell aufgeholt und es lässt sich kein Unterschied zwischen den Insertionslinien und der Kontrolle feststellen (Daten nicht gezeigt). Eine Verkürzung der Lichtperiode führt hingegen zur Verstärkung der zuvor beschriebenen Wachstumseffekte. Die Pflanzen sind kleiner, wachsen langsamer und zeigen eine hellere Blattfarbe. Der Effekt tritt ab einem Tag-/Nacht-Zyklus von 12 h/12 h auf. Bei Kultivierung der Pflanzen mit dieser Photoperiode sind die Wachstumsunterschiede etwa nach 3 Wochen vollständig aufgehoben und die Pflanzen vom Wildtyp nicht mehr zu unterscheiden. Weitere Verkürzungen der Lichtperiode (Tag-/Nacht-Zyklus von 10 h/14 h oder 8 h/16 h) führen dazu, dass die beschriebenen Unterschiede wesentlich länger bestehen bleiben und sich verdeutlichen. Die Pflanzen bilden im Vergleich zur Kontrolle etwa 2-3 Wochen verspätet ihre Infloreszenzen aus und zeigen eine deutlich hellere Blattfarbe, was auf einen reduzierten Chlorophyllgehalt schließen lässt. Dennoch wird der beschriebene Wachstumsunterschied bis zum Ende der Vegetationsperiode vollständig aufgeholt und die blühenden HPR-Mutanten sind der Größe nach nicht mehr vom Wildtyp zu unterscheiden. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die HPR1-Linien unter Kurztagbedingungen einen um 3-4 Wochen verlängerten Lebenszyklus zeigen, diesen jedoch vervollständigen können. Die Abbildung 4-4 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem beschriebenen Wachstumseffekt und der Photoperiode.



Abbildung 4-4 Phänotyp der *AtHPR1*-Insertionslinien

Der vollständige Ausfall der HPR1 führt nicht zum letalen Phänotyp unter Normalluftbedingungen. In Abhängigkeit von der Lichtperiode sind lediglich kleine Wachstumsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 12 h/12 h (oben) und von 10 h/14 h (unten) angezogen. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte im Abstand von jeweils einer Woche. Die gezeigten Aufnahmen entsprechen dem Wachstum nach 3 Wochen (links) und nach 6 Wochen (rechts).

Der komplette Ausfall der HPR1 zieht auch eine drastische Reduktion der HPR-Aktivitäten nach sich. Aus diesem Grund ist es umso erstaunlicher, dass nur geringe Wachstumsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auftreten. Wie eingehend bereits erwähnt, setzt die HPR1 3HP bevorzugt unter Verwendung des präferenziellen Co-Substrates NADH um. Sie ist allerdings auch in der Lage 3HP mit NADPH zu reduzieren, wobei die spezifische Aktivität mit diesem Co-Substrat deutlich geringer ist. Eine untergeordnete Rolle ist der HPR1 bei der Umsetzung von Glyoxylat zu zuschreiben, da für dieses Substrat ein sehr hoher  $K_m$ -Wert festgestellt wurde und somit nur eine Nebenreaktion darstellt (Givan und Kleczkowski, 1992). Die Mutagenese des HPR1-Gens führt zu einer bis zu 94 %igen Reduktion der NADH-abhängigen 3HP-Reduktion. Deutlich geringer zeigt sich der Effekt bei der NADPH-abhängigen Reduktion, da diese um nur etwa die Hälfte reduziert

ist. Die Umsätze von Glyoxylat sind, wie in etwa zu erwarten war, mit einer bis zur 30 %igen Verminderung nur geringfügig betroffen. Anhand der Enzymmessungen lässt sich somit bestätigen, dass die HPR1 hauptsächlich NADH-abhängig 3HP reduziert. Da in den HPR-Mutanten jedoch noch eine deutliche HPR-Aktivität (NADPH-abhängig) gemessen werden konnte, muss wenigstens ein weiteres, alternatives Enzym in *Arabidopsis* vorhanden sein, welches zum 3HP Umsatz befähigt ist. Wie bereits bekannt ist, existiert in höheren Pflanzen neben der NADH- auch eine NADPH-abhängige Hydroxypyruvat-Reduktion. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, die NADPH(NADH)-3HP(Glyoxylat)-Reduktase (HPR2), konnte bisher aus Spinat gereinigt und biochemisch charakterisiert werden (Kleczkowski *et al.*, 1987, 1988 und 1992). Das Vorhandensein einer alternativen HPR2 ist der wahrscheinlichste Grund für die Restaktivitäten in den HPR1-Mutanten und dem nicht vorhandenen photorespiratorischen Phänotyp dieser Pflanzen. Bisher ist jedoch für keine Pflanzenspezies das entsprechende Gen bekannt und musste demzufolge erst identifiziert werden.

#### 4.3. Identifikation der alternativen AtHPR2

Die Identifikation der alternativen HPR2 erfolgte durch die Kombination biochemischer Methoden der Proteinreinigung und massenspektrometrischer Analyse. Das Ausgangsmaterial der Proteinreinigung stellten ca. 600 g *hpr1-1* Blattmaterial dar. Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen, mit einer Photoperiode von 12 h/12 h angezogen, bis die Rosettenblätter vollständig entwickelt waren. Nach Herstellung eines Proteinrohextraktes, wurde die NADPH-abhängige HPR-Aktivität angereichert und bis nahe der Homogenität gereinigt (Timm, Diplomarbeit, 2006). Dabei kamen verschiedene Reinigungsschritte wie die Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie zum Einsatz. Weiterhin stand ein spezifischer Antikörper gegen die Spinat-HPR2 zur Verfügung (Kleczkowski *et al.*, 1988), durch den die angereicherten Fraktionen überprüft und die entsprechende, homologe Bande im SDS-Gel eindeutig identifiziert werden konnte. Diese wurde folgend aus dem Gel geschnitten, die darin enthaltenen Proteine mit Trypsin verdaut und für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt. Die Abbildung 4-5 zeigt das SDS-Gel des finalen Reinigungsschrittes und den korrespondierenden Western-Blot, der zur Proteinidentifikation diente.

Die Fraktionen des finalen Reinigungsschrittes (31 und 32) enthielten stark angereicherte (ca. 460 fach), NADPH-abhängige HPR-Aktivität und wie anhand der Abbildung 4-5 zu erkennen ist, 3 Protein-Banden im erwarteten Größenbereich von 36 kDa. Die entsprechenden Banden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und analysiert. Bande 1 und 2 konnten als Isoformen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) identifiziert werden. Die dritte Bande des finalen Reinigungsschrittes, welche spezifisch mit

dem HPR2-Antikörper reagierte, konnte als At1g79870 identifiziert werden. Das entsprechende Protein gehört zur Familie der Oxidoreduktasen und enthält eine D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure-Dehydrogenase-Domäne sowie eine NAD(P)-Bindestelle (2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen, PF00389 bzw. IPR006139, Dengler *et al.*, 1997). Es besteht aus 313 Aminosäuren, ist 34,2 kDa groß und liegt somit etwa im Bereich der Spinat HPR2 (ca. 38 kDa). Für dieses Protein konnte gezeigt werden, dass es im Zytosol der Zelle lokalisiert ist (Kleczkowski *et al.*, 1988). Auch bei dem *Arabidopsis*-Protein lässt sich kein spezifisches Peptid für das Targeting in ein Organell nachweisen. Diese *in silico* Analysen lassen für *Arabidopsis* ebenfalls die subzelluläre Lokalisation der HPR2 im Zytoplasma vermuten (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp>). Der Versuch der experimentellen Verifizierung mittels GFP-Fusion liefert bisher keinen eindeutigen Hinweis auf ein konkretes Targeting der HPR2. Vergleicht man die Proteinsequenzen der HPR1 und der identifizierten HPR2 miteinander, lässt sich eine Sequenzidentität von ca. 51 % feststellen. Das identifizierte Gen kodiert somit für ein Protein, welches potentiell in der Lage ist, funktionell als HPR zu agieren.

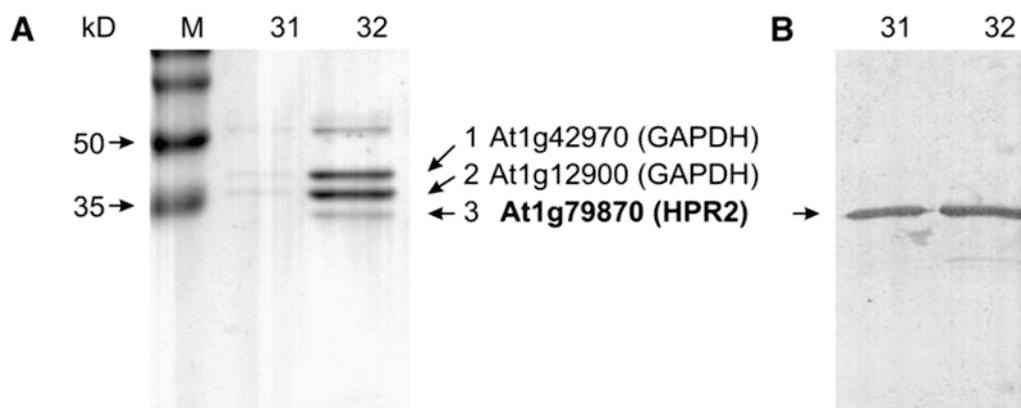


Abbildung 4-5 Identifikation der alternativen *At*HPR2

SDS-Page der aktivsten Fraktionen nach dem finalen Reinigungsschritt (A). Die Banden 1, 2 und 3 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und der massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die Bande 3 zeigte eine spezifische Reaktion mit dem Antikörper gegen die Spinat HPR2 (B) und stellt somit das homologe Protein in *Arabidopsis* dar. Das kodierende Gen des Proteins konnte als At1g79870 identifiziert werden.

Der experimentelle Nachweis, dass es sich bei dem identifizierten Protein um eine funktionelle HPR handelt, sollte im Folgenden mittels heterologer Expression in *E. coli* erbracht werden. Das Protein wurde dazu überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie (NiNTA) gereinigt. Zum Vergleich wurde die HPR1 herangezogen und auf dem gleichen Weg rekombinant hergestellt. Im Anschluss wurden die beiden Proteine auf verschiedene Substrat/Co-Substrat Kombinationen untersucht. Neben der unterschiedlichen Präferenz der beiden HPRs in Bezug auf ihre Co-Substrate konnten Kleczkowski *et al.*, (1991) zeigen, dass sich die Spinat HPR2 spezifisch durch Oxalat

inhibieren lässt. Durch die Zugabe dieses Inhibitors (2 mM) konnte ein drastischer Aktivitätsverlust des Enzyms festgestellt werden. Im klaren Gegensatz dazu wird die HPR1 nur geringfügig durch diesen Inhibitor beeinflusst. Die Tabelle 4-1 zeigt eine Zusammenfassung der Enzymmessungen an den rekombinanten HPR1- und HPR2-Proteinen aus *Arabidopsis*.

Tabelle 4-1 Aktivitätsmessungen an der rekombinanten HPR1 und HPR2.

Der identifizierte Leserahmen At1g79870 kodiert die NADPH-abhängige HPR2 in *Arabidopsis*. Das Protein nutzt ebenfalls Glx als Substrat und ist stark durch Oxalat inhibierbar. Die Aktivitäten stellen Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3) in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  dar. Die Prozentangaben entsprechen den Aktivitäten nach Zugabe des Inhibitors Oxalat (2 mM) im Vergleich zur ungehemmten Kontrolle.

Hydroxypyruvat Reductase	Without Oxalate Mean $\pm$ SD	With Oxalate Mean $\pm$ SD	%
<b>AtHPR1 (At1g68010)</b>			
Hydroxypyruvate:NADH	222.00 $\pm$ 15.70	147.00 $\pm$ 22.00	66
Hydroxypyruvate:NADPH	12.00 $\pm$ 1.40	11.60 $\pm$ 1.10	97
Glyoxylate:NADH	6.40 $\pm$ 0.60	5.80 $\pm$ 0.40	90
Glyoxylat:NADPH	0.26 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.02	77
<b>AtHPR2 (At1g79870)</b>			
Hydroxypyruvate:NADH	1.40 $\pm$ 0.12	0.300 $\pm$ 0.080	21
Hydroxypyruvate:NADPH	5.50 $\pm$ 0.43	0.700 $\pm$ 0.090	13
Glyoxylate:NADH	0.36 $\pm$ 0.02	0.010 $\pm$ 0.001	3
Glyoxylat:NADPH	4.60 $\pm$ 0.36	0.100 $\pm$ 0.026	2

Wie anhand der Tabelle 4-1 zu erkennen ist, ist das Protein des identifizierten Leserahmens At1g79870 in der Lage 3HP umzusetzen. Im Gegensatz zur HPR1 arbeitet die HPR2 mit NADPH als bevorzugtem Co-Substrat. Neben 3HP ist das Protein ebenfalls in der Lage Glyoxylat als alternatives Substrat zu verwenden und zeigt eine starke Inhibition durch Oxalat. Da die HPR1 nur geringfügig durch diesen Inhibitor beeinflusst ist, kann so zwischen den beiden Isoformen unterschieden werden. Die erzeugten Daten aus der Proteinreinigung, der spezifischen Reaktion auf den Spinat-HPR2-Antikörper und der Enzymmessungen an dem rekombinanten Protein zeigen zweifelsfrei, dass es sich bei At1g79870 um die gesuchte alternative HPR2 in *Arabidopsis* handelt.

#### 4.4. Ist die HPR2 funktionell am C2-Zyklus beteiligt?

Wie im Falle der HPR1 wurde zu Beginn auch die Expression der HPR2 *in silico* und *in planta* genauer untersucht. Durch das gewebspezifische Expressionsmuster ließ sich dabei ein erster Eindruck gewinnen, welche Funktion das Protein in der Pflanze ausübt. Wie

bereits unter 4.1 beschrieben wurde, werden die am C2-Zyklus beteiligten Gene vorrangig in photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert. Die Abbildung 4-6 zeigt das Ergebnis der Expressionsanalyse und es wird deutlich, dass das Muster der HPR2 dem der HPR1 sehr ähnlich ist. Auch die HPR2 ist vorrangig in grünen, photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert und die Abundanz in heterotrophen Geweben, wie der Wurzel ist eher gering. Da das Transkript jedoch auch hier vorkommt, liegt die Vermutung nahe, dass die HPR2 ebenfalls an anderen Stoffwechselwegen, außerhalb der Photorespiration beteiligt ist. Eine mögliche, alternative Funktion der HPR2 wurde für ein homologes Protein in der Buntnessel (*Coleus blumei*) diskutiert. Das Enzym ist hier vermutlich am Stoffwechselweg der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligt und könnte dort den Umsatz von Hydroxyphenylpyruvat gewährleisten. Jedoch sind die spezifischen Aktivitäten für dieses Substrat sehr gering, sodass diese Reaktion eher eine untergeordnete Rolle spielen dürfte (Kim *et al.*, 2004). Die Nebenreaktion mit anderen Substraten ist dennoch nicht überraschend, da das Protein zur Familie der D-Isomer spezifischen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen gehört und somit durchaus zum Umsatz von anderen Substraten in der Lage ist.

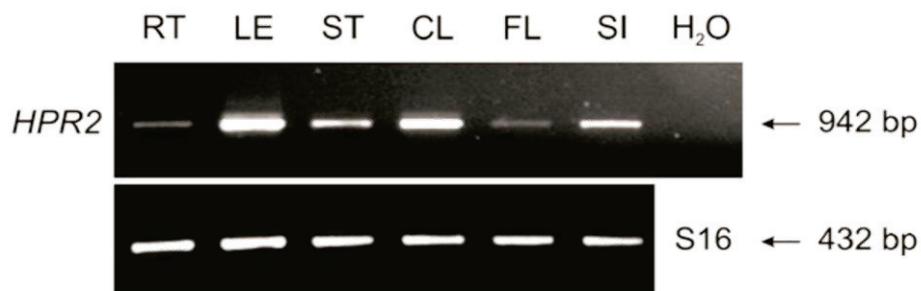


Abbildung 4-6 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der AtHPR2 mittels RT-PCR

Die Expression der HPR2 erfolgt vor allem in photosynthetisch aktivem Gewebe. Die RNA wurde aus den entsprechenden Organen von *Arabidopsis* Wildtyp (col.0) isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Als interne Kontrolle diente die S16 RNA. (RT – Wurzeln, LE – Rosettenblätter, ST – Stängel, CL – Hochblätter, FL – Blüte, SI – Schoten, H<sub>2</sub>O – Wasserkontrolle).

Um die physiologische Funktion der HPR2 in *Arabidopsis* genauer zu untersuchen, wurden für den identifizierten Leserahmen At1g79870 zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien in der NASC-Datenbank identifiziert und bestellt. Die Selektion homozygoter Pflanzen erfolgte auch in diesem Fall unter erhöhten CO<sub>2</sub> Bedingungen, da bei einer Beteiligung der HPR2 an der Photorespiration ebenfalls ein Sauerstoff sensibler Phänotyp zu erwarten war. Die Abbildung 4-7 zeigt einen Überblick über die Genstruktur der HPR2 und die Position der Insertionen (A), sowie den Knock-out Nachweis auf Transkript- (B) und Proteinebene (C).

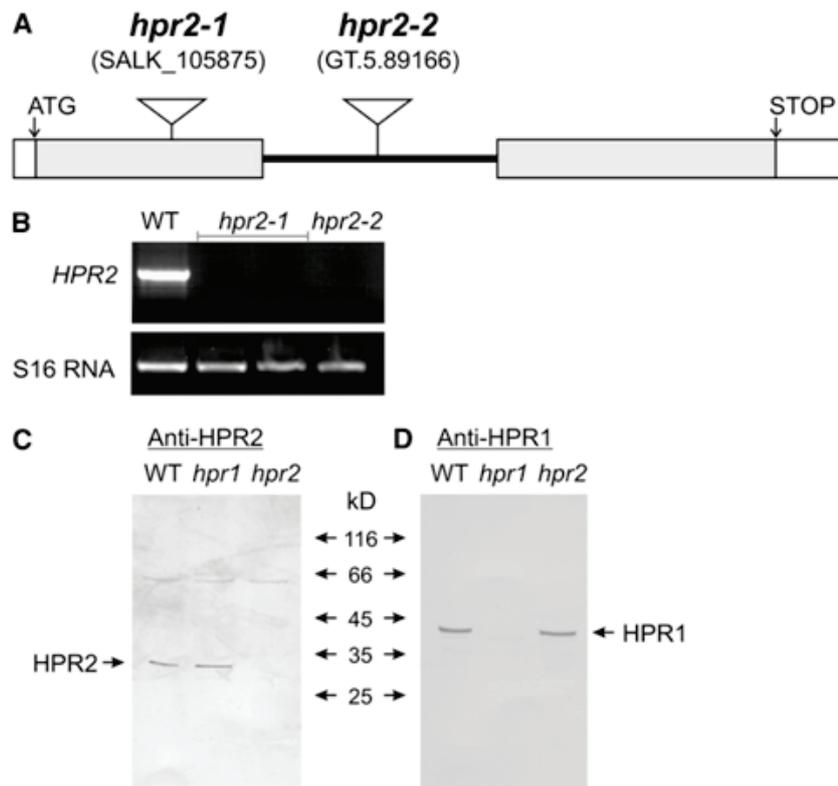


Abbildung 4-7 Isolation der *AtHPR2*-Insertionslinien.

Struktur des Gens At1g79870 und die Position der inserierten T-DNA-Fragmente (A). Die Linie *hpr2-1* trägt die Insertion im ersten Exon, die Linie *hpr2-2* im ersten Intron. In beiden unabhängigen Linien lässt sich weder das Transkript (B) noch das kodierende Protein (C) nachweisen. Die cDNA wurde aus Rosettenblättern isoliert und als interne Kontrolle diente die S16 RNA. Der Western Blot wurde mit einem Proteinextrakt aus Blättern und dem spezifischen Spinat-HPR2 Antikörper angefertigt. Als Vergleich wurde zusätzlich auch ein Proteinextrakt aus Blättern der *hpr1-1* Insertionslinie aufgetragen.

Wie der obigen Abbildung zu entnehmen ist, handelt es sich auch in diesem Fall um vollständige Knock-out Linien. In beiden Mutanten lässt sich weder das Transkript noch das kodierte Protein nachweisen. Damit sollte ein vollständiger Aktivitätsverlust des HPR2-Gens vorliegen. Im Anschluss erfolgte die phänotypische Charakterisierung der Mutanten. Dabei wurden die Pflanzen, äquivalent zu den *AtHPR1*-Linien, unter nicht photorespiratorischen und photorespiratorischen Bedingungen angezogen und mit den entsprechenden Kontrollen verglichen (col.0 für die *hpr2-1* und Ler für die *hpr2-2* Mutante). Der Knock-out der HPR2 in *Arabidopsis* blieb jedoch ohne sichtbare Folgen, unabhängig davon, ob die Pflanzen unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen oder Normalluft angezogen werden. Im Gegensatz zu den *AtHPR1*-Linien führt auch die Veränderung der Photoperiode nicht zu phänotypisch sichtbarer Auffälligkeiten. Somit lässt sich sagen, dass die HPR1 in *Arabidopsis* die Hauptfunktion in der Photorespiration übernimmt und die HPR2 von untergeordneter Bedeutung im Wildtyp ist. Die Abbildung 4-8 zeigt eine bildliche Darstellung der isolierten Pflanzen, bei zwei verschiedenen Photoperioden.



Abbildung 4-8 Phänotyp der *AtHPR2*-Insertionslinien.

Der vollständige Ausfall der HPR2 führt zu keinen phänotypisch sichtbaren Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen (*col.0* für *hpr2-1* und *Ler* für *hpr2-2*). Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 12 h/12 h (oben) und 10 h/14 h (unten) angezogen. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte im Abstand von jeweils einer Woche. Die gezeigten Aufnahmen entsprechen dem Wachstum nach 3 Wochen (links) und nach 6 Wochen (rechts).

Da kleinere Veränderungen im Stoffwechsel der Pflanzen vielleicht keine deutlichen Veränderungen des Phänotyps nach sich ziehen, sollten die Pflanzen einer genaueren Charakterisierung unterzogen werden. Mittels des LICOR-6400-Gaswechsel-Systems wurde die photosynthetische Leistung der Pflanzen untersucht. Die Methode erlaubt die Messung des Gaswechsels an intakten Blättern und ist somit nicht invasiv. Bestimmt wurden durch die Messungen die Parameter der Photosyntheserate und des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes. Die Abbildung 4-9 zeigt die Zusammenfassung der Messungen an Pflanzen der *AtHPR1*- und der *AtHPR2*-Insertionslinien im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, führt sowohl die Mutation der HPR1 als auch die Mutation der HPR2 zu Änderungen der bestimmten Parameter. In beiden Mutanten ist der CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt erhöht, sowie die Photosyntheserate verringert. Der Effekt ist auch bei

der HPR2-Mutante signifikant im Vergleich zum Wildtyp und verstärkt sich in der HPR1-Mutante. Auch diese Messungen machen deutlich, dass die HPR1 das Hauptenzym des photorespiratorischen Stoffwechsels darstellt. Jedoch scheint die HPR2 ebenfalls funktionell daran beteiligt zu sein. Weiterhin wird hier erstmals angedeutet, dass der bisherige Blick auf die ausschließliche Kompartimentierung der Photorespiration in Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien nicht umfassend genug ist. Die funktionelle Beteiligung der HPR2 an diesem Stoffwechselweg zeigt eindeutig, dass das Zytosol, als viertes subzelluläres Kompartiment eine wichtige Rolle spielt.

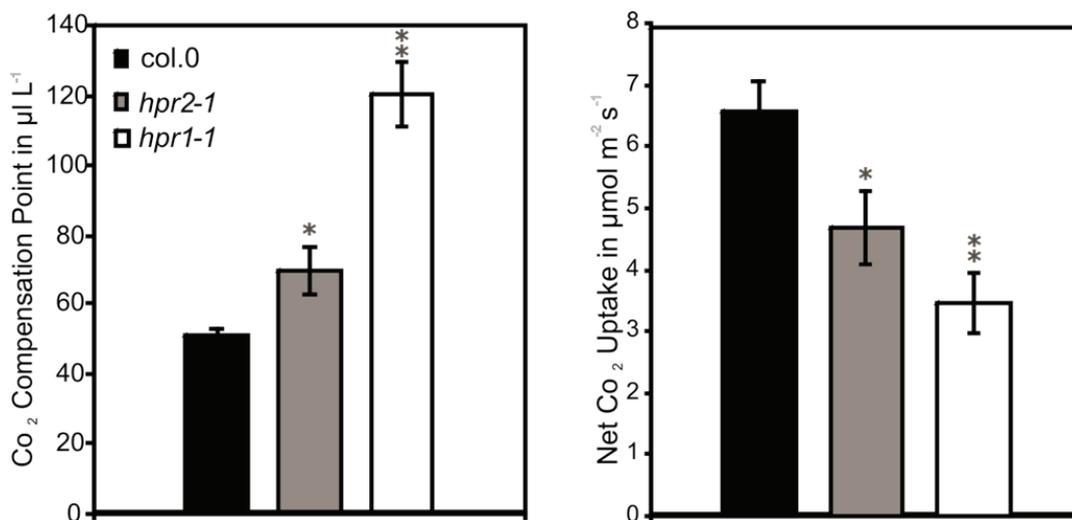


Abbildung 4-9 Photosynthetische Leistung der *AtHPR1*- und *AtHPR2*-Insertionslinien.

Dargestellt sind die CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkte (links) und die Photosyntheseraten (rechts) der beiden HPR-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluftbedingungen angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgten die Messungen (n = 5). Die Sternchen geben einen Aufschluss über die Signifikanz der Daten im Vergleich zum Wildtyp (\* P < 0,01) und im Vergleich zur *AtHPR2*-Mutanten (\*\* P < 0,01).

#### 4.5. HPR-Doppel Knock-out führt zur erhöhten Sauerstoffsensitivität

Da die Einzelmutationen beider HPRs keinen typischen Photorespirationsphänotyp nach sich ziehen und die beiden Gene möglicherweise redundant sind, sollte im Folgenden eine Doppelmutante aus HPR1 und HPR2 hergestellt werden. Diese wurde durch konventionelle Kreuzung der Linien *hpr1-1* und *hpr2-1* hergestellt. Nach Verifizierung beider Insertionen in der F1-Generation wurde die resultierende F2-Generation unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (1 %) angezogen und dem Screening unterzogen. Dabei konnten 3 doppelt-homozygote Pflanzen isoliert werden. In der Abbildung 4-10 ist exemplarisch die Kontroll-PCR für eine Doppelmutante dargestellt. Wie an Hand dieser Abbildung zu erkennen ist, lässt sich in den

erzeugten Doppelmutanten weder das Transkript der HPR1 noch das der HPR2 nachweisen. Bei den isolierten Pflanzen handelt es sich also um vollständige HPR1/2-Doppel-Knock-out Pflanzen. Überraschenderweise ist auch der Ausfall beider HPRs in *Arabidopsis* nicht letal. Im Folgenden sollte der Phänotyp der Mutante genauer untersucht werden, da das Screening der Doppelmutanten unter nicht photorespiratorischen Bedingungen durchgeführt wurde. Dazu wurden ein Satz an Pflanzen unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (1 %) und ein Satz unter Normalluftbedingungen unter gleichzeitiger Verwendung der entsprechenden Kontrollpflanzen angezogen. Wie an Hand der Abbildung 4-11 zu erkennen ist, lässt sich unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen kein Wachstumsunterschied zwischen der Doppelmutante und dem korrespondierenden Wildtyp verzeichnen. Die Kultivierung der Mutante unter Normalluftbedingungen ist allerdings ebenfalls möglich, führt jedoch zur erhöhten Sauerstoffsensitivität. Es wird eine drastische Wachstumsreduktion sichtbar, die mit gelblich verfärbten und chlorotischen Blättern einher geht. Da sich der Wachstumsunterschied jedoch vollständig durch die Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft revertieren lässt, handelt es sich bei dem vorliegenden Erscheinungsbild eindeutig um den photorespiratorischen Phänotyp und nicht um einen sekundären Effekt. Die Tatsache, dass die Pflanzen unter Normalluftbedingungen lebensfähig sind, gibt einen Hinweis darauf, dass unter Umständen ein weiteres Enzym in der Lage ist, das anfallende 3HP zu reduzieren. Es wird dennoch deutlich, dass diese Restaktivität nicht vollständig in der Lage ist, den Ausfall beider HPRs zu kompensieren. Somit stellen die HPR1 und die HPR2 die Hauptenzyme für die photorespiratorische 3HP-Umsetzung dar.



Abbildung 4-10 Genotyp der isolierten *hpr1xhpr2* Doppelmutante

In den getesteten Pflanzen sind die Transkripte der HPR1 und HPR2 nicht mehr nachzuweisen. Die zur cDNA eingesetzte RNA wurde aus Rosettenblättern isoliert und col.0 als Kontrolle verwendet. Als interne Kontrolle diente die S16-RNA.



Abbildung 4-11 Phänotyp der *hpr1xhpr2* Doppelmutante

Der vollständige Ausfall der HPR1 und der HPR2 zieht keinen letalen Phänotyp nach sich, führt allerdings zur erhöhten Sauerstoffsensitivität. Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen, mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h angezogen. Die Doppelmutante zeigt unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (1 %, links) keinen Unterschied zum Wildtyp. Unter Normalluftbedingungen sind eine drastische Reduktion des Wachstums sowie ein chlorotisches Erscheinungsbild der Pflanzen zu verzeichnen (rechts).

Der unter Normalluft beobachtete Phänotyp lässt sich noch deutlicher zeigen, wenn die Pflanzen unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen angezogen und anschließend in Normalluftbedingungen transferiert werden. Unter nicht photorespiratorischen Bedingungen lässt sich zunächst kein Unterschied zwischen den Mutanten und der Kontrolle feststellen. Nach dem Transfer der Pflanzen in Normalluftbedingungen zeigt sich ein deutlicher Effekt. Die Pflanzen zeigen bereits nach 1 Woche gelbliche Verfärbungen an den Spitzen der Rosettenblätter sowie Chlorosen. Diese Effekte verstärken sich in den folgenden Tagen, bis es nach 3 Wochen zum vollständigen Absterben der äußeren Rosette kommt. Nur in der Mitte der Pflanze bleibt ein grüner Bereich erhalten. Die Abbildung 4-12 stellt einen Überblick über den beschriebenen Zusammenhang dar. Weiterhin ist zu beobachten, dass die Pflanzen bei Anzucht unter Normalluftbedingungen sowie nach dem Transfer von erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen auf Normalluft in ihrer Blütenbildung und Samenproduktion beeinträchtigt sind. Die Größe der Stängel und der Infloreszenzen sind deutlich reduziert. Weiterhin sind die Doppelmutanten nicht mehr in der Lage, fertile Samen auszubilden (siehe Abbildung 4-13). Die Vermehrung der Pflanzen ist deshalb nur unter nicht photorespiratorischen Bedingungen möglich. Somit lässt sich sagen, dass viele Eigenschaften der HPR-Doppelmutante dem typischen Photorespirationsphänotyp gleichen, jedoch die Effekte im Vergleich zu anderen Mutanten abgeschwächt sind. Die meisten Mutanten im C<sub>2</sub>-Zyklus sind zwar unter Normalluftbedingungen keimungsfähig, sterben aber nach Erreichen des Zweiblattstadiums ab (Boldt *et al.*, 2005).

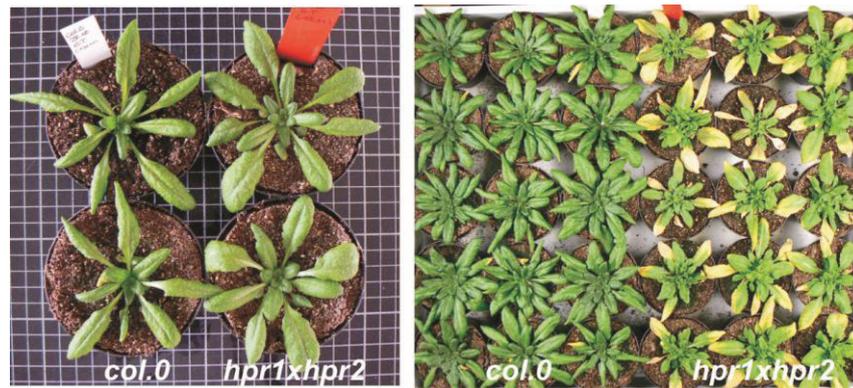


Abbildung 4-12 Phänotyp der *hpr1xhpr2* Doppelmutante nach Transfer der Pflanzen aus erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen in Normalluftbedingungen.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen, mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h angezogen. Die Doppelmutante zeigt unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (links) keinen Unterschied zum Wildtyp. Nach Transfer der Pflanzen in Normalluftbedingungen werden bereits nach einer Woche Mangelerscheinungen sichtbar. Nach 2 Wochen (rechts) sind diese Effekte deutlich verstärkt und es kommt zum vollständigen Absterben der äußeren Rosette.



Abbildung 4-13 Phänotyp der *hpr1xhpr2* Doppelmutante – Samenbildung.

Die Doppelmutante ist unter Normalluftbedingungen nicht mehr in der Lage, fertile Samen auszubilden. Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter 0,15 % CO<sub>2</sub>, angezogen. Nach dem Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte der Transfer in Normalluft. Die Dokumentation erfolgte im Abstand von einer Woche. Die oben gezeigten Aufnahmen wurden 7 Wochen nach dem Transfer gemacht.

Neben dem oben beschriebenen Phänotyp wurden ebenfalls das Keimungsverhalten und das Wurzelwachstum der HPR-Mutanten genauer untersucht. Dazu wurden die Pflanzen der einzelnen Linien auf MS-Medium (ohne/mit Saccharose) gesetzt und die Entwicklung während der ersten 2 Wochen verfolgt. Die Abbildung 4-14 zeigt eine Aufnahme, die 2 Wochen nach der Keimung der Pflanzen gemacht wurde.

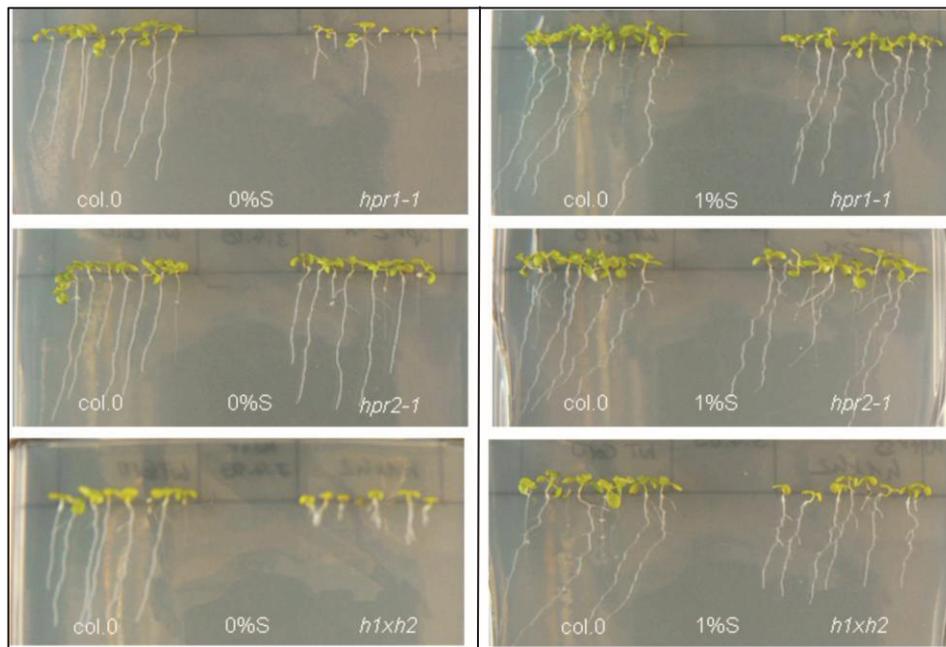


Abbildung 4-14 Keimungsverhalten der HPR-Mutanten auf MS-Medium.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluftbedingungen angezogen. Dabei wurden sie zum einen auf MS-Medium ohne Saccharose und zum anderen mit 1 % Saccharose kultiviert. Die Dokumentation erfolgte 2 Wochen nach der Keimung.

Wie an Hand der Abbildung 4-14 zu erkennen ist, zeigt sich bei Kultivierung der HPR-Mutanten auf MS-Medium ein weiterer Unterschied zum Wildtyp. Die HPR2-Mutante ist nicht in ihrer Keimungsfähigkeit und dem Wurzelwachstum beeinträchtigt, wohingegen die HPR1-Mutante einen deutlichen Effekt zeigt. Die Keimung und das Wachstum sind bei ihr in diesem Stadium verzögert. Durch Zugabe von 1 % Saccharose ins Medium lassen sich diese Unterschiede aufheben. Noch deutlicher zeigt sich der Effekt bei der *hpr1xhpr2* Doppelmutante. Das Wachstum auf MS ohne Zucker ist deutlich beeinträchtigt. Durch Zusatz von 1 % Saccharose lässt sich dieser Effekt teilweise, jedoch nicht vollständig kompensieren. Der beobachtete Effekt der verbesserten Keimung und der Keimlingsentwicklung nach Zugabe von exogenem Zucker, ist ein bekanntes Charakteristikum für Mutanten, mit einem Defekt in der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren (Adham *et al.*, 2005; Fulda *et al.*, 2004 und Hayashi *et al.*, 1998) und konnte auch für die Mutanten der peroxisomalen Malat-Dehydrogenasen gezeigt werden (Pracharoenwattana *et al.*, 2007). Es besteht also die Möglichkeit, dass durch den Block der Photorespiration ebenfalls dieser Stoffwechselweg beeinträchtigt ist. Für einen genauen Nachweis sind jedoch noch weitere Experimente notwendig.

Um den optischen Effekt des verringerten Wachstums und der gelblichen Verfärbung der Blätter darstellen und quantifizieren zu können, wurden die Rosettendurchmesser und die Chlorophyllgehalte an Pflanzen der vorliegenden Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Pflanzen synchron angezogen und nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) vermessen sowie die Proben für die Chlorophyllbestimmung genommen. Die Abbildung 4-15 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.

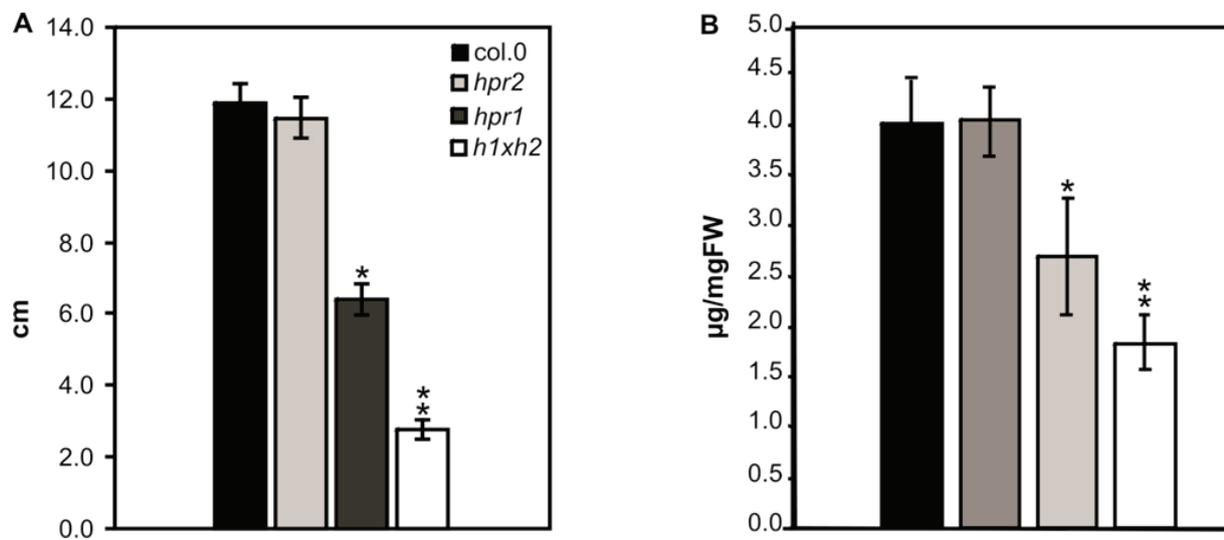


Abbildung 4-15 Rosettendurchmesser und Chlorophyllgehalte der HPR-Mutanten.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluft angezogen. Die Vermessung der Pflanzen (A, n = 5), sowie die Probenahme zur Chlorophyllbestimmung (B, n = 5) erfolgte nach dem Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001). Die Daten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zum Wildtyp (\* P < 0,05) und im Vergleich zur *hpr1-1* (\*\* P < 0,05).

Wie an Hand der Abbildung deutlich wird, lässt sich unter Normalluftbedingungen und verkürzter Photoperiode ein deutlicher Wachstumsunterschied bei einigen HPR-Mutanten nachweisen. Wie auch in der Abbildung 4-8 dargestellt ist, zeigen die HPR2 Mutanten keinen phänotypischen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Die HPR1 Mutanten sind dagegen in ihrer Entwicklung beeinflusst. Das Wachstum der Pflanzen ist unter diesen Bedingungen sowie in diesem Wachstumsstadium etwa um 50 % reduziert. Der Effekt zeigt sich noch deutlicher bei der HPR-Doppelmutante. Des Weiteren ist in der Abbildung 4-4 und der Abbildung 4-11 zu erkennen, dass die HPR1-Einzelmutante und die HPR-Doppelmutante hellere Blätter, sowie gelbliche Verfärbungen zeigen. Diese Effekte sind auf den reduzierten Chlorophyll a + b Gehalt zurück zu führen. Der Gehalt der Chlorophylle ist in der HPR1-Einzelmutante um etwa 33 % und bei der Doppelmutante etwa um 50 % reduziert.

#### 4.6. Die photorespiratorische 3HP-Umsetzung erfolgt durch HPR1 und HPR2

Wie bereits unter 4.2 beschrieben wurde, kommt es durch den Ausfall der HPR1 zu einer deutlichen Reduktion der HPR-Aktivitäten in den HPR1-Einzelmutanten. Dieser Effekt beschränkt sich vor allem auf die NADH-abhängige Reduktion von 3HP. Der NADPH-abhängige Umsatz von 3HP ist wesentlich geringer betroffen, jedoch signifikant reduziert. Da, wie bereits beschrieben, die Umsätze von Glyoxylat mit beiden Co-Substraten nur eine Nebenreaktion der HPR1 darstellt, sind diese Aktivitäten nur moderat verringert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die alternative HPR2, 3HP vorrangig unter Verwendung von NADPH umsetzt und somit vermutlich das Hauptenzym für diese Reduktion darstellt. Der Ausfall der HPR2 in den HPR2-Einzelmutanten ist auf Enzymaktivitätsebene nachweisbar, jedoch ist der Effekt nicht so drastisch. Verantwortlich für die nur geringe Reduktion der Aktivitäten ist die Tatsache, dass die hoch aktive HPR1 in den Mutanten noch vorhanden ist. Die Kombination beider HPR-Mutationen hingegen, führt zu einer deutlichen Verminderung aller HPR-Aktivitäten in der isolierten Doppelmutante. Die Abbildung 4-16 veranschaulicht die in den Pflanzen bestimmten HPR-Aktivitäten und es wird klar ersichtlich, dass die HPR1 und die HPR2 in *Arabidopsis* die Hauptenzyme für die Reduktion von 3HP darstellen. Wie eingangs bereits erwähnt, lässt sich in der *hpr1-1* Mutante nur noch ca. 6 % der HPR-Aktivität des Wildtyps nachweisen. Durch die Kombination beider HPR-Mutationen kommt es zu einer weiteren Verschärfung dieses Effektes, da nur noch um die 2 % der im Wildtyp vorhandenen HPR-Aktivität nachweisbar sind. Der drastische Aktivitätsverlust macht es umso erstaunlicher, dass die Pflanze in der Lage ist, unter Normalluftbedingungen zu wachsen. Wie weiterhin der Abbildung 4-16 zu entnehmen ist, führt auch der Ausfall beider HPRs nicht zum vollständigen Verlust der HPR-Aktivität in den Pflanzen. Diese Tatsache gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass es in *Arabidopsis* mindestens ein weiteres Enzym vorliegen muss, welches zum Umsatz von 3HP in der Lage ist. Da die Doppelmutante jedoch schon deutlich in ihrem Wachstum und der HPR-Aktivität beeinträchtigt ist, lässt sich allerdings daraus schließen, dass dieses Enzym im Gegensatz zur HPR2 und insbesondere der HPR1 die photorespiratorischen Bedürfnisse allein nicht erfüllen kann. Die Umsätze von Glyoxylat mit beiden getesteten Co-Substraten sind zwar in den einzelnen Mutanten reduziert, jedoch nicht so stark betroffen wie die 3HP-Umsetzung. Dieser Fakt spiegelt die Tatsache wieder, dass die beiden HPRs zwar am Umsatz von Glx beteiligt sind, hierfür jedoch weitere Enzyme vorliegen. Die Enzyme, die hauptsächlich für die Reduktion von Glx zuständig sind, konnten ebenfalls in *Arabidopsis* identifiziert werden. Dabei handelt es sich um 2 Isoformen der Glyoxylatreduktase, die zum einen plastidär und zum anderen zytosolisch lokalisiert sind (Hoover *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2008). Das Vorhandensein dieser Proteine erklärt die lediglich geringe Reduktion der Glx-Umsätze in den HPR-Mutanten.

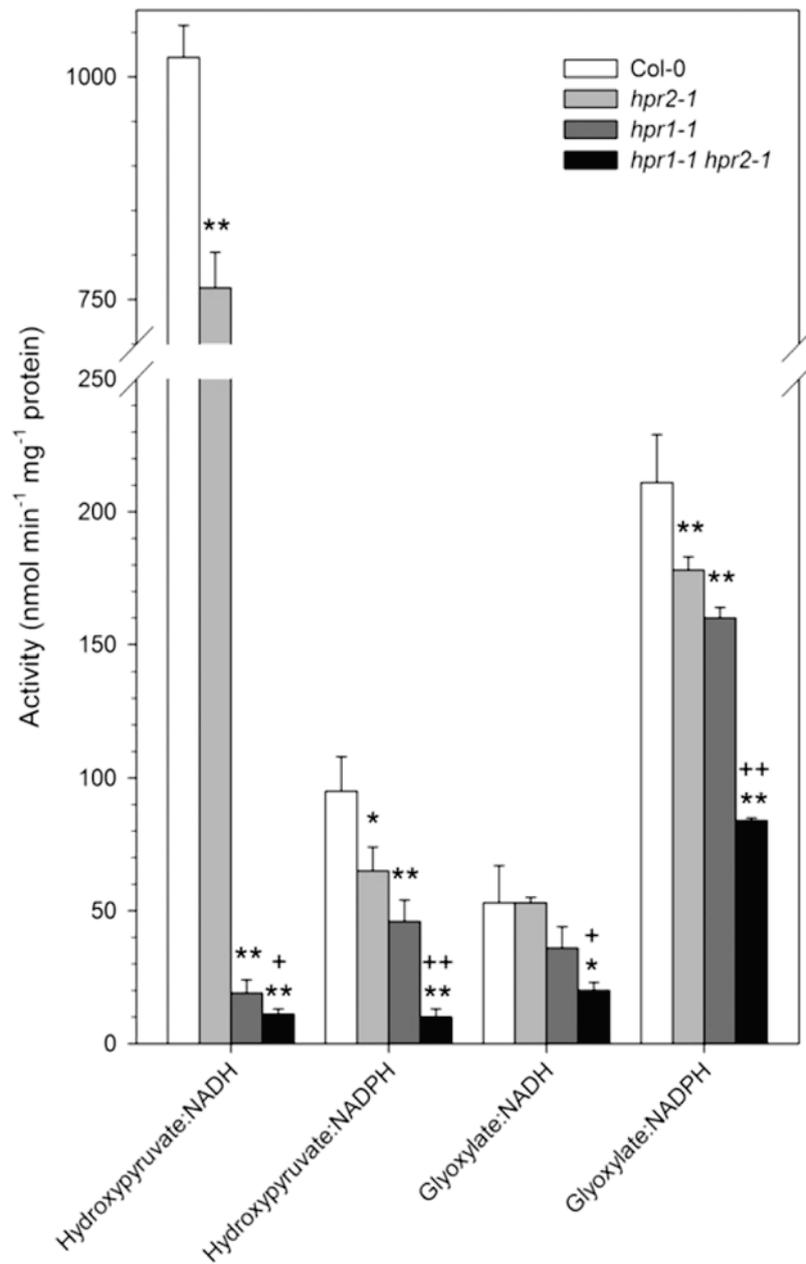


Abbildung 4-16 Reduktion der HPR-Aktivitäten in den HPR-Mutanten.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluft angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte die Probenahme für die Enzymmessungen. Dabei wurden 3 Extrakte vermessen, die jeweils aus 4 unabhängigen Pflanzen hergestellt wurden. Die Aktivitäten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zum Wildtyp (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ ) und im Vergleich zur *hpr1-1* Mutante (+  $P < 0,05$ , ++  $P < 0,01$ ).

#### 4.7. Mutation der HPRs führt zum Anstau photorespiratorischer Intermediate

Um den Ausfall der einzelnen HPRs auf Stoffwechselebene genauer zu analysieren, wurden die HPR-Mutanten einer detaillierten Metabolomanalyse unterzogen. Dabei standen vor allem die Metabolite der Photorespiration im Vordergrund. Durch den Block im C2-Zyklus konnten in anderen Mutanten starke Akkumulationen photorespiratorischer Intermediate nachgewiesen werden. So zeigt die Glycerat-Kinase-Mutanten einen bis zu 200-fach erhöhten Gehalt an Glycerat (Boldt *et al.*, 2005). Die HPR-Pflanzen wurden dafür unter nicht photorespiratorischen sowie unter photorespiratorischen Bedingungen angezogen und miteinander verglichen. Die Abbildung 4-17 zeigt einen Überblick ausgewählter Metabolite und deren Änderungen.

Wie an Hand der Übersicht deutlich wird, sind die Änderungen der *steady state* Gehalte ausgewählter Metabolite eher moderat verglichen mit anderen Mutanten im C2-Zyklus. Die größten Anstiege sind vor allem in den Gehalten der photorespiratorischen Intermediate 3HP, Serin, Glycin, Glykolat und Glycerat zu finden. Die HPR1-Einzelmutante zeigt einen 6-fach erhöhten Gehalt an 3HP, der sich bis auf das 9-fache in der Doppelmutante steigert. Auch die HPR2-Einzelmutante zeigt einen leicht erhöhten Gehalt dieses Metabolits (jedoch statistisch nicht signifikant), was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die HPR2 ebenfalls an der photorespiratorischen 3HP-/Glycerat-Interkonversion beteiligt ist. Die gesteigerten Gehalte an Glycin und Serin machen weiterhin deutlich, dass es in den Mutanten zu Störungen der Glycin/Serin-Interkonversion kommt. Diese Tatsache ist, wie auch der erhöhte Gehalt an Glykolat, auf den Block im C2-Zyklus und dem daraus resultierenden Rückstau in diesem Stoffwechselweg begründet. Ein unerwartetes Phänomen konnte in den gesteigerten Werten für Glycerat beobachtet werden, da dieses Intermediat der Photorespiration erst nach der HPR-Reaktion auftritt. Da jedoch der Gehalt nur in der HPR1-Einzelmutante erhöht ist und sich der Effekt in der Doppelmutante nicht wesentlich erhöht, ist der Grund vermutlich die Irreversibilität der HPR2-Reaktion. Dieses Enzym ist lediglich zur Hinreaktion befähigt, wobei die HPR1 beide Richtungen der Reaktion ausführen kann (Kleczkowski und Randall, 1988). Weiterhin ist der erhöhte Wert für Ethanolamin vermutlich auf den Anstau von Serin zurück zu führen, da dieses Stoffwechselintermediat vor allem durch die Decarboxylierung von freiem Serin gebildet wird (Rontein *et al.*, 2003). Weitere Änderungen können unter anderem in den Gehalten von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutamin, als Vertreter des Nitratstoffwechsels beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Verbindung der Photorespiration und der Nitratassimilation (Rachmilevitch *et al.*, 2004). Neben den Änderungen von Metaboliten der Photorespiration und daran gekoppelte Prozesse, wie z.B. der Nitratstoffwechsel und der Energiehaushalt (Saccharose), sind nur wenige zusätzliche Abweichungen nachweisbar. Diese sind vor allem auf die Gehalte an Alanin, Asparagin, Aspartat und Arginin beschränkt. Ungeachtet der wenigen Ausnahmen führt der Ausfall der

HPRs zu spezifischen Effekten, wenn man die Vielzahl der unveränderten Intermediate betrachtet (siehe 7.3).

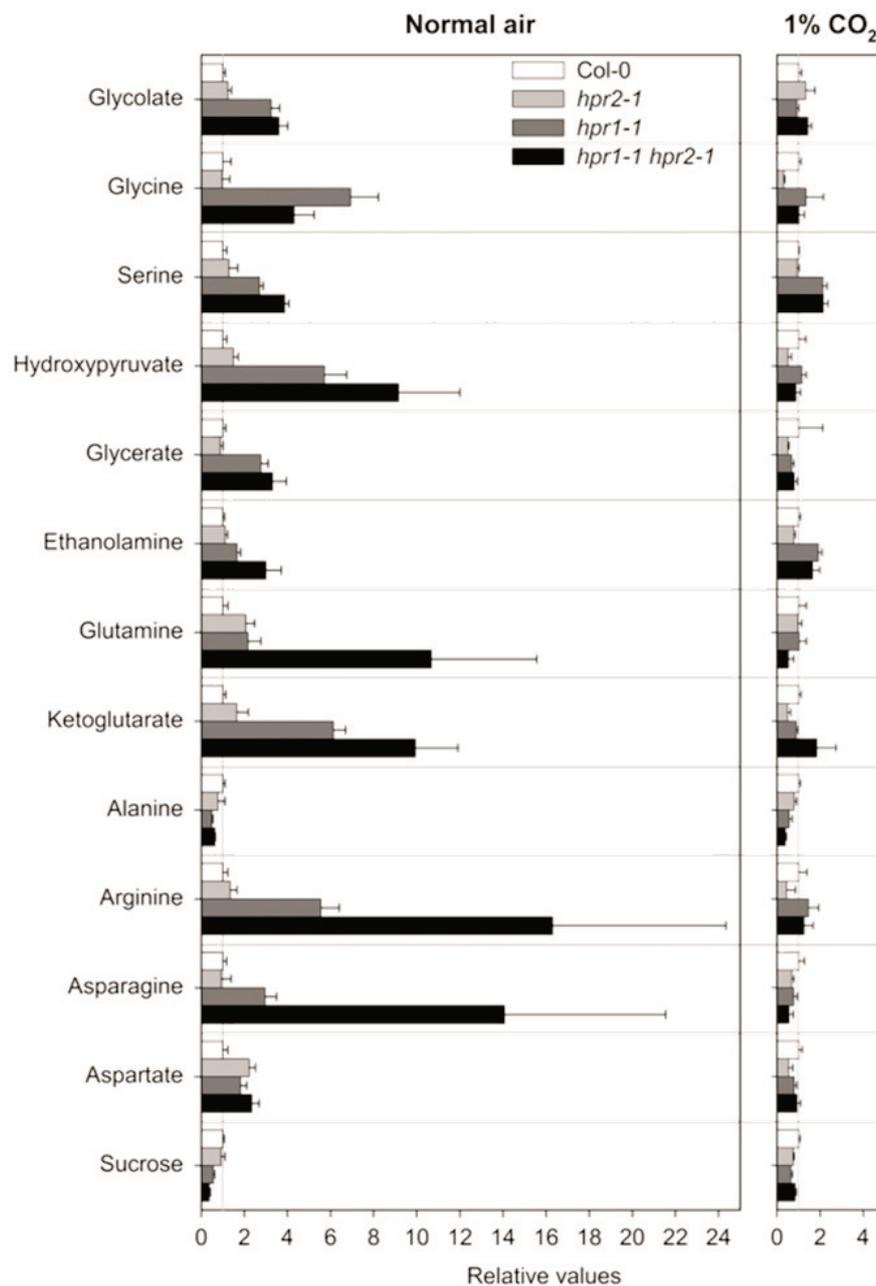


Abbildung 4-17 Änderung ausgewählter Metabolite in den HPR-Mutanten.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluft und unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (1 % CO<sub>2</sub>) angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte die Probenahme für die GC-MS-Analyse (n = 6). Dargestellt sind die relativen Verhältnisse ausgewählter Metabolite der einzelnen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

#### 4.8. Mutation der HPRs führt zu Änderungen des photorespiratorischen $^{13}\text{C}$ -Fluxes

Im Gegensatz zu den *steady state* Messungen der Metabolite, stellen Analysen unter Verwendung von Isotopen potentiell sensitivere Methoden dar. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein Ansatz gewählt, bei dem der Einbau eines markierten Elements in photorespiratorische Intermediate verfolgt wurde. Dazu wurden die Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen angezogen, von den einzelnen Linien Blattplättchen gewonnen und mit 10 mM  $^{13}\text{C}$ -markierter Glukose inkubiert. Der Eintrag des markierten Substrates erfolgt über den Transpirationsstrom und die Akkumulation wurde darauffolgend in C2-Zyklus Metaboliten verfolgt. In der *hpr1* Mutante wird über 103-mal mehr des markierten Substrates in 3HP eingebaut, wobei die *hpr2* Mutante nur eine 3-fach erhöhte Rate im Vergleich zum Wildtyp zeigt. Die HPR-Doppelmutante zeigt von der Tendenz her einen additiven Effekt, da es hier zu einer über 106-fachen Anreicherung des markierten Substrates kommt. Daran lässt sich erkennen, dass nicht nur die HPR1 sondern auch die HPR2 einen Beitrag zum pflanzlichen C2-Zyklus leistet. Jedoch ist ebenso zu erkennen, dass die HPR1 die dominante Rolle bei der Umsetzung von 3HP zu Glycerat einnimmt. Die Änderungen in den 3 anderen, analysierten Intermediaten sind, verglichen mit dem Effekt auf 3HP relativ gering. Die *hpr1*, *hpr2* und die Doppelmutante zeigen leicht erhöhte Werte an markiertem Substrat in Glycerat (2,4-, 1,7-, und 2,0-fach), Serin (1,7-, 0,9-, 0,4-fach) und Glycin (3-, 1,3- und 6-fach). Die Tabelle 4-2 zeigt einen Überblick über die beschriebenen Verhältnisse.

Tabelle 4-2  $^{13}\text{C}$ -Glukose-Markierung der HPR-Mutanten.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluft angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte die Probenahme der Blattplättchen. Diese wurden für 2 h in einem 10 mM MES-KOH-Puffer (pH 6,5, 10 mM [U- $^{13}\text{C}$ ]-Glukose), bei einer Lichtintensität von  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. Im Anschluss erfolgte die GC-MS-Analyse zur Bestimmung des Einbaus an markiertem Substrat in ausgewählten Intermediaten der Photorespiration (Glc – Glycin, Ser – Serin, 3HP – Hydroxypyruvat, Glyc - Glycerat). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte von 4 Bestimmungen je Linie. In fettgedruckt sind die Werte dargestellt, welche dem T-Test nach signifikant verschieden zum Wildtyp sind ( $P < 0,05$ ).

Redistribution of Label ( $\mu\text{mol C}_1$ equivalents $\text{g}^{-1}$ fresh weight $\text{h}^{-1}$ )				
	col.0	<i>hpr1-1</i>	<i>hpr2-1</i>	<i>hpr1xhpr2</i>
<b>Gly</b>	0.013465 ± 0.002167	<b>0.04455 ± 0.01022</b>	0.016896 ± 0.001430	<b>0.07619 ± 0.00970</b>
<b>Ser</b>	0.157030 ± 0.021351	<b>0.27135 ± 0.03000</b>	0.148851 ± 0.027776	<b>0.06752 ± 0.01192</b>
<b>3HP</b>	0.000007 ± 0.000003	<b>0.00072 ± 0.00019</b>	<b>0.000022 ± 0.000005</b>	<b>0.00074 ± 0.00020</b>
<b>Glyc</b>	0.004239 ± 0.000328	<b>0.00982 ± 0.00289</b>	<b>0.006039 ± 0.000597</b>	<b>0.00798 ± 0.00206</b>

#### **4.9. Der Ausfall der HPR1 und der HPR2 führt zur drastischen Reduktion der photosynthetischen Leistung**

Wie bereits beschrieben, führt erst der Knock-out beider HPRs zu einem sehr deutlichen Wachstumseffekt und dem photorespiratorischen Phänotyp. Da deutet darauf hin, dass die beiden HPRs redundant und beide an der Photorespiration beteiligt sind. Die Doppelmutante weist eine erhöhte Sauerstoffsensitivität auf, wie an Hand des Wachstumsunterschiedes unter photorespiratorischen Bedingungen und dem Transfer von erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auf Normalluft zu sehen ist. Dieser verstärkte Effekt lässt sich auf der Ebene der Enzymaktivitäten, der Metabolite und der Stoffflussuntersuchungen nachweisen. Ein weiterer Befund, dass beide Enzyme an der Photorespiration beteiligt sind, konnte durch die reduzierte photosynthetische Leistung in beiden Einzelmutanten gezeigt werden. Des Weiteren wurde auch die erzeugte Doppelmutante hinsichtlich dieses Parameters genauer charakterisiert. Bestimmt wurden auch hier die Photosyntheserate und der CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt mittels des Licor-6400-Gaswechsellmesssystems. Durchgeführt wurden die Messungen unter Verwendung von 4 verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen in der Messluft (10 %, 21 %, 30 % und 40 %). Die HPR-Mutanten wurden dazu unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (0,15 %) angezogen und nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) für die Messungen verwendet. Die Anzucht unter nicht photorespiratorischen Bedingungen war hier nötig, um das Wachstum der einzelnen Mutanten zu synchronisieren. Da die Doppelmutante unter Normalluftbedingungen ein deutlich reduziertes Wachstum zeigt und es zur Blütenbildung kommt bevor die Rosettenblätter voll entwickelt sind, wären andernfalls keine vergleichbaren Messungen möglich. Bevor die jeweiligen Messungen durchgeführt wurden, wurden die Pflanzen zwischen 20 und 30 min an die jeweilige Messluft adaptiert. Die Abbildung 4-18 zeigt einen Überblick über die gewonnenen Ergebnisse dieser Messungen.

Durch den Ausfall der HPRs kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Photosyntheserate und einer Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes. Dieser Effekt ist von der Tendenz über alle 4 Sauerstoffkonzentrationen konsistent und somit nicht nur ein Effekt unter Normalluftbedingungen. Die Stärke des Effektes ist in den einzelnen Linien unterschiedlich. Die geringste Beeinflussung ist erwartungsgemäß in der *hpr2* Mutante zu finden. Dieser Effekt ist dennoch deutlich und statistisch signifikant im Vergleich zum Wildtyp. Stärker betroffen zeigt sich die *hpr1* Mutante, was die beschriebene Aussage stützt, dass dieses Enzym die Hauptarbeit bei der photorespiratorischen 3HP Umsetzung übernimmt. Die Charakterisierung der erzeugten Doppelmutante zeigt jedoch, dass der Ausfall beider HPRs zu einer weiteren Verschärfung des Effektes führt. Dieses Ergebnis unterstreicht noch einmal, dass sowohl die HPR1 als auch die HPR2 am pflanzlichen C<sub>2</sub>-Zyklus beteiligt sind und beide Enzyme eine wichtige Rolle übernehmen. Damit lässt sich belegen, dass die

Photorespiration nicht nur, wie bisher angenommen, im Chloroplasten, den Peroxisomen und den Mitochondrien abläuft, sondern ebenfalls zytosolische Reaktionen beteiligt sind. Der genaue Anteil beider Reaktionen sowie die Bedingungen unter welchen der peroxisomale Weg oder der zytosolische bevorzugt abläuft, sind bisher unklar. Eine attraktive Möglichkeit besteht darin, dass hierbei die Verfügbarkeit an Redoxäquivalenten im Peroxisom eine wichtige Rolle einnimmt. Wenn ein NADH-Mangel im Peroxisom vorliegt, würde demnach die 3HP-Reduktion durch die HPR2 im Zytoplasma ablaufen. Inwieweit das stattfindet und wie das reguliert wird, soll in Zukunft analysiert werden.

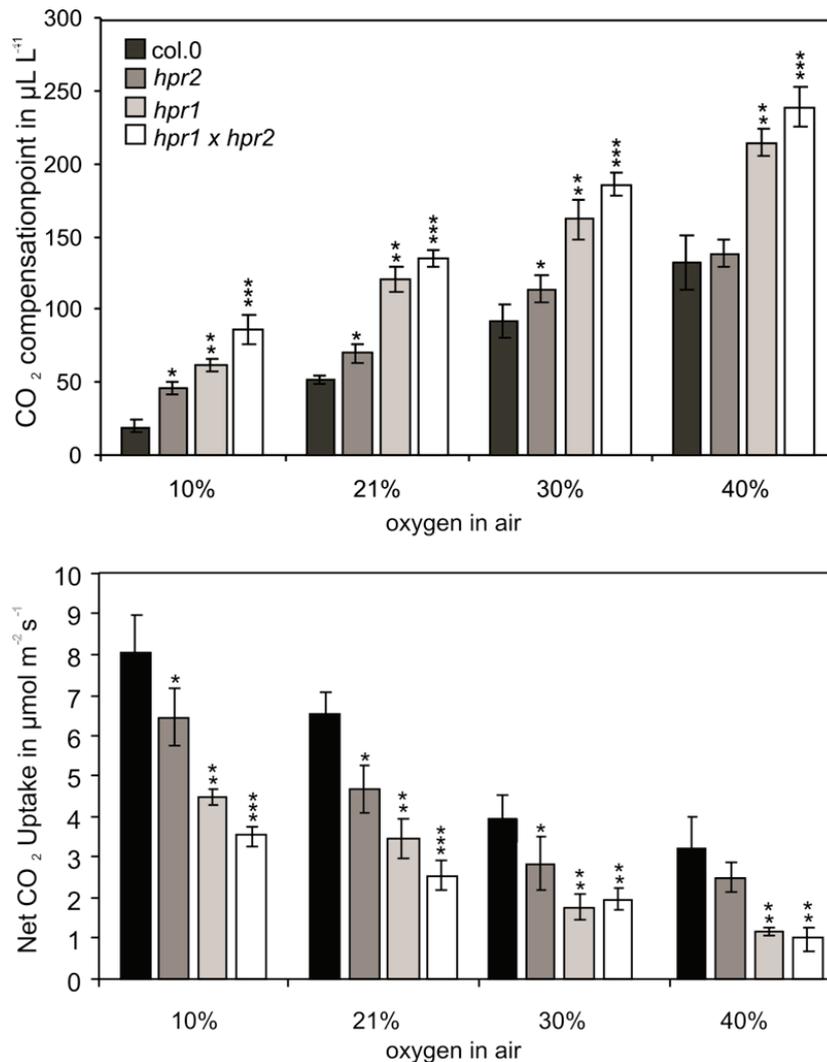


Abbildung 4-18 Photosynthetische Leistung der HPR-Mutanten bei verschiedenen Sauerstoffgehalten der Messluft.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen, mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h und unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (0,15 %) angezogen. Die Vermessung der Pflanzen (n = 5) erfolgte nach dem Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes et al., 2001). Die Messungen erfolgten nach einer ca. 30 minütigen Anpassung an die jeweilige Sauerstoffkonzentration der Messluft. Die Daten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zum Wildtyp (\* P < 0,05), im Vergleich zur *hpr2-1* (\*\* P < 0,05) und im Vergleich zur *hpr1-1*-Mutante (\*\*\*) P < 0,05).

#### 4.10. Sind weitere Enzyme an der 3HP-Umsetzung beteiligt?

Wie unter 4.2 und 4.3 bereits beschrieben wurde, ist auch der Ausfall der HPR1 und der HPR2 nicht letal in *Arabidopsis*. Zwar ist durch den Ausfall der peroxisomalen und der zytosolischen HPR das Wachstum und die photosynthetische Leistung drastisch reduziert, die Pflanze jedoch noch in der Lage unter photorespiratorischen Bedingungen zu überleben. Der offensichtlichste Grund für diesen Sachverhalt wäre das Vorhandensein von mindestens einem weiteren Enzym, welches zum Umsatz von 3HP in der Lage ist. Dieses Enzym könnte notfalls einen gewissen Teil des photorespiratorischen Flusses übernehmen, jedoch nicht den Ausfall beider HPRs vollständig kompensieren, wie an Hand des deutlichen Phänotyps der HPR-Doppelmutante zu erkennen ist.

Um weitere, mögliche Kandidaten für alternative 3HP reduzierende Enzyme zu identifizieren, wurde eine Suche nach ähnlichen Proteinen mit dem BLAST-Algorithmus (*basic local alignment search tool*) durchgeführt. Dabei diente die HPR1 als Referenz, mit der in der gesamten *Arabidopsis* Datenbank nach ähnlichen Enzymen gesucht wurde ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Auf diesem Wege konnten 2 weitere Proteine identifiziert werden, die ca. 50 % Sequenzhomologie zur HPR1 aufweisen. Diese als At1g12550 und At2g45630 bezeichneten Gene kodieren für Proteine, welche ebenfalls eine D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase- und eine NAD/NADP-Binde-Domäne enthalten. Sie gehören somit ebenfalls wie die HPR1 und die HPR2 zur Familie der 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen (siehe Tabelle 4-3; PF00389, <http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF00389>). Die Mitglieder dieser Familie sind spezifisch für die D-Isomere ihrer Substrate. Die katalytische Domäne enthält dabei eine Reihe von konservierten Aminosäuren, welche eine Rolle beim Reaktionsmechanismus spielen (Dengler *et al.*, 1997). Die beiden Proteine sind also potentiell in der Lage als HPR zu fungieren. Um die identifizierten Kandidaten näher zu charakterisieren und zu klären, ob sie als alternative HPRs in Frage kommen, sollten zum einen biochemische Evidenzen erbracht werden und zum anderen ebenfalls Mutanten isoliert werden. Die Identifikation und Bereitstellung der Mutanten erfolgte auch in diesem Falle über die NASC-Datenbank. Bei dem als At2g45630 bezeichnetem Gen konnten bisher keine homozygoten Pflanzen isoliert werden, ungeachtet dessen, ob das Screening unter photorespiratorischen oder und nicht photorespiratorischen Bedingungen durchgeführt wurde. Das lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass dieses Gen für ein essentielles Protein kodiert, welches nicht nur eine Funktion in der Photorespiration ausübt. Aus diesem Grund wurde ein RNAi-Ansatz gewählt, um die Transkription des Genes herunter zu regulieren. Auch durch Überexpression und Affinitätsreinigung des rekombinanten Proteins konnte bisher kein Hinweis auf die exakte Funktion nachgewiesen werden. Die Untersuchung dieses Gens soll an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden, da es Bestandteil einer anderen Arbeit in unserer Arbeitsgruppe ist.

Tabelle 4-3 Überblick über die Proteindomänen der HPRs aus *Arabidopsis*

Die Tabelle zeigt, dass alle 3 HPRs aus *Arabidopsis* sehr ähnlich katalytischen Domänen besitzen und Oxidoreduktaseaktivität besitzen. Aufgrund ihres Reaktionsmechanismus (wirken an CH-OH-Gruppen der Donatoren, benutzen NAD oder NADP als Akzeptoren) gehören diese Proteine in die Proteinsuperfamilie der D-Isomer spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen (PF00389).

Domäne	Beschreibung	Evalue	Start	Stop
<b>AtHPR1 (At1g68010) = 386 Aminosäuren</b>				
2-Hydroxysäure Dehydrogenase	D-Isomer spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase, katalytische Domäne	4,4 E-16	31	357
2-Hydroxysäure Dehydrogenase	D-Isomer spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase, NAD-binde Domäne	0	128	322
3-HCDH	3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, NAD-binde Domäne	0,93	165	272
<b>AtHPR2 (At1g79870) = 313 Aminosäuren</b>				
2-Hydroxysäure Dehydrogenase	D-Isomer spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase, katalytische Domäne	2,2 E-37	6	313
2-Hydroxysäure Dehydrogenase	D-Isomer spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase, NAD-binde Domäne	0	109	281
NAD-Bindedomäne 2	NAD-binde Domäne, der 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase	0,82	144	282
F 420 Oxidoreduktase	NADP-Oxidoreduktase, Coenzym F420-abhängig	0,46	146	301
<b>AtHPR3 (At1g12550) = 323 Aminosäuren</b>				
2-Hydroxysäure Dehydrogenase	D-Isomer spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase, katalytische Domäne	1,4 E-37	9	321
2-Hydroxysäure Dehydrogenase	D-Isomer spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase, NAD-binde Domäne	0	116	289
ADH Zink N	Zink-bindende Dehydrogenase	0,77	151	309
F 420 Oxidoreduktase	NADP-Oxidoreduktase, Coenzym F420-abhängig	0,19	154	315

Das Gen At1g12550 konnte hingegen erfolgreich überexprimiert und das rekombinante Protein durch Affinitätsreinigung angereichert werden. Im Anschluss wurde das Protein ersten biochemischen Untersuchungen unterzogen und auf HPR-Aktivität getestet. Dabei wurden wie im Falle der HPR1 und der HPR2, die NADH- und die NADPH-abhängige Reduktion von 3HP und Glx, sowie der Einfluss des Inhibitors Oxalat auf das rekombinante Protein getestet. Die Abbildung 4-19 zeigt die Ergebnisse der enzymatischen Messungen mit dem durch das Gen At1g12550 kodierten Protein.

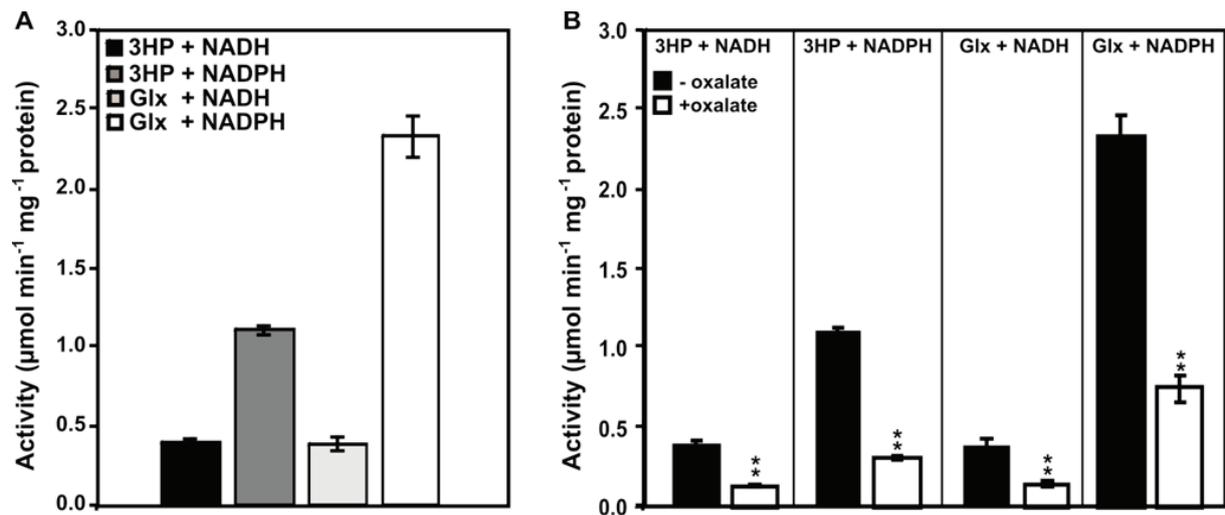


Abbildung 4-19 At1g12550 als alternative HPR3.

Das durch den Leserahmen At1g12550 kodierte Protein zeigt HPR-Aktivität und kommt somit als HPR3 in Frage. Die Aktivitäten stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen des rekombinanten Proteins, mit 4 verschiedenen Substrat/Co-Substrat-Kombinationen dar (A). Die alternative HPR3 zeigt eine starke Inhibition durch die Zugabe von 2 mM Oxalat (B). Die bestimmten Aktivitäten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (\*\* P < 0,01).

Wie die Enzymmessungen zweifelsfrei zeigen, kommt der identifizierte Kandidat At1g12550 als HPR3 in Frage. Das Protein ist in der Lage sowohl 3HP als auch Glx NADH- und NADPH-abhängig zu reduzieren. Wie die HPR2 arbeitet auch die HPR3 mit NADPH als präferiertem Co-Substrat. Im Vergleich zur HPR1 und zur HPR2 (siehe Tabelle 4-4) wird jedoch deutlich, dass die identifizierte HPR3 Glx dem 3HP als Substrat vorzieht. Die Aktivität mit Glx und NADPH ist etwa doppelt so groß wie die mit 3HP und NADPH. Das identifizierte Enzym könnte also ebenfalls als zusätzliche Glyoxylatreduktase fungieren. Ein weiteres Merkmal, das für eine alternative HPR im Sinne der HPR2 spricht, ist die starke Inhibition durch Oxalat. Die Hemmung der Aktivitäten durch die Zugabe von 2 mM Oxalat führt zu Aktivitätsreduktionen von bis zu 75 %. Diese Inhibition ist deutlich stärker als die für die HPR1 und kommt der der HPR2 sehr nahe. Die Lokalisation des Proteins konnte bisher nicht experimentell gezeigt werden, jedoch deuten das Fehlen einer Targeting-Sequenz und die *in*

*silico* Vorhersage auf eine zytosolische Lokalisation hin. Es liegt somit nahe, dass die HPR3, ähnlich wie die HPR2 im Zytosol an der Reduktion von aus dem Peroxisom austretenden 3HP oder Glx beteiligt sein könnte.

Tabelle 4-4 Zusammenfassung der Aktivitätsmessungen an den rekombinanten HPRs

Die HPR1 (At1g68010) stellt das Hauptenzym für die NADH-abhängige 3HP-Reduktion in *Arabidopsis* dar. Der identifizierte Leserahmen At1g79870 kodiert die NADPH-abhängige HPR2 in *Arabidopsis*. Die HPR3 (At1g12550) ist ebenfalls in der Lage 3HP zu reduzieren. Die stärkste Inhibition durch Oxalat zeigt die HPR2 gefolgt von der HPR3. Die HPR1 zeigt nur geringe Aktivitätsverluste durch die Zugabe des Inhibitors. Die Aktivitäten stellen Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3) in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  dar. Die Prozentangaben entsprechen den Aktivitäten nach Zugabe des Inhibitors Oxalat (2 mM) im Vergleich zur ungehemmten Kontrolle.

Hydroxypyruvat Reductase	Without Oxalate Mean $\pm$ SD	With Oxalate Mean $\pm$ SD	%
<b>AtHPR1 (At1g68010)</b>			
Hydroxypyruvate:NADH	222.00 $\pm$ 15.70	147.00 $\pm$ 22.00	66
Hydroxypyruvate:NADPH	12.00 $\pm$ 1.40	11.60 $\pm$ 1.10	97
Glyoxylate:NADH	6.40 $\pm$ 0.60	5.80 $\pm$ 0.40	90
Glyoxylat:NADPH	0.26 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.02	77
<b>AtHPR2 (At1g79870)</b>			
Hydroxypyruvate:NADH	1.40 $\pm$ 0.12	0.300 $\pm$ 0.080	21
Hydroxypyruvate:NADPH	5.50 $\pm$ 0.43	0.700 $\pm$ 0.090	13
Glyoxylate:NADH	0.36 $\pm$ 0.02	0.010 $\pm$ 0.001	3
Glyoxylat:NADPH	4.60 $\pm$ 0.36	0.100 $\pm$ 0.026	2
<b>AtHPR3 (At1g12550)</b>			
Hydroxypyruvate:NADH	0.400 $\pm$ 0.015	0.131 $\pm$ 0.008	33
Hydroxypyruvate:NADPH	1.105 $\pm$ 0.026	0.306 $\pm$ 0.016	28
Glyoxylate:NADH	0.384 $\pm$ 0.044	0.145 $\pm$ 0.013	38
Glyoxylat:NADPH	2.327 $\pm$ 0.127	0.741 $\pm$ 0.080	32

#### 4.11. Einzel-Knock-out der HPR3 zieht keine phänotypischen Folgen nach sich

Da At1g12550 als potentielle HPR3 in Frage kommt, wurden im Anschluss auch T-DNA-Insertionslinien in der NASC-Datenbank identifiziert, bestellt und homozygote Pflanzen isoliert. Wie im Falle der HPR1 und der HPR2 wurden auch für dieses Gen 2 unabhängige Knock-out Linien generiert. Die Abbildung 4-20 zeigt einen Überblick über die Genstruktur der HPR3 und der Position der inserierten T-DNA-Fragmente.

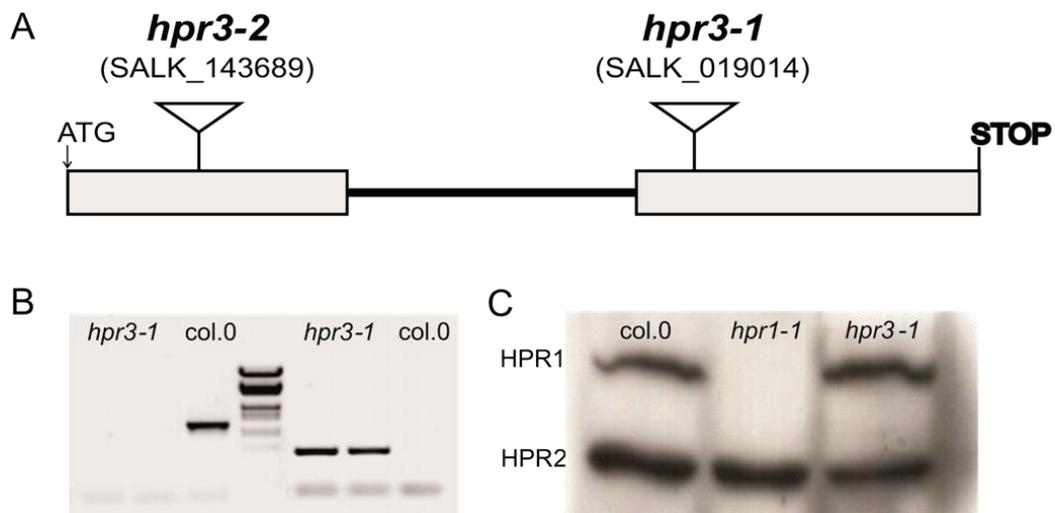


Abbildung 4-20 Genstruktur der alternativen AtHPR3.

Struktur des Gens und der Position der inserierten T-DNA-Fragmente (A). Die Linie *hpr3-1* trägt die Insertion im zweiten Exon, die Linie *hpr3-2* im ersten Exon. In beiden unabhängigen Linien führt die Insertion zum Verlust der Genaktivität. Exemplarische Darstellung des Insertionsnachweises zweier Pflanzen der Linie *hpr3-1*. Beide Pflanzen tragen die Insertion und sind negativ für den Gennachweis auf DNA-Ebene (B). In beiden Linien sind die HPR1 und die HPR2, mit den spezifischen Antisera nachzuweisen (C). Der Western Blot wurde mit einem Proteinextrakt aus Blättern und den spezifischen Spinat-HPR1 und Spinat-HPR2 Antikörpern angefertigt.

Wie an Hand der obigen Abbildung zu erkennen ist, gleicht die Genstruktur der HPR3 der der HPR2 (Vergleich siehe Abbildung 4-7). Die beiden Insertionslinien tragen ihre Insertion im ersten Exon (*hpr3-2*) bzw. im zweiten Exon (*hpr3-1*). In homozygoten Pflanzen beider Linien lässt sich das Wildtyp-Fragment auf DNA-Ebene nicht mehr nachweisen und die Insertion führt zum vollständigen Verlust der Genaktivität (nicht gezeigt). Der Western Blot mit den spezifischen Antikörpern gegen die HPR1 bzw. die HPR2 zeigt hingegen, dass die Proteingehalte von HPR1 und HPR2 in der HPR3-Mutante unverändert sind. Das deutet darauf hin, dass die alternative HPR3 zwar in der Lage ist 3HP umzusetzen und eine gewisse Sequenzähnlichkeit zu beiden HPRs aufweist, jedoch keine Kreuzreaktion mit beiden Antisera zeigt.

Äquivalent zur HPR1 und zur HPR2 sollte im Folgenden auch das gewebsspezifische Expressionsmuster der HPR3 mittels RT-PCR untersucht werden. Dabei ging es vor allem um den Vergleich des Expressionsmusters der HPR3 mit den anderen HPRs und dem typischen Muster der photorespiratorischen Gene. Wie an Hand der Abbildung 4-21 zu erkennen ist, erfolgt auch die Expression der *AtHPR3* in photosynthetisch aktivem Gewebe. Die stärkste Expression erfolgt demnach in den Rosettenblättern. Etwas schwächer ist die Abundanz im Stängel und den Hochblättern. Im heterotrophen Gewebe, wie der Wurzel, ist das Transkript zwar deutlich reduziert jedoch vorhanden. Das beschriebene Muster gleicht in etwa den der HPR1 und der HPR2. Im Unterschied dazu ist allerdings in den Blüten und den Schoten die Expression des Gens nicht nachweisbar.

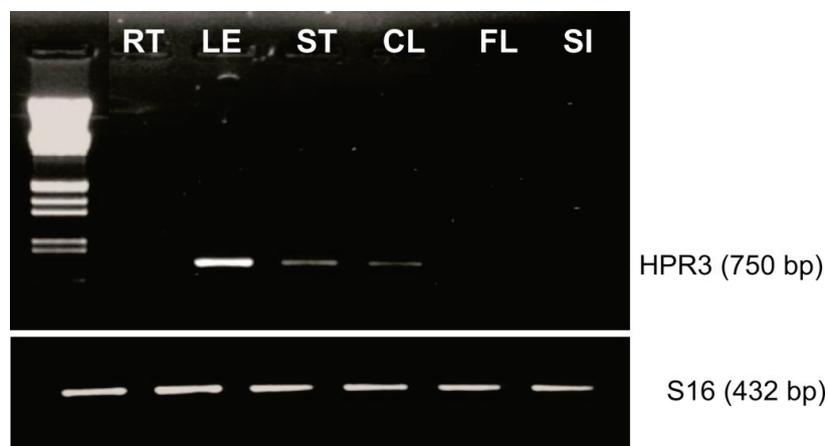


Abbildung 4-21 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der HPR3 mittels RT-PCR

Die Expression der HPR3 erfolgt vor allem in photosynthetisch aktiven Geweben wie den Rosettenblättern, dem Stängel und den Hochblättern. Geringe Mengen sind in der Wurzel zu finden, während in den Blüten und den Schoten kein Transkript nachzuweisen ist. Die RNA wurde aus den entsprechenden Organen von *Arabidopsis* Wildtyp (col.0) isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Als interne Kontrolle diente die S16 RNA. (RT – Wurzeln, LE – Rosettenblätter, ST – Stängel, CL – Hochblätter, FL – Blüte, SI – Schoten, H<sub>2</sub>O – Wasserkontrolle).

Auch mit den HPR3-Mutanten wurde im Anschluss eine phänotypische Charakterisierung wie im Falle der HPR1- und der HPR2-Mutanten durchgeführt. Da die Einzelmutanten in der alternativen HPR3 keinen phänotypisch sichtbaren Unterschied zum Wildtyp zeigten (Abbildung 4-22, A), wurden ebenfalls die entsprechenden doppel- und dreifach-Mutanten, durch konventionelle Kreuzung hergestellt. Dabei wurden die Linien *hpr1-1* und *hpr3-1*, sowie die Linien *hpr1 x hpr2* und *hpr3-1* miteinander gekreuzt. Resultierend aus diesen Kreuzungen konnten die Doppelmutanten *hpr1 x hpr3* und *hpr2 x hpr3*, sowie die Dreifachmutante *hpr1 x hpr2 x hpr3* gewonnen werden. Dabei ist zu sagen, dass die Doppelmutanten keinen weiteren Wachstumsunterschied im Vergleich zu den Einzelmutanten zeigen (siehe Abbildung 4-22, B und C). In den jeweiligen Doppelmutanten

sind zum einen die HPR1 und zum anderen die HPR2 aktiv, welche den Ausfall des jeweils anderen Proteins übernehmen und zum Großteil kompensieren können. Das deutet auf eine sehr geringe Rolle der HPR3 an der photorespiratorischen 3HP-Umsetzung hin. Der Dreifach-Knock-out aus HPR1, HPR2 und der HPR3 zieht hingegen nochmals eine Wachstumsreduktion nach sich (Abbildung 4-22, E). Um die beschriebene Wachstumsreduktion der Dreifachmutante nicht nur fotografisch darzustellen sondern auch quantifizieren zu können, wurden äquivalent zu den Untersuchungen in Abbildung 4-15 (A) die Rosettendurchmesser und das Keimungsverhalten (siehe Abbildung 4-14) der HPR-Dreifachmutante untersucht. Die Abbildung 4-23 veranschaulicht die gemachten Beobachtungen. Dabei wird deutlich, dass die Dreifachmutante (unter Normalluftbedingungen) einen reduzierten Rosettendurchmesser aufweist (A). Im Gegensatz zu der beschriebenen Wachstumsverminderung konnte kein weiter reduzierter Chlorophyllgehalt in der Dreifachmutante gemessen werden. Weiterhin lässt sich jedoch sagen, dass die Dreifachmutante in ihrer Keimungsfähigkeit stärker beeinflusst ist als die *hpr1 x hpr2* Mutante und auch nach der Keimung deutlich langsamer wächst (Abbildung 4-23 (B), oben). Auch die Anzucht auf MS-Medium mit 1 % Saccharose führt lediglich zu einer geringfügigen Verbesserung der Keimung und nicht zur vollständigen Komplementation (Abbildung 4-23 (B), unten). Unter nicht photorespiratorischen Bedingungen lassen sich hingegen keinerlei Wachstumsunterschiede feststellen und alle beschriebenen Beobachtungen treten nicht auf (nicht gezeigt).

Wie bereits an den Merkmalen der *hpr1 x hpr2* Doppelmutante zu erkennen ist, ist die HPR3 nicht in der Lage den Verlust der HPR1 und der HPR2 vollständig zu kompensieren. Jedoch scheint sie in dieser Pflanze die Restaktivität bei der 3HP-Umsetzung zu liefern, da die Dreifachmutante noch stärker als die Doppelmutante geschädigt ist. Allerdings wird erneut deutlich, dass die HPR1 gefolgt von der HPR2 die Hauptenzyme für den photorespiratorischen 3HP-Stoffwechsel sind. Die identifizierte HPR3 hingegen ist zwar in der Lage als HPR zu fungieren, jedoch ist der Beitrag zur Photorespiration wohl eher als gering einzuschätzen, wenn die HPR1 und die HPR2 in den Pflanzen aktiv sind.

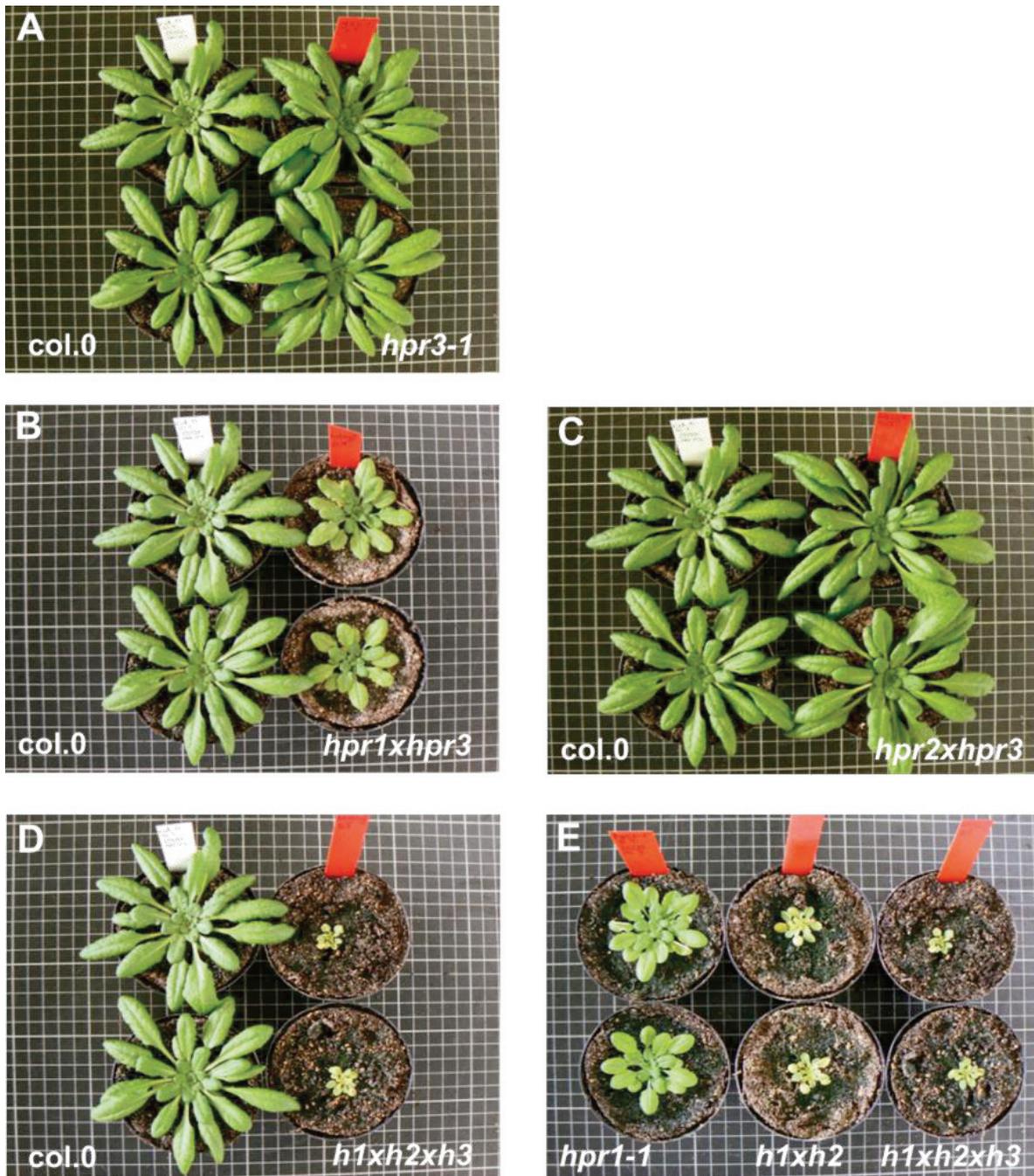


Abbildung 4-22 Phänotyp der HPR3-Einzel-, Doppel und Dreifach-Mutanten.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluft angezogen. Die Einzelmutanten der HPR3 zeigen keinen phänotypisch auffälligen Effekt im Vergleich zum Wildtyp (A). Die Doppelmutante aus HPR1 und HPR3 unterscheidet sich phänotypisch nicht von der HPR1-Einzelmutante (B und E). Ebenfalls gibt es keinen Unterschied zwischen der Doppelmutante aus HPR2 und HPR3 im Vergleich zu den HPR2- und HPR3-Einzelmutanten (C). Der dreifach Knock-out der HPR1, HPR2 und HPR3 führt zu einer drastischen Wachstumsreduktion im Vergleich zum Wildtyp (D) sowie zu einer weiteren Wachstumsreduktion im Vergleich zu den Linien *hpr1-1* und *hpr1 x hpr2* (E).

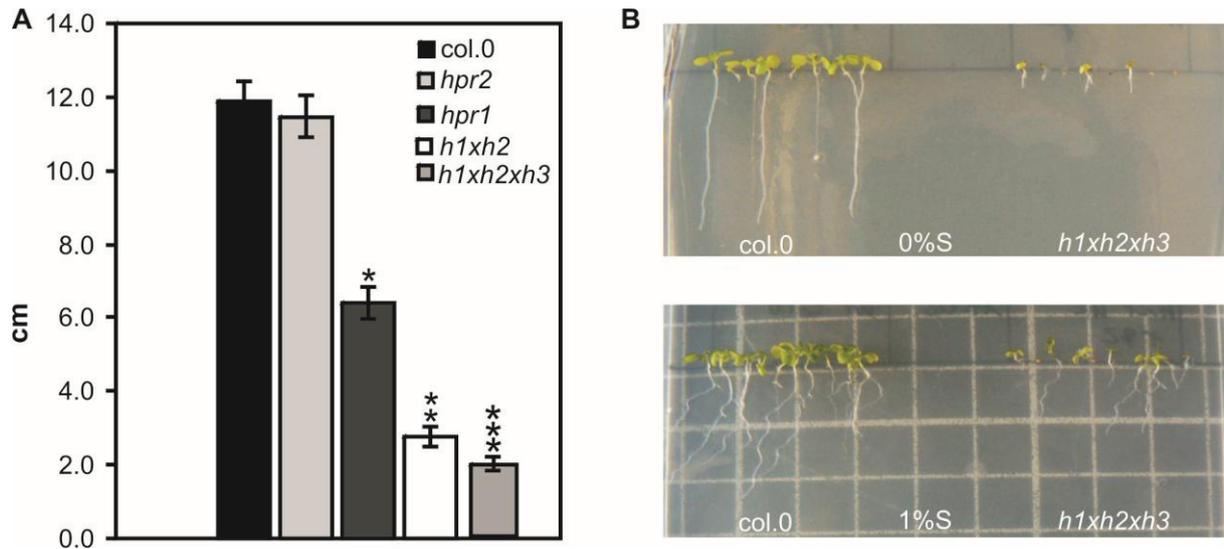


Abbildung 4-23 Wachstumsreduktion der HPR-Dreifachmutante.

Die HPR-Dreifachmutante zeigt im Vergleich zur HPR-Doppelmutante (*hpr1x hpr2*) eine weitere Wachstumsreduktion. Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluft angezogen. Die Rosetten wurden nach dem Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) vermessen (A). Die Daten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zum Wildtyp (\*  $P < 0,05$ ), im Vergleich zur *hpr1-1* (\*\*  $P < 0,05$ ) und im Vergleich zur *hpr1-1 x hpr2-1*-Mutante (\*\*\*)  $P < 0,05$ ). Die Untersuchung der Keimung und des Wurzelwachstums erfolgte ebenfalls unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h (Normalluft) auf MS-Medium (ohne und mit 1 % Saccharose). Die Dokumentation der Pflanzen erfolgte 2 Wochen nach der Keimung.

#### 4.12. Mutation der HPRs führt zu Änderungen des Aminosäurehaushaltes

Im Anschluss an die phänotypische Charakterisierung wurde auch die Dreifachmutante näheren Untersuchungen des Metabolismus unterzogen. Einen ersten Hinweis auf die Folgen des Verlustes sollte dabei durch die Analyse des Aminosäurespektrums gewonnen werden. Dazu wurden die Pflanzen unter nicht photorespiratorischen (0,15 %  $\text{CO}_2$ ) und unter photorespiratorischen Bedingungen angezogen und nach Erreichen des Wachstumsstadium 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte die Probenahme für die HPLC-Analyse. Die Abbildung 4-24 zeigt exemplarisch 2 auffällige Aminosäuren (vollständiger Überblick siehe Anhang), wobei Serin einen Vertreter für ein photorespiratorisches Intermediat darstellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, kommt es in den HPR-Mutanten vornehmlich zum Anstau von Serin und einem der Serin-Biosyntheseintermediate, dem Threonin. Dieser Effekt zeigt sich in allen HPR-Mutanten und ist am deutlichsten in der 3fach Mutante. Der Anstau des Serins liegt nahe, da es die unmittelbare Vorstufe des 3HPs ist. Möglicherweise ist das 3HP toxisch oder instabil, sodass ein Großteil des sich anstauenden Metabolits in Serin umgewandelt wird. Ferner lässt sich daraus schließen, dass die AGT1 mit an der Bildung des

Gleichgewichtes zwischen dem 3HP und dem Serin beteiligt ist und dabei eng mit den HPRs zusammenarbeitet. Der Anstau des Threonins ist dadurch begründet, dass die Zelle womöglich versucht, den massiven Serin-Anstau abzumildern und einen Teil davon in andere Aminosäuren oder weitere Produkte umwandelt. Unter nicht photorespiratorischen Bedingungen sind diese Effekte deutlich reduziert, was darauf schließen lässt, dass der gefundene Effekt photorespiratorischer Natur ist. Die meisten anderen Aminosäuren sind dagegen unauffällig. Kleinere Schwankungen werden in den Glycin, Glutamin und Alanin Gehalten sichtbar. Dabei ist der Glycin-Anstau auf den generellen photorespiratorischen Block zurück zu führen (Abbildung 4-17). Die teilweise erhöhten Gehalte des Glutamins geben einen weiteren Hinweis darauf, dass es durch den photorespiratorischen Block zur Beeinflussung des Stickstoffhaushaltes kommt (wie bereits unter 4.7 beschrieben). Die reduzierten Gehalte an Alanin zeigen hingegen, dass Störungen der Photorespiration auch zu Störungen im Kohlenstoffhaushalt führen können. Eine Analyse des vollständigen Metaboloms für die HPR-Dreifachmutante lag bis zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit noch nicht vor, sodass über andere Beziehungen zu diesem Zeitpunkt noch keine weiteren Aussagen möglich sind. Das die gefundenen Effekte im Aminosäurespektrum jedoch in der HPR-Dreifachmutante am deutlichsten sind, liefert einen ersten Hinweis darauf, dass auch die HPR3 einen gewissen Beitrag zur Photorespiration leistet.

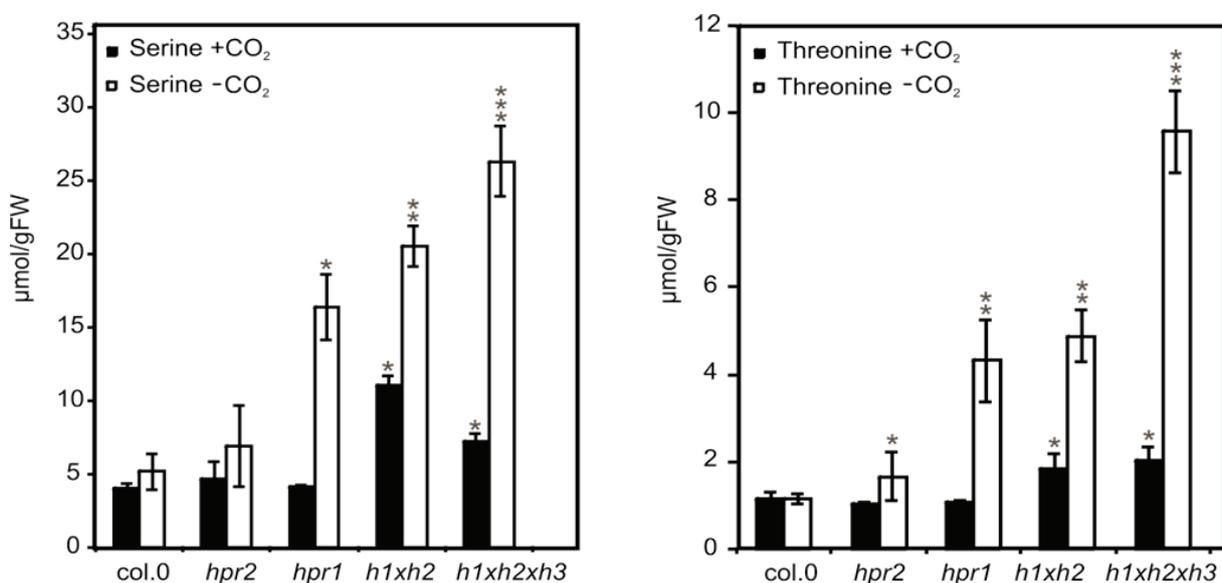


Abbildung 4-24 Knock-out der HPRs führt zu Änderungen des Aminosäuregehalte.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter Normalluft und unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (0,15 % CO<sub>2</sub>) angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte die Probenahme für die HPLC-Analyse (n = 5). Dargestellt sind die Konzentrationen der Aminosäuren Serin und Threonin in Rosettenblättern. Die Daten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zum Wildtyp (\* P < 0,05), im Vergleich zur *hpr1-1*-Mutante (\*\* P < 0,05) und im Vergleich zur *hpr1 x hpr2*-Mutante (\*\*\*) P < 0,05).

#### **4.13. Der Ausfall aller 3 HPRs führt zur weiteren Reduktion der photosynthetischen Leistung und zu verminderter PSII-Aktivität**

Wie in der Abbildung 4-18 gezeigt, führt der Ausfall der HPRs zur Reduktion der photosynthetischen Leistung. Entsprechend des unter 4.9 beschriebenen Experimentes wurden auch die HPR3-Einzel-, die erzeugten HPR3-Doppel- und die HPR-Dreifachmutante einer sauerstoffabhängigen Gaswechselanalyse unterzogen. Hierbei konnte eine nochmalige Reduktion der Photosyntheseleistung und eine weitere Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes in der Dreifachmutante festgestellt werden. Die zuvor generierten HPR3-Doppel-, sowie die HPR3-Einzelmutanten zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied in diesen Parametern. Das lässt darauf schließen, dass die HPR3 nur einen geringen Beitrag zur Photorespiration leistet, insbesondere wenn zumindest die HPR1 oder die HPR2 aktiv in den Pflanzen vorliegt. Der gefundene Sachverhalt bestätigt somit erneut, dass die HPR1 und die HPR2 die Hauptenzyme für die 3HP zu Glycerat Interkonversion sind. Die Abbildung 4-25 zeigt einen Überblick der getroffenen Aussage in Bezug auf die Dreifachmutante. Ein kompletter Überblick über die Gaswechseldaten befindet sich im Anhang (Tabelle 7-1).

Neben der Abnahme der photosynthetischen Leistung wurde bei anderen Mutanten des pflanzlichen C2-Zyklus (z.B. SHMT1, GLYK, DiT2 oder Fd-GOGAT) eine Beeinflussung des maximalen Quantenausbeute des Photosystem II (PSII) beobachtet (Takahashi *et al.*, 2007). Im weiteren Versuch wurden auch die HPR-Mutanten hinsichtlich dieses Sachverhaltes untersucht und der  $F_v/F_m$ -Parameter über die Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt. Verwendet wurde dazu ein Imaging-PAM (Walz) welches gleichzeitig die Verbildlichung der Verhältnisse über die gesamte Pflanze ermöglicht. Für dieses Experiment wurden die einzelnen Linien unter nichtphotorespiratorischen Bedingungen (0,15 % CO<sub>2</sub>), bis zum Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 angezogen und dann auf Normalluft transferiert. Die Messungen erfolgten vor dem Transfer (Kontrolle) und nach dem Transfer, über einen Zeitraum von 3 Wochen, im Abstand von je einer Woche. Die Abbildung 4-26 zeigt die Fotos der einzelnen Linien. Die Tabelle 4-5 stellt die bestimmten  $F_v/F_m$ - Verhältnisse der einzelnen Linien unter Kontrollbedingungen und zwei Wochen nach Transfer der Pflanzen in Normalluft dar.

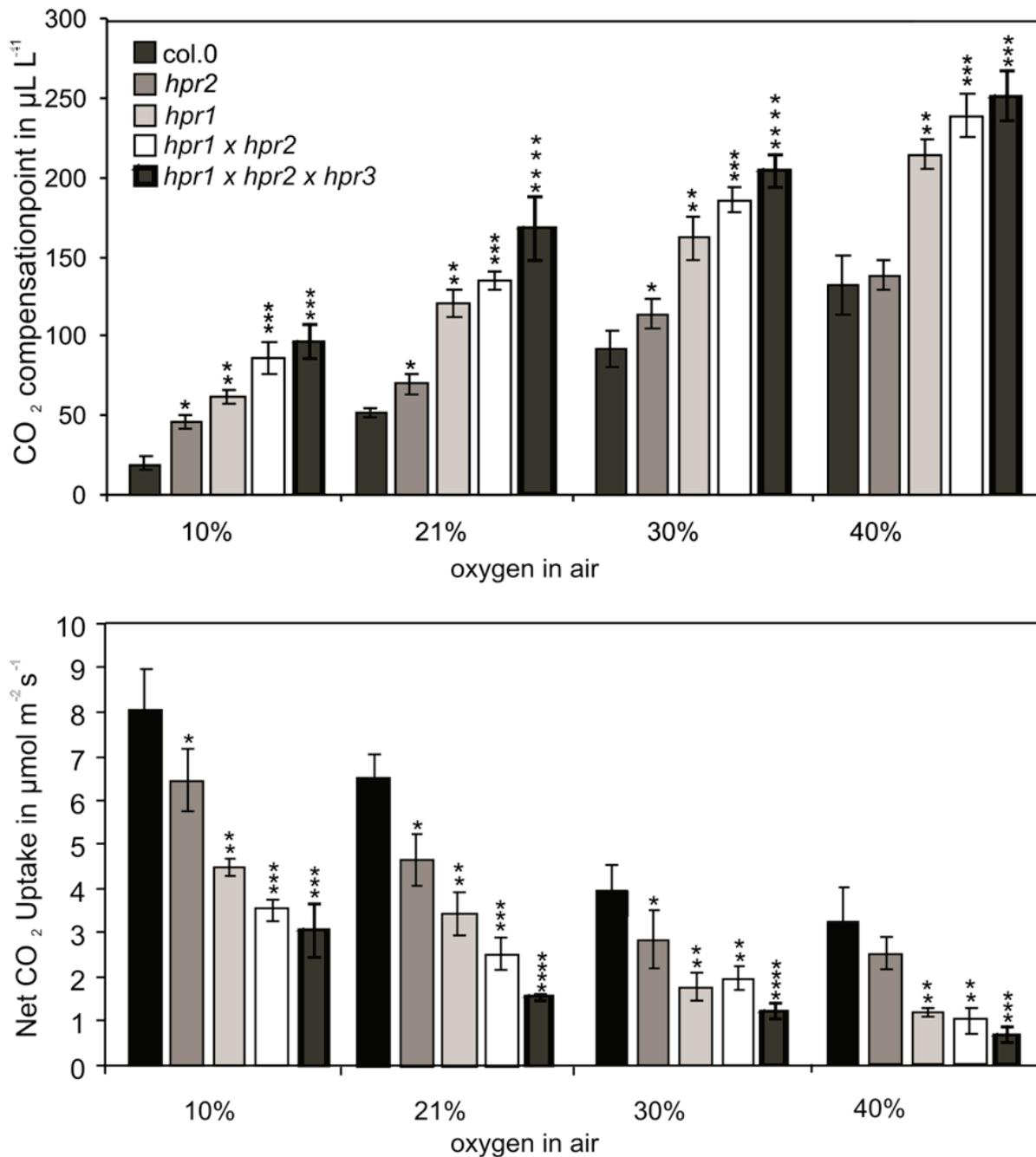


Abbildung 4-25 Mutation der 3 HPRs führt zur Reduktion der photosynthetischen Leistung.

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h und unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (0,15 %) angezogen. Die Vermessung der Pflanzen (n = 5) erfolgte nach dem Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001). Die Messungen erfolgten nach einer ca. 30 minütigen Anpassung an die jeweilige Sauerstoffkonzentration der Messluft. Die Daten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zum Wildtyp (\* P < 0,05), im Vergleich zur *hpr2-1*-Mutante (\*\* P < 0,05), im Vergleich zur *hpr1-1*-Mutante (\*\*\*) P < 0,05) und im Vergleich zur *hpr1xhpr2*-Mutante (\*\*\*\* P < 0,05).

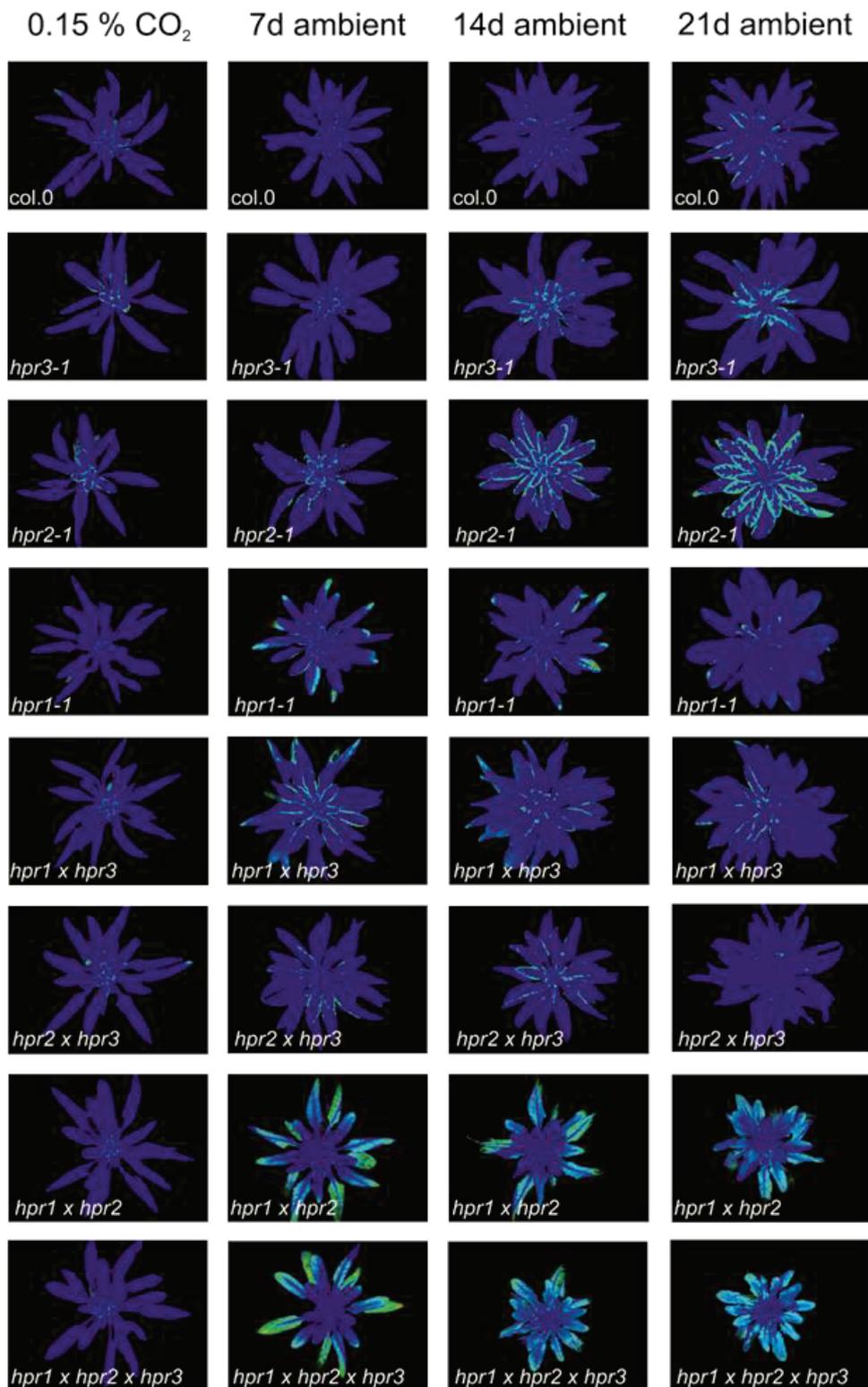


Abbildung 4-26 Aktivität des PSII in den HPR-Mutanten (Fotodokumentation).

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (0,15 % CO<sub>2</sub>) angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte der Transfer der Pflanzen auf Normalluft. Im Abstand von einer Woche (7, 14 und 21 Tage nach Transfer) erfolgte die Charakterisierung der Pflanzen mittels Imaging-PAM. Die maximale photochemische Effizienz des PSII ( $F_v/F_m$ ) wurde nach einer 15 minütigen Dunkeladaptation bestimmt.

Tabelle 4-5 PSII-Aktivität in den HPR-Mutanten ( $F_v/F_m$ -Verhältnisse).

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (0,15 %  $\text{CO}_2$ ) angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte der Transfer der Pflanzen auf Normalluft. Die Messungen erfolgten vor dem Transfer (Kontrolle) und 14 Tage nach dem Transfer in Normalluft. Die maximale photochemische Effizienz des PSII ( $F_v/F_m$ ) wurde nach einer 15 minütigen Dunkeladaptation bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  SE von 5 biologischen Replikaten, wobei von jedem 5 Messpunkte genommen wurden. Die fettgedruckten Werte unterscheiden sich signifikant im Vergleich zum Wildtyp (\*  $P < 0,05$ ).

Line	$F_v/F_m$ Mean $\pm$ SD (0,15% $\text{CO}_2$ )	$F_v/F_m$ Mean $\pm$ SD (ambient air)
col.0	0.7642 $\pm$ 0.0112	0.7570 $\pm$ 0.0435
<i>hpr1-1</i>	0.7613 $\pm$ 0.0223	<b>0.6534 <math>\pm</math> 0.0451</b>
<i>hpr2-1</i>	0.7606 $\pm$ 0.0206	<b>0.7059 <math>\pm</math> 0.0322</b>
<i>hpr3-1</i>	0.7453 $\pm$ 0.0550	<b>0.7114 <math>\pm</math> 0.0247</b>
<i>hpr1xhpr2</i>	0.7658 $\pm$ 0.0043	<b>0.6411 <math>\pm</math> 0.0493</b>
<i>hpr1xhpr3</i>	0.7727 $\pm$ 0.0041	<b>0.6440 <math>\pm</math> 0.0467</b>
<i>hpr2xhpr3</i>	0.7480 $\pm$ 0.0653	0.7474 $\pm$ 0.0271
<i>hpr1xhpr2xhpr3</i>	0.7451 $\pm$ 0.0508	<b>0.6282 <math>\pm</math> 0.0529</b>

Wie an Hand der Abbildung 4-26 und der Tabelle 4-5 dargestellt ist, gibt es unter nicht photorespiratorischen Bedingungen keinen signifikanten Unterschied zwischen den HPR-Mutanten und dem Wildtyp. Nach dem Transfer der Mutanten in Normalluft hingegen, kommt es zur Abnahme des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses in den HPR-Mutanten. Eine sehr geringe, jedoch statistisch signifikante Abnahme zeigen die HPR3- und die HPR2-Mutanten. Das spricht für die These, dass der Einzel-Ausfall beider Enzyme nur geringe Folgen auf das Wachstum der Pflanzen hat. Deutlich stärker betroffen ist die *hpr1*-Einzelmutante sowie die *hpr1xhpr2*-Doppelmutante und die *hpr1xhpr2xhpr3*-Dreifachmutante (Tabelle 4-5). Allerdings ist zu sagen, dass sich der negative Effekt auf den gemessenen Parameter in den Mehrfachmutanten nicht weiter fortsetzt, was ebenfalls ein Hinweis darauf ist, dass die HPR1 das Hauptenzym für die 3HP- zu Glycerat-Interkonversion ist. Die Fotos in Abbildung 4-26 bestätigen, dass der Wildtyp durch den Transfer auf Normalluft nicht beeinflusst wird. Reaktionen weisen vor allem die Linien *hpr1-1*, *hpr2-1*, *hpr1 x hpr3*, *hpr1 x hpr2* und *hpr1 x hpr2 x hpr3* auf. Dabei zeigt die *hpr1* Mutante nach einer Woche an den Spitzen der

Rosettenblätter Stresserscheinungen und Nekrosen, welche nach 14 und 21 Tagen sichtbar weniger werden. Womöglich liegt hier ein bisher noch unbekannter Regulationsmechanismus vor, wodurch der Ausfall der HPR1 kompensiert werden und auf den zytosolischen Weg und alternative Enzyme umgeschaltet werden kann. Jedoch verschwinden die Effekte nicht vollständig, da ein signifikanter Unterschied des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses bestehen bleibt. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis, dass die HPR2 zwar in der Lage ist einen Großteil der Bedürfnisse zu erfüllen, jedoch nicht den Ausfall der HPR1 vollständig kompensieren kann. Bei der *hpr2-1* Mutante beschränken sich die Effekte auf die innere Rosette der Pflanzen und nehmen nach dem Transfer in Normalluft über den beobachteten Meßzeitraum zu. Die stärkste Reaktion zeigen die *hpr1xhpr2* und die *hpr1xhpr2xhpr3* Mutanten. Hier kommt es zu einer bis zu 25 %igen Reduktion des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses nach dem Transfer der Pflanzen auf Normalluft. Die Fotodokumentation der Pflanzen bestätigt die unter 4.5 beschriebenen Effekte. Der Transfer der Pflanzen von erhöhten  $CO_2$ -Bedingungen in Normalluft führt zum vollständigen Absterben der äußeren Rosette und somit zu einem deutlichen photorespiratorischen Phänotyp.

Die gleichen Pflanzen, welche zur Bestimmung der  $F_v/F_m$ -Verhältnisse verwendet worden sind, dienten zur Bestimmung der photosynthetischen Elektronentransportrate des PSII. Diese Messungen wurden ebenfalls mit dem Imaging-Pam (Walz) durchgeführt. Als Messzeitpunkte wurden auch in diesem Fall vor, und zwei Wochen nach dem Transfer der Pflanzen aus nicht photorespiratorischen Bedingungen in Normalluft gewählt. Wie aus der Abbildung 4-27 zu entnehmen ist, zeigen die HPR-Mutanten bei höheren Lichtintensitäten eine reduzierte Elektronentransportrate des PSII, was darauf hindeutet, dass die HPR-Mutanten bei höheren Lichtintensitäten einen Photoinhibitionseffekt zeigen. Dieser Effekt ist auch schon bei den Pflanzen zu beobachten, die unter nichtphotorespiratorischen Bedingungen kultiviert wurden. Eine Ausnahme bildet dabei die *hpr2*-Mutante. Da jedoch in dieser Linie eine intakte HPR1 vorliegt, ist der Befund nicht verwunderlich. Die Linien *hpr1*, *hpr1xhpr2* und *hpr1xhpr2xhpr3* zeigen eine deutliche Reduktion des bestimmten Parameters. Die *hpr1xhpr2*-Doppelmutante ist dabei stärker betroffen als die *hpr1*-Einzelmutante, was auf einen additiven Effekt durch den Ausfall der HPR2 schließen lässt und verdeutlicht, dass die Bestimmung des  $F_v/F_m$ -Parameters unter Umständen nicht sensitiv genug ist. Die HPR-Dreifachmutante zeigt jedoch keine weitere Verschärfung des Effektes, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die HPR3 nur eine untergeordnete Rolle einnimmt. Durch den Transfer in Normalluft kommt es in den Mutanten zu einer weiteren Verschärfung der Beschriebenen Effekte. Unter diesen Bedingungen zeigt auch die *hpr2*-Mutante eine Reaktion bei sehr starkem Licht. Deutlicher betroffen ist vor allem die *hpr1xhpr2*-Doppelmutante, die unter diesen Bedingungen einen noch stärkeren Abfall der Elektronentransportrate zeigt, wohingegen die 3fach Mutante keine weitere

Verschlechterung zeigt und dadurch mit den Messungen des  $F_v/F_m$ -Parameters korrelieren. Diese photosynthetische Inhibition wurde bisher für eine Vielzahl von C2-Zyklus-Mutanten beschrieben (Leegood *et al.*, 1995; Wingler *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2009) und zeigt vor allem, dass die *hpr1xhpr2*-Doppelmutante einen deutlichen photorespiratorischen Phänotyp zeigt. Die durchgeführten Experimente liefern einen ersten Hinweis, dass es auch in den HPR-Mutanten zu photoinhibitorischen Effekten kommt. Um allerdings eine exakte Aussage über die Photoinhibition in den HPR-Mutanten treffen zu können sind dahingehen weitere Experimente nötig.

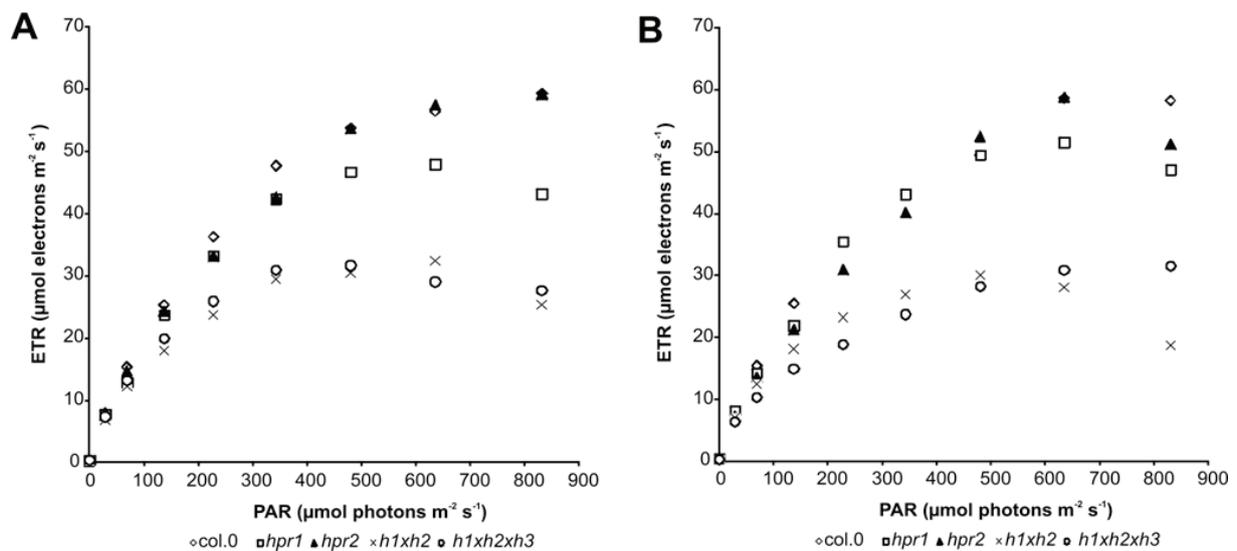


Abbildung 4-27 ETR der HPR-Mutanten

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht Zyklus von 10 h/14 h, unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (0,15 %  $\text{CO}_2$ ) angezogen. Nach Erreichen des Wachstumsstadiums 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) erfolgte der Transfer der Pflanzen in Normalluft. Die Messungen erfolgten vor dem Transfer (Kontrolle) und 14 Tage nach dem Transfer in Normalluft. Dabei wurde die absolute Rate des Elektronentransports des PSII bei einer bestimmten Lichtintensität bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  SE von 5 biologischen Replikaten, wobei von jedem 5 Messpunkte genommen wurden.

## 5. Diskussion

Der photorespiratorische C<sub>2</sub>-Zyklus findet seinen Ursprung in der Oxygenasefunktion der Rubisco. Durch die Reaktion dieses Enzyms mit O<sub>2</sub> entsteht ein Molekül 3PGA und ein Molekül 2PG, statt zwei Moleküle 3PGA durch die Carboxylierungsreaktion. Das 3PGA stellt ein Intermediat des Calvin-Zyklus dar und dient der Kohlenstoffassimilation. Das 2PG hingegen kann von der Zelle nicht weiter metabolisiert werden und würde ohne die Photorespiration als Kohlenstoffquelle verloren gehen. Darüber hinaus inhibiert dieses Metabolit Enzyme des Calvin-Zyklus (Husic *et al.*, 1987; Norman und Colman, 1991) und ist toxisch. Diese Eigenschaft konnte auch für andere Intermediate der Photorespiration gezeigt werden (Eisenhut *et al.*, 2007), was diesem Stoffwechselweg eine Funktion bei der Entgiftung von toxischen Metaboliten zukommen lässt. Eines dieser Intermediate ist 3HP, das in größeren Mengen auch inhibierend auf den pflanzlichen Stoffwechsel wirken könnte. Durch die Photorespiration entstehen täglich große Mengen an 3HP im Peroxisom, das aus der Transaminierung von Serin durch die AGT1 entsteht. 3HP das Substrat der HPR, einem der Schlüsselenzyme des pflanzlichen C<sub>2</sub>-Zyklus. In der Regel sind Mutanten in diesem Stoffwechselweg unter Normalluftbedingungen nicht lebensfähig (Blackwell *et al.*, 1988; Somerville, 2001; Boldt *et al.*, 2005; Voll *et al.*, 2006; Schwarte und Bauwe, 2007, Zelitch *et al.*, 2009) sie können jedoch bei erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Luft kultiviert werden. Für die meisten der photorespiratorischen Enzyme konnten bisher die entsprechenden Mutanten isoliert werden. Die HPR bildete bis zu dieser Arbeit eine Ausnahme. Da im Genom von *Arabidopsis* nur 1 Gen für die HPR vorliegt, sollte 3HP exklusiv durch dieses Enzym metabolisiert werden. Somit sollte eine Mutation in diesem Gen einen letalen Phänotyp unter Normalluftbedingungen nach sich ziehen, der durch CO<sub>2</sub>-Gabe revertiert werden kann. Da jedoch bisher keine Mutante mit definiertem Gendefekt für dieses Schlüsselenzym isoliert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass Mutationen in diesem Gen auch unter nicht photorespiratorischen Bedingungen letal sind oder dass dieser Schritt im pflanzlichen C<sub>2</sub>-Zyklus umgangen werden kann. Einige Hinweise zur Unterstützung der zweiten Theorie konnte bereits durch einige Arbeiten gewonnen werden (Kleczkowski *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 1989; Kleczkowski *et al.*, 1990; Pracharoenwattana *et al.*, 2007 und Cousins *et al.*, 2008). Ein endgültiger Beweis würde sehr von der Identifizierung eines alternativen HPR-Gen profitieren. Allerdings konnte bis zum Beginn dieser Arbeit in keiner Pflanzenspezies ein Gen für eine alternative HPR identifiziert und somit die Arbeit an entsprechenden Mutanten nicht durchgeführt werden. Desweiteren findet bis heute die Theorie, dass die HPR1-Reaktion des pflanzlichen C<sub>2</sub>-Zyklus umgangen werden kann, wenig Akzeptanz in der aktuellen Literatur (Wingler *et al.*, 2000; Siedow und Day, 2001; Reumann und Weber, 2006). Das Ziel dieser Arbeit sollte die Identifizierung bisher

unbekannter, 3HP metabolisierender Enzyme und der Nachweis deren Beteiligung an der Photorespiration sein.

### **5.1. Die *At*HPR1-Insertionslinien stellen eine Ausnahme unter den bisher bekannten C2-Zyklus-Mutanten dar.**

Die generell akzeptierte Meinung, dass das photorespiratorische 3HP exklusiv durch die HPR1 im Peroxisom metabolisiert wird, ist nach der jetzigen Datenlage nicht aufrecht zu erhalten. Die Charakterisierung des 3HP-Stoffwechsels in *Arabidopsis* liefert fundierte Hinweise, dass der Blick auf die Photorespiration und ihre subzelluläre Kompartimentierung erweitert werden muss. Die hier isolierten *At*HPR1-Mutanten zeigen nicht den typischen Photorespirationsphänotyp (Somerville, 2001) und sind somit einzigartig unter den bisher bekannten Mutanten des C2-Zyklus. Die Mutanten mit defekter HPR1, einem der Schlüsselenzyme des C2-Zyklus, zeigten nur eine relativ geringe Sauerstoffempfindlichkeit und lediglich geringe Beeinflussungen des Stoffwechsels. Sie sind unter photorespiratorischen Bedingungen nicht nur lebensfähig sondern auch in der Lage unter diesen Bedingungen ihren gesamten Lebenszyklus zu vervollständigen. Ähnliche Beobachtungen lieferten frühere Arbeiten an einer vermeintlichen Gerste-HPR-Mutante (Murray *et al.*, 1989). Da jedoch für einige Pflanzenspezies Hinweise auf mehrere HPRs existieren bzw. lichtreguliertes, alternatives Splicing (Hayashi *et al.*, 1996) gezeigt werden konnte, kann der ausbleibende Phänotyp auf Genredundanz beruhen, wie z.B. beim P-Protein der Glycin-Decarboxylase (Engel *et al.*, 2007). Das ist auch für Gerste nicht ausgeschlossen, da der exakte Gendefekt dieser Mutante bis heute ungeklärt ist und auch keine komplette Genomsequenz vorliegt. Jedoch gibt es einige Hinweise darauf, dass es sich bei dieser Pflanze tatsächlich um eine Mutante der peroxisomalen HPR1 handelt. Diese Sicht wird durch die Ergebnisse aus meiner Arbeit an genetisch definierten Mutanten von *Arabidopsis* bekräftigt und bestätigt. Da in *Arabidopsis* alternatives Splicing des HPR-Transkriptes nicht stattfindet (Mano *et al.*, 1997), handelt es sich bei den hier untersuchten, beiden Insertionslinien um vollständige HPR1-null-Mutanten. Die geringe Beeinflussung des Wachstums, der photosynthetischen Leistung sowie der Akkumulation von Intermediaten der Photorespiration gleichen sich in beiden Pflanzen und bestätigen die Annahme, dass es sich bei der Gerste-Mutante um eine HPR1-Defizit-Mutante handeln könnte. Generell sind die Effekte des HPR-Ausfalls auf die Pflanze verhältnismäßig gering, verglichen mit anderen Mutanten des pflanzlichen C2-Zyklus (Boldt *et al.*, 2005). Auf der Ebene der Enzymaktivitäten wird deutlich, dass die HPR-Aktivität in den Pflanzen wie erwartet deutlich reduziert ist, jedoch führt der Ausfall der HPR1 vor allem zur Reduktion der NADH-abhängigen Aktivität. Dagegen ist die NADPH-abhängige Reduktion von 3HP relativ gering beeinflusst, was einen Hinweis darauf liefert, dass es für diese Reaktion alternative Enzyme

in höheren Pflanzen geben muss. Diese sind, der geringen Beeinflussung des Stoffwechsels in der HPR1-Mutante zufolge, in der Lage, die photorespiratorischen Bedürfnisse unter den meisten Bedingungen zu erfüllen. Durch frühere Arbeiten an Spinat konnte bereits gezeigt werden, dass ein weiteres Enzym für die 3HP Umsetzung existiert. Diese alternative HPR2 konnte biochemisch gereinigt und charakterisiert werden. Dabei stellt sich heraus, dass dieses Enzym vorrangig NADPH-abhängig arbeitet und zytosolisch lokalisiert ist (Kleczkowski und Randall, 1988; Kleczkowski *et al.*, 1988). Als potentielle Funktion dieses Enzyms wurde eine Art „Überfluss-Hypothese“ diskutiert. Bei hohen photorespiratorischen Umsätzen könnte 3HP das Peroxisom verlassen und im Zytosol von der HPR2 umgesetzt und dann erneut in den C2-Zyklus eingeschleust werden. Allerdings fand diese Annahme bisher kaum Akzeptanz in der wissenschaftlichen Literatur (Wingler *et al.*, 2000; Siedow und Day, 2001; Reumann und Weber, 2006). Für die „Überfluss-Hypothese“ könnte das zuvor beschriebene Splicing aus einer prä-mRNA in eine peroxisomale und eine zytosolische HPR1-Isoform sprechen. In diesen Pflanzenspezies könnte die zytosolische Isoform der HPR1 das Fehlen oder die zu geringe Aktivität einer alternativen HPR2 im Zytosol kompensieren und der peroxisomalen Isoform helfend zur Seite stehen. Gegen die Theorie des zytosolischen Überflusses spricht, das man bisher annahm, das die peroxisomale Membran nicht durchlässig für 3HP ist (z.B. Heupel *et al.*, 1991). Allerdings konnte bisher ebenfalls kein Transporter für dieses photorespiratorische Metabolit identifiziert werden und somit ist es nicht ausgeschlossen, dass 3HP die Membran passieren kann und mit dem Zytosol im Gleichgewicht steht. Da die *AtHPR1*-Defizitmutanten nur geringfügig in ihrer photosynthetischen Leistung beeinflusst sind, kann man davon ausgehen, dass es hier wenigstens ein weiteres Enzym zur 3HP-Reduktion geben muss, dass die photorespiratorischen Bedürfnisse erfüllen kann. Darüber hinaus wird durch das Verhalten der HPR1-Mutante deutlich, dass die Photorespiration mit anderen Stoffwechselwegen in Verbindung steht und für deren optimale Funktion notwendig ist. Einige Studien belegen, dass ein vollständig funktionsfähiger C2-Zyklus z.B. für die Nitratassimilation notwendig ist (Rachmilevitch *et al.*, 2004; Potel *et al.*, 2009). Das Saccharose-abhängige Keimungsverhalten der *AtHPR1*-Mutanten macht deutlich, dass der C2-Zyklus ebenfalls für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren notwendig ist, da diese Eigenschaft ein typisches Charakteristikum für Mutanten in diesem Stoffwechselweg ist (Baker *et al.*, 2006 und Pinfield-Wells *et al.*, 2005). Interessanterweise zeigt die Doppelmutante in den peroxisomalen MDHs den gleichen Phänotyp (Pracharoenwattana *et al.*, 2007), was auf eine Kooperation der HPR1 und der pMDHs für die optimale Funktion der  $\beta$ -Oxidation hindeutet. Als wahrscheinlichster Grund ist hier die peroxisomale Redoxhomöostase zu nennen, die durch das Zusammenspiel der HPR1 und den pMDHs reguliert wird. Als wahrscheinlichste Funktion dieser Enzyme ist die Reoxidation des NADHs zu nennen, welches für die  $\beta$ -

Oxidation notwendig ist (Pracharoenwattana *et al.*, 2007) und somit die Verbindung beider Stoffwechselwege darstellen würde.

## 5.2. Identifikation der HPR2 und die Beteiligung an der Photorespiration

Durch meine Ergebnisse an den *AtHPR1*-Mutanten wird eindeutig erkenntlich, dass die HPR1 nicht das einzige 3HP reduzierende Enzym in *Arabidopsis* ist. In Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten Daten (Kleczkowski und Randall, 1988; Kleczkowski *et al.*, 1988) ist es mir gelungen, eine alternative, NADPH-abhängige HPR2 aus den *AtHPR1*-Defizitmutanten zu reinigen und zu identifizieren. Da bisher für keine Pflanzenspezies ein entsprechendes Gen für eine alternative HPR bekannt war, stellt die Identifikation dieses Gens einen wesentlichen Erkenntnisgewinn dar. Durch biochemische Charakterisierung der rekombinanten HPR2 (*At1g79870*) konnte gezeigt werden, dass das identifizierte Protein 3HP umsetzt. Die biochemischen Eigenschaften gleichen der aus Spinat gereinigte HPR2. Dass es sich bei dem als *At1g79870* identifizierten Protein tatsächlich um das zur Spinat HPR2 homologe handelt, konnte durch die Reaktion mit dem spezifischen HPR2-Antikörper aus Spinat unterstützt werden. Im weiteren Versuch sollte nun geklärt werden, ob die HPR2 funktionell an der Photorespiration beteiligt ist und, wie vermutet die HPR1 ersetzen kann. Wie an Hand des Phänotyps der *AtHPR1*-Mutanten ersichtlich wird, ist ein anderes 3HP-reduzierendes Enzym, vermutlich die HPR2 in der Lage, den Ausfall der HPR1 nahezu vollständig zu kompensieren. Somit könnten die Produkte der beiden Gene redundant sein und die HPR2 die HPR1 ersetzen. Da für die alternative HPR2 aus Spinat gezeigt werden konnte, dass das Protein zytosolisch lokalisiert ist (Kleczkowski *et al.*, 1988) nehmen wir diese Lokalisation auch für die HPR2 in *Arabidopsis* an. Bei dem Protein *At1g79870* konnte kein konkreter Hinweis auf ein Targeting in ein Organell gefunden werden. Diese Annahme wird bisher allerdings nur aus *in silico* Studien bestätigt, da ein eindeutiger experimenteller Nachweis bisher nicht gelungen ist. Wenn die HPR2 tatsächlich in Zytoplasma vorliegt, könnte es, wie bereits länger vermutet und diskutiert worden ist, als eine Art back-up-System fungieren und aus dem Peroxisom austretendes 3HP dem C2-Zyklus wieder zur Verfügung stellen. Man nahm bisher an, dass bei hohen photorespiratorischen Umsätzen die HPR1 die vollen Bedürfnisse nicht erfüllen kann (Situation in der HPR1-Mutante) und es somit zur Kooperation mit der HPR2 im Zytoplasma kommt. Naheliegender ist allerdings die zuvor beschriebene Vermutung, dass es unter bestimmten Bedingungen zur Limitation von Redoxäquivalenten im Peroxisom kommt und die HPR1 deshalb nicht optimal arbeiten kann. Diese Argumentation wird durch eine von dieser Studie unabhängigen Arbeit gestützt, in der die Rolle der Malatdehydrogenasen (MDH) im C2-Zyklus untersucht worden ist. Interessanterweise konnte dort gezeigt werden, dass die Doppelmutante in beiden peroxisomalen MDHs lebensfähig und nur geringfügig in ihrer photosynthetischen Leistung

beeinträchtigt ist. Darüber hinaus wies sie einige weitere Eigenschaften der *AtHPR1*-Insertionslinien auf. Da man bisher davon ausgeht, dass das im Peroxisom benötigte NADH ausschließlich durch die Aktivität der MDHs bereitgestellt wird (Reumann und Weber, 2006), ist davon auszugehen, dass die HPR1 in der pMDH-Doppelmutante nicht arbeiten kann (Cousins *et al.*, 2008). Es ist anzunehmen, dass in dieser Pflanze nahezu der gesamte Fluss der Photorespiration über den zytosolischen Weg geleitet wird und die HPR2 am C2-Zyklus beteiligt ist. Meine Arbeit liefert darüber hinaus weitere Evidenzen dafür, dass die HPR2 nicht nur in pMDH-Doppelmutante eine Rolle spielt, sondern auch unter wildtypischen Bedingungen funktionell an der Photorespiration beteiligt ist. Der Ausfall der HPR2 in *Arabidopsis* vermindert auch die photosynthetische Leistung, wobei der Effekt in der HPR1-Mutante additiv verstärkt ist. Die Photosyntheserate ist in diesen Mutanten reduziert und der CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt erhöht. Insbesondere die Änderung des Kompensationspunktes ist ein klarer Hinweis, dass es zu Beeinflussungen der Photorespiration kommt. Weiterhin wird aus den Metabolm- und den Markierungsexperimenten deutlich, dass der Ausfall der HPR2 einen Einfluss auf den optimalen Fluss durch den C2-Zyklus hat. Die HPR2 Mutanten zeigen einen leicht erhöhten Gehalt an 3HP und eine Akkumulation dieses Intermediates nach Zugabe von <sup>13</sup>C-markierter Glukose. Diese Befunde zeigen, dass die HPR2 bei der Reduktion von 3HP auch im Wildtyp eine Rolle spielt und somit das Zytosol als vierte subzelluläre Komponente der Photorespiration (

Abbildung 5-1) in Betracht gezogen werden muss. Bis heute herrscht die Meinung vor, dass die peroxisomale Membran für 3HP undurchlässig ist (z.B. Heupel *et al.*, 1991). Bisher konnte auch kein Transporter für dieses Intermediat identifiziert werden (Reumann und Weber, 2006). Meine Ergebnisse liefern einen indirekten Beweis dafür, dass für diese Substanz ein Gleichgewicht zwischen Peroxisom und Zytosol vorhanden sein muss und 3HP relativ einfach die Membran der Peroxisomen passieren kann. Inwieweit Poren, Transporter oder andere Mechanismen diesen Austausch vermitteln, ist nicht bekannt. Interessanterweise wurde für ein der *AtHPR2* homologes Protein aus der Buntnessel (*Coleus blumei*) eine Funktion in der Rosmarinsäurebiosynthese diskutiert (Kim *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym zum Umsatz von 3,4-Hydroxyphenylpyruvat befähigt ist, und somit eine Rolle im Sekundärmetabolismus spielen könnte. Diese Funktion ist aufgrund der Eigenschaften des Proteins als D-Isomer-spezifische-2-Hydroxysäure-Dehydrogenase nicht überraschend, jedoch stellt die gemessene Aktivität von Kim *et al.*, (2004) mit diesem Substrat nur etwa ~1 % der Aktivität mit 3HP dar und somit ist die Funktion dieses Proteins klar photorespiratorischer Natur.



Intermediates relativ klein ist. Dennoch wird deutlich, dass die HPRs eine Rolle im Umsatz von Glyoxylat spielen. Das die Umsätze nur geringfügig beeinflusst sind ist nicht verwunderlich, da weitere Enzyme für diese Reaktion in *Arabidopsis* vorhanden sind (Hoover *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2008) und diese Reaktion somit nur eine Nebenfunktion der HPRs darstellen. Die Pflanzen zeigen auch, dass neben dem photorespiratorischen Phänotyp eine drastisch reduzierte photosynthetische Leistung auftritt. Somit sind die Photorespiration und eine intakte HPR essentiell für das Überleben der Pflanze und die optimale photosynthetische Aktivität. Ebenfalls lässt sich an Hand der Doppelmutante zeigen, dass Störungen der Photorespiration zur Verminderung der PSII-Aktivität führen. Im Vergleich zur bekannten Literatur, in der eine Zunahme der Photoinhibition in Photorespirationsmutanten gezeigt wurde (Leegood *et al.*, 1995; Wingler *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2007), weisen auch die HPR-Einzel- und im verstärkten Maße die HPR-Doppelmutante ein reduziertes  $F_v/F_m$  Verhältnis und eine reduzierte Elektronentransportrate bei höheren Lichtintensitäten auf. Die Kombination aus beiden gefundenen Effekten lässt darauf schließen, dass es auch in den HPR-Mutanten zur Inhibition der Photosynthese kommen könnte. Die Abnahme im  $F_v/F_m$ -Wert gilt als Maß für die maximale Quantenausbeute des PSII. Eine Reduktion in diesem Wert zeigt, dass das PSII nicht mehr optimal arbeiten kann. Dieser Effekt tritt nicht bei Pflanzen auf, die unter nicht photorespiratorischen Bedingungen kultiviert wurden und wird erst deutlich, nachdem die Pflanzen in Normalluft transferiert wurden. Da die Reduktion jedoch relativ gering ist könnte man auch davon ausgehen, dass diese Erscheinung auf die reduzierten Chlorophyllgehalte in den HPR-Mutanten zurückzuführen sind (Abbildung 4-15). Die Reduktion des Chlorophyllgehaltes könnte sich negativ auf die Synthese und die optimale Wirkung des PSII auswirken und somit zur Reduktion des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses führen. Dass dieser Effekt nicht ausschließlich durch die Reduktion der Chlorophyllgehalte zu begründen ist zeigen allerdings die Messungen der Elektronentransportraten. Hier tritt bereits eine Reduktion der Rate bei Pflanzen auf, die unter erhöhten  $CO_2$ -Bedingungen kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen ist allerdings kein Unterschied in den Chlorophyllgehalten zwischen den Mutanten und der Kontrolle vorhanden, so dass ein anderer Grund vorliegen muss. Naheliegender hierfür wäre die Mutation der HPRs im pflanzlichen C2-Zyklus. Durch den Block in diesem Stoffwechselweg könnte es zur Überreduktion der Elektronentransportkette kommen, da nicht alle Reduktionsäquivalente verbraucht werden und als Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen.

Dennoch wird deutlich, dass es weitere Alternativen zur HPR1 und HPR2 geben muss. Zwar zeigt die Doppelmutante verlangsamtes Wachstum in Normalluft, ist jedoch dennoch in der Lage unter photorespiratorischen Bedingungen zu wachsen. Wie gezeigt wurde, ist auch *At1g12550* in der Lage 3HP und Glx zu reduzieren und kommt somit als HPR3 in Frage.

Dieses Protein zeigt ca. 50 % Sequenzähnlichkeit mit den HPRs auf Proteinebene und trägt ebenfalls die für HPRs typischen Domänen. Darüber hinaus lässt sich die Aktivität des Proteins spezifisch mit Oxalat inhibieren, welches als ein Charakteristikum für die HPR2 gilt. Die HPR3 gleicht also von der Struktur und den enzymatischen Umsätzen eher der HPR2 als der HPR1. Bisher ist es nicht gelungen die Lokalisation dieses Protein in der Pflanze nachzuweisen. *In silico* Vorhersagen sprechen ebenfalls für eine zytosolische Lokalisation. Die HPR3 könnte also, wie die HPR2 im Zytosol 3HP reduzieren und dem C2-Zyklus wieder zur Verfügung stellen. Darüber hinaus zeigt das Protein deutliche Glyoxylatreduktase-Aktivität, was auf eine weitere Funktion dieses Protein hindeutet. Ebenso wie für das 3HP wurde Ende der 80er Jahre gemutmaßt, dass auch Glyoxylat bei hohen photorespiratorischen Umsätzen aus dem Peroxisom austritt und dort von einer Glyoxylat-Reduktase (GR) wieder zu Glykolat umgesetzt und ebenfalls dem C2-Zyklus wieder zur Verfügung gestellt wird (Kleczkowski *et al.*, 1986; 1990). Das Protein könnte also zusätzlich zu den bisher bekannten GRs (Hoover *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2008) eine Funktion beim Umsatz von Glx ausüben und somit sowohl als HPR, als auch als GR wirksam werden. Die Dreifachmutante aus HPR1, HPR2 und HPR3 zeigt eine nochmalige Reduktion der photosynthetischen Leistung und ein vermindertes Wachstum. Somit kommt es auch in diesem speziellen Fall zu einer zusätzlichen Beeinflussung der Photorespiration. Dafür spricht weiterhin, dass es durch den zusätzlichen Ausfall der HPR3 zu einer weiteren Verschärfung des Anstaus von photorespiratorischen Intermediaten wie Serin und dessen Biosyntheseprodukten kommt. Da es sich bei der Dreifachmutante um ein sehr artifizielles System handelt, lässt sich über die Funktion der dritten HPR im Wildtyp nur spekulieren. An Hand des Wachstums und der stark beeinträchtigten Samenbildung der *hpr1xhpr2* Doppelmutante wird dennoch deutlich, dass der Beitrag der alternativen HPR3 unter normalen Bedingungen als eher gering einzuschätzen ist. Im Gegensatz zu den HPR2-Einzelmutanten zeigen die HPR3-Einzelmutanten keine Beeinträchtigung im Wachstum und der Photosyntheseleistung, was die zuvor gemachte Aussage bekräftigt.

#### **5.4. Rolle der HPRs in *Arabidopsis***

Wie zuvor beschrieben wurde ist die *AtHPR1* nicht das einzige Enzym welches die Interkonversion von 3HP zu Glycerat in *Arabidopsis* bewerkstelligt. Dennoch lassen die durchgeführten Studien an genetisch definierten Mutanten unterschiedliche Rückschlüsse auf die Rolle der jeweiligen HPR zu. Wie an Hand der Tabelle 5-1 zu erkennen ist, kommt es in der *AtHPR1*-Mutante zu den deutlichen Effekten auf Enzymebene. Der Ausfall zieht eine über 95 %ige Reduktion der NADH-abhängigen 3HP-Reduktion nach sich, wobei die NADPH-abhängige Reduktion des photorespiratorischen Intermediats nur zu etwa 50 % reduziert ist. Für diese Reaktion ist vor allem die identifizierte, zytosolische HPR2 zuständig,

was an Hand der Beeinflussung dieser Reaktion in der korrespondierenden *hpr1xhpr2*-Doppelmutante zu erkennen ist. Die zusätzliche Mutation der HPR2 in der *hpr1*-Mutante verschärft den zuvor beobachteten Effekt deutlich. Darüber hinaus ist zu sagen, dass die identifizierte HPR3 nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt, da es durch den zusätzlichen Ausfall dieses Enzyms in der isolierten 3-fach-Mutante nur zu geringfügigen Effekten auf die Enzymaktivität kommt. Da es sich dabei um ein sehr artifizielles Mutantensystem handelt, lässt sich über die Rolle der HPR3 im Wildtyp nur spekulieren. Das Enzym ist zwar in der Lage 3HP zu reduzieren, jedoch ist der Anteil an der Photorespiration als eher gering einzuschätzen, da die Einzelmutante in der HPR3 keine auffälligen Effekte zeigt. Demnach ist die HPR1 das Hauptenzym der photorespiratorischen 3HP-Umsetzung und wird unterstützt durch die HPR2. Das ist vor allem daraus zu schließen, dass die HPR1-Mutanten keinen klaren photorespiratorischen Phänotyp zeigen. Die Kombination der HPR1- mit der HPR2-Mutation zieht jedoch einen deutlichen Effekt nach sich. Die Pflanze ist zwar in der Lage unter Normalluftbedingungen zu wachsen, jedoch weist sie eine verstärkte Sauerstoffsensitivität auf. Die HPR2 ist demzufolge die zweite HPR, welche am pflanzlichen C2-Zyklus beteiligt ist. Das wird nicht nur durch den Phänotyp der Doppelmutante ersichtlich, sondern auch durch die reduzierte photosynthetische Leistung in den HPR2-Mutanten. Darüber hinaus kommt es in den HPR2-Mutanten auch zu erhöhten Gehalten an 3HP und Serin, was die These unterstützt (Tabelle 5-1). Da beide Einzelmutationen dennoch nur geringfügig im Wachstum und Stoffwechsel beeinträchtigt sind wird hieraus ersichtlich, dass mindestens eines der beiden Enzyme aktiv in *Arabidopsis* vorliegen muss um den kompletten Wachstumszyklus zu beenden. Alle betrachteten Effekte auf Stoffwechselebene sind in der Doppelmutante additiv und die Daten korrelieren miteinander. In der HPR2-Einzelmutante ist der Chlorophyllgehalt mit dem Wildtyp vergleichbar, wohingegen eine Abnahme des Gehaltes in der HPR1-Mutante verzeichnet wurde. Daraus resultierend zeigt die HPR2-Mutante keine Reduktion der maximalen Quantenausbeute des PSII, wobei bei der HPR1-Einzelmutante eine Verringerung des  $F_v/F_m$ -Verhältnisses festgestellt wurde. Diese Reduktion ist zwar in der *hpr1xhpr2*-Doppelmutante nicht additiv, jedoch zeigt die Messung der absoluten Elektronentransportraten des PSII (Abbildung 4-27), dass der Verlust beider Enzyme eine Verschärfung nach sich zieht. Dass die HPR1 das Hauptenzym der Photorespiration ist wird weiterhin bestätigt durch die Reduktion des Wachstums in normaler Luft und die reduzierte photosynthetische Leistung. Die HPR2-Mutante ist vom Wachstum dem Wildtyp vergleichbar und nur gering in Photosyntheserate und dem CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt beeinträchtigt. Dennoch ist hier ein Effekt zu verzeichnen und es lässt sich sagen, dass beide Enzyme an der 3HP-Umsetzung beteiligt sind. Ob in der Zelle der peroxisomale oder der zytosolische Weg genutzt wird, wird vermutlich entscheidend von der Redoxhomöostase der Peroxisoms beeinflusst. Die HPR2 wird vor allem dann eine Rolle

spielen, wenn der photorespiratorische Fluss die Kapazität der HPR1 übersteigt. Das wird vornehmlich dann auftreten, wenn die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten limitiert ist. Der genaue Regulationsmechanismus ist bisher jedoch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Der Befund, dass die Doppelmutante aus beiden HPRs in normaler Luft noch wächst, ließ die Existenz weiterer am 3HP-Umsatz beteiligter Enzyme in *Arabidopsis* vermuten. Durch BLAST-Analysen konnte eine weitere HPR (HPR3) identifiziert werden. Das rekombinante Enzym zeigt 3HP-Reduktaseaktivität und kommt somit als weiter HPR in Frage. Die Einzelmutation der HPR3 zieht keinen phänotypischen Effekt nach sich. Die Kombination aller 3 HPR-Mutationen führt jedoch zur weiteren Reduktion des Wachstums, der HPR-Aktivität in den Pflanzen und der photosynthetischen Leistung (Tabelle 5-1). Das lässt darauf schließen, dass auch dieses Enzym unter diesen Bedingungen an der Reduktion von 3HP beteiligt ist. Welche Rolle die HPR3 im Wildtyp einnimmt ist noch unklar und bedarf weiteren Analysen.

Tabelle 5-1 Zusammenfassung der Hauptcharakteristika der HPR-Mutanten

Dargestellt ist eine Übersicht über die charakteristischen Eigenschaften und Effekte der isolierten und hergestellten HPR-Mutanten (Chl = Chlorophyll, A = Photosyntheserate,  $\Gamma$  =  $\text{CO}_2$ -Kompensationspunkt,  $F_v/F_m$  = maximale Quantenausbeute des PSII).

	<b>col.0</b>	<b><i>hpr2-1</i></b>	<b><i>hpr1-1</i></b>	<b><i>hpr1xhpr2</i></b>	<b><i>hpr1xhpr2xhpr3</i></b>
<b>Diameter (cm)</b>	11.9 ± 0.51	11.5 ± 0.56	<b>6.40 ± 0.43</b>	<b>2.80 ± 0.27</b>	<b>2.00 ± 0.18</b>
<b>Chl a + b content (µg/mgFW)</b>	4.01 ± 0.39	4.03 ± 0.35	<b>2.70 ± 0.57</b>	<b>1.84 ± 0.28</b>	<b>1.78 ± 0.07</b>
<b>3HP:NADH (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)</b>	1022 ± 36	<b>763 ± 40</b>	<b>19 ± 5</b>	<b>11 ± 2</b>	<b>2 ± 0.7</b>
<b>3HP:NADPH (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>)</b>	95 ± 13	<b>65 ± 9</b>	<b>46 ± 8</b>	<b>10 ± 3</b>	<b>11 ± 3</b>
<b>A (µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>	6.57 ± 0.49	<b>4.68 ± 0.60</b>	<b>3.46 ± 0.49</b>	<b>2.55 ± 0.36</b>	<b>1.56 ± 0.07</b>
<b><math>\Gamma</math> (µl <math>\Gamma^{-1}</math>)</b>	50.96 ± 2.42	<b>69.91 ± 6.78</b>	<b>120.53 ± 9.38</b>	<b>135.22 ± 5.61</b>	<b>174.65 ± 11.25</b>
<b>Leaf 3HP (fold)</b>	1.00 ± 0.19	1.48 ± 0.23	<b>5.72 ± 1.02</b>	<b>9.15 ± 2.85</b>	n. d.
<b>Leaf Serine (µmol/gFW)</b>	4.82 ± 1.33	6.07 ± 3.00	<b>17.11 ± 2.58</b>	<b>19.46 ± 2.72</b>	<b>26.31 ± 2.41</b>
<b><math>F_v/F_m</math></b>	0.76 ± 0.04	0.71 ± 0.03	<b>0.65 ± 0.04</b>	<b>0.64 ± 0.05</b>	<b>0.63 ± 0.05</b>

## 5.5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert fundierte Hinweise, dass die 3HP- zu Glycerat-Interkonversion und somit auch die Photorespiration flexibler sind als bisher angenommen. Durch die Identifikation der *AtHPR2* und der *AtHPR3* konnte gezeigt werden, dass nicht allein die HPR1 die 3HP-Reduktion in *Arabidopsis* bewerkstelligt. Dennoch bleiben einige Fragen zu diesem Thema offen. Der hierbei wichtigste Punkt, der weitere Untersuchungen bedarf, ist die Identifikation des genauen Regulationsmechanismus und der Bedingungen, unter denen der photorespiratorische Fluss nicht durch die Peroxisomen geleitet wird. Zur Klärung dieser Fragestellung könnte es hilfreich sein, die NAD/NADH-, sowie die NADP/NADPH-Verhältnisse zu bestimmen, sowie detaillierte Metabolomuntersuchungen, unter verschiedenen Bedingungen durchzuführen. Dabei spielen vermutlich die Lichtintensität und die Photoperiode ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der zu vergleichenden Bedingungen. *Arabidopsis* ist unter natürlichen Umständen an temperierte Bedingungen angepasst (Shindo *et al.*, 2007) und die Pflanzen, die in dieser Studie verwendet wurden ebenfalls unter solchen Bedingungen kultiviert. Unter Berücksichtigung, dass das alternative Splicing der HPR1 vor allem bei Pflanzen beobachtet wurde, die an wärmere Standorte angepasst sind (*Curcubita sp.*), könnte nicht nur Licht, sondern auch die Temperatur einen Einfluss auf die Regulation des photorespiratorischen Flusses durch das Peroxisom oder das Zytosol haben. Eine gute Möglichkeit dieser Fragestellung näher auf den Grund zu gehen, würde die Komplementation der *Arabidopsis* HPR-Doppelmutante mit einem Gen bieten, für das das alternative Splicing gezeigt wurde. Durch genaue Studien dieser Pflanzen könnte geklärt werden unter welchen Bedingungen der Splicing-Effekt auftritt und somit Rückschlüsse auf die Beteiligung der zytosolischen Reaktionen gezogen werden. Allerdings setzt dieses Experiment voraus, das auch der Splicing-Vorgang in *Arabidopsis* funktionsfähig ist. Weitere Experimente sind auch im Hinblick auf den Einfluss der Photoperiode und den beschriebenen Phänotypen der HPR-Mutanten notwendig. Erhöhte Flussraten durch den C2-Zyklus treten vor allem unter Starklichtbedingungen und längeren Lichtperioden auf und somit werden größere Mengen an NADH für die HPR-Reaktion im Peroxisom notwendig. Der Prozess der intraperoxisomalen NADH-Versorgung wird als limitierender Schritt für die Serin-/3HP-Interkonversion angesehen (Yu und Huang, 1986) und ist vermutlich entscheidend für den Fluss des 3HPs durch das Peroxisom. Warum allerdings die *AtHPR1*-Mutanten einen eindeutigen Wachstumsunterschied unter Kurztagbedingungen zeigen, ist nach wie vor ungeklärt. Möglicherweise kommt es unter kürzeren Lichtperioden zum Anstau von toxischen Intermediaten, die sich negativ auf das Wachstum der Pflanzen auswirken oder zum „Leerlaufen“ einiger, wichtiger Stoffwechselprodukte, die für das optimale Wachstum der Pflanzen notwendig sind. Aufschluss könnte auch hier eine detaillierte Metabolomanalyse, unter verschiedenen Lichtperioden geben. Darüber hinaus zeigt auch die HPR-Dreifach-

Mutante keinen letalen Phänotyp unter photorespiratorischen Bedingungen. Dieser Befund deutet möglicherweise darauf hin, dass weitere Enzyme an der 3HP-Umsetzung beteiligt sind und kleiner Beiträge dazu leisten können. Denkbar ist außerdem, dass es weitere, alternative Mechanismen gibt, die für eine Flexibilität des pflanzlichen C2-Zyklus sorgen. Als vierter Kandidat für die 3HP-Umsetzung könnte eine weitere D-Isomer-spezifische-2-Hydroxysäure-Dehydrogenase verantwortlich sein. Das Protein des Gens *Af2g45630* zeigt ebenso etwa 50 % Sequenzidentität zur HPR2 und kommt somit als weitere HPR in Frage. Da sich vor allem in den HPR-Mehrfachmutanten der Anstau des Serins deutlich verschärft, ist zu erkennen, dass die AGT1 ebenfalls am Gleichgewicht zwischen dem 3HP und dem Serin beteiligt ist. Ein möglicher Grund hierfür ist vermutlich ein weiterer Inhibierungseffekt. Bei den HPR-Mehrfach-Mutanten kommt es zur Verschärfung des Anstaus an 3HP, was sich negativ auf den Reaktionsmechanismus der AGT1 auswirken könnte und diese inhibiert. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, könnten Inhibitorstudien an der rekombinanten AGT durchgeführt werden. Möglicherweise ist das 3HP ebenfalls toxisch für die Zelle und wird von daher in ein anderes Metabolit umgewandelt, welches keine negative Wirkung auf den Stoffwechsel besitzt. Bisher konnte für das Serin keine toxische Wirkung festgestellt werden und die Frage somit offen geblieben. Hier könnten Versuche an Pflanzen oder rekombinanten Enzymen ebenfalls Aufschluss bringen. Weiterhin lässt sich aus den Metabolomnalyse entnehmen, dass es in den HPR-Mutanten zum Anstau von Ethanolamin kommt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ethanolamin vor allem durch die Decarboxylierung von frei verfügbarem Serin stammt (Rontein *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis könnte als Anhaltspunkt gewertet werden dass auch das Serin Ausgangspunkt für alternative Mechanismen und Umsatzmöglichkeiten darstellt und für eine weitere Flexibilität des photorespiratorischen Stoffwechsels sorgt. Denkbar wäre aufgrund der Überlebensfähigkeit der HPR-Dreifachmutante unter photorespiratorischen Bedingungen weiterhin, dass nicht der gesamte Kohlenstoff der in den pflanzlichen C2-Zyklus eingeht wieder zurück in 3PG umgewandelt und dem Calvin-Zyklus zugeführt wird. Zwar zeigt die Glycerat-Kinase-Defizitmutante einen letalen Phänotyp unter Normalluftbedingungen (Boldt *et al.*, 2005), jedoch ist dieser drastischen Phänotyp vermutlich auf die starke Glycerat-Akkumulation und dessen Toxizität in den Pflanzen zurück zu führen. Aufschluss könnte hierbei die Herstellung einer Dreifachmutante aus der peroxisomalen HPR1, der zytosolischen HPR2 und der Glycerat-Kinase bringen, da unter diesen Bedingungen kaum Glycerat gebildet wird und der Toxizitätseffekt somit abgemildert würde. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit lag die entsprechende Pflanze noch nicht vor und somit können keine weiteren Aussagen zu dieser Theorie getroffen werden. Dennoch wird durch die Charakterisierung des 3HP-Stoffwechsels in *Arabidopsis* deutlich, dass der pflanzliche C2-Zyklus ein größeres Maß an Flexibilität aufweist, als bisher angenommen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adham, A.R., Zolman, B.K., Millius, A. und Bartel, B.** (2005) Mutations in Arabidopsis acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in  $\beta$ -oxidation, *Plant Journal*, **41**: 859-874
- Alonso, J. M., et al.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**: 653-657
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, **408**:796.
- Baker, A., Graham, I., A., Holdsworth, M., Smith, S. M. und Theodoulou, F. L.** (2006) Chewing the fat:  $\beta$ -oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci.*, **11**: 124-132
- Bari, R., Kebeish, R., Kalamajka, R., Rademacher, T. und Peterhänsel, C.** (2004) A glycolate dehydrogenase in the mitochondria of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, **55**: 623-630
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research*, **7**: 1513-1523
- Blackwell, R.D., Murray, A.J.S., Lea, P.J., Kendall, A., Hall, N.P., Turner, J.C. und Wallsgrove, R.M.** (1988) The value of mutants unable to carry out photorespiration. *Photosynth. Res.*, **16**: 155-176
- Boldt, R., Edner C., Kolukisaoglu, U., Hagemann M., Weckwerth, W., Wienkopp, S., Morgenthal, K. und Bauwe, H.,** (2005) D-Glycerate 3-Kinase, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family, *Plant Cell*, **17**: 2413-2430
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding, *Anal. Biochem*, **72**: 248-254
- Catanzariti, A. M., Soboleva, T. A., Jans, D. A., Board, P. G. und Baker, R. T.** (2004) An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins, *Protein Science*, **13**: 1331-1339
- Colman, B.** (1989) Photosynthetic carbon assimilation and the suppression of photorespiration in the cyanobacteria. *Aquatic Botany*. **34**: 211-231
- Cousins, A. B., Pracharoenwattana, I., Zhou, W., Smith, S. M. Und Badger, M.R.** (2008) Peroxisomal Malate Dehydrogenase Is Not Essential for Photorespiration in *Arabidopsis* But Its Absence Causes an Increase in the Stoichiometry of Photorespiratory CO<sub>2</sub> Release. *Plant Physiology*, **148**: 786-795

- Dengler, U., Niefind, K., Kiess, M. und Schomburg, D.** (1997) Crystal structure of a ternary complex of D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*, NAD<sup>+</sup> and 2-oxoisocaproate at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, **267(3)**: 640-60
- Deusch, O., Landan, G., Roettger, M., Gruenheit, N., Kowallik, K. V., Allen, J. F., Martin, W. und Dagan, T.** (2008) Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 748-761
- Eisenhut, M., Kahlon, S., Hasse, D., Ewald, R., Lieman-Hurwitz, J., Ogawa, t., Ruth, W., Bauwe, H., Kaplan, A. und Hagemann, M.** (2006) The Plant-Like C<sub>2</sub> Cycle and the Bacterial-Like Glycerate Pathway Cooperate in Phosphoglycolate Metabolism in Cyanobacteria. *Plant Physiology*, **142**: 333.342
- Eisenhut, M., von Wobeser, E. A., Jonas, L., Schubert, H., Ibelings, B. W., Bauwe, H., Matthijs, H. C. P. und Hagemann, M.** (2007) Long-Term Response toward Inorganic Carbon Limitation in Wild Type and Glycolate Turnover Mutants of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiology*, **144**: 1946-1959
- Eisenhut, M., Bauwe, H. und 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.,** (2008) Oxalate decarboxylase is involved in turnover of 2-phosphoglycolate in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Photosynthesis: Energy from the sun*, eds Allen JF, Gantt JH, Osmond B (Springer, Netherlands)
- Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A. und Hagemann, M.** (2008) The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiotically to plants. *PNAS*, **105**: 17199-17204
- Engel N., van den Daele K., Kolukisaoglu Ü., Morgenthal K., Weckwerth W., Pärnik T., Keerberg O., und Bauwe H.** (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under non-photorespiratory conditions, *Plant Physiology*, **144**:1328-1335
- 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
- Fulda, M., Schnurr, J., Abbadi, A., Heinz, E. und Browse, J.** (2004) Peroxisomal acyl-CoA synthase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*, *Plant cell*, **16**: 394:405

- Givan, C. V. und Kleczkowski, L. A.** (1992) The Enzymic Reduction of Glyoxylate and Hydroxypyruvate in Leaves of Higher Plants. *Plant Physiology*, **100**: 552-556
- Greenler, J. McC., Sloan, J. S., Schwartz; A. W. und Becker, W. M.** (1989) Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding NADH-dependent hydroxypyruvate reductase from cucumber. *Plant Molecular Biology*, **13**: 130-150
- Halliwell, B. und Butt, V. S.** (1974) Oxidative decarboxylation of glycolate and glyoxylate by leaf peroxisomes. *Biochem. J.*, **138**: 217-224
- Hanson, R. S. und Hanson, T.E.** (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.*, **60**: 439-471
- Hayashi, M., Tsugeki, R., Kondo, M., Mori, H. Und Nishimura, M.** (1996) Pumpkin hydroxypyruvate reductase with and without a putative C-terminal signal for targeting to microbodies may be produced by alternative splicing. *Plant Molecular Biology*, **30**: 183-189
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., und Nishimura, M.** (1998) 2,4-dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid  $\beta$ -oxidation, *Plant cell*, **10**: 183-195
- Heupel R., Markgraf T., Robinson D.G. and Heldt H.W.** (1991) Compartmentation studies on spinach leaf peroxisomes: Evidence for channeling of photorespiratory metabolites in peroxisomes devoid of intact boundary membrane. *Plant Physiol.* **96**, 971-979.
- Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C.** (2003) Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*, *Plant Journal*, **33**:975-987
- Jamai, A., Salomé, P. A., Schilling, S. H., Weber, A. P. M. und McClung, C. R.** (2009) *Arabidopsis* Photorespiratory Serine Hydroxymethyltransferase Activity Requires the Mitochondrial Accumulation of Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase. *The Plant Cell*, **21**: 595-606
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H. J., Rosenkranz, R., Stähler, N., Schönfeld, B., Kreuzaler, F. und Peterhänsel, C.** (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, **25**: 593-599
- Kim, K. H., Janiak, V. und Petersen, M.** (2004) Purification, cloning und functional expression of hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei*. *Plant. Mol. Biol.*, **54**: 311-323

- Kleczkowski, L. A., Randall, D. R. und Blevins, D. G.** (1986) Purification and characterization of a novel NADPH (NADH)-dependent glyoxylate reductase from spinach leaves. Comparison of immunological properties of leaf glyoxylate reductase and hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology*, **94**: 819-825
- Kleczkowski L A, Edwards G E, Blackwell R D, Lea P J, Givan C V.** (1990) Enzymology of the Reduction of Hydroxypyruvate and Glyoxylate in a Mutant of Barley Lacking Peroxisomal Hydroxypyruvate Reductase, *Plant Physiology*, 94:819-825
- Kleczkowski, L. A., und Randall D. D.** (1988) Purification and characterization of a novel NADPH (NADH)-dependent hydroxypyruvate reductase from spinach leaves. *Biochem. J.* **250**:145-152
- Kleczkowski, L. A., Givan, C. V., Hodgson, J. M. und Randall, D. D.** (1988) Subcellular localisation of NADPH-dependent hydroxypyruvate reductase activity in leaf protoplasts of *Pisum sativum* L. and its role in photorespiratory metabolism. *Plant Physiology*. **250**: 145-152
- Kleczkowski, L. A., Randall, D. D. und Edwards, G. E.** (1991) Oxalate as a potent and selective inhibitor of spinach (*Spinacia oleracea*) leaf NADPH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Biochem. J.*, **276**: 125-127
- Kohn, L. D. und Jakoby, W. B.** (1968) Tartaric Acid Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, **10**: 2494-2499
- Keys, A. J.** (2006) The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C3 higher plants. *Photosynthesis Research*, **87**: 165-175
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680-685.
- Leegood, R.C., Lea, P.J., Adcock, M.D. und Häusler, R.E.** (1995) The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany*, **46**: 1397-1414
- Leumann, E. und Hoppe, B.** (2001) The Primary Hyperoxalurias. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **12**: 1986-1993
- Liepman, A. H. und Olsen, L. J.** (2001) Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, **25**:487-498
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. und Fernie, A. R.** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protocols*, **1**: 387-396
- Lottspeich, F. und Zorbach, H.** (1998) Bioanalytik, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg-Berlin

- Lutziger, I. und Oliver, D. J.** (2001) Characterization of two cDNAs encoding mitochondrial lipoamide dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127: 615-623
- Mano, S., Hyashi, M., Kondo, M. und Nishimura, M.** (1997) Hydroxypyruvate Reductase with a Carboxy-Terminal Signal to Microbodies is Expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 38: 449-455
- Mano, S., Hyashi, M. und Nishimura, M.** (1999) Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *The Plant Journal*, 17: 309-320
- Mano, S., Hyashi, M. und Nishimura, M.** (2000) A Leaf-Peroxisomal Protein, Hydroxypyruvate Reductase, Is Produced by Light-Regulated Alternative Splicing. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 32: 147-154
- Moreno, J. I., Martin, R. und Castresana, C.** (2005) *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic und abiotic stress. *The Plant Journal*, 41: 451-463
- Murray, A. J. S., Blackwell, R. D., Lea, P. J.** (1989) Metabolism of Hydroxypyruvate in an Mutant of Barley Lacking NADH-Dependent Hydroxypyruvate Reductase, an Important Photorespiratory Enzyme Activity, *Plant Physiology*, 91: 395-400
- Murray, M. G. und Thompson, W. F.** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4321-4325
- Niessen, M., Thiruveedhi, K., Rosenkranz, R., Kebeish, R., Hirsch, H. J., Kreuzaler, F. und Peterhänsel, C.** (2007) Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 10: 2009-2715
- Noctor, G., Arisi, A.-C. M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Rennenberg, H. und Foyer, C. H.** (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 49: 623-647
- Noctor, G., Arisi, A.-C. M., Jouanin, L. Und Foyer, C. H.** (1999) Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1157-1167
- Okinaka, Y., Yang, C. H., Herman, E., Kinney, A. und Keen, N. T.** (2002) The P34 Syringolide Elicitor Receptor Interacts with a Soybean Photorespiration Enzyme, NADH-Dependent Hydroxypyruvate Reductase, *MPMI*, 15: 1213-1218
- Pinfield-Wells, H., Rylott, E. L., Gilday, A. D., Graham, S., Job, K., Larson, T. R. und Graham, I. A.** (2005) Sucrose rescues seedling establishment but not germination of *Arabidopsis* mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism. *Plant Journal*, 43: 861-72

- Potel, F., Valadier, M. H., Ferrario-Mery, S., Grandjean, O., Morin, H., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Lothier, J., Rothstein, S. J., Hirose, N. und Suzuki, A.** (2009) Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana* – roles of glutamate synthases and carbamylphosphate synthase in leaves, *FEBS Journal*, **15**: 4061-76
- Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E. und Smith, S. M.** (2007) *Arabidopsis* peroxisomal malate dehydrogenase functions in  $\beta$ -oxidation but not in the glyoxylate cycle. *The Plant Journal*, **50**: 381-390
- Rachmilevitch, S., Cousins, A. B. und Bloom, A. J.** (2004) Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration, *PNAS*, **101**; 11506-11510
- Raman, R. und Oliver, D. J.** (1997) Light-dependent control of photorespiratory gene expression. *Handbook of photosynthesis* (ed. M. Pessarakli), 381-389
- Reumann, S., Maier, E., Benz, R. und Heldt, H. W.** (1995) The Membrane of Leaf Peroxisomes Contains a Porin-like Channel, *The Journal Of Biological Chemistry*, **270**: 17559-17565
- Reumann, S.** (2000) The Structural Properties of Plant Peroxisomes and Their Metabolic Significance, *Biological Chemistry*, **381**: 639-648
- Reumann, S.** (2004) Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses, *Plant Physiology*, **135**: 783-800
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S. und Babujee, L.** (2004) AraPeroX. A database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes, *Plant Physiology*, **136**: 2587-608
- Reumann, S., und Weber, A.P.** (2006) Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C2-cycle have become filled-others remain. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1496-1510
- Richardson, K. E. und Tolbert, N. E.** (1961) Oxidation of Glyoxylic Acid to Oxalic Acid by Glycolic Acid Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **236**: 1280-1284
- Richter, G.** (1998). Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York*, **6. Aufl.**, ISBN 3-13-442006-6.
- Roessner-Tunali, U., Liu, J. L., Leisse, A., Balbo, I., Perez-Melis, A., Willmitzer, L. und Fernie, A. R.** (2004) Kinetics of labeling of organic and amino acids in potato tubers by gas chromatography-mass spectrometry following incubation in C-13 labeled isotopes. *Plant Journal*, **39**: 668-679

- Porra, R. J.** (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b, *Photosynth. Res.*, **73**: 149-156
- Rotein, D., Rhodes, D., und Hanson, A. D.** (2003) Evidence from engineering that decarboxylation of free serine is the major source of ethanolamine moieties in plants, *Plant Cell Physiology*, **44**: 1185-1191
- Schmidt R.** (1998) Physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome, *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**: 1-8
- Schreiber, U., Schliwa, U. und Bilger, W.** (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with an new type of modulation fluorometer, *Photosynth. Res.*, **10**: 51-62
- Schwarte S, Bauwe H.** (2007) Identification of the photorespiratory 2-phosphoglycolate phosphatase, PGLP1, in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, **144**:1580-86
- Shindo, C., Backhausen, J. E., Emmerlich, V. und Holtgreffe, S.** (2005) Natural genetic variation in *Arabidopsis*: Tools, traits and prospects for evolutionary ecology. *Ann. Bot.* (Lond.) **99**: 1043-1054
- Siedow, J. N., und Day, D.A.** (2001) Respiration and photorespiration. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), pp. 676-728
- Sienkiewicz-Porducek, A., Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Lisec, J., Centeno, D. C., Carillo, P., Leisse, A., Urbanczyk-Wochniak, E. und Fernie, A. R.** (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate sythase activity results in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth, *Plant Physiol.* **147**: 115-127
- Somerville, C.R. and Ogren W.L.** (1983) An *Arabidopsis thaliana* mutant defective in chloroplast dicarboxylate transport, *PNAS*, **80**(5):1290-1294
- Somerville C. R.** (2001) An Early *Arabidopsis* Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration, *Plant Physiol.*, **125**: 20-24.
- Spitschak, A.** (2007) Isolation und Charakterisierung homozygoter *gox*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, Diplomarbeit, Pflanzenphysiologie Universität Rostock
- Srinivasan R, und Oliver, D. J.** (1992) H-protein of the glycine decarboxylase multienzyme complex – complementary DNA encoding the protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **98**: 1518-1519

- Stafford, H. A., Magaldi, A. Und Vennesland, B.** (1954) The enzymatic reduction of hydroxypyruvic acid to D-glyceric acid in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **207**: 621-629
- Sundaresan, L. J., Springer, P., Vople, T., Haward, S., Jones, J- D., Dean, C., Ma, H., und Martinssen, R.** (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* **9**: 1797-1810
- Takahashi, S., Bauwe, H. und Badger, M.** (2007) Impairment of the Photorespiratory Pathway Accelerates Photoinhibition of Photosystem II by Suppression of Repair But Not of Damage Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **144**: 487-494
- Timm, S.** (2006) Charakterisierung des Hydroxypyruvat-reduzierenden Systems in *Arabidopsis thaliana*, Diplomarbeit, Pflanzenphysiologie Universität Rostock
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. J.G.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, **76**: 4350-4354
- Tolbert, N. E., Yamazaki, R. K. und Oeser, A.** (1970) Localisation and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles. *J. Biol. Chem.*, **245**: 5129-5136
- Voll, L.M., Allaire, E.E., Fiene, G., Weber, A.P.** (2006) The photorespiratory *Arabidopsis* shm1 mutant is deficient in SHM1, *Plant Physiology*, 140(1):59-66
- Vorholt, J. A.** (2002) Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.*, **178**: 239-249
- Wienkoop, S., Glinski, M., Tanaka, N., Tolstikov, V., Fiehn, O. und Weckwerth, W.** (2004a) Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks, *Proteomics*, **4**: 78-83
- Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., und Leegood, R.C.** (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **355**: 1517-1529
- 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 Exp Bot.*, **60(6)**:1799.809
- Xue, H. H., Sakaquchi, T., Fujie, M., Ogawa, H. und Ichiyama, A.** (1999) Flux of the L-serine metabolism in rabbit, human, and dog livers. Substantial contributions of both mitochondrial and peroxisomal serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase. *J. Biol. Chem.*, **274**: 16028-33

**Yu, C. und Huang, A. H.** (1986) Conversion of serine to glycerate in intact spinach leaf peroxisomes: Role of malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**: 125-133

**Zelitch, I.** (1955) The isolation and action of crystalline glyoxylic acid reductase from tobacco leaves. *J. Biol. Chem.*, **216**: 553-575

**Zelitch, I. und Gotto, A. M.** (1962) Properties of a new glyoxylate reductase from leaves. *Biochem. J.*, **84**: 541-546

**Zelitch, I.** (1972) The Photooxidation of Glyoxylate by Envelope-Free Spinach Chloroplasts and Its Relation to Photorespiration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 150: 698-707

**Zelitch, I., Schultes, N. P., Peterson, R. B., Brown, P. und Burtnell TP.** (2009) High glycolate oxidase is required for survival of maize in normal air, *Plant Physiology*, 149(1):195-204

## 7. Anhang

### 7.1 Gesamtübersicht der Gaswechsellmessungen

Tabelle 7-1 Gesamtübersicht der sauerstoffabhängigen Gaswechsellmessungen.

a.) Zusammenfassung der Messungen bei 10 % Sauerstoff

<i>PFD</i> in $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ :	net CO <sub>2</sub> uptake in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (n)		$\Gamma_{21}$ in $\mu\text{l l}^{-1}$ (n)	
	250	500	250	500
<b>Wild type col.0</b>	8.06 ± 0.91 (5)	8.23 ± 0.45 (5)	19.23 ± 4.33 (5)	28.44 ± 1.82 (5)
<i>hpr1-1</i>	4.48 ± 0.23 (5)	4.98 ± 0.56 (5)	61.45 ± 3.82 (5)	64.71 ± 10.87 (5)
<i>hpr2-1</i>	6.43 ± 0.71 (5)	5.43 ± 1.42 (5)	45.91 ± 4.68 (5)	44.14 ± 16.70 (5)
<i>hpr3-1</i>	6.57 ± 0.72 (5)	7.20 ± 0.72 (5)	31.26 ± 6.76 (5)	33.93 ± 7.27 (5)
<i>hpr1xhpr2</i>	3.52 ± 0.23 (5)	3.67 ± 0.26 (5)	86.26 ± 10.19 (5)	78.31 ± 7.98 (5)
<i>hpr1xhpr3</i>	4.77 ± 0.46 (5)	7.35 ± 0.74 (5)	62.90 ± 11.90 (5)	45.67 ± 6.44 (5)
<i>hpr2xhpr3</i>	9.85 ± 0.69 (5)	11.26 ± 0.38 (5)	16.50 ± 5.83 (5)	19.05 ± 3.62 (5)
<i>hpr1xhpr2xhpr3</i>	3.26 ± 0.48 (5)	3.68 ± 0.68 (5)	97.85 ± 11.23 (5)	86.14 ± 9.57 (5)

b.) Zusammenfassung der Messungen bei 21 % Sauerstoff (Normalluft)

<i>PFD</i> in $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ :	net CO <sub>2</sub> uptake in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (n)		$\Gamma_{21}$ in $\mu\text{l l}^{-1}$ (n)	
	250	500	250	500
<b>Wild type col.0</b>	6.57 ± 0.49 (5)	6.97 ± 0.46 (5)	50.96 ± 2.42 (5)	62.19 ± 3.94 (5)
<i>hpr1-1</i>	3.46 ± 0.49 (5)	3.35 ± 0.34 (5)	120.53 ± 9.38 (5)	112.09 ± 6.79 (5)
<i>hpr2-1</i>	4.68 ± 0.60 (5)	6.30 ± 1.36 (5)	69.91 ± 6.78 (5)	62.57 ± 8.90 (5)
<i>hpr3-1</i>	5.97 ± 0.57 (5)	5.91 ± 0.49 (5)	54.76 ± 2.05 (5)	58.57 ± 1.70 (5)
<i>hpr1xhpr2</i>	2.55 ± 0.36 (5)	2.91 ± 0.42 (5)	135.22 ± 5.61 (5)	127.60 ± 18.98 (5)
<i>hpr1xhpr3</i>	3.66 ± 0.30 (5)	4.55 ± 0.54 (5)	104.30 ± 3.13 (5)	98.16 ± 4.79 (5)
<i>hpr2xhpr3</i>	8.15 ± 0.26 (5)	9.15 ± 0.68 (5)	46.16 ± 2.29 (5)	50.84 ± 3.48 (5)
<i>hpr1xhpr2xhpr3</i>	1.56 ± 0.07 (5)	2.00 ± 0.52 (5)	174.65 ± 11.25 (5)	153.71 ± 19.77 (5)

## c.) Zusammenfassung der Messungen bei 30 % Sauerstoff

<i>PFD</i> in $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ :	net CO <sub>2</sub> uptake in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (n)		$\Gamma_{21}$ in $\mu\text{l l}^{-1}$ (n)	
	250	500	250	500
<b>Wild type col.0</b>	3.95 ± 0.59 (5)	4.82 ± 0.57 (5)	91.31 ± 11.09 (5)	90.57 ± 3.73 (5)
<i>hpr1-1</i>	1.78 ± 0.30 (5)	2.07 ± 0.43 (5)	163.14 ± 9.38 (5)	113.53 ± 9.79 (5)
<i>hpr2-1</i>	2.84 ± 0.65 (5)	3.47 ± 0.89 (5)	113.53 ± 9.79 (5)	104.82 ± 10.44 (5)
<i>hpr3-1</i>	4.82 ± 1.00 (5)	4.89 ± 0.33 (5)	98.30 ± 11.35 (5)	85.80 ± 4.79 (5)
<i>hpr1xhpr2</i>	1.94 ± 0.28 (5)	1.91 ± 0.30 (5)	186.03 ± 7.16 (5)	181.84 ± 4.09 (5)
<i>hpr1xhpr3</i>	1.89 ± 0.03 (5)	2.17 ± 0.22 (5)	159.05 ± 4.93 (5)	153.93 ± 9.81 (5)
<i>hpr2xhpr3</i>	4.35 ± 0.60 (5)	5.36 ± 0.83 (5)	91.63 ± 8.27 (5)	87.96 ± 11.59 (5)
<i>hpr1xhpr2xhpr3</i>	1.20 ± 0.18 (5)	1.48 ± 0.21 (5)	207.50 ± 10.58 (5)	192.28 ± 18.79 (5)

## d.) Zusammenfassung der Messungen bei 40 % Sauerstoff

<i>PFD</i> in $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ :	net CO <sub>2</sub> uptake in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (n)		$\Gamma_{21}$ in $\mu\text{l l}^{-1}$ (n)	
	250	500	250	500
<b>Wild type col.0</b>	3.24 ± 0.77 (5)	4.13 ± 0.57 (5)	131.71 ± 18.36 (5)	119.50 ± 8.54 (5)
<i>hpr1-1</i>	1.16 ± 0.09 (5)	1.30 ± 0.18 (5)	214.68 ± 9.30 (5)	212.44 ± 12.61 (5)
<i>hpr2-1</i>	2.50 ± 0.38 (5)	2.64 ± 0.38 (5)	138.26 ± 9.29 (5)	129.72 ± 12.25 (5)
<i>hpr3-1</i>	3.68 ± 0.62 (5)	4.31 ± 0.40 (5)	129.79 ± 6.14(5)	109.92 ± 4.61 (5)
<i>hpr1xhpr2</i>	0.98 ± 0.28 (5)	1.15 ± 0.26 (5)	232.97 ± 2.41 (5)	230.28 ± 16.02 (5)
<i>hpr1xhpr3</i>	1.83 ± 0.08 (5)	1.86 ± 0.32 (5)	187.54 ± 15.75 (5)	188.67 ± 2.76 (5)
<i>hpr2xhpr3</i>	3.66 ± 0.49 (5)	4.56 ± 0.48 (5)	133.09 ± 15.37 (5)	117.67 ± 11.08 (5)
<i>hpr1xhpr2xhpr3</i>	0.66 ± 0.18 (5)	1.10 ± 0.24 (5)	255.36 ± 15.96 (5)	226.05 ± 13.88 (5)

## 7.2 Gesamtübersicht der HPLC-Analysen

Dargestellt sind die absoluten Konzentrationen der Aminosäuren in den HPR-Mutanten. Die Analysen wurden mit Pflanzen durchgeführt, die unter photorespiratorischen (ambient air) und unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (0,15 % CO<sub>2</sub>) angezogen wurden.

Tabelle 7-2 Gesamtübersicht der Aminosäureanalysen.

a.) Analyse der Pflanzen unter Normalluftbedingungen

	Leaf amino acid content in $\mu\text{mol/gFW}$							
amino acid	ambient air							
	<i>col.0</i>	<i>hpr1-1</i>	<i>hpr2-1</i>	<i>hpr3-1</i>	<i>hpr1xhpr2</i>	<i>hpr1xhpr3</i>	<i>hpr2xhpr3</i>	<i>h1xh2xh2</i>
Aspartat	1.62±0.39	0.68±0.23	1.91±0.57	1.31±0.12	0.58±0.23	0.62±0.14	1.16±0.30	0.43±0.07
Glutamat	3.17±0.87	2.53±0.28	3.17±0.84	3.10±0.32	2.17±0.74	3.01±0.89	2.88±0.81	3.01±0.46
Asparagin	0.21±0.06	0.33±0.41	0.42±0.17	0.18±0.02	0.15±0.07	0.44±0.14	0.26±0.06	0.53±0.14
Serin	4.82±1.33	17.11±2.58	6.07±3.00	1.99±0.65	19.46±2.72	21.83±1.92	3.60±0.94	26.31±2.41
Glutamin	3.70±1.36	5.20±1.32	3.86±1.14	4.02±0.61	3.29±1.57	5.67±0.59	2.14±0.77	7.72±1.32
Glycin	0.86±0.20	6.15±1.07	1.11±0.06	0.39±0.08	3.83±1.57	5.35±0.61	1.06±0.75	4.25±0.64
Threonin	1.07±0.21	3.90±1.25	1.51±0.58	1.02±0.15	5.00±2.24	5.14±0.52	1.11±0.29	9.57±0.93
Histidin	0.18±0.07	0.43±0.14	0.21±0.16	0.06±0.01	0.31±0.10	0.15±0.05	0.15±0.09	0.43±0.17
Alanin	1.54±0.22	0.68±0.24	1.72±0.63	1.37±0.30	0.74±0.31	0.76±0.08	1.17±0.40	0.40±0.16
Arginin	0.07±0.02	0.15±0.07	0.07±0.027	0.06±0.02	0.03±0.009	0.02±0.009	0.06±0.02	0.19±0.06
Thyrosin	0.04±0.03	0.10±0.07	0.08±0.071	0.03±0.01	0.027±0.02	0.05±0.015	0.09±0.04	0.07±0.03
Valin	1.01±0.34	0.17±0.10	0.24±0.14	0.07±0.02	1.02±0.41	2.16±0.73	0.78±0.23	0.14±0.11
Methionin	0.01±0.002	0.02±0.004	0.02±0.01	0.01±0.002	0.01±0.003	0.02±0.01	0.02±0.005	0.02±0.006
Tryptophan	0.03±0.001	0.017±0.01	0.02±0.015	0.03±0.01	0.048±0.02	0.04±0.01	0.06±0.05	0.11±0.06
Phenylalanin	0.07±0.01	0.10±0.05	0.09±0.08	0.07±0.01	0.16±0.05	0.01±0.002	0.01±0.007	0.14±0.08
Isoleucin	0.08±0.02	0.13±0.057	0.10±0.08	0.07±0.01	0.11±0.04	0.12±0.017	0.09±0.04	0.22±0.08
Leucin	0.11±0.06	0.12±0.095	0.14±0.10	0.09±0.04	0.12±0.06	0.10±0.03	0.18±0.10	0.20±0.13
Lysin	0.32±0.22	0.95±0.28	0.61±0.12	0.47±0.12	0.00±0.00	1.40±0.40	0.51±0.19	0.28±0.25

b.) Analyse der Pflanzen unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen (0,15 % CO<sub>2</sub>)

	Leaf amino acid content in $\mu\text{mol/gFW}$							
amino acid	0,15 % CO <sub>2</sub>							
	<i>col.0</i>	<i>hpr1-1</i>	<i>hpr2-1</i>	<i>hpr3-1</i>	<i>hpr1xhpr2</i>	<i>hpr1xhpr3</i>	<i>hpr2xhpr3</i>	<i>h1xh2xh3</i>
Aspartat	1.76±0.44	1.84±0.25	2.01±0.46	1.59±0.06	1.49±0.33	1.42±0.30	1.81±0.53	1.31±0.09
Glutamat	3.28±0.76	3.27±0.49	3.54±0.89	3.82±0.21	2.94±0.39	2.60±0.51	3.38±0.68	3.06±0.37
Asparagin	0.48±0.06	0.37±0.08	0.61±0.21	0.38±0.07	0.39±0.13	0.35±0.10	0.45±0.08	0.24±0.04
Serin	3.75±0.70	3.79±0.93	3.99±1.83	0.61±0.06	10.69±0.94	3.24±1.02	3.83±0.19	7.21±0.60
Glutamin	5.63±0.68	4.35±0.94	5.53±1.66	3.89±0.37	4.66±0.94	3.62±1.01	4.64±1.21	3.53±0.46
Glycin	0.70±0.41	1.02±0.43	0.87±0.46	0.40±0.12	0.82±0.41	0.71±0.35	0.60±0.36	0.46±0.09
Threonin	1.12±0.14	1.00±0.43	0.96±0.21	0.77±0.03	1.69±0.43	0.97±0.22	0.95±0.22	2.02±0.30
Histidin	0.23±0.08	0.16±0.06	0.22±0.11	0.09±0.02	0.30±0.15	0.14±0.06	0.12±0.06	0.05±0.03
Alanin	2.37±0.41	1.61±0.39	2.09±0.44	1.79±0.21	0.90±0.65	1.56±0.31	2.22±0.15	0.65±0.31
Arginin	0.10±0.03	0.07±0.01	0.08±0.02	0.08±0.01	0.02±0.02	0.05±0.02	0.07±0.01	0.08±0.02
Thyrosin	0.07±0.04	0.06±0.04	0.08±0.046	0.03±0.004	0.019±0.02	0.06±0.02	0.07±0.027	0.07±0.02
Valin	0.92±0.13	0.45±0.43	0.25±0.08	0.05±0.01	0.21±0.35	0.62±0.15	1.00±0.22	0.07±0.02
Methionin	0.02±0.01	0.02±0.007	0.02±0.005	0.007±0.003	0.01±0.01	0.013±0.003	0.023±0.01	0.02±0.01
Tryptophan	0.04±0.01	0.016±0.007	0.02±0.006	0.008±0.002	0.015±0.017	0.034±0.018	0.03±0.01	0.02±0.01
Phenylalanin	0.098±0.04	0.10±0.037	0.09±0.03	0.07±0.01	0.03±0.04	0.08±0.02	0.015±0.003	0.08±0.02
Isoleucin	0.10±0.04	0.05±0.03	0.09±0.04	0.07±0.01	0.02±0.035	0.08±0.037	0.09±0.02	0.08±0.03
Leucin	0.20±0.01	0.08±0.036	0.12±0.05	0.08±0.01	0.04±0.06	0.13±0.06	0.15±0.04	0.11±0.05
Lysin	0.24±0.12	0.00±0.00	0.67±0.10	0.31±0.10	1.65±0.48	0.43±0.08	0.67±0.13	0.25±0.08

### 7.3 Erweiterte Übersicht der Metabolomanalysen

Erweiterte Übersicht der Metabolomanalysen an den HPR-Mutanten. Dargestellt sind die relativen Änderungen der Metabolite, im Vergleich zum Wildtyp. Die Analysen wurden unter photorespiratorischen (ambient air) und unter nicht photorespiratorischen Bedingungen (1 % CO<sub>2</sub>) durchgeführt. Die grau unterlegten Metabolite wurden in der Abbildung 4-17 verwendet.

Tabelle 7-3 Erweiterte Übersicht über die Metabolomanalysen.

<i>Leaf Metabolite Content Relative To the Wild-Type Plants</i>								
<i>Metabolite</i>	<i>Ambient Air</i>				<i>1% CO<sub>2</sub></i>			
	<i>Col-0</i>	<i>hpr1-1</i>	<i>hpr2-1</i>	<i>hpr1 hpr2</i>	<i>Col-0</i>	<i>hpr1-1</i>	<i>hpr2-1</i>	<i>hpr1 hpr2</i>
Aconitate	1.00 ± 0.20	1.64 ± 0.24	1.46 ± 0.14	2.24 ± 0.15	1.00 ± 0.46	0.34 ± 0.07	1.05 ± 0.21	0.42 ± 0.11
Alanine	1.00 ± 0.11	0.49 ± 0.05	0.78 ± 0.26	0.64 ± 0.10	1.00 ± 0.09	0.57 ± 0.08	0.80 ± 0.08	0.39 ± 0.02
Arginine	1.00 ± 0.23	5.55 ± 0.86	1.34 ± 0.32	16.30 ± 8.05	1.00 ± 0.39	1.46 ± 0.68	0.45 ± 0.18	1.26 ± 0.52
Asparagine	1.00 ± 0.18	2.96 ± 0.54	0.93 ± 0.04	14.07 ± 7.47	1.00 ± 0.28	0.77 ± 0.13	0.69 ± 0.08	0.56 ± 0.12
Aspartate	1.00 ± 0.23	1.82 ± 0.29	2.23 ± 0.64	2.34 ± 0.35	1.00 ± 0.18	0.80 ± 0.10	0.54 ± 0.11	0.92 ± 0.18
Citramalic acid	1.00 ± 0.23	1.35 ± 0.25	1.68 ± 0.65	2.48 ± 0.33	1.00 ± 0.16	0.74 ± 0.16	0.85 ± 0.15	0.88 ± 0.09
Citrate	1.00 ± 0.22	0.63 ± 0.15	0.87 ± 0.10	1.48 ± 0.15	1.00 ± 0.17	0.84 ± 0.32	0.74 ± 0.18	1.38 ± 0.78
Cysteine	1.00 ± 0.11	0.58 ± 0.07	1.30 ± 0.16	0.81 ± 0.12	1.00 ± 0.21	1.05 ± 0.15	0.87 ± 0.10	0.90 ± 0.22
Ethanolamine	1.00 ± 0.08	1.66 ± 0.17	1.11 ± 0.11	3.01 ± 0.72	1.00 ± 0.10	1.92 ± 0.17	0.78 ± 0.08	1.65 ± 0.33
Fructose	1.00 ± 0.11	0.48 ± 0.03	0.85 ± 0.16	0.51 ± 0.04	1.00 ± 0.15	4.89 ± 4.22	1.06 ± 0.25	0.84 ± 0.09
Fumarate	1.00 ± 0.21	0.98 ± 0.16	1.16 ± 0.13	1.19 ± 0.12	1.00 ± 0.11	0.79 ± 0.17	0.76 ± 0.21	0.34 ± 0.11
Galactose	1.00 ± 0.30	3.14 ± 1.62	9.97 ± 5.27	3.91 ± 2.67	1.00 ± 0.57	0.53 ± 0.32	0.14 ± 0.07	1.51 ± 0.83
GABA	1.00 ± 0.26	1.17 ± 0.15	1.13 ± 0.30	3.15 ± 1.11	1.00 ± 0.19	1.26 ± 0.48	1.22 ± 0.11	1.10 ± 0.22
Glucose	1.00 ± 0.39	0.25 ± 0.06	0.92 ± 0.18	0.18 ± 0.07	1.00 ± 0.45	1.70 ± 1.33	0.28 ± 0.11	2.49 ± 0.85
Gluconic acid	1.00 ± 0.14	0.78 ± 0.08	1.05 ± 0.07	0.83 ± 0.12	1.00 ± 0.12	0.99 ± 0.09	0.86 ± 0.06	0.95 ± 0.13
Glutamine	1.00 ± 0.24	2.17 ± 0.60	2.07 ± 0.41	10.67 ± 4.90	1.00 ± 0.34	1.03 ± 0.34	0.97 ± 0.19	0.53 ± 0.24
Glycerate	1.00 ± 0.14	2.77 ± 0.34	0.88 ± 0.14	3.30 ± 0.65	1.00 ± 0.13	0.69 ± 0.11	0.51 ± 0.06	0.79 ± 0.15
Glycerate-3-P	1.00 ± 0.18	1.51 ± 0.20	1.21 ± 0.11	2.01 ± 0.50	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.13	0.82 ± 0.18	1.04 ± 0.16
Glycerol	1.00 ± 0.22	0.89 ± 0.08	0.94 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.11	0.79 ± 0.05	1.01 ± 0.12	0.74 ± 0.09
Glycine	1.00 ± 0.38	6.93 ± 1.29	0.97 ± 0.37	4.31 ± 0.93	1.00 ± 0.12	1.35 ± 0.81	0.32 ± 0.06	1.02 ± 0.26
Glycolate	1.00 ± 0.12	3.25 ± 0.39	1.23 ± 0.18	3.59 ± 0.42	1.00 ± 0.14	0.92 ± 0.10	1.34 ± 0.43	1.44 ± 0.17
Homocysteine	1.00 ± 0.09	0.64 ± 0.06	1.54 ± 0.33	0.88 ± 0.29	1.00 ± 0.19	1.09 ± 0.12	0.81 ± 0.20	0.96 ± 0.13
Homoserine	1.00 ± 0.43	0.80 ± 0.17	0.14 ± 0.03	0.76 ± 0.19	1.00 ± 0.18	0.88 ± 0.14	0.45 ± 0.05	0.96 ± 0.18
Hydroxylamine	1.00 ± 0.12	1.17 ± 0.06	0.84 ± 0.04	1.14 ± 0.07	1.00 ± 0.10	0.98 ± 0.12	0.88 ± 0.09	0.81 ± 0.07
Hydroxybenzoic acid	1.00 ± 0.19	1.22 ± 0.12	1.69 ± 0.16	1.72 ± 0.14	1.00 ± 0.11	0.83 ± 0.10	0.85 ± 0.11	0.93 ± 0.32

	<i>Col-0</i>	<i>hpr1-1</i>	<i>hpr2-1</i>	<i>hpr1 hpr2</i>	<i>Col-0</i>	<i>hpr1-1</i>	<i>hpr2-1</i>	<i>hpr1 hpr2</i>
Hydroxypyruvate	1.00 ± 0.19	5.72 ± 1.02	1.48 ± 0.23	9.15 ± 2.85	1.00 ± 0.35	1.15 ± 0.24	0.51 ± 0.09	0.88 ± 0.27
Isoleucine	1.00 ± 0.31	1.60 ± 0.12	1.50 ± 0.72	2.64 ± 0.51	1.00 ± 0.20	1.21 ± 0.35	1.60 ± 0.30	1.21 ± 0.23
α-Ketoglutarate	1.00 ± 0.14	6.13 ± 0.58	1.65 ± 0.54	9.93 ± 1.98	1.00 ± 0.12	0.89 ± 0.08	0.49 ± 0.15	1.85 ± 0.87
L-Ascorbate	1.00 ± 0.18	0.61 ± 0.15	0.94 ± 0.11	0.15 ± 0.05	1.00 ± 0.41	1.15 ± 0.37	0.42 ± 0.21	1.26 ± 0.32
Leucine	1.00 ± 0.37	1.52 ± 0.17	1.60 ± 0.78	3.14 ± 0.43	1.00 ± 0.14	1.12 ± 0.40	1.54 ± 0.31	1.25 ± 0.22
Malate	1.00 ± 0.15	1.36 ± 0.18	1.27 ± 0.41	1.81 ± 0.15	1.00 ± 0.11	1.15 ± 0.02	0.78 ± 0.15	1.25 ± 0.15
Maltose	1.00 ± 0.08	0.02 ± 0.04	1.19 ± 0.30	1.24 ± 0.09	1.00 ± 0.19	0.83 ± 0.16	1.08 ± 0.12	0.84 ± 0.13
Methionine	1.00 ± 0.35	3.80 ± 0.77	1.34 ± 0.30	3.56 ± 1.18	1.00 ± 0.17	1.12 ± 0.25	0.60 ± 0.13	1.23 ± 0.12
Inositol	1.00 ± 0.21	0.20 ± 0.02	1.04 ± 0.08	0.21 ± 0.03	1.00 ± 0.22	0.94 ± 0.13	0.66 ± 0.09	1.01 ± 0.16
Phenylalanine	1.00 ± 0.28	0.28 ± 0.26	1.55 ± 0.75	2.71 ± 0.47	1.00 ± 0.13	1.16 ± 0.19	1.05 ± 0.10	1.01 ± 0.09
Phosphoric acid	1.00 ± 0.12	1.12 ± 0.08	1.28 ± 0.10	1.38 ± 0.05	1.00 ± 0.09	0.94 ± 0.06	0.99 ± 0.10	0.97 ± 0.06
Pyroglutamate	1.00 ± 0.14	1.03 ± 0.09	1.18 ± 0.04	1.32 ± 0.16	1.00 ± 0.16	0.97 ± 0.12	0.12 ± 0.12	0.99 ± 0.10
Serine	1.00 ± 0.19	2.70 ± 0.18	1.28 ± 0.52	3.87 ± 0.20	1.00 ± 0.04	2.13 ± 0.20	0.94 ± 0.10	2.15 ± 0.21
Shikimate	1.00 ± 0.22	1.30 ± 0.16	1.12 ± 0.08	1.75 ± 0.39	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.13	0.83 ± 0.18	1.03 ± 0.14
Succinate	1.00 ± 0.11	1.99 ± 0.11	1.55 ± 0.28	2.12 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.02 ± 0.06	0.74 ± 0.09	1.20 ± 0.15
Sucrose	1.00 ± 0.07	0.56 ± 0.07	0.92 ± 0.20	0.37 ± 0.05	1.00 ± 0.08	0.65 ± 0.08	0.76 ± 0.05	0.84 ± 0.06
Proline	1.00 ± 0.16	1.05 ± 0.10	1.35 ± 0.08	1.55 ± 0.29	1.00 ± 0.21	1.03 ± 0.21	0.77 ± 0.12	0.97 ± 0.14
Threonic acid	1.00 ± 0.13	0.57 ± 0.07	1.24 ± 0.17	0.78 ± 0.13	1.00 ± 0.25	1.05 ± 0.17	0.82 ± 0.10	0.88 ± 0.25
Threonine	1.00 ± 0.20	3.76 ± 0.31	1.83 ± 1.00	7.51 ± 2.60	1.00 ± 0.11	1.30 ± 0.21	0.90 ± 0.10	1.14 ± 0.20
Trehalose	1.00 ± 0.26	0.93 ± 0.21	1.75 ± 0.57	1.44 ± 0.32	1.00 ± 0.29	1.15 ± 0.48	0.77 ± 0.31	0.88 ± 0.20
Valine	1.00 ± 0.23	1.01 ± 0.23	1.58 ± 0.63	1.52 ± 0.22	1.00 ± 0.08	0.83 ± 0.21	1.00 ± 0.14	0.83 ± 0.11
Xylose	1.00 ± 0.17	0.40 ± 0.06	1.37 ± 0.55	0.62 ± 0.13	1.00 ± 0.20	1.01 ± 0.18	0.89 ± 0.14	0.88 ± 0.26

## 7.4 Gesamtübersicht der Chlorophyllbestimmungen

Dargestellt ist die Gesamtübersicht der Chlorophyllbestimmungen an allen isolierten HPR-Mutanten.

Tabelle 7-4 Gesamtübersicht über die Chlorophyllbestimmung.

Linie	Chla µg/mgFW	Chlb µg/mgFW	Chla+b µg/mgFW	Carotinoide µg/mgFW	
<b>col.0</b>	<b>3,1252</b>	<b>0,8851</b>	<b>4,0104</b>	<b>0,1081</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,2671	0,1303	0,3939	0,0237	Stabw
<b>hpr1</b>	<b>2,1299</b>	<b>0,5678</b>	<b>2,6977</b>	<b>0,0700</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,4252	0,1489	0,5737	0,0235	Stabw
	0,0022	0,0071	0,0029	0,0340	Ttest zu col.0
<b>hpr2</b>	<b>3,1193</b>	<b>0,9097</b>	<b>4,0290</b>	<b>0,0986</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,2510	0,0980	0,3479	0,0137	Stabw
	0,9719	0,7448	0,9388	0,4636	Ttest zu col.0
<b>hpr3</b>	<b>3,1880</b>	<b>0,9566</b>	<b>4,1446</b>	<b>0,1035</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,3080	0,1111	0,4184	0,0135	Stabw
	0,7398	0,3777	0,6156	0,7166	Ttest zu col.0
<b>h1xh2</b>	<b>1,4917</b>	<b>0,3450</b>	<b>1,8367</b>	<b>0,0554</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,2177	0,0664	0,2758	0,0149	Stabw
	0,0000	0,0000	0,0000	0,0030	Ttest zu col.0
	0,0174	0,0157	0,0164	0,2741	Ttest zu hpr1
<b>h1xh3</b>	<b>2,4307</b>	<b>0,6849</b>	<b>3,1156</b>	<b>0,0753</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,2897	0,1030	0,3916	0,0157	Stabw
	0,0043	0,0273	0,0070	0,0325	Ttest zu col.0
	0,2276	0,1858	0,2154	0,6859	Ttest zu hpr1
<b>h2xh3</b>	<b>2,9117</b>	<b>0,8503</b>	<b>3,7620</b>	<b>0,0823</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,4298	0,1431	0,5722	0,0204	Stabw
	0,3730	0,6978	0,4470	0,1024	Ttest zu col.0
	0,3783	0,4656	0,3986	0,1745	Ttest zu hpr1
<b>h1xh2xh3</b>	<b>1,4325</b>	<b>0,3450</b>	<b>1,7774</b>	<b>0,0638</b>	<b>Mittelwert</b>
	0,0478	0,0283	0,0741	0,0102	Stabw
	0,0065	0,0111	0,0074	0,6058	Ttest zu hpr1
	0,5686	0,9995	0,6550	0,3262	Ttest zu h1xh2

## 7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese.....	5
Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus. ....	6
Abbildung 2-3 Schema des pflanzlichen C2-Zyklus .....	9
Abbildung 3-1 Struktur des pGEMT-Vektors (Promega) .....	22
Abbildung 3-2 Struktur des pBAD/HisA-Vektors (Invitrogen) .....	23
Abbildung 3-3 Struktur des pHUE-Vektors (Catanzariti <i>et al.</i> , 2004).....	23
Abbildung 4-1 Expressionsmuster photorespiratorischer Gene. ....	40
Abbildung 4-2 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der AtHPR1.....	41
Abbildung 4-3 Isolation der AtHPR1-Insertionsmutanten. ....	42
Abbildung 4-4 Phänotyp der AtHPR1-Insertionslinien.....	44
Abbildung 4-5 Identifikation der alternativen AtHPR2 .....	46
Abbildung 4-6 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der AtHPR2 mittels RT-PCR .....	48
Abbildung 4-7 Isolation der AtHPR2-Insertionslinien.....	49
Abbildung 4-8 Phänotyp der AtHPR2-Insertionslinien.....	50
Abbildung 4-9 Photosynthetischer Leistung der AtHPR1- und AtHPR2-Insertionslinien.....	51
Abbildung 4-10 Genotyp der isolierten <i>hpr1xhpr2</i> Doppelmutante .....	52
Abbildung 4-11 Phänotyp der <i>hpr1xhpr2</i> Doppelmutante .....	53
Abbildung 4-12 Phänotyp der <i>hpr1xhpr2</i> Doppelmutante nach Transfer der Pflanzen aus erhöhten CO <sub>2</sub> -Bedingungen in Normalluftbedingungen. ....	54
Abbildung 4-13 Phänotyp der <i>hpr1xhpr2</i> Doppelmutante – Samenbildung.....	54
Abbildung 4-14 Keimungsverhalten der HPR-Mutanten auf MS-Medium.....	55
Abbildung 4-15 Rosettendurchmesser und Chlorophyllgehalte der HPR-Mutanten. ....	56
Abbildung 4-16 Reduktion der HPR-Aktivitäten in den HPR-Mutanten. ....	58
Abbildung 4-17 Änderung ausgewählter Metabolite in den HPR-Mutanten.....	60
Abbildung 4-18 Photosynthetische Leistung der HPR-Mutanten bei verschiedenen Sauerstoffgehalten der Messluft. ....	63
Abbildung 4-19 At1g12550 als alternative HPR3.....	66
Abbildung 4-20 Genstruktur der alternativen AtHPR3.....	68

Abbildung 4-21 Gewebsspezifische Expressionsanalyse der HPR3 mittels RT-PCR .....	69
Abbildung 4-22 Phänotyp der HPR3-Einzel-, Doppel und Dreifach-Mutanten.....	71
Abbildung 4-23 Wachstumsreduktion der HPR-Dreifachmutante.....	72
Abbildung 4-24 Knock-out der HPRs führt zu Änderungen des Aminosäuregehalte. ....	73
Abbildung 4-25 Mutation der 3 HPRs führt zur Reduktion der photosynthetischen Leistung.	75
Abbildung 4-26 Aktivität des PSII in den HPR-Mutanten (Fotodokumentation). ....	76
Abbildung 4-27 ETR der HPR-Mutanten.....	79
Abbildung 5-1 Der pflanzliche C2-Zyklus verläuft durch 4 subzelluläre Kompartimente .....	85

## 7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Zusammenfassung der am C2-Zyklus beteiligten Gene.....	13
Tabelle 3-1 Verwendete Geräte und Apparaturen .....	19
Tabelle 3-2 Verwendete Reaktionskits .....	20
Tabelle 3-3 Verwendete Enzyme.....	21
Tabelle 3-4 Verwendete Größenstandards für Elektrophoresen .....	21
Tabelle 3-5 Verwendete Oligonukleotide. ....	21
Tabelle 3-6 Verwendete Insertionslinien .....	24
Tabelle 4-1 Aktivitätsmessungen an der rekombinanten HPR1 und HPR2.....	47
Tabelle 4-2 <sup>13</sup> C-Glukose-Markierung der HPR-Mutanten.....	61
Tabelle 4-3 Überblick über die Proteindomänen der HPRs aus <i>Arabidopsis</i> .....	65
Tabelle 4-4 Zusammenfassung der Aktivitätsmessungen an den rekombinanten HPRs.....	67
Tabelle 4-5 PSII-Aktivität in den HPR-Mutanten ( $F_v/F_m$ -Verhältnisse).....	77
Tabelle 5-1 Zusammenfassung der Hauptcharakteristika der HPR-Mutanten.....	89
Tabelle 7-1 Gesamtübersicht der sauerstoffabhängigen Gaswechselfmessungen. ....	101
Tabelle 7-2 Gesamtübersicht der Aminosäureanalysen.....	103
Tabelle 7-3 Erweiterte Übersicht über die Metabolomanalysen. ....	105
Tabelle 7-4 Gesamtübersicht über die Chlorophyllbestimmung. ....	107

## 7.7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3HP	Hydroxypyruvat
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
A	Aqua
ADP	Adenosindiphosphat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
CAT	Katalase
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
Chl	Chlorophyll
Cl	Chloroform/Isoamylalkohol
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid
Da	Dalton
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GDC	Glycinderboxylase
GGAT	Glyoxylat:Glutamat-Aminotransferase
GGT	Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase

Glx	Glyoxylat
Glyk	Glyceratkinase
GOGAT	Glutamin: Oxoglutarat-Aminotransferase
GOX	Glykolatoxidase
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPR	Hydroxypyruvatreduktase
l	Liter
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
LB	left border
LB	Luria Bertani (Medium)
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
M	Mol pro Liter (molar)
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV-RT	Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus
mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
mRNA	messenger (Boten-) RNA
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Center
Ni-NTA	Nickel-Trinitiloessigsäure
Nr.	Nummer
MS	Murashige und Skoog (Medium)
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamiddinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamiddinucleotid, reduziert
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamiddinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamiddinucleotidphosphat, reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
Pi	inorganisches Phosphat

p.a.	pro analysis
PAR	photosynthetisch aktive Photonen-Flux-Dichte
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGLP	Phosphoglykolatphosphatase
RB	right border
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGAT	Serin: Glyoxylat-Aminotransferase
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T-DNA	Transfer-DNA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volt
V	Volumen
VT	Volumentteile
v/v	volume/volume
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

## 7.8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hermann Bauwe danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit in der Abteilung für Pflanzenphysiologie anfertigen zu können. Des Weiteren bedanke ich mich für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und die Unterstützung während der gesamten Zeit. Weiterhin gilt ein großer Dank Prof. Dr. Martin Hagemann, für die ständige Diskussionsbereitschaft, hilfreiche Anmerkungen und viele Hilfestellungen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei dem gesamten Team der Abteilung Pflanzenphysiologie, für die nette Zeit und die prima Stimmung während und außerhalb der Arbeitszeit. Besonders hervorheben möchte ich dabei Nadja Engel und Ralph Ewald, die mich vor allem während der Anfangszeit unterstützt und viele Hilfestellungen geleistet haben. Ebenso gilt ein großer Dank Kathrin Jahnke, die mit flinken Fingern und großem Arbeitseinsatz bei vielen „unliebsamen“ Arbeiten geholfen hat.

Ein großes Dankeschön möchte ich ans Max Planck Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm schicken. Vor allem zu nennen sind dabei Dr. Alisdair Fernie und Dr. Adriano Nunes-Nesi, die mir die Analysen der Metabolite und des photorespiratorischen Flusses ermöglicht haben. Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Wolfram Weckwerth und Dr. Stephanie Wienkoop für die massenspektrometrischen Analysen zur Proteinidentifikation.

Prof. Dr. Leszek Kleczkowski danke ich für die Bereitstellung von Antiseren, welche eine große Arbeitserleichterung ermöglicht haben.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, sowie der Landesgraduiertenförderung, Mecklenburg Vorpommern.

Für die Unterstützung während meines Studiums und der sich anschließenden Promotionszeit gilt mein herzlichstes Dankeschön meinen Eltern, Gabriele und Erwin Timm, die mir das ganze ermöglicht haben. Ebenfalls danke ich meinen Freunden für eine Vielzahl von Ablenkungen, ohne die die ganze Zeit nur halb so schön gewesen wäre. Die meisten kamen oft sehr gelegen.

## **7.9 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Stefan Timm, dass ich die vorliegende Dissertation eigenhändig verfasst habe und lediglich die benannten Quellen zur Anfertigung verwendet habe.

Rostock, 20.10.2009

Stefan Timm

## 7.10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Stefan Timm  
Geburtsdatum: 09.09.1980  
Geburtsort: Kühlungsborn  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1987 – 1991 Grundschule, Diesterweg-Grundschule, Kühlungsborn  
1991 – 1997 Mittelstufe, Heinrich-Schreiber-Realschule, Kühlungsborn  
1997 – 2000 Gymnasium, Fritz-Reuter-Gymnasium, Kühlungsborn (Abitur)

### Grundwehrdienst

2000 – 2001 Grundwehrdienst (Holzdorf und Rostock, Laage)

### Hochschulstudium

WS 2001/02 bis  
WS 2006/07 Biologiestudium an der Universität Rostock (Diplom)

März 2006 bis  
November 2006 Diplomarbeit am Institut für Biologie der Universität Rostock,  
Abteilung für Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. Hermann Bauwe  
„Charakterisierung des Hydroxypyruvat-reduzierenden Systems  
in *Arabidopsis thaliana*“

### Dissertation

Dezember 2006 bis  
Dezember 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Uni Rostock,  
Abteilung für Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. Hermann Bauwe

Januar 2008 bis  
Dezember 2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Uni Rostock,  
Abteilung für Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. Hermann Bauwe  
Landesgraduiertenstipendium, Mecklenburg Vorpommern

Rostock, 20.10.2009

Unterschrift: