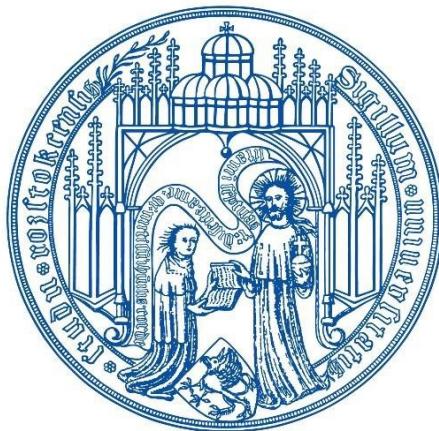


Die Rolle der 2-Phosphoglykolat-Phosphatase in *Arabidopsis thaliana*

Ist 2-Phosphoglykolat ein regulatorischer Metabolit?



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

vorgelegt von

Franziska Flügel, geb. 06.08.1982 in Grevesmühlen

Datum der Einreichung: 23. Mai 2017

Datum der Verteidigung: 13. Oktober 2017

Gutachter:**1. Gutachter:**

Prof. Dr. Hermann Bauwe
Abteilung Pflanzenphysiologie
Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Alisdair Fernie
Arbeitsgruppe „Zentraler Metabolismus“
Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Franziska Flügel, Stefan Timm, Stéphanie Arrivault, Alexandra Florian, Mark Stitt, Alisdair R Fernie, Hermann Bauwe. The Photorespiratory Metabolite 2-Phosphoglycolate Regulates Photosynthesis and Starch Accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 29 (10), 2537-2551. 2017

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	5
2.1 Die Photorespiration	5
2.2 Funktionen und Interaktionen der Photorespiration	7
2.3 Genetische Manipulationen der Photorespiration	9
2.4 Kenntnisstand zu Phosphoglykolatphosphatasen	10
2.5 Zielstellung	12
3 Material.....	13
3.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	13
3.2 Pflanzenmaterial und Anzucht	13
3.3 Bakterien	14
3.4 Verwendete Reaktionskits	14
3.5 Verwendete Enzyme	14
3.6 Größenstandards.....	15
3.7 Oligonukleotide.....	15
3.8 Vektoren	17
4 Methoden	18
4.1 Kultivierung und Anzucht.....	18
4.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	18
4.1.2 Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
4.2 Molekularbiologie.....	19
4.2.1 Isolation genomicscher DNA.....	19
4.2.2 Isolation von Plasmid-DNA	20
4.2.3 Isolation von RNA	20
4.2.4 Herstellung von cDNA.....	20
4.2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	21
4.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	21
4.2.7 DNA-Fragmentisolation aus Agarosegelen	22
4.2.8 Sequenzierung	22
4.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten	22
4.2.10 Transformation von <i>E. coli</i>	22
4.2.11 Restriktion	23
4.2.12 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
4.2.13 Transformation von <i>Arabidopsis</i>	24
4.3 Arbeiten mit Proteinen	25

4.3.1	Proteinisolation aus <i>Arabidopsis</i>	25
4.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	25
4.3.3	SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
4.3.4	Immunologische Nachweistechniken (Western-Blot)	26
4.4	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	28
4.4.1	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	28
4.4.2	Zellaufschluss	28
4.4.3	Affinitätschromatografie	28
4.5	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	29
4.5.1	Phosphoglykolatphosphatase-Aktivität	29
4.5.2	Phosglukomutase-Aktivität.....	29
4.5.3	Phosglukoisomerase-Aktivität	29
4.5.4	Triosephosphatisomerase-Aktivität	30
4.6	Messung Chlorophyll a Fluoreszenz mittels Imaging PAM (I-PAM)	30
4.7	Messungen des Gaswechsels (Li-Cor 6400)	31
4.8	Enzymatischer Nachweis und Quantifizierung von Stärke aus Pflanzenmaterial.....	31
4.9	Quantitative Bestimmung der löslichen Zucker mittels Gaschromatografie	32
4.10	Quantitative Bestimmung der Aminosäuren mittels HPLC.....	33
4.11	Metabolitbestimmung durch GC-MS und LC-MS/MS	33
4.12	Transkriptanalyse auf mRNA-Ebene mit qRT-PCR	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Die genetische Komplementation der <i>pglp1</i> -Mutante	35
5.2	Die Beeinflussung der PGLP-Aktivität durch Antisense-Reduktion und Überexpression	38
5.3	Das veränderte Pflanzenwachstum der transgenen <i>PGLP</i> -Linien	42
5.4	Die Photosyntheseleistung sinkt mit der Abnahme des <i>PGLP</i> -Gehalts und steigt unter Stressbedingungen bei erhöhtem <i>PGLP</i> -Gehalt	45
5.5	Die veränderte PGLP-Aktivität hat Einfluss auf die photosynthetische Kohlenstoffassimilation und assoziierte Stoffwechselwege.....	51
5.6	Der geringe <i>PGLP</i> -Gehalt reduziert die Stärkesynthese, während ein hoher <i>PGLP</i> -Gehalt diese fördert	55
5.7	Ein veränderter 2-PG-Umsatz hat Einfluss auf die Calvin-Benson-Zyklus-Aktivität	60
5.8	Ein hoher 2-PG-Umsatz führt zu stressresistenteren Pflanzen.....	64
5.8.1	Ein erhöhter 2-PG-Umsatz führt zu einer besseren Anpassung an erhöhte Temperaturen.....	64

5.8.2	Wassermangel	69
6	Diskussion	73
6.1	Die <i>AfPGLP</i> -knockout-Mutante weist keine unspezifischen Hintergrund-Mutationen auf	74
6.2	Das Wachstum von <i>Arabidopsis</i> korreliert mit dem <i>PGLP</i> -Gehalt in den transgenen Linien	75
6.3	Die stomatäre Leitfähigkeit (g_s), als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen, korreliert mit dem <i>PGLP</i> -Gehalt	76
6.4	Der zentrale Kohlenstoff-Metabolismus wird durch eine verringerte PGLP-Aktivität stark beeinträchtigt	79
6.5	Verminderte PGLP-Aktivität beeinträchtigt den Calvin-Benson-Zyklus und die Stärke-Synthese, dagegen werden beide Prozesse durch schnelleren 2-PG-Abbau gefördert.....	81
6.6	2-PG als direkter Inhibitor für Enzyme des Kohlen- bzw. Stärkestoffwechsels.....	82
6.7	Die <i>PGLP</i> -Überexpressoren zeigen eine bessere Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen	84
6.8	Ausblick	85
7	Literatur	87
8	Anhang	98
8.1	Abbildungsverzeichnis	117
8.2	Tabellenverzeichnis	119
8.3	Abkürzungsverzeichnis	121
8.4	Danksagung	126
8.5	Erklärung	127

1 Zusammenfassung

Die 2-Phosphoglykolat (2-PG) Phosphatase (PGLP) ist ein integraler Bestandteil der Photorespiration, einem notwendigen Stoffwechselweg, um hohe photosynthetische Kohlenstoffassimulationsraten in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff aufrecht zu erhalten. Die PGLP baut das schädliche Zwischenprodukt 2-PG ab, welches gebildet wird wenn Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) von der RuBP-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) oxygeniert wird. Neben der Funktion der Photorespiration 2-PG in das für den Calvin-Benson-Zyklus (CBZ) nutzbare Intermediat 3-Phosphoglycerat (3-PGA) umzuwandeln, wird auch eine regulatorische Interaktion zwischen der Photorespiration und dem CBZ angenommen (Timm *et al.*, 2016). Eine Inaktivierung von an der Photorespiration beteiligten Genen durch Mutation führt zu einem charakteristischen „photorespiratorischen Phänotyp“ (Somerville C., 2001). Die entsprechenden Mutanten können nicht mehr unter Normalluftbedingungen (0.038% CO₂) wachsen, jedoch durch Kultivierung in erhöhten CO₂-Konzentrationen (> 0.3% CO₂) revertiert werden. Eine Ausnahmeerscheinung unter den Mutanten ist das Eingangsenzym der Photorespiration, die Phosphoglykolat-Phosphatase (*PGLP1*), da dessen Inaktivierung einen besonders starken Phänotyp nach sich zieht (Schwarze *et al.*, 2007). Auch bei sehr hohen CO₂-Konzentrationen (1% CO₂) ist noch eine deutliche Wachstumsverzögerung der *Arabidopsis pg/p1-knockout*-Mutante zu erkennen, die mit einer drastischen Reduktion der photosynthetischen CO₂-Assimilation und Inhibition der Stärke-Biosynthese einhergeht (Timm *et al.*, 2012). Bezogen auf die bisherigen Befunde könnte man vermuten, dass sowohl das Enzym PGLP selber oder aber dessen Substrat 2-PG als ein potentiell regulatorisches Signal aus der Photorespiration in Richtung Kohlenstoffassimilation und Verteilung fungieren könnte. Innerhalb dieser Arbeit sollte diese Hypothese mit Hilfe verschiedener, transgener Eingriffe geprüft werden. Aus diesem Grund wurden neben der *pg/p1*-Mutante, Antisense- und Überexpressions-Mutanten hergestellt und analysiert. Phänotypische, Photosynthese- und Stoffwechselanalysen zeigen, dass eine Reduktion der PGLP Aktivität negativ mit der Kohlenstoffassimilation und dem Wachstum korreliert, sowie eine Umprogrammierung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus bewirkt. Die Erhöhung der PGLP-Aktivität hingegen führt zu wenigen, unspezifischen Änderungen im zentralen Stoffwechsel. Dabei vor allem zu nennen ist die weniger Sauerstoff empfindliche Photosynthese, während das Wachstum weitestgehend unbeeinflusst ist. Interessanterweise sind die *PGLP*-Überexpressionsmutanten deutlich weniger anfällig gegenüber abiotischen Stressfaktoren, wie erhöhten Temperaturen oder Wassermangel, wobei vor allem Änderungen in den Gehalten organischer Säuren oder der Stärke als mechanistische Ursache für diese Anpassung zu diskutieren sein könnten. Eine Änderung im Profil der organischen Säuren der *PGLP*-Mutanten könnte eine Ursache für die

Zusammenfassung

Anpassung an veränderte Umweltbedingungen sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein veränderter 2-PG-Gehalt Einfluss auf die CBZ-Aktivität nimmt und es zu einer Umverteilung des Kohlenstoffs zur Stärkesynthese kommt. Ein hoher 2-PG-Gehalt hemmt den CBZ und verringert den Stärkegehalt. Dagegen zeigen die Überexpressoren mit einem geringen 2-PG-Gehalt einen erhöhten Stärkegehalt. Eine Schlüsselrolle könnte dabei die *in vivo* Inhibition der Triosephosphatisomerase sein, die zuvor schon in *in vitro* Experimenten beschrieben wurde (Segerer *et al.*, 2016). Zusammenfassend lassen die gewonnenen Ergebnisse vermuten, dass der 2-PG-Gehalt als Effektor für veränderte Umweltbedingungen zu agieren scheint und Störungen innerhalb der Photorespiration auf den CBZ überträgt, um eine Anpassung der Kohlenstoffassimilation und dessen Verteilung zu steuern.

Summary

2-phosphoglycolate (2-PG) phosphatase (PGLP) is an integral part of photorespiration, a metabolic pathway necessary to maintain high photosynthetic carbon assimilation rates in the presence of molecular oxygen. The PGLP degrades the harmful intermediate 2-PG, which is formed when ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) is oxygenated from the RuBP carboxylase / oxygenase (RubisCO). In addition to the function of photorespiration to convert 2-PG into the Calvin-Benson cycle (CBC) intermediate 3-phosphoglycerate (3-PGA), a regulatory interaction between the photorespiration and the CBC is also assumed (Timm *et al.*, 2016). Inactivation of genes involved in photorespiration by mutation leads to a characteristic "photorespiratory phenotype" (Somerville C., 2001). The corresponding mutants can no longer grow under normal ambient conditions (0.038% CO₂) but can be reverted by cultivation in elevated CO₂ (> 0.3% CO₂). An exception among the mutants is the input enzyme of photorespiration, the phosphoglycolate phosphatase (*PGLP1*), since its inactivation displays a particularly strong phenotype (Schwarze *et al.*, 2007). Even in the case of very high CO₂ concentrations (1% CO₂), a significant growth delay of the *Arabidopsis pg/p1* knockout mutant is associated with a drastic reduction of photosynthetic CO₂ assimilation and inhibition of starch biosynthesis (Timm *et al.*, 2012). Based on the findings so far, one could assume that both the enzyme PGLP itself or its substrate 2-PG could act as a potential regulatory signal from photorespiration towards carbon assimilation and distribution. Within this work, this hypothesis should be examined with the aid of various transgenic interventions. For this reason, in addition to the *pg/p1* mutant antisense and overexpression mutants were prepared and analyzed. Phenotypic, photosynthetic and metabolic analyzes show that a reduction in PGLP activity correlates negatively with carbonassimilation and growth, as well as a reprogramming of the central carbon metabolism. The increase in PGLP activity leads to few, nonspecific changes in the central metabolism. Above all, the less oxygen sensitive photosynthesis, while the growth is largely unaffected. Interestingly, the PGLP overexpression mutants are significantly less susceptible to abiotic stress factors such as elevated temperatures or water deficiencies, with mainly changes in the levels of organic acids or starch being the mechanistic cause for this adaptation. A change in the profile of the organic acids of the PGLP mutants could be a cause for adaptation to altered environmental conditions. The results of this work show that a changed 2-PG content affects the CBC activity and redistribution of the carbon to the starch synthesis occurs. A high 2-PG content inhibits the CBC and decreases the starch content, while the overexpressors with a low 2-PG content show an increased starch content. A key role here could be the *in vivo* inhibition of the triosephosphate isomerase, which was described previously in *in vitro* experiments (Segerer *et al.*, 2016). In summary, the results obtained suggest that the 2-PG content seems to act as an effector for altered environmental conditions and transmits

Summary

interferences within the photorespiration to the CBC to control an adjustment of carbon assimilation and its distribution of carbon.

2 Einleitung

Die Atmosphäre setzt sich aus verschiedenen Gasen zusammen. Der Hauptbestandteil ist Stickstoff (~78%), gefolgt von Sauerstoff (~21%) und Argon (~1%), dazu kommen Aerosole und Spurengase, zu denen auch Kohlendioxid (~0,04%) zählt. Das war jedoch nicht immer die Zusammensetzung der Luft. Vor 3500 Millionen Jahren enthielt die Atmosphäre hohe Anteile an Methan und Kohlendioxid (Kasting 2005). Sauerstoff ist nicht nur für das Leben notwendig, sondern auch ein Molekül, das Einfluss auf andere Stoffkreisläufe hat, wie z.B. durch die Inhibition der Nitrogenase (Fay 1992) in der Stickstofffixierung und das Auslösen der Oxygenasereaktion bei der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) in der Kohlenstofffixierung. Die Rubisco reagiert mit dem Sauerstoff und es wird 2-Phosphoglykolat (2-PG) gebildet. Dieses Intermediat ist toxisch für die pflanzliche Zelle, da es an der Photosynthese beteiligte Enzyme inhibiert (Husic *et al.*, 1987, Norman and Colman, 1991). Es ist also ein Stoffwechselweg notwendig, der toxische Intermediate abbaut. Im Falle des 2-PG ist es die Photorespiration, in deren Verlauf das 2-PG abgebaut und in ein für die Zelle nutzbares Intermediat, dem 3-Phosphoglycerat (3-PGA), umgewandelt wird.

2.1 Die Photorespiration

Die Photorespiration (PR) gehört zu den Hauptstoffwechselwegen im pflanzlichen Primärstoffwechsel und wird auch als pflanzlicher C2-Zyklus (Tolbert, 1997) bezeichnet. Vom Stoffumsatz wird die PR allein durch die Photosynthese übertroffen (Bauwe *et al.*, 2010) und ihre Rolle ist vielfältig. Die PR verhindert den Kohlenstoffverlust durch die Oxygenasereaktion der Rubisco und füllt den Calvin-Benson-Zyklus (CBZ) wieder auf, indem 2-Phosphoglykolat (2-PG) recycelt wird. Außerdem werden toxische Metabolite wie 2-PG (Anderson, 1971) und Glyoxylat (Mulligan *et al.*, 1983; Cook *et al.*, 1985; Campbell and Orgren, 1990) im Zuge der PR abgebaut und stattdessen wichtige Aminosäuren wie Serin und Glycerin gebildet. Der pflanzliche C2-Zyklus erfordert das Zusammenspiel von über 20 verschiedenen Enzymen und vielen noch nicht bekannten Transportern, welche in 4 verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind, den Chloroplasten, den Peroxisomen, den Mitochondrien und dem Zytosol (siehe Abb. 2.1). Initiiert wird die PR durch die Oxygenasereaktion der Rubisco, bei der in den Chloroplasten ein Molekül 3-Phosphoglycerat (3-PGA) und ein Molekül 2-PG gebildet wird. Das 3-PGA fließt in den CBZ ein und das 2-PG wird durch die chloroplastidäre Phosphoglykolat-Phosphatase (PGLP, EC 3.1.3.18), dem Eingangsenzym der Photorespiration, zu Glykolat und Pi hydrolysiert. Glykolat wird durch den Glykolat/Glycerat Antiporter in das Zytosol exportiert (Pick *et al.*, 2013). Anschließend gelangt es in den Peroxisomen und wird dort von der Glykolat-Oxidase (GOX, EC 1.1.3.15) zu Glyoxylat (Glx) oxidiert. Bei der Glykolat-Oxidase

Einleitung

handelt es sich um ein Flavinmononukleotid (FMN) abhängiges Enzym, welches Elektronen vom Glykolat auf Sauerstoff überträgt, wodurch es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Form von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kommt. Das entstandene H_2O_2 wird durch die peroxisomale Katalase (CAT, EC 1.11.1.6) zu H_2O entgiftet. Glyoxylat wird noch im Peroxisom durch die Reaktion der Serin:Glyoxylat Aminotransferase (SGT1, EC 2.6.1.45) und der Glutamat:Glyoxylat Aminotransferase (GGAT, EC 2.6.1.4) zu Glycin transaminiert. Die Reaktionen laufen parallel ab und sorgen für ein Gleichgewicht. Über einen Dicarboxylat Antiporter wird das hierfür benötigte Glutamat im Austausch gegen Malat aus den Chloroplasten importiert. Glycin wird in die Mitochondrien transportiert, wo zwei Moleküle Glycin durch das Zusammenwirken der Glycin-Decarboxylase (GDC, EC 1.4.4.2) und der Serinhydroxymethyltransferase (SHMT1, EC 2.1.2.1) zu einem Molekül Serin umgesetzt werden. Während dieser Reaktion werden ebenfalls NH_3 und CO_2 freigesetzt. Die Reassimilation des NH_3 ist ein sehr effizienter und essentieller Prozess für die Aufrechterhaltung des Stickstoffhaushaltes in Pflanzen (Mattson *et al.*, 1997; Jamai *et al.*, 2009). 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). Die Freisetzung von CO_2 , während der GDC-Reaktion, stellt allerdings einen Verlust von 30% des in 2-PG primär fixierten Kohlenstoffs dar. Das gebildete Serin wird zurück in die Peroxisomen transportiert und durch die SGAT zu 3-Hydroxypropyruvat (3-HP) umgewandelt, welches durch die NADH-abhängige Hydroxypyruvatreduktase (HPR, EC 1.1.1.29) zu D-Glycerat reduziert wird. Die dafür benötigten Reduktionsäquivalente (NADH) werden durch die peroxisomale Malatdehydrogenase (Cousins *et al.*, 2008) zur Verfügung gestellt. Glycerat wird anschließend in die Chloroplasten eingeschleust und durch die Glyceratkinaise (GLYK, EC 2.7.1.31) zu 3-PGA phosphoryliert. Im CBZ wird das so recycelte 3-PGA wieder zu Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP) umgesetzt und steht der Kohlenstoffassimilation erneut zur Verfügung.

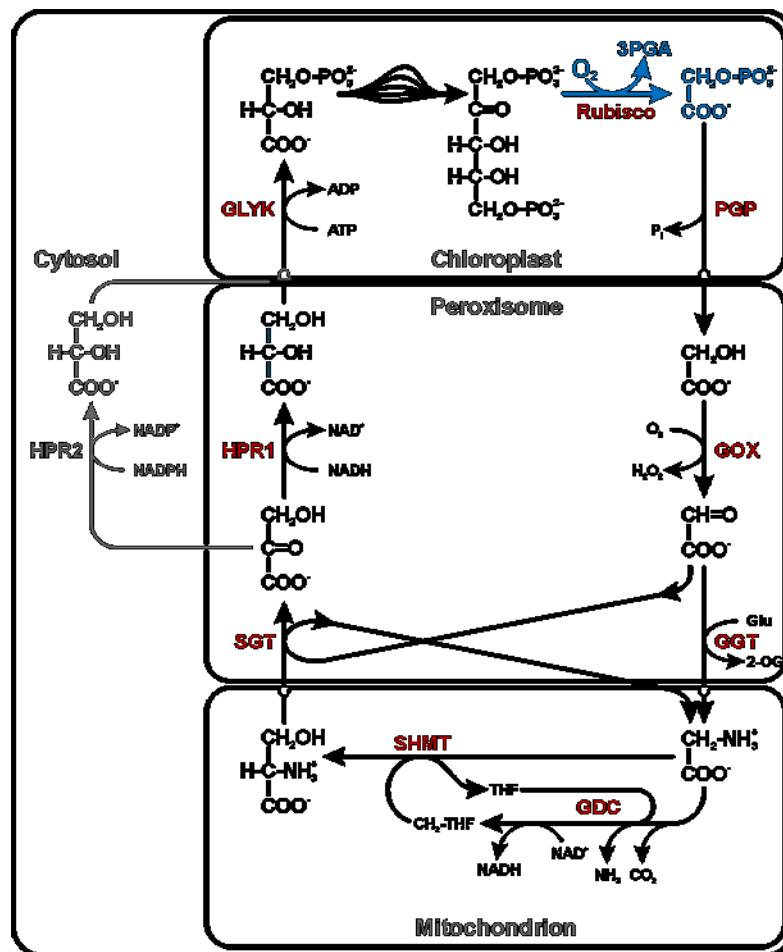


Abbildung 2-1 Schema des pflanzlichen C2-Zyklus

Dargestellt sind die Kernenzyme des C2-Zyklus (Rubisco: Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, PGP: 2-Phosphoglykolat-Phosphatase, GOX: Glykolat-Oxidase, CAT: Katalase, GGT: Glu:Glyoxylat Aminotransferase, GDC: Glycin-Decarboxylase, SHMT: Serin-Hydroxymethyltransferase, SGT: Serin:Glyoxylat Aminotransferase, HPR1: 3-Hydroxypyruvat-Reduktase, GLYK: D-Glycerat-3-Kinase).

2.2 Funktionen und Interaktionen der Photorespiration

Die Hauptfunktion der Photorespiration (PR) besteht darin, das toxische Intermediat 2-PG (Anderson, 1971) abzubauen und der Zelle wieder als Kohlenstoffquelle zur Verfügung zu stellen. 2-PG inhibiert die Triosephosphat-Isomerase (Anderson, 1971; Husic *et al.*, 1987; Norman und Colman, 1990), welche eine Schlüsselrolle für die Triosephosphat-Verwertung im CBZ zur Stärkesynthese und für die RuBP-Regeneration spielt. Ebenfalls inhibiert 2-PG die Phosphofruktokinase (Kelly und Latzko, 1976), ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Es werden 75% des in 2-PG gebundenen Kohlenstoffs durch die PR zurückgewonnen und in Form von 3-PGA für RuBP-Regeneration verwendet. Die restlichen 25% gehen bei der GDC-Reaktion in Form von CO_2 verloren. Eine wichtige Nebenfunktion nimmt die Katalase 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,

Einleitung

ist dieses Gleichgewicht sehr wichtig für den Zellhaushalt und bei der Stressabwehr (Foyer *et al.*, 2009). Weiterhin dient die Photorespiration dem Schutz vor Photoinhibition (Takahashi *et al.*, 2007) durch den Verbrauch von ATP und die Umwandlung von Redoxäquivalenten während des C2-Zyklus (Voß *et al.*, 2013). Zusammengefasst dient die PR dazu den CBZ vor O₂-Inhibition/Vergiftung zu schützen und somit hohe Raten an Photosynthese in der Anwesenheit von O₂ zu erlauben.

Die PR hat Auswirkungen auf verschiedene Stoffwechselprozesse in der Pflanze, wie zum Beispiel dem Stickstoffmetabolismus (Bloom *et al.*, 2015). Während der PR wird Malat aus dem Chloroplasten exportiert und wird dort für die NADH Bildung genutzt. Die Energie vom NADH wird dann für die NO₃-Assimilation verwendet. Wird der Malattransport oder -metabolismus gestört, hat dies Auswirkungen auf die PR und NO₃-Assimilation (Dutilleul *et al.*, 2005; Schneiereit *et al.*, 2006). Genauso führt eine verringerte Durchflussrate der PR bei erhöhtem CO₂- bzw. verringertem O₂-Gehalt in der Wachstumsumgebung zu einer verringerten NO₃-Assimilation (Bloom *et al.*, 2010). Während der PR wird im Peroxisom H₂O₂ gebildet. Dieses ist wichtig bei der Detektion der Photoperiode, in Bezug auf die lichtabhängige Genexpression (Chaouch *et al.*, 2010) und der Pathogenabwehr (Foyer *et al.*, 2009). Ein weiterer Prozess bei dem die PR eine positive Rolle spielt, ist das Erhalten der Redoxhomöostase in der Pflanzenzelle (Scheibe und Diez, 2012). Während der Photosynthese entstehen bei der Umwandlung der Sonnenenergie hoch reaktive Verbindungen, die unter Stressbedingungen zur Bildung von gefährlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen (Voss *et al.*, 2013). Die PR kann viele der gefährlichen Verbindungen abbauen. Dass es eine Interaktion zwischen der PR und der Respiration gibt, ist durch Metabolitanalysen von verschiedenen Photorespirationsmutanten naheliegend (Obata *et al.*, 2016). Einerseits ist eine verminderte Respirationsaktivität vorhanden, wenn Proteine der PR in reduzierter Menge vorliegen. Auf der anderen Seite führt die Reduktion von der Oxoglutarat-Dehydrogenase zu verminderten Gehalten von Glycin, Serin und Glycerat. Die Interaktion zur Respiration dreht sich also um den 2-Oxoglutarat-Metabolismus. Neben den bereits genannten Prozessen hat die PR auch Auswirkungen auf den Aminosäure-Metabolismus (Keys, 2006), die C1-Biosynthese (Engel *et al.*, 2007, 2011) und die Stressabwehr (Wingler *et al.*, 2000 und Moreno *et al.*, 2005). Diese Studien belegen, dass es sich bei der PR nicht um einen isoliert agierenden Zyklus handelt und zeigen darüber hinaus, dass die PR ein essentieller Stoffwechselweg für das Überleben der Pflanzen in der heutigen Atmosphäre ist.

2.3 Genetische Manipulationen der Photorespiration

Die Produkte von landwirtschaftlich genutzten Pflanzen werden für die Ernährung und auch für erneuerbare Energie-Ressourcen benötigt. Durch die stetig wachsende Weltbevölkerung ist der Bedarf an landwirtschaftlichen Produkten enorm hoch und eine Verbesserung der Produktivität wird gesucht. Ein Ansatz ist die Erhöhung der photosynthetischen Leistung der Pflanzen. In diesem Zusammenhang wurde die PR, als Energie verzehrender und Kohlenstoff verlierender Prozess, Ziel von genetischen Manipulationen. Eine Variante die Photorespiration (PR) zu beeinflussen ist die Inaktivierung von an der PR beteiligten Genen durch Mutation. Dies führt jedoch zu einem charakteristischen „photorespiratorischen Phänotyp“ der Mutanten (Somerville 2000), der keine verbesserte Photosyntheseleistung bringt, sondern eine Verschlechterung. Diese Mutanten können nicht mehr unter Normalluftbedingungen wachsen, jedoch durch Kultivierung in erhöhten CO₂-Konzentrationen revertiert werden. Es gibt andere Ansätze die PR zu beeinflussen, zum einen die Reduzierung der 2-PG-Bildung durch Erhöhung der Spezifität der Rubisco für CO₂ (Parry *et al.*, 2013). Dazu wird versucht das aktive Zentrum der Rubisco zu mutieren und damit die Oxygenasereaktion zu unterbinden. Ein weiterer Ansatz zur Unterdrückung der Oxygenasefunktion ist das Einbringen von einem CO₂-Konzentrationsmechanismus (CCM) wie bei Cyanobakterien (Price *et al.*, 2013). Dabei wird die Konzentration des CO₂ in der Nähe der Rubisco erhöht, sodass die Carboxylase-Reaktion vorrangig ablaufen soll. Ein anderer Ansatz ist eine „Abkürzung“ des C2-Zyklus, z.B. durch das Einbringen des Glyceratstoffwechselweges aus *E. coli* in den Chloroplasten von Arabidopsis (Kebeish *et al.*, 2007) oder die komplette Decarboxylierung des 2-PG (Maier *et al.*, 2012). In dem Ansatz von Kebeish katalysiert die *E. coli* Glycolatdehydrogenase, unter Produktion von NADH, die Umsetzung von Glycolat zu Glyoxylat. Zwei Moleküle des entstehenden Glyoxylats werden unter CO₂-Freisetzung durch die Glyoxylat-Carbolisase zu Tatronatsemialdehyd umgesetzt. Die Tatronatsemialdehyd-Reduktase reduziert dieses zu Glycerat, wobei NADH als Elektronendonator fungiert. Das entstehende Glycerat geht in den normalen Stoffwechsel der Photorespiration ein. Bei diesem Bypass wird die Freisetzung von NH₃ reduziert. Zusätzlich geht kein CO₂ im Mitochondrium verloren, da es im Chloroplast verbleibt und sich in der Umgebung der Rubisco anreichern kann. Neben den Versuchen die PR zu unterdrücken oder abzukürzen, gibt es neuere Ansätze, bei denen die Flussrate der PR erhöht wird. Dazu wurden in verschiedenen Studien einzelne Proteine aus der PR überexprimiert. Beispielsweise wurde das H- und L-Protein der photorespiratorischen Glycindecarboxylase in Arabidopsis überexprimiert (Timm *et al.*, 2012b und 2015). Dies führte jeweils zur Erhöhung der Photosyntheseraten und einem verbesserten Wachstum der Pflanzenlinien. In Reis wurde die SHMT überexprimiert und zeigte ähnliche Ergebnisse wie die H- und L-Pflanzen (Wu *et al.*, 2015). Eine Überexpression der GOX in Chloroplasten zeigte reduzierte Rosettendurchmesser, verringerte Frischmasse und gelbliche Blätter (Fahnentrich

et al., 2008). Erst die Co-Expression mit der Malat Synthase und Katalase in den Chloroplasten zeigt verbessertes Wachstum in Form von mehr Blättern, höherer Trocken- und Frischmasse und gesteigerter Photosyntheserate (Maier et al., 2012).

2.4 Kenntnisstand zu Phosphoglykolatphosphatasen

Ein einzigartiges Beispiel für den photorespiratorischen Phänotyp ist das Eingangsenzym der Photorespiration, die Phosphoglykolat-Phosphatase (PGLP), da dessen Inaktivierung einen besonders starken Phänotyp nach sich zieht (Schwarte et al., 2007). In Arabidopsis gibt es zwei Gene, die für eine Phosphoglykolatphosphatase kodieren. Die PGLP1 (PGLP) (At5g36700) ist ein 39,7 kDa großes Protein, welches im Chloroplast lokalisiert ist und 2-PG zu Glykolat umwandelt. Im Zytosol ist die PGLP2 (At5g47760) lokalisiert, ein 33 kDa großes Protein, für das keine Beteiligung an der PR nachgewiesen werden konnte (Schwarte et al., 2007). PGLP ist sehr spezifisch für 2-PG und die volle Aktivität wird in Gegenwart von Cl⁻ und Mg²⁺ Ionen erreicht (Husic and Tolbert, 1984; Seal and Rose, 1987; Christeller and Tolbert, 1978a; Huh et al., 1989). Dagegen wurde Ca²⁺ als Inhibitor beschrieben (Mamedov et al., 2001; Kim et al., 2004). Mutanten mit keiner PGLP-Aktivität (*pglp1*) zeigen einen sehr stark ausgeprägten und artifiziellen Phänotyp. Auch bei sehr hohen CO₂-Konzentrationen (1% CO₂) ist noch eine deutliche Wachstumsverzögerung an der Arabidopsis *pglp1*-knockout-Mutante zu erkennen und eine drastisch reduzierte Photosyntheserate zu verzeichnen (Timm et al., 2012). Nicht zuletzt dieser Befund deutet auf eine Schlüsselrolle des Enzyms selber oder aber des Substrates 2-PG im pflanzlichen Stoffwechsel hin. Diese These stützen ebenfalls Arbeiten an Cyanobakterien und Grünalgen (Richardson and Tolbert, 1961; Hardy and Baldy, 1986; Belanger and Ogren, 1987; Norman and Colman; 1990; Mamedov et al., 2001). Von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* konnte eine *pgp1*-Mutante (Phosphoglykolat-Mangelmutante) isoliert werden (Suzuki et al., 1990). Nach anfänglicher Kultivierung in hoch CO₂-Bedingungen zieht der nachfolgende Transfer der Zellen in Normalluft einen deutlichen Anstau von 2-PG und eine starke Inhibition der Photosynthese nach sich, der in der Folge zum Absterben der Mutanten führt. Auch in der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) wurde eine PGLP-Mutante isoliert (Hall et al., 1987), deren Blätter nach 24 h in Normalluft ausbleichen und bei längerer Exposition komplett absterben. Die Photosyntheserate wurde bei Gaswechselmessungen mit 1% O₂ und 350 µl l⁻¹ CO₂ bestimmt, dann wurde gewechselt auf 21% O₂, CO₂ gleichbleibend, und wieder zurück zu 1% O₂. Die Photosyntheserate der Mutante liegt bei den Messungen mit 1% O₂ bei 35-50% vom Wildtyp und zeigt eine verzögerte Wiederherstellung, wenn von 21% auf 1% O₂ umgestellt wird. Abgesehen von phototrophen Organismen wurde die PGLP auch in nicht-grünen Organismen studiert, u.a. *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Thermoplasma acidophilum* und Mensch (Lyngstadaas et al., 1995; Liu et al., 2009;

Einleitung

Kim *et al.*, 2004; Zecher und Wolf, 1980). Hier soll die PGLP bei der DNA-Reparatur und der chemoautotrophen CO₂-Assimilation eine Rolle spielen (Inamdar *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Pellicer *et al.*, 2003; Shively *et al.*, 1998). Phosphoglykolat ist ein DNA beschädigendes Metabolit in Mäusen, dass *in vivo* die Triosephosphatisomerase-Aktivität vermindert (Segerer *et al.*, 2016). Dadurch kommt es unter hypoxischen Bedingungen zu einer erhöhten Menge an Triglyceriden und die Zellproliferation wird inhibiert. Interessanterweise wurde herausgefunden, dass 2-PG als Aktivator bei der Hydrolyse von 2,3-bisphosphoglycerat zur Modifizierung der O₂-Affinität des Hämoglobins in roten Blutzellen wirkt (Rose *et al.*, 1986). In welchem Ausmaß die PGLP in phototrophen Organismen solche Funktionen ausübt, ist im Moment noch ungeklärt. Jüngste Analysen zeigten, dass in der *Arabidopsis* PGLP-Mutante auch der Kohlenstoffhaushalt (im Besonderen der Aufbau transitorischer Stärke) und der Metabolismus von verzweigtkettigen und aromatischen Aminosäuren beeinflusst ist (Timm *et al.*, 2012). Zusammen mit der sehr starken Reduktion der Photosyntheserate und dem verringerten Wachstum ergibt sich ein interessantes Forschungsgebiet für tiefgreifende Analysen im Hinblick auf photorespiratorische Vernetzungen.

2.5 Zielstellung

Es ist bisher nur wenig darüber bekannt, durch welche Signale oder Mechanismen die Photorespiration (PR) mit anderen Stoffwechselwegen in Verbindung steht. Eine Möglichkeit wäre, dass 2-PG ein regulatorischer Metabolit ist, der nicht nur auf die bereits bekannten Enzyme Triosephosphat Isomerase und Phosphofructokinase inhibierend wirkt. Da es sich bei der *pglp1* um ein sehr artifizielles Modell handelt, welches unter Umständen pleiotrope Effekte beinhaltet, war ein Schwerpunkt in dieser Arbeit die Erzeugung transgener Arabidopsis Pflanzenlinien, in denen der Gehalt der PGLP reduziert ist. An diesen Pflanzen soll die Auswirkung der reduzierten PR durch physiologische und metabolische Methoden untersucht und Verbindungen zu anderen Stoffwechselwegen aufgedeckt werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Wachstum, den Stärkehaushalt und den Ablauf des Calvin-Benson-Zyklus gelegt.

Die Überexpression von Enzymen der PR (SHMT und GDC) haben gezeigt, dass sich eine gesteigerte Flussrate durch die PR positiv auf die Photosynthese der Pflanzenlinien auswirkt. Die Prüfung, ob dieser Effekt auch für die Überexpression der PGLP zutrifft, sollte ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sein. Die Generierung von *PGLP*-Überexpressionslinien im Modellorganismus Arabidopsis und die Validierung dieser Linien mit molekularbiologischen Methoden sollten zeigen, ob sich positive Effekte auf die Photosyntheseleistung, das Wachstum und den Stärkehaushalt ergeben. Zusätzlich wurden die Überexpressionslinien verschiedenen abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt, um ihre Anpassung zu untersuchen.

3 Material

3.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die allgemeinen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen: BioRad Laboratories GmbH (München), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Invitrogen (Leck, NL), MBI Fermentas (St. Leon Rot), New England BioLabs (Frankfurt), PeqLab (Erlangen), Promega (Madison, USA), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich (Steinheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen). Applied Biosystems (Darmstadt), Biometra (Göttingen), Eppendorf (Hamburg), Heraeus (Osterode), Millipore (Eschborn), MWG Biotech (München), Serva (Heidelberg), Schott Glaswerke (Mainz), Sorvall (Bad Homburg), Whatman (Maidstone, GB).

3.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

Innerhalb dieser Arbeit wurde der *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) Ökotyp Columbia 0 (Col.0) als Wildtyp-Referenz und zur Erzeugung transgener Linien eingesetzt. Weiterhin wurde eine T-DNA Insertionsmutante der photorespiratorischen Phosphoglykolat Phosphatase (PGLP) verwendet (*pglp1-1*; Schwarte *et al.*, 2007). Die Aussaat der Samen erfolgte auf einem Erde-Vermiculit-Gemisch (im Verhältnis von 4:1), welches zuvor mit einem Wasser-Dünger-Gemisch (0,2% Wuxal, Aglukon) bis zur Sättigung gestaut wurde. Zur Synchronisation der Keimung erfolgte eine 2-tägige Stratifikation bei 4°C. Die anschließende Kultivierung der Pflanzen (Wildtyp und *PGLP*-Überexpressionslinien) erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in dafür vorgesehene Pflanzenanzuchtkammern (Percival) unter Normalluftbedingungen (380 µL/L CO₂). Dabei erfolgte das Wachstum (soweit nicht anders vermerkt) mit einer Standard-Photoperiode von 10 h Tag und 14 h Nacht, einer Temperatur von 20/18°C (Tag/Nacht), ~70% relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von ca. 120 µmol m⁻² s⁻¹. Die Anzucht der *Arabidopsis pglp1-1* Mutante und der *PGLP*-Antisenselinien erfolgte unter den gleichen Bedingungen, jedoch wurde die Luft mit 1% CO₂ versetzt, um das Wachstum zu ermöglichen.

3.3 Bakterien

Die innerhalb der Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Dabei dienten die *Escherichia coli* Stämme zur Herstellung verschiedener rekombinanter Plasmide und die *Agrobakterium tumefaciens* Stämme der Transformation von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen.

Tabelle 3-1 Bakterienstämme zur Transformation

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
BL21-Gold (DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , <i>Tet</i> ^R , <i>gal</i> , λ (DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i>	Invitrogen
DH5 α	F ⁻ <i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> <i>gyrA96</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> Δ <i>lacZM15</i> <i>hsdR17</i>	Invitrogen
<i>Agrobakterium tumefaciens</i>		
GV3101+pSOUP	pMP90 (pTiBo542 Δ T-DNA) pSOUP in C58C1; <i>Rif</i> ^R , <i>Gent</i> ^R , <i>Tet</i> ^R	

3.4 Verwendete Reaktionskits

Tabelle 3-2 Verwendete Reaktionskits

Art des Kits	Hersteller	Verwendungszweck
PlantRNA-Kit	Macherey&Nagel (Düren)	Isolierung von RNA
peqGOLD Gel Extraction Kit	PeqLab (Erlangen)	Aufreinigung PCR Produkte

3.5 Verwendete Enzyme

Tabelle 3-3 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
CIAP-Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNAseI	Fermentas (St. Leon-Rot)
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)

3.6 Größenstandards

Tabelle 3-4 Verwendete Größenstandards für Elektrophoresen und Chromatografien

Marker	Hersteller
1 kb Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Unstained Protein MolecularWeight Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
HPLC-Standard, 21 proteinogene AS + Glycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GC-Standard	Sigma-Aldrich und Roth

3.7 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide dienten der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zu Klonierungszwecken und Überexpression, dem Screening von Mutanten, sowie zur Sequenzierung (Seqlab, Göttingen). Die Ableitung der Nukleotidsequenz genspezifischer Primer basiert auf der bekannten Genomsequenz von Arabidopsis (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Zur zielgerichteten Klonierung verschiedener Zielfragmente wurden spezifische Restriktionsschnittstellen in die Primer inseriert (unterstrichene Bereiche in der Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5'→3')	Schnittstelle	Stock (PUR)
Primer zur Sequenzierung (pGEMT Vektor)			
pUC/M13_fw	GCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	-	P217
pUC/M13_rev	AGCGGATAACAATTTCACACAGG	-	P218
Klonierprimer			
Primer für das AtPGLP-Antisense Konstrukt 1089 bp			
antiAtPGLP-S-EcoRI	<u>GAATT</u> CATGCTGAGTAGATCAGTTGCTTCT	EcoRI	P520
antiAtPGLP-AS-SacI	<u>GAGCT</u> TTATACAGTTGCGGCTTCGGAGA	SacI	P521
Primer für AtPGLP-Komplementations Konstrukt 1089 bp			
compAtPGLP-S-SacI	<u>GAGCT</u> CATGCTGAGTAGATCAGTTGCTTCT	SacI	P518
compAtPGLP-AS-EcoRI	<u>GAATT</u> CTTATACAGTTGCGGCTTCGGAGA	EcoRI	P519
Primer für AtPGLP-Überexpression 1089 bp			
overAtPGLP-S-PstI	<u>CTGCAG</u> ATGCTGAGTAGATCAGTTGCTCT	PstI	P656
overAtPGLP-AS-PstI	<u>CTGCAG</u> TTATACAGTTGCGGCTTCGG	PstI	P673
Primer für PGM 1872 bp			

Material

PGM-S-Nhel	<u>GCTAGCATGACGTCGAGGTACACGGAGAT</u>	Nhel	P741
PGM-AS-Xhol	<u>CTCGAGTCATGTAATGACAGTGGGCTTCT</u>	Xhol	P742
Primer für pPGI 1842 bp			
pPGI-S-EcoRI	<u>GAATT CATGGCCTCTCTCAGGCCTATA</u>	EcoRI	P743
pPGI-AS-HindIII	<u>AAGCTTTATGCGTACAGGTACATCCACAT</u>	HindIII	P744
Primer für TPI 765 bp			
TPI-S-EcoRI	<u>GAATT CATGCCAGAAAGTTCTCGTCG</u>	EcoRI	P749
TPI-AS-Xhol	<u>CTCGAGTTAGGCACCTTCTTCACCTCTG</u>	Xhol	P750
Kontrollprimer			
35S-Prom-S	AAA CTA GTG TAC CCC TAC TCC AAA AAT GTC AA		P246
ST_LS1-S	GGA TCC CCA AGT TTT TTT GTT GTT TCT		P278
35S-Term-AS	CGA TAT CGA TCT GGA TTT TAG TAC T		P363
mLB1	AAT CAG CTG TTG CCC GTC TCA CTG GTG AA		P206
AtNPL1-S1	CTG TCA CTC ACC TTA CTG ATG CTC		R391
AtNPL1-A1	CAG TAC CCT GAG TTCTAC AGA GTG		R392
40S16forward	5'-GGC GAC ACA ACC AGC TAC TGA-3'		P444
40S16revers	5'-CGG TAA CTC TTC TGG TAA CGA-3'		P445
Primer für qRT-PCR			
PGLP1-fw-RT	CAGAATGGCGGTTGTAAGAC		P393
PGLP1-rev-RT	GGCTCCCTAACGTCACCGGCCTTG		P394
PGM-fw-RT	TGATCGTGTGCCGAGAAGTTGAAGC		P567
PGM-rev-RT	AGTTCCATAAACGTCACCGGCCTTG		P568
PGI-fw-RT	GCAGTGCCTGGAGTCTTAC		P569
PGI-rev-RT	GCGTCCCTGGTAATGAGTTG		P570
TPI-fw-RT	AAC TCT TGG GTT GGG AAA GG		P716
TPI-rev-RT	TTG TGC TTG CTG AGG AGA TG		P717
SBPase-fw-RT	AGTGGAAAGGTGGGTTAGTG		P714
SBPase-rev	AACCATTCCCTCCGGTGTATC		P715

3.8 Vektoren

In der vorliegenden Arbeit kamen für die zielgerichtete Klonierung und der Transformation von Arabidopsis drei verschiedene Vektoren zum Einsatz. Für die Überexpression von Proteinen wurde der Vektor pET28a bzw pASK-IBA6 verwendet. In der Tabelle 3-6 sind die verwendeten Vektoren aufgelistet und in Tabelle 3-7 sind die erzeugten, rekombinanten Vektoren aufgelistet.

Tabelle 3-6 Übersicht der verwendeten Vektoren

Vektor	Größe (bp)	Relevante Merkmale	Herkunft / Referenz
pGEM®-T	3000	P _{T7} , lacZ start codon, lacoperon, Amp ^R , linearisiert über EcoRV, 3'-term. T-Überhang	Promega
P35S-CaMV Backbone	677 + 2175	35S-Promotor, 35S-Terminator, Amp ^R	pGreen
pET28a	5369	P _{T7} , ATG, C-term. 6×HIS-Tag, Kan ^R	NOVAGEN®
pGII0229	2495	lac operon, BASTA ^R , Kan ^R	pGreen
pASK-IBA6	3306	Strep-tag, Amp ^R , tet-promotor, OmpA, factor Xa, f1 origin	©iba

Tabelle 3-7 Übersicht der Rekombinanten Vektoren

Bezeichnung	Vektor	exogenes Gen	Schnittstelle n der Insertion (fw/rv)	Insert (bp)	Primer
pGemt+AtPGLP1comp	pGemt	PGLP1	Sacl/EcoRI	1089	P518/P519
pGemt+AtPGLP1anti	pGemt	PGLP1	EcoRI/Sacl	1089	P520/P521
pGemt+AtPGLP1over	pGemt	PGLP1	PstI	1089	P656/P673
35-S+PGLP1comp	35-S	PGLP1	Sacl/EcoRI	1089	P518/P519
35-S+PGLP1anti	35-S	PGLP1	EcoRI/Sacl	1089	P520/P521
pGII0229_35-S_PGLP1comp_Ter	pGII0229	PGLP1	EcoRV	1739	P246/P363
pGII0229_35-S_PGLP1anti_Ter	pGII0229	PGLP1	EcoRV	1739	P246/P363
pGII0229_STLS1_PGLP over_Ter	pGII0229	PGLP1	PstI	2918	P278/P363
pet28a_PGM	pet28a	PGM	Nhel/Xhol	1872	P741/P742
pet28a_pPGI	pet28a	pPGI	EcoRI/HindIII	1842	P743/P744
pASK-IBA6_TPI	pASK-IBA6	TPI	EcoRI/Xhol	765	P749/P750

4 Methoden

4.1 Kultivierung und Anzucht

4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde (soweit nicht anders vermerkt) bei 37°C kultiviert. Das Wachstum in Flüssigkulturen erfolgte in Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern auf einem Rotationsschüttler (160-180 rpm). Die Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Zur Kultivierung wurde mit Luria Bertani (LB) Medium (Sambrook et al., 1989) gearbeitet.

LB-Medium: Das LB-Medium bzw. der LB-Agar wurden als Fertigmedium bei der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG bestellt, nach Herstellerangaben in A. bidest. gelöst und autoklaviert.

YEB-Medium:

5 g Fleischextrakt
1 g Hefeextrakt
5 g Pepton
5 g Saccharose

auf 1 l aufgefüllt, pH 7,2 eingestellt, autoklaviert, nach Autoklavieren 2 mM MgSO₄ (Endkonzentration) dazugegeben.

Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Antibiotika, welche abhängig vom verwendeten Bakterium sowie dem aufgenommenen Vektor war (siehe Tabelle 4-1). Zur Langzeit-Erhaltung der erzeugten Transformanden wurden 700 µl einer 5-ml-„Über Nacht“ (ÜN)-Kultur mit 300 µl 79 % [v/v] Glycerol (autoklaviert) versehen, zwei Stunden geschüttelt, in flüssigen N₂ Schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4-1 Übersicht der Vektorresistenzen und deren eingesetzte Konzentrationen

Antibiotikum	<i>E. coli</i>					<i>A. tumefaciens</i>
	pGEM-T	pet28a	pASK-IBA6	35S-Kassette	pGII0229/pGII0179	
Ampicillin	100 µg/ml	-	100 µg/ml	100 µg/ml	-	-
Kanamycin	-	50 µg/ml	-	-	50 µg/ml	50 µg/ml
Rifampicin						100 µg/ml
Tetracyclin						10 µg/ml
Gentamycin						25 µg/ml

4.1.2 Kultivierung von Agrobacterium tumefaciens

Die Anzucht und Selektion von *A. tumefaciens* erfolgte in flüssigem YEB-Medium bei 28°C (160 rpm). Die Kultivierung auf YEB-Agarplatten erfolgte bei 28 °C über zwei Tage im Brutschrank. Zur Selektion erfolgte die Zugabe der spezifischen Antibiotika für die Plasmide und *A. tumefaciens* (GV3101-pSOUP) Kanamycin (25 µg ml⁻¹), Rifampicin (100 µg ml⁻¹), Gentamycin (25 µg ml⁻¹) und Tetracyclin (10 µg ml⁻¹). Die Herstellung der Erhaltungskulturen erfolgte wie die für *E. coli* (siehe 4.1.1).

4.2 Molekularbiologie

4.2.1 Isolation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA aus Blattmaterial wurde eine modifizierte Form der Methode nach Murray und Thompson (1980) angewendet. Das Pflanzenmaterial wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit der Retschmühle MM400 (Retsch®GmbH, Haan) homogenisiert. Nach kurzem Antauen der Proben wurden 500 µl 2-fach CTAB-Puffer zur Lyse der Proben hinzugegeben und für 30 min bei 68°C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 3 µl RNase A-Lösung und eine Inkubation bei 37°C für 15 min, um die RNA-Verunreinigung abzubauen. Danach wurden 500 µl CI (24 Chloroform: 1 Isoamylalkohol) hinzugegeben, geschüttelt und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthält die genomische DNA und wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und nach Zugabe von 400 µl Isopropanol für 15 min auf Eis gefällt. Nach sich anschließender Zentrifugation (12000 rpm, 15 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol überschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation (12000 rpm, 10 min) wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Pellet getrocknet. Danach wurden 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8) auf das Pellet gegeben und für 10 min zum Lösen des Pellet geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 68°C für 2 min.

4.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979), in modifizierter Form, als alkalische Mini-Plasmidpräparation. Dazu wurden nacheinander 2 mal 2 ml einer ÜN-Kultur des entsprechenden Bakterienklons in 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min in der Tischzentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung I (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 15 mM EDTA, 50 mM Glucose) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II (1% SDS, 0,2 N NaOH) und vorsichtigem Invertieren wurden die Bakterienzellen lysiert. Nach 10-minütiger Inkubation (Raumtemperatur) wurde Lösung III (3 M Kaliumacetat, 20 % Essigsäure) dazugegeben, um durch Neutralisierung eine Renaturierung der Plasmid-DNA zu erreichen. Die chromosomal DNA liegt aufgrund ihrer Größe weiterhin denaturiert vor. Die Suspension wurde nach 15-minütiger Inkubation auf Eis mit 1 Volumenteil (VT) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und ausgeschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 VT Isopropanol versetzt und 30 min auf Eis gefällt. Danach wurden die Proben 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die ausgefällte DNA wurde dann mit 300 µl 70%-igen Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Pellet unter laminarem Luftstrom getrocknet. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in 30 µl TE-RNase (100:1) aufgenommen und mindestens 15 min unter Schütteln bei 5.000 rpm gelöst. Zur Inaktivierung der RNase folgte eine 5-minütige Inkubation bei 68 °C.

4.2.3 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA aus 100 mg Blattmaterial wurde das NucleoSpin® RNA Plant Kit von Macherey-Nagel verwendet. Dabei wurde nach dem beiliegenden Protokoll gearbeitet.

4.2.4 Herstellung von cDNA

Für die cDNA-Synthese wurden 2,5 µg RNA eingesetzt. Dazu wurde die zuvor isolierte RNA am Photometer vermessen, um deren Konzentration zu ermitteln. Das entsprechende Volumen an RNA wurde mit steriles Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 12 µl gebracht. Folgend wurde dann 1,0 µl Oligo(dT)-Primer gegeben, durchmischt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und kurz anzentrifugiert. Ein Mastermix mit 4,0 µl 5 x Erststrangspuffer, 2,0 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1,0 µl Ribolock (Ribonuklease-Inhibitor) pro Probe wurde vorbereitet und 7 µl davon in jede Probe gegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgte eine Inkubation (5 min, 37°C). Nach Zugabe von 1,0 µl M-MuLV (MoloneyMurineLeukemia Virus) Reverse Transkriptase wurden die Proben

Methoden

durchmischt und für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion der reversen Transkriptase wurde bei 70°C abgestoppt (15 min). Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm. Für eine PCR-Reaktion wurde die cDNA 1:50 mit sterilem Wasser verdünnt.

4.2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; nach Mullis 1986) dient der Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten aus einer geringen Menge Start-DNA. An die DNA-Matrize hybridisieren spezifische Primer und flankieren die Zielsequenz. Die PCR-Reaktion läuft in drei Teilschritten bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Bei 94°C wird die DNA zuerst denaturiert. Anschließend hybridisieren bei 58°C die spezifischen Primer an beide Matrizenstränge. Die DNA-Polymerase nutzt die Primer als Startmolekül und amplifiziert bei 72°C das gewünschte Fragment, womit ein Zyklus abgeschlossen ist. Dieser wird je nach Bedarf zwischen 25- und 40-mal wiederholt (siehe Tabelle 4-2). Für die PCR-Reaktionen wurde der Mastermix der Firma Qiagen verwendet. Dieser enthält alle notwendigen Bestandteile der PCR-Reaktion (dNTPs, Reaktionspuffer, *Taq*-Polymerase und MgCl₂). Für einen Standard PCR-Ansatz wurden 10 µl *Taq*-Mastermix (1.000 U) mit je einem 1 µl Primer (forward bzw. revers; 5 pmol µl⁻¹) versetzt, 1 µl DNA Template hinzugegeben und mit 7 µl steriles H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Tabelle 4-2 PCR-Programm für alle PCR-Reaktionen (NL58var)

Schritt	Zeit	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	2 min	94°C	
2. Denaturierung	1 min	94°C	
3. Annealing	1 min	58°C	
4. Elongation	1,30 min	72°C	
5. Finale Elongation	4 min	72°C	
6.	Pause	4°C	

} 34x

4.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld von der Anode zur Kathode. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit abhängig von der Größe der DNA-Fragmente, der Stromstärke und der Agarosekonzentration. Für die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde Agarose (1%) in 1 x TAE (1 l 50 x TAE enthält 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 57,1 ml Essigsäure, 242 g Tris in Aqua. dest gelöst) aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0,1 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid versetzt und in entsprechend große Horizontal-Gelkammern

Methoden

gegossen. Ethidiumbromid bildet mit den Basenpaaren der DNA einen Komplex und kann durch Licht der Wellenlänge 254-366 nm angeregt werden. Dadurch ist die DNA unter einem UV-Tisch sichtbar. Vor dem Probenauftrag wurde jeder Probe 0,2 VT Stopmix (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2% Bromphenolblau, 30% Glycerin) zugegeben. Als Größenstandard diente der 1KB-Ladder (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte bei 70-100 Volt in 1x TAE-Puffer. Die DNA-Banden wurden am UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

4.2.7 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen

Die nach PCR bzw. Restriktionsverdau notwendige Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit von Peqlab nach beiliegendem Protokoll durchgeführt.

4.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der pGEM®-T-Konstrukte erfolgte durch Seqlab (Göttingen). Eingeschickt wurden 1 µl des jeweiligen Plasmidisolates in 4,5 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) unter Zugabe von entweder je 1,5 µl pUC-forward oder reverse-Primer. Die Sequenzauswertung erfolgte mit dem Programm Bioedit (Ibis Biosciences, Carlsbad).

4.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung und Vervielfältigung von PCR-Produkten erfolgte über den Vektor pGEM®-T. Dazu wurden die gereinigten PCR-Fragmente in den Vektor ligiert. Dieses System nutzt die durch herkömmliche Polymerasen erzeugten 3'-Adenin-Überhänge der DNA-Fragmente, welche mit den 3'-Thymin-Überhängen des linearen Vektors Wasserstoffbrücken ausbilden. Die zugefügte Ligase verknüpft beide Doppelstränge über Phosphodiesterbindungen, wodurch ein zirkuläres Plasmid entsteht. Die Ligation gereinigter DNA-Fragmente in den pGEM®-T-Vektor erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 10 µl (3 µl DNA-Template, 0,5 µl Vektor, 1 µl T4 DNA-Ligase, 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer, 3,5 µl H₂O). Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C.

4.2.10 Transformation von *E. coli*

Die zur Transformation genutzten chemisch kompetenten *E. coli* Stämme wurden der Stammsammlung des Labors entnommen. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz (10-20 µl) bzw. 1 µl Plasmid-DNA zu den Bakterienzellen gegeben und vorsichtig gemischt. Darauf folgte eine 30-minütige

Methoden

Inkubation auf Eis, eine Hitzeschockbehandlung (42 °C, 90 s) und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Zur Regeneration der Bakterienzellen wurden dem Transformationsansatz anschließend 500 µl LB-Medium zugegeben und dieser für 1 h bei 37 °C im Schüttelschrank inkubiert (140 rpm). Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes und das übrig gebliebene Volumen des Transformationsansatzes auf zwei LB-Agarplatten mit Vektor-spezifischem Antibiotikum ausplattiert. Zur Verifizierung der erfolgreichen Transformation von pGEM®-T-Konstrukten enthielten die LB-Agarplatten zusätzlich IPTG und X-Gal (50mg/ml) zur Blau-Weiß-Selektion. Die Transformationsplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.11 Restriktion

Die Restriktion diente der Überprüfung von Plasmiden auf die erfolgreiche Integration der Zielfragmente. Die verwendeten Restriktionsenzyme und Puffersysteme wurden von Fermentas bezogen und nach Herstellerangaben angewendet (www.fermentas.com). Die spezifische Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte für 1-4 h oder über Nacht in einem 20 µl Reaktionsansatz.

Beispiel: 0,5 - 3,0 µl Plasmid-DNA

2,0 µl 10x Restriktionspuffer
0,3 - 0,6 µl Restriktionsenzym A (10 u µl⁻¹)
0,3 - 0,6 µl Restriktionsenzym B (10 u µl⁻¹)
x µl H₂O (auf 20 µl)

Zum Abstoppen der Restriktion wurden 4 µl Stopplösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2% Bromphenolblau, 30% Glycerin) hinzugefügt. Durch anschließende elektrophoretische Auftrennung wurde die Größe der entstandenen DNA-Fragmente überprüft und ggf. gewünschte Fragmente aus dem Agarosegel eluiert.

4.2.12 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die zur Transformation genutzten chemisch kompetent gemachten Agrobakterienzellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu den 100 µl Bakterienzellen wurden 5 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA gegeben. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis, danach 5 min in flüssigem Stickstoff und anschließend 7 min bei 37 °C. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 1 ml YEB-Medium versetzt und 4 h bei 28 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden 200 µl der Kultur und das restliche Volumen des Transformationsansatzes auf zwei YEB-Agarplatten mit Vektor- und Bakterien-spezifischen Antibiotika ausplattiert und bis zu vier Tage bei 28 °C inkubiert.

4.2.13 Transformation von *Arabidopsis*

Die Transformation der *Arabidopsis* erfolgte nach der Blütentauchmethode (Clough & Bent, 1998; Desfeux *et al.*, 2000). Dazu wurden 100 ml Flüssigkultur des entsprechenden Agrobakterien-Klons für zwei Tage bei 28 °C inkubiert (140 rpm). Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, 20°C). Das Zellpellet wurde in 50 ml 5%iger Saccharose-Lösung resuspendiert. Der Zellsuspension wurde Silwet L77-Lösung (Spiess Urania Chemicals, Hamburg) zu einer Endkonzentration von 0,05% zugegeben. Nachdem die Pflanzen von bereits gereiften Schoten befreit wurden, erfolgte die Transformation, wobei die geschlossenen Blüten in die Agrobakterien-Lösung getaucht wurden. Die so behandelten Pflanzen verblieben etwa 24 h bei Raumtemperatur zum Trocknen (Schwachlicht) und wurden anschließend in der Klimakammer bis zur Samenreifung kultiviert (Wildtyp bei Normalluft; *pgl/p1* bei 1% CO₂). Um den Verlust von Samenmaterial zu vermeiden, wurden die Sprosse der Pflanzen rechtzeitig in Papiertüten eingehüllt. Nach vollständiger Reife wurden die Sprosse abgeschnitten und in den Tüten getrocknet. Das getrocknete Saatgut wurde im Anschluss durch Aussieben gewonnen. Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte nach Aussaat auf Erde-Vermiculit-Gemisch durch Besprühen mit BASTA. Die transgenen Pflanzen haben eine BASTA-Resistenz durch das bei der Transformation mit eingeführte *bar* Gen. BASTA ist ein Herbizid das Glufosinat (200 g/L) enthält und nicht resistente Pflanzen abtötet, indem die Synthese von Glutamin blockiert wird.

4.3 Arbeiten mit Proteinen

4.3.1 Proteinisolation aus *Arabidopsis*

Für die Proteinisolation wurde 100 mg Pflanzenmaterial geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit der Retschmühle wurden die Blattproben homogenisiert und folgend mit 10 µl NaHSO₃ + Pefablock (60 mM NaHSO₃, 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) versehen. Die Suspension wurde bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und gekühlt aufbewahrt.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Quantifizierung von Proteinmengen in wässriger Lösung wurde das Verfahren nach Bradford (1976) genutzt. Bei dieser Methode reagiert der Farbstoff Coomassie Brillantblau G250 (CGGB) unter sauren pH-Bedingungen mit den positiv geladenen und unpolaren, hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm. Die Absorption der Probe bei 595 nm ist proportional zur enthaltenen Proteinmenge. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Roti®-Nanoquant (Roth) nach Herstellerangaben. Die Roti®-Nanoquant Stammlösung wurde 1:5 verdünnt. Von dieser Arbeitslösung wurden dann 800 µl in eine 1 ml Küvette gegeben. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl der zu bestimmenden Proteinlösung (1:40 verdünntes Protein; 5 µl Protein in 195 µl H₂O_{dd}). Bei RT wurde die Absorption bei 590 nm und 450 nm gegen Wasser (Blindwert) gemessen. Zur Konzentrationsberechnung wurde die folgende Standard-Verdünnungsreihe verwendet, wobei BSA immer in dem jeweiligen verwendeten Proteinisolationspuffer gelöst wurde.

BSA (µg/ml)	0	1	2,5	5	10	25	50	75	100
----------------	---	---	-----	---	----	----	----	----	-----

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale, diskontinuierliche Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) ist eine analytische Methode zur Bestimmung der Proteingröße. Die Behandlung der Proteine mit dem Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung der Proteine ihrer Molekülmasse entsprechend. Dabei lagert sich an jede Aminosäure ein negativ geladenes Molekül SDS, wodurch die Eigenladung überdeckt wird. Die daraus resultierende negative Ladung ist proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Die diskontinuierliche PAGE zeichnet sich dadurch aus, dass die Proteine im Sammelgel aufkonzentriert werden, sodass die Bandenschärfe erhöht wird.

Methoden

Als Proteinstandard wurde der Protein Molecular Weight Marker der Firma Fermentas verwendet. Die Proteinproben (10 µg Protein) und der Proteinmarker wurden für die Spaltung der Wasserstoff und Schwefelbrücken mit 1/3 VT-3x Lämmli-Reagenz versetzt und 10 min bei 95°C aufgekocht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei 70 Volt für ca. 30 min bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Die weitere Auftrennung erfolgte bei 120 Volt für ca. 2 h bis die Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel lief.

Die Visualisierung der Proteine im Polyacrylamidgel erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Der tiefblaue Farbstoff Coomassie-Brillant Blau R-250 bindet unspezifisch an Proteine. Nach beendeter SDS-PAGE wurden die Gele vorsichtig aus der Apparatur entnommen und mindestens 1 h unter leichtem Schwenken in der Coomassie-Brillant Blau R-250-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Farbstoff durch mehrmalige Behandlung mit Entfärbungs-Lösung (40% Methanol, 10% Essigsäure, in Aqua dest.) aus dem Gel gewaschen. Nach Entfernung von Methanolresten mit destilliertem Wasser wurden die Gele gescannt und eingeschweißt.

4.3.4 Immunologische Nachweistechniken (Western-Blot)

Der Western-Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (SDS-Page) 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 Elektroblotter) der Firma Pharmacia verwendet. Als Stromstärke wurden 0,8 mA pro cm² Gel für 1,5 h angelegt. Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran zuerst in 4%iger Magermilch-Lösung geblockt (4°C, über Nacht). Dann erfolgte die Inkubation mit dem proteinspezifischen, primären Antikörper (1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C, Verdünnung 1:250 im Falle der PGLP1). Nach der Inkubation wurde die Membran 4 x 10 min in TBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgten die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase von Biorad, 1:5000 Verdünnung) und die Waschung der Membran (4 x 10 Minuten). Die Einleitung der Nachweisreaktion erfolgte durch die Zugabe der ECL-Reagenzien (Tabelle 4-3 und 4-4). 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 (von GE Healthcare) durchgeführt.

Methoden

Tabelle 4-3 Zusammensetzung der ECL-Lösung I

Reagenzien	Konzentration Stammlösung	Finale Konzentration	Stammlösung für 50 ml Lösung
Luminol (in DMSO)	250 mM 0,443 g/10ml	2,5 mM	0,5 ml
p-Coumaric Acid (in DMSO)	90 mM 0,148 g/10ml	400 µM	0,22 ml
Tris-HCl, pH 8,5	1 M 24,228 g/200 ml	100 mM	5 ml

Tabelle 4-4 Zusammensetzung der ECL-Lösung II

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

4.4 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

4.4.1 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Expression größerer Mengen rekombinanter Proteine wurden 300 ml LB-Flüssigkultur inklusive Ampicillin mit 100 µl einer Vor-Kultur des entsprechenden Klons angeimpft und im Schikanekolben (wenn nicht anders vermerkt) bei 30 °C für ca. 6 h angezogen (170 rpm). Für AtPGLP eignete sich eine Kultivierungstemperatur von 20 °C am besten. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch die Zugabe von 20 %iger Arabinose. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (10.000 rpm, 4 °C, 15 min). Das Zellpellet wurde in 15 ml Homogenisationspuffer (20 mM Natriumphosphat pH 7,4; 500 mM NaCl) resuspendiert, das Homogenat in ein 50 ml Falcon überführt und erneut zentrifugiert (8000 rpm, 4 °C, 10 min). Das Zellpellet wurde bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

4.4.2 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis bzw. bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in 5 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und die Zellen mithilfe von Ultraschall (Labsonic U B. Braun) 4 x 30 sec bei 90 W mit einer Pause von 30 sec aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10.000 rpm, 20 min, 4°C) abgetrennt und der Überstand (Lysat) für die Affinitätschromatografie genutzt. Zur Kontrolle wurden sowohl vom Lysat als auch vom in 5 ml Homogenisationspuffer resuspendierten Pellet 50 µl als Probe genommen und zur Lagerung eingefroren.

4.4.3 Affinitätschromatografie

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte über Affinitätschromatografie an Ni-NTA-Säulen. Diese Methode beruht auf der Bindung des Histidin-Restes (His-tag) des rekombinanten Proteins an die Ni²⁺-Ionen der Säulenmatrix, welche durch die in der Säulenmatrix enthaltene Nitritotriessigsäure immobilisiert sind. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgt durch Imidazol, welches mit den Histidin-Resten der Proteine um die Ni²⁺-Ionen konkurriert. Bei steigender Imidazol-Konzentration verdrängt dieses das Protein von der Säulenmatrix. Für die Aufreinigung wurden 3 ml ProBondSlurry (Invitrogen) Säulenmatrix in eine Säule gegeben. Nach Absetzen des Säulenmaterials und Equilibrierung mit 6 ml Homogenisationspuffer wurde das geklärte Proteinlysat auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Es folgten drei Waschschrifte mit Waschpuffer 1 (20 mM Natriumphosphat pH 7,4; 500 mM Natriumchlorid; 20 mM Imidazol), Waschpuffer 2 (20 mM Natriumphosphat pH 7,4; 500 mM Natriumchlorid; 40 mM Imidazol) und Waschpuffer 3 (20 mM Natriumphosphat pH 7,4; 500

Methoden

mM Natriumchlorid; 80mM Imidazol). Die Elution erfolgte durch Zugabe von 3 x 1 ml Elutionspuffer 1 (20 mM Natriumphosphat pH 7,4; 500 mM Natriumchlorid; 300 mM Imidazol). Von den einzelnen Fraktionen (Durchfluss, Waschung 1, Waschung 2, Elution 1, Elution 2, Elution 3) wurden 100 µl als Probe für SDS-PAGE eingefroren.

4.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten

4.5.1 Phosphoglykolatphosphatase-Aktivität

Die PGLP-Aktivität wurde nach der beschriebenen Methode von Somerville und Orgren (1979) gemessen. Dazu wird ein Reaktionspuffer mit 5 mM HEPES (pH 6,3) benötigt, der zusätzlich noch 40 mM Natrium Cacodylat, 5 mM Citrat, 5 mM Zinksulfat und 0,5 mM EDTA enthält. Zum Reaktionsansatz kommt 2 mM 2 Phosphoglycolat und gestartet wird die Reaktion durch Zugabe des Proteins. Nach 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten werden Aliquots entnommen und zum Messmix, bestehend aus 1 Teil Lösung 1 (10 %iges Ascorbat) und 6 Teile Lösung 2 (Molybdatkomplex 0,42% $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ in 1 N Schwefelsäure) gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei 45°C wird das freigewordene Phosphat bei 820 nm photometrisch (Ames, 1966) erfasst.

4.5.2 Phosglukomutase-Aktivität

Die Messung der PGM-Aktivität erfolgte nach der in der Literatur beschriebenen Methode (Hattenbach und Heineke, 1999) in 250 µl eines 100 mM Tris-HCl-Puffers (pH 8,0), der 10 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 1 mM glucose-1,6-bisphosphate, 1 U glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und rekombinantes PGM-Enzym enthält. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 1 mM Glucose-1-Phosphat gestartet. Die Messung erfolgt bei 25 °C und 340 nm, wobei die Reduktion von NADP⁺ bestimmt wird.

4.5.3 Phosglukoisomerase-Aktivität

Die Messung der PGI-Aktivität erfolgte nach Jones *et al.*, 1986 in 250 µl 200 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0) mit 4 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 1 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und rekombinantes PGI-Enzym. Gestartet wurde die Reaktion mit der Zugabe von Fructose-6-Bisphosphat. Die Messung erfolgt bei 25 °C und 340 nm, wobei die Reduktion von NADP⁺ bestimmt wird.

4.5.4 Triosephosphat Isomerase-Aktivität

Die Messung der TPI-Aktivität (Ito *et al.*, 2003) wurde in 250 µl eines 300 mM Triethanolamin-Puffers durchgeführt, der 10 mM EDTA, 1 mM NADH, 1 U Glycerophosphat Dehydrogenase und 1 mM DL-glyceraldehyd-3-Phosphat enthält. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe des rekombinanten Enzyms TPI. Die Kinetik wurde dann bei 340 nm am Photometer aufgenommen und dabei die Oxidation von NADH veranschaulicht.

4.6 Messung Chlorophyll a Fluoreszenz mittels Imaging PAM (I-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. Die maximale Fluoreszenz wurde zum einen 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 (YPSII) wurde nach der Formel: $YPSII = (F_{m'} - F_s)/F_{m'}$, berechnet, wobei F_s die steady state Fluoreszenz angibt. Darauf basierend wurden die absoluten Elektronentransportraten um das PSII bei einer gegebenen Lichtintensität durch die Formel: $ETR = YPSII \times PPFD \times 0,84 \times 0,5$ berechnet. Die angegebenen Faktoren beruhen auf der Annahme, dass 84 % des eingestrahlten Lichts vom Blatt absorbiert werden (Faktor 0,84) und das zum Transport eines Elektrons durch die beiden Photosysteme zwei Quanten notwendig sind (Faktor 0,5).

4.7 Messungen des Gaswechsels (Li-Cor 6400)

Die Messungen von photosynthetischen Parametern, wie der Photosyntheserate (A) und dem CO₂-Kompensationspunkt (Γ_{21}), erfolgte mit dem Licor Li-6400-Gaswechselsystem (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg). 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. 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. 10 min erfolgte die jeweilige Bestimmung der Parameter mit einer Lichtintensität (PPFD: *photosynthetic photon flux density*) von 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, welche durch eine im System integrierte rot/blau LED-Lichtquelle ausgestrahlt wird. Die Standardmessungen erfolgten unter Normalluft (21% Sauerstoff, 400 $\mu\text{l/L}$ CO₂) und mit einer Blatttemperatur von 25°C. Die Berechnung der Photosyntheserate und des CO₂-Kompensationspunktes sowie die statistische Auswertung erfolgten mit dem Programm Excel. Der Licor 6400 wurde auch für die Messung der Lichtkurven verwendet. Dazu wurde die Lichtintensität auf verschiedene Stufen eingestellt (0; 20; 50; 100; 200; 500; 750; 1000; 1250 und 1500 μE), die nacheinander auf das Blatt ausgestrahlt wurde. Die statistische Auswertung hierfür erfolgte ebenfalls mit dem Microsoft Office Programm Excel. Zur Ermittlung des Kompensationspunktes wurde die gemessene Photosyntheserate gegen die CO₂-Konzentration aufgetragen und durch lineare Regression der Schnittpunkt mit der x-Achse berechnet. Für die Ermittlung der maximalen Photosyntheserate (Pmax) wurden die Lichtintensitäten gegen die entsprechenden CO₂-Konzentrationen verrechnet. Dazu wurde die Formel: $P = P_m (1 - \exp(-\alpha * I/P_m)) + R$ mit der Solver-Funktion von Excel eingesetzt.

4.8 Enzymatischer Nachweis und Quantifizierung von Stärke aus Pflanzenmaterial

Für die Stärkebestimmung (Cross *et al.*, 2006) aus Frischmasse wird 40-60 mg Blattmaterial in flüssigen Stickstoff schockgefroren und an der Retschmühle homogenisiert. Danach wird 1 ml 80%iger Ethanol zugegeben und die Proben 15 min bei 80 °C geschüttelt. Es folgt eine Zentrifugation mit 20.000 g bei Raumtemperatur für 10 min. Der Überstand wird verworfen und kann ggf. für andere Messungen genutzt werden. Die Ethanolzugabe, die Inkubation schüttelnd bei 80 °C und die Zentrifugation werden wiederholt und der Überstand wieder verworfen. Es folgt eine Waschung des Pellet mit 1 ml eisgekühltem Wasser und vortexen. Nachdem das Pellet getrocknet ist (30 Min Speed-Vac), werden 500 μl 200 mM KOH zugegeben, gevortext und dann für mindestens 45 min bei 95°C inkubiert. Es folgt eine Abkühlung für 10 min auf Eis. Zur Neutralisation werden 88 μl 1 M Essigsäure zugegeben,

Methoden

kurz geschüttelt und für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Es werden 50 µl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zum Überstand 3,5 U a-Amylase und 2,5 U Amyloglucosidase in 20 µl 0,1 M Na-Acetat (pH 4,6) hinzugesetzt. Die Proben vortexen oder 10 Minuten schütteln lassen, danach bei Raumtemperatur über Nacht inkubieren. Am Folgetag erfolgt eine Denaturierung der Enzyme durch Inkubation der Proben bei 95 °C für 5 Minuten. Danach kommen die Proben sofort für 10 Minuten auf Eis und werden dann für 10 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird dann für den Glucose-Assay verwendet.

Für den Assay am Plattenreader (Volumen von 200 µl) wird ein Reaktionsmix aus 50 mM Tricin (pH 7,8), 2,5 mM MgCl₂, 0,75 mM ATP, 0,5 mM NADP⁺ und 1,2 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase verwendet. 20-60 µl des Überstandes, je nach Tageszeit der Probennahme, werden zum Reaktionsmix gegeben und eine Basislinie bei 340 nm aufgenommen. Mit Zugabe von 1,5 U/ml Hexokinase wird die Reaktion gestartet und bei 340 nm die Kinetik für 30 Minuten aufgenommen.

4.9 Quantitative Bestimmung der löslichen Zucker mittels Gaschromatografie

Für die Gaschromatografie (Sievers *et al.*, 2013) wird 100 mg Blattmaterial (Gewicht bestimmen, da für Berechnung notwendig) in flüssigem Stickstoff gefroren und mit der Retschmühle homogenisiert. Dann wird 1 ml 80 % HPLC-Ethanol zugegeben und die Probe für 2 h bei 68 °C inkubiert. Die Proben werden auf Raumtemperatur abgekühlt und für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt und im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt. Auf das Pellet werden 500 µl 80 % HPLC-Ethanol gegeben, für 1 min geschüttelt und dann über Nacht bei 68 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die inkubierten Proben für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird mit dem ersten Überstand vereinigt und für 5 min bei 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Danach wird der Überstand auf zwei verschiedene 2 ml Eppendorfgefäß verteilt und ein Gefäß als Back-up im Kühlschrank verwahrt. In das andere Gefäß wird als Standard 10 µl Ribitol (10 µl = 50 µg) gegeben, gemischt und dann über Nacht in der Lyophilie gefriergetrocknet. Am nächsten Tag wird dann 500 µl HPLC-Wasser auf die getrockneten Proben gegeben, für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und dann für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand kommt in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß und wird über Nacht lyophilisiert. Es folgt die Zugabe von 65 µl Pyridin/Methoxylamin (20 mg Methoxylamin in 1 ml Pyridin gelöst)) und eine Inkubation von 90 min bei 30 °C. Danach werden 35 µl BSTFA Kit (N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid von SUPELCO) zugegeben und nochmal 90 min bei 68 °C geschüttelt. Zum Schluss werden die Proben abzentrifugiert und 70 µl für die Analyse am Gaschromatographen eingesetzt.

4.10 Quantitative Bestimmung der Aminosäuren mittels HPLC

Für die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) wird 100 mg Blattmaterial (Gewicht bestimmen, da für Berechnung notwendig) in flüssigem Stickstoff gefroren und mit der Retschmühle homogenisiert. Dann wird 1 ml 80 % HPLC-Ethanol zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird für 10 min bei 20.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C für 2-3 h vorgefroren, um dann über Nacht in der Lyophille gefriergetrocknet zu werden. Am nächsten Tag wird Puffer A (20 ml 0,4 M Na₂HPO₄ pH 6,8 + 4 ml THF (Tetrahydrofuran) steril filtrieren und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen) auf die getrocknete Probe gegeben. Bei 100 mg Blattmaterial wird 1.000 µl Puffer zugegeben bzw. bei 990 mg Material sind es 990 µl Puffer A. Die Proben werden 30 min geschüttelt und in einem neuen Eppendorfgefäß mindestens 1 ml einer 1:50 (evtl. auch 1:25) Verdünnung mit Puffer A hergestellt. Mit einer Spritze und HPLC-Filter wird die Probe filtriert und in HPLC-Röhrchen überführt, so dass sie für die Analyse eingesetzt werden kann.

4.11 Metabolitbestimmung durch GC-MS und LC-MS/MS

Für die Analyse durch Gas-Chromatografie, gekoppelt an Massen Spectrometrie (GC-MS), wurden Proben zur Mitte des Tages (MoD - 5 h Licht) genommen, jeweils unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%) und in Normalluft (0.039% CO₂). Das Blattmaterial wird geerntet, unmittelbar gefroren in flüssigen Stickstoff und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Für die Metabolit-Analyse werden 50 mg von vollständig entwickelten Rosettenblättern von fünf biologischen Replikaten (Wachstumsphase 5.1) genommen. Die Metabolit Extraktion, Derivatisierung und Analyse wurden wie in Lisec *et al.* (2006) beschrieben durchgeführt.

Für die Analyse mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde das gleiche Pflanzenset, gleicher Probenzeitpunkt und gleiche Wachstumsbedingungen wie bei GC-MS verwendet. Zur Metabolit Bestimmung wurden 20 mg vom Blattgewebe verwendet und exakt so verfahren wie in Arrivault *et al.* (2009) beschrieben.

4.12 Transkriptanalyse auf mRNA-Ebene mit qRT-PCR

Für die qRT-PCR wird 100 mg Blattmaterial geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren. An der Retschmühle wird das Material homogenisiert und dann die RNA aus dem Blatt mit dem NucleoSpin® RNA Plant Kit von Macherey-Nagel isoliert. Anschließend erfolgt die cDNA-Synthese (4.2.4) von 2,5 µg RNA. Die cDNA Mengen werden mit Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion für das konstitutiv exprimierende S16 Gen vom ribosomalen 40S Protein kalibriert. Für die qRT-PCR wurde das LightCycler 1.5 System von Roche und SYBR Green fluorescence (Roche) verwendet. Zur Normalisierung der Gen Expression wurde das konstitutiv exprimierende Referenzgen amplifiziert und der durchschnittliche Zyklus-Schwellenwert ($n = 3$) wurde für die Berechnung relativer Expressionswerte genutzt. Die Expression der ausgewählten Gene wurde durch die Subtraktion ihrer Zyklenschwellenwerte vom Mittelwert des Kontrollgenes normalisiert. Der Wildtyp wurde dann willkürlich auf 1 gesetzt.

5 Ergebnisse

Die Rubisco ist für die Fixierung von CO₂ in allen oxygene Photosynthese betreibenden Organismen verantwortlich. Bei der Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) entstehen zwei Moleküle 3-PGA, die direkt in den Calvin-Benson-Zyklus (CBZ) eingehen und für den Aufbau organischer Substanzen verwendet werden. Während der Oxygenasereaktion der Rubisco entsteht neben 3-PGA auch 2-PG. Dieser Metabolit ist toxisch, er kann nicht im CBZ verstoffwechselt werden und auch in keinem anderen Stoffwechselweg. Er inhibiert die Triosephosphatisomerase (Anderson, 1971) und die Phosphofruktokinase (Kelly und Latzko 1976). Durch die Photorespiration wird 2-PG in 3-PGA umgewandelt, so dass der Kohlenstoffverlust verringert und ein Anstau von 2-PG verhindert wird. Die PGLP ist das Eingangsenzym der Photorespiration und hydrolysiert 2-PG zu Glykolat. Ein Verlust der PGLP zieht einen besonders drastischen Phänotyp nach sich. Die Mutante weist nicht den klassischen photorespiratorischen Phänotyp auf (Somerville, 20001), da sie selbst bei 1 % CO₂ nicht das Wachstum der Wildtyp-Kontrolle erreicht und eine besonders starke Reduktion der Photosynthese aufweist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die Bildung geringer Mengen an 2-PG auch in einer hoch-CO₂-Atmosphäre die CO₂-Assimilation deutlich hemmt. Da es sich bei der *pglp1*-Mutante um ein sehr artifizielles Untersuchungsobjekt handelt, welches unter Umständen eine Reihe pleiotropher Effekte beinhaltet, wurden im Rahmen dieser Arbeit transgene Linien mit verschiedenen Reduktionen und Steigerungen im PGLP-Gehalt generiert und umfassend physiologisch charakterisiert. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die potentielle Rolle der Photorespiration und des 2-PG bei der Kohlenstoffassimilation gelegt.

5.1 Die genetische Komplementation der *pglp1*-Mutante

Die Arabidopsis *PGLP*-Mutante (Schwarze und Bauwe, 2007) ist eine der stärksten photorespiratorischen Mutanten, da sie selbst unter hohen CO₂-Konzentrationen ein eingeschränktes Wachstum zeigt und in der Photosyntheseleistung beeinträchtigt ist (Timm et al., 2012; Timm und Bauwe, 2013). Um unspezifische Hintergrundmutationen ausschließen zu können, die diesen artifiziellen Phänotyp hervorbringen, wurde *pglp1* genetisch komplementiert. Für die Komplementation wurde die gesamte kodierende Sequenz der Arabidopsis *PGLP* in *pglp1* eingebracht. Für eine hohe Transkriptionsrate des Gens wurde der starke, konstitutive Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV) 35S Promotor (Abb. 5-1) verwendet. Die Terminatorsequenz stammt ebenfalls aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus. Damit die *pglp1*-Mutante durch horizontalen Gentransfer das genetische Material aus *Agrobacterium tumefaciens* aufnehmen kann, wurde der binäre Vektor pGreen0229 verwendet (Abb. 5-1).

Ergebnisse

Dieser Vektor vermittelt Resistenz gegenüber dem Herbizid BASTA, sodass die resultierenden Transformanden mit BASTA selektiert werden konnten.

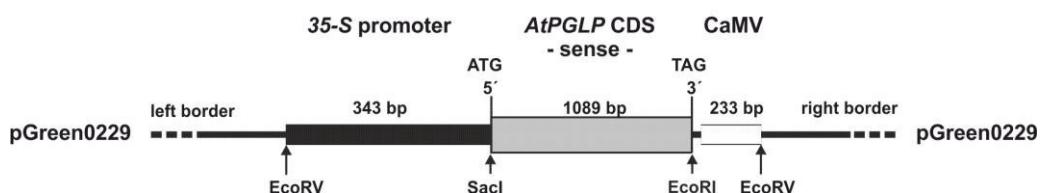


Abbildung 5-1 Schematischer Überblick vom PGLP-Komplementationskonstrukt

Genetisches Konstrukt bestehend aus binärem Vektor pGreen0229, konstitutivem Promotor 35-S (CaMV), kodierende Sequenz von *AtPGLP* und Terminator (CaMV)

Durch eine PCR mit konstruktsspezifischen Primern wurde die korrekte Integration der transgenen DNA bei den positiv selektierten Transformanden verifiziert (Abb. 5-2 A). Danach wurde die Funktionalität des eingebrachten Gens durch einen Western-Blot mit einem PGLP spezifischen Antikörper auf Protein-Ebene überprüft (Abb. 5-2 B). Um Beladungsfehler und Probenverunreinigungen ausschließen zu können, wurde bei beiden Analysen eine Ladekontrolle mit einem zweiten Primerpaar bzw. zweiten Antikörper durchgeführt. Es konnten drei transgene Linien (C1-C3) selektiert werden, in denen die *PGLP* wieder eingebracht wurde. Im Blot mit dem PGLP-Antikörper ist zu sehen, dass die *PGLP* in den Komplementanden wieder vorhanden ist, jedoch nicht immer auf dem gleichen Level wie der Wildtyp gebildet wird.

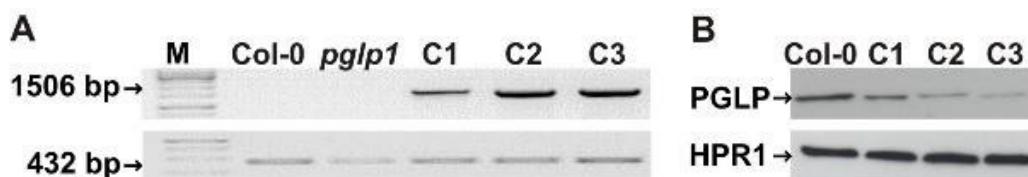


Abbildung 5-2 Verifizierung des PGLP-Komplementationskonstrukts

(A) PCR-Verifizierung des transformierten Konstrukts in das Genom der transgenen Linien (oberes Feld) und die dazu gehörende S16-Ladekontrolle (untere Feld). (B) Immunoblot von Blattproteinen mit einem spezifischen Antikörper gegen PGLP und peroxisomale Hydroxypyruvat Reduktase (HPR1) als Ladekontrolle.

Um das Ausmaß der Komplementation zu analysieren, wurden im Folgenden drei charakteristische Parameter bestimmt. Zuerst wurden die *pglp1*-Komplementanden, hinsichtlich ihrer Fähigkeit unter Normalluft zu wachsen, untersucht (Abb. 5-3 A). Dazu wurden die transgenen Linien C1-C3 zusammen mit dem Wildtyp unter Normalluft angezogen. Die Abbildung 5-3 A zeigt das Wachstum der Pflanzen nach 10 Wochen, wobei keine Unterschiede im Wachstum im Vergleich zum Wildtyp ersichtlich sind. Ein weiterer Parameter, der bestimmt wurde, ist die Photosyntheseleistung (5-3 B). Die Messungen zeigen, dass die

Ergebnisse

Komplementationslinien eine wildtypähnliche Photosyntheseleistung besitzen. Der letzte Parameter, der untersucht wurde, ist der Stärkegehalt in den Blättern der transgenen Linien und dem Wildtyp. In Abbildung 5-3 C sind die Ergebnisse der enzymatischen Stärkebestimmung gezeigt. Auch hier unterscheiden sich die transgenen Linien nicht signifikant vom Wildtyp. Obwohl die PGLP-Menge in den Komplementationslinien nicht auf dem gleichen Level ist wie der Wildtyp (Abb. 5-2 B), zeigen sich im Wachstum der Photosyntheseleistung und der Stärkesynthese keine signifikanten Unterschiede mehr im Vergleich zum Wildtyp. Der artifizielle Phänotyp der *pglp1*-Mutante wird durch die Komplementation aufgehoben.

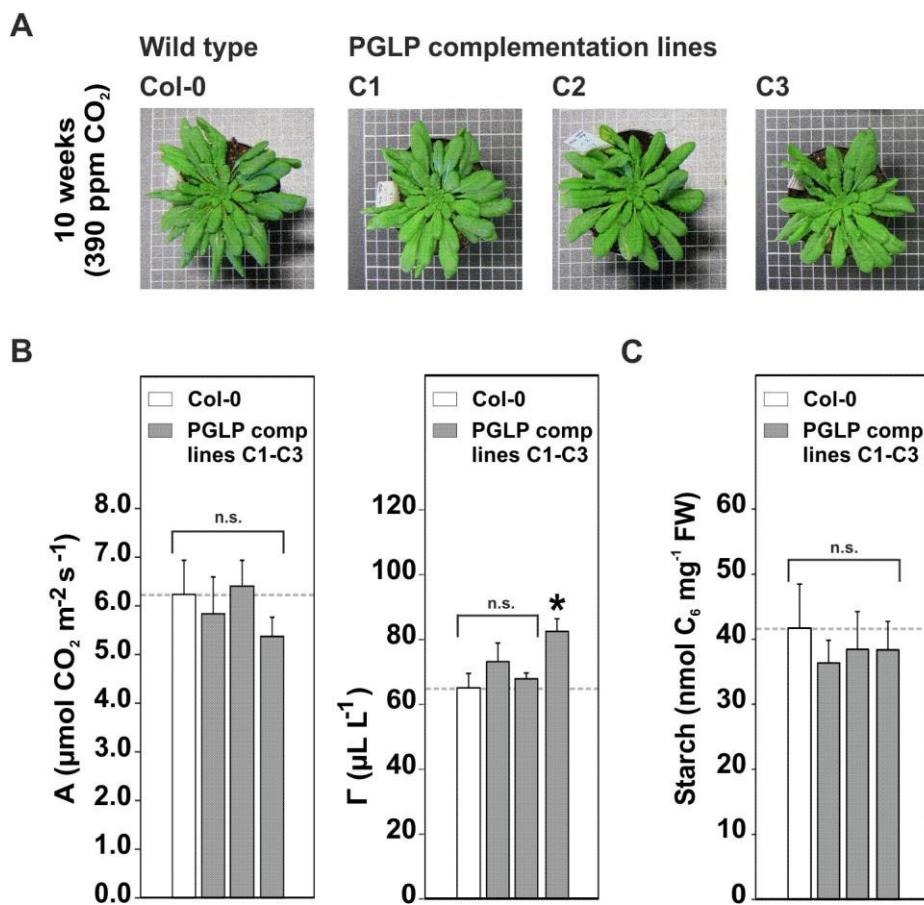


Abbildung 5-3 Genetische Komplementation von der Arabidopsis *pglp1*-Mutante.

(A) Representative Bilder vom Wildtyp und drei unabhängigen *pglp1*-Komplementationslinien (C1-C3) nach 10 Wochen Wachstum unter Normalluft. **(B)** Netto CO_2 -Aufnahme (A) Raten und CO_2 -Kompensationspunkt (Γ) und **(C)** Stärkemengen am Ende des Tages der transgenen Linien im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Die Angabe der Mittelwerte erfolgt \pm Stabw von vier biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf den Student's t-test (* $p < 0.05$; n. s. – nicht signifikant).

5.2 Die Beeinflussung der PGLP-Aktivität durch Antisense-Reduktion und Überexpression

Der stark ausgeprägte Phänotyp der *pgl/p1*, der eventuell eine Reihe an pleiotropen Effekten einschließt, macht die Mutante zu einem problematischen Untersuchungsmodell. Um diese Problematik zu entschärfen, wurden abgeschwächte Formen der *pgl/p1*-Mutation durch Antisense-Reduktion generiert. Zur Herstellung der Antisenselinien wurde die gesamte kodierende Region der *Arabidopsis PGLP* (1089 bp) in Antisense-Richtung in den Pflanzenvektor pGREEN0229 (<http://www.pgreen.ac.uk/>) kloniert. Aus Blumenkohl wurde der konstitutive 35S Promotor und der CaMV ((cauliflower mosaic virus) Terminator verwendet (Abb. 5-4).

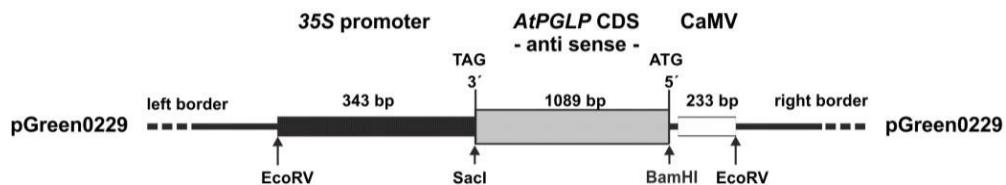


Abbildung 5-4 Schematischer Überblick des Antisense-Konstruktes

Genetisches Konstrukt bestehend aus binärem Vektor pGreen0229, konstitutivem Promotor 35-S (CaMV), kodierende Sequenz von *AtPGLP* in Antisense-Richtung und Terminator (CaMV)

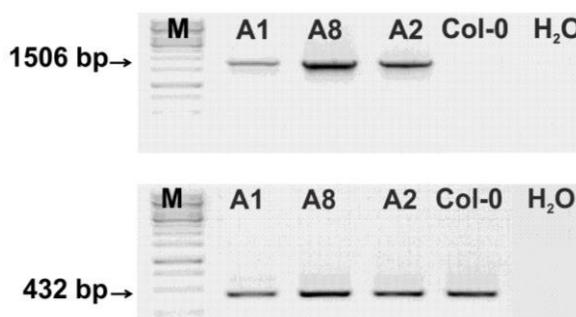


Abbildung 5-5 Verifizierung des PGLP-Antisense-Konstrukts

PCR-Verifizierung des transformierten Konstrukt in das Genom der transgenen Antisenselinien (oberes Feld) mit konstruktsspezifischen Primern und die dazu gehörende S16-Ladekontrolle (unteres Feld).

Das Antisense-Konstrukt wurde in *Arabidopsis* Wildtyppflanzen des Ökotyps Columbia 0 (Col-0) transformiert. Für den Gentransfer wurde die floral dip Methode mit *Agrobacterium tumefaciens* verwendet (Clough und Bent, 1998). Positiv transformierte Pflanzen enthalten das Gen für die Resistenz gegen das Herbizid BASTA (Wirkstoff Glufosinat). Die BASTA

Ergebnisse

resistenten Transformanden wurden dann auf die korrekte Integration des Konstrukts auf DNA Ebene überprüft (Abb. 5-5). Dazu wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die spezifisch an das eingebrachte genetische Material binden. Zur Überprüfung der DNA und als Ladekontrolle für das Gel wurde eine PCR mit Primern für das *S16*-Gen vorgenommen. Danach erfolgte eine Überprüfung der Funktionalität des Antisense-Konstruktes auf Protein-Ebene. Dazu wurden aus Blattextrakten die gesamten Proteine isoliert und mittels Western Blot überprüft, welche Proteinmenge an PGLP in den Transformanden vorliegt. Die Auswahl an Antisense-Mutanten wurde auf drei Linien reduziert. A1 beinhaltet eine sehr starke Reduktion, A8 als mittlere Linie und A2 mit leicht reduziertem PGLP-Gehalt (Abb. 5-6).

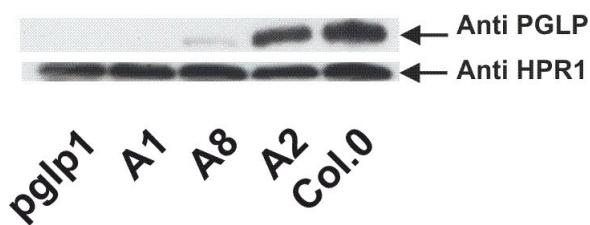


Abbildung 5-6 PGLP-Expression in Antisenselinien

Immunoblot von Blattproteinen mit einem spezifischen Antikörper gegen PGLP und peroxisomale Hydroxypyruvat Reduktase (HPR1) zur Ladekontrolle.

Neben den Antisenselinien sollte in dieser Arbeit auch die *PGLP* überexprimiert und die physiologischen und metabolischen Konsequenzen untersucht werden. Dazu wurden Überexpressionsmutanten erzeugt, wo die gesamte kodierende Region der *Arabidopsis PGLP* (1089 bp) in sense-Richtung zwischen den *ST-LSI* Promotor (Stockhaus *et al.*, 1989) aus der Kartoffel und dem CaMV Terminator (Abb. 5-7) in den Pflanzen-Transformationsvektor pGREEN0229 (<http://www.pgreen.ac.uk/>) kloniert wurde.

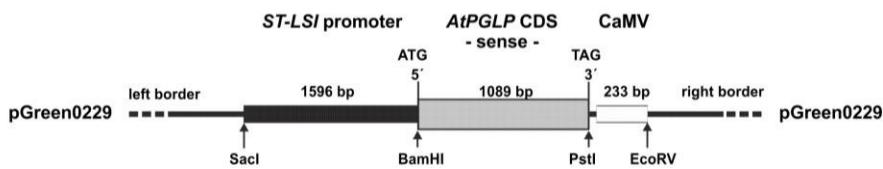


Abbildung 5-7 Schematischer Überblick des Überexpressions-Konstrukts

Genetisches Konstrukt bestehend aus binärem Vektor pGreen0229, lichtinduzierten Promotoren *ST-LSI*, kodierende Sequenz von *AtPGLP* in sense-Richtung und Terminator (CaMV)

Das Konstrukt wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer (Clough und Bent, 1998) in *Arabidopsis* Wildtyppflanzen vom Ökotyp Columbia 0 (Col-0) transformiert. Positive Transformanden enthalten durch den binären Vektor ein Resistenzgen gegen BASTA,

Ergebnisse

sodass eine Selektion mit dem Herbizid erfolgen konnte. Resistente Pflanzen wurden anschließend auf die korrekte Integration des genetischen Materials auf DNA Ebene überprüft. Mit konstruktsspezifischen Primern wurde eine PCR mit der isolierten genomischen DNA der transgenen Linien durchgeführt (obere Feld Abb. 5-8). Zur Überprüfung der DNA und dem Ausschließen von Ladefehlern wurde eine weitere PCR mit Primern für das S16-Gen (unteres Feld Abb. 5-8) vorgenommen.

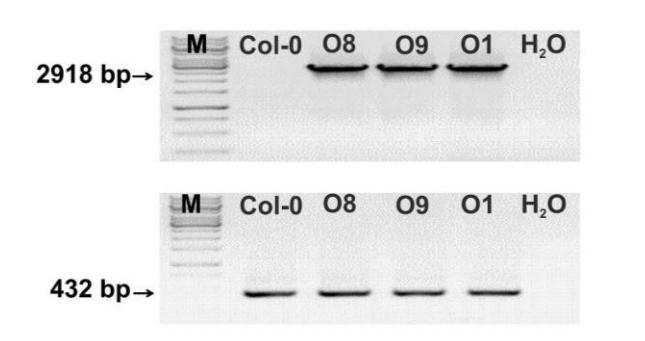


Abbildung 5-8 Verifizierung des *PGLP*-Überexpressions-Konstrukts

PCR-Verifizierung des transformierten Konstrukts in das Genom der transgenen Überexpressionslinien (oberes Feld) mit konstruktsspezifischen Primern und die dazu gehörende S16-Ladekontrolle (unteres Feld).

Die Funktionalität des Überexpressionskonstruktes wurde durch einen Western Blot mit PGLP-Antikörper überprüft. Daraufhin wurde die Anzahl der Überexpressionslinien auf 3 reduziert, mit O8 als schwächste, O9 als mittlere und O1 als stärkste Überexpressionslinie. Im Western Blot zeigen alle drei Überexpressionslinien mehr PGLP im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle (Abb. 5-9 obere Banden). Mit einem weiteren Western Blot mit dem Antikörper gegen die peroxisomale HPR1 konnten Ladefehler und Hintergrundsignale ausgeschlossen werden (Abb. 5-9 untere Banden).

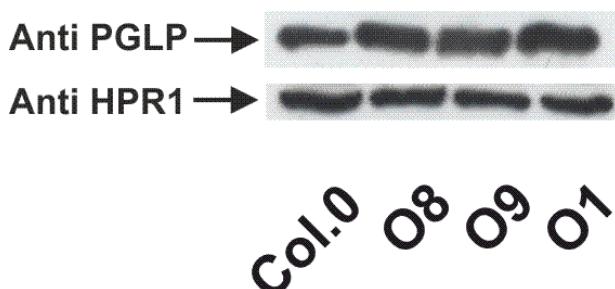


Abbildung 5-9 PGLP-Expression in Überexpressionslinien

Immunoblot von Blattproteinen mit einem spezifischen Antikörper gegen PGLP und peroxisomale Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR1) als Ladekontrolle.

Ergebnisse

Nach der genomischen Überprüfung wurde die Funktionalität beider Konstrukte auf mRNA-Ebene mit qRT-PCR und auf Protein-Ebene mit Bestimmung der totalen PGLP-Aktivität nachgewiesen. Es wurde kein Transkript in *pglp1* erkannt und ein schrittweise verringelter Gehalt in den Antisenselinien im Bereich von ~68,7% bis 8,7% von der Wildtypexpression (Abb. 5-10 A) ermittelt. Im Gegensatz dazu ist die *PGLP*-Expression in den Überexpressionslinien zwischen 40,7% und 103,2% (Abb. 5-10 A), im Vergleich zur Kontrolle, gesteigert. In guter Übereinstimmung mit der mRNA Expression folgt die totale PGLP-Aktivität in den transgenen Linien dem gleichen Muster. Es zeigte sich eine stark reduzierte Aktivität (~3,1%) in *pglp1*, gefolgt von den Antisenselinien A1 (~8,6%) und A8 (12,1%). Die dritte Antisenselinie A2 (68%) zeigt eine signifikante Transkript- und leichte Proteinreduktion, aber keine signifikante Reduktion in der Aktivität (Abb. 5-10 B). Im Vergleich dazu zeigen zwei der drei Überexpressionslinien (O1 und O9) eine signifikante Erhöhung in ihrer PGLP-Aktivität um bis zu 28,0% und 44,7%, während Linie O8 vom Wildtyp nicht zu unterscheiden ist (Abb. 5-10 B).

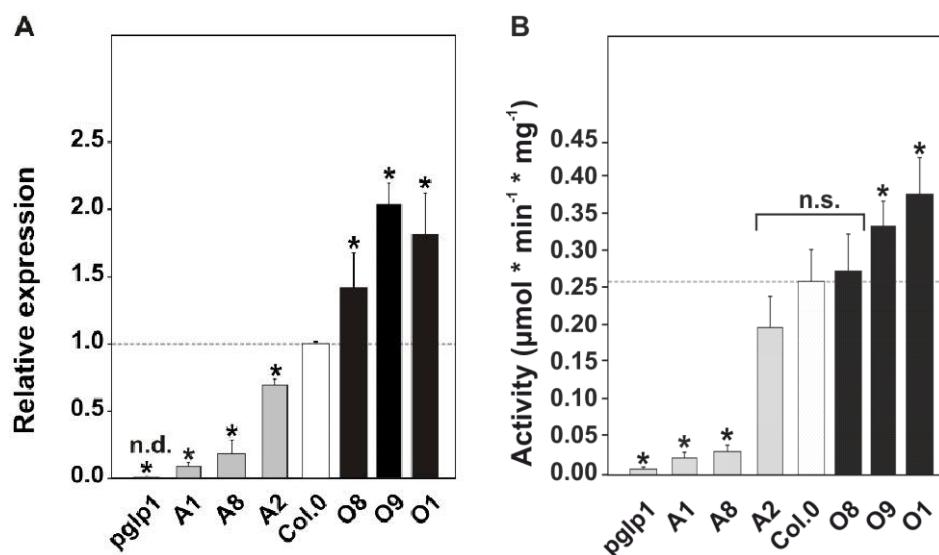


Abbildung 5-10 PGLP-Expression und -Aktivität in Antisense- und Überexpressionslinien.

(A) qRT-PCR Quantifizierung der *PGLP*-Expression in den transgenen Linien, wobei das Wildtypsignal willkürlich auf 1 festgesetzt wurde. **(B)** PGLP-Aktivität in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Angabe der Mittelwerte erfolgt \pm Stabw von fünf biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf den Student's *t*-test (* $p < 0.05$; n. s. – nicht signifikant).

Zur Bestätigung, dass es beim veränderten PGLP-Gehalt auch tatsächlich zu einer veränderten 2-PG-Menge kommt, wurde mit LC-MS/MS der 2-PG-Gehalt in den *PGLP* reduzierten (*pglp1*, A1, A8) bzw. überexprimierten Linien (O9, O1) bestimmt (Abb. 5-11). Dies wurde unter nicht photorespiratorischen (HC) und photorespiratorischen Bedingungen (LC) untersucht. Die Abbildung 5-11 zeigt, dass bereits unter HC-Bedingungen 2-PG stark in der

Ergebnisse

Mutante akkumuliert wird (240 pmol mg^{-1} FM). Auch im Wildtyp ist unter HC 2-PG zu finden ($0,4 \text{ pmol mg}^{-1}$ FM). Die Antisenslinien A1 (11 pmol mg $^{-1}$ FM) und A8 (0,8 pmol mg $^{-1}$ FM) haben signifikant mehr 2-PG, während in den Überexpressionslinien ein unveränderter Gehalt im Vergleich zum Wildtyp vorliegt. Unter LC-Bedingungen steigt der 2-PG-Gehalt im Wildtyp auf $1,8 \text{ pmol mg}^{-1}$ FM, während es in den *PGLP* reduzierten Linien zur massiven Akkumulation von 2-PG bis $1.100 \text{ pmol mg}^{-1}$ FM in der *pglp1*-Mutante kommt. In den Überexpressionslinien dagegen liegt der 2-PG-Gehalt signifikant unterhalb des Wildtyps mit $0,7 \text{ pmol mg}^{-1}$ FM in O9 und $1,1 \text{ pmol mg}^{-1}$ FM in O1.

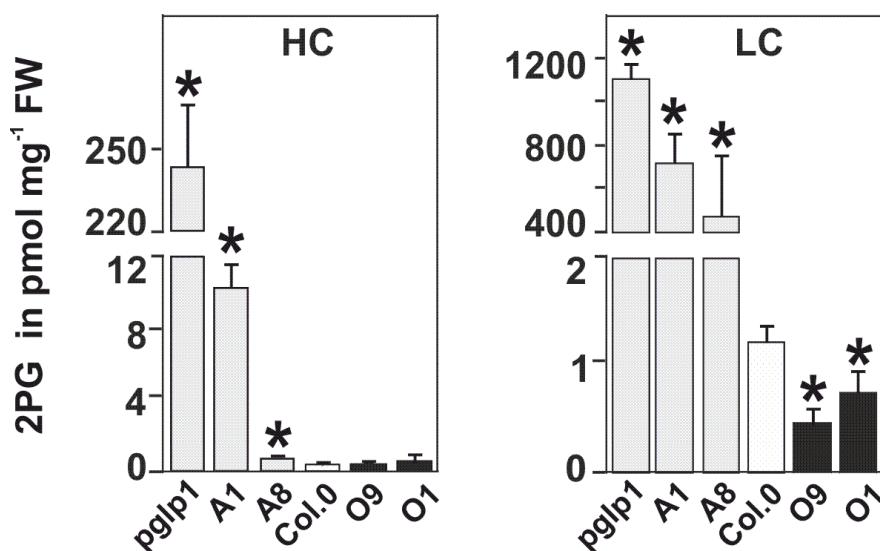


Abbildung 5-11 steady-state Gehalt von 2-PG in PGLP-Linien in HC und LC

Blattmaterial wurde zur Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 laut Boyes *et al.* (2001) unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%, HC) und Normalluft (0,039%, LC) geerntet. Die gezeigten absoluten steady-state Gehalte sind in pmol*mg $^{-1}$ Frischmasse angegeben. Werte sind Mittelwerte \pm Stabw von vier unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die signifikant von der Wildtyp Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's t-test (* p < 0,05).

5.3 Das veränderte Pflanzenwachstum der transgenen *PGLP*-Linien

Nachdem es gelungen ist transgene Pflanzenlinien mit reduzierten und gesteigerten *PGLP*-Gehalten zu erzeugen, wurde im Folgenden eine Phänotypisierung vorgenommen. Da die *pglp1* nicht in der Lage ist in normaler Luft zu wachsen, wurde die initiale Kultivierung der transgenen Linien unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%) durchgeführt. Dadurch ist ein Vergleich zum Wachstum der *pglp1*-Mutante und dem Wildtyp möglich. In Abbildung 5-12 A und B ist das Wachstum 8 Wochen alter Pflanzenlinien unter Hoch-CO₂ (HC) gezeigt. Bei der leichten bis mittelstarken Verringerung des *PGLP*-Gehaltes (A2 und A8) zeigen sich im

Ergebnisse

Vergleich zum Wildtyp unter diesen Bedingungen keine sichtbaren Effekte auf das Wachstum. Bei einer starken Reduktion der *PGLP*, wie in A1, ist das Wachstum signifikant reduziert. Im Vergleich zur *pglp1* ist das Wachstum von A1 mit größerer Blattrosette und größeren Blättern immer noch besser (Abb. 5-12 A). Im Gegensatz dazu zeigen die *PGLP* Überexpressionslinien unter diesen Bedingungen wie erwartet keine sichtbaren Effekte auf das Wachstum (Abb. 5-12 B), da erhöhte CO₂-Konzentrationen in der Luft die Bildung von 2-PG unterdrücken.

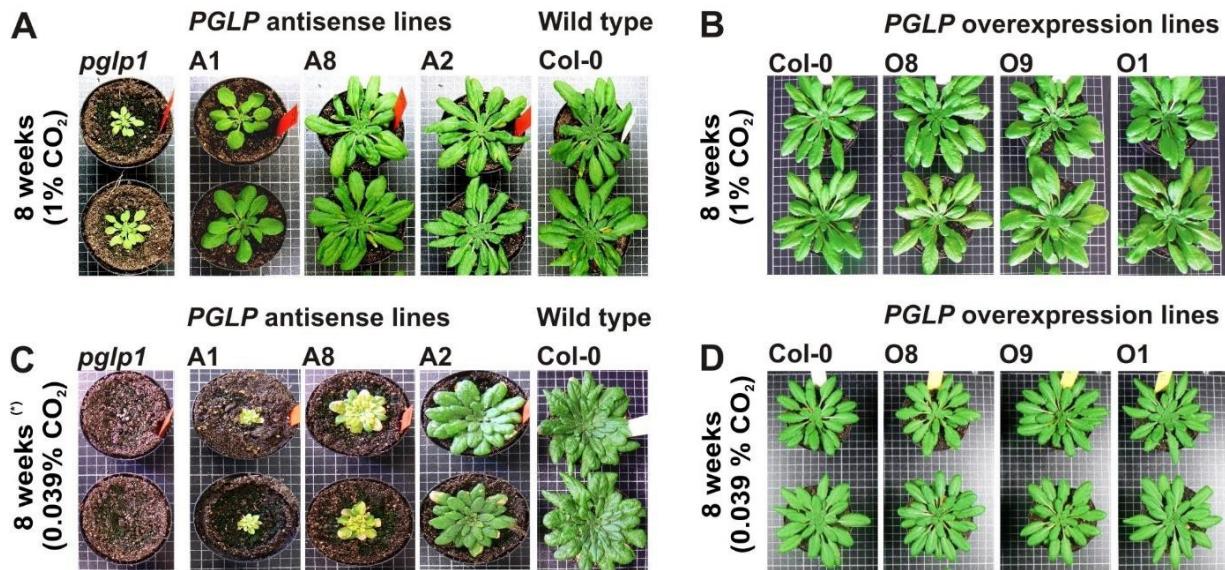


Abbildung 5-12 Phänotyp der *PGLP*-Antisense- und Überexpressionslinien

Phänotyp der *PGLP*-Antisense- und Überexpressoren (**A, B**) angezogen für 8 Wochen unter Hoch-CO₂-Bedingungen (1%) und (**C, D**) in Normalluft (0,039% CO₂) mit einem 10/14 h Tag/Nacht-Verlauf.

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, in welchem Umfang die *PGLP*-Antisenselinien befähigt sind unter Normalluft zu wachsen und ob eine gesteigerte *PGLP*-Aktivität einen sichtbaren Effekt auf den Phänotyp unter photorespiratorischen Bedingungen (0,039% CO₂) hervorruft. Dazu wurden alle Pflanzenlinien in Normalluft angezogen und nach 8 Wochen der Phänotyp dokumentiert (Abb. 5-12 C und D). Hierbei konnte ein stufenweise reduziertes Wachstum bei den Antisenselinien beobachtet werden (Abb. 5-12 C). Entsprechend dem Level der *PGLP*-Reduktion (Abb. 5-10 B) zeigt die Linie A2 eine leichte Wachstumsreduktion. Die Blattfarbe ist grün und die Linie ist in der Lage Blüten und fertile Samen auszubilden. Bei der mittleren (A8) und der starken Reduktion (A1) ist das Wachstum deutlich eingeschränkt. Es zeigt sich der chlorotische Phänotyp, wie er bei photorespiratorischen Mutanten auftritt. Zusätzlich kommt es zur späteren, reduzierten Blüten- und Samenbildung bei A8, während sie bei A1 ganz ausbleibt. In Übereinstimmung mit vorigen Ergebnissen ist *pglp1* nicht in der Lage unter Normalluft zu wachsen (Schwarze und Bauwe, 2007). Das Wachstum der *PGLP*-Überexpressoren unter Standardbedingungen zeigte keine deutlichen, phänotypischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5-12 D). Erst bei

Ergebnisse

näherer Betrachtung des Wachstums durch Bestimmung der quantitativen Parameter, wie Rosettendurchmesser, sowie der Frisch- und Trockenmasse, zeigte sich eine erhöhte Biomasseproduktion bei der stärksten Linie O1. Die Tabelle 5-1 zeigt, dass bis zu 30% mehr Blätter von der Linie O9 und O1 gebildet werden und O1 eine 25% größere Rosettenfläche einnimmt. Die Frisch- und Trockenmasse ist in Linie O1 mit 10% mehr Frischmasse und 60% mehr Trockenmasse als im Wildtyp signifikant erhöht (Tab 5-1).

Tabelle 5-1 Quantitative Wachstumsparameter der *PGLP*-Überexpressoren in Normalluft.

Parameter	O1	O9	O8	Col-0
Diameter (cm)	14.30 ± 0.50	14.58 ± 0.62	14.28 ± 1.63	13.78 ± 1.20
Leaf number	38.25 ± 5.06	33.00 ± 2.65	31.33 ± 4.51	29.25 ± 0.96
Rosette area (cm ²)	176.30 ± 16.60	155.56 ± 15.92	151.84 ± 33.62	137.77 ± 25.57
Fresh weight (g)	8.46 ± 0.20	7.68 ± 0.41	7.64 ± 1.06	7.68 ± 0.81
Dry weight (g)	1.29 ± 0.39	0.69 ± 0.13	0.96 ± 0.39	0.79 ± 0.21

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen (10/14-h Tag/Nacht, 390 ppm CO₂, 20/18°C Tag/Nacht) bis zum Wachstumsstadium 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) angezogen und anschließend zur Bestimmung ausgewählter Wachstumsparameter verwendet. Die Angabe der Werte erfolgt Mittelwerte ± Stabw von mindestens 6 biologischen Replikaten pro Genotyp. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte an, die statistisch signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf den Students *t*-test (*p* < 0.05).

5.4 Die Photosyntheseleistung sinkt mit der Abnahme des *PGLP*-Gehalts und steigt unter Stressbedingungen bei erhöhtem *PGLP*-Gehalt

Die Photorespiration ist unter Hoch-CO₂ (HC) stark reduziert. Doch bereits unter diesen Bedingungen ist die photosynthetische Kohlenstoffassimilation bei *pglp1* stark eingeschränkt (Timm *et al.*, 2012). Angesichts dieser Ergebnisse wurde untersucht, wie sich eine schrittweise Reduktion der PGLP-Aktivität auf die PSII-Aktivität und die CO₂-Fixierung auswirkt. Dazu wuchsen die *PGLP*-Antisenselinien zusammen mit der *pglp1* und dem Wildtyp für 8 Wochen unter erhöhtem CO₂ (HC) und wurden dann auf Normalluft (LC) umgesetzt. Unter HC und 1, 3, 5 und 7 Tage nach dem Transfer auf Normalluft wurde die maximale Quantenausbeute des PSII (F_v/F_m) mit einem Imagaing-PAM bestimmt und mit einem Li-Cor die netto CO₂-Aufnahmeraten (A) und der CO₂-Kompensationspunkt (Γ) bestimmt. F_v/F_m Werte bei 0,84 repräsentieren den optimalen Bereich für terrestrische Pflanzen. Sobald die Werte darunterliegen, ist es ein Indikator für gestresste Pflanzen (Maxwell und Johnson 2000). Es bedeutet, dass weniger als 84% des Sonnenlichts absorbiert werden und die Photosyntheseleistung absinkt. Das Fluoreszenzbild solcher Pflanzen verändert sich von blau über grün zu orange/gelb. Unter HC-Bedingungen ist nur die *pglp1* im Fluoreszenzbild bereits grün und verändert sich nach dem Umsetzen auf Normalluft zu grün/orange bis orange/rot nach 7d Normalluft (Abb. 5-13 A). Der Wildtyp bleibt von der Veränderung im CO₂-Gehalt ziemlich unbeeinflusst und behält sein blaues Fluoreszenzbild über den gesamten Verlauf. Die Antisenselinien zeigen unter HC noch blaue Fluoreszenzbilder, doch nach 1 Tag LC wird A1 hellblau und nach 3 Tagen LC wird auch A8 hellblau. Die Linie A2 ist nur teilweise hellblau. In Abbildung 5-13 B sind die F_v/F_m -Werte abgebildet. Je geringer der *PGLP*-Gehalt in der Pflanzenlinie ist, desto niedriger ist der F_v/F_m -Wert. Außerdem sinkt der F_v/F_m -Wert in den *PGLP* reduzierten Linien nach dem Umsetzen auf LC kontinuierlich ab. Die Messungen zeigen, dass *pglp1* und die Antisenselinien in ihrer Photosyntheseleistung beeinträchtigt sind und die Leistung bei längerer Exposition an LC weiter absinkt.

Ergebnisse

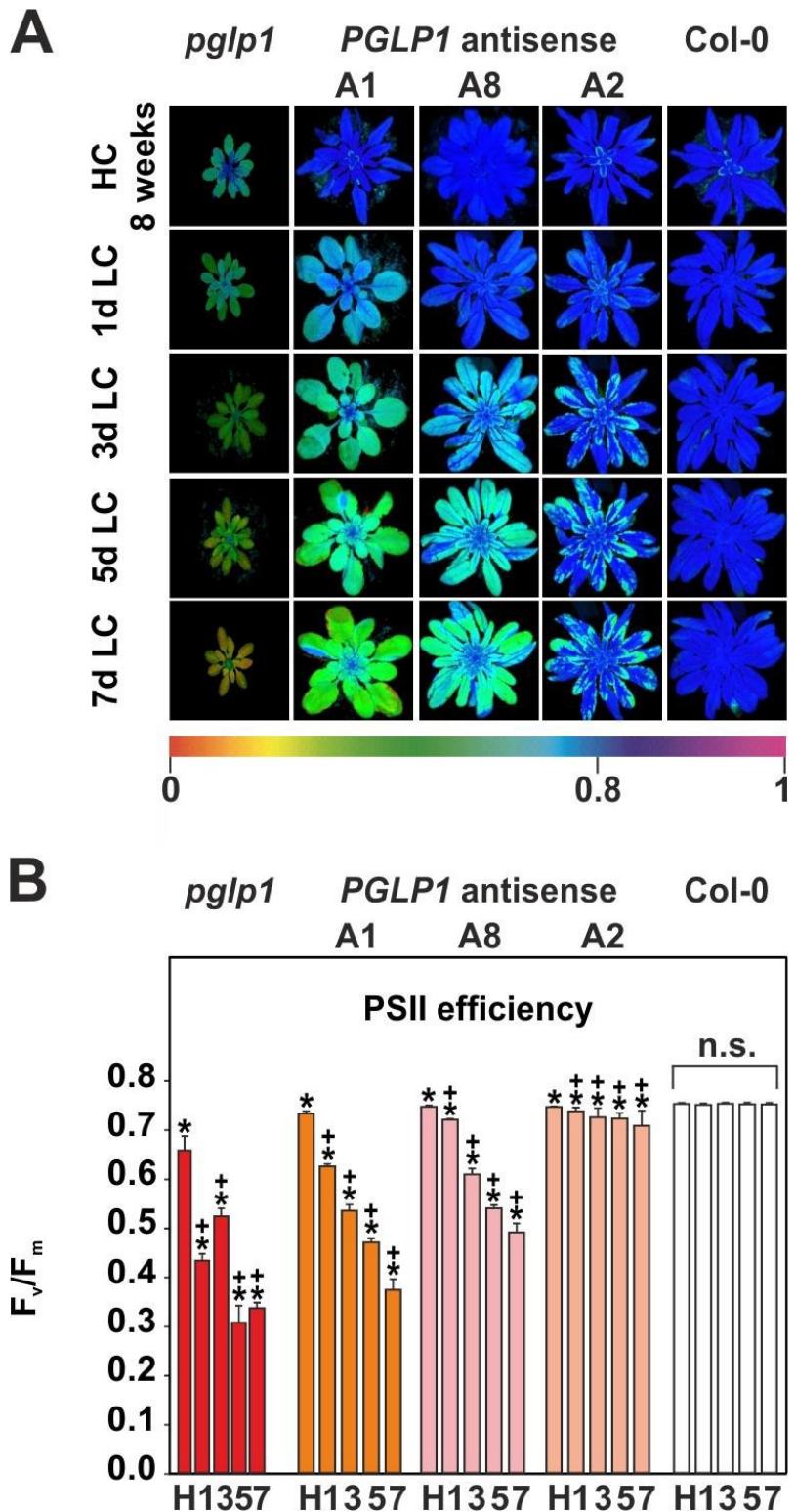


Abbildung 5-13 Chlorophyll a Fluoreszenz der PGLP-Antisenselinien

Die Pflanzen wurden bei erhöhtem CO₂ (HC, 1%) für 8 Wochen (10/14 h Tag/Nacht Zyklus) angezogen und zu Normalluft (LC, 0.039% CO₂) überführt. Chlorophyll a Fluoreszenz und Gaswechsel-Parameter wurden für HC Bedingung und 1, 3, 5 und 7 Tage nach dem Wechsel bestimmt. Die Daten der *pglp1* stammen aus einer früheren Arbeit (Timm *et al.*, 2012b). Dargestellt sind (**A**) Chlorophyll a Fluoreszenz-Aufnahmen von *PGLP*-Antisenselinien während CO₂-Veränderung, (**B**) die zugehörigen F_v/F_m-Werte. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Stabw von 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte die signifikant abweichen von der HC-Kontrolle und bezogen auf den jeweiligen Wildtyp, Werte basieren auf den Students t-test (*p<0.05)

Ergebnisse

In Übereinstimmung mit der F_v/F_m -Bestimmung folgt die Photosyntheserate (A) den gleichen Tendenzen (Abb. 5-14 A). Die Photosyntheserate von *pglp1* ist bereits unter HC gegenüber der Wildtypkontrolle sehr stark reduziert (unter 10%), gefolgt von A1 mit 17,4%, A8 mit 42,6% und A2 mit 83,1%. Nach einem Tag LC steigt die Photosyntherate des Wildtyps leicht an, dagegen fällt die Photosyntheserate rapide in A8 auf 27,4% und in A2 auf 58,1% der Wildtypkontrolle. Während in A2 nach 3 Tagen LC die Photosyntheseleistung steigt und nur langsam im weiteren Verlauf wieder sinkt, sinkt sie in den anderen *PGLP* reduzierten Linien kontinuierlich herab (Abb. 5-14 A). Der CO₂-Kompensationspunkt (Γ) steigt im Gegenzug zur Photosyntheserate an. Ein hoher Γ bedeutet eine niedrige CO₂-Aufnahme. Abbildung 5-14 B zeigt für *pglp1* einen fünfmal höheren Γ gegenüber der Wildtypkontrolle unter HC und sechsmal höher unter LC. Auch die Linie A1 ist noch 2,5 bis 3-mal höher als der Wildtyp und A8 ist 2-mal höher.

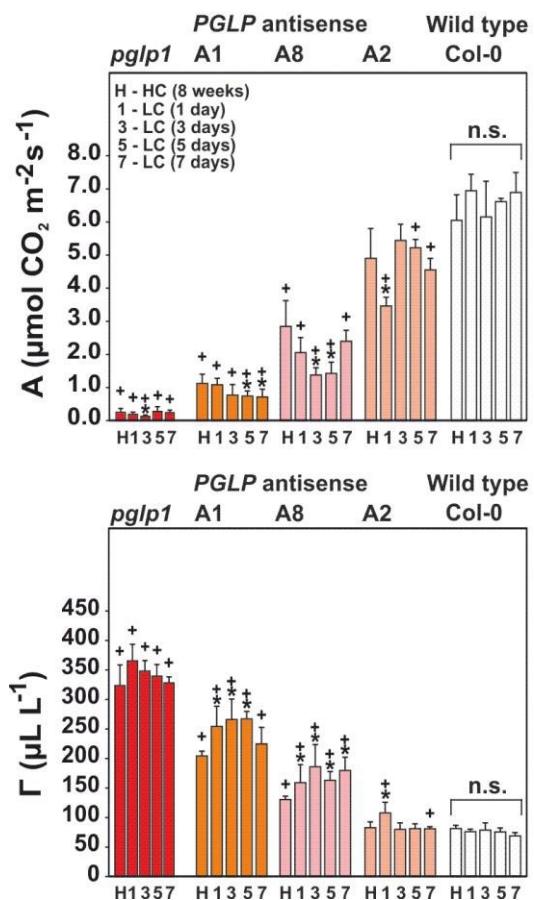


Abbildung 5-14 Gaswechsel-Parameter der *PGLP*-Antisenselinien

Die Pflanzen wurden bei erhöhtem CO₂ (HC, 1%) für 8 Wochen (10/14 h Tag/Nacht Zyklus) angezogen und zu Normalluft (LC, 0,039% CO₂) transferiert. Chlorophyll a Fluoreszenz und Gaswechsel-Parameter wurden für HC-Bedingung und 1, 3, 5 und 7 Tage nach dem Wechsel bestimmt. Die Daten der *pglp1* stammen aus seiner früheren Arbeit (Timm *et al.*, 2012b). Dargestellt sind netto Photosyntheseraten und CO₂-Kompensationspunkte. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Stabw von 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte, die signifikant von der HC Kontrolle und bezogen auf den jeweiligen Wildtyp abweichen, Werte basieren auf den Students t-test (*p<0,05)

Ergebnisse

Die Gaswechselmessungen zeigen deutliche Steigerungen der interzellulären CO₂-Konzentration und erhöhte Verhältnisse von internem zu externem CO₂ (C_i/C_a) nach dem Transfer auf Normalluft (*pglp1* > A1 > A8), während die stomatäre Leitfähigkeit (*g_s*) und Transpirationsraten (*T_r*) reduziert sind (Tabelle 5-2). Zusammenfassend deuten die Gaswechselmessungen auf eine gehemmte CO₂-Assimilierung hin und vermehrtes Verschließen der Stomata.

Tabelle 5-2 Gaswechselparameter von *PGLP*-Antisenselinien während CO₂-Veränderung.

Parameter	<i>pglp1</i>	A1	A8	A2	Col-0
C _i – HC	385.0 ± 2.6	363.9 ± 10.7	368.7 ± 7.1	318.5 ± 7.5	308.9 ± 1.3
C _i – 1dLC	393.3 ± 2.6	359.1 ± 12.5	345.1 ± 14.4	299.9 ± 15.5	294.9 ± 16.0
C _i – 3dLC	390.0 ± 2.4	362.4 ± 14.9	337.6 ± 22.4	268.4 ± 38.8	282.5 ± 18.6
C _i /C _a - HC	0.95 ± 0.02	0.91 ± 0.03	0.93 ± 0.02	0.80 ± 0.02	0.78 ± 0.01
C _i /C _a – 1dLC	0.95 ± 0.03	0.90 ± 0.03	0.86 ± 0.04	0.75 ± 0.04	0.74 ± 0.04
C _i /C _a – 3dLC	0.96 ± 0.01	0.91 ± 0.04	0.84 ± 0.05	0.68 ± 0.09	0.71 ± 0.04
<i>g_s</i> - HC	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.01
<i>g_s</i> – 1dLC	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.02
<i>g_s</i> – 3dLC	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01
T _r – HC	1.63 ± 0.40	1.09 ± 0.22	2.56 ± 0.09	1.65 ± 0.23	1.63 ± 0.13
T _r – 1dLC	0.83 ± 0.18	1.08 ± 0.23	1.12 ± 0.20	1.34 ± 0.23	1.87 ± 0.18
T _r – 3dLC	1.11 ± 0.13	0.84 ± 0.24	0.73 ± 0.20	0.97 ± 0.28	1.47 ± 0.14

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen (10/14-h Tag/Nacht; HC, 1% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht) bis zum Wachstumsstadium 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) angezogen und zu Normalluft überführt. Gaswechselmessungen wurden bei HC durchgeführt und nachdem die Pflanzen 1 und 3 Tage der Normalluft ausgesetzt waren. Gezeigte Werte sind Mittelwerte ± Stabw von mindestens 4 biologischen Replikaten pro Genotyp. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte die statistisch signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf den Students *t*-test (p < 0.05). Abkürzungen: C_i – intracellular CO₂ concentration; C_i/C_a – ratio of intracellular versus extracellular CO₂ concentration; g_s – stomatal conductance; T_r – transpiration rate

Die Untersuchung der *PGLP*-Überexpressoren erfolgte einerseits an Pflanzen die 8 Wochen lang nur unter HC und andererseits 8 Wochen nur unter LC gewachsen sind. Es zeigten sich für beide Wachstumsbedingungen keine Unterschiede in der PSII-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5-15).

Ergebnisse

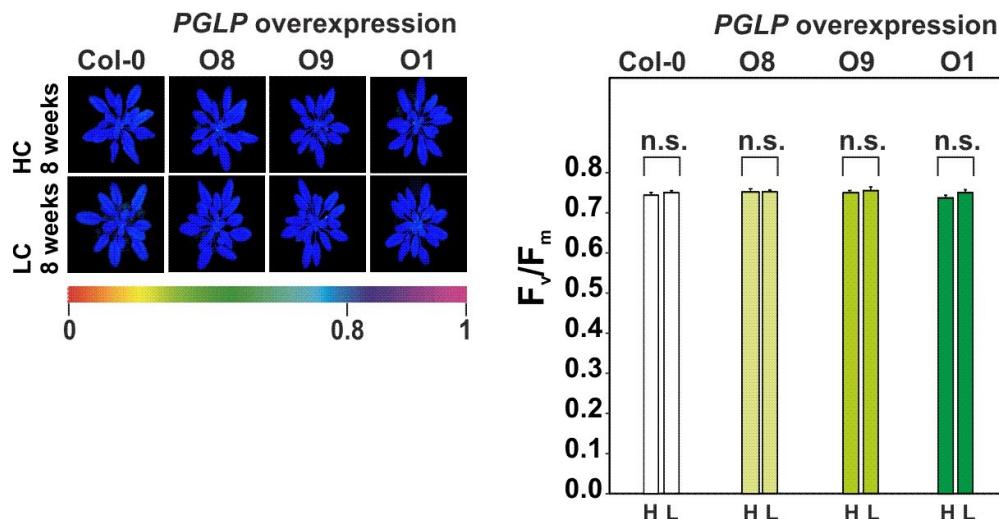


Abbildung 5-15 Chlorophyll a Fluoreszenz der *PGLP*-Überexpressoren.

Dargestellt ist die Chlorophyll a Fluoreszenz mit Aufnahmen von *PGLP*-Überexpressionslinien die für 8 Wochen entweder in HC oder LC gewachsen sind, und die entsprechenden F_v/F_m -Werte. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Stabw von 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte die signifikant von der HC Kontrolle und bezogen auf den jeweiligen Wildtyp abweichen, Werte basieren auf den Students t-test (* $p < 0.05$)

In einem weiteren Experiment wurde die Photosyntheserate von den Überexpressoren analysiert, wobei die Pflanzen konsequent unter photorespiratorischen Bedingungen gewachsen sind. Für die Überexpressoren der Glycin Decarboxylase Proteine H und L wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte Photosyntheseleistung vorliegt (Timm et al., 2012; Timm et al., 2015). Die *PGLP*-Überexpressionslinien wurden zusammen mit dem Wildtyp unter Normalluft bis zur Wachstumsphase 5.1 (Boyes et al., 2001) kultiviert und dann Gaswechselmessungen durchgeführt. Wie Tabelle 5-3 zeigt, gibt es keine signifikanten Änderungen für A und Γ bei Sauerstoffkonzentrationen von 10 und 21%. Dagegen führt eine Erhöhung der Oxygenasereaktion von der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) durch Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf 40% zu einer signifikant besseren CO_2 -Aufnahmerate (A) von 26% bis 40% mehr in allen Überexpressionslinien als beim Wildtyp. Durch die Erhöhung der Sauerstoffmenge kommt es zur Verstärkung der 2-PG-Bildung und das mindert den Kohlenstoffgewinn. Dies zeigt sich in einem erhöhten Γ im Wildtyp bei dieser Messung bei $113 \mu\text{l l}^{-1}$. In der Linie mit dem höchsten *PGLP*-Gehalt, Linie O1, ist Γ signifikant niedriger mit $102 \mu\text{l l}^{-1}$. In dieser Linie zeigt sich zusätzlich eine verringerte O_2 -Inhibition. Außerdem ist in der Linie O1 die Respirationsrate im Dunkeln erhöht (keine Veränderung bei O9 und O8). Dagegen gibt es keine Änderungen in der Respiration im Licht im Vergleich zum Wildtyp. Gleichermaßen gilt für die Photorespirationsrate, sie ist nur bei O1 signifikant erhöht. Interessanterweise zeigen die Überexpressionslinien eine zwischen 50% und 70% höhere stomatische Leitfähigkeit bei 40% Sauerstoff. Diese Reaktion passt zur Beobachtung der reduzierten stomatischen Leitfähigkeit in den Antisenselinien. Schlussfolgernd hat eine

Ergebnisse

Erhöhung der PGLP-Aktivität unter Standardbedingungen keine Effekte bei den Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp. Bei erhöhten O₂-Partialdrücken kommt es zu einem positiven Einfluss auf die Photosynthese und zum Öffnen der Stomata.

Tabelle 5-3 Gaswechselparameter von PGLP-Überexpressoren in Normalluft.

Parameter	O1	O9	O8	Col-0
A ₁₀	13.54 ± 1.14	13.74 ± 2.06	14.36 ± 0.66	13.56 ± 0.84
A ₂₁	12.09 ± 1.87	12.26 ± 1.17	12.32 ± 1.45	11.35 ± 1.52
A ₄₀	8.33 ± 0.55	7.46 ± 0.68	8.10 ± 1.69	6.20 ± 0.58
Γ ₁₀	26.04 ± 4.50	24.19 ± 4.92	21.81 ± 5.07	24.57 ± 3.68
Γ ₂₁	57.87 ± 10.34	62.20 ± 9.04	57.87 ± 10.34	62.01 ± 3.54
Γ ₄₀	104.06 ± 4.48	118.80 ± 8.57	114.42 ± 12.21	111.03 ± 3.29
Ci ₁₀	269.19 ± 26.97	277.68 ± 6.36	276.24 ± 10.85	260.18 ± 18.18
Ci ₂₁	310.16 ± 3.56	298.97 ± 8.17	310.02 ± 12.51	302.13 ± 13.01
Ci ₄₀	323.35 ± 14.12	336.05 ± 4.32	326.25 ± 6.39	303.12 ± 6.13
Ci/Ca ₁₀	0.69 ± 0.07	0.71 ± 0.02	0.71 ± 0.03	0.67 ± 0.05
Ci/Ca ₂₁	0.79 ± 0.01	0.77 ± 0.02	0.79 ± 0.03	0.77 ± 0.03
Ci/Ca ₄₀	0.82 ± 0.04	0.85 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.77 ± 0.02
g _{s 10}	0.22 ± 0.07	0.22 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.18 ± 0.04
g _{s 21}	0.30 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.27 ± 0.06	0.26 ± 0.04
g _{s 40}	0.23 ± 0.06	0.26 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.15 ± 0.03
T _{r 10}	3.74 ± 0.59	5.48 ± 0.97	5.45 ± 0.47	3.84 ± 0.61
T _{r 21}	4.29 ± 0.53	3.30 ± 0.32	3.66 ± 0.76	3.81 ± 0.41
T _{r 40}	4.43 ± 0.51	4.17 ± 1.53	3.94 ± 1.36	4.02 ± 0.59
O ₂ inhibition	30.28 ± 7.31	38.85 ± 6.49	33.78 ± 14.93	44.98 ± 5.26

Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen (10/14-h Tag/Nacht, 390 ppm CO₂, 20/18°C Tag/Nacht) bis zum Wachstumsstadium 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) angezogen und anschließend für Gaswechselmessungen eingesetzt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Stabw (N > 4) und fett gedruckte Zahlen zeigen Werte, die statistisch signifikant zum Wildtyp sind, basierend auf den Students *t*-test (p < 0.05). Abkürzungen: A – net CO₂ uptake; Γ – CO₂ compensation point; 10, 21, 40 – oxygen concentrations

5.5 Die veränderte PGLP-Aktivität hat Einfluss auf die photosynthetische Kohlenstoffassimilation und assoziierte Stoffwechselwege

Die schlechtere Kohlenstoffassimilation und das beeinträchtigte Wachstum der *pglp1* lassen auf einen negativen Einfluss auf den Kohlenstoffhaushalt schließen. Daher wurde als nächstes überprüft, wie sich eine veränderte PGLP-Aktivität auf die Funktionalität des zentralen Kohlenstoffwechsels bei 1% CO₂ (HC) und unter photorespiratorischen Bedingungen (0,039% CO₂, LC) auswirkt. Eine Analyse erfolgte mit allen transgenen PGLP-Linien im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Pflanzen wurden, wie bei den Photosynthesemessungen zuvor, unter HC-Bedingungen angezogen und auf LC-Bedingungen umgesetzt. Unter beiden Bedingungen wurde jeweils nach 5 h Belichtung Blattmaterial genommen, welches für GC-MS (Gas-Chromatografie gekoppelt an Massen- Spektrometrie) eingesetzt wurde. Mit Hilfe des GC-MS erfolgte die Bestimmung relativer steady-state Gehalte von 62 Metaboliten des zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen hat die leichte Reduktion der PGLP kaum Auswirkungen auf andere Bereiche des Stoffwechsels, sodass die meisten metabolischen Veränderungen in *pglp1* und A1 zu finden sind. In der Abbildung 5-16 zeigen sich bei den PGLP-Antisenselinien keine signifikanten Änderungen in photorespiratorischen Metaboliten, was unter HC-Bedingungen zu erwarten ist, da die Bildung von 2-PG reduziert wird. Stattdessen zeigten sich unter diesen Bedingungen Änderungen für Intermediate des Citratzyklus und einige assoziierte Metabolite. Es akkumulieren 2-Oxoglutarat und noch stärker Succinat und GABA. Dafür treten keine Änderungen bei Pyruvat, Citrat und Fumarat auf. In der GC-MS-Analyse akkumulieren transgene Linien mit stark reduzierter PGLP im großen Umfang Aminosäuren. Zum Beispiel β-Alanin, Tyrosin, Lysin, Isoleucin und Valin, was begleitet wird durch erhöhte Mengen an Harnstoff, Guanidin, Ornithin und in geringerem Ausmaß Putrescin. Neben der Akkumulation von Metaboliten als Reaktion auf die verringerte PGLP-Aktivität konnte eine signifikante Abnahme von zuckerähnlichen Komponenten beobachtet werden (z.B. Galactinol, Trehalose, Raffinose und Xylose). Interessanterweise ist Dehydroascorbat in *pglp1* bis zu 90% reduziert. Die Überexpressionslinien hingegen zeigen wenige metabolische Veränderungen unter HC-Bedingungen. Es ist eine Abnahme beim photorespiratorischen Intermediat Glycin und ein Anstieg bei Isomaltose, Glucose, Ethanolamin und Guanidin (Abb. 5-16, Tabelle Anhang 8-1) in den Linien mit höherer PGLP-Aktivität (O1 und O9) zu beobachten.

Ergebnisse

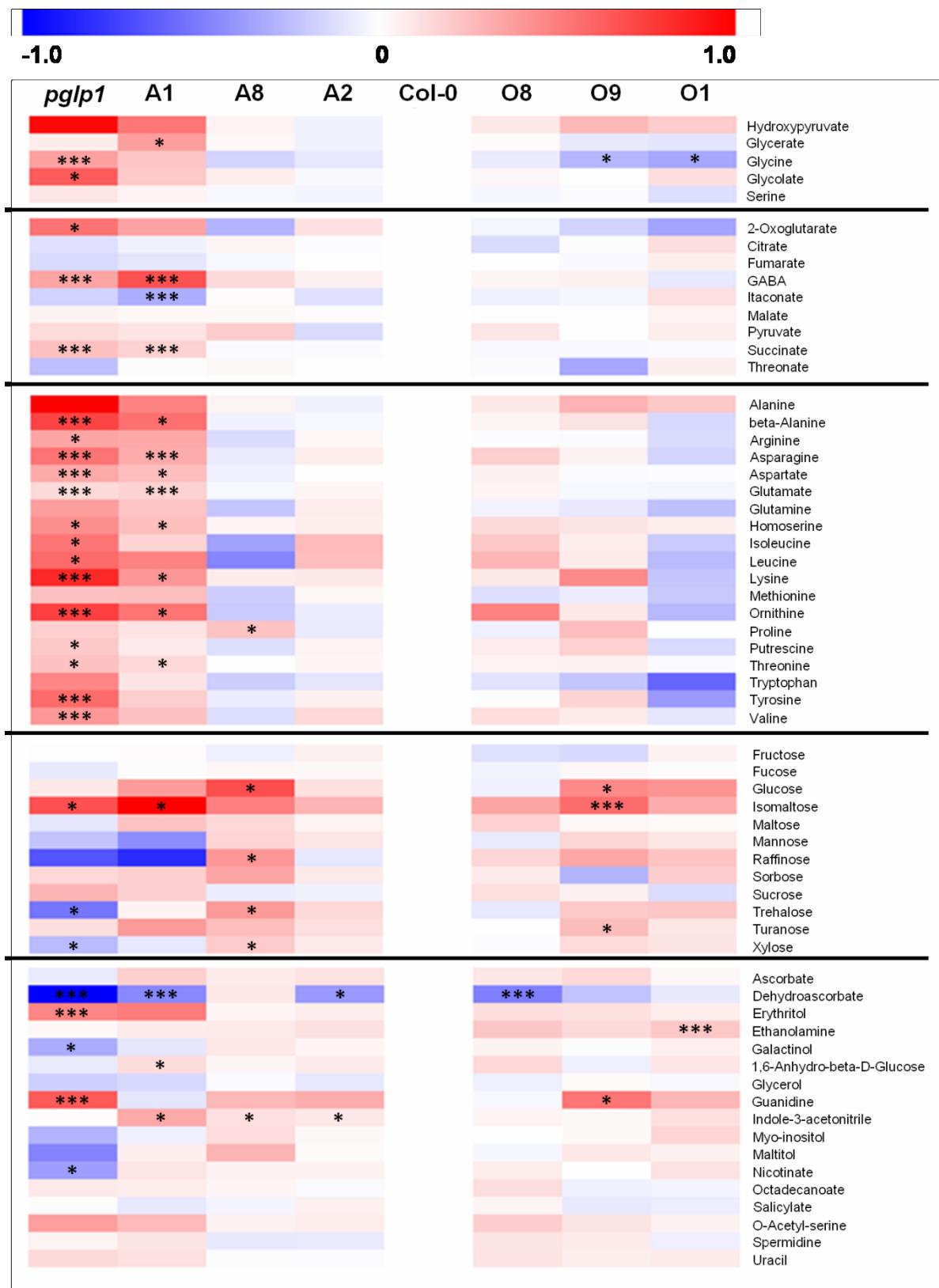


Abbildung 5-16 Metabolitmengen der PGLP-Linien in HC

Blattmaterial wurde in der Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 (Boyes *et al.* 2001) geerntet, die unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%, HC) angezogen wurden. Die gezeigten relativen steady-state Gehalte sind als Mittelwerte ± Stabw von fünf unabhängigen biologischen Replikaten angegeben. Sternchen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf den Student's *t*-test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). Der komplette Datensatz ist im Anhang Tabelle 8-1 zu finden.

Ergebnisse

Passend zu den bisherigen Erkenntnissen intensiviert ein Transfer der *PGLP*-Linien auf LC-Bedingungen die meisten unter HC beobachteten Veränderungen. Im Zusammenhang mit den *PGLP*-Überexpressionslinien treten neue Veränderungen auf (Abb. 5-17). Wie erwartet ist im Wildtyp der auffälligste Effekt die Aktivierung der Photorespiration. In der GC-MS-Analyse sind die Werte für Glykolat, Glycin, Serin und Glycerat erhöht. Neben der Photorespiration werden auch andere Stoffwechselwege durch die Normalluft beeinflusst und es konnten ein paar weitere Veränderungen beim Wildtyp beobachtet werden. Es kommt zu einer Erhöhung der Gehalte an Galactinol, Ethanolamin und Threonat sowie zu einer Reduzierung bei Glukose, Asparagin, Methionin, Arginin und Bernsteinsäure. In Abbildung 5-17 ist zu sehen, dass im Vergleich zum Wildtyp ein Absenken der *PGLP*-Aktivität eine schrittweise Verschlechterung des Stoffflusses innerhalb der Photorespiration zur Folge hat. Alle Metabolite der Photorespiration werden in verschärfter Weise in den *PGLP*-Antisenselinien akkumuliert. Besonders Glykolat zeigt den höchsten Anstieg. Die meisten metabolischen Veränderungen anderer Stoffwechselwege verschärfen sich in den Linien mit stark reduzierter *PGLP*-Aktivität. Einige Aminosäuren akkumulieren in hohen Mengen, besonders die verzweigt kettigen und aromatischen Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin und Tyrosin). Außerdem sind die *PGLP*-Antisenselinien durch einen induzierten GABA-shunt gekennzeichnet, sowie einem beeinträchtigten Harnstoffzyklus, da sie stickstoffhaltige Komponenten wie Ornithin, Arginin, Putrescin und Guanidin akkumulieren. Die *PGLP*-Überexpressionslinien zeigen eine wildtypähnliche Induktion der Photorespiration. Jedoch zeigt sich, wie unter HC, eine Reduktion von Glycin in den Überexpressionslinien O1 und O9. Auch die meisten der anderen analysierten Metabolite zeigen ein wildtypähnliches Muster. Außer Nicotinat, welches in allen drei Überexpressionslinien erhöht ist. In zwei der drei Überexpressionslinien sind Threonat und Itaconat gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, während für Maltose, Fruktose, Asparagin und 2-Oxoglutarat eine Reduktion zu beobachten ist. In der Linie O1 werden zuckerähnliche Komponenten (Galactinol, Raffinose, Isomaltose) und Lysin akkumuliert (Abb 5-17). Zusammengefasst zeigt die Reduktion der *PGLP* eine starke Beeinträchtigung des zentralen Kohlenstoffwechsels durch erhöhte Akkumulation von Metaboliten. Dagegen wird die Überexpression der *PGLP* toleriert und zeigt keine unspezifischen Störungen im zentralen Kohlenstoffwechsel.

Ergebnisse

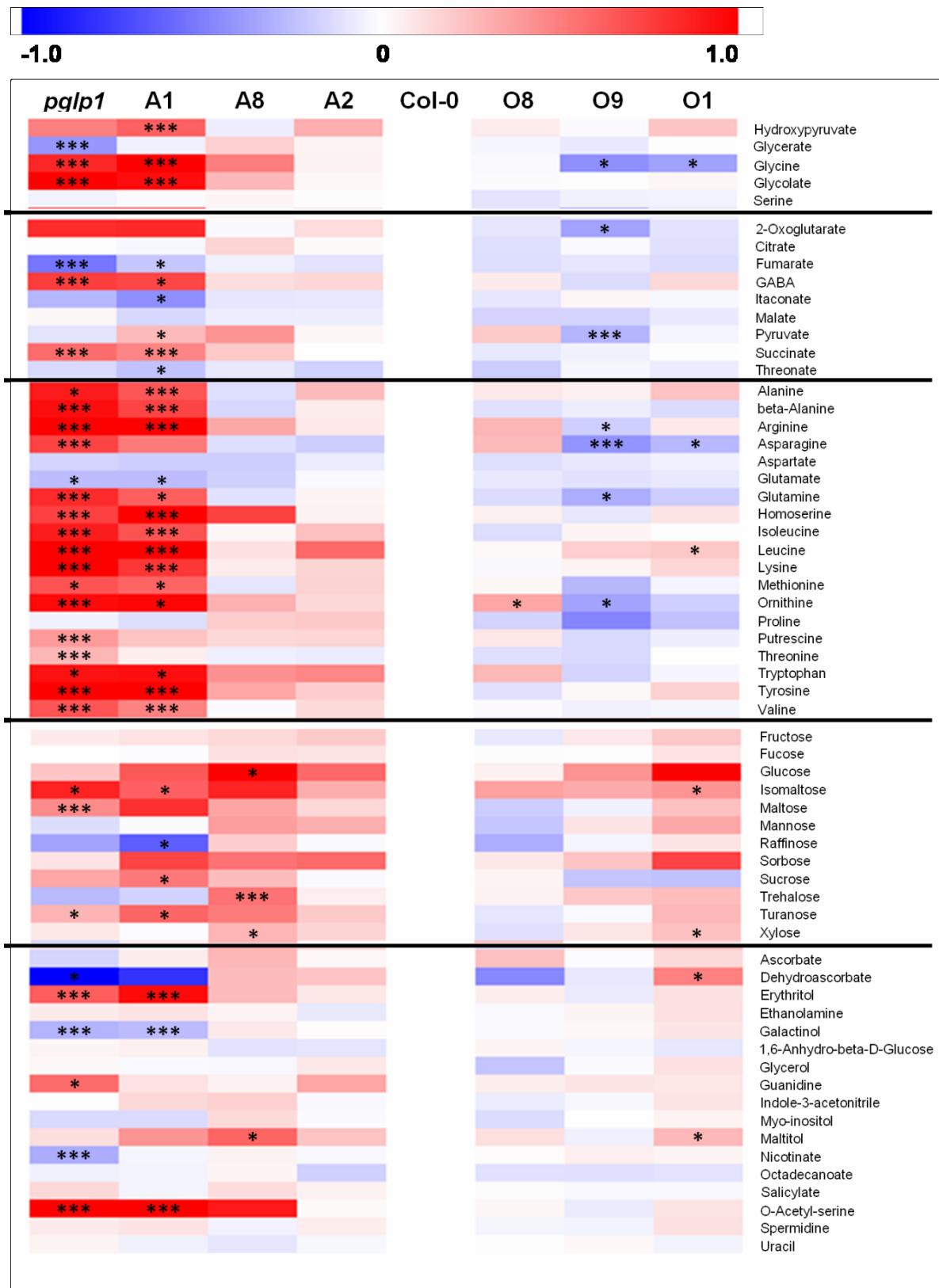


Abbildung 5-17 Metabolitmengen von PGLP-Linien in LC

Blattmaterial wurde in der Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 (Boyes et al 2001) einen Tag nach dem Transfer auf Normalluft (0.039% CO₂) geerntet. Die gezeigten relativen steady-state Gehalte sind als Mittelwerte ± Stabw von fünf unabhängigen biologischen Replikaten angegeben. Sternchen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf den Student's t-test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). Der komplette Datensatz ist zu finden im Anhang Tabelle 8-2

5.6 Der geringe *PGLP*-Gehalt reduziert die Stärkesynthese, während ein hoher *PGLP*-Gehalt diese fördert

Es gibt viele Umweltfaktoren, die in Pflanzen eine Reaktion hervorrufen und den Phänotyp verändern können. Beispiele für solche Umweltfaktoren sind die CO₂- und O₂-Konzentration in der Luft, die Photoperiode, Pathogene, die Kohlenstoffverfügbarkeit und Stoffwechselmetabolite. Pflanzen mit einem Defekt in der Photorespiration zeigen eine veränderte Reaktion auf diese Faktoren (Timm und Bauwe 2013). In Vorarbeiten mit der *pglp1*-Mutante durch Stefan Timm aus der Pflanzenphysiologie Rostock wurde untersucht, ob ein bestimmter Umweltfaktor oder eine bestimmte Behandlung die Intensität der *PGLP1*-Mutation lindert. Zum Beispiel führt ein Anstieg der CO₂-Konzentration zu einer Linderung des *pglp1*-Phänotyps (Timm und Bauwe 2013), jedoch nicht zur vollständigen Aufhebung. Als nächstes wurden die Photoperioden zwischen Kurz- (10/14 h Tag/Nacht) und Lang-Tag (16/8 h Tag/Nacht) variiert, bei gleichbleibend erhöhten CO₂-Konditionen (1%). Interessanterweise gedeiht *pglp1* deutlich besser bei längeren als bei kurzen Lichtphasen (Abb. 5-18 A). In einem anderen Versuch wurde getestet wie *pglp1* im Vergleich zum Wildtyp auf MS-Medium mit verschiedenen Saccharose-Konzentrationen (0, 1 oder 2%) wächst. Dieser Versuch wurde unter 1% CO₂ (HC) und Normalluft (LC) durchgeführt. Mit steigender Saccharose-Konzentration verbessert sich der visuelle Phänotyp von *pglp1* bei HC. Aber das Wachstum von *pglp1* bleibt gegenüber dem Wildtyp reduziert. Interessanterweise ermöglicht die externe Gabe von über 1% Saccharose unter LC nicht nur die Keimung von *pglp1*, sondern teilweise auch das Wachstum (Abb. 5-18 B). Diese Analysen deuten an, dass *pglp1* phänotypische Anzeichen, vergleichbar zu einer Mutante mit Defekt, in der Stärkebiosynthese zeigt (Caspar et al., 1985; Wiese et al., 2007; Yu et al., 2000). Um weitere Beweise zu liefern, wurde als nächstes enzymatisch die Menge an Stärke und ausgewählten Zuckern (Glukose, Fruktose und Saccharose) in den Blättern von *pglp1* und dem Wildtyp quantifiziert. Das Blattmaterial wurde unter erhöhtem CO₂ und nach einem Tag unter Normalluft geerntet. Bereits bei erhöhtem CO₂ besitzt *pglp1* ~25% weniger Stärke im Vergleich zum Wildtyp, während die löslichen Zucker leicht erhöht sind (Abb. 5-18 C). Unter Normalluft scheint *pglp1* praktisch stärkefrei zu sein, wieder verbunden mit erhöhten Werten für die löslichen Zucker. Saccharose und Fruktose akkumulieren unter Normalluft stärker als Glukose (5-18 C). Diese Analysen stützen die Annahme, dass die *pglp1* einen stärkefreien Phänotyp imitiert. Abgesehen von der Photorespiration muss es zusätzliche spezifische Mechanismen geben, die diesen Phänotyp hervorrufen.

Ergebnisse

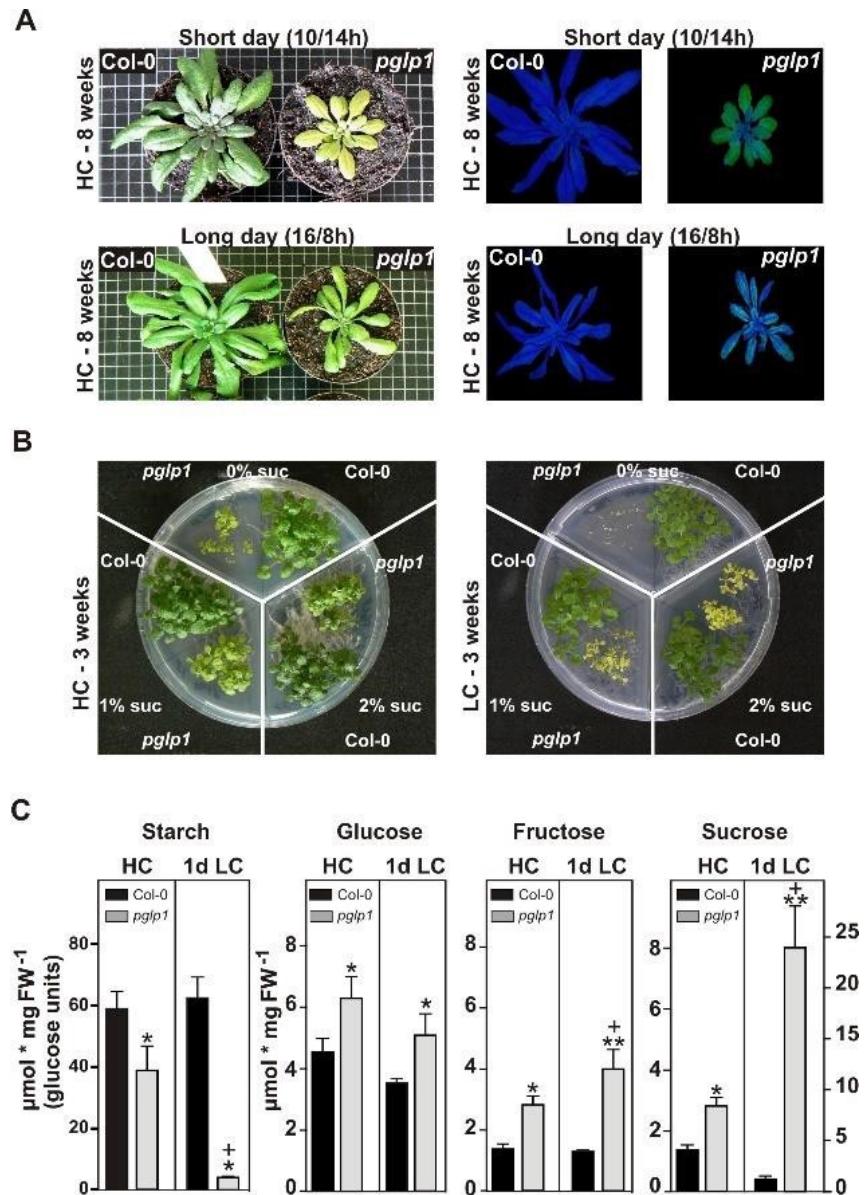


Abbildung 5-18 Das Ausschalten von *PGLP* hat einen Phänotyp mit Anzeichen einer stärkefreien Mutante zur Folge.

(A) Zeigt Ergebnisse von Vorarbeiten von Stefan Timm (Pflanzenphysiologie Universität Rostock). Phänotyp von *pglp1* im Vergleich zum Wildtyp in Hoch-CO₂ (HC, 1%) für 8 Wochen unter Kurz- oder Langtag-Konditionen und repräsentative Chlorophyll a Fluoreszenz images davon. **(B)** Wachstum von *pglp1*- und Wildtyp-Samen auf 1/2 MS-Medium versetzt mit verschiedenen Saccharose-Konzentrationen. **(C)** Sind Messungen die durch Michael Mielewczik (Forschungszentrum Jülich) im Rahmen von Pilotversuchen der PROMICS Forschergruppe durchgeführt und im Timm *et al.* 2012 verwendet wurden. Absolute Stärke- und lösliche Zuckermengen im Blatt von *pglp1* und dem Wildtyp am Ende des Tages unter Hoch-CO₂ und 1 Tag nach Transfer zu Normalluft. Die Angabe der Mittelwerte erfolgt ± Stabw von fünf biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf den Student's *t*-test (**p* < 0.05) und bezogen auf den jeweiligen HC-Wert.

In Anbetracht der Tatsache, dass *pglp1* einer stärkefreien Mutante gleicht, wurden die transgenen Linien genauer auf ihre Stärkegehalte untersucht. Wie bei den photosynthetischen Messungen und den Metabolitanalysen wurden die *PGLP*-Linien unter HC-Bedingungen aufgezogen und dann auf LC-Bedingungen umgesetzt. Für beide Bedingungen wurde am

Ergebnisse

Ende des Tages (EoD, 10 h Licht) Blattmaterial zur Stärkegehaltsbestimmung geerntet. Wie die Abbildung 5-19 zeigt, haben die Antisense- und die Überexpressionslinien unter HC-Bedingungen eine ähnliche Menge an Stärke wie die Wildtypkontrolle, nur die *pglp1* weist eine signifikante Reduktion auf. Nach dem Transfer auf LC sinkt der Stärkegehalt in den Antisenselinien rapide ab. In allen *PGLP* reduzierten Linien ist die Stärkemenge unterhalb von 50% der Wildtypkontrolle. Der Stärkegehalt folgt der gleichen Reihenfolge wie die *PGLP*-Reduktion (*pglp1* < A1 < A2, A8) vorliegt. Interessanterweise ist der Stärkegehalt in den Überexpressionslinien (O1 und O9) unter LC signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht, während in O8 keine signifikante Veränderung beobachtet werden konnte (Abb. 5-19).

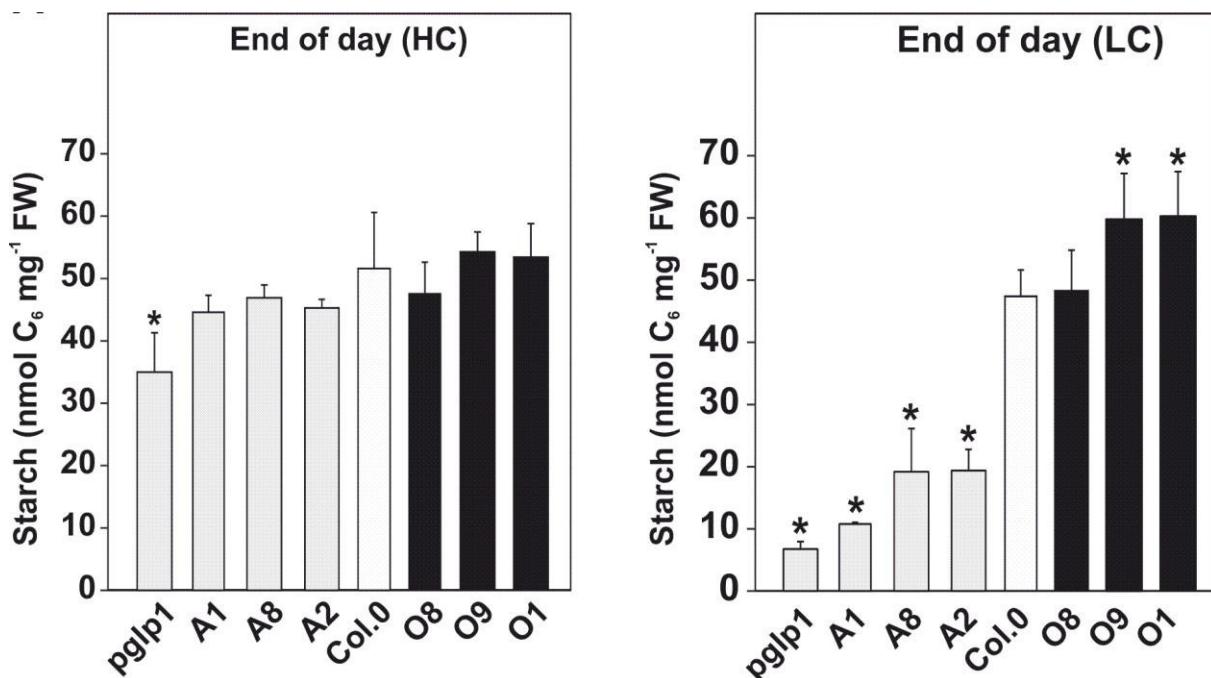


Abbildung 5-19 Stärkegehalte in den *PGLP*-Linien unter HC und LC

Absolute Stärkemengen in Antisense und Überexpressionslinien am Ende der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 gemäß Boyes *et al.* (2001) in HC und LC. Die Angabe der Werte erfolgt als Mittelwerte \pm Stabw von mindestens vier unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die signifikant von der Wildtyp Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's *t*-test (**p* < 0.05).

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurde der Stärkeumsatz in den Überexpressionslinien genauer untersucht. Dazu wurden die Überexpressoren und der Wildtyp unter Normalluft angezogen. Nach 8 Wochen Wachstum wurde über einen 24 h Zeitraum in einem 4 h Intervall Blattmaterial geerntet und die Stärkemenge enzymatisch bestimmt. Mit Hilfe der erhaltenen Werte konnte dann die Synthese- und die Abbaurate von Stärke in $\mu\text{mol Glukose g}^{-1} \text{FM h}^{-1}$ ermittelt werden, die in Abbildung 5-20 zu sehen ist. Die Überexpressionslinien mit hoher PGLP-Aktivität (O9 und O1) zeigen eine signifikant erhöhte Syntheserate, während die Abbaurate nur in O1 signifikant erhöht ist (Abb. 5-20).

Ergebnisse

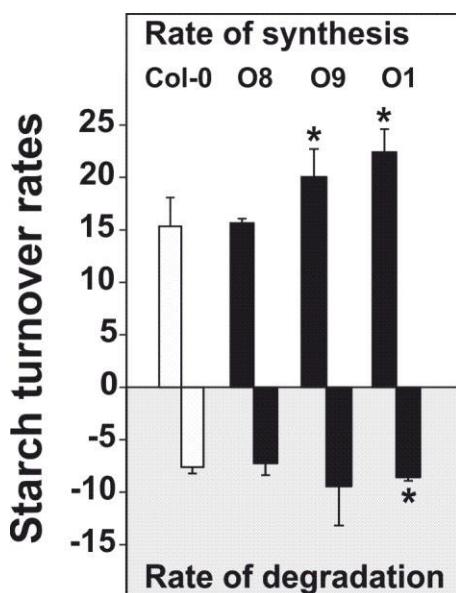


Abbildung 5-20 Biosyntheseraten in $\mu\text{mol C}_6 \text{ g}^{-1} \text{ FM h}^{-1}$ in *PGLP*-Überexpressionslinien in LC

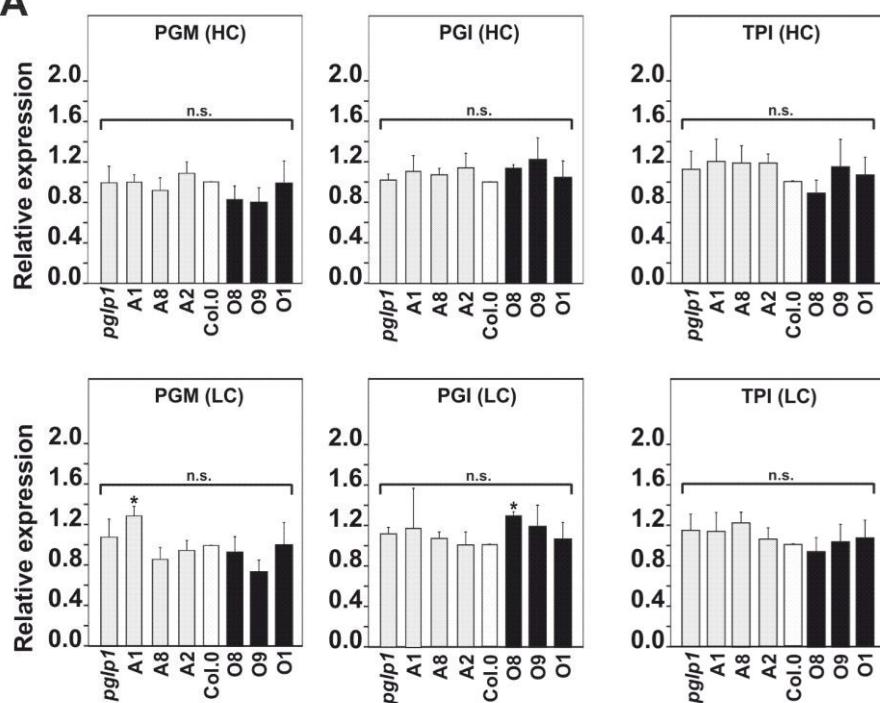
Stärkesynthese und -abbauraten von *PGLP*-Überexpressoren in Normalluft. Die Angabe der Werte erfolgt als Mittelwerte \pm Stabw von mindestens vier unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte die signifikant von der Wildtyp-Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's *t*-test (* $p < 0.05$).

Wegen der deutlichen Effekte auf den Stärkemetabolismus wurde als nächstes geprüft, ob Enzyme der Stärkesynthese, insbesondere Enzyme zur Bereitstellung von Stärkevorläufern, durch 2-PG beeinflusst werden. Es wurde geprüft, ob auf mRNA-Ebene eine Veränderung in der Expression für Phosphoglukoisomerase (PGI), Phosphoglukomutase (PGM) und Triosephosphatisomerase (TPI) eintritt, als Reaktion auf veränderte 2-PG-Konzentrationen. Von den transgenen Linien *pglp1* und dem Wildtyp wurde unter HC- und LC-Blattmaterial für RNA-Isolation genommen. Mit der RNA wurde dann cDNA synthetisiert und mit qRT-PCR die mRNA-Expression in den Blättern der transgenen Pflanzen für PGM, PGI und TPI untersucht (Abb. 5-21 A). Die relative Expression von PGM, PGI und TPI ist unter HC und LC unverändert in den *PGLP* veränderten Linien und weicht nicht von der Wildtypkontrolle ab. Da Messungen in Blattextrakten nicht unbedingt die Inhibition durch 2-PG auf die Enzymaktivität wiedergeben, wurden rekombinante Proteine von PGM, PGI und TPI genutzt. TPI wurde als Kontrolle mitgeführt, da hier die inhibitorische Wirkung von 2-PG an Erbsen bereits gezeigt wurde (Anderson *et al.*, 1971). Das jeweilige Gen für PGM, PGI und TPI aus *Arabidopsis* wurde in den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21de transformiert. Das rekombinante Protein wurde für die Enzymmessung eingesetzt und 2-PG in verschiedenen Konzentrationen zum Enzymtest zugefügt. Die Enzymaktivitäten von PGM und PGI blieben mit 2-PG-Konzentrationen bis zu 3,5 mM (Abb. 5-21 B) auf einem konstanten Niveau. Für TPI konnte die Inhibition durch 2-PG am rekombinanten Enzym bestätigt werden. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Änderungen im Stärkegehalt in den transgenen Linien wahrscheinlich

Ergebnisse

nicht auf Änderungen in den Mengen oder Aktivitäten der Enzyme zur Umwandlung von Stärkevorläufern zurückzuführen sind.

A



B

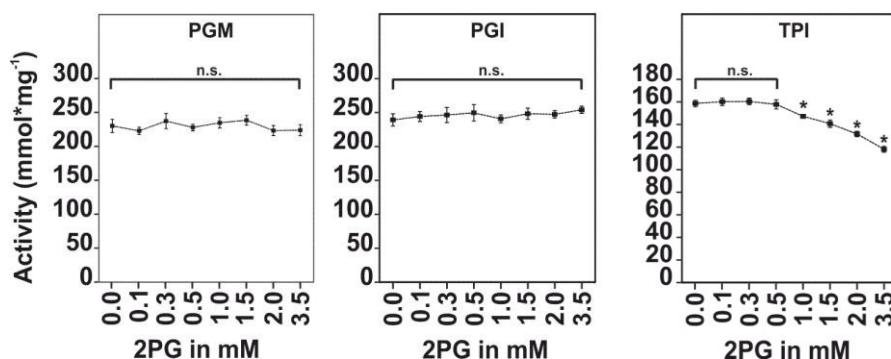


Abbildung 5-21 Expressionsmuster von PGM, PGI und TPI Transkripten und Aktivitäten von rekombinanten Enzymen mit 2-PG als potentiellen Inhibitor.

Pflanzen wurden bis zum Stadium 5.1 (8 Wochen) unter erhöhtem CO₂ (HC, 1%) angezogen und zu Normalluft (LC, 0.039%) überführt. Proben für RNA-Isolation wurden zur Mitte der Lichtperiode genommen. **(A)** PGM-, PGI- und TPI-Transkriptmuster in transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp und **(B)** PGM-, PGI- und TPI-Aktivitäten von rekombinanten Enzymen mit Einsatz von 2-PG als potentiellen Inhibitor. Gezeigt sind Mittelwerte ± Stabw von 3 biologischen (**A**) und 3 technischen (**B**) Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte die statistisch signifikant von der Kontrolle abweichen (*p < 0.05; n.s. – nicht signifikant).

5.7 Ein veränderter 2-PG-Umsatz hat Einfluss auf die Calvin-Benson-Zyklus-Aktivität

Die direkte Verbindung zwischen der Photorespiration und dem Calvin-Benson-Zyklus (CBZ) und die Lokalisation der PGLP in den Chloroplasten machen eine genauere Untersuchung des CBZ unumgänglich. Auch andere chloroplastenspezifische Stoffwechselwege, wie der Stärkemetabolismus, bedürfen einer näheren Analyse. Mit der Flüssigchromatographie, gekoppelt an Massenspektrometrie (LC-MS/MS), wurden die Gehalte an phosphorylierten Metaboliten quantifiziert. Mit dieser Methode wurden die absoluten Mengen ($\text{pmol} \cdot \text{mg FM}^{-1}$) von Intermediaten der Plastiden oder verknüpfter Prozesse (CBZ, Stärkemetabolismus und Saccharosesynthese) bestimmt. In Übereinstimmung zur GC-MS-Analyse wurden Proben von den Pflanzen unter den gleichen Bedingungen und Zeitpunkten analysiert (HC und LC, 5 h Belichtung). Der Fokus liegt auf den Linien, die signifikant in ihrer PGLP-Aktivität verändert sind (*pglp1*, A1, A8, O9, O1), während die physiologisch wildtypähnlichen Linien vernachlässigt wurden (A2 und O8).

Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben, wird 2-PG, passend zur PGLP-Reduktion, bereits unter erhöhten CO_2 -Bedingungen (Abb. 5-22) von *pglp1* ($\sim 244 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$), A1 ($\sim 11 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$) und A8 ($\sim 0,8 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$) akkumuliert. Im Gegensatz dazu sind die Mengen im Wildtyp niedrig ($\sim 0,4 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$) und wie erwartet unverändert in den Überexpressionslinien ($\sim 0,5 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$ in O9 und $\sim 0,6 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$ in O1). Der stärkste Effekt auf ein CBZ-Zwischenprodukt wurde bei Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P) gefunden. Mit sinkendem PGLP-Gehalt in den Antisenselinien sinkt auch der Gehalt an S7P (Abb. 5-22). In *pglp1* ist der niedrigste Gehalt an S7P mit $25,5 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$. Im Vergleich dazu hat der Wildtyp $101,8 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$. In den Überexpressionslinien ist für S7P mit $76,50 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$ in O9 und $68,63 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$ in O1 ebenfalls eine Reduktion zu beobachten. Für 3-PGA und NADP ist der höchste Gehalt im Wildtyp und ein reduzierter Gehalt in allen PGLP veränderten Linien zu beobachten. Andere analysierte Stoffwechselmetabolite des CBZ (RuBP, DHAP, SBP, R5P, Ru5P+X5P) zeigen nicht dieses Muster (Abb. 5-22). Die Zwischenprodukte der Stärke- und Saccharosesynthese (FBP, F6P, G6P, G1P, UDPG, ADPG) zeigen keine konsequenten Veränderungen. Lediglich eine Abnahme bei F6P (*pglp1* und A1) und ADPG (*pglp1*, A1 und O9) ist zu beobachten. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich in fast allen Linien reduzierte Mengen an NADP und ADP (A1, O9, O1), aber ohne ein passendes Muster für NAD und AMP.

Ergebnisse

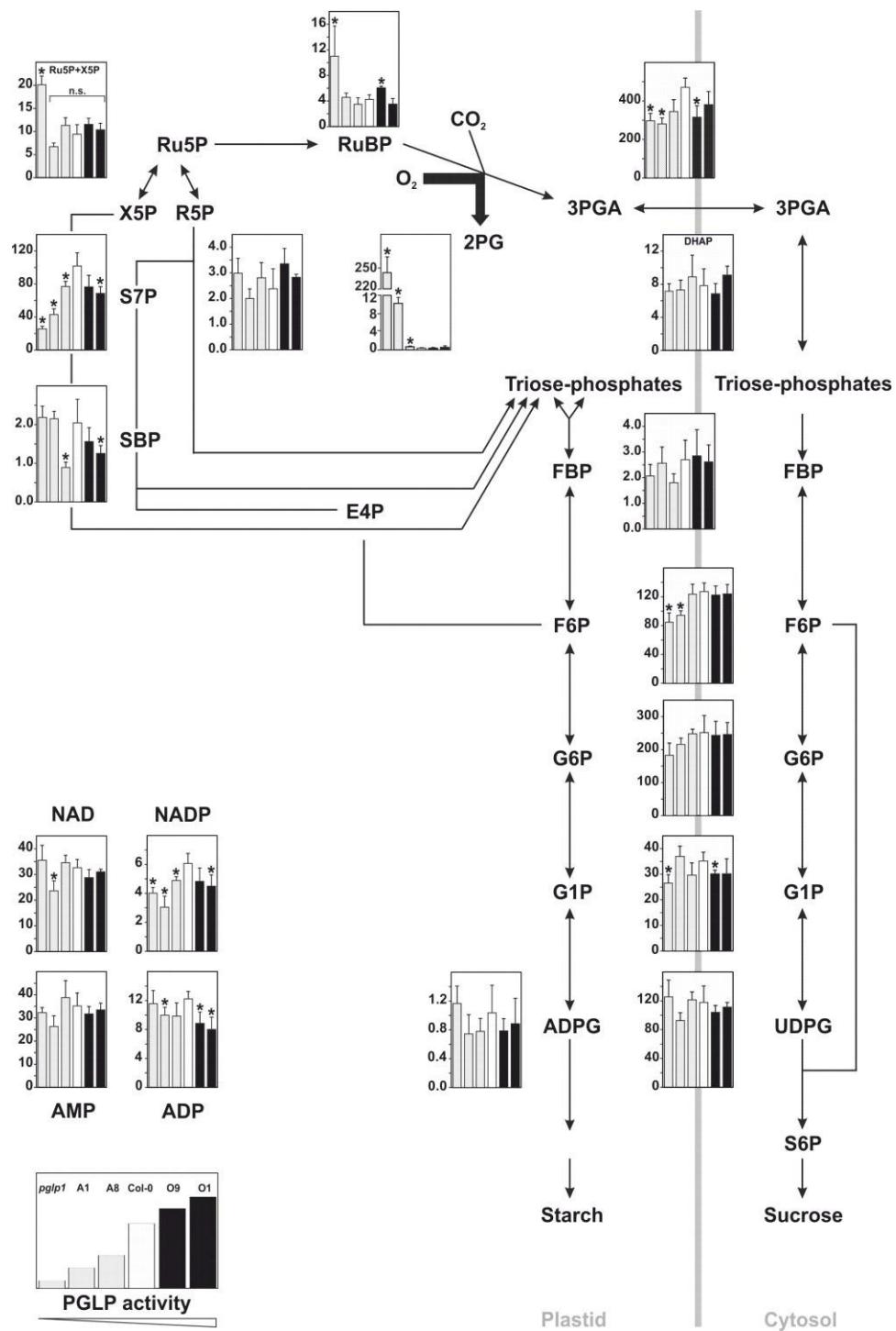


Abbildung 5-22 Absolute Konzentrationen von Intermediaten aus dem CBZ, Saccharose- und Stärkesynthese in den PGLP-Linien bei HC.

Blattmaterial wurde zur Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 laut Boyes *et al.* (2001) unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%, HC) geerntet. Die gezeigten absoluten steady-state Gehalte sind in pmol*mg⁻¹ FM angegeben. Werte sind Mittelwerte ± Stabw von vier unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die signifikant von der Wildtyp-Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's t-test (* p < 0.05). Die gezeigte Abbildung wurde von Arrivault *et al.* (2009) modifiziert. Der komplette Datensatz ist im Anhang Tabelle 8-15 zu finden.

Ergebnisse

Durch LC wird die 2-PG-Bildung induziert und dadurch die Aktivität der Photorespiration erhöht. Der 2-PG-Gehalt im Wildtyp steigt an ($\sim 1,8 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$). Die Abbildung 5-23 zeigt die Ergebnisse der LC-Metabolitanalyse mittels LC/MS-MS. 2-PG wird in hohem Maße in *pglp1* ($\sim 1110 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$), A1 ($\sim 720 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$) und A8 ($\sim 470 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$) akkumuliert. Im Gegensatz dazu zeigt sich in beiden Überexpressionslinien O9 ($\sim 0,7 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$) und O1 ($\sim 1,1 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ FM}$) ein geringerer 2-PG-Gehalt als im Wildtyp. Dies ist der erhöhten PGLP-Aktivität zuzuschreiben. 3-PGA ist in *pglp1* mit 25,2 pmol mg⁻¹ FM und in A1 mit 48,9 pmol mg⁻¹ FM stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp mit 247,4 pmol mg⁻¹ FM. Auch die beiden Überexpressionslinien zeigen einen geringeren Gehalt an 3-PGA (O9 mit 162,4 pmol mg⁻¹ FM und O1 mit 171,4 pmol mg⁻¹ FM). Als Antwort auf die verringerte CO₂-Konzentration in der Luft sind die CBZ Intermediate (RuBP, DHAP, SBP, S7P, R5P) in *pglp1* und den Antisenselinien stark reduziert. Interessanterweise führt auch die gesteigerte PGLP-Aktivität in O9 und O1 zu einer reduzierten Menge an RuBP, DHAP und S7P (Abb. 5-23). Die Zwischenprodukte der Stärke- und Saccharosesynthese (FBP, F6P, G6P, G1P, UDPG und ADPG) sind in *pglp1* und den Antisenselinien stark reduziert, während die Überexpressionslinien bei diesen Metaboliten wildtypähnliche Gehalte zeigen (Abb. 5-23). NADP (*pglp1* und A1) und ADP (A1, A8, O9 und O1) sind im Vergleich zum Wildtyp auch unter LC-Bedingungen reduziert, aber wieder ohne ähnliche Reaktion für NAD und AMP. Alle Informationen aus dem LC-MS/MS zusammengenommen, beeinträchtigt die erhöhte 2-PG-Menge die RuBP-Regeneration und die Stärkesynthese in den PGLP reduzierten Linien. Höhere PGLP-Aktivitäten scheinen die CO₂-Fixierung und die Leistung des CBZ (verminderte RuBP, DHAP, S7P) anzuregen.

Ergebnisse

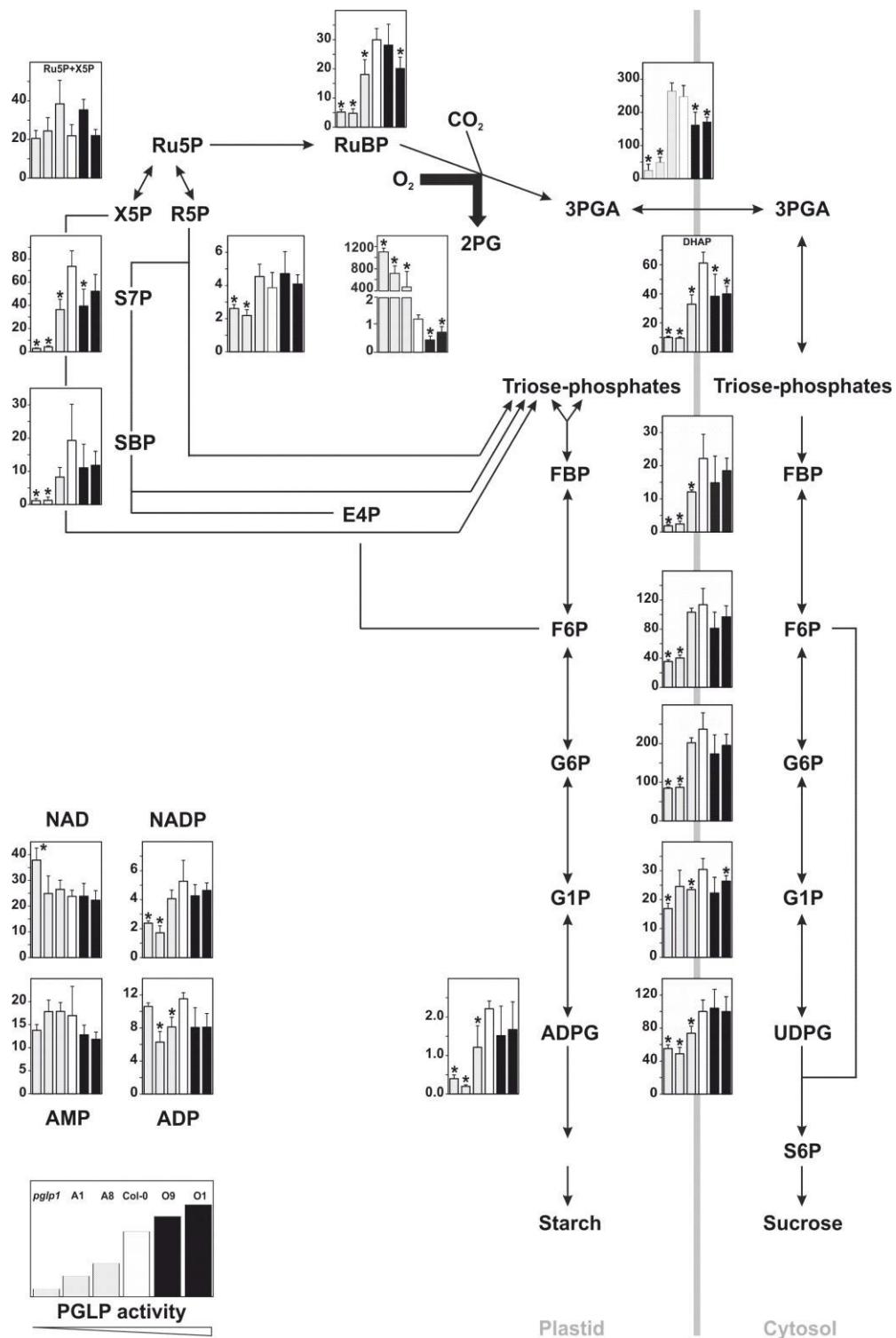


Abbildung 5-23 Absolute Konzentrationen von Intermediaten aus dem CBZ, der Saccharose- und Stärkesynthese in PGLP-Linien in Normalluft.

Blattmaterial wurde zur Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 laut Boyes et al (2001) unter Normalluft (0,039%, LC) geerntet. Die gezeigten absoluten steady-state Gehalte sind in pmol*mg⁻¹ FM angegeben. Werte sind Mittelwerte ± Stabw von vier unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die signifikant von der Wildtyp-Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's t-test (*p < 0,05). Die gezeigte Abbildung wurde von Arrivault et al. (2009) modifiziert. Der komplette Datensatz ist im Anhang Tabelle 8-16 zu finden.

5.8 Ein hoher 2-PG-Umsatz führt zu stressresistenteren Pflanzen

5.8.1 Ein erhöhter 2-PG-Umsatz führt zu einer besseren Anpassung an erhöhte Temperaturen

Die Oxygenasereaktion der Rubisco kann durch verschiedene Stressfaktoren beeinträchtigt werden bzw. das Gleichgewicht zwischen der Carboxylierung und der Oxygenierungsreaktion wird zur Oxygenierung hin verschoben. Es wird mehr 2-PG gebildet und dies macht einen besseren Umsatz von photorespiratorischen Metaboliten wichtig. Zu den abiotischen Stressfaktoren gehören Temperatur, Wasserverfügbarkeit bzw. Trockenheit, Salzgehalte und Sauerstoffkonzentrationen. Die Rolle der Photorespiration (PR) bei der Reaktion auf erhöhten Stress durch abiotische Faktoren ist mehrfach untersucht worden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Expression mehrerer Enzyme der PR (GOX, CAT, HPR, SGAT) durch Licht induziert wird (Raman und Oliver, 1997). In Tabak wurde herausgefunden, dass bei Trockenstress der Proteingehalt der HPR im Wildtyp ansteigt, genauso wie in Mutanten mit eingeschränkter PR (Wingler *et al.*, 2000). Die PR scheint eine Rolle bei der Stressabwehr zu spielen, da sie Glycin zur Verfügung stellt, welches für die Glutathionsynthese eingesetzt wird, die wiederum in der Stressabwehr involviert ist (Wingler, 2000). Während der PR werden ATP und Reduktionsäquivalente verbraucht, wodurch die Photosynthese (PS) vor einer Überreduktion geschützt wird und vor Photoinhibition. Eine gesteigerte Aktivität der PR könnte sich positiv auf die Stressabwehr auswirken. Um diese These näher zu beleuchten, wurden die *PGLP*-Überexpressoren auf verschiedene Stressfaktoren getestet. Dabei zeigten *PGLP*-Überexpressionslinien bereits eine signifikant verbesserte CO₂-Aufnahmerate bei 40% Sauerstoff (Tabelle 5-3). In der Linie O1 zeigt sich eine gesteigerte Photosyntheserate bei erhöhtem O₂-Partialdruck. In einem weiteren Experiment wurden die *PGLP*-Überexpressoren hinsichtlich ihrer Reaktion auf erhöhte Temperatur getestet. In einem Vorversuch wurden die *PGLP*-Überexpressionslinien und der Wildtyp nach Erreichen des Wachstumsstadium 5.1 (Boyes *et al.*, 2001) auf 25°C Tag/Nacht umgesetzt. Vor dem Umsetzen und 1 Tag nach dem Transfer wurden am Li-Cor Gaswechselmessungen vorgenommen. Die Abbildung 8-1 (Anhang) zeigt keine Abweichungen in der Photosyntheserate (A) und dem CO₂-Kompensationspunkt (Γ) zwischen den Überexpressoren und dem Wildtyp. Auch der Stärkegehalt wurde in diesen Pflanzen bestimmt und weicht nicht vom Wildtyp ab (Abb. 8-3 im Anhang). In verschiedenen Arbeiten wurden Temperatureffekte erst bei Differenzen von >5°C deutlich (Florian *et al.*, 2014; Atkin *et al.*, 2006; Koini *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011). Daher wurde das Experiment mit den Überexpressoren mit 30°C wiederholt. Das Wachstum der Pflanzen wurde an mehreren Tagen unter dieser Temperatur dokumentiert. Nach 10 Tagen der erhöhten Temperatur ausgesetzt, konnte ein Aufstellen der Blätter und ein Längenwachstum der Blattstiele beobachtet werden. In Abbildung 5-24 ist die Dokumentation nach 1 Tag und nach 10 Tagen bei 30°C gezeigt.

Ergebnisse

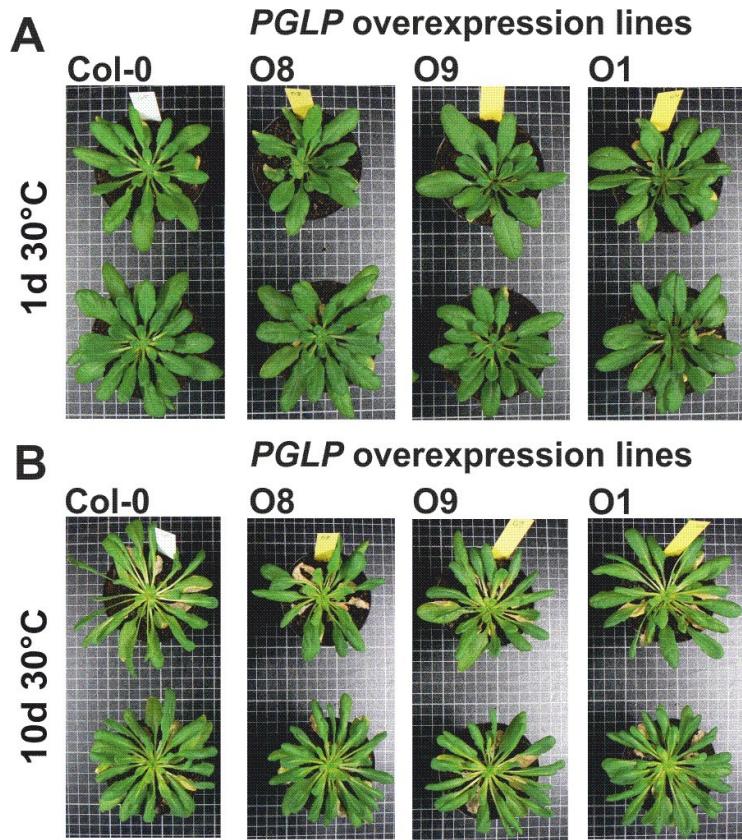


Abbildung 5-24 Phänotyp der *PGLP*-Überexpressionslinien als Antwort auf 30°C Tagestemperatur

Visueller Phänotyp der *PGLP*-Überexpressoren (**A**) 1 Tag nach Umsetzen auf 30°C und (**B**) 10 Tage bei 30°C

Am Li-Cor wurden zur Bestimmung der CO₂-Aufnahmerate (A) und des CO₂-Kompensationspunktes (Γ) nach 0, 1, 3 und 7 Tagen bei 30°C Gaswechselmessungen vorgenommen. Mit steigender Temperatur nimmt Γ zu und die Photosyntheseeffizienz nimmt ab. In Abbildung 5-25 ist die Photosyntheserate (A) dargestellt und zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den *PGLP*-Überexpressoren und dem Wildtyp nach 7d bei 30°C. Der CO₂-Kompensationspunkt steigt im Wildtyp vom Normbereich 60 µl l⁻¹ (Lexikon der Biochemie, Spektrum 1999) auf 100 µl l⁻¹, aber bei O8 und O1 bleibt er bei ~60 µl l⁻¹ (Abb. 5-25).

Ergebnisse

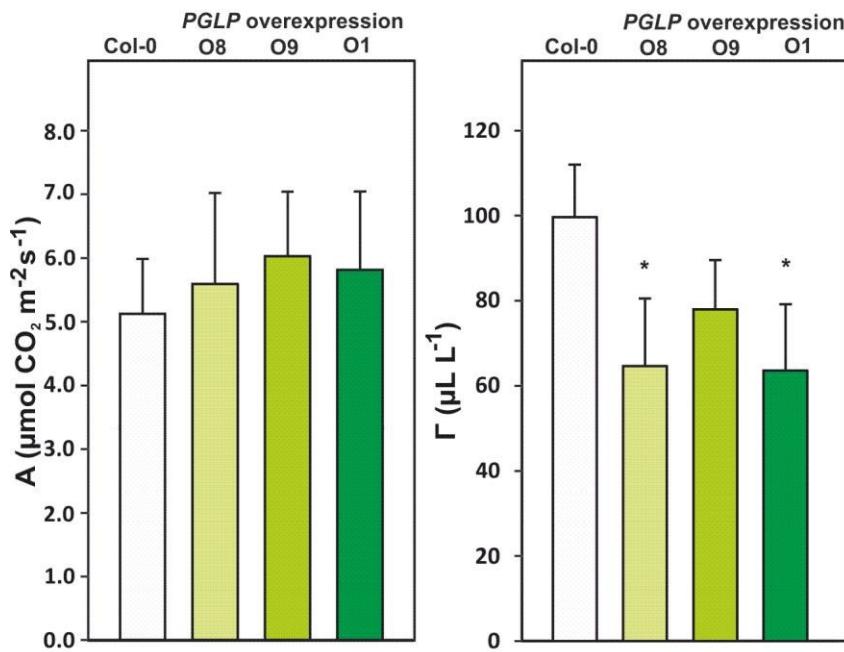


Abbildung 5-25 Gaswechsel-Parameter der *PGLP*-Überexpressoren nach 7 Tagen bei 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO_2 ; 20/18°C Tag/Nacht. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen gewachsen waren, wurden sie zu 30°C Tagestemperatur überführt. Nach einem Tag der neuen Umgebung ausgesetzt, wurden Gaswechselmessungen vorgenommen. (A) zeigt die Photosyntheserate (B) den Kompensationspunkt für CO_2 . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw von mindestens 5 unabhängigen, biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's Ttest ($p < 0,05$)

Der höhere Kompensationspunkt spricht für eine schlechtere CO_2 -Aufnahme des Wildtyps. Das spiegelt sich im Gehalt des interzellulären Kohlenstoffs wider (Tabelle 5-4). Die *PGLP*-Überexpressoren haben sich an die erhöhte Umgebungstemperatur besser anpassen können als der Wildtyp.

Tabelle 5-4 Angaben zum intrazellulären Kohlenstoffgehalt nach 7 Tagen bei 30°C Tagestemperatur in den *PGLP*-Überexpressionslinien

	col.0	O8	O9	O1
ci	$301,91 \pm 12,04$	$338,24 \pm 13,68$	$324,75 \pm 16,74$	$338,89 \pm 7,11$
ci/ca	$0,76 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,02$

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 20/18°C Tag/Nacht; 0,039% CO_2 bei LC. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt und für die Gaswechselmessungen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw von mindestens 5 unabhängigen, biologischen Replikaten. Fett gedruckte Werte weichen signifikant vom Wildtyp ab, basierend auf dem Student's Ttest ($p < 0,05$)

Eine niedrigere Photosyntheseeffizienz äußert sich in einer niedrigeren Stärkesynthese. Bei erhöhter Temperatur sinkt der Stärkegehalt in *Arabidopsis* (Florian et al., 2014). Von den *PGLP*-Überexpressoren und der Wildtypkontrolle wurde jeweils am Ende des Tages nach 0, 1, 3 und 7 Tagen bei 30°C Blattmaterial geerntet und enzymatisch der Stärkegehalt bestimmt.

Ergebnisse

Während der Exposition bei 30°C zeigten sich signifikante Änderungen im Stärkegehalt der Überexpressoren im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5-26). Bereits unter Standardbedingungen ist in den Linien O9 und O1 der Stärkegehalt signifikant um 26-27% erhöht. Nach nur einem Tag bei 30°C sinkt der Stärkegehalt im Wildtyp und den *PGLP*-Überexpressoren stark ab (ca. 40% weniger als am Vortag). Der Stärkegehalt fällt weiter in allen Pflanzenlinien, je länger sie der erhöhten Temperatur ausgesetzt sind. Nach 7 Tagen bei 30°C hat der Wildtyp nur noch 25% der Stärkemenge unter Standardbedingung. Die Linie O1 hat dagegen noch 41% der Stärkemenge unter Standardbedingung und im Vergleich zum Wildtyp nach 7 Tagen bei 30°C sogar 122% mehr Stärke. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die *PGLP*-Überexpressoren bei erhöhter Temperatur mehr Stärke akkumulieren können als der Wildtyp.

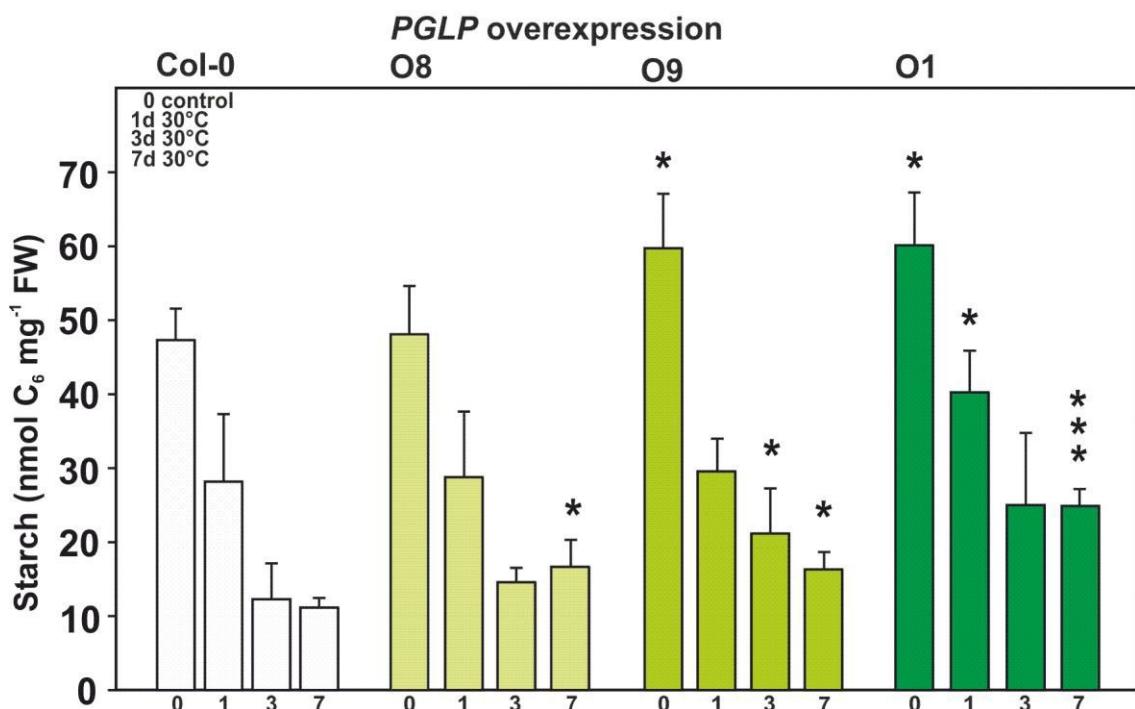


Abbildung 5-26 Stärkegehalte in *PGLP*-Überexpressoren bei 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 20/18°C Tag/Nacht; 0,039% CO₂. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt. Nach 1, 3 und 7 Tagen der neuen Umgebung ausgesetzt, wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Stärkegehaltbestimmungen verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 5 unabhängigen, biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's t-test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Als nächstes wurde der Aminosäurehaushalt unter Standardbedingungen und nach 1, 3 und 7 Tagen bei 30°C analysiert. Durch die erhöhte Umgebungstemperatur konnte im Wildtyp und in den Überexpressoren nach 1 Tag bei 30°C eine Reduktion in verschiedenen Aminosäuren beobachtet werden, dazu gehören Alanin, Aspartat, Glutamin, Glycin, Serin und Threonin. Der Gehalt von Glutamin sinkt nach längerer Exposition bei 30°C weiter, wobei in den Überexpressoren signifikant weniger vorliegt. Bei Glycin und Aspartat hingegen steigen die

Ergebnisse

Gehalte nach 3 Tagen wieder an. Bei den Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Phenylalanin, und Valin konnte im Wildtyp nach 1 Tag bei 30°C ein Anstieg beobachtet werden. Nach längerer Exposition bei 30°C sinkt der Gehalt bei Arginin und Phenylalanin wieder herab. Nicht bei den *PGLP*-Überexpressoren O8 und O9, hier steigt der Gehalt der beiden Aminosäuren nach längerem Zeitraum bei 30°C weiter an. Glutamin und Arginin sind exemplarisch einmal dargestellt (Abbildung 5-27).

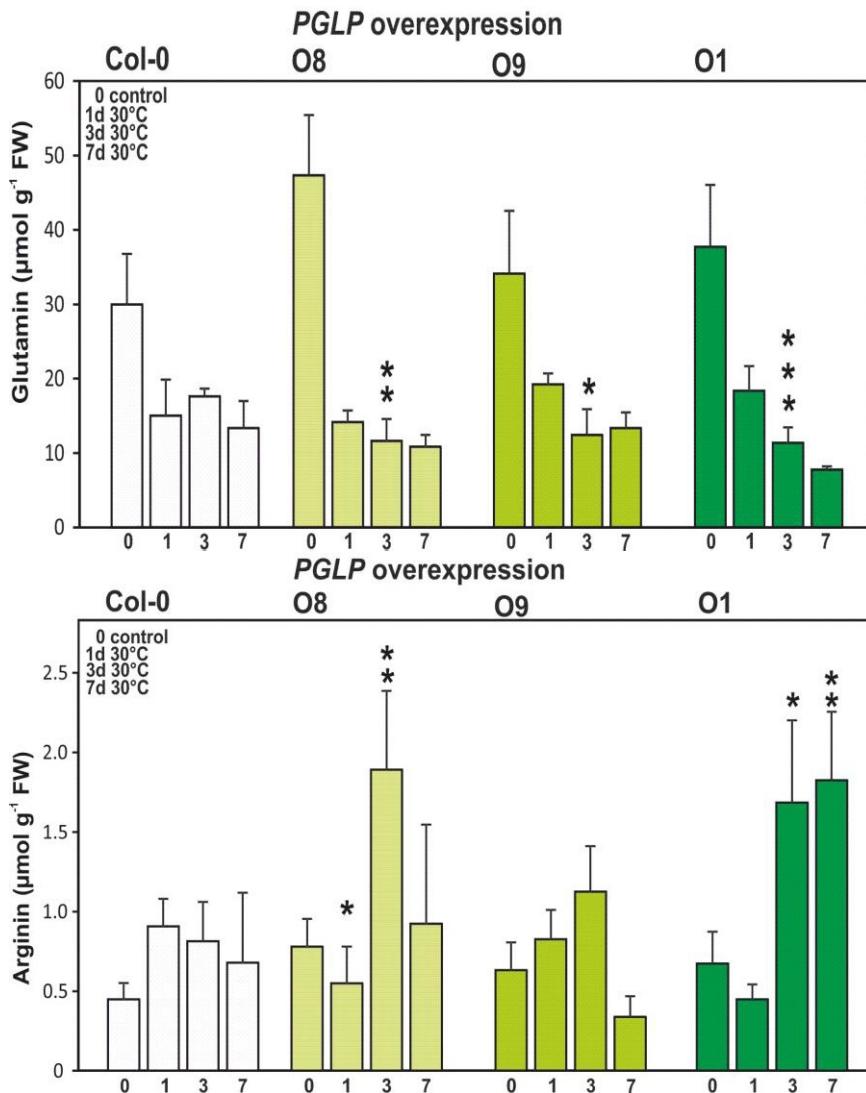


Abbildung 5-27 Glutamin- und Arginingehalt in *PGLP*-Überexpressoren bei 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 20/18°C Tag/Nacht; 0,039% CO₂. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt. Nach 1, 3 und 7 Tagen der neuen Umgebung ausgesetzt, wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Aminosäuregehaltsbestimmung mittels HPLC verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw von mindestens 5 unabhängigen, biologischen Replikaten. Sternchen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's t-test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Ergebnisse

Der Aminosäurehaushalt der *PGLP*-Überexpressionslinien unterscheidet sich vom Wildtyp durch Reduktion und Akkumulation von verschiedenen Aminosäuren als Anpassung an die erhöhte Temperatur. Die Unterschiede zwischen den *PGLP*-Überexpressoren und der Wildtypkontrolle treten deutlicher hervor, wenn die Pflanzen über einen längeren Zeitraum der erhöhten Temperatur ausgesetzt sind.

5.8.2 Wassermangel

Als einen weiteren abiotischen Stressfaktor wurde bei den *PGLP*-Überexpressoren das Verhalten bei Wassermangel untersucht. Dabei geht es um die Anpassungsfähigkeit der Pflanzen auf Schwankungen in den Umweltbedingungen zu reagieren. Es gibt Pflanzen die Wochen ohne Regen auskommen können, zum Beispiel die Wiederauferstehungspflanze (*Carterostigma plantagineum*). Für Nutzpflanzen ist die Verfügbarkeit an Wasser besonders wichtig. Bleibt das Wasser gerade in der Wachstumsphase aus, fällt die Ernte deutlich geringer aus. Die Untersuchung der *PGLP*-Überexpressoren bei Wassermangel soll Aufschluss darüber erbringen, ob eine gesteigerte Flussrate in der Photorespiration (PR) bzw. im Besonderen ein gesteigerter Abbau des 2-PG einen Einfluss auf die Photosyntheseleistung hat. Ein gestörter Fluss in der PR durch reduzierte PR Enzyme führt zu reduzierten Photosyntheseraten und beeinträchtigt die Stressabwehr (Wingler *et al.*, 2000). Ein gesteigerter 2-PG-Abbau müsste unter Wassermangel zu einer höheren Photosyntheserate im Vergleich zum Wildtyp führen. Hierzu wurden der Wildtyp und die *PGLP*-Überexpressoren zusammen in einem großen Topf co-kultiviert und nach 7 Wochen Wachstum dem Wassermangel ausgesetzt und der Phänotyp dokumentiert. In der Abbildung 5-28 ist zu beobachten, dass die Pflanzen sich ohne zusätzliche Wassergabe 4 Wochen (27 Tage) weiterentwickeln können. Der Wildtyp und die Überexpressoren nutzen die verbliebene Feuchtigkeit der Erde und die Luftfeuchtigkeit und wachsen weiter. Es ist noch keine Beeinträchtigung im Phänotyp zu erkennen. Bereits vier Tage später jedoch ist die Spannkraft aus den Blättern verschwunden und die Pflanzen welken dahin. Nach 38 Tagen ohne Wasserzufuhr haben sich die Blätter eingerollt und vertrocknen. Die Linie O1 hat noch nicht alle Blätter eingerollt und sieht etwas besser aus als der Wildtyp und die anderen beiden *PGLP*-Überexpressoren (Abb. 5-28).

Ergebnisse

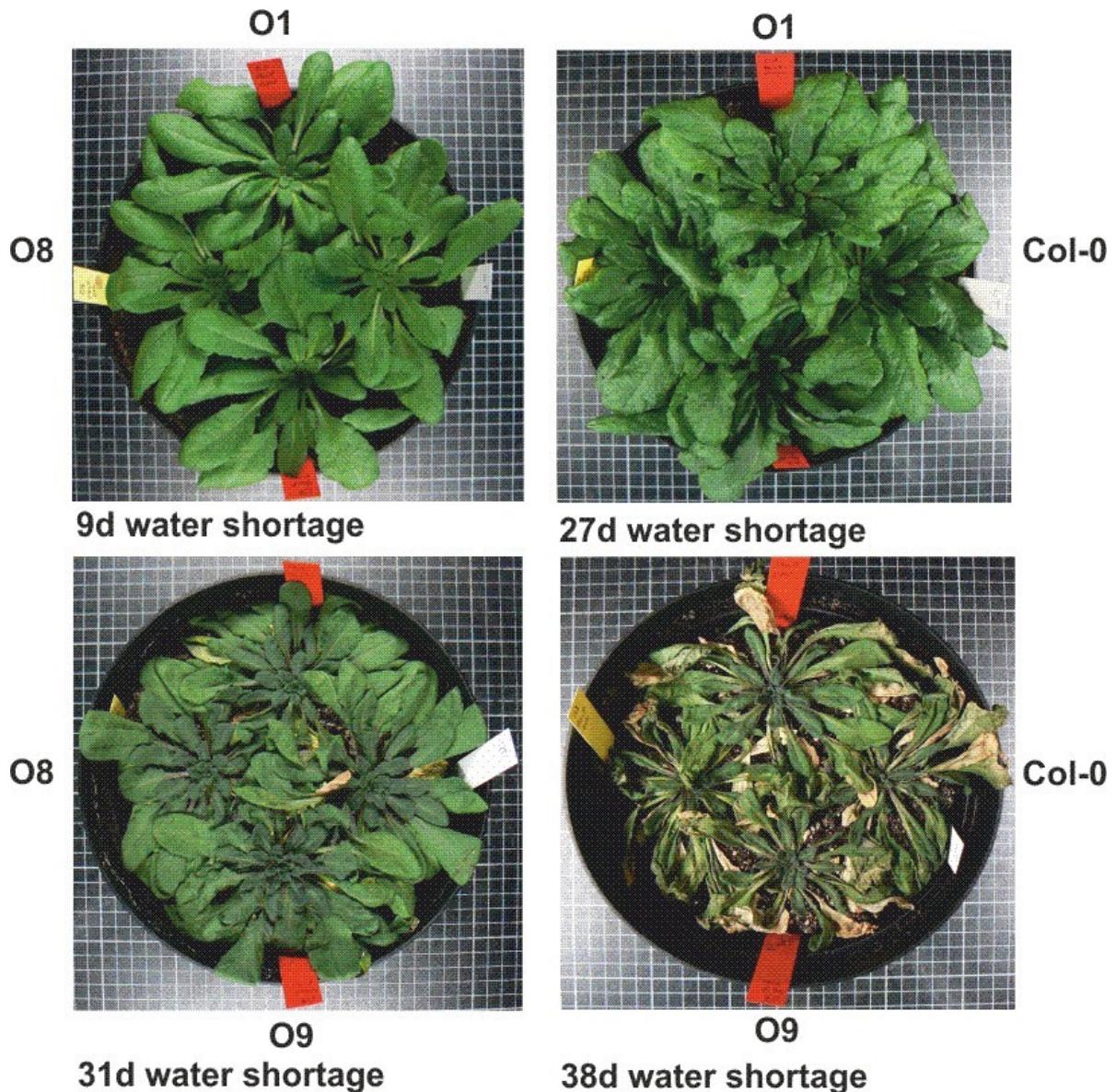


Abbildung 5-28 Phänotyp der *PGLP*-Überexpressionslinien als Antwort auf Wassermangel

Visueller Phänotyp nach 9, 27, 31 und 38 Tagen ohne Wassergabe. Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 20°C/18°C Tag/Nacht und 0,039% CO₂. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie dem Wassermangel ausgesetzt

Ein Parameter für die Fitness der Pflanzen ist die Bestimmung der maximalen Quantenausbeute des PSII (F_v/F_m). Alle 3-4 Tage wurde mittels Fluoreszenzmessung der F_v/F_m -Wert bestimmt. Die Abbildung 5-29 zeigt die Ergebnisse für Messungen innerhalb von 4 Wochen Wassermangel. Es ist zusehen, dass alle drei *PGLP*-Überexpressoren nach 13 bis 20 Tagen Wassermangel einen höheren F_v/F_m -Wert haben als der Wildtyp. Nach den 27 Tagen Wassermangel sinkt der F_v/F_m in allen Pflanzen kontinuierlich ohne signifikante Unterschiede zwischen den *PGLP*-Überexpressoren und dem Wildtyp. Aus dieser Messung geht hervor,

Ergebnisse

dass die *PGLP*-Überexpressoren den Wassermangel über einen längeren Zeitraum tolerieren können als der Wildtyp.

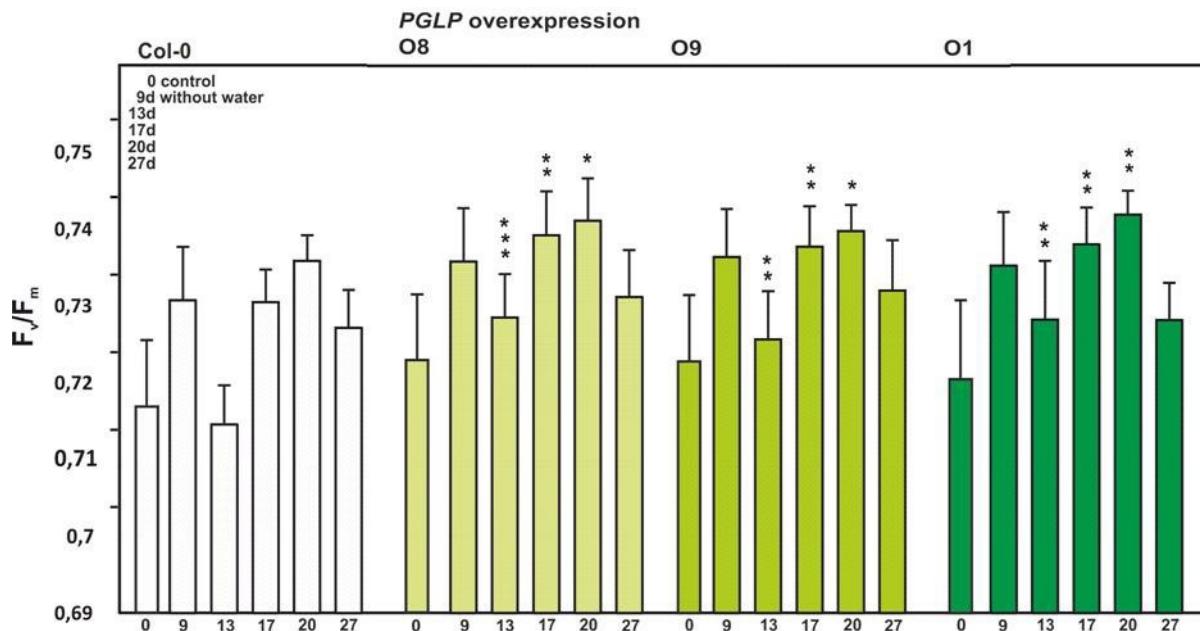


Abbildung 5-29 Chlorophyll a Fluoreszenz der *PGLP*-Überexpressoren bei Wassermangel

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 20°C/18°C Tag/Nacht und 0,039% CO₂. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie dem Wassermangel ausgesetzt und an mehreren Tagen für PAM- und Gaswechselmessungen verwendet. Gezeigt werden F_vF_m nach 9, 13, 20 und 27 Tagen Wassermangel. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's Ttest ($p < 0,05$)

Als nächstes wurde die Photosyntheseleistung durch Gaswechselmessungen untersucht. Dazu wurde eine Kontrollmessung ohne Wassermangel vorgenommen, dann nach 13 Tagen Wassermangel und nach 27 Tagen. In Abbildung 5-32 sind die Ergebnisse zu den Messungen grafisch zusammengefasst. Durch den Wassermangel sinkt die Photosyntheseleistung im Wildtyp und in den Überexpressionslinien, aber in allen *PGLP*-Überexpressionslinien ist nach 13 Tagen Wassermangel eine signifikant höhere Photosyntheseleistung zu beobachten. Die Photosyntheseleistung ist gegenüber der Wildtypkontrolle 30-34% höher. Nach 27 Tagen ohne Wasserzufuhr sinkt die Photosyntheseleistung in O9 und O1 herab, während sie im Wildtyp und O8 auf der gleichen Höhe bleibt wie nach 13 Tagen Wassermangel.

Ergebnisse

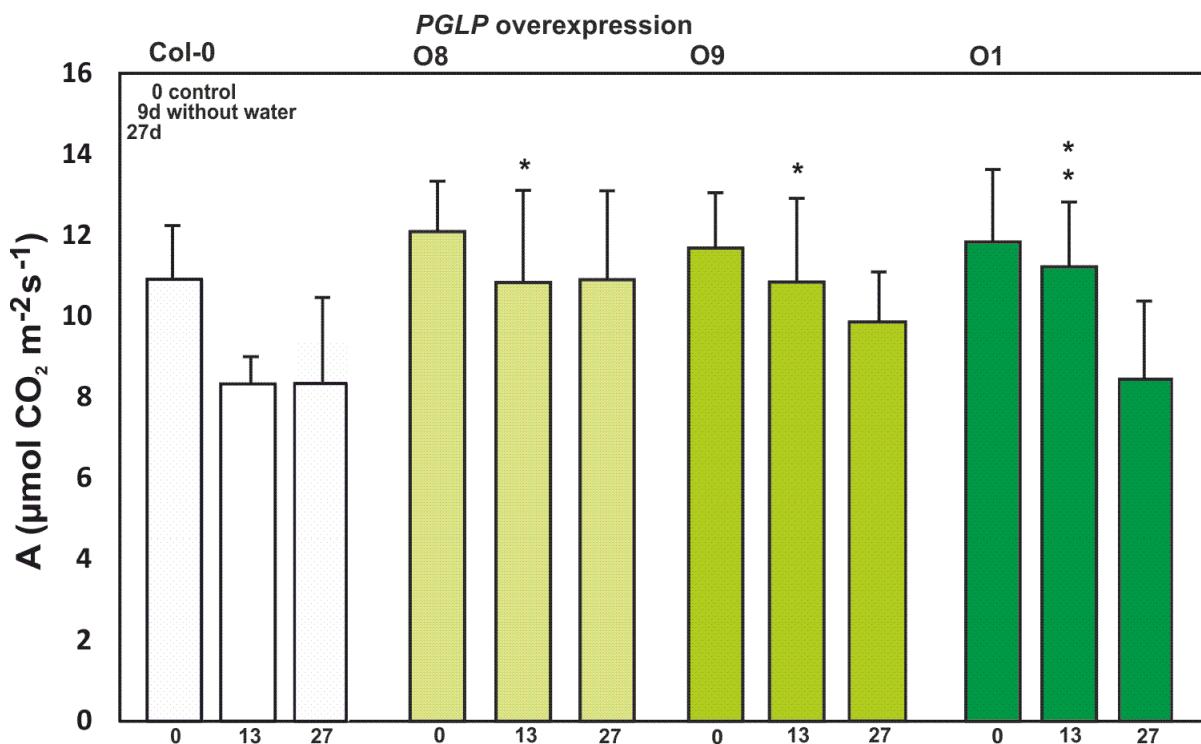


Abbildung 5-30 Gaswechselparameter der PGLP-Überexpressoren bei Wassermangel

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 20°C/18°C Tag/Nacht und 0,039% CO₂. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie dem Wassermangel ausgesetzt und an mehreren Tagen für PAM- und Gaswechselmessungen verwendet. Gezeigt ist die Photosyntheserate A nach 13 und 27 Tagen Wassermangel. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw von mindestens 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's Ttest ($p < 0,05$)

Die erhöhte Photosynthesleistung nach 13 Tagen Wassermangel in den PGLP-Überexpressoren wird begleitet durch eine erhöhte stomatäre Leitfähigkeit (g_s) und erhöhte Transpirationsrate (Tr) in allen drei Überexpressionslinien (Tabelle 5-5). Anhand der Gaswechselmessungen und Chl a Fluoreszenzmessungen der gestressten Pflanzen lässt sich ableiten, dass die PGLP-Überexpressoren besser auf den Wassermangel reagieren und über einen längeren Zeitraum eine höhere Photosyntheseleistung aufrechterhalten können.

Tabelle 5-5 Angaben zur stomatären Leitfähigkeit und Transpiration in den PGLP-Überexpressionslinien 13 Tage ohne Wasserzufuhr

	Col. 0	O8	O9	O1
g_s	$0,14 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$
Tr	$2,43 \pm 0,19$	$3,22 \pm 0,29$	$3,07 \pm 0,57$	$3,04 \pm 0,62$

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 20°C/18°C Tag/Nacht und 0,039% CO₂. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie dem Wassermangel ausgesetzt und an mehreren Tagen für PAM- und Gaswechselmessungen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw von mindestens 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Fett gedruckte Werte weichen signifikant vom Wildtyp ab, basierend auf dem Student's Ttest ($p < 0,05$)

6 Diskussion

In einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre oxidiert Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase (Rubisco) Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) bei nahezu jeder vierten Reaktion zu 2-Phosphoglykolat (2-PG) und 3-Phosphoglycerat (3-PGA). In photosynthetisch aktiven, grünen Geweben wird durch diese Reaktion täglich eine große Menge an 2-PG gebildet. 2-PG kann nicht direkt, wie das Carboxylierungs-Produkt 3-PGA, in den Calvin-Benson Zyklus (CBZ) eingehen und für die Kohlenstofffixierung genutzt werden. Folglich würde ohne den Abbau von 2-PG die Effizienz der Photosynthese, das Pflanzenwachstum und der Ertrag reduziert werden (Betti *et al.*, 2015; Ort *et al.*, 2015). Um den ständigen Verlust von frisch fixiertem CO₂ zu reduzieren, ist im Zuge der Evolution die Photorespiration entstanden. Für die primäre Umwandlung von 2-PG ist die Phosphoglykolat Phosphatase (PGLP) verantwortlich. Die PGLP konvertiert 2-PG in Glykolat, welches dann im Zuge der Photorespiration (PR) weiter zu 3-PGA umgewandelt wird, um den CBZ aufzufüllen und der RuBP-Regeneration zur Verfügung steht. Folglich kann die Photorespiration als evolutionäre Anpassung angesehen werden, wodurch die photosynthetische Kohlenstofffixierung in einer sauerstoffhaltigen Umgebung ermöglicht wird (Eisenhut *et al.*, 2008; Hagemann *et al.*, 2013, 2016).

Im Hinblick auf die genetischen und biochemischen Grundlagen der Photorespiration wurden im letzten Jahrzehnt erhebliche Fortschritte erzielt. Abgesehen von einer erheblichen Lücke an noch nicht identifizierten Transport-Proteinen, die mutmaßlich an der Beförderung photorespiratorischer Intermediate zwischen den vier subzellulären Kompartimenten beteiligt sind (Reumann und Weber, 2006; Eisenhut *et al.*, 2013), sind alle Enzyme des photorespiratorischen Kernzyklus identifiziert und umfassend charakterisiert (Somerville, 2001; Bauwe *et al.*, 2010).

Neben der eigentlichen Funktionsweise der Photorespiration gibt es eine wachsende Anzahl an Hinweisen, die auf eine spezifische, regulatorische Verbindung zwischen Photorespiration und Photosynthese hindeuten. Der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus ist bisher allerdings nicht identifiziert und umfasst sehr wahrscheinlich regulatorische Funktionen von photorespiratorischen Intermediaten. Hierbei gibt es Hinweise, dass diese sowohl die Genexpression oder die katalytische Effizienz von beteiligten Enzymen beeinflussen können (Timm *et al.*, 2013; Timm *et al.*, 2016; Kelly und Latzko, 1976; Anderson, 1971). Gerade im Hinblick auf die zweite Hypothese konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass eine Veränderung des photorespiratorischen Kohlenstoffflusses durch künstliche Umleitungen (Kebeish *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2012) oder Überexpressionsstudien mit Untereinheiten der photorespiratorischen Glycin Decarboxylase (GDC) (Timm *et al.*, 2012; Timm *et al.*, 2015) die

Diskussion

photosynthetische Kohlenstofffixierung stimuliert. Dabei scheint die verbesserte Umsetzung einiger, kritischer Intermediate der Photorespiration von entscheidender Bedeutung zu sein. In diesem Zusammenhang wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob 2-PG in einem solchen regulatorischen Zusammenspiel einen wesentlichen Einfluss hat. Im Besonderen sollte untersucht werden, ob 2-PG als Signal für die Kommunikation zwischen Photorespiration und Photosynthese fungiert und ob ein verbesserter 2-PG Abbau einen positiven Effekt auf die Kohlenstofffixierung ausübt.

6.1 Die AtPGLP-knockout-Mutante weist keine unspezifischen Hintergrund-Mutationen auf

Die *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) PGLP1-Mutante (*pgl/p1*) ist einmalig in der Sammlung an Photorespirationsmutanten (Timm *et al.*, 2012; Timm und Bauwe, 2013), da sie spezifische Eigenschaften besitzt, die keine andere Mutante dieses Stoffwechselweges zeigt. Dabei zu nennen ist vor allem ein sehr besonderes Verhalten der Mutante auf phänotypischer Ebene, das nicht ausschließlich dem photorespiratorischen Defekt zugeordnet werden kann. Das Wachstumsverhalten von *pgl/p1* wurde mit verschiedenen CO₂-Konzentrationen, Lichtperioden und Zugabe externer Kohlenstoffquellen untersucht (Abb. 5-18). Wie erwartet zeigte sich dabei ein verbessertes Wachstum bei erhöhten CO₂-Konzentrationen, einer typischen Antwort photorespiratorischer Mutanten (Somerville, 2000). Weiterhin konnte allerdings auch beobachtet werden, dass die Verlängerung der Photoperiode und die Erhöhung der externen Saccharose-Konzentration im Wachstumsmedium (Abb. 5-18) ebenfalls förderlich für das Wachstum sind. An Hand dieser Befunde wurde spekuliert, dass 2-PG, das Substrat der PGLP, eine spezifische, regulatorische Wirkung auf die Kohlenstofffixierung und die Verwertung ausüben könnte. Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass die starke Reduktion des 2-PG-Abbaus bereits unter hoch CO₂-Bedingungen (1% HC) einen erheblichen Einfluss auf diese Prozesse hat. Das spiegelt sich vor allem in der Akkumulation transitorischer Stärke wieder (Abb. 5-18 C). Dieser Effekt scheint dabei spezifisch für *pgl/p1* zu sein, da alle anderen photorespiratorischen Mutanten keine Beeinträchtigung des Stärkehaushaltes unter HC aufweisen (Timm *et al.*, 2012). Da die täglich synthetisierte Stärke als Kohlenstoff-Reservoir dient, welches zur Aufrechterhaltung des Wachstums nötig ist, ist es nicht verwunderlich, dass die *pgl/p1*-Mutante durch diesen Mangel erheblich in ihrem Wachstum beeinträchtigt ist. Besonders auffällig ist die Ähnlichkeit von *pgl/p1* zu Mutanten mit Defekten in der Stärke-Biosynthese (Caspar *et al.*, 1985; Graf *et al.*, 2010; Wiese *et al.*, 2007). Dabei ist vor allem das verbesserte Wachstum unter Langtagbedingungen und bei externer Gabe löslicher Zucker (Abb. 5-18 B) zu nennen. Das dieser spezifische Effekt durch die PGLP1-Mutation und nicht durch eine potentielle Hintergrund-Mutation hervorgerufen wird, konnte

Diskussion

durch die genetische Komplementation von *pglp1* gezeigt werden. Die Wiedereinführung einer funktionellen Kopie des *PGLP1*-Gens stellt die wildtypische Leistungsfähigkeit der entsprechenden Komplementationslinien wieder her (Abb. 5-3). Im Detail bedeutet das, dass der Stärkegehalt nicht vom Wildtyp abweicht und die Linien unter Normalluft überlebensfähig sind (Abb. 5-3 C). Somit kann geschlussfolgert werden, dass 2-PG maßgeblich in die Prozesse der Kohlenstofffixierung und Verwertung eingreift und der optimale Abbau von 2-PG durch die PGLP nicht nur essentiell für die Photorespiration, sondern des gesamten Metabolismus ist.

6.2 Das Wachstum von *Arabidopsis* korreliert mit dem *PGLP*-Gehalt in den transgenen Linien

Aufgrund des sehr starken Phänotyps von *pglp1*, der möglicherweise einige pleiotrope Effekte beinhaltet, sollten Abstufungen der Mutation hergestellt werden. Um sowohl negative als auch positive Korrelationen zu gewährleisten, wurde eine Sammlung von *Arabidopsis*-Mutanten mit stufenweise reduzierter und erhöhter PGLP-Aktivität generiert. Um zu analysieren, wie sich Änderungen in der PGLP-Aktivität auf das Pflanzenwachstum und die Photosynthese (PS) auswirkt, wurde die gesamte Mutantensammlung einer umfassenden Phänotypisierung unter HC- und LC-Bedingungen unterzogen. Wie erwartet ist *pglp1* stark im Wachstum beeinträchtigt (Timm *et al.*, 2012) und auch in der Linie mit sehr niedriger PGLP-Aktivität (A1; Abb. 5-12 A) ist eine Wachstumsreduktion bereits in HC sichtbar. Dieser Effekt ist dabei spezifisch für die *PGLP*-Mutation, da andere photorespiratorische Mutanten unter HC-Bedingungen vom Wildtyp nicht zu unterscheiden sind (Dellero *et al.*, 2015; Pick *et al.*, 2013; Timm *et al.*, 2012a). Dies gilt auch für die weniger stark reduzierten *PGLP*-Linien A8 und A2 und weist darauf hin, dass die 2-PG-Akkumulation oberhalb eines gewissen Schwellenwertes stark in die Physiologie der Pflanzen eingreift. Die bereits unter HC beobachtete Wachstumsverzögerung verstärkt sich sehr drastisch, wenn die jeweiligen Linien von Beginn an in Normalluft kultiviert werden (Abb. 5-12 C). Da das verringerte Wachstum und die Samenproduktion dem Rückgang der *PGLP* (Abb. 5-10) folgen, deutet alles auf eine 2-PG-Dosis abhängige Inhibition der Photosynthese hin. Diese ist vor allem durch die Akkumulation von 2-PG begründet, da zum einen das Kohlenstoffrecycling der Photorespiration (PR) reduziert ist und 3-PGA nur in sehr geringer Menge in den Calvin-Benson-Zyklus (CBZ) zurückgeführt und wesentlich weniger Ribulose-1,5-BisPhosphat (RuBP) regeneriert wird. Folglich kommt es zur verminderten Verfügbarkeit von RuBP als Akzeptor-Molekül der Photosynthese und deutlichen Reduktion des Wachstums. Im Vergleich dazu wird in den *PGLP*-Überexpressoren ein schneller Abbau von 2-PG erwartet und angenommen, dass die negative Rückkopplung auf die Photosynthese und das Wachstum gelindert wird. Dieser Effekt

Diskussion

konnte bereits bei anderen photorespiratorischen Überexpressoren, wie die der Glycin Decarboxylase (GDC) Proteine H und L, beobachtet werden (Timm *et al.*, 2012b; 2015). Für die *PGLP*-Überexpressionslinien konnte keine Wachstumsstimulation unter LC-Bedingungen beobachtet werden, die sich auf der Ebene der Rosetten-Morphologie zeigte (Abb. 5-12; Tab. 5-1). Eine detailliertere Charakterisierung ergab, dass eine sehr starke Erhöhung der *PGLP*-Aktivität (O1) zu einer gesteigerten Anzahl an Blättern und somit vergrößerten Rosettenfläche führt, die sich auch in erhöhter Trocken- und Frischmasse wiederspiegelt (Tab. 5-1). In Übereinstimmung zu diesem Befund wurde kürzlich gezeigt, dass auch die Überexpression der Serinhydroxymethyltransferase (SHM) in Reis im Wesentlichen zu einer erhöhten Ausbildung von Trieben führt (Wu *et al.*, 2015). Durch die Überexpression der *PGLP* wird der Druck von 2-PG auf die C-Fixierung und -Verteilung reduziert. Da die RuBP-Regeneration und das Kohlenstoffrecycling der PR zu 3-PGA nicht mehr eingeschränkt sind, wird die PS-Effizienz erhöht.

6.3 Die stomatäre Leitfähigkeit (g_s), als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen, korreliert mit dem *PGLP*-Gehalt

Die stomatäre Leitfähigkeit (g_s) bezeichnet den Öffnungsgrad der Stomata auf der Blattepidermis und reguliert somit den Gas-Wasser-Austausch des Blattes mit der Umgebung. Folglich ist eine höhere Leitfähigkeit Grundvoraussetzung für eine hohe Photosyntheserate, da viel CO₂ in die Chloroplasten gelangen kann. Die photosynthetische Kohlenstoff-Assimilation ist eng an die Wasserversorgung der Pflanze gekoppelt (Flexas *et al.*, 2004). Neben der stomatären Leitfähigkeit spielt auch die Mesophyll-Leitfähigkeit (g_m) eine Rolle, da sie sehr oft miteinander korrelieren (Flexas *et al.*, 2012). Hierbei geht es um die Diffusion des CO₂ über die internen Barrieren bis hin zum Chloroplasten, wo es durch die Rubisco fixiert wird. Eine eingeschränkte g_m führt zu einer ineffektiveren Photosynthese (Flexas *et al.*, 2012). Verschiedene Parameter haben Einfluss auf g_m , dazu gehört die Temperatur (Bernacchi *et al.*, 2002), die externe CO₂-Verfügbarkeit (Singsaas *et al.*, 2003) und morphologische Eigenschaften wie die Zellwanddicke und Chloroplastenverteilung. Mit dem Li-Cor-6400-Gaswechselmesssystem wurde die Photosyntheseleistung (A, Γ) der transgenen *PGLP*-Pflanzen während des Übergangs von hoch CO₂ (HC) zu Normalluft (LC) charakterisiert. Zusätzlich wurde mit einem Imaging-PAM die maximale Quantenausbeute des Photosystems II (F_v/F_m) bestimmt. Die Abnahme von F_v/F_m bei den *PGLP*-Antisenselinien und *pglp1* ist ein Zeichen dafür, dass die Seneszenz einsetzt und folgt im Wesentlichen der Abnahme in der *PGLP*-Aktivität (Abb. 5-10). Durch den Transfer von HC zu LC wird das O₂/CO₂-Verhältnis in der Luft verschoben. Um dem entgegen zu wirken, werden beim Wildtyp die Stomata geöffnet (Eisenhut *et al.*, 2016). In *pglp1* und den Antisenselinien ist dies nicht der Fall. Das äußert sich

Diskussion

einerseits im Rückgang der Photosyntheserate (A), durch die niedrigere stomatäre Leitfähigkeit (g_s) und der Transpirationsrate (Tr) (Tab. 5-2). Da in den *PGLP* reduzierten Linien die Photosynthese reduziert ist und nicht mehr so viel CO_2 fixiert werden kann, kommt es zur Erhöhung des interzellulären Kohlenstoffgehaltes (c_i) und der Verschiebung des c_i/c_a -Verhältnis. Dadurch wird der Fluss des Kohlenstoffs von außen nach innen eingeschränkt. Die Diffusion des Kohlenstoffs ist von der Differenz zwischen c_i und c_a abhängig und wenn diese immer kleiner wird, wird der Einstrom geringer. Die 2-PG-Akkumulation inhibiert stärker als in anderen PR-Mutanten (Timm *et al.*, 2012) die Kohlenstofffixierung und vermindert zusätzlich die Leitfähigkeit von Stomata und Mesophyll. Dagegen sind alle drei *PGLP*-Überexpressionslinien, bei geringerem Druck auf die Photorespiration, in A oder Γ bei O_2 -Konzentrationen von 10% oder 21% (Tab. 5-3) im Wesentlichen unverändert. Im Gegensatz dazu führt die Erhöhung der Oxygenierung von RuBP durch 40% O_2 dazu, dass alle drei Überexpressionslinien eine verbesserte CO_2 -Assimilationrate (Tab. 5-3) im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Die stärkste Überexpressionslinie O1 ist dabei signifikant weniger empfindlich gegenüber O_2 -Inhibition von A . Angesichts der Tatsache, dass die photosynthetische Kapazität hauptsächlich durch die Effizienz Licht zu nutzen und der Stomata- und Mesophyll-Leitfähigkeit limitiert wird (Flexas *et al.*, 2012; Farquhar *et al.*, 1980), kann sich die positive Wirkung auf A bei höheren O_2 -Konzentrationen aus einer begünstigten CO_2 -Leitfähigkeit ergeben. Die *PGLP*-Überexpressoren zeigen höhere Werte für c_i , c_i/c_a und signifikant erhöhte g_s als Reaktion auf erhöhte O_2 -Pegel (Tab. 5-3). Da g_s sehr oft mit der Mesophyll-Leitfähigkeit (g_m) korreliert (Flexas *et al.*, 2012), ist es denkbar, dass ein verbesserter 2-PG-Umsatz einen Nutzen gegenüber rauen Umweltveränderungen hat. Die PR stellt Metabolite für den Stressschutz zur Verfügung, z.B. Glycin (Wingler *et al.*, 2000). Ein erhöhter 2-PG-Umsatz und eine infolgedessen effektiv bzw. schneller verlaufende PR sollte einen positiven Effekt bei der Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen haben. Um das zu prüfen wurden die Überexpressionslinien auf ihre Reaktion auf erhöhte Temperatur (30°C) und Wassermangel getestet. Wie vermutet und bereits beschrieben (Florian *et al.*, 2014), kommt es bei erhöhter Temperatur zum Absinken der CO_2 -Assimilation (A) (Anhang Tabelle 8-5 bis 8-7) und zur Erhöhung des CO_2 -Kompensationspunktes (Γ). Jedoch sinkt nach längerer Exposition bei 30°C der Kompensationspunkt der *PGLP*-Überexpressoren wieder herab (Abb. 5-25) und die Linien zeigen signifikant höhere c_i , c_i/c_a und g_s (Anhang Tabelle 8-7). Das lässt wiederum vermuten, dass der erhöhte 2-PG-Umsatz bei erhöhter Temperatur eine Einschränkung der Leitfähigkeit im Mesophyll und Stomata (Flexas *et al.*, 2012) delimitiert und das notwendige CO_2 besser verwertet wird. Der Einfluss von Wassermangel wurde mit einer umfassenden Phänotypisierung hinsichtlich Chlorophyll a Fluoreszenz und Gaswechselmessungen untersucht. Dabei zeigt sich, dass das Einsetzen der Seneszenz (Absinken von F_v/F_m) in den *PGLP*-Überexpressoren später einsetzt. Die *PGLP*-Überexpressoren können den

Diskussion

Wassermangel über einen längeren Zeitraum besser tolerieren (Abb. 5-29). Die Gaswechselmessungen zeigen, dass die *PGLP*-Überexpressoren im Vergleich zum Wildtyp mittelfristig eine höhere photosynthetische Leistungsfähigkeit aufrechterhalten können (Abb. 5-30). Ähnlich wie bei erhöhtem Sauerstoff und erhöhter Temperatur führt der gesteigerte 2-PG-Umsatz bei Wassermangel zu einer verbesserten Leitfähigkeit in den Stomata der *PGLP*-Überexpressoren. Die Triebkraft der Wasseraufnahme ergibt sich aus der Differenz des Wasserpotentials zwischen Wurzelraum und Xylemflüssigkeit (Friedman, 1986). Das in der Pflanze normalerweise niedrigere Wasserpotential wird durch die Transpiration oder durch den Wurzeldruck verursacht. Eine Temperaturerhöhung bei gleichbleibender Luftfeuchtigkeit hat eine hohe Transpirationsrate zur Folge und sorgt dafür, dass die Triebkraft für die Wasseraufnahme hoch ist. Die *PGLP*-Überexpressionslinien sind also gekennzeichnet durch eine weniger sensitive Reaktion auf ungünstige Umweltbedingungen, in diesem Fall 40% O₂, 30°C und Wassermangel. Da die Stimulation erst über einem bestimmten Schwellenwert der Enzymaktivität auftritt, wird deutlich, dass der Wildtyp gut genug ausgestattet ist, um auf einen großen Umfang an 2-PG-Schwankungen zu reagieren. Dennoch ist es schwer zu erfassen, wie eine veränderte Regulation der stomatären Leitfähigkeit in den *PGLP* veränderten Linien mechanistisch erreicht wird. Die meisten bisher diskutierten Faktoren, die an der Regulation der Funktion der Stomata beteiligt sind, sind unter anderem Veränderungen in den Gehalten von organischen Säuren und Zuckern (z.B. Daloso *et al.*, 2015a; 2015b; Medeiros *et al.*, 2016). Da die *PGLP*-Linien in ihren Profilen für organische Säuren und für Zucker (Abb. 5-16, 5-17) vom Wildtyp abweichen, ist es naheliegend, dass diese Änderungen Auswirkungen auf g_s und g_m haben. In einer Multispezies-Metadaten-Analyse (Gago *et al.*, 2016) wurde die mögliche Rolle von Saccharose und der Einfluss organischer Säuren auf die Stomata-Regulation diskutiert. Ob 2-PG eine besondere Rolle in den Chloroplasten der Schließzellen einnimmt, wurde in dieser Arbeit nicht genauer untersucht. In den Chloroplasten der Schließzellen befindet sich reichlich Stärke (Azoulay-Shemer *et al.*, 2016) und im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der *PGLP*-Menge und dem Stärkegehalt im Blatt hergestellt werden. Es ist möglich, dass sich die 2-PG-Menge auf den Stärkegehalt in den Schließzellen auswirkt und damit deren die Effektivität beeinflusst. Eine hohe 2-PG-Menge würde zu weniger Stärke führen und dadurch weniger Energie für die Schließzellen liefern, sodass deren Aktivität eingeschränkt wird und die Stomata sich schließen.

6.4 Der zentrale Kohlenstoff-Metabolismus wird durch eine verringerte PGLP-Aktivität stark beeinträchtigt

Die 2-PG-Akkumulation wirkt sich nachteilig auf die CO₂-Fixierung aus, während eine Abschwächung der regulatorischen Rückkopplung sich als vorteilhaft erweist (Wingler *et al.*, 2000). Mit Hilfe der durchgeführten GC-MS basierten Metabolitanalyse konnten Nachweise für die schädliche Wirkung der 2-PG-Akkumulation auf den zentralen Kohlenstoffwechsel gewonnen werden (Abb. 5-16, 5-17). Aus dieser Analyse geht hervor, dass die Photosynthese und assoziierte Stoffwechselwege auf die *PGLP*-Menge in der Pflanze reagieren. Unter HC-Bedingungen weisen nur die stark beeinträchtigten Linien (*pglp1* und A1) erhebliche Veränderungen im Stoffwechsel auf. Die Effekte durch 2-PG treten in den Antisenselinien erst nach überschreiten eines Schwellenwertes auf. Demnach wird 2-PG wahrscheinlich in einem sehr dynamischen Umfang toleriert (Abb. 5-16, Abb. 5-10 und 5-11). Aus der Analyse geht ebenfalls hervor, dass 1% CO₂ die Photorespiration nicht komplett unterdrücken kann. Genauer betrachtet führt der Rückgang der PGLP-Aktivität zu einer Reihe von Neuprogrammierungen verschiedener Stoffwechselprozesse. Beispielsweise tritt eine veränderte Regulation des TCA-Zyklus auf (Abb. 5-16 und 5-17). Der TCA-Zyklus ist in einem großen Netzwerk eingebettet und wenn ein Intermediat des Zyklus besonders stark eingebracht bzw. verbraucht wird, ändert sich der Stoffwechselfluss von zyklisch zu nicht zyklisch (Sweetlove *et al.*, 2010). Durch die Reduktion an fixiertem CO₂ kommt es zu einer Verschiebung der C/N-Balance und dies führt zu intrazellulärem Stress. Eine Reaktion auf diesen Stress ist eine starke Induktion des GABA-shunt (Fait *et al.*, 2008). Dies zeigt sich in der Akkumulation von 2-Oxo-Glutarat, Succinat und GABA. Die Induktion des GABA-shunt ist in den *PGLP*-Antisenselinien sehr wahrscheinlich der Auslöser des nicht-zyklischen Flusses des TCA (Fait *et al.*, 2008). Interessanterweise ist dieses Szenario in den Linien mit stark verringrigerter *PGLP* bereits unter HC-Bedingungen vorherrschend. Außerdem ist die Anreicherung von hohen Mengen an Aminosäuren (z.B. Lysin, Isoleucin, Valin; Abb. 5-16) ein weiterer Hinweis für die verringerte Kohlenstoffverfügbarkeit und resultiert wahrscheinlich aus einem verstärkten Proteinabbau. Passend zur Hypothese des verstärkten Proteinabbaus wurde ein signifikanter Anstieg in Harnstoff, Guanidin, Ornithin und Putrescin beobachtet (Abb. 5-16). Sie können, wie bei Kohlenstoffmangel und Zellalterung, als alternative Respirationsmetabolite wirken (Araújo *et al.*, 2010; Hildebrandt *et al.*, 2015; Nelson *et al.*, 2014). Darüber hinaus sind starke *PGLP*-Reduktionen charakterisiert durch den Rückgang zuckerbezogener Komponenten (Galactinol, Trehalose, Raffinose, Xylose; Abb. 5-16). Dies ist ebenfalls auf die Reduktion der Kohlenstofffixierung zurückzuführen.

Die Überexpressionslinien sind unter HC-Bedingungen in ihrem Metabolitprofil (Abb. 5-16) weitestgehend unbeeinträchtigt, da die 2-PG-Produktion unter diesen Bedingungen stark unterdrückt ist. Werden die Pflanzen auf Normalluft umgesetzt, wird die Photorespiration

Diskussion

angeregt und die Intermediate der PR liegen im Wildtyp in erhöhter Form vor. Dies geschieht jedoch ohne weitere wesentliche Stoffwechseländerungen (Abb. 5-17). Die Induktion der PR ist auf höhere Raten der RuBP-Oxygenierung zurückzuführen und interessanterweise nicht durch die Induktion der Expression photorespiratorischer Gene (Queval *et al.*, 2007, Eisenhut *et al.*, 2016). Die Antisenselinien zeigen ebenfalls einen Anstieg an PR-Metaboliten. Dieser Effekt ist hier jedoch deutlich verschärft und deutet auf einen weniger optimalen Ablauf der Photorespiration hin (Abb. 5-17). Von den PR-Metaboliten ist die Akkumulation für Glykolat am stärksten ausgeprägt, was nicht mit der *PGLP*-Mutation und dem Stofffluss zu erklären ist. Derzeit ist die beste Erklärung, dass bei Überschreiten eines Schwellenwertes für 2-PG in Plastiden eine unspezifische Dephosphorylierung durch andere Phosphatasen erfolgt. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass eine 2-Phosphosulfolactat-Phosphatase von *Methanococcus jannaschii* in der Lage ist 2-PG als Substrat zu verwenden (Graham *et al.*, 2001). Das am nächsten homologe Protein von Arabidopsis ist tatsächlich in den Chloroplasten lokalisiert, wurde aber als UDP-glykosyltransferase (At2g36770) charakterisiert und noch nicht auf eine potentielle Reaktion mit 2-PG getestet. Eine weitere Möglichkeit stellt die zytoplasmatisch lokalisierte PGLP2 dar, die nach Austritt von 2-PG aus den Chloroplasten dort an der Glykolat-Produktion beteiligt sein könnte. Da unter LC die CO₂-Assimilation in den Antisenselinien noch deutlicher reduziert ist (Abb. 5-14), verstärkt sich der Effekt des Kohlenstoffmangels und führt so zur zusätzlichen Erhöhung der Akkumulation von Aminosäuren (hauptsächlich aromatische und verzweigtkettige AS) und stickstoffhaltigen Komponenten (z.B. Ornithin, Putrescin). Die *PGLP*-Überexpressionslinien hingegen verhalten sich während des CO₂-Wechsels nahezu wildtypisch. Ihr Umfang an Stoffwechselmetaboliten der PR, TCA-Zyklus und Aminosäuren weicht nicht vom Wildtyp ab. Lediglich eine Abnahme in 2-Oxo-Glutamat, Glycerin und Asparagin lässt sich beobachten. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die *PGLP*-Überexpression gut vertragen wird und auch keine unspezifischen physiologischen Reaktionen hervorruft. Allerdings sind in den Linien mit signifikant höherer *PGLP*-Aktivität (O9 und O1) einige Zuckerkomponenten erhöht, was hauptsächlich Fruktose, Maltose und Isomaltose betrifft. Diese Änderungen zeigen bereits, dass die Überexpressoren wahrscheinlich ihre Kohlenstoffverwertung umgestellt haben, im Wesentlichen in Richtung des Stärkemetabolismus.

6.5 Verminderte PGLP-Aktivität beeinträchtigt den Calvin-Benson-Zyklus und die Stärke-Synthese, dagegen werden beide Prozesse durch schnelleren 2-PG-Abbau gefördert

Da sich die CO₂-Fixierung durch einen veränderten PGLP-Gehalt in ihrer Leistung ändert, sollte überprüft werden, ob 2-PG als Signal für eine Wechselwirkung zwischen PR und dem CBZ fungiert. Mit einer LC-MS/MS Analyse von allen transgenen PGLP-Linien und dem Wildtyp unter HC und LC wurden die Metabolitgehalte bestimmt. Die Ergebnisse unterstützen deutlich die bisherige Annahme, dass 1% CO₂ die Photorespiration nicht komplett unterdrücken kann. Bereits unter HC-Bedingungen stauen die PGLP-Antisenselinien eine Menge 2-PG an (A1; 10 pmol g⁻¹ FM und *pglp1*; 250 pmol g⁻¹ FM), (Abb. 5-22). Die Blockade der Umwandlung von 2-PG zu Glykolat verringert die 3-PGA-Regeneration und beschränkt dadurch den Kohlenstoffeintrag in den CBZ. Die stark eingeschränkte PR verringert als Folge die CBZ-Aktivität. Am auffallendsten sind die Veränderungen von Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P). S7P nimmt allmählich ab und folgt damit dem Grad der PGLP-Reduktion. Kein anderes untersuchtes CBZ-Intermediat zeigt ein vergleichbares Muster (Abb. 5-22). Die S7P-Phosphatase (SBP) wurde bereits durch Lefebvre (2005) als limitierender Schritt während des CBZ vermutet. SBPase könnte ein Ziel für eine enzymatische 2-PG-Regulierung sein. Auf Transkriptebene gibt es keine Veränderungen (Anhang Abb. 8-1), sodass eine Regulation der Genexpression in diesem Fall nicht relevant ist. Interessanterweise sind 3-PGA und S7P auch bei den PGLP-Überexpressoren reduziert, obwohl die 2-PG-Menge unter HC-Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist. Da die 2-PG-Mengen unter HC-Bedingungen fast an der Detektionsgrenze des LC-MS/MS liegen, ist es möglich das kleine Veränderungen nicht nachgewiesen werden können. Die Zwischenprodukte von der Stärke- und Saccharose-Synthese sind unter HC weitestgehend unberührt. Das zeigt, dass 2-PG-Veränderungen unter HC diese Stoffwechselwege nicht beeinflussen und der geringere Stärkegehalt in *pglp1* nicht auf die Menge der Vorläufer der Stärkesynthese zurückzuführen ist. Eine Erklärung für den geringeren Stärkegehalt könnte ein Einfluss auf die Stärke verzweigenden Enzyme (starch branching enzyme = SBE) sein. Da die PR in *pglp1* gestört ist, kommt es zu einem veränderten Redoxstatus im Chloroplast. Die SBE sind empfindlich für Redoxveränderungen (Glaring et al., 2012). Wird die Aktivität der SBE reduziert, kommt es zur Inhibition der Stärkesynthese.

Nach dem Transfer auf Normalluft, wird 2-PG in *pglp1* (1100 pmol g⁻¹ FM) und Antisenselinie A1 (720 pmol g⁻¹ FM) sehr stark akkumuliert und dadurch wiederum wird die CBZ-Aktivität beeinträchtigt. Fast alle Zwischenprodukte des CBZ sind reduziert (3-PGA, DHAP, SBP, S7P und RuBP). Wenn die Photorespiration beschleunigt wird, aber die Umwandlung von 2-PG zu 3-PGA nicht erfolgt, ist es eine logische Schlussfolgerung, dass es zum Schwund von 3-PGA kommt und der CBZ nicht aufgefüllt wird. Folglich wird die RuBP-Regeneration immer weiter reduziert, was die sehr niedrige Photosyntheseleistung in den Linien mit starkem PGLP-

Diskussion

Rückgang erklärt (Abb. 5-14; Abb. 5-10). Dadurch wird klar, dass ein optimal arbeitender 2-PG-Abbau notwendig für die CO₂-Assimilation ist. Unter Normalluft ist 2-PG in den Überexpressionslinien gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert. Das ist ein Indiz dafür, dass ein verbesserter 2-PG-Umsatz in Linien mit stark erhöhter PGLP-Aktivität die Leistung des Kohlenstoffflusses zum CBZ fördert. Daraufhin wurde die Stärkebiosynthese in den *PGLP*-veränderten Linien analysiert. Es zeigte sich ein verminderter Stärkegehalt in den *PGLP*-Antisenselinien unter LC und ein erhöhter Stärkegehalt in den Überexpressoren (Abb. 5-19). Wie aus zahlreichen Studien hervorgeht, ist die Stärkebiosynthese hauptsächlich durch das 3-PGA-zu-P_i-Verhältnis im Stroma gesteuert, welches auf die allosterische Aktivierung von ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase; Yu *et al.*, 2001) zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung der AGPase reagiert auf veränderte Umweltbedingungen. In einer Studie über den Phosphorylierungsstatus der AGPase unter HC und LC wurde gezeigt, dass überraschenderweise unter HC weniger phosphorylierte AGPase vorliegt (Abadie *et al.*, 2016). Neben dem 3-PGA/P_i-Verhältnis spielt auch das CO₂/O₂-Verhältnis eine Rolle. Da die *PGLP*-Antisenselinien stark verringerte 3-PGA-Gehalte haben, ist das Verhältnis erwartungsgemäß sehr niedrig. Dadurch werden hohe Stärkesyntheseraten verhindert (Neuhaus and Stitt, 1990; Smith *et al.*, 1997). Eine Reduktion von *PGLP* in Normalluft hat sehr geringe Mengen an ADPG (Abb. 5-23) zur Folge. Diese Beobachtung untermauert die angenommene Inhibition der AGPase. Eine Linderung der 2-PG-Akkumulation fördert den Stärkemetabolismus beträchtlich. In den Überexpressionspflanzen ergibt sich dadurch unter Normalluft eine höhere Syntheserate von den Pflanzen (Abb. 5-20). Da die Linien mit sehr hoher PGLP-Aktivität auch im Stärkeabbau erhöht sind, scheint eine Umprogrammierung des Stärkemetabolismus aufzutreten. Diese Neuprogrammierung verhindert offensichtlich höhere Nettogewinne an Stärke, was auch bei Überexpressionslinien für das GDC-L-Protein (Timm *et al.*, 2015) beobachtet wurde. Zusammenfassend wirkt 2-PG nicht nur auf die CBZ-Aktivität und RuBP-Regeneration, sondern auch auf die Zuteilung von frisch fixiertem Kohlenstoff zu Stärke.

6.6 2-PG als direkter Inhibitor für Enzyme des Kohlen- bzw. Stärkestoffwechsels

2-PG ist ein Metabolit, das im pflanzlichen Stoffwechsel gebildet wird, aber nicht gebraucht wird. Es ist sogar toxisch, da es inhibierend auf Enzyme der Photosynthese wirkt. Gezeigt wurde die toxische Wirkung von 2-PG an der Phosphofruktokinase (PFK) aus Spinat (Kelly und Latzko, 1976), bei der Triosephosphatisomerase (TPI) aus Erbse (Anderson, 1971) und bei der Enolase aus Hefe (Lebioda, 1991). Für die TPI konnte auch *in vivo* eine Inhibition durch 2-PG gezeigt werden (Segerer *et al.*, 2016). Bei der Embryonalentwicklung von Säugetieren in sauerstoffhaltigem Millieu zeigt sich ein verzögertes Wachstum der Embryonen, wenn 2-PG

Diskussion

nicht abgebaut wird. Dies führt zum Tode. Ursache ist eine unterdrückte Zellteilung, ausgelöst durch eine inaktive PGLP, die wiederum eine verminderte TPI-Aktivität nach sich zieht. Für Arabidopsis konnte im Zuge dieser Arbeit die Inhibition der TPI am rekombinanten Enzym bestätigt werden (Abb. 5-21). Eine eingeschränkte TPI-Aktivität führt zu einem Anstieg von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) (Chen *et al.*, 2010; Grüning *et al.*, 2014), welches wiederum im frühen Entwicklungsstadium der Pflanzen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Keimlinge und Chloroplasten hat. In den *PGLP* veränderten Linien zeigt sich ein Einfluss auf den Stärkegehalt. Da der Stärkestoffwechsel von der *pglp1* im negativen und bei den *PGLP*-Überexpressoren im positiven Sinne beeinflusst wird (Abb. 5-19), wurden in dieser Arbeit Enzyme aus diesem Bereich näher untersucht. Die Phosphoglukomutase (PGM) und Phosphoglukoisomerase (PGI), beides Enzyme, die beim Umsatz von Stärkevorläufern beteiligt sind, wurden als rekombinante Enzyme aus Arabidopsis hergestellt und deren Aktivität nach Zugabe von 2-PG getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Enzyme nicht durch 2-PG inhibiert werden (Abb. 5-21 B). Auch die Genexpression zu diesen Enzymen wurde in den transgenen *PGLP*-Pflanzen unter HC und LC angeschaut, hier gibt es ebenfalls keinen Effekt (Abb. 5-21 A). Ein weiterer Kandidat als regulatorisches Ziel für 2-PG ist die SBPase aus dem CBZ. Eine erhöhte SBPase-Aktivität in Tabak führt zu erhöhten Mengen an Stärke und Saccharose, sowie einer erhöhten Photosyntheserate. Wobei die erhöhte Rate vermutlich einer erhöhten RuBP-Rgeneration zugeschrieben wird (Lefebvre *et al.*, 2005). Genau diese Effekte treten bei den *PGLP*-Überexpressoren auf, bzw. gegensätzliche Effekte bei den Antisenselinien. Da sich die Mengen von S7P an den Mengen von PGLP zu orientieren scheinen (Abb. 5-22), wurde auch für die SBPase ein rekombinantes, aufgereinigtes Enzym aus Arabidopsis kloniert. Es konnte jedoch noch kein Zusammenhang zwischen SBPase und 2-PG hergestellt werden, da der verwendete Aktivitätstest direkt mit dem 2-PG reagiert. Auch die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase; Yu *et al.*, 2001) ist ein gutes Ziel für 2-PG. Es ist bereits bekannt das Pi inhibierend und 3-PGA aktivierend auf die AGPase wirken (Zeeman *et al.*, 2007) und dass eine enge Verbindung zum CO₂/O₂-Verhältnis besteht (Abadie *et al.*, 2016). Unter LC ist mehr phosphorylierte und dadurch aktive AGPase im Zytosol vorhanden. Eine Abnahme von *PGLP* in LC hat sehr geringe Mengen an ADP-Glukose (Abb. 5-23) zur Folge. Das untermauert die angenommene Inhibition der AGPase. Arbeiten am rekombinanten Enzym zur Überprüfung der Annahme sind zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.

6.7 Die *PGLP*-Überexpressoren zeigen eine bessere Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen

Werden Arabidopsis-Pflanzen erhöhten Temperaturen ($\sim 30^{\circ}\text{C}$) ausgesetzt, ergeben sich deutliche Veränderungen in der weiteren Entwicklung der Pflanzen (Gray *et al.*, 1998, Koini *et al.*, 2009). Es kommt zu einer rasanten Verlängerung der Pflanzenachsen, zur Aufrichtung der Blätter durch Hyponastie und zur vorzeitigen Blütezeit. Mehrere Studien haben die Auswirkungen erhöhter Temperatur auf die Architektur von Arabidopsis untersucht (Gray *et al.*, 1998; Hong und Vierling 2000; Koini *et al.*, 2009) und besonders das Längenwachstum der Hypokotyle bei Keimlingen hervorgehoben. Die *PGLP*-Überexpressoren wurden erst nach 7 Wochen Wachstum unter Standardbedingungen auf 30°C umgesetzt. Bei den älteren Pflanzen setzte das Längenwachstum als Reaktion auf die erhöhte Temperatur bei den Petiolen ein (Abb. 5-24). Das Längenwachstum wird durch den Transkriptionsfaktor PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) vermittelt und die damit verbundene erhöhte Synthese des Hormons Auxin (Sun *et al.*, 2012). Auxin ist ein Hormon, das im Zellwachstum und in der Zelldifferenzierung eine regulatorische Wirkung hat. Durch die erhöhte Temperatur wird mehr Auxin gebildet und die auxininduzierte Genexpression erhöht sich. Dies wirkt sich auf das Streckenwachstum und die Zellwandsynthese aus. Neben dem Effekt auf die pflanzliche Architektur hat die erhöhte Temperatur auch Auswirkungen auf die Kohlenstoffassimilation und die Stärkemenge in den Pflanzen. Die Photosyntheserate geht bei hohen Temperaturen zurück. Ursache für den Rückgang kann ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren sein. Zum einen geht die Rubisco-Aktivität runter (Salvucci *et al.*, 2001) und die Anzahl der Chloroplasten pro Zelle geht zurück (Jin *et al.*, 2011). Auch der Stärkegehalt geht bei höheren Temperaturen zurück, was auf die niedrigere Photosyntheserate zurückzuführen ist (Jin *et al.*, 2011), bzw. resultiert durch eine höhere Respiration gegenüber der PS (Porter und Semedov 2005) und eine reduzierte Aktivität der Stärkesynthase (Keeling *et al.*, 1993). Die Photosyntheserate geht beim Wildtyp und den *PGLP*-Überexpressoren gleichermaßen auf $5\text{-}6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ runter, jedoch geht der CO_2 -Kompensationspunkt in den Überexpressoren nach 1 Tag bei 30°C von $100 \mu\text{l l}^{-1}$ zurück auf um die $60 \mu\text{l l}^{-1}$ nach 7 Tagen bei 30°C (Abb 5-25). Ein hoher Kompensationspunkt senkt die Effizienz der Photosynthese herab. Die Überexpressionslinien zeigen bei 30°C einen höhren Stärkegehalt als der Wildtyp. Besonders die Linie O1 hat nach 7 Tagen noch 41% der ursprünglichen Stärkemenge, während der Wildtyp nur noch 25% besitzt. Während reduzierte PR-Enzyme unter unvorteilhaften Umweltbedingungen (Wingler *et al.*, 2011) zu einer reduzierten PS-Rate führen, zeigen die Ergebnisse der *PGLP*-Überexpressoren, dass sich ein erhöhter Enzymgehalt von PR-Enzymen positiv auf die Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen auswirkt. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch, wenn die *PGLP*-Überexpressoren Wassermangel ausgesetzt werden. Sie sind in der Lage mittelfristig die Photosyntheseleistung

Diskussion

auf einem höheren Level zu halten als der Wildtyp (Abb. 5-30). Das Kohlenstoff-Sauerstoff-Verhältnis der Umgebung, hohe Temperaturen, starkes Licht und Trockenstress führen zu einem schrittweise verstärkten Schließen der Stomata. Als Konsequenz sinkt die interne zelluläre CO₂-Konzentration, während die O₂-Konzentration immer weiter steigt. Dadurch wird die Oxygenierung von RuBP immer dominanter, senkt die Effizienz der Carboxylierung und Rubisco produziert immer mehr Mengen von 2-PG. Um den steigenden Verlust von frisch fixiertem Kohlenstoff zu verhindern, arbeitet 2-PG als Signal, was zur Verlangsamung des CBZ führt, um die Mengen an RuBP zu reduzieren und die Möglichkeit weiterer RuBP-Oxygenierung zu mindern. Als Folge wird der Verlust von Kohlenstoff während der Photorespiration durch die GDC verhindert. Die *PGLP*-Überexpressoren zeigen durch den erhöhten 2-PG-Umsatz, dass die Stomata bei ungünstigen Umweltbedingungen nicht so schnell verschlossen werden und der erhöhte 2-PG-Umsatz einen positiven Einfluss auf die Photosynthese hat. Die stomatäre Leitfähigkeit g_s ist in den Überexpressionslinien unter den verschiedenen Umweltbedingungen (40% O₂, 30°C und Wassermangel) immer höher im Vergleich zum Wildtyp. Das legt die Vermutung nahe, dass sich der erhöhte *PGLP*-Gehalt auf g_s auswirkt. Da sich in den guard cells besonders viele Chloroplasten befinden, könnte es ein Effekt sein, der von der 2-PG-Menge in den guard cells abhängig ist. Je mehr 2-PG vorliegt, desto niedriger ist g_s .

6.8 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass 2-PG großes Potential als regulatorisches Metabolit hat. Durch die Bildung von viel 2-PG in den Antisenselinien bzw. weniger in den Überexpressoren verändert sich das Verhältnis von 3-PGA zu Pi in den jeweiligen Linien. Dieses Verhältnis ist in der pflanzlichen Zelle wichtig für andere Enzyme, besonders die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) sei hier genannt (Zeeman *et al.*, 2007). Möglicherweise sind die SBPase und/oder AGPase die besten Kandidaten, deren nähere Untersuchung sich lohnen würde. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass 2-PG auf die Transkription von anderen Genen wirkt, die bisher nicht im Fokus der Bearbeitung liegen. Dieser Fragestellung könnte mit einem RNA-Sequencing nachgegangen werden, denn mit dieser Methode kann erfasst werden, welche Gene an bzw. ausgeschaltet sind. Wird dann noch der Aspekt von HC und LC mit einbezogen, kann auf Transkriptebene eine Reaktion auf sich veränderte CO₂-Gehalte erfasst werden. Gleiches gilt bei der Untersuchung von Reaktionen auf abiotische Stressfaktoren. Da die Überexpressionslinien mittelfristig besser auf Wassermangel, erhöhte Temperaturen und erhöhte O₂-Gehalte reagieren, wäre es interessant zu analysieren, welche Gene bei der Stressantwort in den Überexpressionslinien anders reguliert sind als im Wildtyp.

Diskussion

Im Gegensatz zu den steady-state-Messungen der Metabolite mittels LC-MS/MS- und GC/MS-Analysen stellen Analysen unter Verwendung von Isotopen potentiell sensitivere Methoden dar. Dadurch könnte herausgefunden werden, wie sich der photorespiratorische Fluss durch den veränderten *PGLP*-Gehalt ändert, indem der Einbau eines markierten Elements in photorespiratorische Intermediate verfolgt wird. Weiterhin könnte damit analysiert werden, wie sich der Kohlenstofffluss in den transgenen Linien verhält. Dazu werden die Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen angezogen, von den einzelnen Linien Blattplättchen gewonnen und mit ¹³C-markierter Glukose inkubiert. Der Eintrag des markierten Substrates erfolgt über den Transpirationsstrom und die Akkumulation kann in den C2-Zyklus-Metaboliten verfolgt werden. Daraus können dann Aussagen über den Stofffluss in der Photorespiration getroffen werden. Ähnliches wäre auch für die Stärkebiosynthese sinnvoll. Da die *PGLP*-Änderung Einfluss auf die CO₂-Assimilation und -Verteilung hat, wäre es sehr interessant den Weg des aufgenommenen Kohlenstoffs zu verfolgen. Die erhöhte Stärkemenge bei den *PGLP*-Überexpressionslinien macht die Aufklärung von beeinflussten Regulationsmechanismen nicht nur in *Arabidopsis* sinnvoll. Eine Überexpression in der Kartoffel oder Zuckerrübe hätte einen wirtschaftlichen Nutzen. Dazu könnte die *PGLP* alleine oder im Zusammenhang mit dem überexprimierten GDC-H oder L-Protein in eine der Nutzpflanzen transformiert werden, um zu schauen, ob sich der beobachtete Effekt bei *Arabidopsis* auch in einer C4-Pflanze reproduzieren lässt. Das könnte im besten Falle dazu führen den Ertrag dieser Pflanzen deutlich zu steigern. In diesem Zusammenhang würde sich auch die weniger sensitive Reaktion der *PGLP*-Überexpressionslinien auf abiotische Stressfaktoren, wie hohe Temperatur und Wassermangel, als nützlich erweisen.

7 Literatur

Abadie C, Mainguet S, Davanture M, Hodges M, Zivy M, Tcherkez G (2016) Concerted Changes in the Phosphoproteome and Metabolome Under Different CO₂/O₂ Gaseous Conditions in Arabidopsis Rosettes. *Plant Cell Physiol.* **57**(7): 1544–1556 (2016)
doi:10.1093/pcp/pcw086

Anderson, L.E. (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochim. Biophys. Acta* **235**: 237–244

Araújo, W.L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T.R., Tohge, T., Krahnert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I.A., Leaver, C.J., and Fernie, A.R. (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* **22**: 1549–1563.

Araújo, W.L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Tohge, T., Larson, T.R., Krahnert, I., Balbo, I., Witt, S., Dörmann, P., Graham, I.A., Leaver, C.J., Fernie, A.R. (2011) Analysis of a Range of Catabolic Mutants Provides Evidence That Phytanoyl-Coenzyme A Does Not Act as a Substrate of the Electron-Transfer Flavoprotein/ Electron-Transfer Flavoprotein:Ubiquinone Oxidoreductase Complex in Arabidopsis during Dark-Induced Senescence. *Plant Physiology* **157**: 55-69

Arrivault, S., Guenther, M., Ivakov, A., Feil, R., Vosloh, D., van Dongen, J.T., Sulpice, R., Stitt, M. (2009) Use of reverse-phase liquid chromatography, linked to tandem mass spectrometry, to profile the Calvin cycle and other metabolic intermediates in Arabidopsis rosettes at different carbon dioxide concentrations. *Plant Journal* **59**: 824-839

Atkin Owen K., Tjoelker Mark G. (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* Vol.8 No.7 doi:10.1016/S1360-1385(03)00136-5

Azoulay-Shemer T., Andisheh Bagheri, Cun Wang, Axxell Palomares, Aaron B. Stephan, Hans-Henning Kunz and Julian I. Schroeder (2016) Starch Biosynthesis in Guard Cells But Not in Mesophyll Cells Is Involved in CO₂-Induced Stomatal Closing. *Plant Physiology* vol. 171 no. 2 788-798. doi:10.1104/pp.15.01662

Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* 15:330–336. doi:10.1016/j.tplants.2010.03.006

Bauwe, H., Hagemann, M., Kern, R., Timm, S. (2012) Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 269-275

Belanger, F.C., Ogren, W.L. (1987) Phosphoglycolate phosphatase: purification and preparation of antibodies. *Photosynth Res* **14**: 3–13

Betti, M., Bauwe, H., Busch, F., Fernie, A.R., Keech, O., Levey, M., Ort, D., Parry, M.A.J., Sage, R., Timm, S., Walker, B., Weber, A.P.M. (2016) Manipulating photorespiration to increase plant productivity. Recent advances and perspectives for crop improvement. *Journal of Experimental Botany* doi: 10.1093/jxb/erw076

Literatur

- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523
- Bloom, A. (2015)** Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. Photosynth Res 123: 117-128 doi:10.1007/s11120-014-0056-y
- Bloom AJ, Burger M, Asensio JSR, Cousins AB (2010)** Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. Science 328:899–903. doi:10.1126/science.1186440
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., Gorlach, J.** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. Plant Cell 13: 1499-1510
- 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
- Campbell, W.J. & Ogren, W.L. (1990)** Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed, and reconstituted chloroplasts. Photosynth Res 23: 257. doi:10.1007/BF00034856
- Caspar, T., Huber, S.C., Somerville, C. (1985)** Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. Plant Physiology 79: 11-17
- Chaouch S, Queval G, Vanderauwera S, Mhamdi A, Vandorpe M, Langlois-Meurinne M, Van Breusegem F, Saindrenan P, Noctor G (2010)** Genetic reversion of cell death in the *Arabidopsis cat2* knockout mutant shows that peroxisomal H₂O₂ is coupled to biotic defense responses by isochorismate synthase 1 in a daylength-related manner. Plant Physiology 153:1692-1705.
- Chastain, CJ., Orgren, WL. (1989)** Glyoxylate Inhibition of Ribulosebisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activation State in vivo. Plant and Cell Phys. 30: 937 - 944
- Chen, M., Thelen, J.J. (2010)** The Plastid Isoform of Triose Phosphate Isomerase Is Required for the Postgerminative Transition from Heterotrophic to Autotrophic Growth in *Arabidopsis*. The Plant Cell 22: 77-90
- Christeller, J.T., Tolbert, N.E. (1978)** Phosphoglycolate phosphatase. Effect of cation and pH on activity. J Biol Chem 253: 1786–1790
- Clough, S.J., Bent, A.F. (1998)** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 16: 735–743
- Cook CM, Mulligan RM and Tolbert NE (1985)** Inhibition and stimulation ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by glyoxylate. Arch Biochem Biophys 240: 392–401
- Cousins, A.B., Pracharoenwattana, I., Zhou, W., Smith, S.M., 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 CO₂ release. Plant Physiology 148, 786-795.
- Cousins, A.B., Walker, B.J., Pracharoenwattana, I., Smith, S.M., Badger, M.R. (2011)** Peroxisomal hydroxypyruvate reductase is not essential for photorespiration in *Arabidopsis*

Literatur

but its absence causes an increase in the stoichiometry of photorespiratory CO₂ release. Photosynthesis Research **108**, 91-100

Cross, J.M., von Korff, M., Altmann, T., Bartzelko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., and Stitt, M. (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol.* **142**: 1574– 1588

Dalal, J., Lopez, H., Vasani, N.B., Hu, Z., Swift, J.E., Yalamanchilli, R., Dvora, M., Lin, X., Xie, D., Qu, R., Sederoff, H.W. (2015) A photorespiratory bypass increases plant growth and seed yield in biofuel crop *Camelina sativa*. *Biotechnol Biofuels*. doi:10.1186/s13068-015-0357-1

Daloso, D.M., Antunes, W.C., Pinheiro, D.P., Wquim, J.P., Araújo, W.L., Loureiro, M.E., Fernie, A.R., Williams, T.C.R. (2015) Tobacco guard cell fix CO₂ by both Rubisco and PEPcase while sucrose acts as a substrate during light-induced stomatal opening. *Plant Cell and Environment* **38**: 2353-2371

Daloso, D.M., Williams, T.C.R., Antunes, W.C., Pinheiro, D.P., Müller, C., Loureiro, M.E., Fernie, A.R. (2015) Guard cell-specific upregulation of sucrose synthase 3 reveals that the role of sucrose in stomatal function is primarily energetic. *New Phytologist* **209**: 1470-1483

Dellero, Y., Lamothe-Sibold, M., Jossier, M., Hodges, M. (2015) *Arabidopsis thaliana ggt1* photorespiratory mutants maintain leaf carbon:nitrogen balance by reducing RuBisCO content and plant growth. *Plant Journal* **83**, 1005-1018

Desfeux C, Clough SJ, Bent AF (2000) Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol* **123**:895–904.

Dutilleul C, Lelarge C, Prioul J-L, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G (2005) Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiol* **139**:64–78

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., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A., Hagemann, M. (2008) The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiotically to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 17199-17204

Eisenhut, M., Planchais, S., Cabassa, C., Guivrac'h, A., Justin, A.M., Taconnat, L., Renou, J.P., Linka, M., Gagneul, D., Timm, S., Bauwe, H., Carol, P., Weber, A.P.M. (2013) *Arabidopsis A BOUT DE SOUFFLE* is a putative mitochondrial transporter involved in photorespiratory metabolism and is required for meristem growth at ambient CO₂ levels. *The Plant Journal* **73**, 836-849

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

Literatur

- Engel, N., Ewald, R., Gupta, K.J., Zrenner, R., Hagemann, M., Bauwe, H.** (2011) The presequence of Arabidopsis serine hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria. *Plant Physiology* **157**: 1711-1720
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., Fernie, A.R.** (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* **13**: 14-19
- Farquhar, G.D., von Cammerer, S., Berry, J.A.** (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. *Planta* **149**: 78-90
- Feng, L., Wang, K., Li, Y., Tan, Y., Kong, J., Li, H., Li, Y., Zhu, Y.** (2007) Overexpression of SBPase enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports* **26**: 1635-1646
- Flexas, J., Barbour, M.M., Brendel, O., Cabrera, H.M., Carriqui, M., Diaz-Espejo, A., Douthe, C., Dreyer, E., Ferrio, J.P., Gago, J., Galle, A., Galmes, J., Kodama, N., Medrano, H., Niinemets, Ü., Peguero-Pina, J.J., Pou, A., Ribas-Carbo, M., Tomas, M., Tossens, T., Warren, C.R.** (2012) Mesophyll diffusionconductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science* **193-194**: 70-84
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., und Sharkey, T.D.** (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* **6**, 269-279.
- Florian A., Nikoloski Z., Sulpice R., Timm S., Wagner L., Araújod, Takayuki Tohgea, Hermann Bauwe, and Alisdair R. Fernie** (2014) Analysis of Short-Term Metabolic Alterations in Arabidopsis Following Changes in the Prevailing Environmental Conditions. *Molecular Plant* Vol. 7 Number 5: 893-911
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* 60:455–484
- Friedman, M. H.** (1986) *Principles and Models of Biological Transport*. Springer Verlag, Berlin.
- Gago, J., Daloso, D., Figueroa, C.M., Flexas, J., Fernie, A.R., Nikoloski, Z.** (2016) Relationships of leaf net photosynthesis, stomatal conductance, and mesophyll conductance to primary metabolism: a multi-species meta-analysis approach. *Plant Physiology* DOI:10.1104/pp.15.01660
- Gibon, Y., Vigeolas, H., Tiessen, A., Geigenberger, P., Stitt, M.** (2002) Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant Journal* **30**: 221-235
- Glaring, M.A., Skryhan, K., Kötting, O., Zeeman, S.C., Blennow, A.** (2012) Comprehensive survey of redox sensitive starch metabolising enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **58**: 89-97
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., Smith, A.M.** (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 9458-9463

Literatur

- Graham, D.E., Graupner, M., Xu, H., With, R.H.** (2001) Identification of coenzyme M biosynthetic 2-phosphosulfolactate phosphatase - A member of a new class of Mg²⁺-dependent acid phosphatases. *Eur. J. Biochem.* **268:** 5176–5188
- Gray W. M., ÖSTIN A., SANDBERG G., ROMANO C.P., ESTELLE M.** (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Biology* Vol. 95, pp. 7197–7202
- Grüning, N., Du, D., Keller, M.A., Luisi, B.F., Ralser, M.** (2014) Inhibition of riosephosphate isomerase by phosphoenolpyruvate in the feedback-regulation of glycolysis. *Open Biol.* **4:** 130232. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.130232>
- Hagemann, M., Fernie, A.R., Espie, G.S., Kern, R., Eisenhut, M., Reumann, S., Bauwe, H., Weber, A.P.M.** (2013) Evolution of the biochemistry of the photorespiratory C2 cycle. *Plant Biology* **45:** 639-647
- Hagemann, M., Kern, R., Maurino, V.G., Hanson, D.T., Weber, A.P.M., Sage, R.F., Bauwe, H.** (2016) Evolution of photorespiration from cyanobacteria to land plants considering protein phylogenies and acquisition of carbon concentrating mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/erw063
- Hall, N.P., Kendall, A.C., Lea, P.J., Turner, J.C., Wallsgrove, R.M.** (1987) Characteristics of a photorespiratory mutant of barley (*Hordeum vulgare L.*) deficient in phosphoglycollate phosphatase. *Photosynthesis Research*, **11:** 89–96
- Hardy, P., Baldy, P.** (1986) Corn phosphoglycolate phosphatase: purification and properties. *Planta* **168:** 245-252
- Hattenbach, A., Heineke, D.** (1999) On the role of chloroplastic phosphoglucomutase in the regulation of starch turnover. *Planta* **207:** 527-532
- Hildebrandt, T., Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., Braun, H.P.** (2015) Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant* DOI:10.1016/j.molp.2015.09.005
- Hong, S., Vierling, E.** (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *PNAS* Vol. 97 No.8: 4392-4397
- Huh, D.H., Kursell, A.V., Husic, H.D.** (1989) Kinetic properties of phosphoglycolate phosphatase from *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **28:** 719-720
- Husic, H.D., Tolbert, N.E.** (1984) Anion and divalent cation activation of phosphoglycolate phosphatase from leaves. *Arch Biochem Biophys* **229:** 64–72
- Husic DW, Husic HD, Tolbert NE** (1987) The oxidative photosynthetic carbon cycle or C2 cycle. *Crit Rev Plant Sci* **5:** 45 – 100
- Igamberdiev, A.U., Lea, P.J.** (2002) The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochemistry* **60:** 651–674
- Inamdar, K.V., Pouliot, J.J., Zhou, T., Lees-Miller, S.P., Rasouli-Nia, A., Povirk, L.F.** (2002) Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1. *J Biol Chem* **277:** 27162-27168

Literatur

- Ito, H., Iwabuchi, M., Ogawa, K.** (2003) The Sugar-Metabolic Enzymes Aldolase and Triose-Phosphate Isomerase are Targets of Glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: Detection using Biotinylated Glutathione. *Plant Cell Physiology* **44**: 655-660
- 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
- Jin et al.** (2011): The effect of experimental warming on leaf functional traits, leaf structure and leaf biochemistry in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 2011 11:35.
- Jones, T.W.A., Gottlieb, L.D., Pichersky, E.** (1986) Reduced Enzyme Activity and Starch Level in an Induced Mutant of Chloroplast Phosphoglucose Isomerase. *Plant Physiology* **81**: 367-371
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H.J., Rosenkranz, R., Stäbler, N., Schönfeld, B., Kreuzaler, F., Perterhängsel, C.** (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **25**: 593-599
- Kelly, G.J., and Latzko, E.** (1976) Inhibition of spinach-leaf phosphofructokinase by 2-phosphoglycollate. *FEBS Lett.* **68**: 55–58
- 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
- Kim, Y., Yakunin, A.F., Kuznetsova, E., Xu, X., Pennycooke, M., Gu, J., Cheung, F., Proudfoot, M., Arrowsmith, C.H., Joachimiak, A., Edwards, A.M., Christendat, D.** (2004) Structure- and function-based characterization of a new phosphoglycolate phosphatase from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem* **279**: 517-526
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., Franklin, K.A.** (2009) High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology* **19**, 408–413 DOI 10.1016/j.cub.2009.01.046
- Kump, L.R.** (2008) The rise of atmospheric oxygen. *Nature* **451** doi:10.1038/nature06587
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lebioda, L., Stec, B., Brewer, J.M., Tykarska, E.** (1991) Inhibition of Enolase: The Crystal Structures of Enolase-Ca²⁺-2-Phosphoglycerate and Enolase-Zn²⁺-Phosphoglycolate Complexes at 2.2-A Resolution. *Biochemistry* **30**: 2823-2827
- Lefebvre, S., Lawson, T., Zakhleniuk, O.V., Lloyd, J., Raines, C.A.** (2005) Increased Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase Activity in Transgenic Tobacco Plants Stimulates Photosynthesis and Growth from an Early Stage in Development. *Plant Physiology* **138**: 451-430
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R.** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protocols* **1**: 387–396

Literatur

- Liu, H., Zhou, H., Zhu, D., Bi, R.** (2009) Overexpression, purification, characterization and preliminary crystallographic study of phosphoglycolate phosphatase from *Shigella flexneri* 2a strain 301. *Acta Crystallographica* **65**: 29-33
- Lu, Y., Gehan, J.P., and Sharkey, T.D.** (2005) Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* **138**: 2280–2291
- Lyngstadaas, A., Lobner-Olesen, A., Boye, E.** (1995) Characterization of three genes in the dam-containing operon of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **247**: 546-554
- Mamedov, T.G., Suzuki, K., Miura, K., Kucho, K.K., Fukuzawa, H.** (2001) Characteristics and sequence of phosphoglycolate phosphatase from a eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **276**: 45573–45579
- Maier, A., Fahnstich, H., von Cammerer, S., Engquist, M.K., Weber, A.P., Flügge, U.I., Maurino, V.G.** (2012) Transgenic Introduction of a Glycolate Oxidative Cycle into *A. thaliana* Chloroplasts Leads to Growth Improvement. *Front Plant Sci* doi: 10.3389/fpls.2012.00038
- Mattsson, M., Häusler, RE., Leegood, RC., Lea, PJ., Schjoerring, JK.** (1997) Leaf-Atmosphere NH₃ Exchange in Barley Mutants with Reduced Activities of Glutamine Synthetase. *Plant Physiol.* **114**: 1307- 1312
- Maxwell K., Johnson G. N.** (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* Vol. 51, No. 345, pp. 659-668
- Medeiros, D.B., Martins, S.C.V., Cavalcanti, J.H.F., Daloso, D.M., Martinoia, E., Nunes-Nesi, A., DaMatta, F.M., Fernie, A.R., Araújo, W.L.** (2016) Enhanced photosynthesis and growth in atquac1 knockout mutants are due to altered organic acid accumulation and an increase in both stomatal and mesophyll conductance. *Plant Physiology* **170**: 86-101
- 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
- Mulligan RM, Wilson B and Tolbert NE** (1983) Effects of glyoxylate on photosynthesis by intact chloroplasts. *Plant Physiol* **72**: 415–419
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. **51**: 263–273.
- Murray MG and Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325.
- Neuhaus, H.E., and Stitt, M.** (1990) Control analysis of photosynthate partitioning: Impact of reduced activity of ADP-glucose pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **182**: 445–454
- Nelson, C.J., Li, L., and Millar, A.H.** (2014) Quantitative analysis of protein turnover in plants. *Proteomics* **14**: 579-592
- Norman, E.G., Colman, B.** (1990) Purification and Characterization of Phosphoglycolate Phosphatase from the Cyanobacterium *Coccochloris peniocystis*. *Plant Physiology* **95**: 693-698

Literatur

Obata T, Florian A, Timm S, Hermann Bauwe and Alisdair R. Fernie (2016) On the metabolic interactions of (photo)respiration Journal of Experimental Botany, Vol. 67, No. 10 pp. 3003–3014, 2016 doi:10.1093/jxb/erw128

Ort, D.R., Merchant, S.S., Alric, J., Barkan, A., Blankenship, R.E., Bock, R., Croce, R., Hanson, M.R., Hibberd, J.M., Long, S.P., Moore, T.A., Moroney, J., Niyogi, K.K., Parry, M.A., Peralta-Yahya, P.P., Prince, R.C., Redding, K.E., Spalding, M.H., van Wijk, K.J., Vermaas, W.F., von Caemmerer, S., Weber, A.P., Yeates, T.O., Yuan, J.S., Zhu, X.G. (2015) Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**: 8529–8536.

Pellicer, M. T., Nuñez, M. F., Aguilar, J., Badia, J. & Baldoma, L. (2003). Role of 2-Phosphoglycolate Phosphatase of *Escherichia coli* in Metabolism of the 2-Phosphoglycolate Formed in DNA Repair J. Bacteriol. 185, 5815–5821

Pick, T.R., Bräutigam, A., Schulz, M.A., Obata, T., Fernie, A.R., Weber, A.P.M. (2013) PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**: 3185-3190

Queval G., Issakidis-Bourguet E., Hoeberichts F.A., Vandorpe M., Gakiere B., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Van Breusegem F., and Noctor G. (2007) Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. Plant J. **52**: 640-657

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., Tolbert, N.E. (1961) Phosphoglycolic acid phosphatase. J Biol Chem **236**: 1285–1290

Rose, Z.B., Grove, D.S., Seal, S.N. (1986) Mechanism of Activation by Anions of Phosphoglycolate Phosphatase from Spinach and Human Red Blood Cells. J Biol Chem **261**: 10996-11002

Salvucci ME, Osteryoung KW, Crafts-Brandner SJ, Vierling E (2001): Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in Vitro and in Vivo. Plant Physiol 2001, 127:1053-1064.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory

Scheibe R, Dietz KJ (2012) Reduction-oxidation network for flexible adjustment of cellular metabolism in photoautotrophic cells. Plant, Cell Environ 35:202–216. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02319.x

Schneidereit J, Hausler RE, Fiene G, Kaiser WM, Weber APM (2006) Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism. Plant J 45:206–224

Literatur

- 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**: 1580-1586
- Seal, S.N., Rose, Z.B.** (1987) Characterization of a phosphoenzyme intermediate in the reaction of phosphoglycolate phosphatase. *J Biol Chem* **262**: 13496–13500
- Segerer S, Hadamek K, Zundler M, Fekete A, Seifried A, Mueller MJ, Koentgen F, Gessler M, Jeanclos E, Gohla A** (2016) An essential developmental function for murine phosphoglycolate phosphatase in safeguarding cell proliferation. *Scientific Reports* 6:35160 DOI: 10.1038/srep35160
- Shively, J.M., van Keulen, G., Meijer, W.G.** (1998) Something for almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annu Rev Microbiol* **52**: 191-230
- Sievers, N., Muders, K., Henneberg, M., Klähn, S., Effmert, M., Junghans, H., and Hagemann, M.** (2013) Establishing glucosylglycerol synthesis in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. albatros) by expression of the *ggpPS* gene from *Azotobacter vinelandii*. *J. Plant Sci. Mol. Bree.* **2**: 1
- Smith, A.M., Denyer, K., and Martin, C.** (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **48**, 65–87
- Somerville, C.R., Ogren, W.L.** (1979) A phosphoglycolate phosphatasedeficient mutant of Arabidopsis. *Nature* **280**: 833–836
- Somerville, C.R.** (2001) An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. *Plant Physiology* **125**: 20-24
- Stockhaus, J., Schell, J., Willmitzer, L.** (1989) Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1 with the presence of chloroplast. *EMBO J.* **8**: 2445–2451
- Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C** (2012) PIF4–Mediated Activation of YUCCA8 Expression Integrates Temperature into the Auxin Pathway in Regulating Arabidopsis Hypocotyl Growth. *PLoS Genet* 8(3): e1002594. doi:10.1371/journal.pgen.1002594
- Suzuki, K., Marek, L.F., Spalding, M.H.** (1990) A photorespiratory mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **93**: 231–237
- Sweetlove, L.J., Beard, K.F.M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., and Ratcliffe, R.G.** (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci.* **15**: 462–470
- Taiz, L., Zeiger, E.** (2000) *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- 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, Nunes-Nesi A, Pärnik T, Morgenthal K, Wienkoop S, Keerberg O, Weckwerth W, Kleczkowski LA, Fernie AR, Bauwe H.** (2008) A cytosolic pathway for the conversion of

Literatur

hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20, 2848–2859.

Timm, S., Mielewczik, M., Florian, A., Frankenbach, S., Dreissen, A., Hocken, N., Fernie, A.R., Walter, A., Bauwe, H. (2012a) High-to-low CO₂ acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of Arabidopsis. *PLoS ONE* 7:e42809. doi:10.1371/journal.pone.0042809

Timm, S., Florian, A., Arrivault, S., Stitt, M., Fernie, A.R., Bauwe, H. (2012b) Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *FEBS Lett* **586**: 3692-3697

Timm, S., Bauwe, H. (2013a) The variety of photorespiratory phenotypes - employing the current status for future research directions on photorespiration. *Plant Biology* **15**: 737-747

Timm, S., Florian, A., Wittmiß, M., Jahnke, K., Hagemann, M., Fernie, A.R., Bauwe, H. (2013b) Serine acts as metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **162**: 379-389

Timm, S., Wittmiß, M., Gamlien, S., Ewald, R., Florian, A., Frank, M., Wirtz, M., Hell, R., Fernie, A.R., Bauwe, H. (2015) Mitochondrial Dihydrolipoyl Dehydrogenase Activity Shapes Photosynthesis and Photorespiration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **27**: 1968-1984

Timm, S., Florian, A., Fernie, A.R., Bauwe, H. (2016) The regulatory interplay between photorespiration and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/erw083

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

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

Voll LM, Jamai A, Renné P, Voll H, McClung CR, Weber APM. (2006) The photorespiratory *Arabidopsis* *shm1* mutant is deficient in SHM1. *Plant Physiology* 140, 59–66.

Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS (2013) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biol* 15:713–722. doi:10.1111/j. 1438-8677.2012.00710.x

Wiese, A., Christ, M.M., Virnich, O., Schurr, U., Walter, A. (2007) Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytol* **174**: 752–761

Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 355, 1517–1529.

Wu, J., Zhang, Z., Zhang, Q., Han, X., Gu, X., Lu, T. (2015) The molecular cloning and clarification of a photorespiratory mutant, oscdm1, using enhancer trapping. *Frontiers in Genetics* 6, 226

Literatur

Yu, T.S., Lue, W.L., Wang, S.M., Chen, J. (2000) Mutation of Arabidopsis Plastid Phosphoglucose Isomerase Affects Leaf Starch Synthesis and Floral Initiation. *Plant Physiology* **123**: 319-325

Yu T.S., Kofler H., Häusler R.E., Hille D., Flügge U.I., Zeeman S.C., Smith A.M., Kossmann J., Lloyd J., Ritte G., Steup M., Lue W.L., Chen J., Weber A. (2001) The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell*.**13**:1907–1918.

Zecher, R., Wolf, H.U. (1980) Partial purification and characterization of human erythrocyte phosphoglycollate phosphatase. *Biochem J* **191**: 117-124

ZEEMAN, SC., SMITH, SM., SMITH, AM. (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* **401**: 13-28

8 Anhang

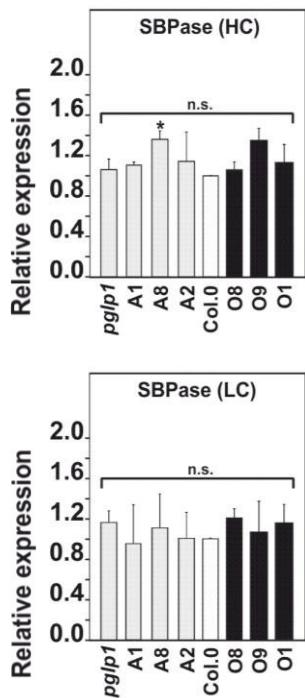


Abbildung 8-1 Expressionsmuster von SBP Transkripten

Pflanzen wurden bis zum Stadium 5.1 (8 Wochen) unter erhöhtem CO₂ (HC, 1%) angezogen und zu Normalluft (LC, 0.039%) überführt. Proben für RNA Isolation wurden zur Mitte der Lichtperiode genommen. Gezeigt ist das SBPase Transkriptmuster in transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von 3 biologischen Replikaten. Sternchen kennzeichnen Werte, die statistisch signifikant von der Kontrolle abweichen (*p < 0.05; n.s. – nicht signifikant).

Anhang

Tabelle 8-1 Relative Metabolitgehalte gemessen mit GC/MS in PGLP-Antinsense- und Überexpressionlinien in HC

Blattmaterial wurde in der Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 (Boyes *et al.*, 2001), die unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%, HC) angezogen wurden, geerntet. Die relativen steady-state Gehalte sind als Mittelwerte ± Stabw von fünf unabhängigen biologischen Replikaten angegeben. Fett gedruckte Werte weichen signifikant vom Wildtyp ab, basierend auf dem Student's *t*-test (*p* < 0.05).

Compound	<i>pglp1</i> rv to WT	A1 rv to WT	A8 rv to WT	A2 rv to WT	MoD_WT rv to WT	O8 rv to WT	O9 rv to WT	O1 rv to WT
alanine	10,18 ± 3,93	3,07 ± 1,21	1,11 ± 0,32	0,89 ± 0,17	1,0 ± 0,30	1,23 ± 0,30	1,98 ± 0,64	1,63 ± 0,57
alanine, beta	5,39 ± 1,01	3,58 ± 0,90	0,90 ± 0,31	0,94 ± 0,29	1,0 ± 0,20	1,09 ± 0,23	1,30 ± 0,26	0,71 ± 0,22
arginine	2,24 ± 0,43	2,19 ± 0,55	0,73 ± 0,24	1,07 ± 0,27	1,0 ± 0,28	0,99 ± 0,20	0,98 ± 0,22	0,73 ± 0,21
ascorbate	0,84 ± 0,13	1,53 ± 0,38	1,19 ± 0,16	1,29 ± 0,29	1,0 ± 0,22	1,25 ± 0,33	1,40 ± 0,33	1,07 ± 0,16
asparagine	3,49 ± 0,32	2,13 ± 0,29	0,84 ± 0,15	1,18 ± 0,28	1,0 ± 0,11	1,53 ± 0,49	1,12 ± 0,23	0,69 ± 0,09
butanoate, 4-amino	2,26 ± 0,17	4,76 ± 1,00	1,39 ± 0,43	1,14 ± 0,29	1,0 ± 0,05	1,10 ± 0,27	1,14 ± 0,21	0,82 ± 0,25
dehydroascorbate	0,10 ± 0,05	0,35 ± 0,10	1,24 ± 0,34	0,40 ± 0,13	1,0 ± 0,15	0,32 ± 0,08	0,59 ± 0,17	0,83 ± 0,15
erythritol	2,98 ± 0,50	3,25 ± 1,07	1,09 ± 0,24	1,17 ± 0,23	1,0 ± 0,12	1,35 ± 0,28	1,32 ± 0,14	1,17 ± 0,20
fructose	1,01 ± 0,13	1,03 ± 0,13	0,89 ± 0,08	1,14 ± 0,09	1,0 ± 0,12	0,76 ± 0,06	0,72 ± 0,15	1,12 ± 0,21
fucose	0,83 ± 0,09	1,02 ± 0,11	1,08 ± 0,12	1,06 ± 0,08	1,0 ± 0,06	0,91 ± 0,10	1,08 ± 0,09	1,02 ± 0,04
fumarate	0,73 ± 0,06	0,80 ± 0,10	0,94 ± 0,08	1,01 ± 0,10	1,0 ± 0,12	1,00 ± 0,15	0,96 ± 0,12	1,16 ± 0,17
gaba	2,26 ± 0,17	4,76 ± 1,00	1,39 ± 0,43	1,14 ± 0,29	1,0 ± 0,05	1,10 ± 0,27	1,14 ± 0,21	0,82 ± 0,25
galactinol	0,48 ± 0,09	0,81 ± 0,11	1,23 ± 0,18	1,10 ± 0,12	1,0 ± 0,16	1,12 ± 0,23	1,02 ± 0,16	1,15 ± 0,19
glucose	1,23 ± 0,46	2,46 ± 0,88	4,93 ± 1,44	1,31 ± 0,37	1,0 ± 0,23	0,88 ± 0,33	2,89 ± 0,72	2,61 ± 0,82
glucose, 1,6-anhydro, beta	0,84 ± 0,07	1,36 ± 0,09	1,09 ± 0,13	1,19 ± 0,14	1,0 ± 0,08	1,41 ± 0,17	0,88 ± 0,16	1,24 ± 0,22
glutamate	1,39 ± 0,02	1,50 ± 0,12	0,95 ± 0,12	1,10 ± 0,11	1,0 ± 0,03	1,11 ± 0,09	0,94 ± 0,04	0,93 ± 0,13
glutamine	2,40 ± 0,63	1,70 ± 0,43	0,60 ± 0,14	1,18 ± 0,25	1,0 ± 0,33	0,90 ± 0,15	0,82 ± 0,23	0,57 ± 0,13
glycerate	1,19 ± 0,21	2,39 ± 0,49	1,08 ± 0,25	0,89 ± 0,17	1,0 ± 0,10	1,04 ± 0,33	0,83 ± 0,14	0,80 ± 0,12
glycerol	0,66 ± 0,21	0,72 ± 0,12	0,97 ± 0,16	0,81 ± 0,13	1,0 ± 0,16	0,88 ± 0,19	1,04 ± 0,17	0,95 ± 0,29
glycine	2,35 ± 0,37	1,67 ± 0,34	0,69 ± 0,18	0,82 ± 0,24	1,0 ± 0,09	0,85 ± 0,25	0,53 ± 0,12	0,46 ± 0,09

Anhang

glycolate	4,33 ± 1,24	1,61 ± 0,46	1,17 ± 0,14	0,95 ± 0,12	1,0 ± 0,12	1,08 ± 0,13	1,01 ± 0,16	1,34 ± 0,18
guanidine	4,40 ± 0,37	0,80 ± 0,19	1,90 ± 0,31	2,09 ± 0,53	1,0 ± 0,35	0,94 ± 0,23	3,46 ± 0,84	1,92 ± 0,33
indole-3-acetonitrile	1,03 ± 0,13	2,16 ± 0,44	1,32 ± 0,14	1,23 ± 0,08	1,0 ± 0,03	1,10 ± 0,16	1,06 ± 0,12	1,32 ± 0,16
inositol, myo	0,52 ± 0,07	0,88 ± 0,15	1,35 ± 0,12	1,06 ± 0,13	1,0 ± 0,20	1,00 ± 0,29	1,06 ± 0,14	1,46 ± 0,17
isoleucine	3,43 ± 0,77	1,48 ± 0,54	0,43 ± 0,06	1,86 ± 0,83	1,0 ± 0,25	1,66 ± 0,69	1,17 ± 0,29	0,63 ± 0,14
isomaltose	4,84 ± 1,39	19,72 ± 7,04	3,15 ± 0,96	1,95 ± 0,70	1,0 ± 0,23	2,24 ± 0,67	3,77 ± 0,67	2,13 ± 0,62
itaconate	0,67 ± 0,10	0,49 ± 0,06	1,03 ± 0,21	0,77 ± 0,15	1,0 ± 0,14	0,89 ± 0,17	0,93 ± 0,20	1,33 ± 0,27
leucine	3,83 ± 0,89	3,07 ± 1,50	0,34 ± 0,06	1,80 ± 0,89	1,0 ± 0,31	1,94 ± 0,94	1,21 ± 0,29	0,54 ± 0,13
lysine	6,87 ± 1,32	2,55 ± 0,45	1,19 ± 0,29	1,22 ± 0,39	1,0 ± 0,20	1,22 ± 0,21	2,85 ± 0,89	0,60 ± 0,05
malate	1,12 ± 0,02	1,07 ± 0,14	1,06 ± 0,13	1,03 ± 0,07	1,0 ± 0,11	0,99 ± 0,10	1,01 ± 0,06	1,10 ± 0,23
malitol	0,33 ± 0,21	1,16 ± 0,22	1,96 ± 0,54	1,04 ± 0,20	1,0 ± 0,23	0,94 ± 0,31	1,24 ± 0,20	1,14 ± 0,28
maltose	0,80 ± 0,21	1,72 ± 0,50	1,42 ± 0,34	1,11 ± 0,17	1,0 ± 0,09	1,51 ± 0,45	1,08 ± 0,15	1,05 ± 0,17
mannose	0,59 ± 0,12	0,36 ± 0,11	1,45 ± 0,17	1,26 ± 0,20	1,0 ± 0,31	0,84 ± 0,26	1,45 ± 0,13	1,25 ± 0,22
methionine	1,77 ± 0,46	1,79 ± 0,27	0,65 ± 0,12	1,08 ± 0,25	1,0 ± 0,24	0,75 ± 0,17	0,86 ± 0,21	0,62 ± 0,07
nicotinate	0,42 ± 0,07	1,26 ± 0,14	1,13 ± 0,12	1,13 ± 0,10	1,0 ± 0,16	1,19 ± 0,15	1,01 ± 0,18	1,29 ± 0,14
octadecanoate	1,22 ± 0,17	1,18 ± 0,17	1,09 ± 0,19	0,96 ± 0,16	1,0 ± 0,13	1,35 ± 0,34	0,88 ± 0,09	0,92 ± 0,10
ornithine	5,56 ± 0,65	3,45 ± 0,79	0,63 ± 0,16	0,86 ± 0,33	1,0 ± 0,25	3,05 ± 1,37	1,24 ± 0,37	0,53 ± 0,16
proline	1,53 ± 0,19	1,28 ± 0,22	1,73 ± 0,22	0,84 ± 0,24	1,0 ± 0,19	0,88 ± 0,25	1,81 ± 0,41	1,01 ± 0,17
putrescine	1,64 ± 0,22	1,19 ± 0,33	0,75 ± 0,13	1,11 ± 0,32	1,0 ± 0,16	1,18 ± 0,26	1,51 ± 0,25	0,73 ± 0,09
pyruvate	1,38 ± 0,45	1,28 ± 0,43	1,58 ± 0,70	0,73 ± 0,11	1,0 ± 0,22	1,25 ± 0,47	1,01 ± 0,32	1,18 ± 0,35
raffinose	0,22 ± 0,06	0,15 ± 0,09	2,57 ± 0,38	0,82 ± 0,20	1,0 ± 0,52	1,43 ± 0,85	2,21 ± 0,22	1,71 ± 0,48
salicylate	1,03 ± 0,20	0,83 ± 0,19	0,92 ± 0,15	1,14 ± 0,13	1,0 ± 0,08	1,10 ± 0,13	0,83 ± 0,20	0,86 ± 0,06
serine	1,26 ± 0,07	1,11 ± 0,13	0,94 ± 0,23	0,92 ± 0,19	1,0 ± 0,12	0,93 ± 0,19	0,98 ± 0,12	0,75 ± 0,17
serine, o-acetyl	2,37 ± 0,57	1,85 ± 0,39	1,13 ± 0,21	1,18 ± 0,14	1,0 ± 0,17	1,56 ± 0,25	1,27 ± 0,16	1,13 ± 0,16
sorbose	1,41 ± 0,53	1,53 ± 0,26	2,24 ± 0,71	1,22 ± 0,37	1,0 ± 0,32	1,20 ± 0,46	0,51 ± 0,12	1,56 ± 0,52
spermidine	1,11 ± 0,15	1,27 ± 0,17	0,83 ± 0,10	0,84 ± 0,24	1,0 ± 0,22	1,27 ± 0,24	1,21 ± 0,17	0,88 ± 0,15
succinate	1,76 ± 0,17	1,49 ± 0,11	0,97 ± 0,10	0,98 ± 0,07	1,0 ± 0,05	0,95 ± 0,16	0,95 ± 0,11	0,97 ± 0,03
sucrose	1,96 ± 0,62	1,53 ± 0,42	0,85 ± 0,26	0,89 ± 0,27	1,0 ± 0,28	1,32 ± 0,35	1,14 ± 0,37	0,74 ± 0,19
threonate	0,57 ± 0,10	1,03 ± 0,13	1,06 ± 0,17	1,01 ± 0,16	1,0 ± 0,27	0,98 ± 0,16	0,46 ± 0,06	1,16 ± 0,28

Anhang

threonine	1,74 ± 0,21	1,41 ± 0,13	1,01 ± 0,13	1,08 ± 0,19	1,0 ± 0,07	1,11 ± 0,15	1,13 ± 0,08	0,97 ± 0,03
trehalose	0,29 ± 0,07	1,12 ± 0,43	2,48 ± 0,37	1,42 ± 0,37	1,0 ± 0,24	0,82 ± 0,15	1,62 ± 0,22	1,67 ± 0,32
tryptophan	2,97 ± 0,89	1,27 ± 0,21	0,65 ± 0,32	0,80 ± 0,30	1,0 ± 0,39	0,78 ± 0,26	0,60 ± 0,20	0,26 ± 0,06
turanose	1,35 ± 0,41	2,48 ± 0,77	1,81 ± 0,49	1,33 ± 0,21	1,0 ± 0,18	1,01 ± 0,22	1,83 ± 0,27	1,25 ± 0,34
tyrosine	3,78 ± 0,78	1,55 ± 0,49	0,85 ± 0,23	1,14 ± 0,43	1,0 ± 0,23	0,99 ± 0,37	1,46 ± 0,31	0,41 ± 0,06
uracil	1,40 ± 0,38	1,32 ± 0,37	1,02 ± 0,26	0,99 ± 0,25	1,0 ± 0,24	1,28 ± 0,28	1,16 ± 0,25	1,20 ± 0,27
valine	2,52 ± 0,39	1,75 ± 0,48	0,75 ± 0,16	1,40 ± 0,47	1,0 ± 0,17	1,35 ± 0,41	1,20 ± 0,18	0,81 ± 0,11
xylose	0,55 ± 0,07	0,82 ± 0,16	1,60 ± 0,17	1,21 ± 0,15	1,0 ± 0,18	0,99 ± 0,37	1,37 ± 0,05	1,27 ± 0,14
citrate	0,76 ± 0,16	0,89 ± 0,18	1,09 ± 0,17	0,99 ± 0,15	1,0 ± 0,24	0,73 ± 0,09	1,02 ± 0,11	1,34 ± 0,26
2-oxo-gutarate	3,52 ± 0,82	2,28 ± 0,51	0,51 ± 0,12	1,31 ± 0,39	1,0 ± 0,31	0,93 ± 0,39	0,68 ± 0,22	0,45 ± 0,07
ethanolamine	1,07 ± 0,12	1,19 ± 0,10	1,21 ± 0,12	1,31 ± 0,13	1,0 ± 0,05	1,67 ± 0,35	1,39 ± 0,22	1,66 ± 0,17
3-hydroxy-pyruvate	9,30 ± 3,64	3,39 ± 1,18	1,11 ± 0,31	0,89 ± 0,16	1,0 ± 0,30	1,23 ± 0,29	1,89 ± 0,59	1,58 ± 0,53
homoserine	2,75 ± 0,56	1,79 ± 0,20	1,09 ± 0,21	1,16 ± 0,16	1,0 ± 0,12	1,39 ± 0,22	1,27 ± 0,13	1,17 ± 0,08
aspartate	2,14 ± 0,28	1,79 ± 0,27	0,88 ± 0,16	1,00 ± 0,17	1,0 ± 0,16	1,14 ± 0,15	0,98 ± 0,12	0,98 ± 0,23

Tabelle 8-2 Relative Metabolitgehalte mit GC/MS gemessen in PGLP-Antinsense- und Überexpressionslinien in LC

Blattmaterial wurde in der Mitte der Lichtperiode 1 Tag nach dem Transfer von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 (Boyes et al 2001), die unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%, HC) angezogen und auf LC (0,039% CO₂) umgesetzt wurden geerntet. Die gezeigten relativen steady-state Gehalte sind als Mittelwerte ± Stabw von fünf unabhängigen biologischen Replikaten angegeben. Fett gedruckte Werte weichen signifikant vom Wildtyp ab, basierend auf dem Student's t-test (p < 0,05).

Compound	<i>pglp1</i> rv to WT-HC	A1 rv to WT-HC	A8 rv to WT-HC	A2 rv to WT-HC	MoD_WT rv to WT-HC	O8 rv to WT-HC	O9 rv to WT-HC	O1 rv to WT-HC
alanine	2,76 ± 0,88	1,63 ± 0,23	0,27 ± 0,06	0,65 ± 0,25	0,36 ± 0,11	0,43 ± 0,14	0,41 ± 0,15	0,62 ± 0,26
alanine, beta	6,12 ± 0,78	3,76 ± 0,75	0,50 ± 0,09	0,83 ± 0,17	0,70 ± 0,20	0,54 ± 0,12	0,60 ± 0,07	0,51 ± 0,08
arginine	3,43 ± 0,75	3,53 ± 0,91	0,72 ± 0,18	0,40 ± 0,08	0,33 ± 0,04	0,63 ± 0,20	0,22 ± 0,03	0,40 ± 0,08
ascorbate	0,74 ± 0,11	1,25 ± 0,18	2,02 ± 0,65	1,13 ± 0,15	1,06 ± 0,09	1,86 ± 0,49	1,04 ± 0,13	1,47 ± 0,23
asparagine	3,22 ± 0,54	1,97 ± 0,60	0,45 ± 0,16	0,39 ± 0,09	0,60 ± 0,08	1,11 ± 0,36	0,23 ± 0,01	0,32 ± 0,05
butanoate, 4-amino	5,01 ± 0,95	4,65 ± 1,35	1,19 ± 0,23	1,26 ± 0,39	0,88 ± 0,15	1,05 ± 0,27	0,65 ± 0,10	1,25 ± 0,27

Anhang

dehydroascorbate	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,78 ± 0,20	0,71 ± 0,15	0,43 ± 0,16	0,15 ± 0,03	0,35 ± 0,11	1,32 ± 0,31
erythritol	3,82 ± 0,58	8,10 ± 1,24	1,65 ± 0,38	1,11 ± 0,22	0,90 ± 0,08	1,04 ± 0,24	0,76 ± 0,08	1,17 ± 0,21
fructose	0,68 ± 0,15	0,72 ± 0,17	0,79 ± 0,04	0,91 ± 0,20	0,57 ± 0,15	0,47 ± 0,12	0,69 ± 0,05	0,93 ± 0,11
fucose	0,86 ± 0,12	0,85 ± 0,13	1,12 ± 0,19	1,09 ± 0,12	0,86 ± 0,08	0,87 ± 0,20	0,85 ± 0,03	1,10 ± 0,14
fumarate	0,47 ± 0,29	0,97 ± 0,10	1,42 ± 0,14	1,26 ± 0,16	1,60 ± 0,16	1,21 ± 0,11	1,30 ± 0,04	1,18 ± 0,11
gaba	5,01 ± 0,95	4,65 ± 1,35	1,19 ± 0,23	1,26 ± 0,39	0,88 ± 0,15	1,05 ± 0,27	0,65 ± 0,10	1,25 ± 0,27
galactinol	0,71 ± 0,11	0,77 ± 0,10	1,68 ± 0,30	1,43 ± 0,09	1,39 ± 0,15	1,34 ± 0,23	1,49 ± 0,17	1,75 ± 0,16
glucose	0,42 ± 0,12	1,11 ± 0,39	3,67 ± 0,96	0,95 ± 0,41	0,25 ± 0,12	0,28 ± 0,10	0,65 ± 0,14	2,68 ± 1,65
glucose, 1,6-anhydro, beta	1,91 ± 0,42	2,01 ± 0,42	1,38 ± 0,20	1,41 ± 0,09	1,76 ± 0,34	1,92 ± 0,31	1,65 ± 0,08	1,43 ± 0,19
glutamate	0,73 ± 0,09	0,73 ± 0,14	0,88 ± 0,21	1,27 ± 0,25	1,32 ± 0,18	1,10 ± 0,08	1,03 ± 0,16	1,09 ± 0,11
glutamine	2,81 ± 0,60	1,74 ± 0,54	0,32 ± 0,08	0,45 ± 0,10	0,41 ± 0,07	0,31 ± 0,08	0,20 ± 0,05	0,27 ± 0,05
glycerate	1,09 ± 0,19	2,46 ± 0,31	4,21 ± 1,12	3,06 ± 0,63	2,77 ± 0,29	2,59 ± 0,77	2,33 ± 0,12	2,80 ± 0,33
glycerol	1,35 ± 0,29	1,22 ± 0,32	1,22 ± 0,18	1,56 ± 0,26	1,27 ± 0,28	0,76 ± 0,06	1,25 ± 0,34	1,67 ± 0,28
glycine	11,52 ± 1,50	16,72 ± 0,61	5,28 ± 2,16	1,84 ± 0,28	1,65 ± 0,33	1,58 ± 0,45	0,61 ± 0,05	0,71 ± 0,09
glycolate	39,25 ± 9,87	17,70 ± 2,56	3,80 ± 1,02	2,13 ± 0,15	1,99 ± 0,24	1,94 ± 0,27	2,01 ± 0,19	2,14 ± 0,24
guanidine	4,50 ± 1,02	1,55 ± 0,24	1,34 ± 0,19	2,65 ± 0,71	1,20 ± 0,48	1,40 ± 0,56	1,51 ± 0,17	1,49 ± 0,06
indole-3-acetonitrile	1,48 ± 0,19	2,10 ± 0,38	2,25 ± 0,34	1,41 ± 0,38	1,49 ± 0,29	1,27 ± 0,14	1,40 ± 0,15	1,87 ± 0,17
inositol, myo	1,00 ± 0,16	1,01 ± 0,18	1,92 ± 0,19	1,33 ± 0,30	1,38 ± 0,15	1,01 ± 0,19	1,38 ± 0,12	1,52 ± 0,12
isoleucine	7,28 ± 1,06	4,49 ± 0,71	1,02 ± 0,21	1,68 ± 0,49	0,94 ± 0,21	0,71 ± 0,11	1,03 ± 0,21	0,96 ± 0,09
isomaltose	6,43 ± 1,49	3,71 ± 0,96	6,44 ± 2,61	1,85 ± 0,63	0,89 ± 0,25	2,05 ± 0,93	1,90 ± 0,41	2,31 ± 0,36
itaconate	0,95 ± 0,14	0,66 ± 0,13	1,45 ± 0,14	1,48 ± 0,31	1,79 ± 0,35	1,45 ± 0,22	1,94 ± 0,17	1,69 ± 0,20
leucine	8,80 ± 1,16	5,05 ± 0,98	0,57 ± 0,08	1,67 ± 0,68	0,43 ± 0,08	0,46 ± 0,08	0,67 ± 0,19	0,71 ± 0,07
lysine	16,16 ± 1,49	7,90 ± 1,60	1,53 ± 0,28	1,88 ± 0,21	1,29 ± 0,22	1,22 ± 0,19	1,43 ± 0,18	1,84 ± 0,13
malate	1,40 ± 0,14	0,93 ± 0,09	1,12 ± 0,16	1,13 ± 0,15	1,30 ± 0,23	0,89 ± 0,12	0,89 ± 0,08	1,09 ± 0,14
maltitol	0,82 ± 0,13	1,59 ± 1,05	2,45 ± 0,66	1,03 ± 0,22	0,61 ± 0,14	0,81 ± 0,68	0,54 ± 0,10	1,16 ± 0,16
maltose	2,22 ± 0,37	5,03 ± 2,00	1,76 ± 0,49	1,11 ± 0,17	0,78 ± 0,12	0,50 ± 0,16	0,69 ± 0,04	1,37 ± 0,32
mannose	0,49 ± 0,13	0,65 ± 0,25	1,58 ± 0,35	1,36 ± 0,39	0,66 ± 0,21	0,40 ± 0,14	0,84 ± 0,08	1,44 ± 0,27
methionine	1,76 ± 0,57	1,49 ± 0,43	0,30 ± 0,06	0,56 ± 0,14	0,37 ± 0,07	0,40 ± 0,09	0,20 ± 0,03	0,34 ± 0,06

Anhang

nicotinate	0,74 ± 0,09	1,41 ± 0,13	1,71 ± 0,24	1,45 ± 0,12	1,52 ± 0,16	1,58 ± 0,06	1,75 ± 0,07	1,67 ± 0,09
octadecanoate	1,35 ± 0,12	1,38 ± 0,16	1,64 ± 0,33	1,01 ± 0,10	1,51 ± 0,26	1,18 ± 0,19	1,16 ± 0,20	1,20 ± 0,16
ornithine	5,59 ± 0,98	5,79 ± 1,68	1,24 ± 0,40	0,86 ± 0,28	0,61 ± 0,13	1,37 ± 0,30	0,27 ± 0,02	0,40 ± 0,09
proline	1,13 ± 0,33	0,95 ± 0,23	2,00 ± 0,64	2,07 ± 0,70	1,26 ± 0,55	0,86 ± 0,48	0,43 ± 0,16	0,73 ± 0,26
putrescine	2,51 ± 0,37	1,74 ± 0,29	1,45 ± 0,12	1,48 ± 0,25	1,02 ± 0,18	1,26 ± 0,23	0,74 ± 0,10	0,89 ± 0,18
pyruvate	0,46 ± 0,12	1,07 ± 0,15	1,52 ± 0,72	0,62 ± 0,13	0,58 ± 0,06	0,93 ± 0,53	0,30 ± 0,04	0,54 ± 0,08
raffinose	0,96 ± 0,27	0,52 ± 0,17	3,41 ± 0,46	2,13 ± 0,62	2,17 ± 0,48	1,06 ± 0,33	2,00 ± 0,14	2,76 ± 0,41
salicylate	1,27 ± 0,26	0,83 ± 0,17	1,24 ± 0,32	1,01 ± 0,13	0,90 ± 0,03	0,92 ± 0,23	0,86 ± 0,08	0,86 ± 0,06
serine	1,86 ± 0,18	2,01 ± 0,03	2,24 ± 0,34	2,10 ± 0,40	2,06 ± 0,19	1,64 ± 0,05	1,85 ± 0,10	1,86 ± 0,13
serine, o-acetyl	10,14 ± 0,72	31,28 ± 2,70	7,70 ± 4,35	1,01 ± 0,10	0,97 ± 0,09	1,05 ± 0,21	0,81 ± 0,05	1,22 ± 0,23
sorbose	0,23 ± 0,07	0,94 ± 0,33	0,62 ± 0,19	0,67 ± 0,26	0,18 ± 0,05	0,22 ± 0,08	0,30 ± 0,07	0,96 ± 0,46
spermidine	1,02 ± 0,09	1,09 ± 0,16	0,77 ± 0,08	1,00 ± 0,12	0,86 ± 0,23	0,79 ± 0,13	0,78 ± 0,09	1,12 ± 0,16
succinate	2,72 ± 0,17	2,17 ± 0,12	1,18 ± 0,33	0,73 ± 0,04	0,73 ± 0,06	0,60 ± 0,09	0,65 ± 0,06	0,74 ± 0,05
sucrose	1,32 ± 0,39	2,00 ± 0,46	1,10 ± 0,33	0,58 ± 0,18	0,60 ± 0,17	0,66 ± 0,25	0,36 ± 0,07	0,35 ± 0,10
threonate	1,50 ± 0,21	1,21 ± 0,18	1,71 ± 0,32	1,41 ± 0,25	2,09 ± 0,22	1,34 ± 0,32	1,96 ± 0,17	1,78 ± 0,16
threonine	2,47 ± 0,26	1,51 ± 0,25	1,13 ± 0,22	1,09 ± 0,10	1,28 ± 0,20	0,97 ± 0,19	0,92 ± 0,09	1,29 ± 0,17
trehalose	0,66 ± 0,16	0,83 ± 0,24	4,32 ± 0,85	1,41 ± 0,41	1,22 ± 0,28	1,37 ± 0,47	2,01 ± 0,48	2,20 ± 0,49
tryptophan	3,86 ± 1,19	3,95 ± 1,15	1,24 ± 0,36	1,35 ± 0,57	0,46 ± 0,13	0,86 ± 0,41	0,31 ± 0,08	0,43 ± 0,05
turanose	1,35 ± 0,25	2,72 ± 0,86	2,21 ± 0,71	1,11 ± 0,26	0,69 ± 0,12	0,56 ± 0,25	0,66 ± 0,09	1,29 ± 0,39
tyrosine	8,55 ± 0,62	8,22 ± 0,97	1,26 ± 0,39	0,89 ± 0,23	0,57 ± 0,10	0,45 ± 0,13	0,60 ± 0,07	0,86 ± 0,07
uracil	1,94 ± 0,41	1,59 ± 0,42	1,42 ± 0,30	1,66 ± 0,36	1,77 ± 0,39	1,79 ± 0,26	1,90 ± 0,18	1,61 ± 0,33
valine	3,91 ± 0,49	2,60 ± 0,34	0,83 ± 0,10	1,17 ± 0,30	0,85 ± 0,17	0,83 ± 0,23	0,75 ± 0,11	0,79 ± 0,05
xylose	1,08 ± 0,12	0,87 ± 0,14	1,72 ± 0,24	1,30 ± 0,18	0,88 ± 0,12	0,68 ± 0,07	1,10 ± 0,07	1,54 ± 0,24
citrate	1,02 ± 0,06	0,97 ± 0,16	1,49 ± 0,19	1,07 ± 0,18	1,03 ± 0,17	0,78 ± 0,19	1,00 ± 0,10	0,79 ± 0,21
2-oxo-gutarate	1,90 ± 0,55	1,98 ± 0,76	0,27 ± 0,05	0,39 ± 0,10	0,29 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,23 ± 0,03
ethanolamine	1,89 ± 0,22	2,02 ± 0,17	1,76 ± 0,21	1,32 ± 0,08	1,58 ± 0,10	1,52 ± 0,15	1,72 ± 0,20	2,08 ± 0,29
3-hydroxy-pyruvate	1,20 ± 0,30	1,59 ± 0,24	0,33 ± 0,09	0,79 ± 0,27	0,38 ± 0,11	0,45 ± 0,15	0,37 ± 0,19	0,64 ± 0,26
homoserine	5,29 ± 1,23	25,78 ± 2,50	5,30 ± 2,92	1,06 ± 0,15	0,95 ± 0,08	1,08 ± 0,20	0,77 ± 0,05	1,19 ± 0,19
aspartate	0,63 ± 0,08	0,60 ± 0,13	0,60 ± 0,16	0,79 ± 0,09	0,92 ± 0,11	0,70 ± 0,06	0,75 ± 0,12	0,82 ± 0,11

Anhang

Compound	<i>pglp1</i> rv to WT-LC	A1 rv to WT-LC	A8 rv to WT-LC	A2 rv to WT-LC	O8 rv to WT-LC	O9 rv to WT-LC	O1 rv to WT-LC
alanine	7,74 ± 2,46	4,57 ± 0,66	0,76 ± 0,18	1,83 ± 0,71	1,21 ± 0,38	1,15 ± 0,43	1,73 ± 0,73
alanine, beta	8,75 ± 1,12	5,37 ± 1,07	0,71 ± 0,12	1,19 ± 0,25	0,77 ± 0,18	0,86 ± 0,11	0,73 ± 0,11
arginine	10,46 ± 2,29	10,78 ± 2,78	2,19 ± 0,55	1,21 ± 0,24	1,93 ± 0,61	0,66 ± 0,09	1,21 ± 0,23
ascorbate	0,70 ± 0,10	1,18 ± 0,17	1,91 ± 0,62	1,07 ± 0,15	1,76 ± 0,46	0,99 ± 0,13	1,39 ± 0,22
asparagine	5,40 ± 0,91	3,30 ± 1,00	0,75 ± 0,27	0,65 ± 0,15	1,85 ± 0,60	0,39 ± 0,03	0,54 ± 0,08
butanoate, 4-amino	5,67 ± 1,07	5,26 ± 1,53	1,34 ± 0,27	1,43 ± 0,45	1,19 ± 0,30	0,74 ± 0,11	1,42 ± 0,30
dehydroascorbate	0,10 ± 0,03	0,16 ± 0,04	1,83 ± 0,48	1,68 ± 0,35	0,34 ± 0,06	0,83 ± 0,26	3,10 ± 0,73
erythritol	4,26 ± 0,64	9,03 ± 1,38	1,84 ± 0,42	1,23 ± 0,25	1,16 ± 0,27	0,84 ± 0,09	1,31 ± 0,24
fructose	1,20 ± 0,26	1,28 ± 0,30	1,40 ± 0,08	1,60 ± 0,36	0,83 ± 0,21	1,22 ± 0,09	1,64 ± 0,20
fucose	1,21 ± 0,12	1,10 ± 0,15	1,31 ± 0,22	1,37 ± 0,13	1,02 ± 0,23	1,00 ± 0,03	1,28 ± 0,16
fumarate	0,30 ± 0,18	0,61 ± 0,07	0,88 ± 0,08	0,79 ± 0,10	0,76 ± 0,07	0,81 ± 0,03	0,74 ± 0,07
gaba	5,67 ± 1,07	5,26 ± 1,53	1,34 ± 0,27	1,43 ± 0,45	1,19 ± 0,30	0,74 ± 0,11	1,42 ± 0,30
galactinol	0,51 ± 0,08	0,55 ± 0,07	1,21 ± 0,22	1,03 ± 0,06	0,97 ± 0,16	1,07 ± 0,12	1,26 ± 0,12
glucose	4,48 ± 0,21	10,57 ± 1,89	20,22 ± 4,02	10,47 ± 3,55	2,04 ± 0,72	3,81 ± 0,64	3,67 ± 0,93
glucose, 1,6-anhydro, beta	1,09 ± 0,24	1,14 ± 0,24	0,79 ± 0,12	0,80 ± 0,05	1,09 ± 0,18	0,94 ± 0,05	0,81 ± 0,11
glutamate	0,55 ± 0,06	0,55 ± 0,10	0,67 ± 0,16	0,96 ± 0,19	0,83 ± 0,06	0,78 ± 0,12	0,83 ± 0,09
glutamine	6,77 ± 1,44	4,21 ± 1,30	0,78 ± 0,18	1,10 ± 0,25	0,74 ± 0,19	0,49 ± 0,12	0,65 ± 0,11
glycerate	0,40 ± 0,07	0,89 ± 0,11	1,52 ± 0,41	1,11 ± 0,23	0,93 ± 0,28	0,84 ± 0,04	1,01 ± 0,12
glycerol	1,06 ± 0,22	0,96 ± 0,25	0,95 ± 0,14	1,22 ± 0,20	0,60 ± 0,05	0,98 ± 0,27	1,31 ± 0,22
glycine	7,00 ± 0,91	10,16 ± 0,37	3,20 ± 1,31	1,12 ± 0,17	0,96 ± 0,28	0,37 ± 0,03	0,43 ± 0,05
glycolate	19,72 ± 4,96	8,89 ± 1,29	1,91 ± 0,51	1,07 ± 0,08	0,97 ± 0,14	1,01 ± 0,10	1,08 ± 0,12
guanidine	3,74 ± 0,85	1,28 ± 0,20	1,12 ± 0,16	2,20 ± 0,59	1,16 ± 0,46	1,26 ± 0,14	1,24 ± 0,05
indole-3-acetonitrile	0,99 ± 0,13	1,41 ± 0,26	1,51 ± 0,23	0,95 ± 0,26	0,86 ± 0,10	0,94 ± 0,10	1,26 ± 0,12
inositol, myo	0,73 ± 0,11	0,73 ± 0,13	1,39 ± 0,14	0,97 ± 0,22	0,74 ± 0,14	1,01 ± 0,08	1,11 ± 0,09
isoleucine	7,71 ± 1,12	4,75 ± 0,75	1,08 ± 0,22	1,78 ± 0,52	0,75 ± 0,11	1,09 ± 0,22	1,01 ± 0,10

Anhang

isomaltose	7,26 ± 1,68	4,20 ± 1,09	7,28 ± 2,95	2,09 ± 0,71	2,32 ± 1,05	2,15 ± 0,46	2,61 ± 0,40
itaconate	0,53 ± 0,08	0,37 ± 0,07	0,81 ± 0,08	0,82 ± 0,17	0,81 ± 0,12	1,08 ± 0,09	0,94 ± 0,11
leucine	20,26 ± 2,67	11,63 ± 2,26	1,31 ± 0,18	3,84 ± 1,58	1,06 ± 0,19	1,54 ± 0,43	1,63 ± 0,16
lysine	12,55 ± 1,16	6,13 ± 1,25	1,19 ± 0,21	1,46 ± 0,17	0,95 ± 0,15	1,11 ± 0,14	1,43 ± 0,10
malate	1,08 ± 0,11	0,71 ± 0,07	0,86 ± 0,12	0,87 ± 0,12	0,68 ± 0,09	0,69 ± 0,06	0,84 ± 0,11
maltitol	1,34 ± 0,21	2,60 ± 1,72	4,00 ± 1,08	1,69 ± 0,36	1,32 ± 1,11	0,89 ± 0,16	1,90 ± 0,27
maltose	2,84 ± 0,47	6,43 ± 2,56	2,24 ± 0,63	1,42 ± 0,22	0,64 ± 0,20	0,89 ± 0,06	1,75 ± 0,41
mannose	0,75 ± 0,19	0,98 ± 0,38	2,39 ± 0,53	2,06 ± 0,59	0,60 ± 0,21	1,27 ± 0,12	2,18 ± 0,41
methionine	4,71 ± 1,53	3,99 ± 1,16	0,80 ± 0,17	1,50 ± 0,38	1,08 ± 0,24	0,53 ± 0,08	0,91 ± 0,15
nicotinate	0,49 ± 0,06	0,92 ± 0,08	1,12 ± 0,15	0,95 ± 0,08	1,04 ± 0,04	1,15 ± 0,05	1,10 ± 0,06
octadecanoate	0,89 ± 0,08	0,91 ± 0,11	1,09 ± 0,22	0,67 ± 0,07	0,78 ± 0,12	0,77 ± 0,14	0,80 ± 0,10
ornithine	9,14 ± 1,61	9,47 ± 2,75	2,03 ± 0,66	1,41 ± 0,45	2,23 ± 0,49	0,44 ± 0,04	0,66 ± 0,14
proline	0,89 ± 0,26	0,75 ± 0,18	1,58 ± 0,50	1,63 ± 0,55	0,68 ± 0,38	0,34 ± 0,13	0,58 ± 0,21
putrescine	2,45 ± 0,36	1,70 ± 0,29	1,41 ± 0,12	1,44 ± 0,25	1,23 ± 0,22	0,72 ± 0,10	0,87 ± 0,18
pyruvate	0,80 ± 0,20	1,85 ± 0,25	2,62 ± 1,24	1,08 ± 0,22	1,60 ± 0,92	0,52 ± 0,07	0,93 ± 0,14
raffinose	0,44 ± 0,13	0,24 ± 0,08	1,57 ± 0,21	0,98 ± 0,29	0,49 ± 0,15	0,92 ± 0,07	1,27 ± 0,19
salicylate	1,41 ± 0,29	0,91 ± 0,19	1,37 ± 0,35	1,12 ± 0,14	1,02 ± 0,25	0,95 ± 0,09	0,95 ± 0,07
serine	0,90 ± 0,09	0,98 ± 0,01	1,09 ± 0,17	1,02 ± 0,19	0,80 ± 0,02	0,90 ± 0,05	0,90 ± 0,06
serine, o-acetyl	10,50 ± 0,75	32,39 ± 2,79	7,97 ± 4,50	1,04 ± 0,10	1,08 ± 0,22	0,84 ± 0,05	1,26 ± 0,24
sorbose	1,28 ± 0,41	5,35 ± 1,85	3,54 ± 1,10	3,82 ± 1,48	1,22 ± 0,45	1,69 ± 0,39	5,44 ± 2,59
spermidine	1,19 ± 0,10	1,28 ± 0,19	0,90 ± 0,09	1,17 ± 0,14	0,92 ± 0,16	0,91 ± 0,10	1,30 ± 0,19
succinate	3,74 ± 0,23	2,99 ± 0,17	1,63 ± 0,45	1,01 ± 0,06	0,83 ± 0,12	0,90 ± 0,09	1,02 ± 0,07
sucrose	4,28 ± 0,66	4,66 ± 1,07	3,70 ± 0,46	1,36 ± 0,42	0,58 ± 0,18	0,70 ± 0,13	0,65 ± 0,25
threonate	0,72 ± 0,10	0,58 ± 0,09	0,82 ± 0,15	0,67 ± 0,12	0,64 ± 0,15	0,94 ± 0,08	0,85 ± 0,08
threonine	1,92 ± 0,21	1,18 ± 0,19	0,88 ± 0,17	0,85 ± 0,08	0,76 ± 0,14	0,72 ± 0,07	1,01 ± 0,13
trehalose	0,54 ± 0,13	0,68 ± 0,19	3,53 ± 0,69	1,15 ± 0,34	1,12 ± 0,39	1,64 ± 0,39	1,80 ± 0,40
tryptophan	8,47 ± 2,61	8,66 ± 2,53	2,72 ± 0,78	2,96 ± 1,25	1,89 ± 0,89	0,69 ± 0,18	0,93 ± 0,11
turanose	1,96 ± 0,36	3,95 ± 1,26	3,21 ± 1,03	1,62 ± 0,38	0,81 ± 0,36	0,96 ± 0,13	1,88 ± 0,57
tyrosine	14,94 ± 1,08	14,37 ± 1,70	2,21 ± 0,68	1,56 ± 0,41	0,78 ± 0,23	1,06 ± 0,13	1,50 ± 0,13

Anhang

uracil	1,10 ± 0,23	0,90 ± 0,24	0,80 ± 0,17	0,94 ± 0,20	1,01 ± 0,15	1,07 ± 0,10	0,91 ± 0,18
valine	4,63 ± 0,58	3,07 ± 0,40	0,98 ± 0,12	1,38 ± 0,35	0,98 ± 0,27	0,89 ± 0,13	0,93 ± 0,05
xylose	1,22 ± 0,14	0,99 ± 0,16	1,94 ± 0,28	1,47 ± 0,21	0,77 ± 0,08	1,25 ± 0,08	1,74 ± 0,27
citrate	1,00 ± 0,06	0,95 ± 0,15	1,45 ± 0,19	1,05 ± 0,17	0,76 ± 0,19	0,97 ± 0,10	0,77 ± 0,20
2-oxo-gutarate	6,64 ± 1,92	6,92 ± 2,65	0,95 ± 0,17	1,35 ± 0,35	0,80 ± 0,13	0,44 ± 0,06	0,79 ± 0,12
ethanolamine	1,20 ± 0,14	1,28 ± 0,11	1,11 ± 0,13	0,83 ± 0,05	0,96 ± 0,09	1,09 ± 0,13	1,32 ± 0,18
3-hydroxy-pyruvate	3,14 ± 0,79	4,16 ± 0,63	0,86 ± 0,23	2,07 ± 0,70	1,19 ± 0,38	0,97 ± 0,49	1,67 ± 0,68
homoserine	5,58 ± 1,29	27,22 ± 2,64	5,59 ± 3,08	1,12 ± 0,16	1,14 ± 0,21	0,82 ± 0,06	1,26 ± 0,20
aspartate	0,68 ± 0,09	0,65 ± 0,14	0,65 ± 0,17	0,85 ± 0,09	0,76 ± 0,07	0,82 ± 0,13	0,89 ± 0,12

Tabelle 8-3 Absolute Metabolitgehalte in pmol*mg⁻¹ FW gemessen mit LC/MS_MS in PGLP-Antinsense- und Überexpressionslinien in HC

Blattmaterial wurde zur Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 laut Boyes et al. (2001) unter erhöhten CO₂-Bedingungen (1%, HC) geerntet. Die gezeigten absoluten steady-state Gehalte sind in pmol*mg⁻¹ Frischmamsse angegeben. Werte sind Mittelwerte ± Stabw von vier unabhängigen biologischen Replikaten. Fett gedruckte Werte zeigen an, dass sie signifikant von der Wildtyp Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's t-test (* p < 0,05).

Compound	HC <i>pglp1</i> av	HC A1 av	HC A8 av	HC WT av	HC O9 av	HC O1 av
2PG	243,65 ± 22,67	11,10 ± 1,36	0,78 ± 0,05	0,43 ± 0,21	0,46 ± 0,06	0,64 ± 0,34
3PGA	296,43 ± 38,81	280,85 ± 30,73	345,05 ± 61,11	470,57 ± 47,99	315,38 ± 59,87	380,75 ± 68,28
glutamate	6171,75 ± 592,39	5022,32 ± 552,45	4426,83 ± 1693,49	3750,08 ± 964,37	4089,61 ± 690,06	4771,10 ± 842,81
aspartate	4607,53 ± 424,70	4514,57 ± 124,90	4260,02 ± 627,17	4566,33 ± 728,94	4171,84 ± 548,70	4609,05 ± 807,56
glycerate	214,97 ± 42,23	213,20 ± 60,52	272,42 ± 79,93	143,24 ± 30,15	174,44 ± 54,61	195,22 ± 9,95
G6P	182,93 ± 36,69	215,84 ± 19,08	248,37 ± 13,68	251,64 ± 51,97	243,37 ± 42,38	246,16 ± 35,90
R5P	2,98 ± 0,58	2,00 ± 0,38	2,81 ± 0,59	2,38 ± 0,78	3,35 ± 0,60	2,83 ± 0,12
F6P	84,62 ± 12,98	94,11 ± 6,28	123,46 ± 13,96	127,10 ± 12,05	122,37 ± 12,41	123,92 ± 12,94
G1P	26,52 ± 3,31	36,97 ± 4,01	29,61 ± 4,83	35,16 ± 3,46	30,17 ± 1,43	30,16 ± 5,88
Ru5P+X5P	20,13 ± 1,86	6,72 ± 0,78	11,32 ± 1,67	9,42 ± 2,06	11,56 ± 1,31	10,37 ± 1,41
DHAP	7,16 ± 0,90	7,31 ± 1,19	8,88 ± 2,63	7,83 ± 2,03	6,85 ± 1,23	9,10 ± 1,08
succinate	8449,87 ± 1441,79	4944,19 ± 774,10	3884,25 ± 841,96	2329,96 ± 234,53	2439,09 ± 595,83	3115,22 ± 472,67

Anhang

AMP	32,26 ± 2,22	26,34 ± 4,58	38,75 ± 7,39	35,18 ± 5,62	31,73 ± 3,16	33,49 ± 2,94
malate	32261,25 ± 6094,20	27905,60 ± 6544,63	40946,97 ± 15253,29	28479,16 ± 4625,51	32628,87 ± 3745,03	33464,81 ± 3948,77
2OG	430,69 ± 104,03	376,20 ± 108,12	213,98 ± 61,97	247,78 ± 68,68	254,30 ± 34,92	242,13 ± 58,41
UDPG	125,52 ± 23,32	92,61 ± 10,77	121,42 ± 10,98	117,77 ± 22,81	104,00 ± 9,51	111,26 ± 6,50
FBP	2,06 ± 0,45	2,56 ± 0,63	1,80 ± 0,34	2,70 ± 0,76	2,85 ± 1,02	2,62 ± 0,66
shikimate	53,26 ± 2,04	40,33 ± 3,91	52,66 ± 1,59	54,66 ± 3,82	50,82 ± 9,48	49,71 ± 4,85
S7P	25,55 ± 3,19	42,93 ± 6,99	76,93 ± 6,24	101,86 ± 16,04	76,50 ± 14,01	68,63 ± 8,24
NAD	35,52 ± 5,81	23,63 ± 3,87	34,60 ± 2,88	32,63 ± 3,21	28,78 ± 3,14	31,05 ± 0,99
SBP	2,18 ± 0,29	2,15 ± 0,19	0,89 ± 0,14	2,05 ± 0,61	1,56 ± 0,36	1,25 ± 0,21
ADPG	0,83 ± 0,28	0,74 ± 0,27	1,00 ± 0,51	1,26 ± 0,31	0,79 ± 0,17	0,89 ± 0,35
RuBP	11,00 ± 4,73	4,57 ± 0,68	3,49 ± 1,01	4,25 ± 0,71	6,05 ± 0,26	3,52 ± 0,85
NADP	4,02 ± 0,39	3,05 ± 0,76	4,89 ± 0,26	6,07 ± 0,69	4,82 ± 0,93	4,50 ± 0,78
ADP	11,57 ± 1,81	9,97 ± 1,09	9,85 ± 1,83	12,24 ± 1,02	8,85 ± 1,56	8,00 ± 1,70

Tabelle 8-4 Absolute Metabolit-Gehalte in pmol*mg⁻¹ FW gemessen mit LC/MS_MS in PGLP-Antinsense- und Überexpressionslinien in LC

Blattmaterial wurde zur Mitte der Lichtperiode von Pflanzen im Wachstumsstadium 5.1 laut Boyes *et al.* (2001) 1 Tag unter niedrigen CO₂-Bedingungen (0,039%, LC) geerntet. Die gezeigten absoluten steady-state Gehalte sind in pmol*mg⁻¹ Frischmasse angegeben. Werte sind Mittelwerte ± Stabw von vier unabhängigen biologischen Replikaten. Fett gedruckte Werte zeigen an, dass sie signifikant von der Wildtyp Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's t-test (* p < 0.05).

Compound	LC <i>pglp1</i> av	LC A1 av	LC A8 av	LC WT av	LC O9 av	LC O1 av
2PG	1112,35 ± 64,65	721,27 ± 135,61	473,92 ± 283,00	1,83 ± 0,23	0,71 ± 0,19	1,13 ± 0,30
3PGA	25,22 ± 18,49	48,92 ± 15,74	264,28 ± 24,67	247,39 ± 33,65	162,42 ± 38,16	171,40 ± 13,89
glutamate	1813,41 ± 329,35	2833,94 ± 630,16	2687,45 ± 711,36	5457,77 ± 319,69	4732,52 ± 1327,59	4352,10 ± 1282,05
aspartate	1522,01 ± 175,25	1629,27 ± 401,17	1637,18 ± 422,65	2330,20 ± 292,54	2555,01 ± 752,03	2139,49 ± 233,93
glycerate	58,44 ± 13,60	136,18 ± 27,02	326,36 ± 35,78	289,94 ± 61,63	228,81 ± 99,56	246,67 ± 61,68
G6P	84,51 ± 2,55	86,56 ± 8,54	202,02 ± 13,03	237,07 ± 42,64	173,41 ± 49,16	195,36 ± 28,92
R5P	2,61 ± 0,24	2,19 ± 0,35	4,54 ± 0,74	3,86 ± 0,92	4,72 ± 1,32	4,09 ± 0,56
F6P	35,51 ± 2,30	40,30 ± 3,99	103,14 ± 5,55	113,67 ± 22,20	81,03 ± 22,27	96,64 ± 15,27
G1P	16,91 ± 1,84	24,58 ± 5,58	23,49 ± 0,77	30,44 ± 3,75	22,26 ± 5,45	26,40 ± 1,87
Ru5P+X5P	20,56 ± 4,06	24,40 ± 6,87	38,46 ± 12,18	21,92 ± 5,75	35,31 ± 5,47	21,99 ± 3,16

Anhang

DHAP	10,02 ± 0,78	9,56 ± 0,88	32,87 ± 6,49	61,19 ± 7,51	38,25 ± 15,27	39,90 ± 5,36
succinate	7109,84 ± 1209,51	7970,72 ± 1600,94	2447,18 ± 1381,98	1351,27 ± 108,46	1676,20 ± 305,28	1674,37 ± 321,95
AMP	13,78 ± 1,24	17,82 ± 2,54	17,87 ± 1,92	16,98 ± 6,32	12,81 ± 2,10	11,84 ± 1,56
malate	16095,83 ± 3225,69	22624,24 ± 7062,41	30261,94 ± 11237,34	24878,07 ± 6375,89	33251,93 ± 5512,95	26358,22 ± 8098,38
2OG	148,64 ± 53,05	152,48 ± 48,96	183,76 ± 30,27	267,25 ± 29,36	268,60 ± 122,25	240,48 ± 31,69
UDPG	55,28 ± 4,36	48,86 ± 7,70	73,81 ± 8,45	100,15 ± 13,90	104,03 ± 22,91	99,96 ± 18,03
FBP	1,84 ± 0,38	2,44 ± 0,87	12,07 ± 0,63	22,18 ± 7,32	14,82 ± 8,06	18,49 ± 3,80
shikimate	51,76 ± 5,15	57,99 ± 15,06	66,91 ± 29,81	51,59 ± 8,78	36,80 ± 11,96	43,86 ± 12,49
S7P	2,82 ± 0,55	4,20 ± 0,86	36,30 ± 8,90	73,56 ± 13,41	39,37 ± 14,63	52,06 ± 14,59
NAD	37,87 ± 4,70	24,88 ± 6,84	26,51 ± 3,56	23,79 ± 2,38	23,88 ± 4,94	22,30 ± 3,74
SBP	1,21 ± 0,59	1,29 ± 0,99	8,28 ± 2,87	19,31 ± 10,87	11,06 ± 7,09	11,81 ± 4,22
ADPG	0,40 ± 0,09	0,20 ± 0,04	1,21 ± 0,56	2,21 ± 0,20	1,51 ± 0,77	1,67 ± 0,72
RuBP	5,18 ± 0,87	4,76 ± 1,52	18,09 ± 5,09	29,96 ± 3,84	28,12 ± 7,20	20,05 ± 3,96
NADP	2,39 ± 0,15	1,72 ± 0,48	4,06 ± 0,60	5,27 ± 1,44	4,26 ± 0,78	4,64 ± 0,52
ADP	10,60 ± 0,44	6,29 ± 1,27	8,12 ± 1,17	11,53 ± 0,75	8,06 ± 2,40	8,10 ± 1,66

Tabelle 8-5 Gaswechselparameter der PGLP-Überexpressoren unter Standardbedingung

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nach 7 Wochen Wachstum wurden die Pflanzen für Gaswechselmessungen am Licor 6400 eingesetzt. Werte sind Mittelwerte ± Stabw von fünf unabhängigen biologischen Replikaten.

	col.0	O8	O9	O1
A	10,91 ± 1,32	12,09 ± 1,24	11,69 ± 1,37	11,84 ± 1,79
Γ	64,59 ± 6,54	59,28 ± 8,01	66,69 ± 10,70	58,82 ± 9,54

Anhang

Tabelle 8-6 Gaswechselparameter der PGLP-Überexpressoren 1 Tag bei 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nach 7 Wochen Wachstum wurden die Pflanzen auf 30°C Tagestemperatur umgesetzt und nach einem Tag für Gaswechselmessungen am Licor 6400 eingesetzt. Werte sind Mittelwerte ± Stabw von fünf unabhängigen biologischen Replikaten.

	col.0	O8	O9	O1
A	4,96 ± 1,05	6,31 ± 0,46	6,33 ± 0,94	6,15 ± 1,01
Γ	95,98 ± 11,61	91,04 ± 8,38	82,44 ± 7,06	101,13 ± 7,91
ci	302,04 ± 21,23	291,55 ± 36,11	296,45 ± 11,66	303,21 ± 19,52
ci/ca	0,76 ± 0,05	0,74 ± 0,09	0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,05
gs	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,05
Tr	2,05 ± 0,50	2,34 ± 0,75	1,94 ± 0,49	2,17 ± 0,82

Tabelle 8-7 Gaswechselparameter der PGLP-Überexpressoren 7 Tagen bei 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nach 7 Wochen Wachstum wurden die Pflanzen auf 30°C Tagestemperatur umgesetzt und nach 7 Tagen für Gaswechselmessungen am Licor 6400 eingesetzt. Werte sind Mittelwerte ± Stabw von fünf unabhängigen biologischen Replikaten. Fett gedruckte Werte zeigen an, dass sie signifikant von der Wildtyp Kontrolle abweichen, basierend auf den Student's t-test (* p < 0,05).

	col.0	O8	O9	O1
A	5,13 ± 0,86	5,59 ± 1,43	6,03 ± 1,01	5,81 ± 1,23
Γ	99,69 ± 12,35	64,67 ± 15,87	77,98 ± 11,58	63,62 ± 15,56
ci	301,91 ± 12,04	338,24 ± 13,68	324,75 ± 16,74	338,89 ± 7,11
ci/ca	0,76 ± 0,03	0,85 ± 0,03	0,82 ± 0,04	0,86 ± 0,02
gs	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,20 ± 0,07
Tr	1,67 ± 0,28	2,27 ± 0,59	1,92 ± 0,33	2,96 ± 0,86

Anhang

Tabelle 8-8 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in PGLP-Überexpressionlinien bei Standardbedingungen

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nachdem die Pflanzen das Wachstumsstadium 5.1 erreicht hatten, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt. Davor wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Aminosäureanalysen mittels HPLC verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 4 unabhängigen, biologischen Replikaten. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's *t*-test (*p* < 0,05).

Aminosäure	Col. 0 MW	O8 MW	O9 MW	O1 MW
Aspartat	19,58 ± 5,06	19,15 ± 4,76	17,15 ± 5,52	20,14 ± 2,63
Glutamat	21,14 ± 3,46	24,95 ± 5,20	20,82 ± 8,70	25,07 ± 4,42
Asparagin	32,23 ± 13,61	17,64 ± 18,41	12,22 ± 8,95	29,95 ± 5,56
Serin	30,14 ± 12,53	28,16 ± 9,49	24,49 ± 5,84	24,51 ± 5,15
Glutamin	48,40 ± 9,73	57,09 ± 14,46	49,14 ± 16,05	59,96 ± 5,27
Glycin	5,39 ± 3,32	4,49 ± 1,76	4,77 ± 0,56	3,50 ± 1,14
Threonin	10,51 ± 2,48	10,97 ± 3,20	9,28 ± 2,84	10,51 ± 0,98
Histidin	3,77 ± 1,97	2,43 ± 0,63	2,11 ± 0,44	1,41 ± 0,36
Alanin	12,68 ± 2,15	9,13 ± 1,99	7,88 ± 1,53	9,23 ± 0,81
Arginin	1,50 ± 0,40	1,21 ± 0,29	0,90 ± 0,11	0,75 ± 0,24
Thyrosin	3,61 ± 2,13	2,29 ± 0,76	1,60 ± 0,72	1,12 ± 0,37
Valin	7,80 ± 1,59	7,59 ± 1,63	6,62 ± 0,32	6,84 ± 0,88
Methionin	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tryptophan	0,71 ± 0,33	0,28 ± 0,16	0,30 ± 0,06	0,31 ± 0,11
Phenylalanin	0,96 ± 0,61	0,69 ± 0,26	0,61 ± 0,18	0,52 ± 0,11
Isoleucin	0,89 ± 0,68	0,98 ± 0,32	0,90 ± 0,17	0,48 ± 0,13
Leucin	0,90 ± 0,72	0,94 ± 0,28	0,72 ± 0,16	0,48 ± 0,15
Lysin	0,52 ± 0,47	0,41 ± 0,22	0,33 ± 0,18	0,23 ± 0,08

Anhang

Tabelle 8-9 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in PGLP-Überexpressionslinien bei 1 Tag 25°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nachdem die Pflanzen das Wachstumsstadium 5.1 erreicht hatten, wurden sie zu 25°C Umgebungstemperatur überführt. Nach einem Tag der neuen Umgebung ausgesetzt, wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Aminosäureanalysen mittels HPLC verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 4 unabhängigen, biologischen Replikaten. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp der Standardbedinung abweichen, basierend auf dem Student's *t*-test (*p* < 0,05).

	Col.0	Col.0 25°C	O8 25°C	O9 25°C	O1 25°C
Aminosäure	MW	MW	MW	MW	MW
Aspartat	19,58 ± 5,06	15,47 ± 2,77	18,90 ± 5,82	20,98 ± 8,78	17,02 ± 5,53
Glutamat	21,14 ± 3,46	18,09 ± 2,85	21,46 ± 6,25	23,45 ± 8,65	20,07 ± 3,89
Asparagin	32,23 ± 13,61	26,68 ± 3,35	16,73 ± 11,75	26,10 ± 16,53	25,58 ± 3,82
Serin	30,14 ± 12,53	23,29 ± 3,15	25,34 ± 4,07	28,82 ± 10,52	21,58 ± 4,46
Glutamin	48,40 ± 9,73	32,05 ± 5,97	47,29 ± 9,31	49,98 ± 10,24	45,73 ± 7,93
Glycin	5,39 ± 3,32	4,84 ± 1,61	4,28 ± 1,07	7,62 ± 3,04	3,56 ± 0,99
Threonin	10,51 ± 2,48	8,25 ± 0,76	13,00 ± 3,20	13,03 ± 6,32	10,31 ± 2,98
Histidin	3,77 ± 1,97	2,58 ± 0,96	2,67 ± 0,64	3,30 ± 1,94	1,88 ± 0,39
Alanin	12,68 ± 2,15	10,27 ± 1,59	9,65 ± 1,63	10,96 ± 4,49	8,97 ± 1,19
Arginin	1,50 ± 0,40	0,80 ± 0,34	1,21 ± 0,31	1,24 ± 0,63	0,85 ± 0,21
Thyrosin	3,61 ± 2,13	2,25 ± 0,87	2,15 ± 0,73	2,29 ± 1,66	1,55 ± 0,18
Valin	7,80 ± 1,59	5,27 ± 0,99	7,05 ± 0,74	7,11 ± 0,96	6,36 ± 1,44
Methionin	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tryptophan	0,71 ± 0,33	0,35 ± 0,17	0,36 ± 0,14	0,41 ± 0,08	0,34 ± 0,10
Phenylalanin	0,96 ± 0,61	0,66 ± 0,26	0,71 ± 0,16	0,85 ± 0,51	0,61 ± 0,08
Isoleucin	0,89 ± 0,68	1,04 ± 0,36	0,97 ± 0,21	1,37 ± 0,93	0,73 ± 0,17
Leucin	0,90 ± 0,72	0,88 ± 0,35	0,86 ± 0,28	1,20 ± 0,74	0,60 ± 0,09
Lysin	0,52 ± 0,47	0,49 ± 0,24	0,43 ± 0,12	0,54 ± 0,43	0,30 ± 0,09

Anhang

Tabelle 8-10 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in PGLP-Überexpressionslinien bei Standardbedingungen

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nachdem die Pflanzen das Wachstumsstadium 5.1 erreicht hatten, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt. Davor wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Aminosäureanalysen mittels HPLC verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 4 unabhängigen, biologischen Replikaten. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte an, die signifikant vom Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's *t*-test (*p* < 0,05).

	Col.0	O8	O9	O1
Aminosäure	MW	MW	MW	MW
Aspartat	10,51 ± 1,39	14,38 ± 1,57	10,86 ± 2,62	11,67 ± 2,99
Glutamat	16,88 ± 3,89	24,63 ± 1,98	16,91 ± 2,72	16,45 ± 2,87
Asparagin	21,94 ± 4,45	20,03 ± 6,10	15,82 ± 5,58	23,66 ± 12,04
Serin	18,41 ± 5,10	17,40 ± 4,21	16,17 ± 2,24	13,03 ± 3,01
Glutamin	29,97 ± 6,79	47,35 ± 8,09	34,15 ± 8,39	37,73 ± 8,33
Glycin	3,88 ± 0,98	4,76 ± 2,11	4,41 ± 0,99	3,61 ± 0,92
Threonin	8,39 ± 1,11	11,66 ± 2,18	7,82 ± 1,06	7,58 ± 1,92
Histidin	0,66 ± 0,28	0,90 ± 0,23	0,98 ± 0,18	0,77 ± 0,30
Alanin	7,82 ± 1,26	7,79 ± 1,12	6,18 ± 1,29	6,08 ± 1,37
Arginin	0,45 ± 0,10	0,78 ± 0,18	0,63 ± 0,18	0,67 ± 0,20
Thyrosin	0,88 ± 0,22	1,19 ± 0,54	1,34 ± 0,42	1,09 ± 0,19
Valin	1,41 ± 0,20	3,99 ± 2,16	2,34 ± 1,01	1,42 ± 0,34
Methionin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tryptophan	0,25 ± 0,08	0,35 ± 0,16	0,29 ± 0,12	0,35 ± 0,14
Phenylalanin	0,31 ± 0,06	0,44 ± 0,07	0,40 ± 0,11	0,36 ± 0,07
Isoleucin	0,34 ± 0,09	0,41 ± 0,13	0,41 ± 0,13	0,33 ± 0,12
Leucin	0,38 ± 0,12	0,43 ± 0,22	0,51 ± 0,12	0,34 ± 0,14
Lysin	0,22 ± 0,10	0,14 ± 0,05	0,15 ± 0,06	0,13 ± 0,05

Anhang

Tabelle 8-11 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in PGLP-Überexpressionslinien bei 1 Tag 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nachdem die Pflanzen das Wachstumsstadium 5.1 erreicht hatten, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt. Nach einem Tag der neuen Umgebung ausgesetzt, wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Aminosäureanalysen mittels HPLC verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 4 unabhängigen, biologischen Replikaten. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte an, die signifikant vom gleichbehandelten Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's *t*-test (*p* < 0,05). Die fett gedruckten Werte des Wildtyps beziehen sich auf den Wildtyp unter Standardbedingung.

	Col. 0	O8	O9	O1
Aminosäure	MW	MW	MW	MW
Aspartat	3,26 ± 0,82	3,55 ± 0,56	4,32 ± 0,81	3,70 ± 0,39
Glutamat	18,54 ± 5,60	18,73 ± 3,01	19,88 ± 3,68	15,89 ± 1,94
Asparagin	23,47 ± 5,70	15,02 ± 7,10	26,06 ± 4,41	4,67 ± 0,72
Serin	17,61 ± 4,35	19,76 ± 5,16	22,65 ± 3,34	16,94 ± 16,94
Glutamin	15,05 ± 4,83	14,16 ± 1,58	19,24 ± 1,44	18,35 ± 3,35
Glycin	0,58 ± 0,26	0,47 ± 0,12	0,66 ± 0,13	0,51 ± 0,16
Threonin	6,27 ± 1,26	6,13 ± 1,01	6,72 ± 0,89	5,55 ± 0,82
Histidin	1,13 ± 0,35	0,93 ± 0,36	1,24 ± 0,23	0,76 ± 0,22
Alanin	2,87 ± 0,81	3,04 ± 0,75	3,99 ± 0,55	4,24 ± 0,69
Arginin	0,91 ± 0,17	0,55 ± 0,23	0,83 ± 0,18	0,45 ± 0,09
Thyrosin	1,38 ± 0,42	1,64 ± 0,91	1,83 ± 0,62	0,73 ± 0,18
Valin	3,08 ± 0,45	2,65 ± 1,12	3,06 ± 0,46	1,57 ± 0,52
Methionin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tryptophan	0,34 ± 0,18	0,41 ± 0,27	0,76 ± 0,19	0,25 ± 0,15
Phenylalanin	0,42 ± 0,13	0,53 ± 0,27	0,53 ± 0,18	0,29
Isoleucin	0,38 ± 0,20	0,54 ± 0,27	0,54 ± 0,18	0,19 ± 0,04
Leucin	0,71 ± 0,39	0,91 ± 0,55	0,81 ± 0,43	0,20 ± 0,09
Lysin	0,51 ± 0,30	0,38 ± 0,22	0,50 ± 0,22	0,18 ± 0,07

Anhang

Tabelle 8-12 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in PGLP-Überexpressionslinien bei 3 Tagen 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nachdem die Pflanzen das Wachstumsstadium 5.1 erreicht hatten, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt. Nach 3 Tagen der neuen Umgebung ausgesetzt, wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Aminosäureanalysen mittels HPLC verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 4 unabhängigen, biologischen Replikaten. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte an, die signifikant vom gleichbehandelten Wildtyp abweichen basierend auf dem Student's *t*-test (*p* < 0,05).

	Col.0	O8	O9	O1
Aminosäure	MW	MW	MW	MW
Aspartat	6,60 ± 1,56	8,32 ± 1,35	6,52 ± 0,12	6,20 ± 0,90
Glutamat	19,69 ± 4,28	23,23 ± 2,76	25,87 ± 5,34	23,03 ± 4,07
Asparagin	17,76 ± 8,99	34,25 ± 4,42	30,21 ± 7,26	16,02 ± 12,06
Serin	20,22 ± 4,80	26,31 ± 5,53	20,62 ± 3,17	16,79 ± 5,10
Glutamin	17,62 ± 1,04	11,61 ± 2,94	12,47 ± 3,44	11,36 ± 2,09
Glycin	1,61 ± 0,32	3,03 ± 0,23	2,02 ± 0,73	1,43 ± 0,20
Threonin	6,88 ± 1,47	7,31 ± 0,32	7,15 ± 1,06	5,88 ± 0,85
Histidin	1,68 ± 0,54	2,15 ± 0,45	2,29 ± 0,65	1,28 ± 0,49
Alanin	7,04 ± 1,40	5,61 ± 1,03	4,59 ± 0,47	4,71 ± 1,40
Arginin	0,81 ± 0,25	1,89 ± 0,50	1,12 ± 0,29	1,69 ± 0,52
Thyrosin	1,91 ± 0,54	3,12 ± 0,52	2,82 ± 1,41	2,04 ± 0,90
Valin	2,65 ± 0,83	5,66 ± 0,65	3,23 ± 1,15	2,93 ± 0,85
Methionin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tryptophan	0,34 ± 0,10	0,77 ± 0,09	0,57 ± 0,05	0,40 ± 0,11
Phenylalanin	0,47 ± 0,09	1,10 ± 0,13	0,54 ± 0,21	0,74 ± 0,23
Isoleucin	0,63 ± 0,18	1,40 ± 0,21	0,90 ± 0,49	0,94 ± 0,58
Leucin	0,70 ± 0,24	1,61 ± 0,30	0,91 ± 0,49	1,00 ± 0,51
Lysin	0,39 ± 0,20	0,66 ± 0,30	0,54 ± 0,22	0,86 ± 0,19

Anhang

Tabelle 8-13 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in PGLP-Überexpressionslinien bei 7 Tagen 30°C

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht-Rhythmus; 0,039% CO₂; 20/18°C Tag/Nacht. Nachdem die Pflanzen das Wachstumsstadium 5.1 erreicht hatten, wurden sie zu 30°C Umgebungstemperatur überführt. Nach 7 Tagen der neuen Umgebung ausgesetzt, wurde Blattmaterial zum Ende der Lichtperiode genommen und für Aminosäureanalysen mittels HPLC verarbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 4 unabhängigen, biologischen Replikaten. Fett gedruckte Zahlen zeigen Werte an, die signifikant vom gleichbehandelten Wildtyp abweichen, basierend auf dem Student's *t*-test (*p* < 0,05).

	Col.0	O8	O9	O1
Aminosäure	MW	MW	MW	MW
Aspartat	6,68 ± 2,17	5,42 ± 1,01	6,88 ± 0,77	4,91 ± 0,52
Glutamat	15,51 ± 4,68	16,41 ± 3,26	16,14 ± 2,98	16,31 ± 0,91
Asparagin	19,20 ± 6,62	26,33 ± 7,51	19,85 ± 4,53	23,71 ± 0,92
Serin	15,43 ± 1,88	12,08 ± 1,10	15,26 ± 3,08	11,60 ± 1,11
Glutamin	12,25 ± 3,99	10,85 ± 1,61	13,35 ± 2,11	7,78 ± 0,45
Glycin	1,30 ± 0,30	0,64 ± 0,09	0,70 ± 0,20	0,89 ± 0,16
Threonin	6,17 ± 0,98	6,05 ± 0,91	6,70 ± 0,94	5,43 ± 0,35
Histidin	0,91 ± 0,45	1,13 ± 0,42	0,82 ± 0,35	1,38 ± 0,41
Alanin	4,06 ± 0,98	2,42 ± 1,18	2,78 ± 0,56	3,46 ± 0,98
Arginin	0,68 ± 0,44	0,92 ± 0,62	0,34 ± 0,13	1,83 ± 0,43
Thyrosin	1,17 ± 0,68	2,37 ± 0,77	0,86 ± 0,35	1,99 ± 0,37
Valin	3,15 ± 1,04	4,36 ± 0,38	2,06 ± 0,84	3,45 ± 0,26
Methionin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tryptophan	0,58 ± 0,34	1,08 ± 0,45	0,28 ± 0,10	1,06 ± 0,13
Phenylalanin	0,33 ± 0,18	0,99 ± 0,13	0,46 ± 0,28	0,83 ± 0,24
Isoleucin	0,45 ± 0,28	1,11 ± 0,04	0,31 ± 0,13	0,89 ± 0,18
Leucin	0,36 ± 0,31	1,21 ± 0,26	0,39 ± 0,24	1,03 ± 0,20
Lysin	0,28 ± 0,11	0,29 ± 0,12	0,16 ± 0,05	0,47 ± 0,07

Anhang

Tabelle 8-14 Gaswechselparameter der PGLP Überexpressoren nach 9 Tagen Wassermangel

Pflanzenanzucht erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen mit 10/14 h Tag/Nacht Rhythmus; 20°C/18°C Tag/Nacht und 0,039% CO₂. Nachdem die Pflanzen 7 Wochen alt waren, wurden sie dem Wassermangel ausgesetzt und an mehreren Tagen für PAM- und Gaswechselmessungen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw von mindestens 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Fett gedruckte Werte weichen signifikant vom Wildtyp ab, basierend auf dem Student's Ttest (p < 0,05)

	col. 0	O8	O9	O1
A	8,33 ± 0,67	10,84 ± 2,27	10,84 ± 2,07	11,22 ± 1,60
Γ	77,50 ± 8,98	72,23 ± 9,56	71,31 ± 4,10	69,44 ± 5,28
ci	292,24 ± 9,83	295,26 ± 19,40	286,19 ± 15,06	283,93 ± 15,18
ci/ca	0,74 ± 0,02	0,75 ± 0,05	0,73 ± 0,04	0,72 ± 0,04
gs	0,14 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,05
Tr	2,43 ± 0,19	3,22 ± 0,29	2,95 ± 0,58	3,04 ± 0,62

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Schema des pflanzlichen C2-Zyklus	7
Abbildung 5-1 Schematischer Überblick vom <i>PGLP</i> -Komplementationskonstrukt	36
Abbildung 5-2 Verifizierung des <i>PGLP</i> -Komplementationskonstrukts	36
Abbildung 5-3 Genetische Komplementation von der <i>Arabidopsis</i> <i>pgl/p1</i> -Mutante	37
Abbildung 5-4 Schematischer Überblick des Antisense-Konstruktes	38
Abbildung 5-5 Verifizierung des <i>PGLP</i> -Antisense-Konstrukts	38
Abbildung 5-6 <i>PGLP</i> -Expression in Antisenselinien	39
Abbildung 5-7 Schematischer Überblick des Überexpressions-Konstrukts	39
Abbildung 5-8 Verifizierung des <i>PGLP</i> -Überexpressions-Konstrukts	40
Abbildung 5-9 <i>PGLP</i> -Expression in Überexpressionslinien	40
Abbildung 5-10 <i>PGLP</i> -Expression und -Aktivität in Antisense- und Überexpressionslinien	41
Abbildung 5-11 steady-state Gehalt von 2-PG in <i>PGLP</i> -Linien in HC und LC	42
Abbildung 5-12 Phänotyp der <i>PGLP</i> -Antisense- und Überexpressionslinien	43
Abbildung 5-13 Chlorophyll a Fluoreszenz der <i>PGLP</i> -Antisenselinien	46
Abbildung 5-14 Gaswechsel-Parameter der <i>PGLP</i> -Antisenselinien	47
Abbildung 5-15 Chlorophyll a Fluoreszenz der <i>PGLP</i> -Überexpressoren	49
Abbildung 5-16 Metabolitmengen der <i>PGLP</i> -Linien in HC	52
Abbildung 5-17 Metabolitmengen von <i>PGLP</i> -Linien in LC	54
Abbildung 5-18 Das Ausschalten von <i>PGLP</i> hat einen Phänotyp mit Anzeichen einer stärkefreien Mutante zur Folge	56
Abbildung 5-19 Stärkegehalte in den <i>PGLP</i> -Linien unter HC und LC	57
Abbildung 5-20 Biosyntheseraten in $\mu\text{mol C}_6 \text{ g}^{-1} \text{ FM h}^{-1}$ in <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien in LC	58
Abbildung 5-21 Expressionsmuster von PGM, PGI und TPI Transkripten und Aktivitäten von rekombinanten Enzymen mit 2-PG als potentiellen Inhibitor	59
Abbildung 5-22 Absolute Konzentrationen von Intermediaten aus dem CBZ, Saccharose- und Stärkesynthese in den <i>PGLP</i> -Linien bei HC	61
Abbildung 5-23 Absolute Konzentrationen von Intermediaten aus dem CBZ, der Saccharose- und Stärkesynthese in <i>PGLP</i> -Linien in Normalluft	63
Abbildung 5-24 Phänotyp der <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien als Antwort auf 30°C Tagestemperatur	65
Abbildung 5-25 Gaswechsel-Parameter der <i>PGLP</i> -Überexpressoren nach 7 Tagen bei 30°C	66
Abbildung 5-26 Stärkegehalte in <i>PGLP</i> -Überexpressoren bei 30°C	67
Abbildung 5-27 Glutamin- und Arginingehalt in <i>PGLP</i> -Überexpressoren bei 30°C	68

Anhang

Abbildung 5-28 Phänotyp der <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien als Antwort auf Wassermangel	70
Abbildung 5-29 Chlorophyll a Fluoreszenz der <i>PGLP</i> -Überexpressoren bei Wassermangel	71
Abbildung 5-30 Gaswechselparameter der <i>PGLP</i> -Überexpressoren bei Wassermangel	72
Abbildung 8-1 Expressionsmuster von SBP Transkripten	98

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Bakterienstämme zur Transformation.....	14
Tabelle 3-2 Verwendete Reaktionskits	14
Tabelle 3-3 Verwendete Enzyme	14
Tabelle 3-4 Verwendete Größenstandards für Elektrophoresen und Chromatografien.....	15
Tabelle 3-5 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	15
Tabelle 3-6 Übersicht der verwendeten Vektoren	17
Tabelle 3-7 Übersicht der Rekombinanten Vektoren.....	17
Tabelle 4-1 Übersicht der Vektorresistenzen und deren eingesetzte Konzentrationen	18
Tabelle 4-2 PCR-Programm für alle PCR-Reaktionen (NL58var).....	21
Tabelle 4-3 Zusammensetzung der ECL-Lösung I	27
Tabelle 4-4 Zusammensetzung der ECL-Lösung II	27
Tabelle 5-1 Quantitative Wachstumsparameter der <i>PGLP</i> -Überexpressoren in Normalluft	44
Tabelle 5-2 Gaswechselparameter von <i>PGLP</i> -Antisenselinien während CO ₂ -Veränderung.....	48
Tabelle 5-3 Gaswechselparameter von <i>PGLP</i> -Überexpressoren in Normalluft.....	50
Tabelle 5-4 Angaben zum intrazellulären Kohlenstoffgehalt nach 7 Tagen bei 30°C Tagestemperatur in den <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien.....	66
Tabelle 5-5 Angaben zur stomatären Leitfähigkeit und Transpiration in den <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien 13 Tage ohne Wasserzufuhr.....	72
Tabelle 8-1 Relative Metabolitgehalte gemessen mit GC/MS in <i>PGLP</i> -Antinsense- und Überexpressionlinien in HC.....	99
Tabelle 8-2 Relative Metabolitgehalte mit GC/MS gemessen in <i>PGLP</i> -Antinsense- und Überexpressionslinien in LC	101
Tabelle 8-3 Absolute Metabolitgehalte in pmol*mg ⁻¹ FW gemessen mit LC/MS_MS in <i>PGLP</i> -Antinsense- und Überexpressionslinien in HC	106
Tabelle 8-4 Absolute Metabolit-Gehalte in pmol*mg ⁻¹ FW gemessen mit LC/MS_MS in <i>PGLP</i> -Antinsense- und Überexpressionslinien in LC	107
Tabelle 8-5 Gaswechselparameter der <i>PGLP</i> -Überexpressoren unter Standardbedingung	108
Tabelle 8-6 Gaswechselparameter der <i>PGLP</i> -Überexpressoren 1 Tag bei 30°C.....	109
Tabelle 8-7 Gaswechselparameter der <i>PGLP</i> -Überexpressoren 7 Tagen bei 30°C.....	109
Tabelle 8-8 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in <i>PGLP</i> -Überexpressionlinien bei Standardbedingungen	110

Anhang

Tabelle 8-9 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien bei 1 Tag 25°C.....	111
Tabelle 8-10 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien bei Standardbedingungen	112
Tabelle 8-11 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien bei 1 Tag 30°C.....	113
Tabelle 8-12 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien bei 3 Tagen 30°C.....	114
Tabelle 8-13 Absolute Aminosäuregehalte im Blatt in µmol/gFW gemessen mit HPLC in <i>PGLP</i> -Überexpressionslinien bei 7 Tagen 30°C.....	115
Tabelle 8-14 Gaswechselparameter der <i>PGLP</i> Überexpressoren nach 9 Tagen Wassermangel.....	116

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2-PG	2-Phosphoglykolat
3-PGA	3-Phosphoglycerat
3-HP	Hydroxypyruvat
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Γ	CO ₂ compensation point
Γ*	CO ₂ compensation point in the absence of dark respiration
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
A	Aqua
A	net CO ₂ uptake
ADP	Adenosindiphosphat
ADPG	ADP-Glukose
AGT	Alanin:Glyoxylat:Aminotransferase
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderalbumin)
C	Kohlenstoff
Ca ²⁺	Calzium Ion
CAT	Katalase
CBC	Calvin-Benson-Cycle
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
Chl	Chlorophyll
Cl	Chloroform/Isoamylalkohol
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col. 0	Columbia 0
CTAB	N-Cetyl-N,N,N,Trimethylammoniumbromid
Da	Dalton
dest.	Destilliert
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Anhang

DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein
E	Extinktion
EC	Enzyme Commission Number
ECL	Emmission Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
<i>et al.</i>	Et alteri = und andere
F6P	Fruktose-6-Phosphat
FBP	Fruktose-1,6-Bisphosphat
Fd	Ferredoxin
FMN	Flavinmononukleotid
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G1P	Glukose-1-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GDC	Glycindecarboxylase
GGAT	Glyoxylat:Glutamat-Aminotransferase
GGT	Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase
Glx	Glyoxylat
Glyk	Glyceratkinaise
g _m	Leitfähigkeit Mesophyll
GOGAT	Glutamin: Oxoglutarat-Aminotransferase
GOX	Glykolatoxidase
g _s	Leitfähigkeit Stoma
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
HC	high Carbon
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Anhang

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPR	Hydroxypyruvatreduktase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo (10^3)
l	Liter
LB	left border
LB	Luria Bertani (Medium)
LC	low carbon, Normalluft
LC – MS/MS	Liquid Chromatographie Massenspektometrie/Massenspektometrie
LCF	Leaf chamber Fluorometer
m	Meter
m^2	Quadratmeter
M	Mol pro Liter (molar)
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV-RT	Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus
MoD	Mitte des Tages
mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
mRNA	messenger (Boten-) RNA
MS	Murashige und Skoog (Medium)
Ni-NTA	Nickel-Trinitroessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamiddinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamiddinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamiddinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamiddinucleotidphosphat, reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
NH_3	Ammoniak
NTP	Nukleosidtriphosphat
O_2	Sauerstoff
OD	optische Dichte
Pi	inorganisches Phosphat
PAR	photosynthetisch aktive Photonen-Flux-Dichte

Anhang

PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGI	Phosphoglucoisomerase
PGLP	Phosphoglykolatphosphatase
PGM	Phosphoglucomutase
PR	Photorespiration
PS	Photosynthese
PUR	Pflanzenphysiologie Universität Rostock
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion
Rn	dark respiration
Rd	day respiration
RB	right border
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Spezies (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
R5P	Ribose-5-phosphat
Ru5P	Ribulose – 5-phosphat
s	Sekunde
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
SBP	Sedoheptulose-1,7-bisphosphat
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGAT	Serin: Glyoxylat-Aminotransferase
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TE	Tris-EDTA
THF	Tetrahydrofuran
T-DNA	Transfer-DNA
TPI	Triosephosphatisomerase
Tr	Transpirationsrate
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Anhang

U	Unit
UDPG	Uridindiphosphat-Glukose
UV	Ultraviolet
ÜN	Übernacht
V	Volt
V	Volumen
VT	Volumenteile
v/v	volume/volume
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
X5P	Xylulose-5-Phosphat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YEB	yeast extract broth
z.B.	zum Beispiel