

Die Expression des photorespiratorischen Gens
2-Phosphoglycolat-Phosphatase im Genus *Flaveria*
und die Folgen einer beeinträchtigten
Photorespiration für die C4-Pflanze
Flaveria bidentis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Myles Levey

aus Mönchengladbach

Mönchengladbach, Oktober 2016

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Peter Westhoff
Koreferent: Prof. Dr. Andreas Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2017

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation habe ich in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Mönchengladbach, den 11.10.2016

Inhaltsverzeichnis

I	Allgemeine Einleitung	1
I.1	Die zwei Seiten des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase	1
I.2	Die Photorespiration	4
I.2.1	Die Photorespiration in Pflanzen und Armleuchteralgen	4
I.2.2	Die Photorespiration in Cyanobakterien und Grünalgen der Gruppe <i>Chlorophyceae</i>	7
I.2.3	Mutanten der Photorespiration	7
I.3	Anpassungen an die Photorespiration	9
I.3.1	CO ₂ -Anreicherung durch Carboxysome und Pyrenoide	9
I.3.2	CO ₂ -Anreicherung in Pflanzen durch CAM-, C ₄ - und C ₂ -Photosynthese	10
I.4	Die Evolution der C ₄ -Photosynthese	15
I.4.1	Die C ₄ -Photosynthese hat einen polyphyletischen Ursprung	15
I.4.2	Der selektive Druck, der die Evolution der C ₄ -Photosynthese ermöglichte	15
I.4.3	Voraussetzungen für die Evolution der C ₄ -Photosynthese	16
I.4.4	Die schrittweise Evolution der C ₄ -Photosynthese	18
I.5	Das Genus <i>Flaveria</i> als Modell für die Evolution der C ₄ -Photosynthese	21
II	Ziele der Arbeit	22
III	Thesen	24
IV.a	Zusammenfassung	26
IV.b	Summary	28
V	Literaturverzeichnis	30
VI	Manuskripte	38
	a) Die Expression des photorespiratorischen Gens <i>2-Phosphoglycolat-Phosphatase</i> im Genus <i>Flaveria</i>	38
	b) The reduction of the photorespiratory enzyme 2-phosphoglycolate phosphatase (PGLP) in the C ₄ plant <i>Flaveria bidentis</i> and its consequence	74
VII	Addendum	103
VIII	Danksagung	115
IX	Referenzen und Koautoren	116

I Einleitung

I.1 Die zwei Seiten des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) ist das häufigste Protein auf der Erde (Ellis 1979). Es kann in den Blättern photosynthetisch aktiver Pflanzen bis zu 50 % des gesamten Blatt-Proteins ausmachen (Hartman and Harpel 1994; Parry et al. 2003). Dabei wird so viel Enzym benötigt, weil RubisCO eine sehr langsame Umsatzrate besitzt und es daher entsprechend vieler Enzymmoleküle bedarf, um nennenswerte CO₂-Mengen zu fixieren (Andrews and Lorimer 1987; Hartman and Harpel 1994; Lorimer et al. 1986). Insgesamt können drei Formen der RubisCO unterschieden werden (Hanson and Tabita 2001). Die am weitesten verbreitete Form, welche in Cyanobakterien, höheren Pflanzen und Algen vorkommt, besteht aus jeweils acht großen und acht kleinen Untereinheiten (Knight et al. 1990; Tabita 1999). In Eukaryoten wird die kleine Untereinheit im Kerngenom kodiert, während sich die Gene der großen Untereinheit im Chloroplastengenom befinden (Gutteridge and Gatenby 1995; Rodermeil 1999). Diese Aufteilung der RubisCO-Gene ist eine Folge der Endosymbiose, in deren Verlauf der Chloroplast aus cyanobakteriellen Vorläufern entstanden ist. In diesem hatte sich RubisCO wahrscheinlich vor ca. 3 Milliarden Jahren aus den sogenannten „RubisCO-like-Proteins“ entwickelt, welche noch heute existieren und eine Funktion im Schwefelmetabolismus verschiedener Prokaryoten haben (Ashida et al. 2005; Keeling 2013; Nisbet et al. 2007).

RubisCO ist in der Lage zwei verschiedene Reaktionen zu katalysieren. Dies sind zum einen die Carboxylierung und zum anderen die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP). Da der K_M der RubisCO für CO₂ etwa 40- bis 50-fach niedriger ist als für O₂, kann die Carboxylierung als die Hauptreaktion angesehen werden (Jordan and Ogren 1981; Tcherkez et al. 2006). Sowohl die Carboxylierung als auch die Oxygenierung beginnen mit der Bindung von RuBP, in seiner 2,3-Endiol-Form, an RubisCO (Abb. 1). Durch die Carboxylierung dieser 2,3-Endiol-Form zu β -Ketoacid und der folgenden Hydratisierung zerfällt das entstehende Molekül in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3-PGA). Dieses wird anschließend über den Calvin-Benson-Zyklus für die Bildung von Kohlenhydraten verwendet. Die Oxygenierung der 2,3-Endiol-Form mit anschließender Hydratisierung hat hingegen ein Molekül 3-PGA und ein Molekül

2-Phosphoglycolat (2-PG) zur Folge (Bowes et al. 1971; Tcherkez 2013). 2-PG wirkt toxisch, da es mit der Phosphofructo-Kinase und der Triosephosphat-Isomerase zwei entscheidende Enzyme des Metabolismus hemmt (Anderson 1971; Kelly and Latzko 1976). Um diese Hemmung zu verhindern, wird gebildetes 2-PG im Rahmen der Photorespiration entfernt.

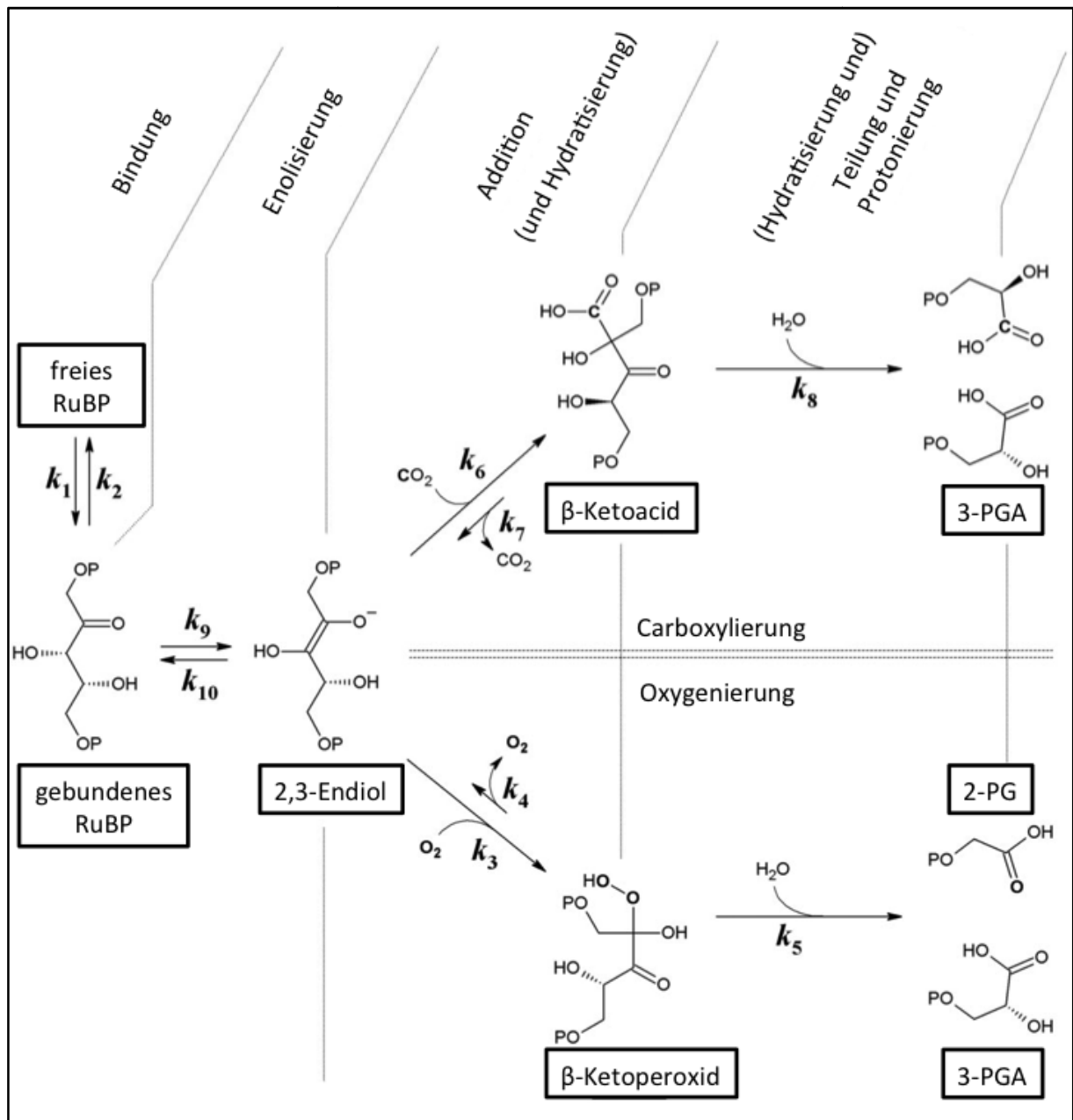


Abbildung 1: Reaktionsmechanismus des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase. Die Darstellung wurde abgewandelt nach Tcherkez (2013).

Die Häufigkeit von Carboxylierung und Oxygenierung hängt vom Verhältnis der Gase CO_2 und O_2 sowie der Temperatur ab (Jordan and Ogren 1984; Laing et al. 1974). Allgemein fördern hohe CO_2 - und niedrige O_2 -Konzentrationen die Carboxylierung. Die Temperatur hat zwei Effekte auf das Verhältnis von Carboxylierung zu Oxygenierung. Sie wirkt einerseits auf die Löslichkeit von O_2 und CO_2 in Wasser und andererseits auch auf den Reaktionsmechanismus selbst. Der Effekt der Temperatur auf den Reaktionsmechanismus betrifft laut Tcherkez möglicherweise die Bindung des β -Ketoacids an RubisCO (Tcherkez 2013; Tcherkez et al. 2006). Je fester diese Bindung ist, desto höher ist die Spezifität der RubisCO für CO_2 . Allerdings wird die Bindung durch erhöhte Temperaturen geschwächt, wodurch die CO_2 -Spezifität sinkt. Als Folge davon wird die Carboxylierung bei steigender Temperatur gehemmt bzw. die Oxygenierung gefördert (Jordan and Ogren 1984; Savir et al. 2010). Zusätzlich zum möglichen Effekt auf die Spezifität der RubisCO beeinflusst die Bindung von β -Ketoacid an RubisCO möglicherweise auch deren Reaktionsgeschwindigkeit. Dabei scheint die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Festigkeit der Bindung langsamer zu werden (Tcherkez et al. 2006). Dies erklärt, warum RubisCO mit steigender Spezifität für CO_2 auch langsamer wird (Jordan and Ogren 1981; Tcherkez et al. 2006).

Im Laufe der Evolution entwickelten sich verschiedene Varianten der RubisCO mit unterschiedlichen Eigenschaften. So ist die RubisCO der Cyanobakterien schnell, aber wenig spezifisch für CO_2 (Andrews and Lorimer 1985; Badger 1980; Morell et al. 1994; Tcherkez et al. 2006). Im Gegensatz dazu ist die RubisCO der C_3 -Pflanzen langsam aber sehr spezifisch (Kane et al. 1994; Tcherkez et al. 2006; Zhu et al. 1998). Vollständig unterbinden kann jedoch keine Variante der RubisCO die Oxygenierungs-Reaktion und das damit verbundene Auftreten des toxischen 2-PG. Dennoch konnte sich RubisCO in Cyanobakterien, Algen und Pflanzen etablieren. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die Oxygenierungs-Reaktion zur Entstehungszeit der RubisCO keine große Rolle spielte. Begründet wird diese Annahme durch die damals wahrscheinlich sehr geringe O_2 -Konzentration und hohe CO_2 -Konzentration, welche die Carboxylierungs-Reaktion stark begünstigten (Kanzaki and Murakami 2015; Kump 2008; Lyons et al. 2014; Nisbet et al. 2007). Als die O_2 -Konzentration im Laufe der Zeit zu- und die CO_2 -Konzentration abnahm, hatte sich RubisCO bereits als Enzym zur Fixierung von CO_2 etabliert. Offensichtlich war es zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich RubisCO so weit

zu modifizieren, dass die Oxygenierungs-Reaktion unterbunden wird. Zudem war der Selektionsdruck offenbar nicht groß genug, um ein neues CO₂-fixierendes Enzym ohne Oxygenierungs-Reaktion zu entwickeln, sofern dies überhaupt möglich ist (Tcherkez et al. 2006). Aufgrund der Zusammensetzung der heutigen Erdatmosphäre beträgt das Verhältnis von Carboxylierung zu Oxygenierung bei C3-Pflanzen etwa 4:1 (Sharkey et al. 1988). Folglich führt jede vierte Reaktion der RubisCO zum giftigen 2-PG, welches durch den Prozess der Photorespiration entfernt werden muss.

I.2 Die Photorespiration

Das Enzym RubisCO kann RuBP zu 3-PGA carboxylieren oder zum toxischen 2-PG oxygenieren. Diese Oxygenierungs-Reaktion der RubisCO ist als solche nicht zu verhindern (Lorimer & Andrews 1973). Dementsprechend verfügen alle Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben, über einen Mechanismus, der 2-PG unschädlich macht. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um die Photorespiration. Das Prinzip der Photorespiration ist in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien konserviert, unterscheidet sich aber im Detail.

I.2.1 Die Photorespiration in Pflanzen und Armleuchteralgen

In Pflanzen und Armleuchteralgen wird im ersten Schritt der Photorespiration 2-PG durch das Enzym 2-Phosphoglycolat-Phosphatase (PGLP) zu Glycolat dephosphoryliert. Das Glycolat wird anschließend über den plastidären Glycolat-Glycerat-Transporter1 (PLGG1) aus dem Chloroplasten befördert oder es diffundiert heraus (Pick et al. 2013; Walker et al. 2016). Durch porinartige Kanäle gelangt Glycolat nun in das Peroxisom (Reumann and Weber 2006). Hier wird es durch das Flavinmononukleotid-abhängige Enzym Glycolat-Oxidase (GOX) unter der Verwendung von O₂ zu Oxoglutarat oxidiert. Bei diesem Prozess wird auch H₂O₂ freigesetzt, das anschließend durch das Enzym Katalase (CAT) zu H₂O und $\frac{1}{2}$ O₂ umgesetzt wird. Das freigewordene H₂O₂ hat dabei eine Funktion in der Pathogenabwehr sowie als Signalstoff (Foyer et al. 2009; Sørhagen et al. 2013; Voss et al. 2013). Das durch GOX gebildete Oxoglutarat wird von der Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase (GGT) zu Glycin trans-aminiert. Dieses wird anschließend vom Peroxisom in das Mitochondrium überführt. Hier wird Glycin durch

den, aus den Untereinheiten P (GLDP), H (GLDH), L (GLDL) und T (GLDT) bestehenden, Multiproteinkomplex Glycin-Decarboxylase (GDC) decarboxyliert und deaminiert. Dabei werden CO_2 und NH_3 freigesetzt. Der verbliebene C1-Körper wird als Methyl-Gruppe auf Tetrahydrofolat (THF) übertragen, wodurch dieses zu Methylen-Tetrahydrofolat (CH_2 -THF) wird. Zur Herstellung eines C3-Körpers wird die Methylen-Gruppe von CH_2 -THF auf ein weiteres Molekül Glycin übertragen. Es entsteht ein Molekül Serin. Verantwortlich für diese Reaktion ist das Enzym Serin:Hydroxymethyl-Transferase (SHMT). Serin wird anschließend aus dem Mitochondrium in das Peroxisom überführt und hier durch die Serin:Glyoxylat-Aminotransferase (SGT) zu Hydroxypyruvat deaminiert. Die Aminogruppe wird dabei auf Glyoxylat übertragen, wodurch es zu Glycin wird und als solches wiederum ins Mitochondrium geleitet werden kann. Damit stellen sowohl GGT als auch SGT Glycin für die Photorespiration zur Verfügung. Das von SGT gebildete Hydroxypyruvat wird nun von dem Enzym Hydroxypyruvat-Reductase (HPR) zu Glycerat reduziert. Dieser Schritt kann, zumindest in *Arabidopsis*, sowohl durch HPR1 (At1g68010) im Peroxisom als auch durch HPR2 (At1g79870) im Cytoplasma erfolgen (Timm et al. 2008). Im letzten Schritt gelangt Glycerat durch PLGG1 oder Diffusion in den Chloroplasten, wo es durch das Enzym Glyceratkinase (GLYK) zu 3-PGA phosphoryliert wird (Boldt et al. 2005; Pick et al. 2013; Walker et al. 2016). Anschließend steht 3-PGA wieder für den Stoffwechsel zur Verfügung.

Zur Refixierung des während der Deaminierung von Glycin freigesetzten NH_3 nutzen Pflanzen den photorespiratorischen Stickstoff-Kreislauf (Keys 2006) (Abb. 2). Bei diesem wird das freigesetzte NH_3 als NH_4^+ in den Chloroplasten überführt, wo es unter ATP-Verbrauch auf Glutamat übertragen wird. Das Glutamat wird dadurch zu Glutamin aminiert. Diese Reaktion wird von dem Enzym Glutamin-Synthase 2 (GS2) katalysiert. Das gebildete Glutamin wird anschließend von der Ferredoxin-abhängigen Glutamin:Oxoglutarat-Aminotransferase (Fd-GOGAT) zur Aminierung von 2-Oxoglutarat (2-OA) eingesetzt. Dieses wird über den 2-OA/Malat-Translokator (DiT1) im Austausch für Malat in den Chloroplasten transportiert. Das Resultat der Aminierung von 2-OA sind zwei Moleküle Glutamat. Diese können erneut durch GS2 zu Glutamin aminiert werden oder sie verlassen den Chloroplasten im Austausch für Malat durch den Glutamat/Malat-Translokator (DiT2.2). Anschließend kann Glutamat ins Peroxisom gelangen, wo es der GGT als Amino-Gruppen-Donor zur Verfügung steht. Das hierdurch gebildete Glycin

I.2.2 Die Photorespiration in Cyanobakterien und Grünalgen der Gruppe *Chlorophyceae*

Auch in Cyanobakterien und Grünalgen der Gruppe *Chlorophyceae* muss bei der Oxygenierung gebildetes 2-PG entfernt werden. Dafür haben sich insgesamt drei unterschiedliche Wege entwickelt (Eisenhut et al. 2006; Eisenhut et al. 2008).

Der erste Weg entspricht weitestgehend der pflanzlichen Photorespiration, wobei jedoch die beteiligten Enzyme alle im Cytosol vorliegen. Zudem wird das Enzym Glycolat-Dehydrogenase statt GOX verwendet, um Glycolat zu Glyoxylat umzusetzen. Im Gegensatz zu GOX verwendet die Glycolat-Dehydrogenase NAD^+ statt O_2 , um Glycolat zu oxydieren. Dadurch wird hier statt H_2O_2 NADH gebildet. Als zweiten Weg verfügen Cyanobakterien über die Möglichkeit Glyoxylat über das Enzym Glyoxylat-Carboligase und unter CO_2 -Abgabe erst in Tartronat-Semialdehyd und dann durch die Tartronat-Semialdehyd-Reduktase zu Glycerat umzusetzen, anstatt es zu Glycin zu aminieren (Eisenhut et al. 2006). Der dritte Weg führt zur kompletten Oxydation des Glyoxylats zu zwei CO_2 . Dabei wird in einem ersten Schritt Glyoxylat über das Enzym Hydroxyacid-Dehydrogenase zu Oxalsäure umgesetzt. Anschließend wird die Oxalsäure durch die Oxalsäure-Dehydrogenase zu Methansäure decarboxyliert, welche wiederum durch die Format-Dehydrogenase zu CO_2 umgesetzt wird (Eisenhut et al. 2008).

I.2.3 Mutanten der Photorespiration

Im Laufe der Zeit wurden durch Mutageneseexperimente die verschiedenen Enzyme der Photorespiration identifiziert. Dabei wurde der sogenannte photorespiratorische Phänotyp als Indiz für die Rolle des jeweiligen Gens in der Photorespiration angeführt. Als photorespiratorischer Phänotyp wird klassischerweise ein mutanter Phänotyp bezeichnet, der durch eine erhöhte CO_2 -Konzentration komplementiert werden kann (Somerville 2001; Somerville and Ogren 1979). Dabei wirkt die erhöhte CO_2 -Konzentration reduzierend auf die Oxygenase-Aktivität der RubisCO, wodurch auch die Photorespiration reduziert wird. Die Konzentration an CO_2 , welche für die Komplementation erforderlich ist, unterscheidet sich je nach Mutante und kann in *A. thaliana* von unter 0,15 % für *glyk1* und der *hpr1/hpr2*-Doppelmutante über 1 % für

agt1 bis 2 % für *pglp1* reichen (Boldt et al. 2005; Schwarte and Bauwe 2007; Somerville and Ogren 1980; Timm et al. 2011; Timm et al. 2012).

Neuere Ergebnisse zeigen allerdings, dass es nicht unbedingt zu einem photorespiratorischen Phänotyp kommen muss, wenn ein photorespiratorisches Enzym mutiert ist. Ein Grund hierfür ist beispielsweise, dass in *A. thaliana* mit HPR1 und HPR2 zwei an der Photorespiration beteiligte HPR-Enzyme existieren (Timm et al. 2011; Timm et al. 2008). Da beide Enzyme redundant wirken, zeigt die alleinige Mutation von *HPR1* nur geringe Unterschiede zum Wildtyp (Timm et al. 2008). Ein weiterer Grund für das Ausbleiben eines photorespiratorischen Phänotyps kann die Photoperiode sein. So zeigt die *hpr1*-Mutante unter einer Lichtperiode von 8 bis 10 Stunden beeinträchtigt Wachstum, nicht aber bei einer Lichtperiode von 12 Stunden (Timm et al. 2011). Neben der Dauer der Belichtung ist auch deren Stärke von Bedeutung. Beispiele hierfür sind die *cat2*- und *ggt*-Mutante in *A. thaliana*, welche erst ab einer gewissen Lichtstärke beeinträchtigt Wachstum zeigen (Igarashi et al. 2003; Queval et al. 2007).

Die verschiedenen Mutanten der Photorespiration unterscheiden sich nicht nur in den Bedingungen, unter denen ein photorespiratorischer Phänotyp auftritt, sondern auch in der Ausprägung dieses Phänotyps (Timm and Bauwe 2013). So akkumulieren die Mutanten *pglp1* und *glyk1* unter normaler Luft große Mengen ihres jeweiligen Substrats, während dieser Effekt bei den Mutanten *hpr1* und *cat2* nicht auftritt (Queval et al. 2007; Timm and Bauwe 2013; Timm et al. 2012). Allerdings zeigen diese beiden Mutanten Veränderungen des Metabolismus, die etwa in der *hpr2*- oder *hpr3*-Mutante ausbleiben (Timm and Bauwe 2013; Timm et al. 2011). Neben der Beeinträchtigung des Metabolismus kann es in Mutanten der Photorespiration auch zu einer Beeinträchtigung der photochemischen Reaktion sowie der CO₂-Fixierung kommen. Eine Beeinträchtigung der photochemischen Reaktion äußert sich z. B. in einer erhöhten Fluoreszenz in *pglp1*- oder *glyk1*-Mutanten verglichen mit *hpr1*-Mutanten oder dem Wildtyp (Timm et al. 2012). Die erhöhte Fluoreszenz photorespiratorischer Mutanten unter normaler Luft wird auch zur Identifikation neuer photorespiratorischer Mutanten genutzt (Badger et al. 2009). Der Effekt auf die CO₂-Fixierung ist ebenfalls von Mutante zu Mutante unterschiedlich, zeigt sich aber besonders in einer erhöhten Sensitivität gegenüber O₂ (Somerville and Ogren 1979; 1980; Zelitch et al. 2009).

I.3 Anpassungen an die Photorespiration

Bei der Regeneration von 3-PGA aus 2-PG in Rahmen der Photorespiration wird ATP verbraucht und NH_3 sowie CO_2 werden freigesetzt. Für Photosynthese-betreibende Organismen gibt es folglich einen selektiven Druck die Oxygenierungs-Reaktion der RubisCO als Ursache der Photorespiration zu vermeiden. Da die Oxygenierungs-Reaktion aber nicht einfach entfernt werden kann, haben sich stattdessen verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Oxygenierungs-Reaktion zu umgehen bzw. zu reduzieren. Die Häufigkeit der Oxygenierungs-Reaktion steigt mit dem Verhältnis von O_2 zu CO_2 an. Daher kann sie durch eine Erhöhung der CO_2 -Konzentration vermindert werden. Um die CO_2 -Konzentration um RubisCO zu erhöhen, bedienen sich photosynthetisch aktive Organismen verschiedener CO_2 -Anreicherungsstrategien.

I.3.1 CO_2 -Anreicherung durch Carboxysome und Pyrenoide

Sowohl bei Algen als auch bei Cyanobakterien befindet sich RubisCO in einem bestimmten Zellkompartiment, in welchem CO_2 angereichert werden kann (Abb. 3).

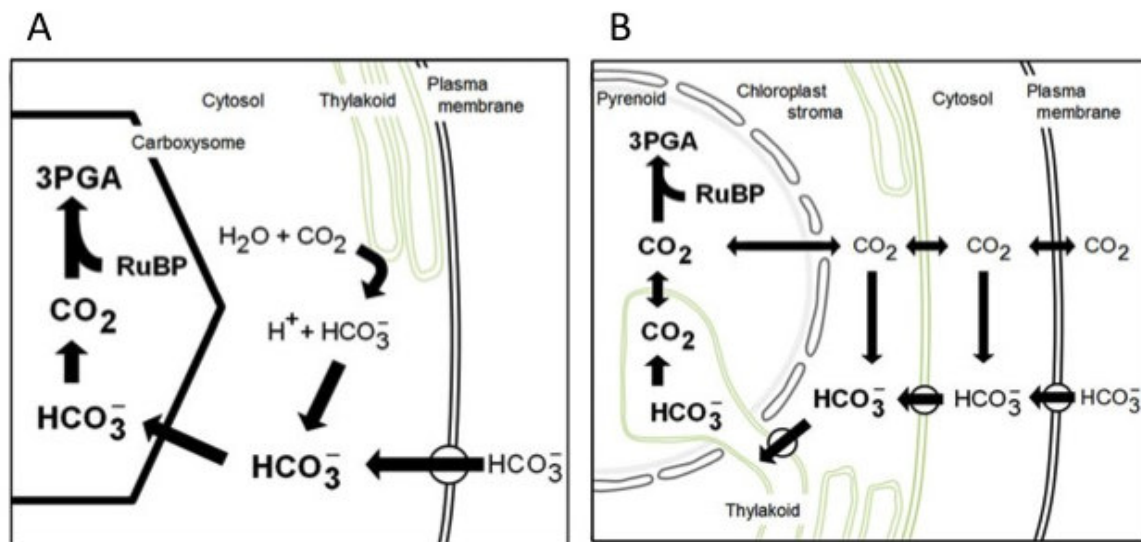


Abbildung 3: Verschiedene Arten der CO_2 -Anreicherung. Gezeigt sind der Anreicherungsmechanismus in Cyanobakterien (A) und Algen (B) (Moroney et al. 2013).

Bei den Cyanobakterien ist dieses Kompartiment das Carboxysom, dessen Hülle aus Proteinen besteht. Die Anreicherung von CO_2 erfolgt in Cyanobakterien über das Enzym

CA, welches CO_2 zu HCO_3^- umsetzt. Dieses kann aufgrund seiner Ladung die Zelle nicht mehr verlassen. Das HCO_3^- wird anschließend in das Carboxysom überführt und dort wieder zu CO_2 umgesetzt, wodurch sich die CO_2 -Konzentration um RubisCO erhöht (Price et al. 2008). Aufgrund dieser Erhöhung konnten Cyanobakterien eine weniger CO_2 -spezifische, aber dafür schnellere RubisCO entwickeln als jene der Pflanzen (Yeates et al. 2008). Die Funktionalität dieses Systems zeigt sich darin, dass die Cyanobakterien beim Verlust der Carboxysomen-Hülle oder einer Relokalisierung der RubisCO ihre Fähigkeit verlieren bei niedrigen CO_2 -Konzentrationen zu wachsen (Moroney et al. 2013).

In Algen ist das RubisCO-enhaltende Kompartiment das Pyrenoid, welches sich innerhalb des Chloroplasten befindet (Rawat et al. 1996). Im Gegensatz zum Carboxysom besteht das Pyrenoid nicht aus Hüllproteinen, sondern aus zusammengelagerten RubisCO-Molekülen mit aufgelagerter Stärke. Diese Stärke dient dabei der Diffusionsblockade für das CO_2 . Ähnlich wie bei den Cyanobakterien wird so auch bei Algen CO_2 in einem ersten Schritt in HCO_3^- überführt, um es in der Zelle zu halten. Anschließend wird dieses erst in den Chloroplasten und anschließend ins Pyrenoid überführt und dort wieder zu H_2O und CO_2 umgesetzt (Moroney et al. 2013; Moroney et al. 2011).

I.3.2 CO_2 -Anreicherung in Pflanzen durch CAM-, C4- und C2-Photosynthese

Im Gegensatz zu Algen und Cyanobakterien bilden höhere Pflanzen kein Carboxysom oder Pyrenoid um die Konzentration von CO_2 um RubisCO zu erhöhen. Stattdessen haben sich hier unter anderem die C4- und „Crassulacean Acid Metabolism“ (CAM)-Photosynthese entwickelt. Beide Photosynthese-Typen umgehen die Oxygenase-Aktivität der RubisCO, indem sie CO_2 von der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) vorfixieren lassen und diesen Prozess von der eigentlichen CO_2 -Fixierung durch RubisCO trennen. Anders als RubisCO hat PEPC keine Oxygenase-Aktivität, sondern carboxyliert spezifisch den C3-Körper Phosphoenolpyruvat (PEP) zum C4-Körper Oxalacetat (OA). Als Substrat benutzt PEPC dabei neben PEP auch HCO_3^- , welches durch eine cytoplasmatische CA bereitgestellt wird.

In CAM-Pflanzen erfolgt die Vorfixierung von CO_2 über PEPC nachts bei geöffneten Stomata, während diese tagsüber geschlossen sind. Das dabei gebildete OA wird in den Chloroplasten durch die NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase zu Malat umgesetzt und anschließend in der Vakuole gespeichert. Das Fassungsvermögen der Vakuole für Malat ist allerdings begrenzt, sodass häufig schon vor Tagesanbruch das Malat aus der Vakuole befördert und hiernach zu Pyruvat decarboxyliert wird. Der Großteil des Malats wird jedoch tagsüber umgesetzt. Das durch die Decarboxylierung von Malat freigesetzte CO_2 erhöht die CO_2 -Konzentration um RubisCO, wodurch letztlich die Oxygenase-Aktivität reduziert wird. Das gebildete Pyruvat wird anschließend zu PEP regeneriert. Die Vorfixierung und die finale Fixierung von CO_2 werden in CAM-Pflanzen also zeitlich voneinander getrennt (Borland et al. 2000).

Im Gegensatz zu CAM-Pflanzen erfolgt die Trennung von CO_2 -Vorfixierung und dessen finaler Fixierung in C4-Pflanzen räumlich statt zeitlich. Hierzu verfügen C4-Pflanzen über einen CO_2 -Pumpmechanismus, der bei den meisten Typen der C4-Photosynthese CO_2 von den Mesophyll-Zellen (M-Zellen) zu den Bündelscheiden-Zellen (BS-Zellen) pumpt. Diese beiden Zelltypen sind in C4-Pflanzen in der sogenannten Kranz-Anatomie angeordnet (Haberlandt 1904). Wie bei der CAM-Photosynthese so wird auch bei der C4-Photosynthese OA durch PEPC gebildet. Diese Vorfixierung von CO_2 findet in C4-Pflanzen allerdings ausschließlich in den M-Zellen statt. Ab diesem Schritt können drei unterschiedliche Typen der C4-Photosynthese unterschieden werden (Hatch et al. 1975; Kanai and Edwards 1999). Diese drei Typen sind in Abbildung 4 gezeigt. Alle drei Typen haben gemeinsam, dass jeweils eine C4-Säure in die BS-Zellen transportiert und dort decarboxyliert wird. Hierdurch wird die CO_2 -Konzentration in den BS-Zellen erhöht, welche als einzige Zellen RubisCO enthalten. Durch die Konzentrationserhöhung von CO_2 um RubisCO wird letztlich deren Oxygenase-Aktivität reduziert. Die drei Typen der C4-Photosynthese unterscheiden sich in der Art der transportierten C4-Säure und dem Enzym, welches die Decarboxylierung dieser C4-Säure katalysiert. Beim NAD-Malatenzym-Typ (NAD-ME-Typ) und dem PEP-Carboxykinase-Typ (PEPCK-Typ) wird das durch PEPC gebildete OA durch die Aspartat-Aminotransferase (AspAT) zu Aspartat trans-aminert. Anschließend wird das Aspartat in die BS-Zellen überführt. In beiden Typen wird das Aspartat durch AspAT wieder zu OA umgesetzt, welches anschließend in das Mitochondrium transportiert und durch die NAD-Malat-Dehydrogenase zu Malat umgesetzt wird. Dieses wird folgend durch NAD-ME decarboxyliert, wobei Pyruvat und

CO₂ entstehen. Das Pyruvat wird hiernach durch die Alanin-Aminotransferase (AlaAT) zu Alanin trans-aminiert, welches in die M-Zellen transportiert wird. Hier erfolgt die Deaminierung durch AlaAT zu Pyruvat, aus welchem in den Chloroplasten der M-Zellen PEP regeneriert wird. In C₄-Pflanzen des PEPCK-Typs kann OA in den BS-Zellen parallel auch direkt über PEPCK zu PEP decarboxyliert werden, das folgend in die M-Zellen gelangt. Dieser zweite Weg überwiegt in Pflanzen des PEPCK-Typs. Im Gegensatz zum NAD-ME- und PEPCK-Typ wird OA beim NADP-Malatenzym-Typ (NADP-ME-Typ) nicht zu Aspartat, sondern zu Malat umgesetzt. Dieser Schritt wird in den M-Zellen durch die NADPH-Malat-Dehydrogenase der Chloroplasten katalysiert. Malat gelangt anschließend in die BS-Zellen, wo es im Chloroplasten durch NADP-ME zu Pyruvat decarboxyliert wird. Das Pyruvat wird nun in den Chloroplasten der M-Zellen durch die Pyruvat-Dikinase zu PEP regeneriert, welches schließlich erneut als Substrat für die PEPC zur Verfügung steht.

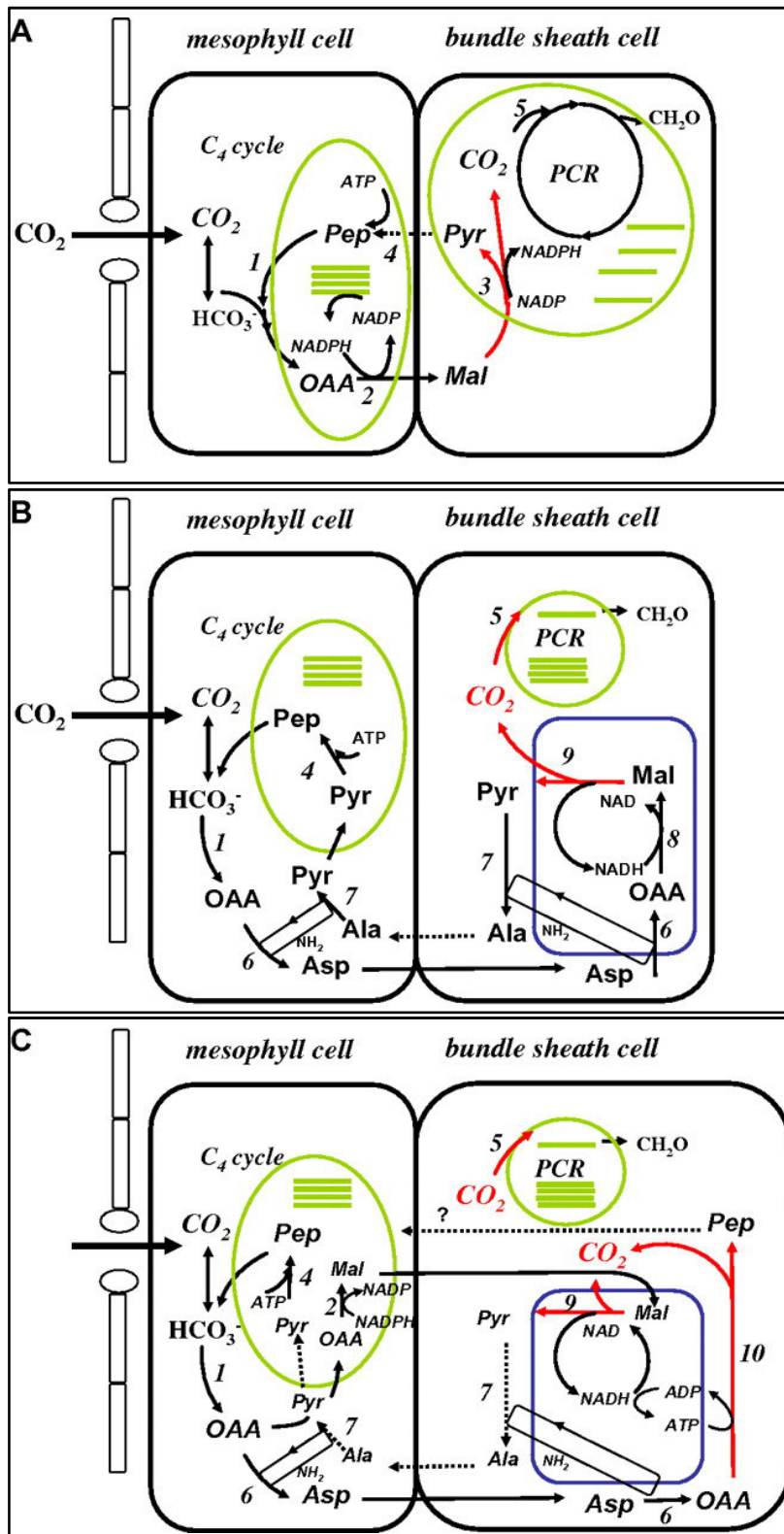


Abbildung 4: Die drei Typen der C4-Photosynthese (Furbank 2011). Gezeigt sind der NADP-ME- (A), NAD-ME- (B) und PEPCK-Typ (C) der C4-Photosynthese. Die Nummern 1 bis 10 bezeichnen die Enzyme Phosphoenolpyruvate-Carboxylase (1), NADPH-Malat-Dehydrogenase (2), NADP-Malatenzym (3), Pyruvat-Pi-Dikinase (4), Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (5), Aspartat-Aminotransferase (6), Alanin-Aminotransferase (7), NAD-Malat-Dehydrogenase (8), NAD-Malatenzym (9) und Phosphoenolpyruvate-Carboxykinase (10). Die Abkürzungen bezeichnen die Metabolite Phosphoenolpyruvat (PEP), Oxalacetat (hier OAA), Aspartat (Asp), Alanin (Ala), Pyruvat (Pyr) und Malat (Mal). Chloroplasten und Thylakoide sind grün, Mitochondrien blau und Decarboxylierungs-Reaktionen rot gekennzeichnet.

Neben diesen drei Typen der C4-Photosynthese gibt es noch die einzellige C4-Photosynthese, welche bei einigen Land- und Wasserpflanzen vorkommt (Sage 2004). Allgemein wird bei den verschiedenen Typen dieser einzelligen C4-Photosynthese CO₂ in einem Bereich der Zelle durch PEPC fixiert und in Form von C4-Säuren zu einem anderen Bereich der Zelle transportiert, an dem sich RubisCO befindet. Durch Freisetzung von CO₂ aus der C4-Säure kommt es in diesem Bereich nun zu einer erhöhten CO₂-Konzentration. Die erhöhte Konzentration von CO₂ unterdrückt hier letztlich die Oxygenase-Aktivität der RubisCO und steigert so die Carboxylierungs-Rate (Edwards et al. 2004; Edwards and Voznesenskaya 2011).

Ähnlich wie bei der C4-Photosynthese basiert auch die C2-Photosynthese auf einer CO₂-Pumpe. Im Gegensatz zur C4-Photosynthese wird hier jedoch keine C4-Säure, sondern der C2-Körper Glycin von den M-Zellen in die BS-Zellen transportiert. Das Glycin ist dabei ein Zwischenprodukt der Photorespiration und entsteht sowohl in den M- als auch in den BS-Zellen der C2-Pflanzen. In C2-Pflanzen verfügen die M-Zellen jedoch nicht über eine ausreichende Menge an GDC, um alles anfallende Glycin umzusetzen. Das überschüssige Glycin wird stattdessen in die BS-Zellen transportiert und durch die dortigen GDC decarboxyliert. Durch die vermehrte Decarboxylierung von Glycin ist die CO₂-Konzentration innerhalb der BS-Zellen von C2-Pflanzen dreimal höher als in C3-Pflanzen (Keerberg et al. 2014). Als Folge dessen wird hier die Oxygenierungs-Reaktion der RubisCO reduziert und es kommt in den BS-Zellen der C2-Pflanzen zu weniger Photorespiration als in C3-Pflanzen. Das durch die Decarboxylierung von Glycin gebildete Serin wird anschließend in die M-Zellen zurücktransportiert, wo es im Rahmen der Photorespiration zu 3-PGA umgesetzt wird. Die Effektivität der C2-Photosynthese steigt mit der Spezifität des GDC für die BS-Zellen (Heckmann et al. 2013; Schulze et al. 2013). Zusätzlich erhöht eine verstärkte Expression der photorespiratorischen Gene die Umsatzgeschwindigkeit der Photorespiration und damit auch den CO₂-konzentrierenden Effekt, da hierdurch mehr CO₂ pro Zeiteinheit freigesetzt werden kann (Mallmann et al. 2014).

Durch den Transport der Aminosäure Glycin von den M-Zellen in die BS-Zellen wird nicht nur CO₂, sondern auch Ammonium transportiert. Damit es zwischen beiden Zelltypen nicht zu einem Ungleichgewicht kommt, muss dieses Ammonium anschließend wieder in die M-Zellen zurücktransportiert werden (Monson and Rawsthorne 2000). Der genaue Mechanismus hierfür ist noch unbekannt. Es wird aber

vermutet, dass eine der Aminosäuren Glutamat, Alanin oder Aspartat jeweils im Austausch für 2-Oxoglutarat, Pyruvat oder Malat von den BS- in die M-Zellen transportiert wird (Mallmann et al. 2014).

I.4 Die Evolution der C4-Photosynthese

I.4.1 Die C4-Photosynthese hat einen polyphyletischen Ursprung

Im Laufe der pflanzlichen Evolution entstand die C4-Photosynthese mindestens 65-mal unabhängig voneinander (Christin et al. 2011a; Sage et al. 2012). Insgesamt gibt es heute ca. 7500 C4-Spezies auf der Welt. Von diesen entfallen ca. 1600 auf die Dicotyledonae, 1300 auf die Seggen und 4600 auf die Gräser, welche beide den Monocotyledonae angehören (Bruhl 2007; Roalson 2011; Sage et al. 2011a; Sage et al. 1999). Während es in vielen Gruppen innerhalb der Bedecktsamer gar keine C4-Pflanzen gibt, treten sie in anderen Gruppen gehäuft auf. So sind z. B. alle 4600 C4-Spezies innerhalb der Gräser in der sogenannten PACMAD-Gruppe (*Panicoideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae*, *Micrairoideae*, *Aristidoideae*, *Danthonioideae*) zu finden, während es in der ähnlich-großen BEP-Gruppe (*Bambusoideae*, *Ehrhartoidae*, *Pooidae*) keine C4-Pflanzen gibt (Christin et al. 2013; Christin et al. 2007).

Der polyphyletische Ursprung der C4-Photosynthese zeigt sich unter anderem in den verschiedenen Formen der C4-Photosynthese. So gibt es neben den NADP-ME, NAD-ME und PEPC-Typ auch verschiedene einzellige C4-Photosynthese-Typen sowie 22 verschiedene Formen der Kranz-Anatomie (Bowes 2011; Edwards and Voznesenskaya 2011; Furbank 2016; Sage et al. 2011a).

I.4.2 Der selektive Druck, der die Evolution der C4-Photosynthese ermöglichte

Die ersten C4-Pflanzen entstanden in der Mitte des Oligozän vor ca. 30 bis 35 Millionen Jahren (Besnard et al. 2009; Christin et al. 2011a; Christin et al. 2011b; Christin et al. 2008; Vicentini et al. 2008). Innerhalb dieser Periode sank die CO₂-Konzentration der Atmosphäre von ca. 1500 ppm auf unter 500 ppm, wobei sich gleichzeitig die O₂-Konzentration von 18 auf 21 % erhöhte (Sage and Stata 2015). Durch diese Verschiebung des Verhältnisses von CO₂ zu O₂ veränderte sich auch das Verhältnis von

Carboxylierungs- zu Oxygenierungs-Reaktion der RubisCO zugunsten der Oxygenierungs-Reaktion (Jordan and Ogren 1984; Laing et al. 1974). In der Folge stieg auch die Photorespiration einschließlich ihrer Kosten an (Peterhansel 2010). Somit übte die Abnahme der CO₂-Konzentration einen bedeutenden selektiven Druck zur Verringerung der Photorespiration aus (Ehleringer et al. 1997; Ehleringer et al. 1991; Sage et al. 2012 ; Sage and Stata 2015). Neben der geringen CO₂-Konzentration sind auch hohe Temperaturen und Trockenheit entscheidende selektive Faktoren (Edwards and Smith 2010; Moore 1983; Osborne and Freckleton 2009; Sage 2004). So führen erhöhte Temperaturen zu einer geringeren Spezifität der RubisCO für CO₂ und somit zu mehr Photorespiration (Jordan and Ogren 1984; Tcherkez 2013; Tcherkez et al. 2006). Zudem steigern erhöhte Temperaturen und Trockenheit die Transpiration der Pflanzen. Um einen zu hohen Wasserverlust durch Transpiration unter diesen Bedingungen vorzubeugen, verschließen Pflanzen ihre Stomata. Das Schließen der Stomata hat jedoch einen eingeschränkten Gasaustausch zur Folge. Als Konsequenz der hierdurch verringerten Zufuhr an CO₂ wird die Oxygenierungs-Reaktion begünstigt, was letztlich zu mehr Photorespiration führt. Einen ähnlichen Effekt wie die Trockenheit haben auch salzige Böden, da sie die Wasserversorgung erschweren und somit auch die vermehrte Schließung der Stomata begünstigen. Entsprechend diesen Bedingungen finden sich die meisten Ursprungs- und Verbreitungsgebiete von C₄-Pflanzen in halb-trockenen bis trockenen Gebieten mit hohen Temperaturen (Sage et al. 2011a; Sage and Stata 2015). Diese Gebiete sind jedoch entweder sommerlichem Monsun ausgesetzt oder haben doch so viel Bodenfeuchtigkeit, dass sie sommerliche Photosynthese ermöglichen (Sage et al. 2011a; Sage and Stata 2015; Sage et al. 2011b).

I.4.3 Voraussetzungen für die Evolution der C₄-Photosynthese

Die C₄-Photosynthese ist zwar mindestens 65-mal unabhängig voneinander entstanden, diese C₄-Ursprünge sind aber nicht gleichmäßig über die verschiedenen Familien des Pflanzenreichs verteilt (Sage et al. 2011a). Dies deutet darauf hin, dass es bestimmte Voraussetzungen gibt, welche die Entstehung der C₄-Photosynthese begünstigen und nicht in allen Gruppen des Pflanzenreichs vorhanden sind (Christin et al. 2013).

Eine solche Voraussetzung ist eine Genomduplikation, durch die Gene in mehrfacher Kopie vorhanden sind. Wenn nun eine Genkopie im Laufe der C₄-Evolution mutiert und

sich der Ort oder die Stärke der Expression verändert, so behält die zweite Genkopie die ursprüngliche Funktion bei und sichert so die Funktionstüchtigkeit des Organismus. Da der Organismus nicht auf die mutierte Genkopie angewiesen ist, kann diese sich im Laufe der Zeit langsam verändern und sich an andere Gene des C4-Zyklus anpassen, ohne dass dies letal wirkt (Bräutigam and Gowik 2016). Ein Beispiel für die Notwendigkeit einer Genom- bzw. Genduplikation sind die *GLDP*-Gene in *Flaveria*. Hier entwickelte eine Genkopie eine C4-typische Expression, während die zweite Kopie die C3-typische Expression beibehielt und so das Überleben des Organismus sicherte (Engel et al. 2007; Schulze et al. 2013).

Ein zweiter wichtiger Faktor neben der Genomduplikation ist die Etablierung von regulatorischen Elementen, die eine M- oder BS-spezifische Expression vermitteln können. Solche Elemente stellen das M-spezifische MEM1 des *ppcA*-Gens oder die BS-spezifische Region 7 des *GLDPA*-Gens aus *Flaveria* dar (Gowik 2004, Aykildiz 2007, Engelmann 2008, Wiludda 2012, Schulze 2013).

Neben diesen genetischen Grundvoraussetzungen gibt es auch anatomische Voraussetzungen zur Evolution der C4-Photosynthese. Eine dieser Voraussetzungen ist ein verringerter Abstand der Leitgefäße bzw. Venen zueinander. Dieser wird erreicht, indem die Anzahl der M-Zellen zwischen den Venen reduziert wird. Der Vorteil einer solchen Anpassung ist ein erhöhter Schutz gegen Austrocknung in heißen und trockenen Gebieten (Griffiths et al. 2012; Nardini et al. 2012; Osborne and Sack 2012; Sage et al. 2012a). Eine derartige Reduktion des Venenabstands kann in der BEP- und der PACMAD-Gruppe der Gräser beobachtet werden. Allerdings entwickelten sich nur in der PACMAD-Gruppe C4-Pflanzen. Offenbar erfüllen die PACMAD-Gräser eine zweite anatomische Voraussetzung, die den BEP-Gräsern fehlt. Hierbei handelt es sich um vergrößerte BS-Zellen (Christin et al. 2013). Solche vergrößerten BS-Zellen sind dazu in der Lage die Reduktion des photosynthetisch aktiven M-Gewebes zu kompensieren, da sie selbst eine höhere photosynthetische Leistung erbringen können (Lundgren et al. 2014; Muhaidat et al. 2011). Zwar verfügten die gemeinsamen Vorfahren der PACMAD- und BEP-Gruppe schon über solche vergrößerten BS-Zellen, innerhalb der BEP-Gruppe verkleinerten sie sich aber mit der Zeit, während die vergrößerten BS-Zellen in der PACMAD-Gruppe erhalten geblieben sind (Christin et al. 2013). Als sich die Umweltbedingungen so änderten, dass C4-Photosynthese begünstigt wurde, fehlten den

BEP-Gräsern die entsprechenden anatomischen Voraussetzungen, um die BS-Zellen für die C4-Photosynthese zu rekrutieren.

I.4.4 Die schrittweise Evolution der C4-Photosynthese

Im Oligozän sank die CO₂-Konzentration in der Luft, wodurch die Photorespiration verstärkt auftrat. Dementsprechend verstärkte sich auch der selektive Druck, die Photorespiration zu vermeiden. Pflanzen, die bereits über die genetischen und anatomischen Voraussetzungen verfügten, hatten nun einen Vorteil, wenn sie die C4-Photosynthese entwickelten. Die Entwicklung von C3- zur C4-Photosynthese erfolgte dabei wahrscheinlich über mehrere Schritte, wobei jeder Schritt die Fitness des Individuums erhöhte (Heckmann et al. 2013; Monson and Moore 1989; Sage 2004; Sage et al. 2012a). Eine Übersicht der schrittweisen Evolution der C4-Photosynthese ist in Abbildung 5 gezeigt.

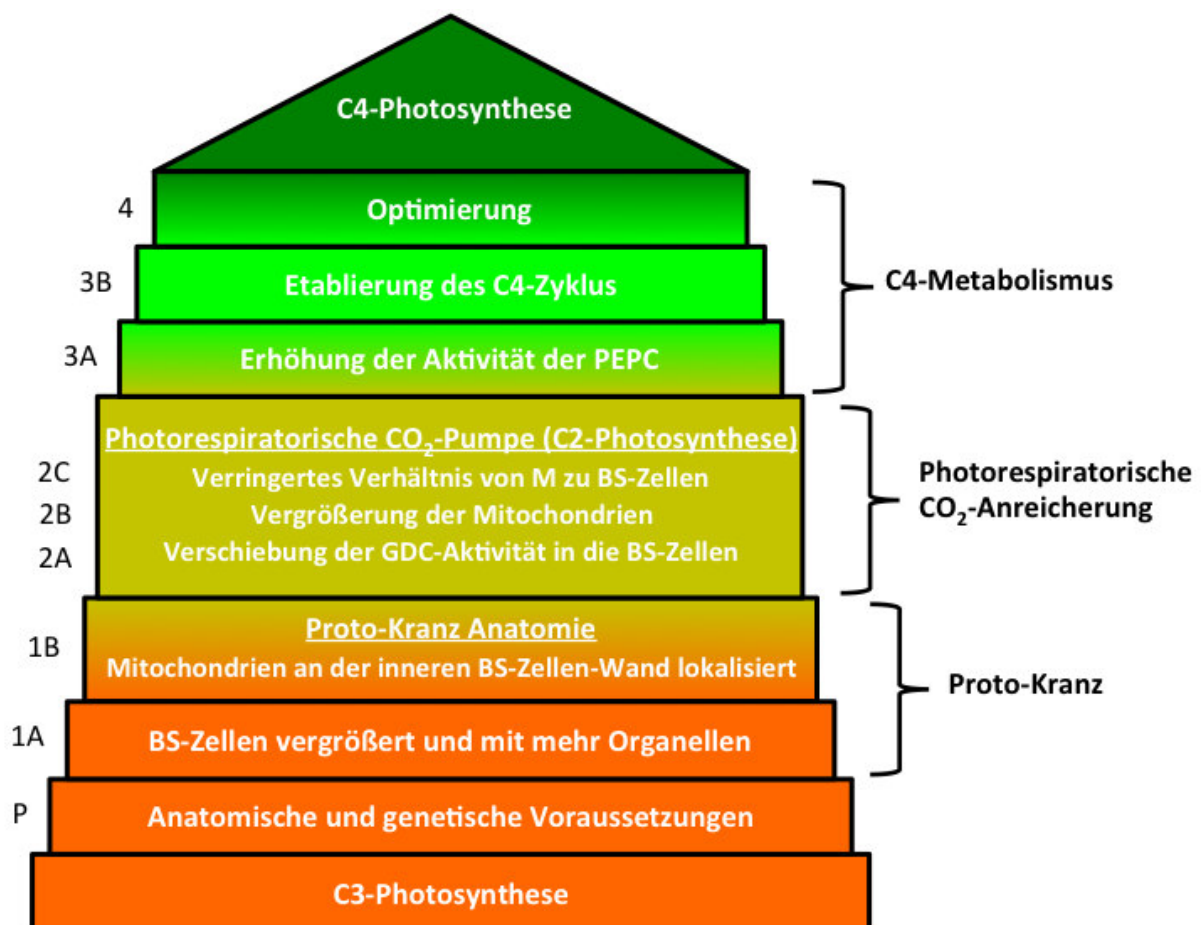


Abbildung 5: Die Schrittweise Evolution der C4-Photosynthese. Abgewandelt nach Sage und Stata (2015).

Im ersten Schritt der C₄-Evolution nahm das Volumen der BS-Zellen zu. Dieses vergrößerte Volumen bot mehr Chloroplasten und Mitochondrien Platz, wodurch sich die photosynthetische Kapazität der BS-Zellen erhöhte (Lundgren et al. 2014). Neben der Anzahl der Chloroplasten änderte sich auch ihre Position innerhalb der BS-Zellen. Ein Teil der Chloroplasten verblieb an der Zellwand auf der Mesophyll zugewandten Seite, während andere zusammen mit den Mitochondrien an die Zellwand nahe des Leitgewebes verlagert wurden. Diese anatomische Anpassung wird als Proto-Kranz-Anatomie bezeichnet (Muhaidat et al. 2011; Sage et al. 2014). Unter diesen Bedingungen wurde das Glycin, welches im Zuge der Photorespiration entsteht, von den Chloroplasten nahe der M-Zellen hin zu den Mitochondrien nahe des Leitgewebes überführt. Als Folge der Decarboxylierung dieses Glycins durch den GDC in den Mitochondrien wurde vermehrt CO₂ in diesem Bereich der BS-Zellen freigesetzt. Die benachbarten Chloroplasten waren so einer erhöhten CO₂-Konzentration ausgesetzt, weshalb es hier zu weniger Oxygenierungs-Reaktionen und damit auch zu weniger Photorespiration kam. Bei dem Transport von Glycin durch diese BS-Zellen handelte sich also um eine Art einzellige C₂-Photosynthese (Sage 2013; Sage and Stata 2015).

Im zweiten Schritt der C₄-Evolution veränderte sich die Lokalisation des GDC dahingehend, dass dieser nun immer spezifischer für die BS-Zellen wurde (Monson and Rawsthorne 2000; Sage et al. 2012a). Verantwortlich hierfür war wahrscheinlich die Mutation eines *GLDP*-Gens bzw. dessen regulatorischer Elemente (Schulze et al. 2013). Anschließend wurden auch die Mitochondrien innerhalb der BS-Zellen größer. Beides hatte den Effekt, dass Glycin in Zeiten verstärkter Photorespiration von den M- in die BS-Zellen geleitet werden konnte, um dort decarboxyliert zu werden. Hierdurch kam es in den BS-Zellen zu einer CO₂-Anreicherung, welche die Photorespiration innerhalb der BS-Zellen verringerte. Somit hatte sich eine photorespiratorische Pumpe gebildet. Da diese Pumpe mit der Aminosäure Glycin nicht nur CO₂, sondern auch Ammonium transportierte, musste sich zudem ein Mechanismus entwickeln, um das Ammonium von den BS-Zellen wieder in die M-Zellen zurück zu transportieren. So wurde ein Teil des Ammoniums wahrscheinlich über die Aminosäure Alanin von den BS- in die M-Zellen zurück transportiert. Das Alanin resultierte dabei aus der Aminierung von Pyruvat, welches wiederum durch die Decarboxylierung von Malat entstand. Sowohl Malat als auch Pyruvat und Alanin sind Teil des C₄-Zyklus. Aus diesem Grund scheint der C₄-Zyklus den Rücktransport von Ammonium und damit auch die C₂-Photosynthese

unterstützt zu haben (Mallmann et al. 2014). Die Effektivität eines solchen Ammoniumrücktransports steigt mit der Aktivität des C4-Zyklus an, was letztlich auch in mehr Biomasse resultiert (Mallmann et al. 2014).

Aus diesem Grund stieg in einem dritten Schritt der C4-Evolution wohl zuerst die Aktivität der PEPC und dann anschließend die Aktivitäten der anderen C4-Enzyme (Edwards and Ku 1987; Muhaidat et al. 2011). Durch die Aktivitätssteigerung der PEPC konnte mehr CO₂ primär fixiert und mehr PEP für den C4-Zyklus bereitgestellt werden. Erst als hierdurch die Menge an verfügbarem PEP anstieg, brachte es einen Vorteil auch die anderen Enzym-Aktivitäten zu erhöhen bzw. jeweils mehr dieser Enzyme zu exprimieren, um so den Metabolit-Transport aufrechtzuerhalten (Sage 2004). Der C4-Zyklus wurde dabei so verstärkt, dass in C2-Pflanzen bis zu 55 % des CO₂ in Form von C4-Säuren primär fixiert wird (Ku et al. 1991; Monson and Rawsthorne 2000). Dennoch trägt die C4-Photosynthese bei diesen Pflanzen nur in geringen Maße zur finalen CO₂-Fixierung bei, da C4-Enzyme wie etwa PPDK und NADP-ME hier noch keine nennenswerten Aktivitäten aufweisen (Edwards and Ku 1987; Ku et al. 1991; Monson et al. 1988). Erst bei C4-artigen Pflanzen wurde der C4-Zyklus wohl voll integriert und etabliert, indem die Expression von Enzymen wie RubisCO, CA und PEPC abermals verstärkt und gewebespezifisch wurde (Akyildiz et al. 2007; Ludwig 2011; Monson and Rawsthorne 2000).

Im vierten Schritt der C4-Evolution erfolgte die weitere Optimierung des C4-Zyklus. So wurde neben der Stärke der Expression auch die katalytische Aktivität und die Regulation der beteiligten Enzyme angepasst (Aldous et al. 2014; Aubry et al. 2011; Brown et al. 2011; Engelmann et al. 2003; Kapralov et al. 2011; Ludwig 2011; Paulus et al. 2013; Sage 2004). Zudem erfolgten weitere anatomische Anpassungen, wie etwa eine Verringerung des Diffusions-Widerstandes zwischen den BS- und M-Zellen, durch eine Vermehrung der Plasmodesmata oder die Verstärkung der BS-Zellwand durch Suberin (Botha 1992; Evert et al. 1996; Majeran et al. 2010; Sage 2004; Sowiński et al. 2008). Suberin dient dabei als Diffusionsbarriere für das CO₂, wodurch dieses effektiver in der BS-Zelle angereichert werden kann. *Andropogonae* wie *Zea mays* oder *Sorghum bicolor* entwickelten zusätzlich noch Grana-freie Chloroplasten in den BS-Zellen (Golbeck et al. 1981; Meierhoff and Westhoff 1993; Woo et al. 1970). Durch diese Anpassung haben die Pflanzen keinen „Oxygen-Evolving-Complex“ in den BS-Zellen. Als Folge dessen bilden

sie hier auch keinen Sauerstoff, der die Oxygenierungs-Reaktion bzw. die Photorespiration innerhalb der BS-Zellen verstärken könnte.

I.5 Das Genus *Flaveria* als Modell für die Evolution der C4-Photosynthese

Um die Entstehung der C4-Photosynthese zu untersuchen, ist es zweckmäßig Pflanzen miteinander zu vergleichen, die unterschiedliche Entwicklungsstadien der C4-Evolution repräsentieren. Diese Pflanzen sollten für einen guten Vergleich auch möglichst nahe miteinander verwandt sein. Mit Hilfe des dicotylen Genus *Flaveria* aus der Familie der *Asteraceae* können beide Forderungen erfüllt werden (Gowik and Westhoff 2011; Westhoff and Gowik 2010). So verfügt das Genus *Flaveria* (Abb. 6) nicht nur über miteinander verwandte C3-, C4- und C2-Pflanzen sondern auch über C4-artige Pflanzen, die folglich gut miteinander vergleichbar sind (Lyu et al. 2015; McKown and Dengler 2007; McKown et al. 2005). Durch diese Vergleichbarkeit lassen sich auch kleinere Veränderungen beispielsweise in kodierenden oder regulatorischen Sequenzen von C4-Genen detektieren. Des Weiteren ist die C4-Pflanze *Flaveria bidentis* transformierbar und somit für transgene Ansätze geeignet (Chitty et al. 1994).

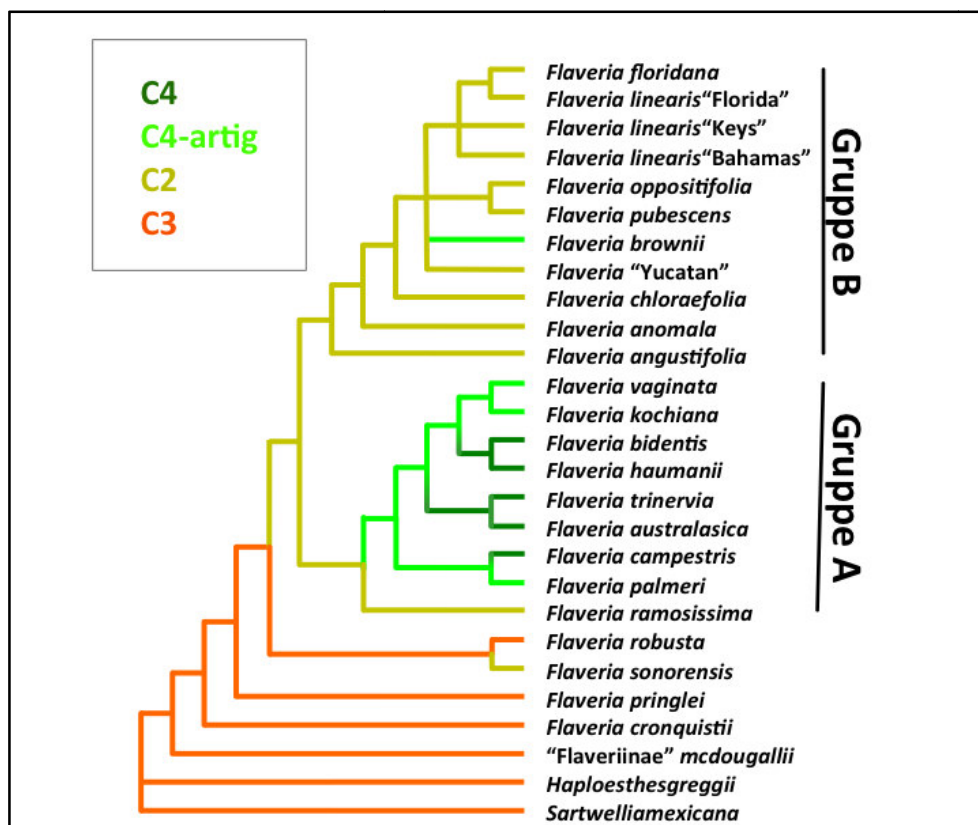


Abbildung 6: Stammbaum des Genus *Flaveria*. Verändert nach McKown et al. (2005).

II Ziele der Arbeit

Die Photorespiration gilt als ein entscheidender Faktor für die Evolution der C4-Photosynthese und für die Lebensfähigkeit photosynthetisch aktiver Organismen in der heutigen Atmosphäre. Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Expression des photorespiratorischen Gens *2-Phosphoglycolat-Phosphatase (PGLP)* in verschiedenen Spezies der Gattung *Flaveria* untersucht. Der zweite Teil befasst sich mit den Folgen einer Reduktion des PGLP-Spiegels für den Metabolismus und die Physiologie der C4-Pflanze *F. bidentis*.

a) Manuskript I befasst sich mit der Expression des photorespiratorischen Gens *PGLP* in verschiedenen Schritten der C4-Evolution. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass sich die Expression anderer photorespiratorischer Gene im Verlauf der C4-Evolution im Bezug auf ihre Stärke und Gewebespezifität geändert hat. Um die Expression von *PGLP* zu untersuchen, wurde die Sequenz der 5' flankierenden Region des *PGLP*-Gens sowie des ersten Introns aus verschiedenen Spezies der Gattung *Flaveria* analysiert. Neben dem Vergleich der Struktur wurden die Sequenzen zur Expression des Reportergens *β -Glucuronidase (GUS)* eingesetzt, was einen Einblick in die Lokalisation und die Stärke der vermittelten Expression ermöglichte. Hierdurch konnten Rückschlüsse auf die Gewebespezifität und die Stärke der *PGLP*-Expression im Verlauf der C4-Evolution gezogen werden.

b) Manuskript II untersucht die Folgen einer Reduktion des Proteinspiegels von *PGLP* für den Metabolismus und die Physiologie der C4-Pflanze *F. bidentis*. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Störung der Photorespiration auch das Wachstum der C4-Pflanze *Zea mays* unter normaler Luft beeinträchtigt und dass die Reduktion von *PGLP* in C3-Pflanzen einen letalen photorespiratorischen Phänotyp zur Folge hat. Um nun die Folgen einer gestörten Photorespiration für den Metabolismus einer C4-Pflanze zu untersuchen, wurde der Protein-Spiegel von *PGLP* in *F. bidentis* durch eine siRNA reduziert. An der entstehenden Mutante wurden das Wachstum unter hoch CO₂ und normaler Luft, die Sensitivität der Photosynthese gegenüber O₂ sowie die Reaktionen des Metabolismus nach einem Umgebungswechsel von 1 % CO₂ auf normale

Luft analysiert. Diese Untersuchung ermöglichte den Vergleich der PGLP-Reduktion in *F. bidentis* mit bekannten Mutationen der Photorespiration hinsichtlich deren Physiologie und Metabolismus.

III Thesen

In Rahmen dieser Arbeit konnte Folgendes gezeigt werden:

Teilprojekt a)

1. Die 5' flankierende Region des *PGLP*-Gens weist nur im proximalen Abschnitt vor der Translationsstart-Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Spezies auf. Diese Ähnlichkeit spricht für hier befindliche *cis*-regulatorische Elemente.
2. Das Gen *PGLP* wird im Genus *Flaveria* offenbar spezifisch in den Bündelscheiden- und Mesophyll-Zellen exprimiert. Dies gilt sowohl für C3-Pflanzen als auch für C2-Pflanzen, C4-artige und C4-Pflanzen. Die Lokalisation der *PGLP*-Expression hat sich demnach im Verlauf der C4-Evolution nicht verändert. Die spezifische Expression des *PGLP*-Gens in den Bündelscheiden-Zellen stellt folglich keinen zwingenden Schritt in der Evolution der C4-Photosynthese im Genus *Flaveria* dar.
3. Die Stärke der Expression konnte durch die Anwesenheit des ersten Introns des *PGLP*-Gens gesteigert werden. Dieses Intron verfügt in *F. pubescens*, *F. brownii* und *F. trinervia* offenbar über Expressions-fördernde regulatorische Elemente. Die genaue Lokalisation dieser Elemente sowie ihre Funktionsweise konnten hier nicht geklärt werden.

Teilprojekt b)

1. Die C4-Pflanze *F. bidentis* exprimiert mehr *PGLP* als für ihr Überleben unter normaler Luft notwendig ist. Eine Reduktion auf etwa 6 % führt aber zu einer Beeinträchtigung der Photosynthese und des Wachstums unter den hier gewählten Bedingungen.
2. Die Reduktion von *PGLP* führt zu einer höheren Empfindlichkeit der Photosynthese gegenüber Sauerstoff. Diese ist wahrscheinlich eine Folge der Akkumulation verschiedener Metabolite unter erhöhten O₂-Konzentrationen, welche Enzyme der Photosynthese inhibieren.

3. Der Metabolismus der C4-Pflanze *F. bidentis* reagiert auf die Reduktion von PGLP unter anderem mit einer Verstärkung alternativer Wege der Respiration zur Energiegewinnung. In diesem Punkt ähnelt ihre Reaktion jener der C3-Pflanze *Arabidopsis thaliana*.
4. Anders als bei der *PGLP*-Mutante von *A. thaliana* oder dem *F. bidentis* Wildtyp akkumulieren die siRNA-Linien Glycolat, welches eventuell durch die Reduktion von Glyoxylat entsteht. Hierbei würde NADPH verbraucht werden, was das Redox-Gleichgewicht wiederherstellen und so der Überreduktion der Elektronentransportkette entgegenwirken könnte.

IV.a Zusammenfassung

Im Rahmen der Photorespiration wird Energie verbraucht und zusätzlich werden NH_3 und CO_2 freigesetzt. Aufgrund dieser Kosten entwickelten sich im Laufe der Zeit verschiedene Mechanismen, um den Bedarf an Photorespiration zu reduzieren. Einen solchen Mechanismus stellt die C4-Photosynthese dar, bei der die finale Fixierung von CO_2 durch Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) ausschließlich in den Bündelscheiden-Zellen (BS-Zellen) stattfindet. Zusammen mit RubisCO sind auch die meisten Enzyme der Photorespiration in vielen C4-Pflanzen spezifisch in den BS-Zellen lokalisiert. In welchem Schritt der C4-Evolution das Enzym 2-Phosphoglycolat-Phosphatase (PGLP) seine Expression entsprechend änderte, ist bisher ebenso unklar wie die Frage, ob dies für die Etablierung der C4-Photosynthese zwingend erforderlich ist. Insgesamt ist die Photorespiration in allen C4-Pflanzen stark reduziert, dennoch wurde beobachtet, dass die C4-Pflanze *Zea mays* ohne eine funktionierende Photorespiration auf Dauer in normaler Luft nicht lebensfähig ist. Die Auswirkungen einer Störung der Photorespiration auf den Metabolismus von C4-Pflanzen sind aber bisher unerforscht.

In dieser Arbeit wurde die Expression des photorespiratorischen Gens *PGLP* in den Spezies *F. bidentis* (C4), *F. trinervia* (C3), *F. brownii* (C4-artig), *F. pubescens* (C2), *F. pringlei* (C3) und *F. robusta* (C3) des Genus *Flaveria* untersucht, welche verschiedene Schritte der C4-Evolution repräsentieren. Zu diesem Zweck wurde jeweils die 5' flankierende Region des *PGLP*-Gens isoliert, verglichen und zur Expression des Reportergens β -Glucuronidase (*GUS*) verwendet. Dabei zeigte sich, dass die 5' flankierenden Regionen der verschiedenen Spezies nur im proximalen Abschnitt eine hohe Ähnlichkeit aufweisen. Trotz dieser Unterschiedlichkeit führten alle getesteten 5' flankierenden Regionen die gleiche Expression des *GUS*-Gens in BS- und Mesophyll-Zellen (M-Zellen) herbei. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl im Hintergrund der C4-Pflanze *F. bidentis* als auch dem der C3-Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Die Gewebespezifität der Expression für BS- und M-Zellen änderte sich auch nicht, wenn zusätzlich zu der 5' flankierenden Region das erste Intron des *PGLP*-Gens in das Konstrukt eingebracht wurde. Verglichen mit den 5' flankierenden Regionen wiesen die Introns des *PGLP*-Gens insgesamt eine höhere Ähnlichkeit in den verschiedenen Spezies auf, was auf die Anwesenheit *cis*-regulatorischer Elemente hindeutet. Anders als bei der Lokalisation der *GUS*-Expression zeigte sich bei der Messung derer Stärke, dass das erste

Intron einen verstärkenden Effekt auf die Expression hat. Insgesamt deuten alle Ergebnisse auf die Expression des *PGLP*-Gens in BS- und M-Zellen in Pflanzen des Genus *Flaveria* hin, unabhängig davon, welchen Schritt der C4-Evolution sie verkörpern.

Zusätzlich zur Expression des *PGLP*-Gens im Genus *Flaveria* wurden auch die Folgen einer siRNA-vermittelten Reduktion des PGLP-Proteinspiegels für die C4-Pflanze *F. bidentis* untersucht. Ziel dessen war es, die Auswirkungen einer Störung der Photorespiration auf den Metabolismus und die Physiologie einer C4-Pflanze zu erforschen. Die siRNA-Linien, deren Proteinspiegel auf ca. 6 % des wildtypischen Niveaus reduziert wurden, zeigten dabei eine verringerte Fähigkeit unter normaler Luft auf Erde zu wachsen. Dieser Effekt konnte durch eine Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 1 % verringert werden, was ihn als photorespiratorischen Phänotyp kennzeichnet. Neben dem Effekt auf das Wachstumsverhalten der siRNA-Linien konnte auch eine signifikant erhöhte Inhibition der Photosynthese durch O₂ detektiert werden, was auf die Akkumulation verschiedener inhibitorischer Metabolite und eine Überreduktion der Elektronentransportkette zurückzuführen ist. Hinsichtlich des Metabolismus zeigten die siRNA-Linien eine Akkumulation verzweigtkettiger Aminosäuren und verschiedener Komponenten des Zitronensäure-Zyklus, die auf eine verstärkte Respiration hindeuteten. Die erfassten Metabolite, die mit der C4-Photosynthese assoziiert sind, zeigten hingegen kaum Veränderungen. Als Alleinstellungsmerkmal gegenüber des *F. bidentis* Wildtyps und der *PGLP*-Mutante von *A. thaliana* akkumulierten die siRNA-Linien Glycolat, was eventuell durch die Reduktion von Glyoxylat durch die Glyoxylat-Reduktase entstand und den Versuch darstellt, das Redox-Gleichgewicht der Zelle wieder herzustellen.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass das Gen *PGLP* im Genus *Flaveria* in BS- und M-Zellen exprimiert wird und seine BS-spezifische Expression demnach kein zwingender Schritt in der C4-Evolution dieses Genus ist. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Störung der Photorespiration in der C4-Pflanze *F. bidentis* durch Reduktion der PGLP-Protein-Spiegel eine Akkumulation von Glycolat sowie eine Verstärkung alternativer der Respirationsarten zur Folge hat und die Fähigkeit der Pflanze in normaler Luft auf Erde zu wachsen beeinträchtigt.

IV.b Summary

In the framework of photorespiration NH_3 and CO_2 are set free and energy is consumed. Due to these costs several mechanisms evolved to reduce the need for photorespiration. One of these mechanisms is the C4 photosynthesis, where the final fixation of CO_2 by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) occurs within the bundle sheath cells (BS). At the site of RubisCO, most enzymes of photorespiration are specifically localized in the BS in many C4 plants. Concerning the photorespiratory enzyme 2-phosphoglycolate phosphatase (PGLP), it is unclear so far, if such a change of localization is needed to perform C4 photosynthesis and in which step of C4 evolution it might occur. All in all photorespiration is severely reduced in C4 plants. However, former studies demonstrate that even in C4 plants a disturbance of photorespiration impairs their ability to sustain in ambient air is reduced. To date the impact of such a disturbance on C4 metabolism and the connection to physiological responses is unknown.

As a part of this work, the expression of the photorespiratory gene *PGLP* was analyzed in the *Flaveria* species *F. bidentis* (C4), *F. trinervia* (C3), *F. brownii* (C4-artig), *F. pubescens* (C2), *F. pringlei* (C3) and *F. robusta* (C3), which all represent different stages of C4 evolution. For this purpose, the 5' flanking region of the *PGLP* gene was isolated, compared and used to express the gene β -Glucuronidase (*GUS*) in the background of the C3 plant *Arabidopsis thaliana* and the C4 plant *F. bidentis*. The comparison of this 5' flanking regions revealed that only their proximal part is similar in the different species. In spite of these differences, all 5' flanking regions mediate the same pattern of *GUS* expression in the BS and the mesophyll (M) cells of *A. thaliana* and *F. bidentis*. This expression pattern was unaffected by addition of *PGLP*'s first intron to the constructs, Compared to the 5' flanking regions the introns of *PGLP* have a higher degree of similarity between the species, indicating the presence of *cis*-regulatory elements conserving the sequence towards C4 evolution. In contrast to the localization of expression, the strength of expression was positively affected under the influence of the first intron. To conclude, all results obtained here indicate that the gene *PGLP* is expressed in BS and M cells in species of genus *Flaveria* independent from the stage they represent in C4 evolution.

In addition to the analysis of *PGLP* gene expression in genus *Flaveria*, the consequence of a siRNA mediated reduction of PGLP protein for the C4 plant *F. bidentis* was investigated. The aim of this was to unravel the impact of a disturbance of photorespiration for C4 metabolism and the connection to physiology. Concerning the siRNA-lines with a PGLP level reduced to about 6 %, an impaired growth on soil in ambient air was observed. This impairment could be reduced, if plants were kept under 1 % CO₂, marking it as a photorespiratory phenotype. Beside the effect on the growth of these siRNA-lines, a significant increase of the inhibition of photosynthesis by O₂ was detected. This increase can be explained by the accumulation of different metabolites that might inhibit photosynthetic enzymes and by an over reduction of the electron transport chain. With regard to the impact on metabolism, the siRNA-lines accumulated branched chained amino acids and several metabolites of the TCA cycle after shifting them from 1 % CO to ambient air, which points to an up regulation of alternative pathways of respiration. In contrast to that the measured metabolites of C4 photosynthesis showed no reaction after the shift. As a unique feature of the PGLP siRNA-lines of *F. bidentis* an accumulation of glycolate was detected. This is possibly caused by a reduction of glyoxylate to glycolate via glyoxylate reductase as an attempt of the plant to restore its redox homeostasis.

In summary, this study showed that the *PGLP* gene is expressed in BS- and M-cells in genus *Flaveria*, demonstrating that its BS-specific expression is no mandatory step for the C4 evolution in this genus. Furthermore, it was shown that a disturbance of the photorespiratory pathway, obtained via reducing the levels of PGLP, lead to an accumulation of glycolat and an enhancement of alternative ways of respiration on the one hand and a reduced ability of the plants to sustain under ambient air on soil on the other hand.

V Literaturverzeichnis

- Akyildiz M, Gowik U, Engelmann S, Koczor M, Streubel M, Westhoff P** (2007) Evolution and Function of a Cis-Regulatory Module for Mesophyll-Specific Gene Expression in the C4 Dicot *Flaveria trinervia*. *The Plant Cell* 19: 3391–3402
- Aldous SH, Weise SE, Sharkey TD, Waldera-Lupa DM, Stühler K, Mallmann J, Groth G, Gowik U, Westhoff P, Arsova B** (2014) Evolution of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Protein Kinase Family in C3 and C4 *Flaveria* spp. *Plant Physiology* 165: 1076-1091
- Anderson LE** (1971) Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes II. Pea Leaf Triose Phosphate Isomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 235: 237-244
- Andrews TJ, Lorimer GH** (1985) Catalytic Properties of a Hybrid between Cyanobacterial Large Subunits and Higher Plant Small Subunits of Ribulose Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 260: 4632-4636
- Andrews TJ, Lorimer GH** (1987) 3 - Rubisco: Structure, Mechanisms, and Prospects for Improvement A2 - Hatch, M.D. In: Boardman NK (ed) *Photosynthesis*. Academic Press, pp 131-218
- Ashida H, Danchin A, Yokota A** (2005) Was Photosynthetic RuBisCO Recruited by Acquisitive Evolution from RuBisCO-Like Proteins Involved in Sulfur Metabolism? *Research in Microbiology* 156: 611-618
- Aubry S, Brown NJ, Hibberd JM** (2011) The Role of Proteins in C3 Plants Prior to Their Recruitment into the C4 Pathway. *Journal of Experimental Botany* 62: 3049-3059
- Badger MR** (1980) Kinetic Properties of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from *Anabaena variabilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 201: 247-254
- Badger MR, Fallahi H, Kaines S, Takahashi S** (2009) Chlorophyll Fluorescence Screening of *Arabidopsis thaliana* for CO₂ Sensitive Photorespiration and Photoinhibition Mutants. *Functional Plant Biology* 36: 867-873
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR** (2010) Photorespiration: Players, Partners and Origin. *Trends in Plant Science* 15: 330-336
- Besnard G, Muasya AM, Russier F, Roalson EH, Salamin N, Christin PA** (2009) Phylogenomics of C4 Photosynthesis in Sedges (*Cyperaceae*): Multiple Appearances and Genetic Convergence. *Molecular Biology and Evolution* 26: 1909-1919
- Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S, Morgenthal K, Bauwe H** (2005) D-GLYCERATE 3-KINASE, the Last Unknown Enzyme in the Photorespiratory Cycle in *Arabidopsis*, belongs to a Novel Kinase Family. *The Plant Cell* 17: 2413-2420
- Borland AM, Maxwell K, Griffiths H** (2000) Ecophysiology of Plants with Crassulacean Acid Metabolism. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 583-605
- Botha CEJ** (1992) Plasmodesmatal Distribution, Structure and Frequency in Relation to Assimilation in C3 and C4 Grasses in Southern Africa. *Planta* 187: 348-358
- Bowes G** (2011) Chapter 5 Single-Cell C4 Photosynthesis in Aquatic Plants. In: Raghavendra SA, Sage FR (eds) *C4 Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 63-80
- Bowes G, Ogren WL, Hageman RH** (1971) Phosphoglycolate Production Catalyzed by Ribulose Diphosphate Carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45: 716-722
- Bräutigam A, Gowik U** (2016) Photorespiration Connects C3 and C4 Photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 67: 2953–2962

- Brown NJ, Newell CA, Stanley S, Chen JE, Perrin AJ, Kajala K, Hibberd JM** (2011) Independent and Parallel Recruitment of Preexisting Mechanisms Underlying C4 Photosynthesis. *Science* 331: 1436-1439
- Bruhl JJW, Karen L** (2007) Towards a Comprehensive Survey of C3 and C4 Photosynthetic Pathways in Cyperaceae. *Aliso* 23
- Chitty JA, Furbank RT, Marshall JS, Chen Z, Taylor WC** (1994) Genetic Transformation of the C4 Plant, *Flaveria bidentis*. *The Plant Journal* 6: 949-956
- Christin P-A, Osborne CP, Sage RF, Arakaki M, Edwards EJ** (2011a) C4 Eudicots are Not Younger than C4 Monocots. *Journal of Experimental Botany* 62: 3171-3181
- Christin P-A, Sage TL, Edwards EJ, Ogburn RM, Khoshravesh R, Sage RF** (2011b) Complex Evolutionary Transitions and the Significance of C3-C4 Intermediate Forms of Photosynthesis in *Molluginaceae*. *Evolution* 65: 643-660
- Christin PA, Besnard G, Samaritani E, Duvall MR, Hodkinson TR, Savolainen V, Salamin N** (2008) Oligocene CO₂ Decline Promoted C4 Photosynthesis in Grasses. *Current Biology* : CB 18: 37-43
- Christin PA, Osborne CP, Chatelet DS, Columbus JT, Besnard G, Hodkinson TR, Garrison LM, Vorontsova MS, Edwards EJ** (2013) Anatomical Enablers and the Evolution of C4 Photosynthesis in Grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 110: 1381-1386
- Christin PA, Salamin N, Savolainen V, Duvall MR, Besnard G** (2007) C4 Photosynthesis Evolved in Grasses via Parallel Adaptive Genetic Changes. *Current Biology*: CB 17: 1241-1247
- Edwards EJ, Smith SA** (2010) Phylogenetic Analyses Reveal the Shady History of C4 Grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107: 2532-2537
- Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenskaya EV** (2004) Single-Cell C4 Photosynthesis Versus the Dual-Cell (Kranz) Paradigm. *Annual Review of Plant Biology* 55: 173-196
- Edwards GE, Ku MSB** (1987) Biochemistry of C3-C4 Intermediates. In: Hatch MD, Boardman NK (eds) *The Biochemistry of Plants*, Vol. 10. Academic Press, Inc., New York, pp 275-325
- Edwards GE, Voznesenskaya EV** (2011) Chapter 4 C4 Photosynthesis: Kranz Forms and Single-Cell C4 in Terrestrial Plants. In: Raghavendra SA, Sage FR (eds) *C4 Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 29-61
- Ehleringer JR, Cerling TE, Helliker BR** (1997) C4 Photosynthesis, Atmospheric CO₂, and Climate. *Oecologia* 112: 285-299
- Ehleringer JR, Sage RF, Flanagan LB, Pearcy RW** (1991) Climate Change and the Evolution of C4 Photosynthesis. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 95-99
- Eisenhut M, Kahlon S, Hasse D, Ewald R, Lieman-Hurwitz J, Ogawa T, Ruth W, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M** (2006) The Plant-Like C2 Glycolate Cycle and the Bacterial-Like Glycerate Pathway Cooperate in Phosphoglycolate Metabolism in Cyanobacteria. *Plant physiology* 142: 333-342
- 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 USA* 105: 17199-17204
- Ellis RJ** (1979) The Most Abundant Protein in the World. *Trends in Biochemical Sciences* 4: 241-244
- 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 Nonphotorespiratory Conditions. *Plant Physiology* 144: 1328-1335

- Engelmann S, Bläsing OE, Gowik U, Svensson P, Westhoff P** (2003) Molecular Evolution of C4 Phosphoenolpyruvate Carboxylase in the Genus *Flaveria*—a Gradual Increase from C3 to C4 Characteristics. *Planta* 217: 717-725
- Evert RF, Russin WA, Botha CEJ** (1996) Distribution and Frequency of Plasmodesmata in Relation to Photoassimilate Pathways and Phloem Loading in the Barley Leaf. *Planta* 198: 572-579
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 60: 455-484
- Furbank RT** (2011) Evolution of the C4 Photosynthetic Mechanism: Are There Really Three C4 Acid Decarboxylation Types? *Journal of Experimental Botany* 62: 3103–3108
- Furbank RT** (2016) Walking the C4 Pathway: Past, Present, and Future. *Journal of Experimental Botany* 67 4057–4066
- Golbeck JH, Martin IF, Velthuys BR, Radmer R** (1981) A Critical Reassessment of the Photosystem II Content in Bundle Sheath Chloroplasts of Young Leaves of *Zea mays*. In: Akoyunoglou J (ed) Proceedings of the Vth International Congress of Photosynthesis, Vol. 5, Chloroplast Development. Balaban International Science Services, Philadelphia, pp 533-546
- Gowik U, Westhoff P** (2011) The Path from C3 to C4 Photosynthesis. *Plant Physiology* 155: 56-63
- Griffiths H, Weller G, Toy LMF, Dennis RJ** (2012) You're So Vein: Bundle Sheath Physiology, Phylogeny and Evolution in C3 and C4 Plants. *Plant, Cell and Environment* 36:249-261
- Gutteridge S, Gatenby AA** (1995) Rubisco Synthesis, Assembly, Mechanism, and Regulation. *The Plant Cell* 7: 809-819
- Haberlandt G** (1904) Physiologische Pflanzenanatomie. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Hanson TE, Tabita FR** (2001) A Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RubisCO)-Like Protein from *Chlorobium tepidum* that is Involved with Sulfur Metabolism and the Response to Oxidative Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 4397-4402
- Hartman FC, Harpel MR** (1994) Structure, Function, Regulation, and Assembly of D-Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Annual Review of Biochemistry* 63: 197-234
- Hatch MD, Kagawa T, Craig S** (1975) Subdivision of C4 Pathway Species Based on Differing C4 Acid Decarboxylating Systems and Ultrastructural Features. *Australian Journal of Plant Physiology* 2: 111-128
- Häusler RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, Schubert S, Kreuzaler F, Hirsch HJ** (2001) Single and Double Overexpression of C4-Cycle Genes Had Differential Effects on the Pattern of Endogenous Enzymes, Attenuation of Photorespiration and on Contents of UV Protectants in Transgenic Potato and Tobacco Plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 1785-1803
- Heckmann D, Schulze S, Denton A, Gowik U, Westhoff P, Weber Andreas PM, Lercher Martin J** (2013) Predicting C4 Photosynthesis Evolution: Modular, Individually Adaptive Steps on a Mount Fuji Fitness Landscape. *Cell* 153: 1579-1588
- Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C** (2003) Identification of Photorespiratory Glutamate:glyoxylate Aminotransferase (GGAT) Gene in Arabidopsis. *The Plant Journal* 33: 975-987
- J. Bloom A, Burger M, A. Kimball B, J. Pinter JP** (2014) Nitrate Assimilation Is Inhibited by Elevated CO₂ in Field-Grown Wheat. *Nature Climate Change* 4: 477-480

- Jordan DB, Ogren WL** (1981) Species Variation in the Specificity of Ribulose Biphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Nature* 291: 513-515
- Jordan DB, Ogren WL** (1984) The CO₂/O₂ Specificity of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Planta* 161: 308-313
- Kanai R, Edwards GE** (1999) The Biochemistry of C₄ Photosynthesis. In: Sage RF, Monson RK (eds) *C₄ Plant Biology*. Academic Press, San Diego, pp 49-87
- Kane H, Viil J, Entsch B, Paul K, Morell M, Andrews T** (1994) An Improved Method for Measuring the CO₂/O₂ Specificity of Ribulosebisphosphate Carboxylase-Oxygenase. *Functional Plant Biology* 21: 449-461
- Kanzaki Y, Murakami T** (2015) Estimates of Atmospheric CO₂ in the Neoproterozoic–Paleoproterozoic from Paleosols. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 159: 190-219
- Kapralov MV, Kubien DS, Andersson I, Filatov DA** (2011) Changes in Rubisco Kinetics During the Evolution of C₄ Photosynthesis in *Flaveria* (*Asteraceae*) are Associated with Positive Selection on Genes Encoding the Enzyme. *Molecular Biology and Evolution* 28: 1491-1503
- Keeling PJ** (2013) The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. *Annual Review of Plant Biology* 64: 583-607
- Keerberg O, Pärnik T, Ivanova H, Bassüner B, Bauwe H** (2014) C₂ Photosynthesis Generates about 3-Fold Elevated Leaf CO₂ Levels in the C₃–C₄ Intermediate Species *Flaveria pubescens*. *Journal of Experimental Botany* 65:3649-56
- Kelly GJ, Latzko E** (1976) Inhibition of Spinach-Leaf Phosphofructokinase by 2-Phosphoglycollate. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 68: 55-58
- Keys A** (2006) The Re-Assimilation of Ammonia Produced by Photorespiration and the Nitrogen Economy of C₃ Higher Plants. *Photosynthesis Research* 87: 165-175
- Knight S, Andersson I, Brändén C-I** (1990) Crystallographic Analysis of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase from Spinach at 2.4 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 215: 113-160
- Ku MSB, Wu J, Dai Z, Scott RA, Chu C, Edwards GE** (1991) Photosynthetic and Photorespiratory Characteristics of *Flaveria* Species. *Plant Physiology* 96: 518-528
- Kump LR** (2008) The Rise of Atmospheric Oxygen. *Nature* 451: 277-278
- Laing WA, Ogren WL, Hageman RH** (1974) Regulation of Soybean Net Photosynthetic CO₂ Fixation by the Interaction of CO₂, O₂, and Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase. *Plant Physiology* 54: 678-685
- Lorimer GH, Andrews TJ, Pierce J, Schloss JV** (1986) 2'-Carboxy-3-Keto-D-Arabinitol 1,5-Bisphosphate, the Six-Carbon Intermediate of the Ribulose Bisphosphate Carboxylase Reaction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 313: 397-407
- Ludwig M** (2011) The Molecular Evolution of β-Carbonic Anhydrase in *Flaveria*. *Journal of Experimental Botany* 62: 3071-3081
- Lundgren MR, Osborne CP, Christin P-A** (2014) Deconstructing Kranz Anatomy to Understand C₄ Evolution. *Journal of Experimental Botany* 65: 3357-3369
- Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ** (2014) The Rise of Oxygen in Earth's Early Ocean and Atmosphere. *Nature* 506: 307-315
- Lyu M-JA, Gowik U, Kelly S, Covshoff S, Mallmann J, Westhoff P, Hibberd JM, Stata M, Sage RF, Lu H, Wei X, Wong GK-S, Zhu X-G** (2015) RNA-Seq Based Phylogeny Recapitulates Previous Phylogeny of the Genus *Flaveria* (*Asteraceae*) with Some Modifications. *BMC Evolutionary Biology* 15: 1-14

- Majeran W, Friso G, Ponnala L, Connolly B, Huang M, Reidel E, Zhang C, Asakura Y, Bhuiyan NH, Sun Q, Turgeon R, van Wijk KJ** (2010) Structural and Metabolic Transitions of C4 Leaf Development and Differentiation Defined by Microscopy and Quantitative Proteomics in Maize. *The Plant Cell* 22: 3509-3542
- Mallmann J, Heckmann D, Bräutigam A, Lercher MJ, Weber APM, Westhoff P, Gowik U** (2014) The Role of Photorespiration during the Evolution of C4 Photosynthesis in the Genus *Flaveria*. *eLife* 3: e02478
- McKown AD, Dengler NG** (2007) Key Innovations in the Evolution of Kranz Anatomy and C4 Vein Pattern in *Flaveria* (*Asteraceae*). *American Journal of Botany* 94: 382-399
- McKown AD, Moncalvo J-M, Dengler NG** (2005) Phylogeny of *Flaveria* (*Asteraceae*) and Inference of C4 Photosynthesis Evolution. *American Journal of Botany* 92: 1911-1928
- Meierhoff K, Westhoff P** (1993) Differential Biogenesis of Photosystem II in Mesophyll and Bundle-Sheath Cells of Monocotyledonous NADP-Malic Enzyme-Type C4 Plants: the Non-Stoichiometric Abundance of the Subunits of Photosystem II in the Bundle-Sheath Chloroplasts and the Translational Activity of the Plastome-Encoded Genes. *Planta* 191: 23-33
- Monson RK, Moore Bd** (1989) On the Significance of C3-C4 intermediate photosynthesis to the evolution of C4 Photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 12: 689-699
- Monson RK, Rawsthorne S** (2000) CO₂ Assimilation in C3-C4 Intermediate Plants. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 533-550
- Monson RK, Teeri JA, Ku MSB, Gurevitch J, Mets LJ, Dudley S** (1988) Carbon-Isotope Discrimination by Leaves of *Flaveria* Species Exhibiting Different Amounts of C3-and C4-Cycle Co-Function. *Planta* 174: 145-151
- Moore PD** (1983) Plants and the Palaeoatmosphere. *Journal of the Geological Society* 140: 13-25
- Morell MK, Paul K, O'Shea NJ, Kane HJ, Andrews TJ** (1994) Mutations of an Active Site Threonyl Residue Promote Beta Elimination and Other Side Reactions of the Enediol Intermediate of the Ribulosebiphosphate Carboxylase Reaction. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8091-8098
- Moroney J, Jungnick N, DiMario R, Longstreth D** (2013) Photorespiration and Carbon Concentrating Mechanisms: Two Adaptations to High O₂, Low CO₂ Conditions. *Photosynthesis Research* 117: 121-131
- Moroney JV, Ma Y, Frey WD, Fusilier KA, Pham TT, Simms TA, DiMario RJ, Yang J, Mukherjee B** (2011) The Carbonic Anhydrase Isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: Intracellular Location, Expression, and Physiological Roles. *Photosynthesis Research* 109: 133-149
- Muhaidat R, Sage TL, Frohlich MW, Dengler NG, Sage RF** (2011) Characterization of C3-C4 Intermediate Species in the Genus *Heliotropium L.* (*Boraginaceae*): Anatomy, Ultrastructure and Enzyme Activity. *Plant, Cell and Environment* 34: 1723-1736
- Nardini A, Pedà G, Rocca NL** (2012) Trade-Offs between Leaf Hydraulic Capacity and Drought Vulnerability: Morpho-Anatomical Bases, Carbon Costs and Ecological Consequences. *New Phytologist* 196: 788-798
- Nisbet EG, Grassineau NV, Howe CJ, Abell PI, Regelous M, Nisbet RER** (2007) The Age of Rubisco: the Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Geobiology* 5: 311-335
- Osborne CP, Freckleton RP** (2009) Ecological Selection Pressures for C4 Photosynthesis in the Grasses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276: 1753-1760

- Osborne CP, Sack L** (2012) Evolution of C4 Plants: a New Hypothesis for an Interaction of CO₂ and Water Relations Mediated by Plant Hydraulics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 367: 583-600
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Madgwick PJ, Keys AJ** (2003) Manipulation of Rubisco: the Amount, Activity, Function and Regulation. *Journal of Experimental Botany* 54: 1321-1333
- Paulus JK, Schlieper D, Groth G** (2013) Greater Efficiency of Photosynthetic Carbon Fixation due to Single Amino-Acid Substitution. *Nature Communications* 4: 1518
- Peterhänzel C, Horst I, Niessen M, Blume C, Kebeish R, Kürkcüoglu S, Kreuzaler F** (2010) Photorespiration. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD
- Pick TR, Bräutigam A, Schulz MA, Obata T, Fernie AR, Weber APM** (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 USA* 110: 3185-3190
- Price GD, Badger MR, Woodger FJ, Long BM** (2008) Advances in Understanding the Cyanobacterial CO₂-Concentrating-Mechanism (CCM): Functional Components, Ci Transporters, Diversity, Genetic Regulation and Prospects for Engineering into Plants. *Journal of Experimental Botany* 59: 1441-1461
- Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoerberichts FA, Vandorpe M, Gakière B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, 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. *The Plant Journal* 52: 640-657
- Rawat M, Henk MC, Lavigne LL, Moroney JV** (1996) *Chlamydomonas reinhardtii* Mutants Without Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase Lack a Detectable Pyrenoid. *Planta* 198: 263-270
- Reumann S, Weber APM** (2006) Plant Peroxisomes Breathe in the Light: Some Gaps of the Photorespiratory C₂ Cycle Have Become Filled - Others Remain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 1496-1510
- Roalson EH** (2011) Chapter 16 C₄ Photosynthesis Origins in the Monocots: A Review and Reanalysis. In: Raghavendra SA, Sage FR (eds) *C₄ Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 319-338
- Rodermel S** (1999) Subunit Control of Rubisco Biosynthesis - a Relic of an Endosymbiotic past? *Photosynthesis Research* 59: 105-123
- Sage RF** (2004) The Evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341-370
- Sage RF** (2013) Photorespiratory Compensation: a Driver for Biological Diversity. *Plant Biology* 15: 624-638
- Sage RF, Christin PA, Edwards EJ** (2011a) The C₄ Plant Lineages of Planet Earth. *Journal of Experimental Botany* 62: 3155-3169
- Sage RF, Khoshravesh R, Sage TL** (2014) From Proto-Kranz to C₄ Kranz: Building the Bridge to C₄ Photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 65: 3341-3356
- Sage RF, Li M, Monson RK** (1999) The Taxonomic Distribution of C₄ Photosynthesis. In: Sage RF, Monson RK (eds) *C₄ Plant Biology*. Academic Press, San Diego, pp 551-584
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F** (2012) Photorespiration and the Evolution of C₄ Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 63: 19-47
- Sage RF, Stata M** (2015) Photosynthetic Diversity Meets Biodiversity: The C₄ Plant Example. *Journal of Plant Physiology* 172: 104-119

- Sage TL, Sage RF, Vogan PJ, Rahman B, Johnson DC, Oakley JC, Heckel MA** (2011b) The Occurrence of C2 Photosynthesis in *Euphorbia* Subgenus *Chamaesyce* (*Euphorbiaceae*). *Journal of Experimental Botany* 62: 3183-3195
- Savir Y, Noor E, Milo R, Tlustý T** (2010) Cross-Species Analysis Traces Adaptation of Rubisco toward Optimality in a Low-Dimensional Landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107: 3475-3480
- Schulze S, Mallmann J, Burscheidt J, Koczor M, Streubel M, Bauwe H, Gowik U, Westhoff P** (2013) Evolution of C4 Photosynthesis in the Genus *Flaveria*: Establishment of a Photorespiratory CO₂ Pump. *The Plant Cell Online* 25: 2522-2535
- Schwarte S, Bauwe H** (2007) Identification of the Photorespiratory 2-Phosphoglycolate Phosphatase, PGLP1, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 1580-1586
- Sharkey TD, Kobza J, Seemann JR, Brown RH** (1988) Reduced Cytosolic Fructose-1,6-Bisphosphatase Activity Leads to Loss of O₂ Sensitivity in a *Flaveria linearis* Mutant. *Plant Physiology* 86: 667-671
- Somerville CR** (2001) An Early *Arabidopsis* Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration. *Plant Physiology* 125: 20-24
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) A Phosphoglycolate Phosphatase-Deficient Mutant of *Arabidopsis*. *Nature* 280: 833-836
- Somerville CR, Ogren WL** (1980) Photorespiration Mutants of *Arabidopsis thaliana* Deficient in Serine-Glyoxylate Aminotransferase Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 77: 2684-2687
- Sørhagen K, Laxa M, Peterhänsel C, Reumann S** (2013) The Emerging Role of Photorespiration and Non-Photorespiratory Peroxisomal Metabolism in Pathogen Defence. *Plant Biology* 15: 723-736
- Sowiński P, Szczepanik J, Minchin PE** (2008) On the Mechanism of C4 Photosynthesis Intermediate Exchange between Kranz Mesophyll and Bundle Sheath Cells in Grasses. *Journal of Experimental Botany* 59: 1137-1147
- Tabita FR** (1999) Microbial Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase: A Different Perspective. *Photosynthesis Research* 60: 1-28
- Tcherkez G** (2013) Modelling the Reaction Mechanism of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Consequences for Kinetic Parameters. *Plant, Cell and Environment* 36: 1586-1596
- Tcherkez GGB, Farquhar GD, Andrews TJ** (2006) Despite Slow Catalysis and Confused Substrate Specificity, all Ribulose Bisphosphate Carboxylases May Be Nearly Perfectly Optimized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 7246-7251
- Timm S, Bauwe H** (2013) The Variety of Photorespiratory Phenotypes – Employing the Current Status for Future Research Directions on Photorespiration. *Plant Biology* 15: 737-747
- Timm S, Florian A, Jahnke K, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Bauwe H** (2011) The Hydroxypyruvate-Reducing System in *Arabidopsis*: Multiple Enzymes for the Same End. *Plant physiology* 155: 694-705
- Timm S, Mielewicz M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H** (2012) High-to-Low CO₂ Acclimation Reveals Plasticity of the Photorespiratory Pathway and Indicates Regulatory links to Cellular Metabolism of *Arabidopsis*. *Public Library of Science ONE* 7: e42809
- 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 Hydroxypyruvate to Glycerate during Photorespiration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 20: 2848-2859

- Vicentini A, Barber JC, Aliscioni SS, Giussani LM, Kellogg EA** (2008) The Age of the Grasses and Clusters of Origins of C4 Photosynthesis. *Global Change Biology* 14: 2963-2977
- 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 Biology* 15: 713-722
- Walker BJ, South PF, Ort DR** (2016) Physiological Evidence for Plasticity in Glycolate/Glycerate Transport during Photorespiration. *Photosynthesis Research* 129: 93-103
- Westhoff P, Gowik U** (2010) Evolution of C4 Photosynthesis - Looking for the Master Switch. *Plant Physiology* 154: 598-601
- Woo KC, Anderson JM, Boardman NK, Downton WJS, Osmond CB, Thorne SW** (1970) Deficient Photosystem II in Agranal Bundle Sheath Chloroplasts of C4 Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 67: 18-25
- Yeates TO, Kerfeld CA, Heinhorst S, Cannon GC, Shively JM** (2008) Protein-Based Organelles in Bacteria: Carboxysomes and Related Microcompartments. *Nature Reviews Microbiology* 6: 681-691
- Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP** (2009) High Glycolate Oxidase Activity Is Required for Survival of Maize in Normal Air. *Plant Physiology* 149: 195-204
- Zhu G, Jensen RG, Bohnert HJ, Wildner GF, Schlitter J** (1998) Dependence of Catalysis and CO₂/O₂ Specificity of Rubisco on the Carboxy-Terminus of the Large Subunit at Different Temperatures. *Photosynthesis Research* 57: 71-79

VI.a Die Expression des photorespiratorischen Gens *2-Phosphoglycolat-Phosphatase* im Genus *Flaveria*

Myles Levey¹, Stefanie Schulze¹, Maria Koczor¹, Monika Streubel¹, Udo Gowik¹ und Yuri Munekage²

¹ Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Universitätsstraße 1, Heinrich-Heine-Universität, 40225 Düsseldorf, Deutschland

² School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, 2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo, 669-1337 Japan

Zusammenfassung

Diese Studie untersucht die Expression des photorespiratorischen Gens *2-Phosphoglycolat-Phosphatase (PGLP)* in verschiedenen Schritten der C₄-Evolution. Hierfür wurden die 5' flankierenden Regionen und Introns des *PGLP*-Gens aus C₃-, C₂-, C₄-artigen und C₄-Pflanzen der Gattung *Flaveria* isoliert und hinsichtlich ihrer Sequenz und Expressionseigenschaften miteinander verglichen. Die Expressionseigenschaften wurde dabei mit Hilfe der β -Glucuronidase (*GUS*) in der C₄-Pflanze *Flaveria bidentis* und der C₃-Pflanze *Arabidopsis thaliana* analysiert. Der Vergleich der Sequenzen ergab eine hohe Ähnlichkeit der verschiedenen Spezies im proximalen Abschnitt der 5' flankierenden Region sowie den Introns des *PGLP*-Gens. Das erste Intron wies dabei den größten Unterschied zwischen C₃- und C₄-Spezies auf und lies sich in bis zu fünf Bereiche unterteilen, die jedoch nicht ausnahmslos in allen Spezies vorhanden sind. Zudem vermittelten alle 5' flankierenden Regionen sowohl allein als auch in Kombination mit dem ersten Intron eine Expression in den Bündelscheiden- und Mesophyll-Zellen. Die Anwesenheit des ersten Introns erhöhte dabei jeweils die Stärke der vermittelten *GUS*-Expression, wobei das erste Intron der C₃-Pflanze *Flaveria pringlei* hier eine Ausnahme bildet. Insgesamt deutet die Untersuchung auf eine Expression des *PGLP*-Gens in Bündelscheiden- und Mesophyll-Zellen von C₃-, C₂-, C₄-artigen und C₄-Pflanzen im Genus *Flaveria* hin. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die spezifische Expression von *PGLP* keinen zwingenden Schritt in der Evolution der C₄-Photosynthese repräsentiert.

1 Einleitung

Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) kann neben der Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) auch dessen Oxygenierung katalysieren. Der K_M für CO_2 ist dabei 40 bis 50-fach niedriger als für O_2 , sodass die Carboxylierung als die Hauptreaktion bezeichnet werden kann, während die Oxygenierung eine Nebenreaktion darstellt (Jordan and Ogren 1981; Tcherkez et al. 2006). Als RubisCO vor etwa 3 Milliarden Jahren entstand, war gasförmiges O_2 nur in Spuren vorhanden, wohingegen die CO_2 -Konzentration in der Erdatmosphäre deutlich höher war als heute (Kanzaki and Murakami 2015; Kump 2008; Lyons et al. 2014; Nisbet et al. 2007). Aufgrund dieser Verhältnisse und der höheren Spezifität der RubisCO für CO_2 , kam es in der Entstehungszeit der RubisCO nur selten zu Oxygenierungs-Reaktionen. Daher bestand kein hoher Selektionsdruck auf der Vermeidung dieser Oxygenierungs-Reaktion. Als die O_2 -Konzentration in der Erdatmosphäre mit der Zeit zunahm und gleichzeitig die CO_2 -Konzentration sank, war es offenbar nicht mehr möglich die Spezifität der RubisCO für CO_2 zu erhöhen, ohne gleichzeitig die Geschwindigkeit der Katalyse zu reduzieren (Arndt and Nisbet 2012; Lyons et al. 2014; Nisbet et al. 2007; Savir et al. 2010; Tcherkez et al. 2006). Als Folge dessen macht die Oxygenierungs-Reaktion heute etwa 25 % der gesamten katalytischen Aktivität der RubisCO aus, wobei dieser Anteil mit steigender Temperatur zunimmt (Jordan and Ogren 1984; Laing et al. 1974; Sage 2004; Sharkey et al. 1988; Tcherkez et al. 2006).

Das Resultat der Carboxylierungs-Reaktion sind zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3-PGA). Dieses Triosephosphat kann zur Synthese von Saccharose oder Stärke sowie zur Regeneration von RuBP verwendet werden. Das Resultat der Oxygenierungs-Reaktion ist hingegen ein Molekül 2-Phosphoglycerat (2-PG) und ein Molekül 3-PGA (Bowes et al. 1971). Im Gegensatz zu 3-PGA kann 2-PG nicht in den Zucker-Stoffwechsel eingehen, sondern inhibiert durch seine Akkumulation sowohl die Phosphofruktokinase als auch die Triosephosphat-Isomerase (Anderson 1971; Kelly and Latzko 1976). Um eine Beeinträchtigung des Stoffwechsels durch 2-PG möglichst gering zu halten, nutzen Pflanzen die Photorespiration. Im Zuge der Photorespiration werden zwei Moleküle 2-PG zu einem Molekül 3-PGA umgesetzt und somit entfernt. Dabei werden auch je ein Molekül CO_2 und NH_3 freigesetzt, welche anschließend refixiert werden können. Sowohl für die Umsetzung von 2-PG zu 3-PGA als auch für die Refixierung von

CO₂ und NH₃ muss die Pflanze Energie in Form von ATP investieren. Aufgrund dessen profitieren Pflanzen davon, wenn sie die Oxygenierungs-Reaktion der RubisCO umgehen und so die Photorespirationsrate mit dem einhergehenden ATP-Verbrauch reduzieren.

Eine solche Reduktion der Photorespiration wird in einigen Pflanzen durch eine erhöhte CO₂-Konzentration um RubisCO erreicht, da so die Oxygenierungs-Reaktion minimiert wird. Zwei mögliche Mechanismen zur Konzentrierung von CO₂ um RubisCO sind die C₄- und die C₂-Photosynthese (Hatch 1971; Monson et al. 1984; Sage et al. 2012). In beiden Photosynthese-Typen wird CO₂ von den Mesophyll-Zellen (M-Zellen) zu den Bündelscheiden-Zellen (BS-Zellen) gepumpt und so in den BS-Zellen angereichert. Bei den C₄-Pflanzen geschieht dies durch den Transport einer der C₄-Säuren Malat oder Aspartat und in C₂-Pflanzen über den Transport von Glycin. Die C₄-Säuren entstehen durch die Vorfixierung von CO₂ in den M-Zellen durch das O₂-unempfindliche Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC). Das von den C₂-Pflanzen verwendete Glycin ist hingegen ein Metabolit der Photorespiration. C₂-Pflanzen nutzen also die Photorespiration in den M-Zellen, um die Photorespiration in den BS-Zellen zu reduzieren. Die Freisetzung des CO₂ in den BS-Zellen erfolgt in C₂-Pflanzen über den photorespiratorischen Glycin-Decarboxylase-Komplex (GDC) und in den C₄-Pflanzen über eines von zwei Malat-Enzymen oder die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Edwards et al. 1971; Hatch and Kagawa 1976; Sage et al. 2012). Ein wesentlicher Unterschied zwischen C₂- und C₄-Photosynthese ist, dass RubisCO in C₄-Pflanzen spezifisch in den BS-Zellen lokalisiert ist, während es in C₂-Pflanzen auch in den M-Zellen vorkommt (Sage et al. 2012). Dementsprechend ist die CO₂-Fixierung in C₄-Pflanzen auf die BS-Zellen beschränkt, während sie in C₂-Pflanzen auch in den M-Zellen stattfindet. Durch die Beschränkung der CO₂-Fixierung auf die mit CO₂ angereicherten BS-Zellen, ist die Reduktion der Photorespiration in C₄-Pflanzen deutlich ausgeprägter als in C₂-Pflanzen (Dai et al. 1996; Mallmann et al. 2014).

Die Funktionsweise beider Photosynthese-Typen bedingt eine unterschiedliche Expression verschiedener Gene in M- und BS-Zellen. Ein Beispiel für ein in M- und BS-Zellen unterschiedlich exprimiertes Gen ist *PEPC*, welches im Verlauf der C₄-Evolution immer stärker in den M-Zellen exprimiert wird, um hier CO₂ vorzufixieren (Furbank 2016; Hatch 1971). Die Untereinheit P (GLDP) des Enzymkomplexes GDC ist hingegen ein Beispiel für ein Gen, dessen Expression in C₄-Pflanzen spezifisch in den BS-Zellen stattfindet (Döring et al. 2016; Engelmann et al. 2008; Sage et al. 2014). Als

Teil des GDC ist GLDP für die Freisetzung von CO₂ aus Glycin mitverantwortlich. Die zunehmende Expression von *GLDP* in den BS-Zellen ist dabei ein Hauptmerkmal der C2-Photosynthese und gleichzeitig ein entscheidender Schritt in der stufenartigen Evolution der C4-Photosynthese (Heckmann et al. 2013; Schulze et al. 2016). Aus diesem Grund gilt die C2-Photosynthese auch als ein Zwischenschritt in der Evolution von C3- zur C4-Photosynthese (Bauwe 2011; Heckmann et al. 2013; Mallmann et al. 2014; Schulze et al. 2016). Im Gegensatz zu *GLDP* ist für die anderen Gene der Photorespiration nicht geklärt, ob und zu welchem Zeitpunkt der C4-Evolution sie ihre Expression auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt haben. Untersuchungen an den C4-Pflanzen *Sorghum bicolor* und *Zea mays* legen aber nahe, dass letztlich die meisten Gene der Photorespiration *GLDP* folgen und im Laufe der C4-Evolution spezifisch für die BS-Zellen werden (Chang et al. 2012; Döring et al. 2016; Li et al. 2010).

In dieser Studie soll nun die Expression des photorespiratorischen Gens *2-Phosphoglycolat-Phosphatase (PGLP)* in verschiedenen Schritten der C4-Evolution untersucht werden. Das Enzym PGLP setzt 2-PG im ersten Schritt der Photorespiration zu Glycolat um und entfernt so ein sehr giftiges Metabolit dieses Stoffwechselweges (Somerville and Ogren 1979; Timm and Bauwe 2013). Zur Untersuchung der Expression von *PGLP* wird das Genus *Flaveria* genutzt, welches neben C4- auch über C3- und C2-Pflanzen sowie C4-artige Pflanzen verfügt (Abb. 1). Dies ermöglicht es, die Expression an nahe verwandten Pflanzen zu analysieren, welche unterschiedliche Schritte der C4-Evolution repräsentieren (McKown et al. 2005). Hierdurch sind Rückschlüsse auf die Art und den Mechanismus der Expression von *PGLP* in verschiedenen Schritten der C4-Evolution möglich.

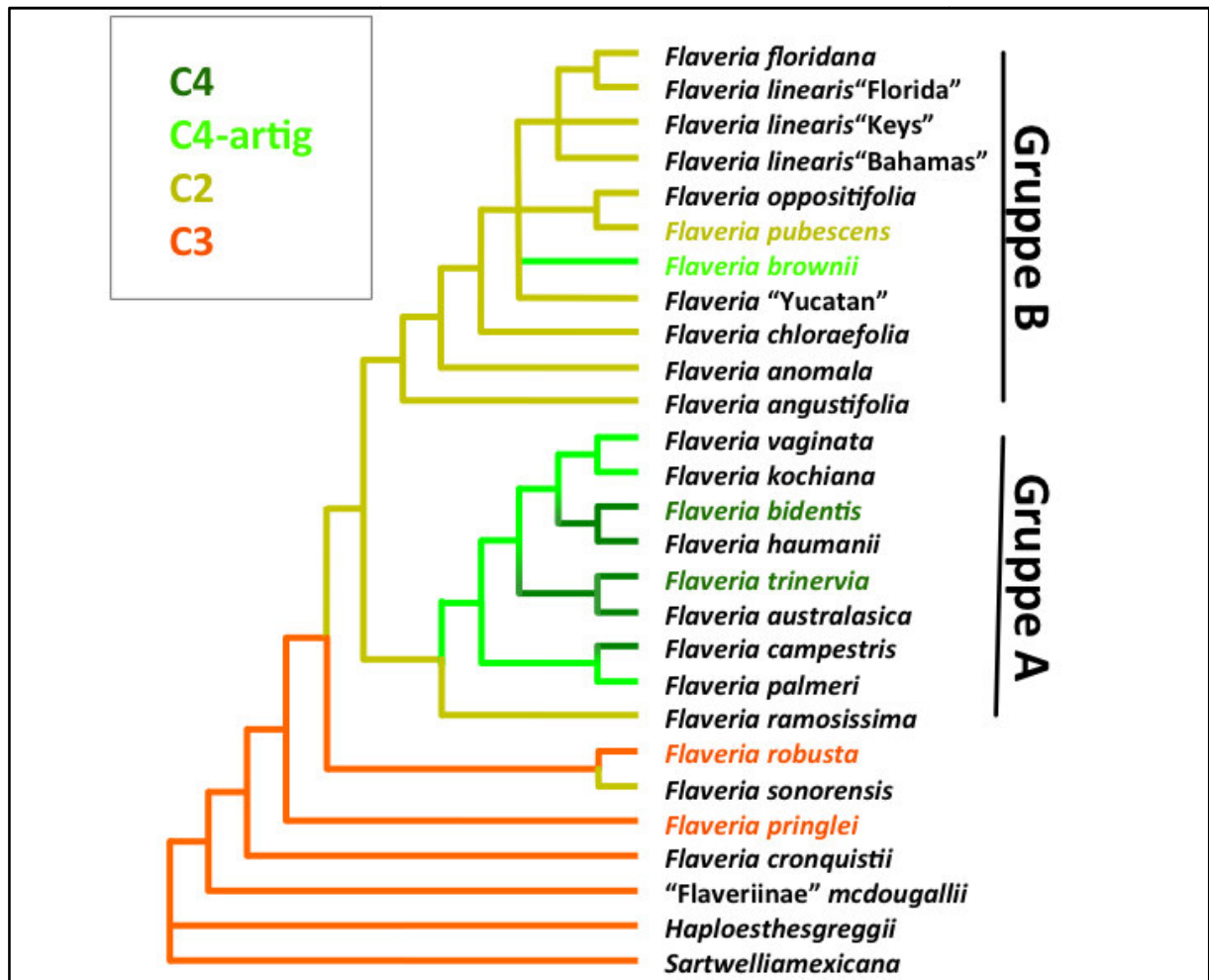


Abbildung 1: Stammbaum des Genus *Flaveria*. Verändert nach McKown et al. (2005). Die Namen der in dieser Studie verwendeten *Flaveria*-Spezies sind farbig markiert. Die Farbe des Stammbaum-Astes gibt den jeweiligen Photosynthese-Typ wieder.

2 Ergebnis

2.1 Isolation und Sequenzvergleich der 5' flankierenden Region des *PGLP*-Gens aus verschiedenen Spezies der Gattung *Flaveria*

Zur Untersuchung der Expression des *PGLP*-Gens in verschiedenen Schritten der C4-Evolution werden in dieser Studie *Flaveria*-Spezies unterschiedlichen Photosynthese-Typs verwendet. Wie vergleichbare Untersuchungen an den Genen *GLDP* und *PEPC* belegen, kann die Expression eines Gens maßgeblich durch *cis*-regulatorische Elemente in dessen 5' flankierender Region bestimmt werden (Adwy et al. 2015; Akyildiz et al. 2007; Engelmann et al. 2008). Aus diesem Grund wurde hier zuerst die 5' flankierende Region des *PGLP*-Gens untersucht.

Mittels Genome Walking (Clontech) wurden zunächst aus den Spezies *F. trinervia* (C4), *F. brownii* (C4-artig), *F. pubescens* (C2) und *F. pringlei* (C3) jeweils mindestens 1089 Basenpaare (bp) der 5' flankierenden Region des *PGLP*-Gens isoliert. Zusätzlich wurde die 5' flankierende Region von *F. bidentis* (C4) und *F. robusta* (C3) aus den Genom-Sequenzen dieser beiden Spezies entnommen (Gowik & Munekage, unveröffentlicht).

Diese sechs 5' flankierenden Regionen wurden nun mittels BLAST2seq paarweise miteinander verglichen, um so gemeinsame Elemente in den Sequenzen zu finden. Dabei ermittelte BLAST2seq in allen Sequenzvergleichen gemeinsame Elemente in der Nähe der Translationsstart-Sequenz des *PGLP*-Gens. Die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung (e-value) innerhalb dieses proximalen Abschnitts der 5' flankierenden Regionen wurde dabei von BLAST2seq mit Werten von $2e^{-34}$ (*F. trinervia* zu *F. robusta*) bis $1e^{-75}$ (*F. trinervia* zu *F. bidentis*) berechnet. Aufgrund dieser Wahrscheinlichkeiten und da sich das Ergebnis in allen Sequenzvergleichen ähnelte, werden diese Elemente als nicht-zufällig betrachtet. Abgesehen von den Elementen im proximalen Abschnitt identifizierte BLAST2seq nur Elemente, die mit einer Wahrscheinlichkeit von über $1e^{-2}$ auftreten. Diese Elemente sind dabei über die komplette 5' flankierende Region verteilt und in jedem Sequenzvergleich unterschiedlich. Aufgrund der hohen Auftretswahrscheinlichkeit und da sich keinerlei Muster erkennen ließ, werden diese Elemente als zufällig betrachtet und im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Alle gemeinsamen Elemente befinden sich somit im proximalen Abschnitt der 5' flankierenden Region. Zur besseren Vergleichbarkeit des proximalen Abschnitts wurde dieser als die ersten 256 bp der 5' flankierenden Region definiert. Dies entspricht der Sequenz, die von BLAST2seq als übereinstimmend zwischen *F. trinervia* und *F. bidentis* bewertet wurde. In *F. pringlei* und *F. bidentis* unterbricht allerdings eine Insertion von 240 bzw. 849 bp den proximalen Abschnitt (Abb. 2). Diese Insertionen wurden nicht in die Sequenzvergleiche einbezogen. Der so definierte proximale Abschnitt umfasst somit in allen Spezies die von BLAST2seq identifizierten Übereinstimmungen. Um nun zu ermitteln, wie ähnlich sich die verschiedenen proximalen Abschnitte sind, wurden diese über das Programm DIALIGN miteinander verglichen (Anhang 1). Anhand dieses Sequenzvergleichs wurde die Ähnlichkeit jedes proximalen Abschnitts mit dem proximalen Abschnitt von *F. trinervia* über DIALIGN berechnet, welche hier als Referenz-Sequenz genutzt wird (Morgenstern et al. 1998).

Als Ähnlichkeit wird dabei allgemein der Anteil der Nukleotide der kürzeren Sequenz definiert, die mit der längeren Sequenz übereinstimmen.

Beim Vergleich der Ähnlichkeiten zeigt sich, dass zwischen *F. trinervia* und den beiden C3-Pflanzen *F. robusta* mit 62 % und *F. pringlei* mit 64 % die geringste Ähnlichkeit besteht (Abb. 2). Die nah verwandten Pflanzen *F. pubescens* (C2) und *F. brownii* (C4-artig) haben mit 72 % bzw. 76 % hingegen eine mittlere und *F. bidentis* mit 92 % die höchste Ähnlichkeit zu *F. trinervia*. Allgemein ist die Ähnlichkeit umso höher, je näher die Pflanzen mit *F. trinervia* verwandt sind und je mehr ihr Photosynthese-Typ der C4-Photosynthese entspricht.

Insgesamt zeigen die verschiedenen Sequenzvergleiche, dass gemeinsame Elemente nur im proximalen Abschnitt der 5' flankierenden Region des *PGLP*-Gens zu finden sind. Dies gilt für alle untersuchten Pflanzen unabhängig vom Photosynthese-Typ. Erwartungsgemäß ähneln sich die beiden C4-Pflanzen *F. trinervia* und *F. bidentis* hier mehr als *F. trinervia* und die C3-Pflanzen *F. robusta* und *F. pringlei*. Inwiefern diese Ähnlichkeiten der 5' flankierenden Region die Expression beeinflussen, wird im Folgenden untersucht.

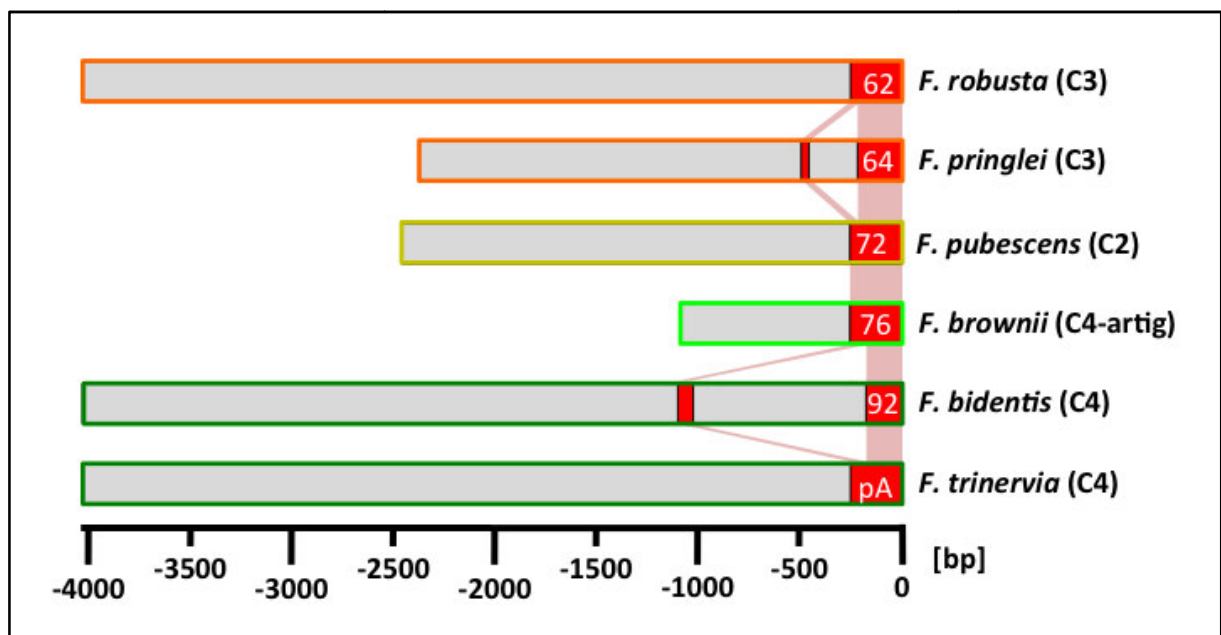


Abbildung 2: Die Struktur der 5' flankierenden Region des *PGLP*-Gens aus verschiedenen Spezies der Gattung *Flaveria*. Die abgebildeten Zahlen geben den Prozent-Wert der Ähnlichkeit des jeweiligen proximalen Abschnitts (pA) zu den von *F. trinervia* an. Sowohl die Ähnlichkeit als auch der zugrunde liegende Sequenzvergleich wurden mit dem Programm DIALIGN erstellt (Morgenstern et al. 1998). Die Skala unter den Balken gibt die Länge der Sequenz an, wobei „0“ das Ende der 5' flankierenden Region und „-“ die Sequenz stromaufwärts des *PGLP*-Gens markiert.

2.2 Analyse der durch die 5' flankierende Region vermittelten Gewebespezifität der Expression

Nun sollte untersucht werden, ob die 5' flankierende Region einen Einfluss auf die Expression des Gens hat. Da der größte Unterschied dabei zwischen einer C4- und einer C3-Pflanze zu erwarten war, wurden die 5' flankierenden Regionen aus *F. trinervia* und *F. pringlei* analysiert. Hierfür wurden beide 5' flankierenden Regionen stromaufwärts des Reportergens β -Glucuronidase (*GUS*) kloniert. Durch diese Anordnung ist die jeweilige 5' flankierende Region für die Expression des *GUS*-Gens ausschlaggebend. Die so erstellten Konstrukte sind in Abbildung 3 gezeigt.

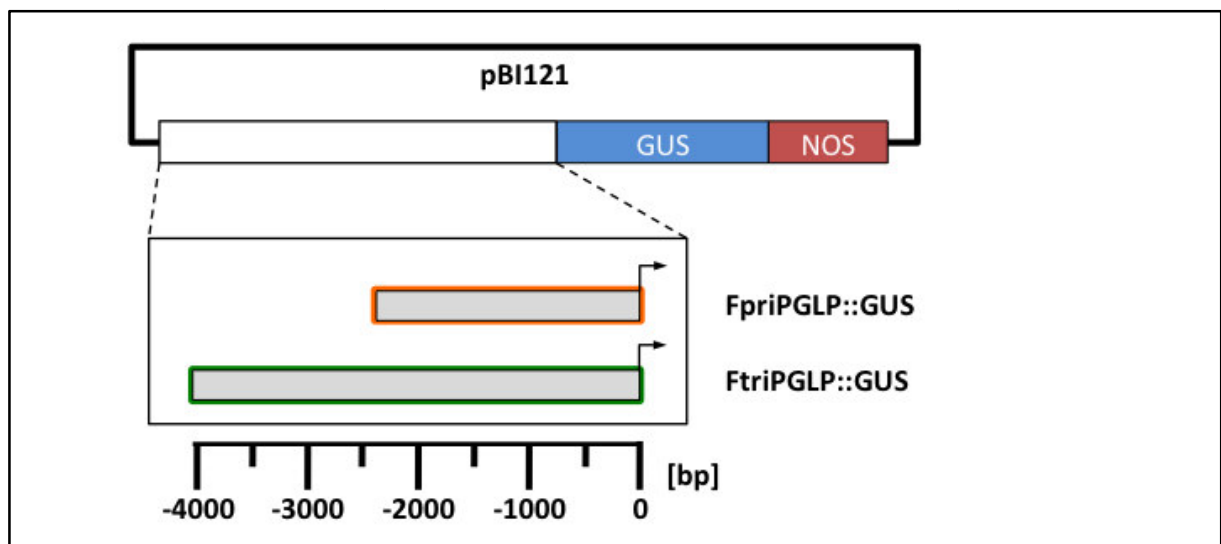


Abbildung 3: Konstrukte zur Transformation von *F. bidentis*. Der Vektor pBI121 enthält neben dem *GUS*-Gen (*GUS*) auch den NOS-Terminator (*NOS*) (Chen et al. 2003; Jefferson et al. 1987). Die verwendeten 5' flankierenden Regionen sind grau dargestellt. Die Skala unter den Balken gibt die Länge der Sequenz an, wobei „0“ das Ende der 5' flankierenden Region und „-“ die Sequenz stromaufwärts des PGLP-Gens markiert.

Die Konstrukte FpriPGLP::GUS und FtriPGLP::GUS wurden zur Transformation der C4-Pflanze *F. bidentis* verwendet. Anhand der transformierten Pflanzen konnte anschließend die Lokalisation des GUS-Proteins *in-situ* untersucht werden. Die Lokalisation des GUS-Proteins spiegelt dabei die durch die 5' flankierende Region vermittelte Gewebespezifität der Expression wieder. Bei der Untersuchung zeigte sich, dass beide 5' flankierenden Regionen eine Expression des *GUS*-Gens in den BS-Zellen sowie den M-Zellen von *F. bidentis* vermitteln (Abb. 4). Verschiedene Studien belegen allerdings, dass die *PGLP*-mRNA in den C4-Spezies *S. bicolor*, *Z. mays* und *Cleome gynandra* BS-spezifisch lokalisiert auftritt (Aubry et al. 2014a; Chang et al. 2012; Döring

et al. 2016; Li et al. 2010). Aus diesem Grund wurde hier eigentlich eine BS-spezifische Expression des GUS-Proteins erwartet. Mögliche Ursachen für diese Abweichung werden daher im nächsten Teil untersucht.

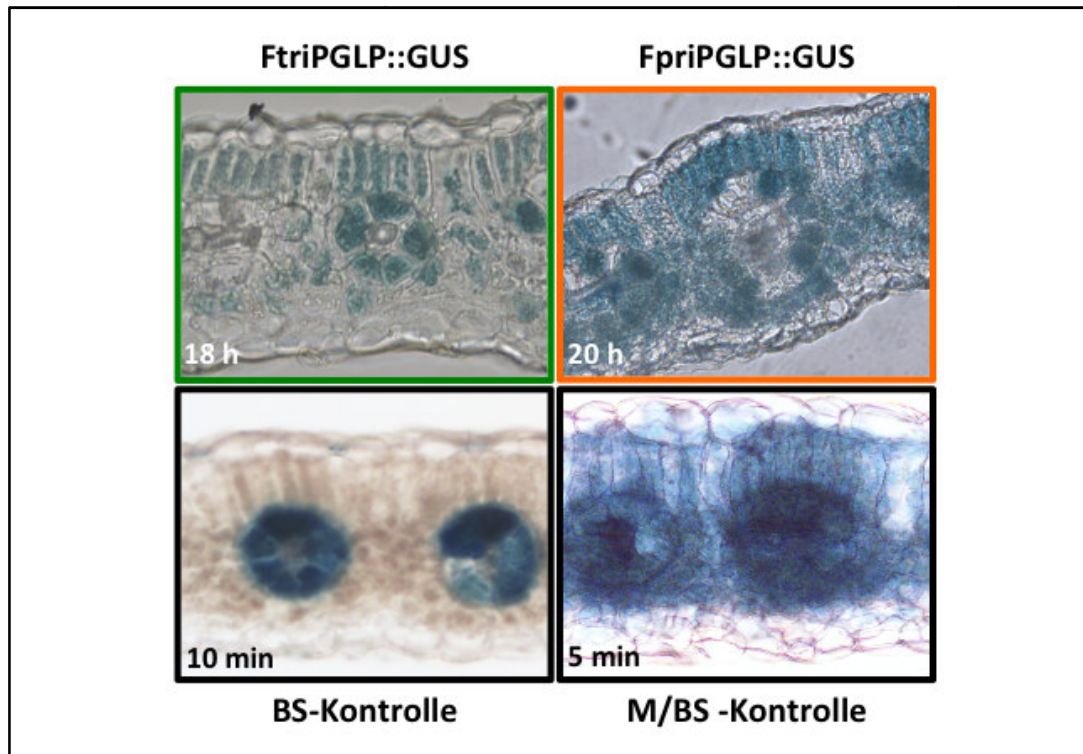


Abbildung 4: In-situ-Lokalisation des GUS-Proteins in Querschnitten transgener *F. bidentis*-Blätter. Abgebildet sind repräsentative Färbungen von je 10 gefärbten Linien pro Konstrukt. Als BS-Kontrolle diente *Fp-GLDPA1* und als M/BS-Kontrolle *Fp-GLDPB2* (Schulze et al. 2013). Die zur Färbung benötigten Zeiten sind jeweils unten links aufgeführt.

2.3 Können Introns die Spezifität der Expression verändern?

Die Untersuchung der Expression von *FpriPGLP::GUS* und *FtriPGLP::GUS* in *F. bidentis* zeigte, dass beide Konstrukte in BS- und M-Zellen exprimiert werden. Dies widerspricht der Erwartung einer BS-spezifischen Expression des *PGLP*-Gens in C4-Pflanzen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es regulatorische Elemente gibt, die nicht Teil der verwendeten 5' flankierende Region sind. So ist bekannt, dass sich *cis*-Elemente auch in den Introns eines Gens befinden können (Burgess and Freeling 2014; Schauer et al. 2009). Um zu testen, ob dies hier der Fall ist, wurde der Einfluss der Introns auf die Gewebespezifität der Expression untersucht. Zudem wurde überprüft, ob es einen Effekt auf die Stärke der Expression gibt.

2.3.1 Sequenzvergleich aller *PGLP*-Introns zwischen *C3*- und *C4*-*Flaverien*

Zur Überprüfung, ob es einen Einfluss der Introns auf die Expression des *PGLP*-Gens gibt, war es nötig zuerst die Struktur des *PGLP*-Gens aufzuklären (Abb. 5). Hierzu wurden die bekannten *PGLP*-Gensequenzen aus *F. bidentis* und *F. robusta* mit der isolierten Gensequenz aus *F. trinervia* verglichen. Die Sequenz aus *F. trinervia* wurde dabei als Referenz verwendet (Tab. 1).

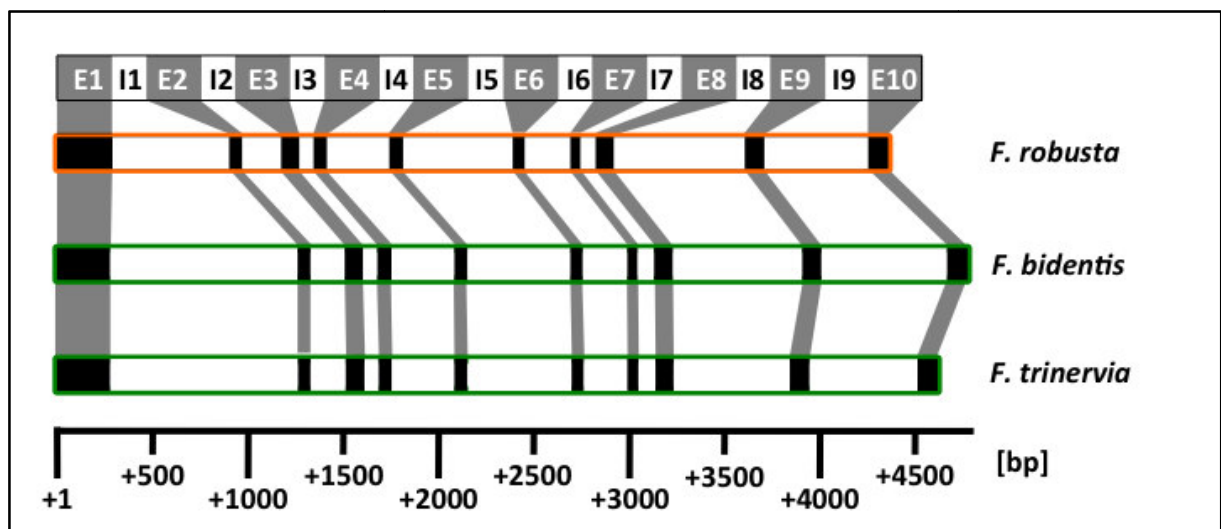


Abbildung 5: Die Struktur des *PGLP*-Gens aus verschiedenen Spezies der Gattung *Flaveria*. Exons (E) sind in schwarz und Introns (I) in weiß eingezeichnet. Die Grenzen von Introns und Exons wurden durch einen Vergleich der jeweiligen mRNA-Sequenz mit der genomischen DNA über das Programm DIALIGN bestimmt (Morgenstern et al. 1998). Die Skala unter den Balken gibt die Länge der Sequenz an, wobei „+1“ den Translations-Startpunkt und „+“ die Sequenz innerhalb des *PGLP*-Gens markiert.

Tabelle 1: Sequenzvergleich der Introns des *PGLP*-Gens aus *F. trinervia* mit denen aus *F. bidentis* und *F. robusta*. Die Ähnlichkeiten und der zugrundeliegende Sequenzvergleich wurden mit dem Programm DIALIGN ermittelt (Morgenstern et al. 1998).

Pflanze	Ähnlichkeit zwischen Introns [%]								
	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	I-8	I-9
<i>F. trinervia</i>									
<i>F. bidentis</i>	98	95	100	95	95	97	96	96	97
<i>F. robusta</i>	86	84	90	91	86	88	88	83	87

Der Sequenzvergleich zeigt, dass alle drei untersuchten *PGLP*-Gene über insgesamt neun Introns und zehn Exons verfügen (Abb. 5). Die Größe der Introns und Exons ist dabei in allen Pflanzen ungefähr gleich. Eine Ausnahme hiervon stellt das erste Intron dar, welches mit 612 bp in *F. robusta* um ca. ein Drittel kürzer ist als in *F. trinervia* mit 984 bp oder in *F. bidentis* mit 982 bp. Die 612 bp von *F. robusta* weisen jedoch 86 %

Ähnlichkeit zu den 984 bp von *F. trinervia* auf. Insgesamt ist die Ähnlichkeit der Introns zueinander im achten Intron mit 83 % zwischen *F. robusta* und *F. trinervia* am geringsten und mit 100 % im dritten Intron zwischen *F. bidentis* und *F. trinervia* am höchsten (Tab. 1). Erwartungsgemäß ist die Ähnlichkeit zwischen *F. bidentis* und *F. trinervia* jeweils höher als die zwischen *F. robusta* und *F. trinervia*.

Von allen *PGLP*-Introns unterscheidet sich das erste Intron aufgrund des Längenunterschieds von über 300 bp am stärksten zwischen der C3-Pflanze *F. robusta* und den C4-Pflanzen, wobei die vorhandene Sequenz jedoch eine hohe Ähnlichkeit aufweist. Ein Grund für die unterschiedliche Länge dieses Introns könnten hier lokalisierte C4-spezifische Elemente sein, welche in *F. robusta* fehlen und wodurch die Sequenz folglich kürzer ist.

2.3.2 Wie ähnlich ist sich das erste Intron des *PGLP*-Gens in verschiedenen *Flaveria*-Spezies?

Das erste Intron des *PGLP*-Gens unterscheidet sich am stärksten zwischen den C4-Spezies *F. trinervia* und *F. bidentis* auf der einen Seite und der C3-Spezies *F. robusta* auf der anderen Seite.

Um zu klären, ob es sich hier um einen spezifischen Unterschied zwischen C4-*Flaverien* und *Flaveria*-Spezies anderen Photosynthese-Typs handelt, wurde das erste Intron aus weiteren *Flaveria*-Spezies isoliert und untersucht. Beim Vergleich der isolierten Sequenzen wurde dabei die Sequenz von *F. trinervia* als Referenz verwendet. Das Ergebnis dieses Sequenzvergleichs ist in Abbildung 6 gezeigt.

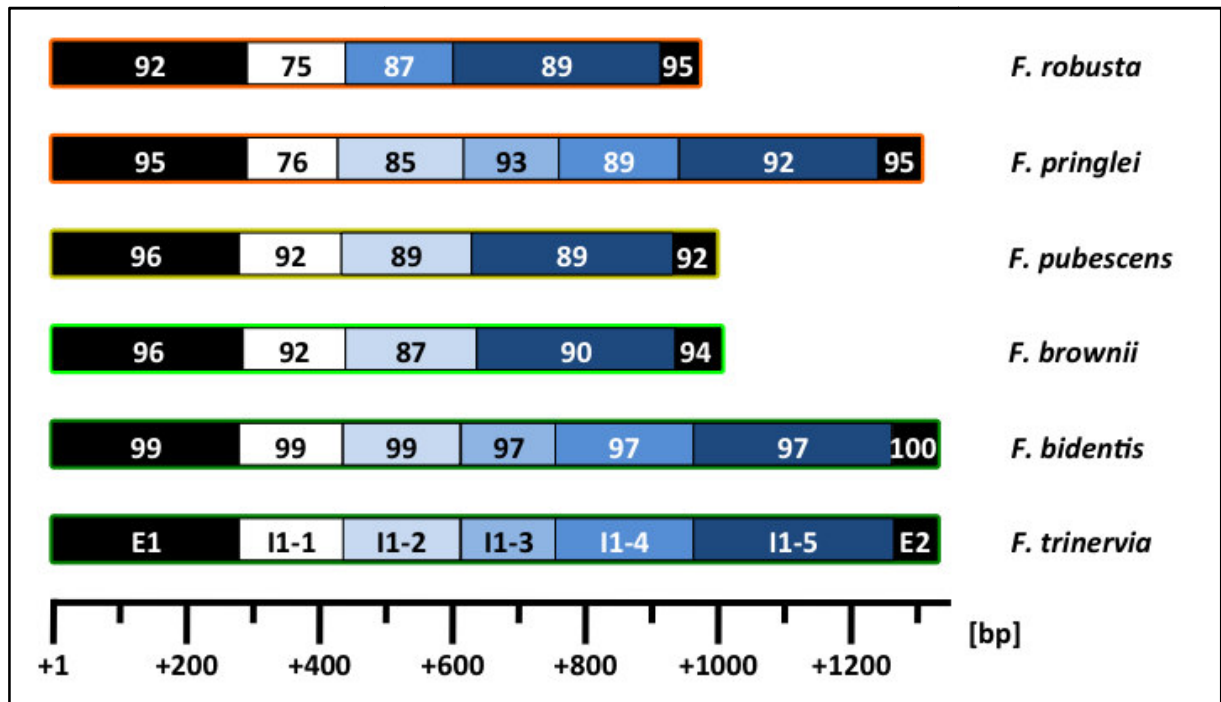


Abbildung 6: Die Struktur des ersten Introns des PGLP-Gens aus verschiedenen Spezies der Gattung *Flaveria*. Die abgebildeten Zahlen geben die prozentuale Ähnlichkeit zu dem entsprechenden Bereich in *F. trinervia* an. Der zugrundeliegende Sequenzvergleich wurde ebenso wie die Berechnung der Ähnlichkeit mit DIALIGN durchgeführt (Morgenstern et al. 1998). In *F. trinervia* ist die Benennung der Bereiche aufgeführt. Dabei steht „E“ für Exon und „I“ für Intron. Die Skala unter den Balken gibt die Länge der Sequenz an, wobei „+1“ den Translations-Startpunkt und „+“ die Sequenz innerhalb des PGLP-Gens markiert.

Der Sequenzvergleich zwischen *F. trinervia* und den anderen Spezies zeigt, dass es in der Sequenz von *F. trinervia* Sequenzabschnitte gibt, die keine Entsprechung in der Sequenz von *F. robusta*, *F. pubescens* oder *F. brownii* haben (Anhang 2). Diese Sequenzabschnitte wurden dazu verwendet, die Bereiche I1-1 bis I1-5 innerhalb des ersten Introns zu definieren. I1-1 und I1-5 sind dabei in allen *Flaveria*-Spezies vorhanden, während I1-2 in *F. robusta* und I1-3 in *F. robusta*, *F. pubescens* und *F. brownii* fehlen. In *F. pubescens* und *F. brownii* fehlt zudem I1-4. Im Gegensatz zu *F. robusta*, *F. pubescens* und *F. brownii* verfügen *F. bidentis* und *F. pringlei* über die gleichen Bereiche wie *F. trinervia*. Da die C3-Pflanze *F. pringlei* über die gleichen Bereiche verfügt wie die C4-Pflanzen *F. trinervia* und *F. bidentis*, ist keiner der Bereiche des ersten Introns spezifisch für C4- oder C3-Pflanzen.

Bei Betrachtung der Ähnlichkeit innerhalb der Bereiche fällt auf, dass diese mit mindestens 75 % (*F. robusta* I1-1) höher ist als die innerhalb der 5' flankierenden Region. Zwischen den C3-Pflanzen und den C4-Pflanzen besteht die geringste Ähnlichkeit in I1-1. Auch wenn die Bereiche selbst nicht C4-spezifisch sind, so könnten die Unterschiede innerhalb der Sequenz auf unterschiedliche regulatorische Elemente innerhalb der Bereiche hindeuten.

Zur Überprüfung, ob die Unterschiede innerhalb des ersten Introns einen Einfluss auf die Expression haben, wurden folgend die Gewebespezifität und die Stärke der vermittelten Expression untersucht.

2.3.3 Hat das erste Intron einen Einfluss auf die Gewebespezifität oder Stärke der Expression?

Aufgrund der Unterschiede des ersten Introns des *PGLP*-Gens besteht die Möglichkeit, dass sich hier unterschiedliche regulatorische Elemente befinden, die einen Einfluss auf die Gewebespezifität und Stärke der Expression haben. Um dies zu überprüfen, wurden Konstrukte erstellt, die aus dem ersten Exon, dem ersten Intron sowie einem Teil des zweiten Exons einer Spezies bestehen und N-terminal mit dem *GUS*-Gen fusioniert sind (Abb. 7). Jedes Fusionskonstrukt wurde dabei unter die Kontrolle der 5' flankierenden Region der entsprechenden Spezies gestellt. Zum Vergleich wurden auch Konstrukte mit den 5' flankierenden Regionen allein erstellt.

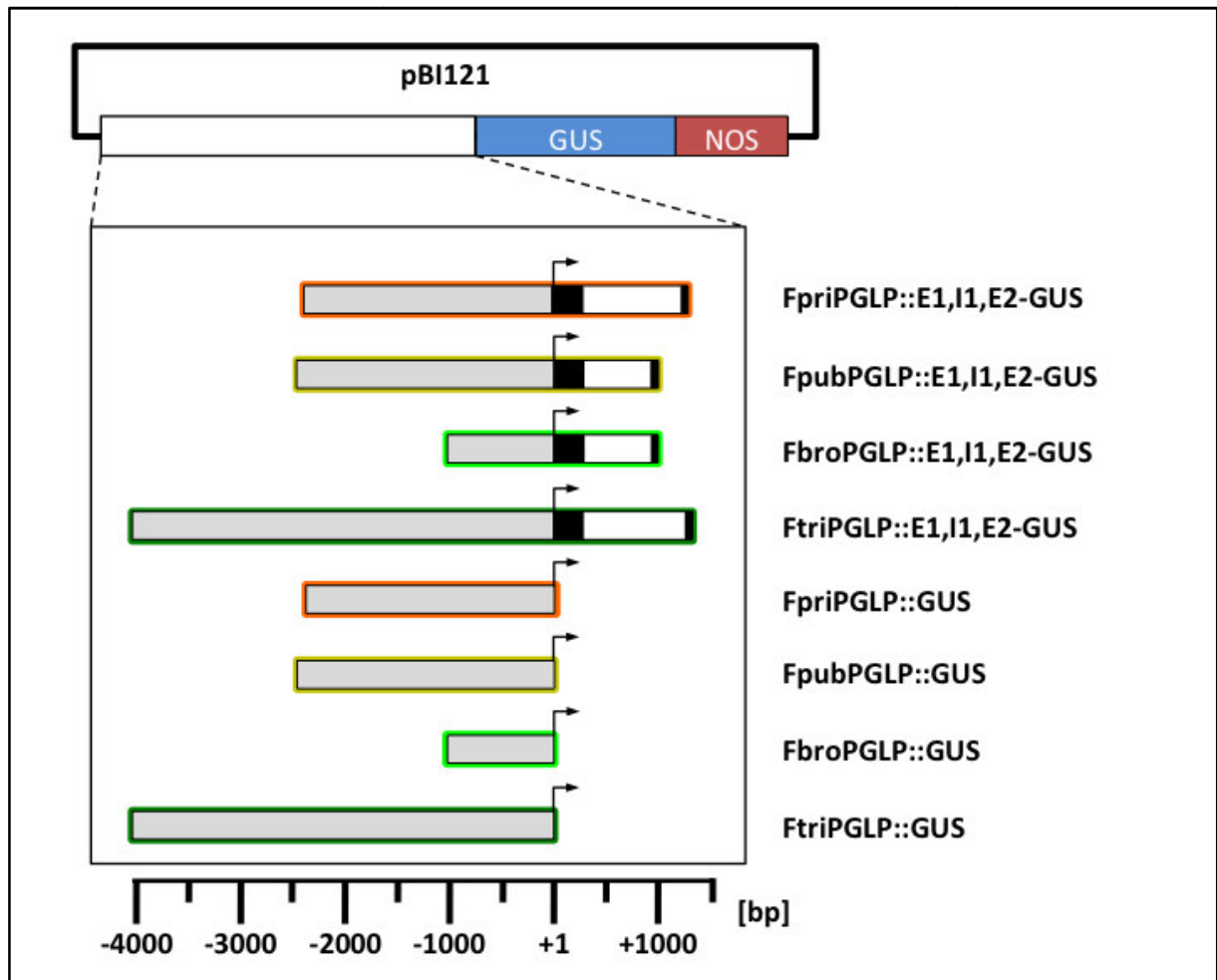


Abbildung 7: Konstrukte zur Transformation in *A. thaliana*. Der Vektor pBI121 enthält neben dem *GUS*-Gen (*GUS*) auch den NOS-Terminator (NOS) (Chen et al. 2003; Jefferson et al. 1987). Die 5' flankierende Region ist grau, das Intron (I) weiß und die Exone (E) sind schwarz dargestellt. Die Skala unter den Balken gibt die Länge der Sequenz an, wobei „+1“ den Translations-Startpunkt, „+“ die Sequenz innerhalb und „-“ die Sequenz stromaufwärts des PGLP-Gens markiert.

Alle Konstrukte wurden in die C3-Pflanze *Arabidopsis thaliana* transformiert, um die Gewebespezifität (Abb. 8) und Stärke der Expression (Abb. 9) im gleichen Hintergrund zu analysieren.

Bei der Untersuchung zeigten alle Konstrukte Expression des *GUS*-Gens in BS-Zellen und M-Zellen. Die Gewebespezifität dieser Fusionskonstrukte unterscheidet sich dabei nicht von der jener Konstrukte, welche nur die 5' flankierende Region enthalten. Was sich hingegen unterschied, waren die Zeiten, die zur Färbung des Blattes benötigt wurden. So verlief die Färbung bei den Konstrukten mit Intron mindestens viermal so schnell wie in denen ohne Intron. Eine Ausnahme hiervon stellen die Konstrukte von *F. pringlei* dar, welche beide eine ähnliche Färbezeit aufwiesen. Diese ungleichen Färbezeiten deuten auf eine unterschiedliche Stärke der Expression hin.

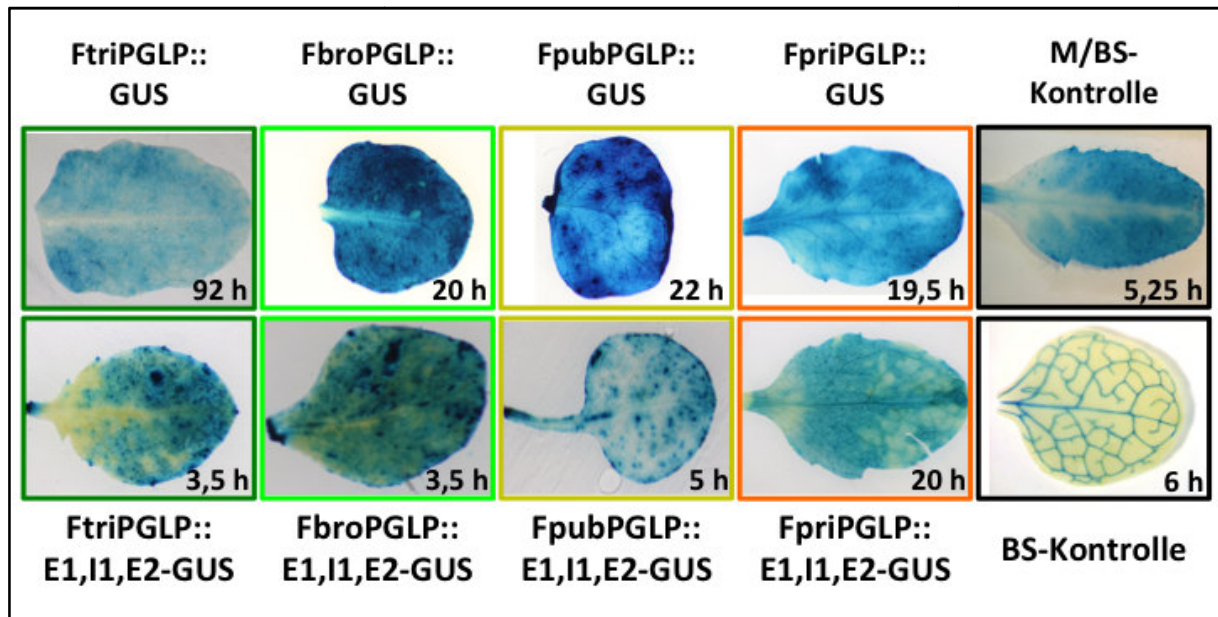


Abbildung 8: In-situ-Lokalisation des GUS-Proteins im Habitus transgener *A. thaliana*-Blätter. Abgebildet sind repräsentative Färbungen von je 10 gefärbten Linien pro Konstrukt. Als BS-Kontrolle diente FtGLDPA und als M/BS-Kontrolle FpGLDPA (Engelmann et al. 2008; Schulze et al. 2013). Die zur Färbung benötigte Zeit ist im jeweiligen Bild unten rechts angegeben.

Die Stärke der vermittelten Expression äußert sich in der Menge des gebildeten GUS-Proteins. Je mehr Protein entstanden ist, desto stärker ist die Expression und desto schneller tritt auch eine Färbung des Gewebes ein. Zur Untersuchung der gebildeten Menge an GUS-Protein wurden Blätter von je mindestens 20 Pflanzen der ersten transgenen Generation (T_1) jedes Konstrukts geerntet und fluorometrisch untersucht (Abb. 9). Hierdurch konnte die GUS-Enzym-Aktivität bestimmt werden. Je höher die Enzym-Aktivität ist, desto größer ist die Menge an GUS-Protein und desto stärker ist folglich dessen Expression.

Die Bestimmung der GUS-Enzym-Aktivität zeigt, dass die Konstrukte Ftri-, Fpub-, und FbroPGLP::E1,I1,E2-GUS eine um 500 bis 1500-fach höhere Aktivität als die Konstrukte Ftri-, Fpub- und FbroPGLP::GUS aufweisen. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität des Konstrukts FpriPGLP::E1,I1,E2-GUS weniger hoch als bei FpriPGLP::GUS. Von allen Konstrukten ohne Intron zeigt FpriPGLP::GUS die höchste Aktivität, während es bei den Konstrukten mit Intron und Exons FbroPGLP::E1,I1,E2-GUS ist.

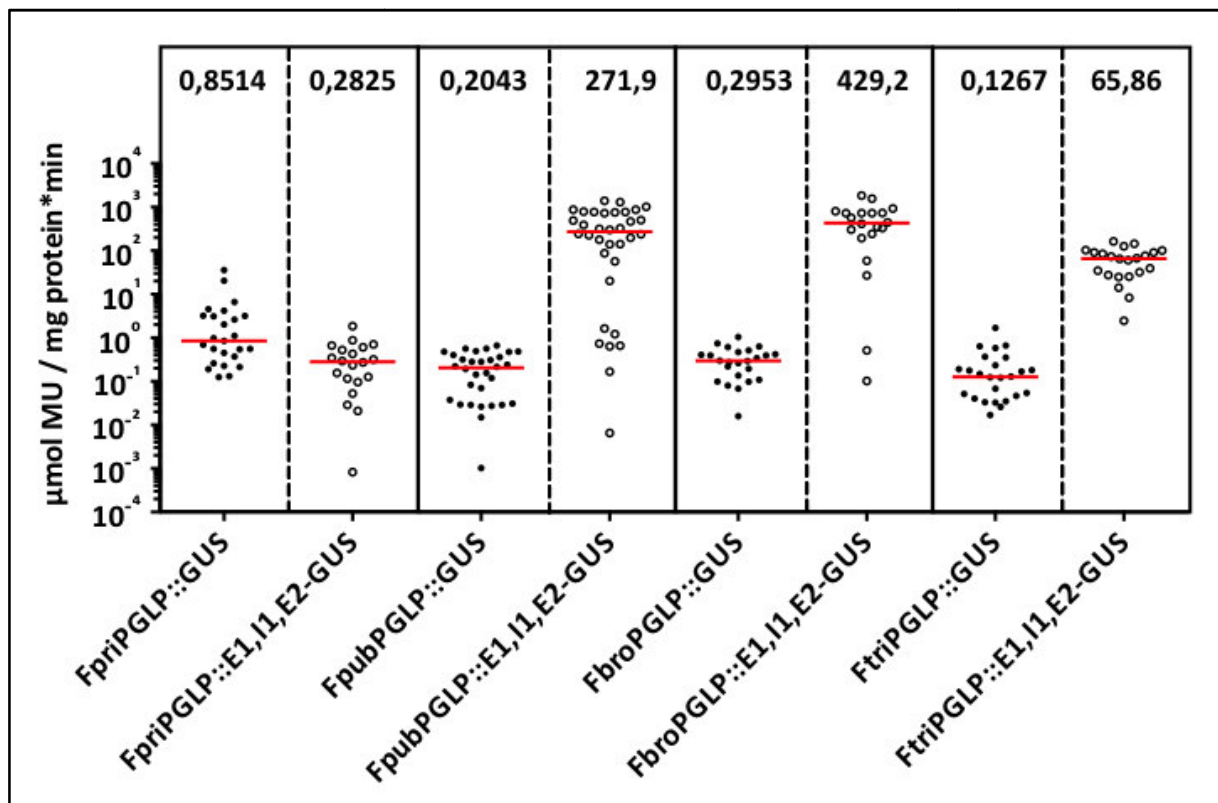


Abbildung 9: Bestimmung der GUS-Enzym-Aktivität in transgenen *A. thaliana*-Blättern. Der Stichprobenumfang beträgt 25 für FpriPGLP::GUS, 20 für FpriPGLP::E1,I1,E2-GUS, 32 für FpubPGLP::GUS, 34 für FpubPGLP::E1,I1,E2-GUS, 24 für FbroPGLP::GUS, 20 für FbroPGLP::E1,I1,E2-GUS, 26 für FtriPGLP::GUS und 22 für FtriPGLP::E1,I1,E2-GUS. Der Median ist oben aufgeführt und als roter Balken eingezeichnet.

Insgesamt führte das erste Intron in drei von vier Fällen zu einer Erhöhung der GUS-Enzym-Aktivität bzw. der Expression des *GUS*-Gens. Auf die Gewebespezifität der Expression hatte das erste Intron aber keinen Einfluss. Somit wies keines der verwendeten Konstrukte die erwartete spezifische Expression in den BS-Zellen auf.

Zumindest bei den Konstrukten mit den *PGLP*-Sequenzen aus der C4-Pflanze *F. trinervia* wurde eine BS-spezifische Expression erwartet. Diese Erwartung basierte auf den Ergebnissen zweier vorangegangener Experimente. Zum einen wurde bereits eine BS-spezifische Lokalisation der *PGLP*-mRNA in verschiedenen C4-Pflanzen beschrieben und zum anderen konnte die ebenso festgestellte BS-spezifische Expression eines der *GLDP*-Gene aus *F. trinervia* beobachtet werden (Döring et al. 2016; Engelmann et al. 2008). Allerdings konnte bei keinem der hier verwendeten Konstrukte eine BS-spezifische Expression beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass *PGLP* in C4-Flavieren entgegen der Erwartung nicht BS-spezifisch exprimiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde nun die *in-situ*-Lokalisation der *PGLP*-mRNA in C4-Flavieren untersucht.

2.4. Lokalisation der *PGLP*-mRNA in transgenen Pflanzen der C4-Spezies *F. bidentis*

Die bisherige Untersuchung zielte darauf ab, die unterschiedliche Expression von *PGLP* in *Flaveria*-Spezies verschiedenen Photosynthese-Typs zu analysieren. Dabei wurde davon ausgegangen, dass *PGLP* wie andere photorespiratorische Gene auch in C4-*Flaverien* ausschließlich in den BS-Zellen exprimiert wird. Diese Annahme soll nun durch die Lokalisation der *PGLP*-mRNA in *F. bidentis* überprüft werden. Die folgende Untersuchung wurde von Dr. Stefanie Schulze durchgeführt und ausgewertet. Aufgrund der Tatsache, dass das Experiment nur mit einem geringen Stichprobenumfang durchgeführt wurde, kann hier aber nur von einem vorläufigen Ergebnis ausgegangen werden.

Zur Lokalisation der *PGLP*-mRNA wurde *F. bidentis* mit Konstrukten transformiert (Abb.10), welche eine mit dem HF-Tag markierte Untereinheit des Ribosoms entweder spezifisch in den BS- oder den M-Zellen exprimieren (Aubry et al. 2014b; Zanetti et al. 2005). Für die BS-spezifische Expression wurde *FtGLDPA* und für die M-spezifische Expression *FtppcA* verwendet (Engelmann et al. 2008; Gowik et al. 2004). Blattmaterial je einer transformierten Pflanze wurde nun dazu verwendet, die markierten Ribosomen einschließlich ihrer gebundenen mRNA aus den entsprechenden Zellen zu isolieren. Die isolierte BS- bzw. M-Zellen-spezifische *PGLP*-mRNA wurde nun mittels quantitativer Real-Time-PCR gemessen (Abb. 11). Zur Kontrolle wurde zudem die mRNA des photorespiratorischen Gens *GLDPA* untersucht, welche in *F. bidentis* BS-spezifisch ist (Engelmann et al. 2008).

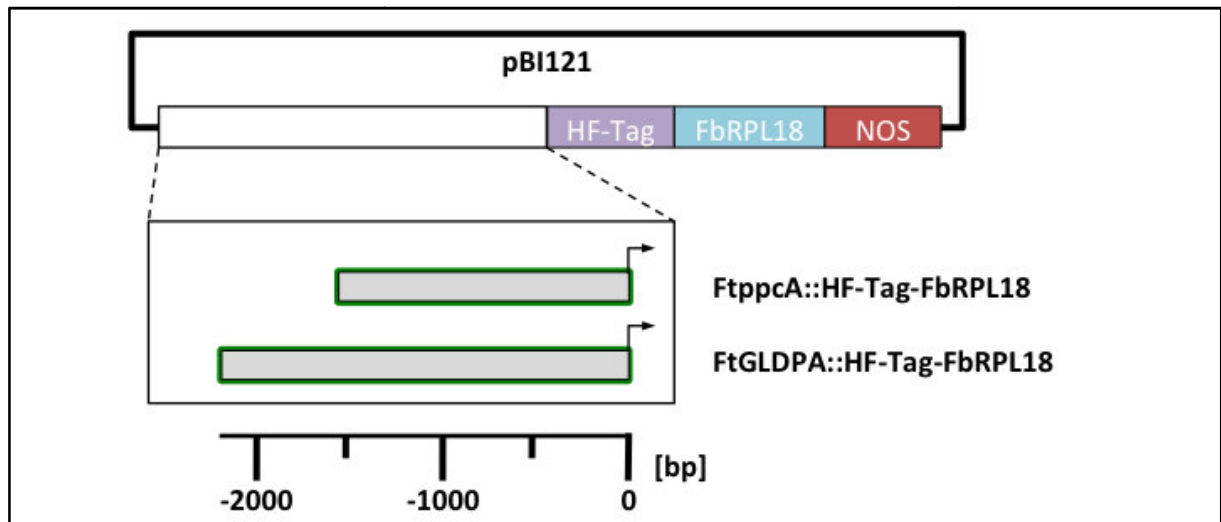


Abbildung 10: Konstrukte zur Lokalisation der PGLP-mRNA in transgenen *F. bidentis*-Pflanzen. Gezeigt sind die verwendeten 5' flankierenden Regionen (grau), der zur Aufreinigung verwendete Protein-Tag (HF-Tag), die kodierende Sequenz des ribosomalen Proteins RPL18 aus *F. bidentis* (*FbRPL18*) sowie der NOS-Terminator (NOS) (Chen et al. 2003; Jefferson et al. 1987). Die Skala unter den Balken gibt die Länge der Sequenz an, wobei „+1“ den Translations-Startpunkt und „-“ die Sequenz stromaufwärts des Gens markiert.

Die Quantifizierung zeigt, dass die *PGLP*-mRNA in den BS-Zellen etwa doppelt so häufig vorkommt wie in den M-Zellen (Abb. 11). Die *GLDP*-mRNA ist hingegen in den BS-Zellen etwa sieben-fach häufiger als in den M-Zellen. Demzufolge wäre *PGLP* in der C4-Spezies *F. bidentis* eher in den BS- als in den M-Zellen lokalisiert. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs von je einer Pflanze ist dieses Ergebnis jedoch als vorläufig anzusehen.

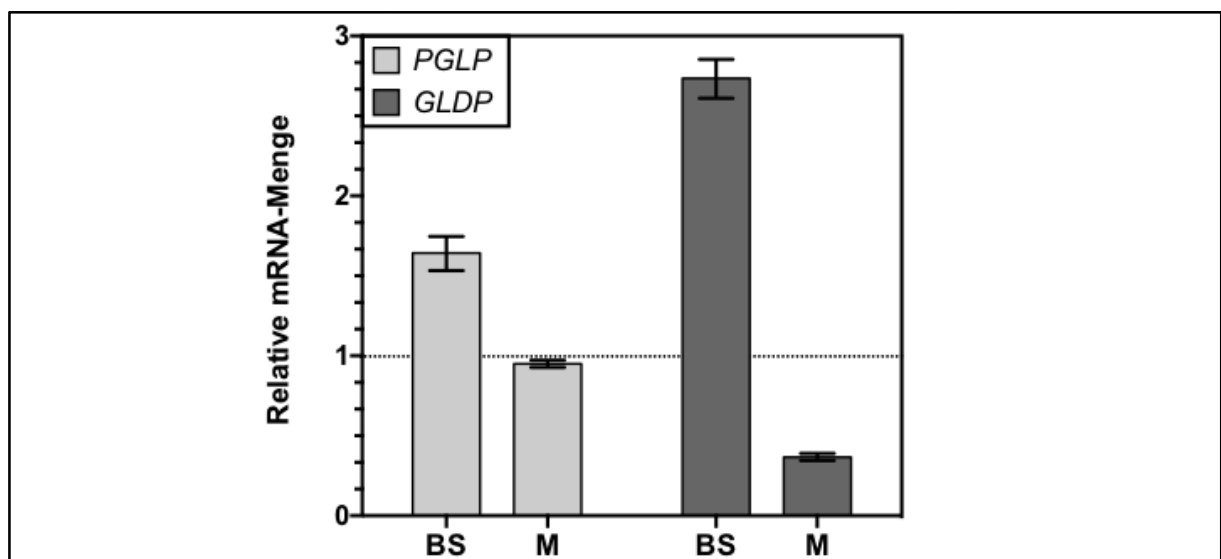


Abbildung 11: Lokalisierung der PGLP- und GLDP-mRNA in *F. bidentis*. Das Experiment wurde mit dem 4. Blatt jeweils einer transgenen *F. bidentis*-Pflanze von Dr. S. Schulze durchgeführt. Bei der qRT-PCR wurden Triplikate bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Werte wurden auf die relative Häufigkeit der jeweiligen mRNA in einer mRNA-Probe des gesamten Blatts normiert. Die gestrichelte Linie zeigt die relative Häufigkeit der PGLP- und GLDP-mRNA im Gesamtblatt, welche auf „1“ gesetzt wurde.

3. Diskussion

In dieser Studie wurde anhand der Gattung *Flaveria* die Expression des photorespiratorischen Gens *PGLP* in verschiedenen Schritten der C4-Evolution untersucht. Dazu wurden die Sequenzen der 5' flankierenden Regionen von *PGLP* sowie dessen Introns aus C3-, C2-, C4-artigen und C4-*Flaverien* miteinander verglichen und ihr Einfluss auf die Gewebespezifität und Stärke der Expression analysiert.

3.1 Das *PGLP*-Gen wird in C4-Pflanzen der Gattung *Flaveria* in BS- und M-Zellen exprimiert

Frühere Studien zeigten, dass die meisten Gene der Photorespiration einschließlich *PGLP* in unterschiedlichen C4-Spezies spezifisch in den BS-Zellen exprimiert werden (Aubry et al. 2014a; Chang et al. 2012; Döring et al. 2016; Li et al. 2010). Entscheidend für eine solche gewebespezifische Expression kann dabei, z. B. im Fall der Gene *GLDPA* und *ppcA* im Genus *Flaveria*, die 5' flankierende Region sein (Engelmann et al. 2008; Gowik et al. 2004). In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde hier erwartet, dass auch in C4-*Flaverien* *PGLP* spezifisch in den BS-Zellen exprimiert wird und dass diese Expression durch die 5' flankierende Region vermittelt werden kann. Im Gegensatz zu dieser Erwartung konnte in dieser Studie jedoch gezeigt werden, dass die 5' flankierende Region der C4-Pflanze *F. trinervia* die Expression des Reportergens *GUS* in BS- und M-Zellen vermittelt (Abb. 3 und Abb. 8). Diese Expression entspricht jener der 5' flankierenden Region aus der C3-Pflanze *F. pringlei*.

Anders als die 5' flankierenden Regionen von *ppcA* und *GLDPA* vermittelte die 5' flankierende Region von *PGLP* also keine BS-spezifische Expression des Reportergens. Das ist allerdings nicht der einzige beobachtete Unterschied zwischen den 5' flankierenden Regionen dieser beiden Gene und jenen von *PGLP*. Während es in den 5' flankierenden Regionen von *ppcA* und *GLDPA* mehrere Abschnitte gibt, in denen die unterschiedlichen *Flaveria*-Spezies hohe Ähnlichkeiten aufweisen, ist die Ähnlichkeit bei *PGLP* auf den proximalen Abschnitt begrenzt (Abb. 2). In *ppcA* und *GLDPA* haben diese Abschnitte mit hoher Ähnlichkeit *cis*-regulatorische Funktionen z. B. bei der jeweiligen Gewebespezifität der Expression (Gowik et al. 2004; Wiludda et al. 2012).

Die Beobachtung, dass der Großteil der 5' flankierenden Region von *PGLP* frei von solchen Abschnitten höherer Ähnlichkeit ist, kann dementsprechend als ein Hinweis darauf gedeutet werden, dass hier keine so komplexe *cis*-regulatorische Regulation vorliegt wie bei *ppcA* und *GLDPA*. Diese Regulation ist aber wahrscheinlich für die gewebespezifische Expression in C4-Pflanzen erforderlich (Sage et al. 2012). Ihr Fehlen könnte also bedeuten, dass *PGLP* nicht BS-spezifisch exprimiert wird.

Tatsächlich ist es möglich, dass *PGLP* entgegen der Erwartung in C4-Spezies des Genus *Flaveria* nicht BS-spezifisch, sondern in BS- und M-Zellen exprimiert wird. So basiert die erwartete spezifische Expression von *PGLP* in den BS-Zellen von C4-*Flaverien* auf Studien mit den Genera *Cleome*, *Sorghum* und *Zea*, welche alle nicht näher mit *Flaveria* verwandte sind (Aubry et al. 2014a; Chang et al. 2012; Döring et al. 2016; Li et al. 2010). Demzufolge ist die BS-spezifische Expression von *PGLP* in C4-Pflanzen dieser Genera lediglich ein Indiz, das auch für eine BS-spezifische Expression in C4-*Flaverien* spricht. Im Gegenzug dazu gibt es mehrere Erklärungen, die eine Expression von *PGLP* auch in den M-Zellen von C4-*Flaverien* plausibel erscheinen lassen. So hatte das Genus *Flaveria* seinen C4-Ursprung erst vor ca. 3 Millionen Jahren, während der C4-Ursprung der beiden *Andropogonae* *Sorghum* und *Zea* ca. 18 Millionen Jahre und bei *Cleome* ca. 10 Millionen Jahre zurückliegt (Feodorova et al. 2010). Dementsprechend kann es sein, dass die in diesen Genera beobachtete BS-spezifische Expression des *PGLP*-Gens einen späteren evolutionären Schritt der C4-Photosynthese darstellt, welchen die C4-*Flaverien* noch nicht erreicht haben. So ist die BS-spezifische Expression von *PGLP* in keinem Modell der C4-Evolution eine zwingende Voraussetzung zur Entwicklung der C4-Photosynthese (Bräutigam and Gowik 2016; Heckmann et al. 2013; Sage et al. 2012; Williams et al. 2013). Das ist ein klarer Unterschied zum Fall des *GLDP*-Gens, dessen BS-spezifische Expression hier einen wichtigen Schritt darstellt (Bräutigam and Gowik 2016; Schulze et al. 2016). Die Beobachtung, dass *GLDPA* in C4-*Flaverien* bereits BS-spezifisch exprimiert wird, muss also nicht bedeuten, dass dies auch für *PGLP* gilt (Schulze et al. 2016). Es könnte im Gegenteil sogar zwingend erforderlich sein, dass *PGLP* anders als *GLDP* noch lange nach Etablierung der C2-Photosynthese in BS- und M-Zellen vorhanden ist.

Diese Überlegung lässt sich durch die Bedeutung von *PGLP* für den Organismus erklären. So hemmt das durch *PGLP* entfernte 2-PG, mit der Triosephosphat-Isomerase und der Phosphofructo-Kinase zwei zentrale Enzyme des Stoffwechsels (Anderson

1971; Kelly and Latzko 1976). Aus diesem Grund muss 2-PG nach seiner Bildung möglichst schnell durch PGLP zu Glycolat umgesetzt werden. Da 2-PG von dem Enzym RubisCO gebildet wird, muss sich PGLP auch stets in der Nähe der RubisCO befinden, um seiner Funktion nachzukommen. Folglich kann die Expression von *PGLP* in den M-Zellen vermutlich erst dann unterbunden werden, wenn auch RubisCO hier nicht mehr gebildet wird. Zwar ist RubisCO in *C4-Flavieren* nahezu ausschließlich in den BS-Zellen lokalisiert, geringe Mengen scheinen aber auch in den M-Zellen gebildet zu werden (Bauwe 1984). Eventuell sind diese geringen Mengen ausreichend, um die weitere Anwesenheit von PGLP zu rechtfertigen. Selbst wenn PGLP keine Funktion mehr in den M-Zellen hat, könnte es immer noch sein, dass der selektive Druck, die Gewebespezifität der Expression zu ändern, zu gering für eine schnelle Änderung der Gewebespezifität von PGLP ist. Schließlich scheint der einzige Nachteil einer *PGLP*-Expression in den M-Zellen von *C4-Flavieren* die Kosten des Proteinaufbaus zu sein.

Eine andere mögliche Erklärung für die beobachtete Expression in BS- und M-Zellen ist, dass *PGLP* in *F. trinervia* doch BS-spezifisch exprimiert wird, die verwendeten Konstrukte aber nicht alle dafür nötigen *cis*-regulatorischen Elemente enthalten. So ist es zum Beispiel denkbar, dass sich *cis*-regulatorische Elemente noch weiter stromaufwärts in der 5' flankierenden Region des *PGLP*-Gens befinden. Allerdings wurden hier 4000 bp der 5' flankierenden Region von *PGLP* aus *F. trinervia* verwendet, während bei den Genen *ppcA* und *GLDPA* bereits ca. 2000 bp alle für die jeweilige Gewebespezifität erforderlichen Elemente enthielten (Akyildiz et al. 2007; Engelmann et al. 2008; Gowik et al. 2004). Zwar befindet sich das von Akyildiz et al. (2007) untersuchte „Mesophyll Expression Module 1“ (MEM1) in *F. brownii* und *F. pubescens* auch ca. 4000 bp vor der Translations-Startsequenz, eine spezifische Expression in den M-Zellen kann es hier jedoch nicht hervorrufen (Akyildiz et al. 2007). Dementsprechend erscheint es unwahrscheinlich, dass sich Elemente noch weiter stromaufwärts befinden, die einen Einfluss auf die Expression von *PGLP* haben könnten.

Alternativ zur 5' flankierenden Region können auch die 3' UTR, die Introns, die Exons oder der intergenische Bereich *cis*-regulatorische Elemente enthalten (Burgess and Freeling 2014; Burgess et al. 2015; Cawley et al. 2004; Franco-Zorrilla et al. 2014; Guo and Moose 2003; Schauer et al. 2009). Für die Lokalisation *cis*-regulatorischer Elemente innerhalb der Introns des *PGLP*-Gens spricht dabei deren hohe Ähnlichkeit in den verschiedenen Spezies (Tab. 1). Dies deutet auf einen Selektionsdruck hin, der

wiederum durch das Vorhandensein regulatorischer Elemente begründet sein kann (Burgess and Freeling 2014; Franco-Zorrilla et al. 2014; Guo and Moose 2003). Hierzu zählen unter anderem auch Elemente, die für das korrekte Spleißen des Introns benötigt werden und wahrscheinlich zwischen C3 und C4 konserviert sind (Le Hir et al. 2000). Diese Elemente sind aber in der Regel nur 20 bis 24 Nukleotide groß, weshalb deren Vorhandensein nicht die in Abbildung 6 gezeigte hohe Ähnlichkeit über eine Länge von mehr als 100 bp erklären würde (Le Hir et al. 2000). Obwohl die insgesamt hohe Ähnlichkeit auf das Vorhandensein regulatorischer Elemente hindeutet führten auch die Konstrukte mit dem ersten Intron zur Expression des *GUS*-Gens in BS- und M-Zellen. Somit scheint es hier zumindest kein *cis*-regulatorisches Element zu geben, das eine BS-spezifische Expression verursacht.

Allerdings wurden diese Konstrukte nur im Hintergrund der C3-Pflanze *A. thaliana* getestet. Es ist daher möglich, dass zwar nun alle regulatorischen Elemente für eine BS-spezifische Expression vorhanden sind, diese aber im Hintergrund der C3-Pflanze *A. thaliana* nicht auf die gleiche Art funktionieren wie in *F. trinervia*. Dies kann unter anderem in der evolutionären Distanz des Genus *Arabidopsis* zum Genus *Flaveria* begründet sein. Außerdem kann die C3-Pflanze *A. thaliana* eventuell nicht die C4-spezifischen Elemente einer C4-Pflanze verwenden, da beispielsweise die passenden *trans*-Faktoren fehlen (Love et al. 2007). So zeigten die Arbeiten von Akyildiz (2007) und Wiludda (2012), dass die Konstrukte *GLDPA-Ft-2-7* und *ppcA-Ft* aus *F. trinervia* im Hintergrund der C4-Pflanze *F. bidentis* und der C3-Pflanze *A. thaliana* jeweils eine andere Expression hervorriefen. In *F. bidentis* wurde dabei für beide Konstrukte eine C4-typische Expression in den BS- bzw. M-Zellen beobachtet, welche in *A. thaliana* nicht erhalten blieb (Akyildiz et al. 2007; Wiludda et al. 2012). Ähnliches wurde auch über das Konstrukt *ME-GUS* aus der C4-Pflanze *Z. mays* berichtet, welches in *Z. mays* eine C4-typische Gewebespezifität aufweist, in der C3-Pflanze *Oryza sativa* hingegen eine C3-typische (Nomura et al. 2005). Demgegenüber blieb die C4-typische gewebespezifische Expression etwa bei den Konstrukten *GLDPA-Ft* in *A. thaliana* oder *ZmPEPC* und *ZjPCK* in *O. sativa* erhalten (Engelmann et al. 2008; Matsuoka et al. 1994). Ob die Gewebespezifität der Konstrukte mit Intron in *F. bidentis* sich von jener in *A. thaliana* unterscheidet, konnte in Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Daher bleibt offen, inwieweit hier der Hintergrund die beobachtete Gewebespezifität beeinflusst.

Letztlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression des *PGLP*-Gens durch epigenetische Modifikationen beeinflusst wird, die z. B. in *Z. mays* die Stärke und den Zeitpunkt der Expression verschiedener C4-Gene steuern (Heimann et al. 2013; Perduns et al. 2015). Eine solche Modifikation an den Konstrukten könnte möglicherweise weder in *F. bidentis* noch in *A. thaliana* so durchgeführt werden, wie es beim nativen *PGLP*-Gen der Fall ist. Die Folge wäre eine vom *PGLP*-Gen abweichende Expression der Konstrukte in beiden Pflanzen, obwohl hier alle *cis*-regulatorischen Elemente vorhanden sind.

Zusammenfassend gibt es zwei grundlegende Erklärungsansätze für die beobachtete Expression der untersuchten Konstrukte in BS- und M-Zellen. Erstens ist es möglich, dass die beobachtete Gewebespezifität der Expression mit der tatsächlichen übereinstimmt, *PGLP* also in *C4-Flavieren* nicht BS-spezifisch exprimiert wird, sondern die Expression sowohl in den BS-Zellen als auch in den M-Zellen stattfindet. Zweitens kann nicht ausgeschlossen werden, dass *cis*-regulatorische Elemente fehlen oder diese im transgenen Hintergrund nicht funktionieren, wodurch die beobachtete Gewebespezifität der Expression von *PGLP* nicht mit der tatsächlichen übereinstimmen würde.

Insgesamt deutet die nur geringfügig größere Menge an *PGLP*-mRNA in den BS-Zellen der C4-Pflanze *F. bidentis* aber darauf hin, dass *PGLP* zwar etwas stärker in den BS-Zellen von *C4-Flavieren* exprimiert wird, dieser Unterschied aber verglichen mit *GLDP* marginal ist (Abb. 11). *PGLP* kann in *C4-Flavieren* demnach nicht als BS-spezifisch exprimiert betrachtet werden, sondern zeigt im Genus *Flaveria* wohl tatsächlich die hier beobachtete Expression in BS- und M-Zellen. Die Gewebespezifität der *PGLP*-Expression hat sich also in der Entwicklung von C3- zur C4-Photosynthese im Genus *Flaveria* kaum verändert. Dieses Ergebnis kann als Beleg dafür gewertet werden, dass die BS-spezifische Expression des *PGLP*-Gens für die Entstehung und den Mechanismus der C4-Photosynthese nicht zwingend erforderlich ist. Stattdessen stellt sie wohl eher eine der vielen Optimierungen der C4-Photosynthese dar, die nach Etablierung dieses Photosynthese-Typs auftreten (Sage et al. 2012).

3.2 Das erste Intron des *PGLP*-Gens verstärkt die Expression

Neben der Gewebespezifität der *PGLP*-Expression im Genus *Flaveria* wurde in dieser Studie auch deren Stärke untersucht. Zu diesem Zweck wurde die 5' flankierende Region sowie das erste Intron aus verschiedenen *Flaveria*-Spezies für die fluorometrische Bestimmung der GUS-Enzym-Aktivität eingesetzt. Das erste Intron wurde verwendet, da es aufgrund seiner Länge zwischen C3- und C4-*Flaverien* den größten Unterschied aufwies, was wiederum auf die Anwesenheit verschiedener regulatorischer Elemente in den untersuchten C4-Spezies einerseits und der C3-Spezies *F. robusta* andererseits hindeutet. Bei der Bestimmung der GUS-Enzym-Aktivität zeigten alle Konstrukte mit Intron außer *Fpri::E1,I1,E2-GUS* eine um den Faktor 500 bis 1500 höhere Aktivität als die entsprechenden Konstrukte ohne Intron. Diese höhere Aktivität lässt sich durch eine verstärkte Expression des GUS-Proteins erklären.

Daraus kann geschlossen werden, dass in dem ersten Intron von *F. trinervia*, *F. brownii* und *F. pubescens* vermutlich ein entscheidendes Element für die Stärke der Expression enthalten ist, welches in *F. pringlei* fehlt. Verschiedene Studien zeigen allerdings auch, dass Konstrukte mit Introns häufig und aus ungeklärter Ursache eine stärkere Expression aufweisen als Konstrukte ohne Introns (Buchman and Berg 1988; Callis et al. 1987; Gallegos and Rose 2015; Nomura et al. 2005). Wenn es sich hier tatsächlich um so einen unspezifischen Effekt handeln würde, wäre aber zu erwarten, dass alle Konstrukte eine verstärkte Expression aufweisen. Der fehlende Effekt auf die Expression von *FpriPGLP::E1,I1,E2-GUS* deutet aber eher auf die Existenz eines Expressionsverstärkenden Elements hin. Dabei könnte es sich um ein Element handeln, welches *F. trinervia*, *F. brownii* und *F. pubescens* gemeinsam haben oder um eins, welches sich in diesen Pflanzen unterscheidet. Um dies zu untersuchen, wurde das erste Intron genauer betrachtet.

Das erste Intron des *PGLP*-Gens besteht aus bis zu fünf Bereichen (I1-1 bis I1-5, Abb. 6). Der Bereich I1-1 in *F. pringlei* unterscheidet sich dabei besonders von jenen in *F. trinervia*, *F. brownii* und *F. pubescens*. Ein Grund für die geringe Ähnlichkeit könnte ein hier befindliches *cis*-regulatorisches Element sein, welches in den drei Pflanzen, nicht aber in *F. pringlei* vorhanden ist. Im Gegensatz zu I1-1 weist I1-2 in *F. pringlei*, *F. brownii* und *F. pubescens* gleichermaßen Unterschiede zu *F. trinervia* auf. Falls sich also in diesem Bereich ein *cis*-regulatorisches Element befindet, so ist dieses wahrscheinlich

nicht zwischen *F. trinervia* auf der einen und *F. brownii* und *F. pubescens* auf der anderen Seite konserviert. Die Bereiche I1-3 und I1-4 fehlen in *F. brownii* und *F. pubescens*. Daher ist die Lokalisation eines allen drei Pflanzen gemeinsamen Elements an dieser Stelle ausgeschlossen. In *F. pringlei* haben die Bereiche I1-3 und I1-4 eine Ähnlichkeit von ca. 90 % mit *F. trinervia*. Aufgrund dieser hohen Ähnlichkeit zwischen *F. pringlei* und *F. trinervia* ist es unwahrscheinlich, dass sich hier ein Element befindet, welches *F. pringlei* fehlt. Gegen ein Expressions-verstärkendes Element in I1-5 spricht ebenfalls die durchweg hohe Ähnlichkeit in allen Pflanzen. Anhand der Untersuchung der Ähnlichkeit des ersten *PGLP*-Introns wird deutlich, dass es vermutlich ein Expressions-verstärkendes Element in I1-1 in *F. trinervia*, *F. brownii* und *F. pubescens* gibt, welches in *F. pringlei* fehlt. In den anderen Bereichen des Introns ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass sich hier Expressions-verstärkende Elemente befinden.

Im Gegensatz zu den anderen Spezies führte das erste Intron von *F. pringlei* nicht zu einer Verstärkung der Expression. Als C3-Pflanze bildet *F. pringlei* größere Mengen an *PGLP* als C2-, C4-artige oder C4-Pflanzen (Mallmann et al. 2014). Demzufolge widerspricht die Beobachtung, dass die Expression in *F. pringlei* die schwächste ist, der Erwartung. Wahrscheinlich verfügt *F. pringlei* ebenfalls über Elemente, welche die Expression verstärken, aber hier nicht Teil der verwendeten Sequenz waren. Diese Elemente befinden sich möglicherweise an anderer Stelle wie z. B. dem 3' - oder 5' UTR oder dem intergenischen Bereich (Burgess and Freeling 2014; Burgess et al. 2015; Cawley et al. 2004; Franco-Zorrilla et al. 2014; Guo and Moose 2003; Schauer et al. 2009).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass das erste Intron des *PGLP*-Gens einen verstärkenden Einfluss auf die Expression in *F. trinervia*, *F. pubescens* und *F. brownii* hat. Wie dieser Mechanismus im Detail funktioniert und welche Teile der Intron-Sequenz dafür nötig sind, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass *PGLP* offenbar sowohl in den BS- als auch in den M-Zellen von C3-, C2-, C4-artigen und C4-Flavieren exprimiert wird. Demnach ist die BS-spezifische Expression von *PGLP* scheinbar nicht zwingend für die Funktion und Evolution der C4-Photosynthese. Auch wenn sich die Gewebespezifität der Expression kaum geändert hat, so zeigen die Ergebnisse doch auch, dass sich die

Struktur des *PGLP*-Gens änderte. Während die Ähnlichkeit des proximalen Abschnitts der 5' flankierenden Region in den verschiedenen untersuchten Pflanzen noch relativ hoch ist, unterscheidet sich der Rest der 5' flankierenden Region deutlich. Im Gegensatz dazu war die Ähnlichkeit in den Introns des *PGLP*-Gens höher, wobei das Fehlen verschiedener Bereiche im ersten Intron eine Ausnahme darstellt. Der deutlichste Unterschied zwischen den untersuchten *PGLP*-Sequenzen zeigt sich aber in der Expressions-verstärkenden Wirkung des ersten Introns, die in *F. pringlei* fehlt. Auch wenn *PGLP* in C4-Flavieren nicht BS-spezifisch exprimiert wird, so zeigt die Untersuchung doch, dass sich das *PGLP*-Gen und seine Expression in C3- und C4-Flavieren deutlich voneinander unterscheiden.

5 Material und Methoden

Erstellung der Konstrukte

Zur Erstellung der Konstrukte wurden zuerst die Introns und 5' flankierenden Regionen aus genomischer DNA der jeweiligen Spezies amplifiziert (Tab. 2). Anschließend wurden die 5' flankierenden Regionen über die Restriktionsenzyme *AscI* und *AsiSI* in einen modifizierten pBI121-Vektor mit *AsiSI*- und *AscI*-Schnittstelle legiert, um die Konstrukte ohne Intron zu erhalten (Chen et al. 2003; Jefferson et al. 1987). In die so gebildeten Vektoren konnten anschließend die Introns über *AscI* und *XmaI* legiert werden, um so die Konstrukte mit Intron und 5' flankierender Region zu erhalten. Alle verwendeten Enzyme wurden von New England Biolabs, Ipswich, USA bezogen.

Tabelle 2: Zur Erstellung der Konstrukte genutzte Primer.

Konstrukt	Primer in Richtung 5' zu 3'
FpriPGLP::GUS	ATAGGCGCGCCGTCTACAACGTGTCGATCGATCGATGGGTTG ATAGCGATCGCGTGGCAAACATTTCTGTTTGTCCATCTCGG
FpubPGLP::GUS	ATAGCGATCGCAGGATATTGCAATACAAATTGGATTTCAAACAC ATAGGCGCGCCTTCTACAACGTGTCGATCGATTGATCGATCG
FbroPGLP::GUS	ATAGCGATCGCCTGGTTTCTATTTGATCTAGTACGTG ATAGGCGCGCCGTCTACAACGTGTCGATCGATGGATG
FtriPGLP::GUS	ATAGCGATCGCAAGGGCATATCATTTAATGCGGC ATAGGCGCGCCGTCAACAACGTGTCGATCAATCGATGGGTTG
FpriPGLP::E1,I1,E2-GUS	ATAGGCGCGCCATGCTTGTTACCACCAGAGCAACC TATCCCGGGAGCATGTCCAAGGTTTCTGGAAC
FpubPGLP::E1,I1,E2-GUS	ATAGGCGCGCCATGCTTGTTGACCACCAGAGCAAC TATCCCGGGGAGCGGAGCATCTCCAAGGTT
FbroPGLP::E1,I1,E2-GUS	ATAGGCGCGCCATGCTTGTTGACCACAAGAGCAAC TATCCCGGGGAGCATCTCCAAGGTTTCTGGAAC
FtriPGLP::E1,I1,E2-GUS	ATAGGCGCGCCATGCTTGTTGACCACCAGAGCAAC TATCCCGGGGACCGGAGCATCTCCAAGGTT

Isolation von 5' flankierenden Regionen und Genen aus *Flaveria*-Spezies mittels Genome Walking

Um die Sequenz der *PGLP* 5' flankierende Region sowie des *PGLP*-Gens aufzuklären, wurde das "GenomeWalker™"-Kit (Clontech, Mountain View, US) gemäß Anleitung verwendet. Die verwendete genomische DNA wurde entsprechend dem Protokoll von Westhoff et al. (1991) mit RNA isoliert über LiCl-Fällung von dieser separiert und aufgereinigt.

Ermittlung der Ähnlichkeit zweier DNA-Sequenzen

Zur Ermittlung der Ähnlichkeit zweier DNA-Sequenzen zueinander wurden diese zuerst mit DIALIGN verglichen (Morgenstern et al. 1998). Die Ähnlichkeit wurde dabei von DIALIGN als der Anteil an Nukleotiden der kürzeren Sequenz definiert, welche mit der längeren Sequenz im Sequenzvergleich übereinstimmen. Zur Identifikation von gemeinsamen Elementen wurde zudem BLAST2seq verwendet (Altschul et al. 1990).

Transformation von *Flaveria bidentis* und *Arabidopsis thaliana*

Zur Transformation von *F. bidentis* wurden Calli gemäß Chitty et al. (1994) über den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL1 transformiert und auf Medium regeneriert (Hood et al. 1986; Lazo et al. 1991). *A. thaliana* wurde über den *A. tumefaciens* Stamm GV3101 mittels der Floral Dip-Methode gemäß Clough und Bent (1998) mit Modifizierungen nach Logemann et al. (2006) transformiert (Koncz and Schell 1986). Zum Nachweis der Transformation wurde genomische DNA gemäß Edwards et al. (1991) isoliert und das Konstrukt über eine Test-PCR nachgewiesen. Für die Test-PCR wurden die Primer GCTCACTCATTAGGCACCCAG und CTTTCCCACCAACGCTGATCA verwendet.

Bestimmung der GUS-Enzym-Aktivität mittels Fluorometrie

Um die Stärke der Expression des *GUS*-Gens zu untersuchen, wurde die Aktivität des GUS-Enzyms bestimmt. Hierzu wurde zuerst das vierte Blatt einer transgenen *F. bidentis*-Pflanze oder vier Blätter einer transgenen *A. thaliana*-Pflanze in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Material in gefrorenen Zustand mittels Elektro-Pistill aufgeschlossen und mit 200 – 400 µl Protein-Extraktions-Puffer (100 mM Na₂PO₄ pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Na-Laurylsarcosinat; 0,1 % (w/v) Triton X-100; 20 % Methanol) vermenget. Das Gemisch wurde anschließend gemischt und für 10 min bei 4°C und 12000 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde nun abgenommen und die Protein-Konzentration mittels Bradford-Assay bestimmt (Bradford 1976). Die Messung der Enzym-Aktivität erfolgte, wie bei Jefferson et al. (1987) und Kosugi et al. (1990) beschrieben. Es wurden jeweils 10 µg Protein, gelöst in 20 µl Protein-Isolations-Puffer, mit 200 µl 37°C warmem Reaktionsmedium (1 mM β-Methyl-Umbelliferyl-β-D-

Glucuronid (MUG) in Protein-Isolations-Puffer) vermischt und bei 37°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 30 bis 90 min wurden insgesamt fünf Aliquots des Gemisches abgenommen und in Stopp-Puffer (0,2 M NaCO₃ in H₂O) gegeben, um die Reaktion zu beenden. Anschließend wurden die Aliquots dunkel und kühl aufbewahrt und die Fluoreszenz mittels eines 25 UV/VIS Spektrometers (Perkin Elmer Instruments, Massachusetts, USA) gemessen. Die Menge an umgesetzten MUG wurde durch eine Konzentrationsreihe von 4-Methylumbelliferon-Lösungen berechnet.

***In-situ*-Lokalisation der GUS-Expression mittels Färbung**

Zur Lokalisation der Expression des GUS-Proteins *in-situ* wurden, wie bei Engelmann beschrieben, ganze Blätter transgener *A. thaliana*-Pflanzen oder quer-geschnittene Blätter von *F. bidentis* verwendet (Engelmann et al. 2008). Diese wurden mit einer Färbelösung (100 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0; 10 mM EDTA; 0,5 mM K₄Fe(CN)₆; 0,5 mM K₃Fe(CN)₆; 0,1 % Triton X-100; 1 mM 5-Brom-4-Chlor-Inodolyl-β-D-Glucuronid) über Vakuum infiltriert und bei 37°C gefärbt. Um den Färbeprozess zu stoppen, wurden die Proben in Fixierlösung (25 % Essigsäure; 75 % Ethanol) für 10 min inkubiert. Sowohl die Waschung als auch die anschließende Lagerung der Proben erfolgte in 70 % Ethanol.

Anzucht von *F. bidentis* und *A. thaliana*

Transgene Pflanzen von *F. bidentis* wurden im Gewächshaus der HHU-Düsseldorf angezogen. Die Anzucht transgener *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte in einer Anzucht-Kammer mit 23°C Tages- und 16°C Nacht-Temperatur bei einem Verhältnis von 16 h Tag zu 8 h Nacht und einer Lichtstärke von etwa 100 bis 200 μE.

6 Literaturverzeichnis

- Adwy W, Laxa M, Peterhansel C** (2015) A Simple Mechanism for the Establishment of C₂-Specific Gene Expression in *Brassicaceae*. *The Plant Journal* 84: 1231-1238
- Akyildiz M, Gowik U, Engelmann S, Koczor M, Streubel M, Westhoff P** (2007) Evolution and Function of a Cis-Regulatory Module for Mesophyll-Specific Gene Expression in the C₄ Dicot *Flaveria trinervia*. *The Plant Cell* 19: 3391-3402
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410
- Anderson LE** (1971) Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes II. Pea Leaf Triose Phosphate Isomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 235: 237-244
- Arndt NT, Nisbet EG** (2012) Processes on the Young Earth and the Habitats of Early Life. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 40: 521-549
- Aubry S, Kelly S, Kümpers BMC, Smith-Unna RD, Hibberd JM** (2014a) Deep Evolutionary Comparison of Gene Expression Identifies Parallel Recruitment of Trans-Factors in Two Independent Origins of C₄ Photosynthesis. *Public Library of Science Genetics* 10: e1004365
- Aubry S, Smith-Unna RD, Bournsnell CM, Kopriva S, Hibberd JM** (2014b) Transcript Residency on Ribosomes Reveals a Key Role for the *Arabidopsis thaliana* Bundle Sheath in Sulfur and Glucosinolate Metabolism. *The Plant Journal* 78: 659-673
- Bauwe H** (1984) Photosynthetic Enzyme Activities in C₃-C₄ Intermediate Species of *Moricandia* and in *Panicum milioides*. *Photosynthetica* 18: 201-209
- Bauwe H** (2011) Photorespiration - the Bridge to C₄ Photosynthesis. In: Raghavendra AS, Sage RF (eds) *C₄ Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms*. Springer Verlag, Heidelberg-Berlin, pp 81-108
- Bowes G, Ogren WL, Hageman RH** (1971) Phosphoglycolate Production Catalyzed by Ribulose Diphosphate Carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45: 716-722
- Bradford MM** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Bräutigam A, Gowik U** (2016) Photorespiration Connects C₃ and C₄ Photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 67: 2953-2962
- Buchman AR, Berg P** (1988) Comparison of Intron-Dependent and Intron-Independent Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* 8: 4395-4405
- Burgess D, Freeling M** (2014) The Most Deeply Conserved Noncoding Sequences in Plants Serve Similar Functions to Those in Vertebrates Despite Large Differences in Evolutionary Rates. *The Plant Cell* 26: 946-961
- Burgess DG, Xu J, Freeling M** (2015) Advances in Understanding Cis Regulation of the Plant Gene with an Emphasis on Comparative Genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 27: 141-147
- Callis J, Fromm ME, Walbot V** (1987) Introns Increase Gene Expression in Cultured Maize Cells. *Genes and Development* 1: 1183-1200
- Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams AJ, Wheeler R, Wong B, Drenkow J, Yamanaka M, Patel S, Brubaker S, Tammana H, Helt G, Struhl K, Gingeras TR** (2004) Unbiased Mapping of Transcription Factor Binding Sites along Human Chromosomes 21 and 22 Points to Widespread Regulation of Noncoding RNAs. *Cell* 116: 499-509

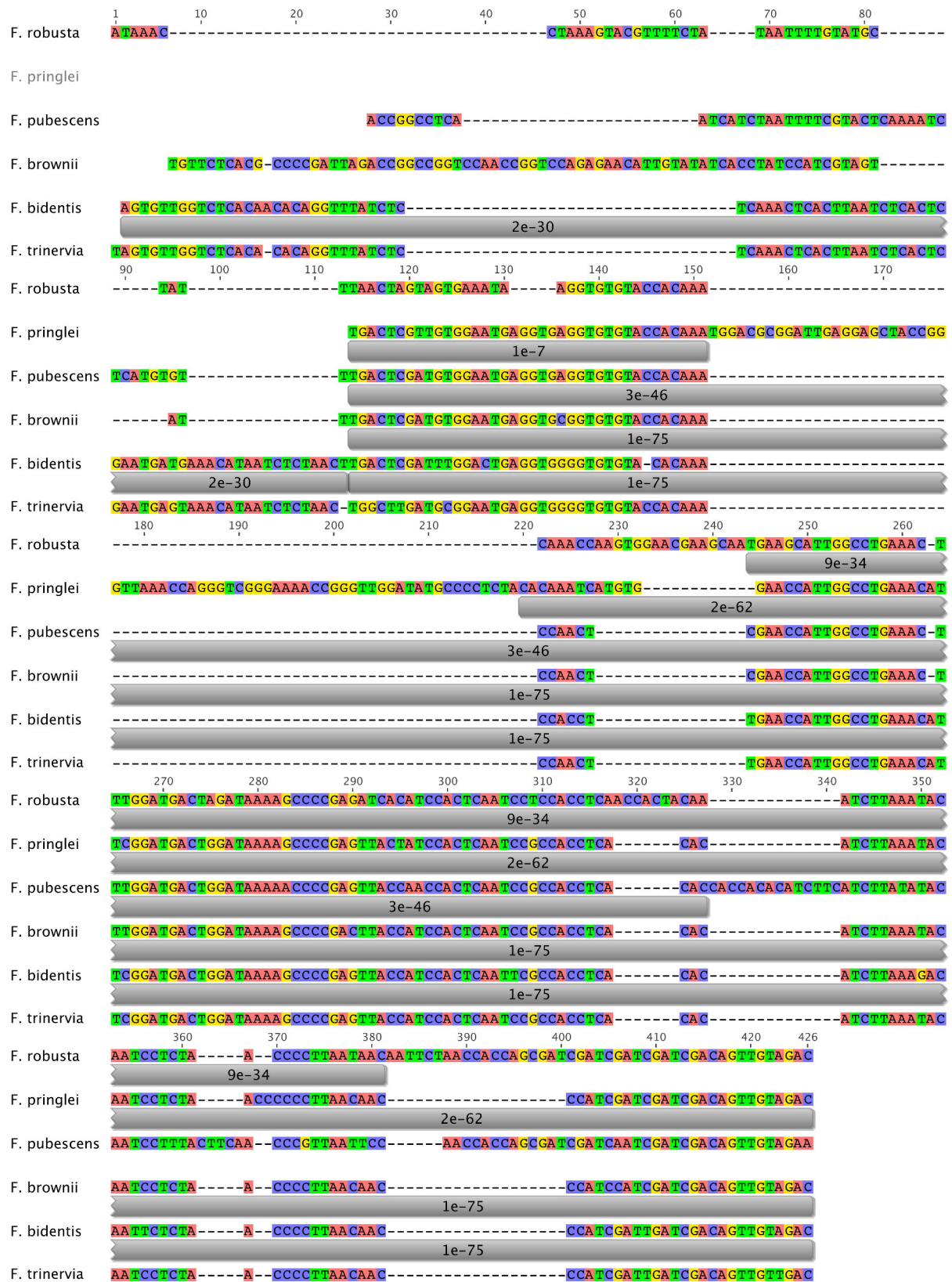
- Chang YM, Liu WY, Shih AC, Shen MN, Lu CH, Lu MY, Yang HW, Wang TY, Chen SC, Chen SM, Li WH, Ku MS** (2012) Characterizing Regulatory and Functional Differentiation between Maize Mesophyll and Bundle Sheath Cells by Transcriptomic Analysis. *Plant Physiology* 160: 165-177
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY** (2003) Complete Sequence of the Binary Vector pBI121 and Its Application in Cloning T-DNA Insertion from Transgenic Plants. *Molecular Breeding* 11: 287-293
- Chitty JA, Furbank RT, Marshall JS, Chen Z, Taylor WC** (1994) Genetic Transformation of the C₄ Plant, *Flaveria bidentis*. *The Plant Journal* 6: 949-956
- Clough RC, Matthijs AL, Barnum SR, Jaworski JG** (1992) Purification and Characterization of 3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III from Spinach. A Condensing Enzyme Utilizing Acetyl-Coenzyme A to Initiate Fatty Acid Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 20992-20998
- Dai Z, Ku MB, Edwards G** (1996) Oxygen Sensitivity of Photosynthesis and Photorespiration in Different Photosynthetic Types in the Genus *Flaveria*. *Planta* 198: 563-571
- Döring F, Streubel M, Bräutigam A, Gowik U** (2016) Most Photorespiratory Genes are Preferentially Expressed in the Bundle Sheath Cells of the C₄ Grass *Sorghum bicolor*. *Journal of Experimental Botany* 67: 3053-3064
- Edwards GE, Kanai R, Black CC** (1971) Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Leaves of Certain Plants Which Fix CO₂ by the C₄-Dicarboxylic Acid Cycle of Photosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45: 278-285
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349
- Engelmann S, Wiludda C, Burscheidt J, Gowik U, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Cossu R, Bauwe H, Westhoff P** (2008) The Gene for the P-subunit of Glycine Decarboxylase from the C₄ Species *Flaveria trinervia*: Analysis of Transcriptional Control in Transgenic *Flaveria bidentis* (C₄) and *Arabidopsis thaliana* (C₃). *Plant Physiology* 146: 1773-1785
- Feodorova TA, Voznesenskaya EV, Edwards GE, Roalson EH** (2010) Biogeographic Patterns of Diversification and the Origins of C₄ in Cleome (*Cleomaceae*). *Systematic Botany* 35: 811-826
- Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R** (2014) DNA-binding Specificities of Plant Transcription Factors and Their Potential to Define Target Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 111: 2367-2372
- Furbank RT** (2016) Walking the C₄ Pathway: Past, Present, and Future. *Journal of Experimental Botany* 67 4057-4066
- Gallegos JE, Rose AB** (2015) The Enduring Mystery of Intron-Mediated Enhancement. *Plant Science* 237: 8-15
- Gowik U, Burscheidt J, Akyildiz M, Schlue U, Koczor M, Streubel M, Westhoff P** (2004) Cis-Regulatory Elements for Mesophyll-Specific Gene Expression in the C₄ Plant *Flaveria trinervia*, the Promoter of the C₄ Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene. *The Plant Cell* 16: 1077-1090
- Guo HN, Moose SP** (2003) Conserved Noncoding Sequences among Cultivated Cereal Genomes Identify Candidate Regulatory Sequence Elements and Patterns of Promoter Evolution. *The Plant Cell* 15: 1143-1158
- Hatch MD** (1971) The C₄-Pathway of Photosynthesis. Evidence for an Intermediate Pool of Carbon Dioxide and the Identity of the Donor C₄-dicarboxylic Acid. *Biochemical Journal* 125: 425-432

- Hatch MD, Kagawa T** (1976) Photosynthetic Activities of Isolated Bundle Sheath Cells in Relation to Differing Mechanisms of C4 Pathway Photosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175: 39-53
- Heckmann D, Schulze S, Denton A, Gowik U, Westhoff P, Weber Andreas PM, Lercher Martin J** (2013) Predicting C4 Photosynthesis Evolution: Modular, Individually Adaptive Steps on a Mount Fuji Fitness Landscape. *Cell* 153: 1579-1588
- Heimann L, Horst I, Perduns R, Dreesen B, Offermann S, Peterhänsel C** (2013) A Common Histone Modification Code on C4 Genes in Maize and Its Conservation in *Sorghum* and *Setaria italica*. *Plant Physiology* 162: 456-469
- Hood E, Helmer GL, Fraley RT, Chilton M-D** (1986) The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 Is Encoded in a Region of pTiBo542 Outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* 168: 1291-1301
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS Fusions: β -Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. *European Molecular Biology Organisation Journal* 6: 3901-3907
- Jordan DB, Ogren WL** (1981) Species Variation in the Specificity of Ribulose Biphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Nature* 291: 513-515
- Jordan DB, Ogren WL** (1984) The CO₂/O₂ Specificity of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Planta* 161: 308-313
- Kanzaki Y, Murakami T** (2015) Estimates of Atmospheric CO₂ in the Neoproterozoic-Paleoproterozoic from Paleosols. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 159: 190-219
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A** (2012) Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649
- Kelly GJ, Latzko E** (1976) Inhibition of Spinach-Leaf Phosphofructokinase by 2-Phosphoglycollate. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 68: 55-58
- Koncz C, Schell J** (1986) The Promoter of TL-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimaeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector. *Molecular and General Genetics MGG* 204: 383-396
- Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K, Arai Y** (1990) An Improved Assay for β -glucuronidase in Transformed Cells: Methanol Almost Completely Suppresses a Putative Endogenous β -Glucuronidase Activity. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology* 70: 133-140
- Kump LR** (2008) The Rise of Atmospheric Oxygen. *Nature* 451: 277-278
- Laing WA, Ogren WL, Hageman RH** (1974) Regulation of Soybean Net Photosynthetic CO₂ Fixation by the Interaction of CO₂, O₂, and Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase. *Plant Physiology* 54: 678-685
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA** (1991) A DNA Transformation-Competent *Arabidopsis* Genomic Library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)* 9: 963-967
- Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ** (2000) The Spliceosome Deposits Multiple Proteins 20-24 Nucleotides Upstream of mRNA Exon-Exon Junctions. *European Molecular Biology Organization Journal* 19: 6860-6869
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Myers CR, Reidel EJ, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell TP** (2010) The Developmental Dynamics of the Maize Leaf Transcriptome. *Nature Genetics* 42: 1060-1067
- Logemann E, Birkenbihl RP, Ülker B, Somssich IE** (2006) An Improved Method for Preparing *Agrobacterium* Cells that Simplifies the *Arabidopsis* Transformation Protocol. *Plant Methods* 2: 1-5

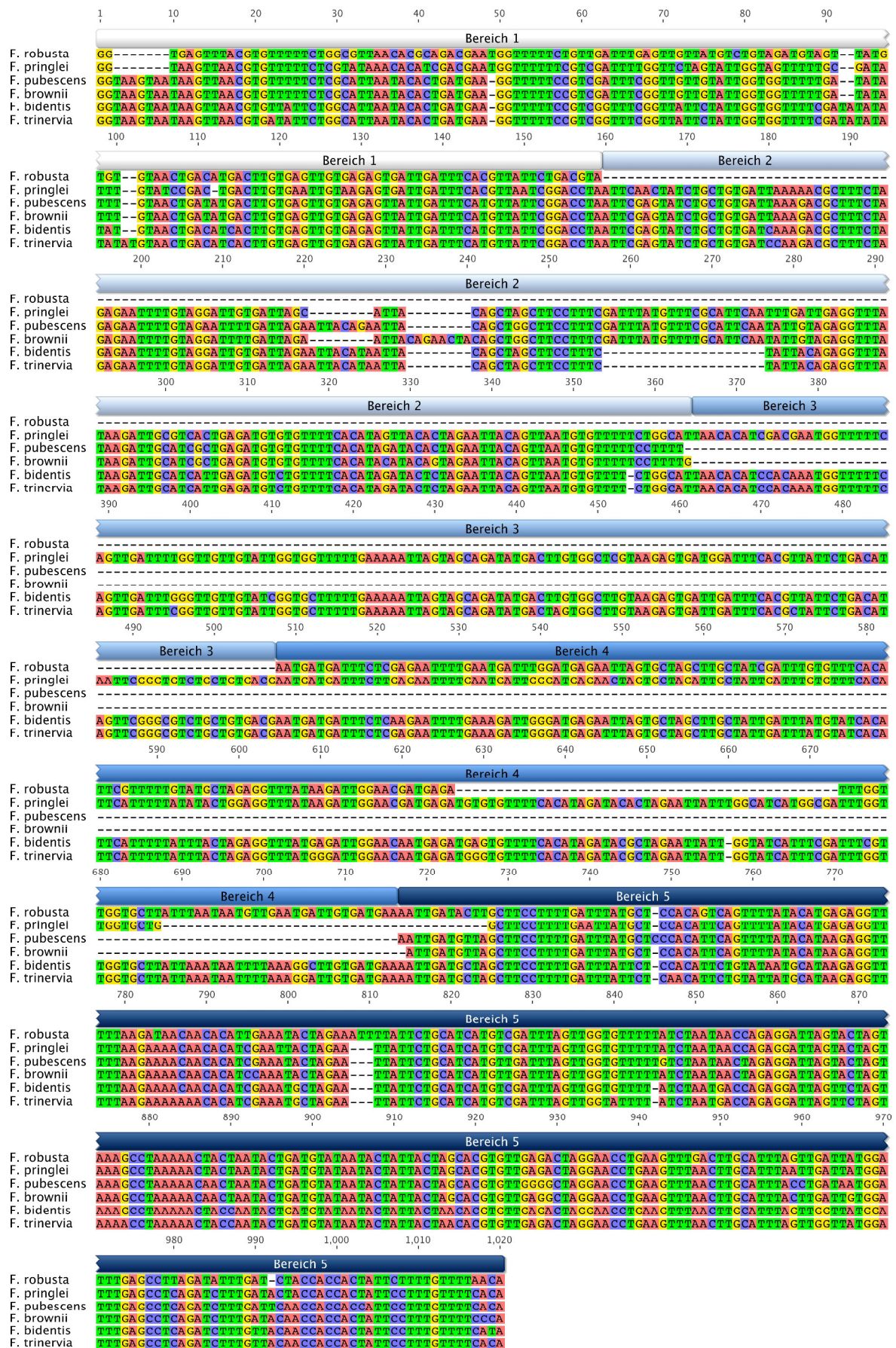
- Love AC, Andrews ME, Raff RA** (2007) Gene Expression Patterns in a Novel Animal Appendage: the Sea Urchin *Pluteus arm*. *Evolution and Development* 9: 51-68
- Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ** (2014) The Rise of Oxygen in Earth's Early Ocean and Atmosphere. *Nature* 506: 307-315
- Mallmann J, Heckmann D, Bräutigam A, Lercher MJ, Weber APM, Westhoff P, Gowik U** (2014) The Role of Photorespiration during the Evolution of C4 Photosynthesis in the Genus *Flaveria*. *eLife* 3: e02478
- Matsuoka M, Kozuka J, Shimamoto K, Kano-Murakami Y** (1994) The Promoters of Two Carboxylases in a C4 Plant (Maize) Direct Cell-specific, Light-regulated Expression in a C3 Plant (Rice). *The Plant Journal* 6: 311-319
- McKown AD, Moncalvo J-M, Dengler NG** (2005) Phylogeny of *Flaveria* (*Asteraceae*) and Inference of C4 Photosynthesis Evolution. *American Journal of Botany* 92: 1911-1928
- Monson RK, Edwards GE, Ku MSB** (1984) C3-C4 Intermediate Photosynthesis in Plants. *Bioscience* 34: 563-574
- Morgenstern B, Frech K, Dress A, Werner T** (1998) DIALIGN: Finding Local Similarities by Multiple Sequence Alignment. *Bioinformatics* 14: 290-294
- Nisbet EG, Grassineau NV, Howe CJ, Abell PI, Regelous M, Nisbet RER** (2007) The Age of Rubisco: the Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Geobiology* 5: 311-335
- Nomura M, Higuchi T, Ishida Y, Ohta S, Komari T, Imaizumi N, Miyao-Tokutomi M, Matsuoka M, Tajima S** (2005) Differential Expression Pattern of C4 Bundle Sheath Expression Genes in Rice, a C3 Plant. *Plant and Cell Physiology* 46: 754-761
- Perduns R, Horst-Niessen I, Peterhänsel C** (2015) Photosynthetic Genes and Genes Associated with the C4 Trait in Maize are Characterized by a New Class of Highly Regulated Histone Acetylation Peaks on Upstream Promoters. *Plant Physiology* 168:1378-1388
- Sage RF** (2004) The Evolution of C4 Photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341-370
- Sage RF, Khoshravesh R, Sage TL** (2014) From Proto-Kranz to C4 Kranz: Building the Bridge to C4 Photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 65: 3341-3356
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F** (2012) Photorespiration and the Evolution of C4 Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 63: 19-47
- Savir Y, Noor E, Milo R, Tlustý T** (2010) Cross-Species Analysis Traces Adaptation of Rubisco toward Optimality in a Low-dimensional Landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 3475-3480
- Schauer SE, Schlüter PM, Baskar R, Gheyselinck J, Bolaños A, Curtis MD, Grossniklaus U** (2009) Intronic Regulatory Elements Determine the Divergent Expression Patterns of AGAMOUS-LIKE6 Subfamily Members in Arabidopsis. *The Plant Journal* 59: 987-1000
- Schulze S, Mallmann J, Burscheidt J, Koczor M, Streubel M, Bauwe H, Gowik U, Westhoff P** (2013) Evolution of C4 Photosynthesis in the Genus *Flaveria*: Establishment of a Photorespiratory CO₂ Pump. *The Plant Cell Online* 25: 2522-2535
- Schulze S, Westhoff P, Gowik U** (2016) Glycine Decarboxylase in C3, C4 and C3-C4 Intermediate Species. *Current Opinion in Plant Biology* 31: 29-35
- Sharkey TD, Kobza J, Seemann JR, Brown RH** (1988) Reduced Cytosolic Fructose-1,6-Bisphosphatase Activity Leads to Loss of O₂ Sensitivity in a *Flaveria linearis* Mutant. *Plant Physiology* 86: 667-671
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) A Phosphoglycolate Phosphatase-Deficient Mutant of Arabidopsis. *Nature* 280: 833-836

- Tcherkez GG, Farquhar GD, Andrews TJ** (2006) Despite Slow Catalysis and Confused Substrate Specificity, all Ribulose Bisphosphate Carboxylases May be Nearly Perfectly Optimized. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 7246-7251
- Timm S, Bauwe H** (2013) The Variety of Photorespiratory Phenotypes – Employing the Current Status for Future Research Directions on Photorespiration. *Plant Biology* 15: 737-747
- Westhoff P, Offermann-Steinhard K, Höfer M, Eskins K, Oswald A, Streubel M** (1991) Differential Accumulation of Plastid Transcripts Encoding Photosystem II Components in the Mesophyll and Bundle-sheath Cells of Monocotyledonous NADP-Malic Enzyme-Type C4 Plants. *Planta* 184: 377-388
- Williams BP, Johnston IG, Covshoff S, Hibberd JM** (2013) Phenotypic Landscape Inference Reveals Multiple Evolutionary Paths to C4 Photosynthesis. *eLife* 2: e00961
- Wiludda C, Schulze S, Gowik U, Engelmann S, Koczor M, Streubel M, Bauwe H, Westhoff P** (2012) Regulation of the Photorespiratory *GLDPA* Gene in *C4 Flaveria* - an Intricate Interplay of Transcriptional and Post-Transcriptional Processes. *The Plant Cell* 24: 137–151
- Zanetti ME, Chang IF, Gong FC, Galbraith DW, Bailey-Serres J** (2005) Immunopurification of Polyribosomal Complexes of Arabidopsis for Global Analysis of Gene Expression. *Plant Physiology* 138: 624-635

7 Anhang



Anhang 1: Sequenzvergleich des proximalen Abschnitts der 5' flankierenden Region des PGLP-Gens durch das Programm DIALIGN (Morgenstern et al. 1998). Die mit BLAST2seq identifizierten Übereinstimmungen zwischen *F. trinervia* und den anderen Spezies sind mit grauen Balken markiert und die Wahrscheinlichkeit des zufälligen Auftretens innerhalb des jeweiligen Balkens aufgeführt (Altschul et al. 1990). Die Abbildung wurde mit dem Programm Genious erstellt (Kearse et al. 2012).



Anhang 2: Sequenzvergleich des ersten Introns des PGLP-Gens mit den Programm DIALIGN (Morgenstern et al. 1998). Die definierten Bereiche des Introns sind mit farbigen Balken markiert. Die Abbildung wurde mit den Programm Genious erstellt (Kearse et al. 2012).

VI.b Manuskript II**The reduction of the photorespiratory enzyme 2-phosphoglycolate phosphatase (PGLP) in the C4 plant *Flaveria bidentis* and its consequence**

Myles Levey¹, Stefan Timm², Udo Gowik¹, Maria Koczor¹, Kathrin Jahnke², and Katrin Weber³

¹ Institute of Plant Molecular and Developmental Biology, Universitätsstrasse 1, Heinrich-Heine-University, 40225 Düsseldorf, Germany

² University of Rostock, Plant Physiology Department, Albert-Einstein-Straße 3, D-18051 Rostock, Germany

³ Institute of Plant Biochemistry, Universitätsstrasse 1, Heinrich-Heine-University, 40225 Düsseldorf, Germany

Abstract

Photorespiration is a pathway used by all photosynthetic organisms to recycle toxic 2-phosphoglycolate to 3-phosphoglycerate by the cost of energy. C4 plants have a severely reduced photorespiration that is though mandatory to sustain in ambient air. However, while the consequence of a disturbance of the photorespiratory pathway for the physiology of C4 plants was analyzed before, the direct impact of such a disturbance for the metabolism is still unclear. To elucidate this impact we knocked down the photorespiratory gene *2-phosphoglycolate phosphatase (PGLP)* in the C4 plant *F. bidentis* via an siRNA gene and analyzed the consequence for metabolism and physiology. All in all our results demonstrate that the C4 plant *F. bidentis* displays a reduced ability to grow and to do photosynthesis in ambient air, when the PGLP protein level is reduced to about 6 %. Moreover we found an unexpected accumulation of glycolate in the siRNA-lines that distinguishes this mutant from the *PGLP* mutant of the C3 plant *Arabidopsis thaliana* and wild type *F. bidentis*.

Introduction

The enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) is able to carboxylate as well as to oxygenate 1,5-bisphosphate (RuBP) leading to 3-phosphoglycerate (3-PGA) or to 2-phosphoglycolate (2-PG), respectively. 2-PG is supposed to be toxic as it inhibits triosephosphate isomerase and phosphofructokinase

in vitro, which are main enzymes of the primary carbon metabolism (Anderson 1971; Kelly and Latzko 1976). To recycle the toxic 2-PG to 3-PGA a metabolic repair pathway named photorespiration is used. In higher plants photorespiratory reactions take place in the chloroplast, the peroxisome, the mitochondria and the cytosol. Photorespiration involves the reactions of eight core enzymes as well as several intracellular transport steps and side reactions as reviewed by Bauwe (Bauwe et al. 2010). All in all regeneration of one 3-PGA molecule costs 8,5 molecules of ATP, one molecule of CO₂ and one molecule of NH₃ (Bloom 2014). In addition to its role in detoxification of 2-PG photorespiration has an impact on pathogen defense and photo protection (Sørhagen et al. 2013; Wingler et al. 2000).

One physiological trait that successfully reduces RuBP oxygenation and consequently photorespiration is the C₄ photosynthesis (Hatch 1971; Ogren 1984; Sage 2004; Vogan and Sage 2012). C₄ plants are able to enrich CO₂ around RubisCO leading to a reduction of the oxygenase reaction and accordingly photorespiration. This CO₂ enrichment is achieved by the interaction of two different cell types in the leaves of C₄ plants, the mesophyll and the bundle sheath cells. CO₂ is prefixed in the mesophyll by the oxygen insensitive phosphoenolpyruvate carboxylase, the resulting four carbon compound diffuses to the bundle sheath cell where CO₂ is set free by a decarboxylase, leading to an increased CO₂ concentration in the vicinity of RubisCO that is exclusively localized in the bundle sheath cells in C₄ plants (Hatch 1987). To ensure an efficient exchange of metabolites between both cell types C₄ plants exhibit a special leaf anatomy, Kranz anatomy (Haberlandt 1904). The, compared to C₃ species, big and organelle rich bundle sheath cells, surround the vascular bundles and are themselves surrounded by the mesophyll cells. Ensuring that each mesophyll cell is in direct contact to a bundle sheath cell the vein density is high. C₄ plants evolved more than 60 times independently from C₃ ancestors whereas the reduction of photorespiration and its costs was the major driving force (Sage 2016; Sage et al. 2014).

The photorespiratory proteins are reduced in C₄ plants and largely restricted to the bundle sheath in some C₄ grass species (Majeran et al., 2010; Döring et al., 2016). Apparent photorespiration is hardly detectable in C₄ plants (Dai et al. 1993; Hatch 1971; Laisk and Edwards 1998). However, in 2009, Zelitch et al. demonstrated that photorespiration is also essential for C₄ plants as the knock out of the photorespiratory *GOX* gene in the C₄ plant *Zea mays* leads to a lethal phenotype in ambient air, whereas

the mutant plants could be rescued in elevated CO₂, corresponding to a typical “photorespiratory phenotype” (Somerville 2001). Similar observations were reported for single celled organisms exhibiting a carbon concentration mechanism like cyanobacterium *Synechocystis* or the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (Eisenhut et al. 2008; Nakamura et al. 2005; Suzuki et al. 1990). So far, no further C₄ plants with impairments of the photorespiratory pathway were analyzed, leaving the impact on the metabolism of C₄ plants and the connection to physiological responses unknown.

To address this question we knocked down the photorespiratory *2-phosphoglycolate phosphatase (PGLP)* gene (EC number: 3.1.3.18) in the dicotyledonous C₄ plant *Flaveria bidentis* via a constitutively expressed siRNA. PGLP is responsible for the conversion of 2-PG to glycolate and *PGLP* mutants display a very severe photorespiratory phenotype, underlining the importance of the enzyme and the impact of 2-PG on the organism (Hall et al. 1987; Somerville and Ogren 1979; Suzuki et al. 1990; Timm and Bauwe 2013; Timm et al. 2012). However, the amount of *PGLP* mRNA and protein found in C₄ plants is reduced by a factor of 2.7 and 3.6, respectively, compared with C₃ plants (Mallmann et al. 2014). By inhibiting triosephosphate isomerase and phosphofructo kinase, 2-PG and not glycolate, accumulating in the *Z. mays GOX* mutant, appears to be the most toxic metabolite of photorespiration (Anderson 1971; Kelly and Latzko 1976; Timm and Bauwe 2013). Beside its toxic nature, 2-PG seems to have a role as signal molecule in photosynthetic organisms (Haimovich-Dayana et al. 2015; Nishimura et al. 2008).

The regenerated *F. bidentis* plants containing the siRNA-gene, showed reduced PGLP protein amounts and a varying ability to grow on soil in ambient air. However, under 1 % CO₂ all plants survived and grew. Two siRNA-lines were analyzed in detail in the T₁ generation. Here the photosynthesis of both lines was more sensitive to oxygen than in the wild type. Moreover, the measurement of metabolite profiles after a shift from 1 % CO₂ to ambient air revealed a number of similar effects on the metabolism of the *PGLP* knock down of C₄ plant *F. bidentis* and the *PGLP* mutants in the C₃ plant *Arabidopsis thaliana*, but also a accumulation of glycolate that is specific to the siRNA-lines.

Results

Construction of the *PGLP*-siRNA gene and conformation of transformation

The aim of this project was to analyse the physiological impact of a down regulation of the photorespiratory *PGLP* gene in the C4 plant *F. bidentis*. Therefore we constructed a siRNA-gene against *PGLP* (*PGLP*-siRNA) containing the first 749 bp of the 1480 bp long *PGLP* messenger RNA of *F. bidentis* in sense and antisense direction connected via the *Actin11* intron of *A. thaliana*. The siRNA gene was fused to the constitutively active CaMV35S promoter to achieve a permanent down regulation of *PGLP* in the photosynthetic tissue of the plant (Figure 1A). Transformation of this construct into *F. bidentis* resulted in nine transgenic calli that were positively tested for the construct (Figure 1B). These calli were used to regenerate transgenic plants on sucrose-supplemented media under ambient air in the light. Each transgene callus represents an independent transformation event and plants regenerated from these are considered as separate siRNA-lines.

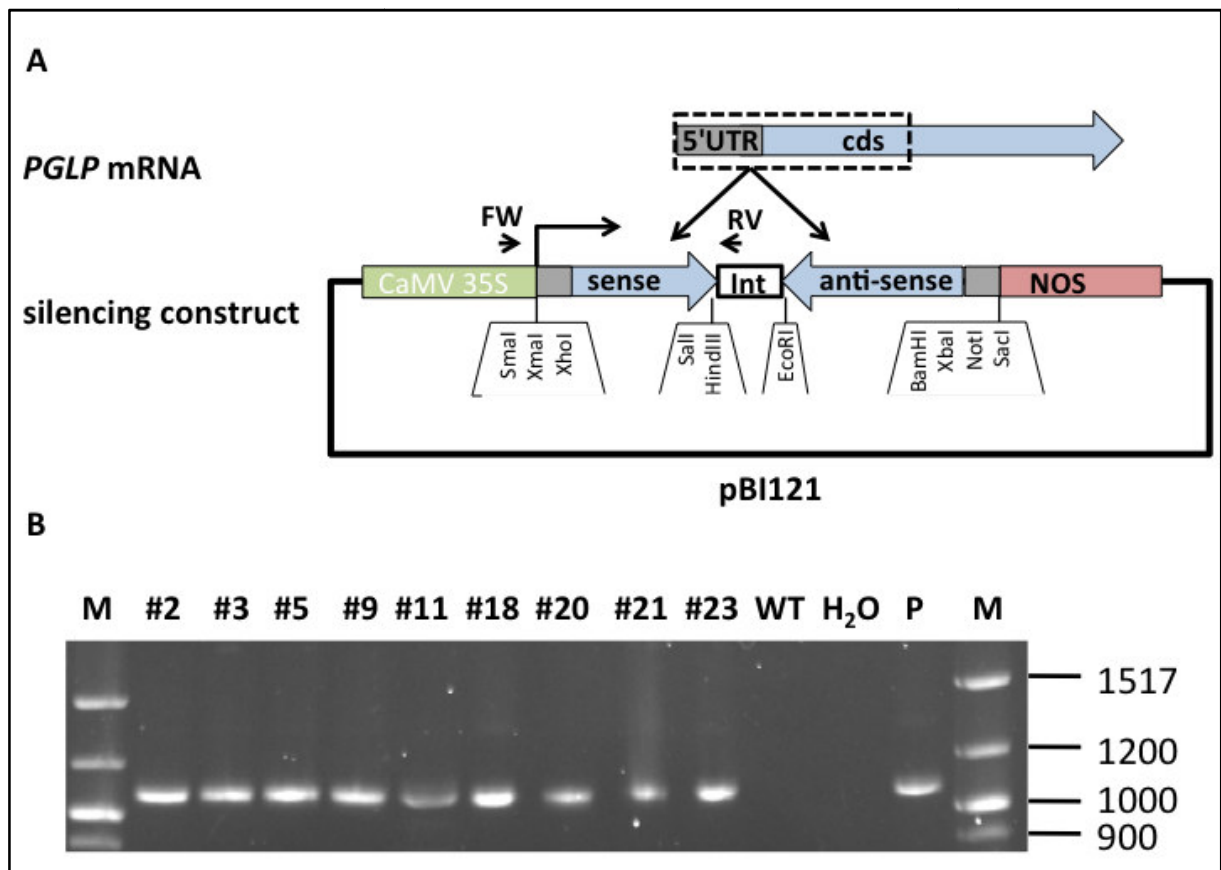


Figure 1: The construction of the PGLP siRNA (A) and the conformation of its transformation (B). Shown in A is the used part of the PGLP mRNA (scattered box) the 5'UTR (dark grey), as well as the coding region of PGLP (blue). The sense strand is marked with "sense" and separated from the anti-sense strand "anti-sense" via an Intron "Int". The construct is downstream of the CaMV 35S Promoter (green) and upstream of the NOS-terminator (red). Shown in B are the PCR products of a genotyping PCR with genomic DNA from the different plants from tissue culture on a 2 % Agarose Gel. The wild type is marked with "WT" and the PGLP-siRNA containing plasmid with "P" for positive control.

The siRNA-lines #5 and #11 display the phenotype of a photorespiratory mutant

During the growth of siRNA-lines under ambient air in tissue culture, the two siRNA-lines #5 and #11, exhibited yellow leaves, while the other seven siRNA-lines looked like wild type *F. bidentis* (Figure 2). This yellowish phenotype is comparable to the one of the *A. thaliana* PGLP knock out mutant (*pglp1*) described previously (Timm et al. 2012). However, siRNA-line #5 and #11 grew and could be propagated. When cuttings of the siRNA-lines were transferred from media to soil, those of siRNA-line #5 and #11 did not grow, and died within two weeks (Figure 3). This resembles the *Arabidopsis* *pglp1* mutant that is also not viable on soil in ambient air (Schwarte and Bauwe 2007). The remaining seven siRNA-lines grew under the same conditions like the wild type (Figure 3) and were also able to produce fertile seeds.

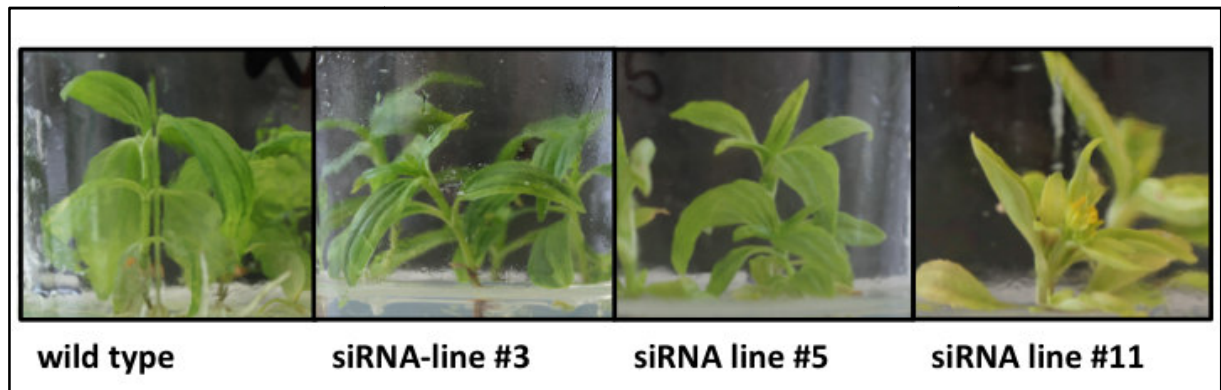


Figure 2: Growth comparison of *F. bidentis* wild type plants and siRNA-lines under ambient air on media. siRNA-line #3 represents the average habitus of the siRNA-lines not shown here. The media contained 1 x Murashige & Skoog and 3 % Sucrose.

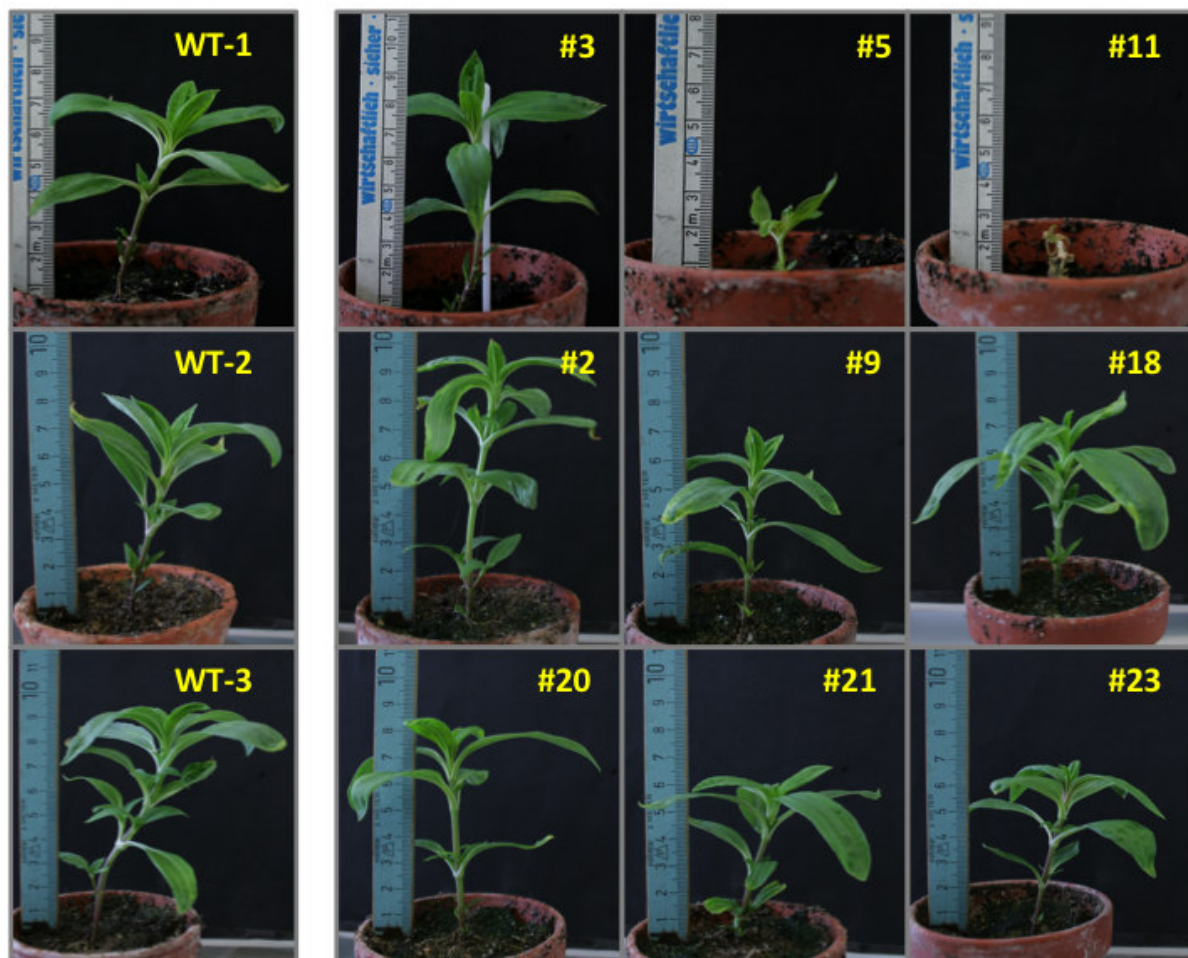


Figure 3: Growth of the T_0 generation of siRNA-lines under ambient air on soil in a growth cabinet after one week. Shown are representative results of two separate experimental runs with wild type "WT-1" and the siRNA-lines #3, #5 and #11 on the one site and WT-2, WT-3, siRNA-line #2, #9, #18, #20, #21 and #23 on the other site. The experiment was repeated three times for each line with three plants per experimental run. The scale on the left is in cm.

Several studies showed that photorespiratory *A. thaliana* mutants can be rescued with elevated CO₂ concentrations (Schwarte and Bauwe 2007; Somerville and Ogren 1979; Timm and Bauwe 2013; Zelitch et al. 2009). To test if this is true also for the C₄ species *F. bidentis*, cuttings of the yellowish siRNA-lines #5 and #11 as well as the wiltypish line #3 and the wild type itself were grown under 1 % CO₂. All three siRNA lines survived and grew under elevated CO₂ conditions and produced seeds (Supplemental figure 1). While plants of siRNA-line #3 and #5 showed wild type like growth, siRNA-line #11 grew slower than the wild type, indicating, that 1 % CO₂ is sufficient to rescue the phenotype completely in siRNA-line #3 and #5 but not in #11. The latter is similar to the observation made with *pglp1*, where 1 % CO₂ was also not sufficient to rescue the phenotype completely (Timm et al. 2012). The possibility to rescue mutant plants by elevated CO₂ concentrations is the hallmark of a photorespiratory phenotype and again resembles the *A. thaliana* *PGLP* mutant (Schwarte and Bauwe 2007; Timm and Bauwe 2013). Seeds generated by plants from the siRNA-line #5 did not germinate under 1 % CO₂ or ambient air on soil or media.

Leave development is impaired when the siRNA-lines are returned to ambient air

Photorespiratory mutants can be rescued by elevated CO₂, but the mutant phenotype often becomes apparent again, when the plants are shifted to ambient air. To address this we grew T₁ plants of siRNA-lines #3 and #11 under 1 % CO₂ alongside with wild type *F. bidentis*. After twelve weeks the plants were shifted to ambient air.

Three days after the shift (AC3), the sink leaves at the top of the plants of siRNA-line #3 and #11, but not of the wild type plants, turned yellow (Figure 4). This effect was more pronounced in siRNA-line #11 and vanished in siRNA-line #3 after five to seven days, but not in siRNA-line #11. After seven days under ambient air conditions (AC7) plants of the wild type and siRNA-line #3 kept growing. In contrast, plants of siRNA-line #11 displayed stunted growth and their leaves showed chlorotic lesions (Figure 4). After 14 days plants of siRNA-line #11 were dead indicating that the mutant phenotype in siRNA-line #11 can be suppressed only by the constant application of elevated CO₂. Moreover it

demonstrates that also siRNA-line #3 suffers from a change in CO₂ concentration, while the wild type does not.

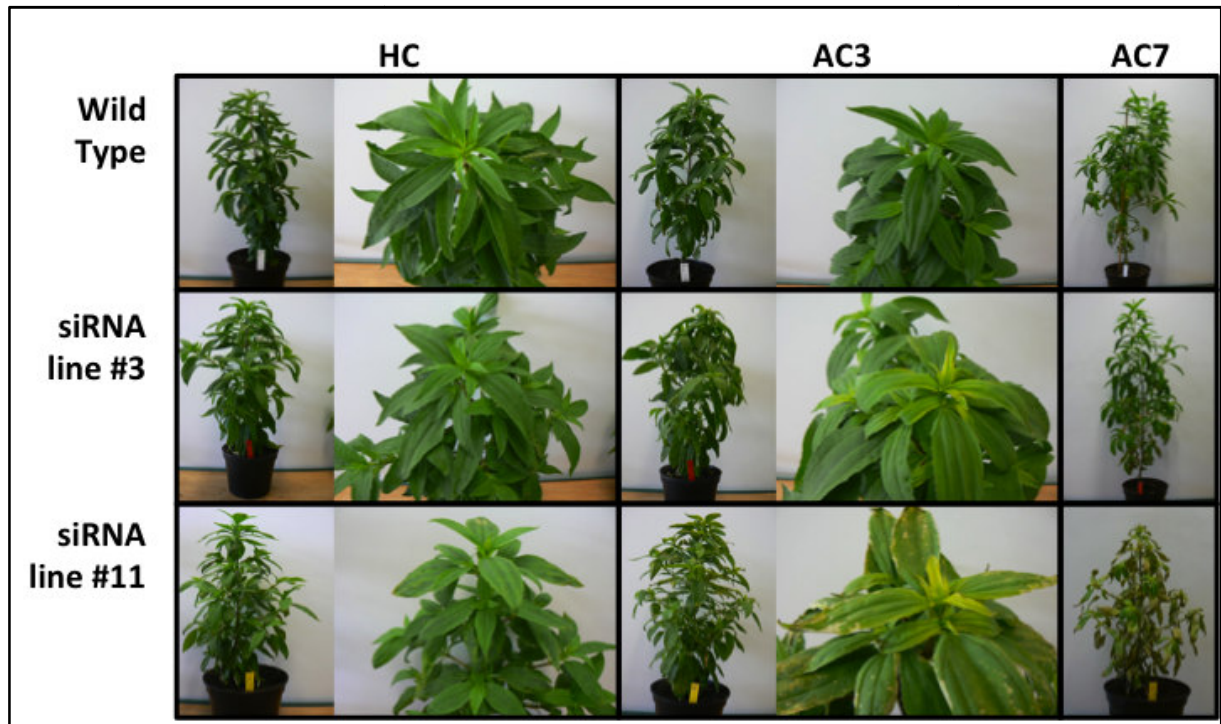


Figure 4: Growth of twelve weeks old T₁ plants of the siRNA-lines #3 and #11 in 1 % CO₂ and after a shift to ambient air on soil. Shown are one plant of siRNA-line #3, one of siRNA-line #11 and one of the wild type at high CO₂ and after three days (AC3) and seven days (AC7) in ambient air.

PGLP protein levels are reduced to 6 % or less in siRNA-line #3 and #11 in T₁ generation

To determine the degree of PGLP reduction in the siRNA-lines T₁ plants from siRNA-lines #11 and #3 were grown next to the wild type in 1 % CO₂ to suppress photorespiration considerably. PGLP levels were measured by means of western blotting using a specific PGLP antibody (Timm et al. 2013). As shown in Figure 5, PGLP amounts are reduced to 6 % or less of the wild type level in both of the lines.

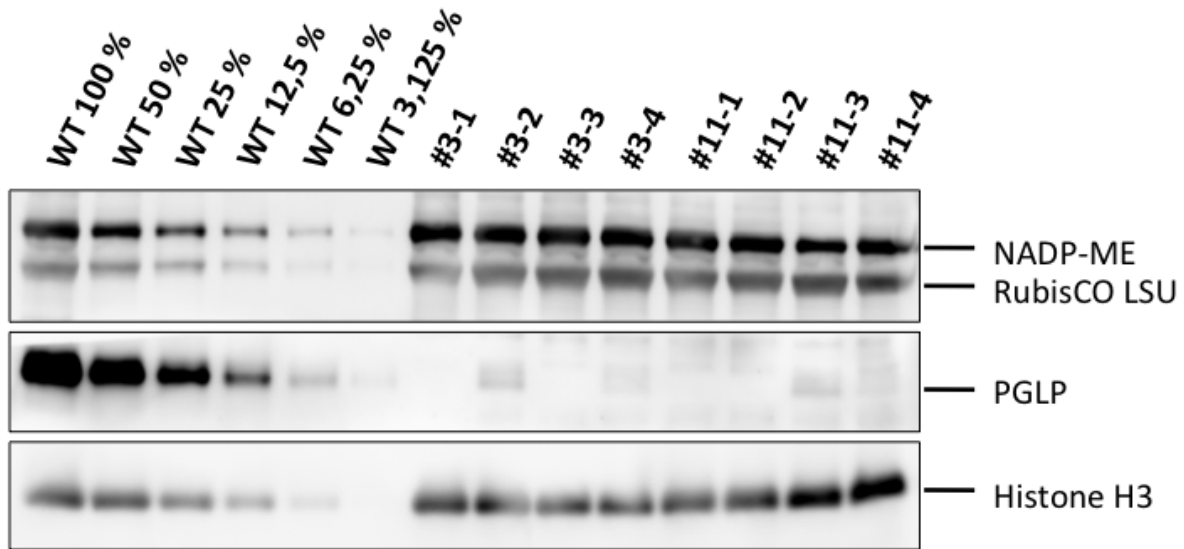


Figure 5: Quantification of PGLP protein amount in T_1 plants of siRNA-line #3 and #11. Shown are four replicates (1-4) of both lines grown alongside in 1 % CO_2 with the wild type. Detected were the proteins 2-phosphoglycolate phosphatase (PGLP), the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO LSU), NADP dependent malate enzyme (NADP-ME) and Histone H3 as a loading control.

We also quantified the PGLP protein in lines #2, #9, #18, #20, #21, and #23 grown in ambient CO_2 on soil, which all showed no growth inhibition under these conditions. In these lines PGLP was reduced to levels between 10 and 75 % of the wild type (Supplemental figure 2), confirming that the *PGLP* gene is knocked down in all siRNA-lines available. These results imply that a minimal level of PGLP is needed by *F. bidentis* under the growth conditions applied. It appears that 10 % of the wild type amount is quite enough whereas about 6 % of the wild type amount or below do not suffice. Although siRNA-line #3 and #11 show a similar down regulation of PGLP they differ in their phenotype as line #11 appears to be more severely affected when grown under ambient air. This implies that the effect of small differences in PGLP levels can be quite drastically once PGLP levels fall below a certain threshold.

In contrast to PGLP, the protein levels of the large subunit of RubisCO, as a marker for the Calvin-Benson cycle, and NADP-ME, as a marker for the C₄-cycle, showed no difference between the siRNA-plants and the wild type under 1 % CO_2 . Therefore the reduction of *PGLP* expression via an siRNA-gene seems to have no effect on the expression of C₄ or Calvin-Benson cycle genes under these conditions.

The photosynthesis of siRNA-line #3 and #11 exhibit increased oxygen sensitivity compared to the wild type

To get an insight of the physiological consequences of reduced PGLP levels in the C4 species *F. bidentis* we analysed the oxygen sensitivity of photosynthesis. Therefore we used the T₁ plants of siRNA-line #3 and #11 grown under 1 % CO₂ and measured their net CO₂ assimilation rate (*A*) under 5, 21 and 40 % O₂ in comparison to the wild type (Figure 6). While 5 % O₂ should reduce the rate of oxygenation and photorespiration, 40 % should increase it.

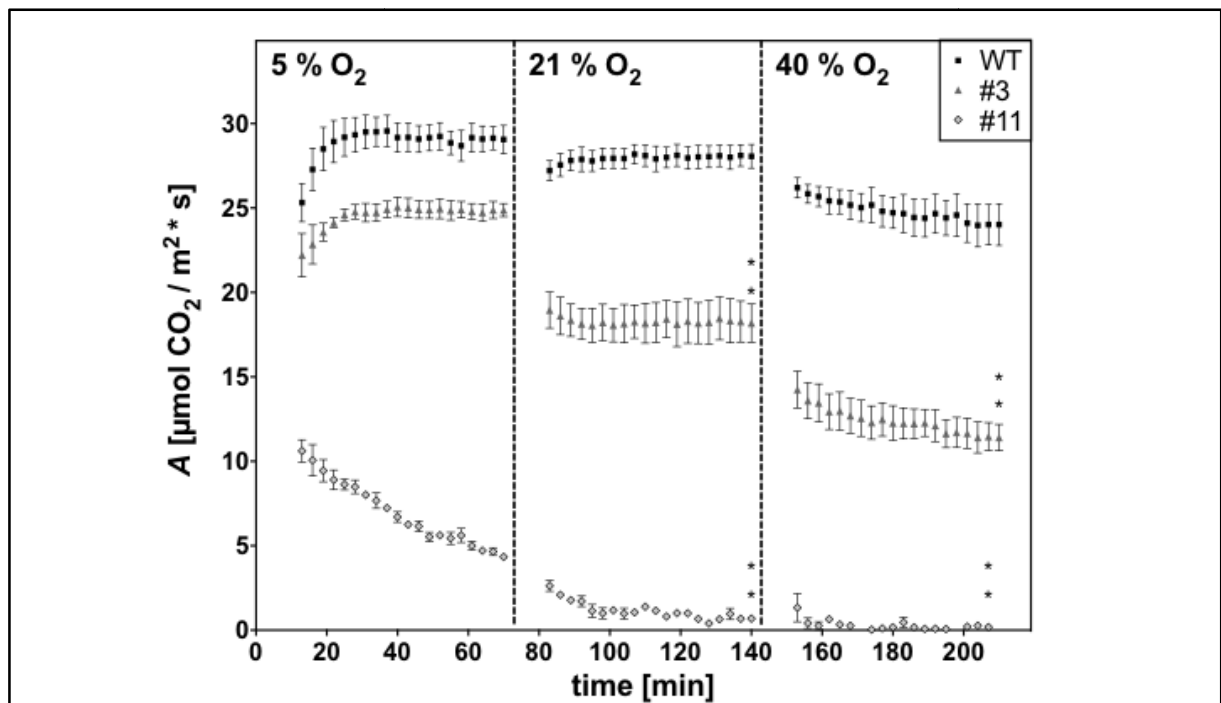


Figure 6: Oxygensensitivity-assay of plants from siRNA-line #3 and #11 as well as wild type *F. bidentis*. The number of replicates is four for the Wild Type (WT), three for siRNA-line #3 (#3) and three for siRNA-line #11 (#11). Each data point represents the mean of the replicates with standard error. A significant difference to the wild typ of $<0,01$ is marked with "***".

In the presence of 5 % O₂ net CO₂ assimilation rate of siRNA-line #3 (24.88 μmol CO₂/m²*s (± 0.39 μmol CO₂/m²*s)) and the wild type (29.06 μmol CO₂/m²*s (± 0.84 μmol CO₂/m²*s)) were significantly different to each other after 20 min (Table 1). Furthermore, in both experiments the net CO₂ assimilation rate rose from minute 3 to minute 20 after the start of the experiment. In contrast to the wild type and siRNA-line #3, siRNA-line #11 showed a decrease in the net CO₂ assimilation rate from minute 3 to

minute 20, whereas the net CO₂ assimilation rate (4.34 μmol CO₂/m²*s (± 0.08)) was significantly lower than that of the other two lines. Also under 21 % O₂ the net CO₂ assimilation rate in siRNA-lines #11 and #3 was significantly lower compared to the wild type (siRNA-lines #11: 0.69 μmol CO₂/m²*s (± 0.60 μmol CO₂/m²*s); siRNA-lines #3: 18.19 μmol CO₂/m²*s (± 1.40 μmol CO₂/m²*s); WT: μmol CO₂/m²*s (± 1.19 μmol CO₂/m²*s)). These differences between the siRNA-lines and the wild became even more pronounced when the O₂ concentration was raised to 40 %.

The photosynthetic activity of both siRNA-lines is significantly reduced in comparison to the wild type under all O₂ concentrations tested whereas line #11 is affected more severely than line #3. This is also reflected by the inhibition of photosynthesis by O₂ (Θ_A) (Table 1). Θ_A exhibits the highest value in siRNA-line #11 (2.90 % (± 0.40 %)), followed by siRNA-line #3 (1.55 % (± 0.16 %)) and the wild type (0.50 % (± 0.23 %)). The value of Θ_A calculated for the wild type is similar to former studies of with *F. bidentis* plants (Dai et al. 1996).

Table 1: Effect of varying O₂-concentrations on the net CO₂ assimilation rate in wild type and PGLP siRNA-lines. The net CO₂ assimilation rate is defined as μmol CO₂/m²*s. Shown is always the last data point on any condition measured after 20 min. Values that differ significantly from the wild type in two-way ANOVA, under the same condition, are marked with * for p-value < 0,05, ** for < 0,01. The calculation of the inhibition of photosynthesis by O₂ “Θ_A” is defined in material and methods.

Parameter	Wild type	siRNA-line #3	siRNA-line #11
A at 5 % O ₂ (± SE)	29.06 ± 0.84	24.88 ± 0.39 **	4.34 ± 0.08 **
A at 21 % O ₂ (± SE)	28.07 ± 1.19	18.19 ± 1.40 **	0.69 ± 0.60 **
A at 40 % O ₂ (± SE)	24.02 ± 1.57	11.41 ± 1.16 **	-0.07 ± 0.59 **
Θ _A [%]	0.50 ± 0.23	1.55 ± 0.16	2.90 ± 0.40

Metabolic acclimatization of PGLP siRNA-lines and wild type *F. bidentis* during CO₂ transition

Given that PGLP is an important enzyme of the photorespiratory cycle and with respect to the severe phenotype of some of the siRNA-lines, we expect considerable alterations in the metabolism of the siRNA-lines with reduced PGLP levels compared to the wild

type especially under photorespiratory conditions. To analyse the alterations of metabolite levels we performed a GC/MS analysis. Since plants of siRNA-line #11 were already severely damaged on AC7 (Figure 4) we sampled a developing and a mature fully photosynthetic active leaf for metabolite analysis under HC as well as on AC1 and AC3. In total we were able to quantify 35 metabolites in two experimental runs. The representative results for 18 selected metabolites of the photosynthetic active leaf are shown in Figure 7. Results for the developing leaf are similar to the shown in supplemental figure 3.

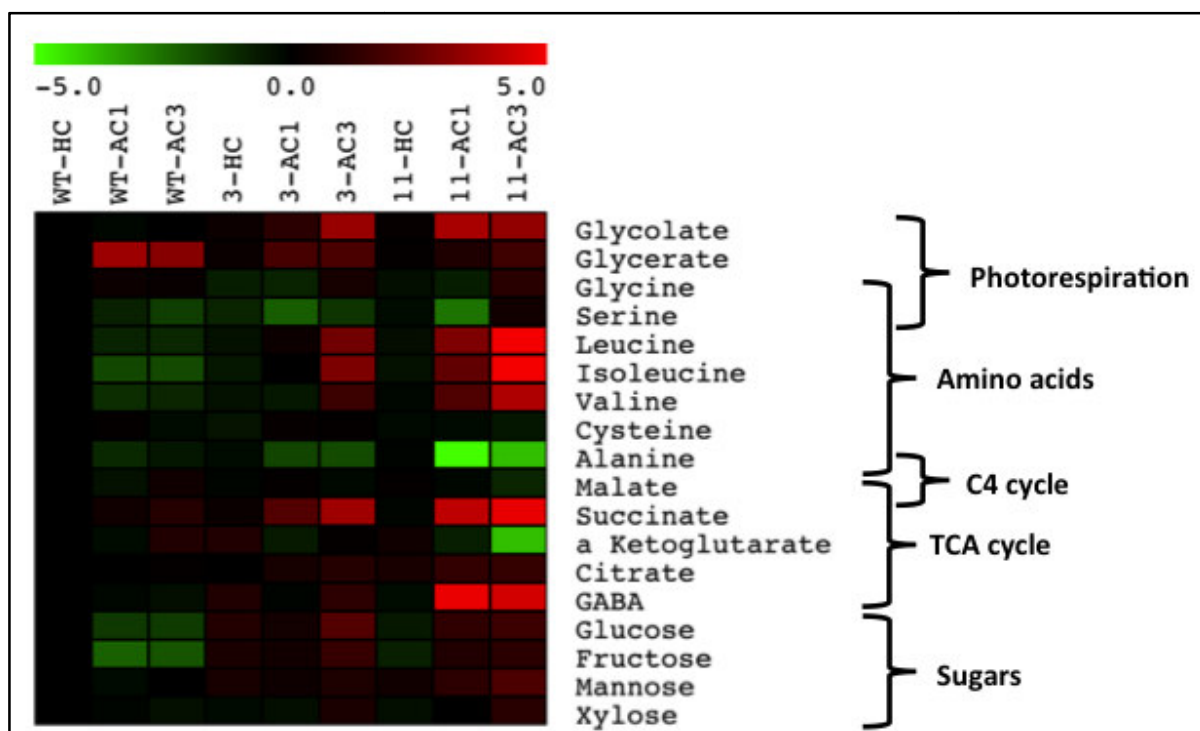


Figure 7: Relative abundance of metabolites in the mature leaf of wild type *F. bidentis*, siRNA-line #3 and #11 after a shift from 1 % CO₂ to ambient air. The values represent the log₂ fold change of relative metabolite concentrations after one “AC1” and three days “AC3” after the shift from 1 % CO₂ to ambient air, compared to the relative concentration in the wild type under 1 % CO₂ “WT-HC”. The figure was created via the “Multi Experiment Viewer” program (<http://www.tm4.org/mev.html>).

Wild type plants display nearly constant levels of the photorespiratory metabolites glycolate and glycine after the shift to ambient air, while glycerate accumulates to high levels and the amount of serine declines. The pattern of serine is consistent with the other amino acids measured. Concerning the C4 pathway and TCA cycle the shift to ambient air causes no major effect in the wild type. Finally the sugars fructose and

glucose were reduced on AC1 and AC3 in the wild type, while xylose and mannose didn't change.

In contrast to the wild type both siRNA-lines accumulate not only glycerate but also glycolate as photorespiratory metabolites. However, the accumulation of glycerate is less pronounced than in the wild type. The amino acids did not exhibit common patterns in the siRNA-lines. While the branched chained amino acids isoleucine, leucine and valine accumulate to high levels after the shift, the amounts of glycine, serine and alanine were comparable to the wild type under HC, AC1 and AC3. The C4 photosynthesis metabolites alanine and malate show a similar pattern in the siRNA-lines and the wild type. One differences between the siRNA-lines and the wild type concerning the the TCA cycle is the decrease of α -ketoglutarate in the siRNA-line after the shift. Another difference is the strong accumulation of the TCA cycle metabolites GABA and succinate in the siRNA-lines that is absent or less pronounced in the wild type, respectively. At last, all sugars shown here are increased in the siRNA lines, while they are unchanged (Xylose and Mannose) or decreased (Glucose and Fructose) in the wild type.

Most of the changes observed occurred in a similar fashion in wild type *F. bidentis* and in the siRNA-lines. Exceptions from this observation are found in the sugars and the branched chained amino acids. Furthermore it is obvious that this differences in metabolite levels between the siRNA-lines and the wild type followed mainly the shift from high CO₂ to ambient CO₂. This observation was also checked via a clustering approach (Supplemental figure 4 and 5).

Discussion

It was thought for a long time, that the suppression of the RubisCO oxygenase reaction results in a minor importance of photorespiration in C4 plants. However, in 2009, Zelitch et al. showed that the knock out of the photorespiratory glycolate oxidase (*GOX*) gene in the C4 plant *Z. mays* leads to death of accordant plants *in ambient air*, whereas the same plants live on in elevated CO₂. This “photorespiratory phenotype” demonstrates that C4 plants depend on a functional photorespiratory pathway, as C3 plants do. So far, no further photorespiratory mutants in C4 plants were analyzed and it

is still unknown how C4 plants react on a metabolic level to a disturbed photorespiratory cycle.

To clarify this question a siRNA gene was used to reduce the amount of PGLP in the C4 plant *Flaveria bidentis*. Accordant plants showed reduced PGLP protein amounts and a varying ability to grow on soil in ambient air. Two siRNA-lines were analyzed in detail in the T₁ generation together with wild type *F. bidentis*. The photosynthesis of both lines displayed a stronger inhibition of photosynthesis by oxygen than that of the wild type.

Comparing the metabolism of the siRNA-lines and the wild type, differences occur concerning the of branched chain amino acids and sugars after shifting the plants from 1 % CO₂ to ambient CO₂.

***F. bidentis* contains more PGLP than needed**

We created nine different siRNA-lines exhibiting different PGLP protein levels ranging from 75 % (siRNA-line #23) over 10 % (siRNA-line #2) to 6 % (siRNA-line #11 and #3) of wild type level. However, only when PGLP levels dropped to 6 % of the wild type level an impact on the plant fitness was observed. Hence, the C4 plant *F. bidentis* is expressing severely more PGLP protein than they need to grow in our green houses or plant chambers. This observation is in line with former studies with *F. bidentis* and different other plant species that showed no changes in the expression of photorespiration related genes when photorespiratory conditions were applied (Foyer et al. 2012; Queval et al. 2012; Timm et al. 2013). While the transcription of other photorespiratory genes seems to be regulated by the serine to glycine ratio, no such regulation was found for PGLP (Timm et al. 2013). One explanation could be that adjusting the activity of PGLP to the required level for the current RubisCO oxygenase activity is not advantageous for the plant. 2-PG is the most toxic of the photorspiratory metabolites (Timm and Bauwe 2013) and its immediate conversion is of highest importance for the plant. To ensure this, plants have to keep high PGLP levels as the oxygenase activity of RubisCO might change within short time frames caused by environmental changes. It is quite interesting that the “safety margin“ of the PGLP appears to be so high, as obviously only less than 10 % of the wild type PGLP amount is needed. Given that *F. bidentis* as a C4 species should be less affected by RubisCO oxygenase activity than C3 species due to its

CO₂ concentration mechanism, this PGLP excess seems to be really huge. We can only speculate here but most likely *F. bidentis* experiences more dry, hot and high light conditions in its natural environment than in our green houses and plant chambers. This may justify higher PGLP amounts although the PGLP excess seems to be huge even under these assumptions indicating that the avoidance of free 2-PG is prime also in C4 species.

As part of the photorespiratory cycle PGLP is important to maintain photosynthesis

We analyzed the inhibition of photosynthesis by oxygen (Θ_A) in wild type *F. bidentis* plants and in *F. bidentis* plants with reduced PGLP protein amounts to elucidate the consequences of a *PGLP* knock down for the photosynthesis of this C4 species. The experiment revealed, that the net CO₂ assimilation rate decreases with increasing O₂ concentration in the wild type as well as in the siRNA-lines. Compared to the wild type, the effect was significantly stronger in the siRNA-lines being more severe in siRNA-line #11 that was also affected more severely according to growth and changes in overall metabolism than #3 (Table 1, Figure 4 and 7).

Like the *PGLP* siRNA-lines in the C4 plant *F. bidentis* the *pglp1* mutant of the C3 plant *A. thaliana* displays a decreasing net CO₂ assimilation rate under conditions that stimulate photorespiration, namely high O₂ or low CO₂ concentrations, that is stronger than in the wild type (Flügel, unpublished; Timm et al. 2012). Therefore, our results demonstrate that despite of its CO₂ concentrating mechanism that reduces 2-PG formation, the C4 plant *F. bidentis* depends on the enzyme PGLP to maintain a high net CO₂ assimilation rate. Hence we conclude, that photorespiration as a whole is important for C4 plants as it is for all photosynthetic organisms (Timm and Bauwe 2013). This conclusion is supported by previous work on a knock out mutant of the photorespiratory gene *glycolate oxidase (GOX)* in the C4 grass *Z. mays* that was unable to grow in ambient air (Zelitch et al. 2009).

Like the *Z. mays* wild type (0.37 %) the wild type of *F. bidentis* measured here displayed a low Θ_A (0.50 %), what is common for C4 plants (Dai et al. 1996; Zelitch et al. 2009). Comparing the effect of a down regulation of *PGLP* and *GOX* on Θ_A , the *Z. mays GOX*

mutant shows with 1.90 % a value that is in the middle of the 1.55 % of siRNA-line #3 and the 2.90 % of siRNA-line #11 (Zelitch et al. 2009). So, the knock down of *PGLP* in *F. bidentis* can have a stronger effect on Θ_A than the complete knock out of *GOX* in *Z. mays*. Interestingly, in contrast to the wild type and siRNA-line #3, siRNA-line #11 showed even under 5 % O_2 severely inhibited CO_2 -assimilation. This was not expected based on former studies, where photosynthesis was promoted under O_2 -levels beneath 21 % in *PGLP* deficient plants (Dai et al. 1996; Somerville and Ogren 1979; Zelitch et al. 2009). One possible explanation is that siRNA-line #11 already accumulated metabolites that somehow inhibit photosynthesis before the start of the experiment. However, as shown in the metabolic comparisons levels of the tested metabolites are comparable in siRNA-line #11 and the wild type under HC (Figure 7). Alternatively siRNA-line accumulates inhibitory metabolites faster than siRNA-line #3 and the wild type, what is reflected by the broader changes in this line on AC1 and AC3.

Concerning the inhibitory metabolites we expect an accumulation of 2-PG in the *PGLP* siRNA-lines of *F. bidentis* as it is observed in *A. thaliana* (Flügel, unpublished). However, since we couldn't detect 2-PG in this study, this accumulation remains speculative. One metabolite that is already known to inhibit photosynthesis is glycolate, which levels rise in the siRNA-lines after the shift (Zelitch et al. 2009). Therefore we cannot rule out that the observed effects could be a consequence of glycolate accumulation rather than 2-PG accumulation. Alternatively we speculate that the decrease of the net CO_2 assimilation rate observed here might be due to a combined effect of 2-PG and glycolate. One such effect could be that enzymes of the Calvin-Benson cycle are somehow inhibited by the accumulating metabolites. This inhibition would directly reduce the net CO_2 assimilation rate. Furthermore, the accumulation of 2-PG might interfere with the formation of 3-PGA via inhibiting triose phosphate isomerase in the bundle sheath (Anderson 1971). As a consequence, the Calvin-Benson cycle would drain empty, leading to a reduced net CO_2 assimilation rate.

The C4 plant *F. bidentis* reacts differently to a shift from elevated CO_2 to ambient air than does the C3 plant *A. thaliana*

We found several differences between the C3 plant *A. thaliana* and wild type C4 *F. bidentis* plants during their adaption to ambient air after growth in elevated CO_2 on

the metabolic level. These differences mostly concern the photorespiratory metabolites, while the metabolites related to TCA cycle, the amino acids as well as the sugars analyzed display basically the same patterns in *A. thaliana* and *F. bidentis*. It is supposed that the differences are mainly due to the different photosynthetic metabolism in both species.

One difference of the photosynthetic metabolism of this two species is the additional role of alanine and malate in the C4 plant *F. bidentis*. Here, alanine is used as a nitrogen transport metabolite from the bundle sheath to the mesophyll tissue whereas malate transports CO₂ in the opposite direction (Furbank 2016; Mallmann et al. 2014). However, in *F. bidentis* and *A. thaliana* the changes of malate and alanine levels following the shift to ambient CO₂ were comparable (Timm et al. 2012). One explanation for this observation is that the changes are related to the role of both metabolites common to *A. thaliana* and *F. bidentis*. In that case, the C4 cycle in *F. bidentis* wild type plants would be unaffected by the shift to ambient CO₂, while the metabolism of malate in the TCA cycle and alanine is changing. This hypothesis seems reasonable, concerning the low inhibition of photosynthesis in *F. bidentis* that reduces the effect of a reduction of available CO₂ for this C4 plant and so the need for metabolic changes of photosynthesis (Table 1).

The most striking difference is the accumulation of glycerate observed in both species. Glycerate accumulates eleventh fold one day after the shift from high to ambient CO₂ in *F. bidentis* (Figure 7), whereas its only three fold in *A. thaliana* (Timm et al. 2012). Moreover, the amount of glycerate decreases in *A. thaliana* from first to the fifth day after the shift towards amounts identical with that under 1 % CO₂ (Timm et al. 2012). Such a decrease of the glycerate level seems to occur also in *F. bidentis*, although it appears to be much slower as the glycerate amount is on AC3 still nine fold higher than that under high CO₂ conditions. This indicates that glycerate plays a different role in C4 species than it does in C3. This might be caused by the fact that glycerate has to be shuttled from the bundle sheath to the mesophyll cells for 3-PG regeneration in C4 species. At least for some C4 grass species like maize or Sorghum bicolor it is known that while most of the photorespiratory enzymes are located in the bundle sheath glycerate kinase (GLYK) is found specifically in the mesophyll (Döring et al. 2016; Li et al. 2010; Usuda and Edwards 1980). A comparatively high glycerate level would be in line with its

role as transport metabolite under ambient CO₂ when the RubisCO oxygenase reaction occurs in the BS cell of a C4 plant.

Unlike glycerate, the amount of glycolate does not change notably after the shift of *F. bidentis* from high to ambient CO₂ concentrations. In contrast to that glycolate levels decrease in the C3 plant *A. thaliana* after such a shift. This decrease in *A. thaliana* was explained by a possible down regulation of GOX under HC that is lost under ambient air, leading to sudden oxidation of a majority of the glycolate pool present (Timm et al. 2012). With respect to this explanation the unchanged glycolate pool in *F. bidentis* might indicate, that GOX not regulated in the C4 species at all. More likely the amount of glycolate produced in *F. bidentis* is nearly unaffected by the shift from high to ambient CO₂, because of its carbon concentrating mechanism, preventing the engagement of regulatory mechanisms observed in C3 species.

The two amino acids serine and glycine accumulate about two and four fold in *A. thaliana* after a shift from high to ambient CO₂, while their levels decrease or stay constant in *F. bidentis*, after such a treatment (Timm et al. 2012). In C3 species the accumulation of both amino acids under ambient air occurs because the rate of photorespiration increases, leading to higher amounts of this two photorespiratory metabolites. The serine and glycine pools also play a role in the photorespiration of C4 plants, but these pools themselves might be much smaller in C4 plants compared with C3 plants and the increase in the rate of photorespiration is lower after the shift from HC to AC. The serine level decreases in *F. bidentis* in the same order of magnitude as the levels of most other amino acids analyzed. This indicates that the consumption of amino acids including serine by metabolism exceeds the extra production of serine by increased photorespiration after the shift from high to ambient CO₂ in the C4 plant.

The metabolism of *F. bidentis* changes when PGLP is reduced

Changes in metabolite levels occurred after a shift from elevated to ambient CO₂ that could be related to the metabolism of C4 plants. Most of these changes were not only observed in the wild type *F. bidentis* but also in the siRNA-lines with reduced PGLP protein amounts. One similar change is the decrease of the C4 related metabolites alanine and malate, which was more distinct in the siRNA-lines. While the reduction of

this metabolites in the wild type was solely linked to changes in TCA cycle and amino acid metabolism, the more severe effect in the siRNA-lines might indicate an additional impact on the C4 cycle not occurring in the wild type.

A reduction of C4 photosynthesis in the siRNA-lines would explain the several differences concerning the effect of the shift to the wild type and the siRNA-lines. One such difference is the accumulation of the branched chained amino acids leucine, isoleucine and valine after the shift to ambient air. A similar reaction was observed also in the *pglp1* mutant of *A. thaliana* in former studies. There, the others explained this accumulation with an up regulation of alternative pathways of respiration and a block of degeneration of these amino acids (Sweetlove et al. 2010; Timm et al. 2012). Such an up regulation of respiration is needed, because photosynthesis can no longer provide the needed energy in *PGLP* mutants, neither in the C3 plant *A. thaliana* nor in the C4 plant *F. bidentis*. The down regulation of photosynthesis as a consequence of *PGLP* reduction in *F. bidentis* is demonstrated by the elevated inhibition of photosynthesis by O₂, observed in this study in the two siRNA-lines #3 and #11 (Table 1).

Another difference between wild type *F. bidentis* and *A. thaliana* on the one hand and accordant *PGLP* mutant plants on the other hand, is the elevation of citrate and succinate levels after the shift. Like the accumulation of branched chained amino acids, this observation indicates an enhanced respiration via the TCA cycle. This enhancement is achieved partly by an elevation of GABA levels that enables the plant to replenish the TCA cycle in *pglp1* and the siRNA-lines studied here (Fait et al. 2008; Sweetlove et al. 2010).

The last difference between *PGLP* mutants and wild type plants is an accumulation of several sugars. In these study, we found an accumulation of glucose and fructose as well as xylose and mannose in the siRNA-lines compared to wild type *F. bidentis*. The accumulation of glucose and fructose could be the consequence of reduced starch accumulation in the siRNA-lines, which was observed in *pglp1* (Timm et al. 2012). In this case, the siRNA-lines would have to increase the soluble sugar content to compensate and to maintain growth. However, because starch content was not analyzed in this study, this correlation remains speculative. Like *pglp1* the *PGLP* siRNA-lines showed chlorotic lesions after a shift from elevated CO₂ to ambient air. The elevated amount of xylose in the siRNA-lines might be the result of cell degeneration, that is the basis of the

chlorotic lesions observed. Although there is no proof for an accumulation of xylose in *pglp1* a similar reaction seems likely.

All in all, there are several effects on metabolism observed in the siRNA-lines that are similar in the *F. bidentis* wild type or in the *PGLP* mutant of *A. thaliana*. However, there is also one effect on metabolism of the siRNA-lines that wasn't observed in *pglp1* before and that is also absent in *F. bidentis* wild type. This effect is the accumulation of glycolate after the shift. In contrast to the siRNA-lines, the glycolate levels remain constant in the *F. bidentis* wild type and they decrease in *pglp1* and the *A. thaliana* wild type. So the accumulation of glycolate after the shift is specific to a *PGLP* reduction in the C4 plant *F. bidentis*. This seems counterintuitive since the known source of glycolate is the dephosphorylation of 2-PG by *PGLP*, the enzyme that was reduced here. Because of the down regulation of *PGLP* expression via siRNA, one would assume less glycolate to be formed instead of more.

One explanation for the elevated glycolate amount is that there are other sources for glycolate than dephosphorylation of 2-PG, which are enhanced in the siRNA-lines. Such a source might be the action of the enzyme glyoxylate reductase (GR), which converts glyoxylate to glycolate by the cost of NADPH (Allan et al. 2009; Givan and Kleczkowski 1992; Zelitch and Gotto 1962). This consumption of NADPH is similar to the Calvin-Benson cycle as well as the photorespiratory cycle. By disturbing both cycles a knock down of *PGLP* could lead to an over reduction of the electron transport chain, because less electrons could be used for NADP⁺ reduction than transported through the chain. The excess electrons would be transferred to oxygen, producing reactive oxygen species (ROS). This ROS might than damage the proteins of the electron transport chain, what would lead to a reduced light absorption, consequently less energy to maintain photosynthesis and finally to a reduced net CO₂ assimilation rate as observed here (Table 1). In respect to that, it was already assumed that the photorespiratory cycle might have a role in photoprotection (Wingler et al. 2000). Concerning this role of photorespiration it seems possible that the assumed action of GR that leads to the glycolate accumulation occurs because it consumes NADPH like photorespiration. Therefore the action of GR would decrease the excess of the reducing equivalent NADPH and consequently decrease the over reduction of the electron transport chain (Keech et al. 2016). Hence we speculate that the observed accumulation of glycolate in the siRNA-lines might be an attempt to restore the redox homeostasis via repeatedly regenerating

glycolate through the action of the GR. The hereby-formed glycolate could be oxidated to glyoxylate again by GOX. This glyoxylate could either be reduced to glycolate for another round or trans aminated to glycine to take part in photorespiration. The action of GR would consequently not impair the flow through photorespiration but instead compensate for its reduction in the context of redox homeostasis. However, this attempt is obviously not sufficient to rescue the plant in the case of siRNA-line #11, maybe because glycolate and 2-PG accumulate to toxic levels in this line.

The purpose of this study was to analyze the consequences of a reduction of the photorespiratory enzyme PGLP for the metabolism of the C4 plant *F. bidentis* as well as the connection to the observed physiological responses. Our results show that a reduction of PGLP protein level to about 6 % decreases *F. bidentis* ability to sustain under ambient air. This is caused by an inhibition of net CO₂ assimilation and a variety of metabolic changes, including accumulation of the toxic metabolite glycolate and an enhancement of alternative ways of respiration. In contrast to this, the reduction of PGLP levels have no large impact on the accumulation of the C4 related metabolites malate and alanine. However, because both metabolites are not specific for the C4 cycle no conclusion in respect to the C4 cycle as a whole could be made. In summary the results obtained here lead us to the conclusion that the C4 plant *F. bidentis* depends on the action of PGLP and consequently on a functional photorespiratory cycle, although it is able to tolerate a certain degree of PGLP reduction.

Material and methods

Construction of the *PGLP* siRNA gene

For the construction of the *PGLP* siRNA gene, RNA from *F. bidentis* was isolated via the QIAprep RNeasy Kit (QIAGEN) and translated to cDNA via the SMARTer RACE cDNA-Synthesis Kit (Clontech). Then the arms of the siRNA gene were amplified via the primers ATAAAGCTTTCACCATCTTCCGGACCCCAA and ATACTCGAGGGTACACAAACC-ACCTTGAACCATTGG for the sense and ATAGAATTCTCCACCATCTTCCGGACCCCAA and ATAGGATCCGGTACACAAACCACCTTGAACCATTGG for the anti sense arm. Both PCR products were ligated in the pJET cloning vector (thermofisher) and amplified in

Escherichia coli. The sense arm was then cut out with the enzymes *Hind*III and *Xho*I and the anti sense arm with *Eco*RI and *Bam*HI. Then the sense arm was ligated in the pSK-Int Vector (Guo et al. 2003) via *Hind*III and *Xho*I, what results in pSK-PGLP(+)-Int. This construct was then cloned in *E. coli*. pSK-PGLP(+)-Int was then cut with *Eco*RI and *Bam*HI and ligated with the anti sense arm, what results in pSK-PGLP(+)-Int-PGLP(-), that was cloned in *E. coli* afterwards. An adapter was created, that consists of the oligonucleotides ATAGGCGCGCCCGTCGACGGGTACCATTAAATGCGATCGCCCCGGGCTC-GAGATA and TATCTCGAGCCCGGGGCGATCGCATTAAATGGTACCCGTCGACGGGCGCGCC-TAT, which were given in equal amounts into boiling water that cooled down to room temperature afterwards. The adapter was then cut with *Xho*I and ligated to pSK-PGLP(+)-Int-PGLP(-), that was cut with *Xho*I and *Sac*I. The resulting Adapter-PGLP(+)-Int-PGLP(-) was cut with *Xma*I and ligated in the pBI121 Vector (Chen et al. 2003; Jefferson et al. 1987), that was cut with *Xma*I and *Sac*I before, what results in pBI121-PGLP(+)-Int-PGLP(-), named pBI121-PGLPsiRNA gene.

Transformation of *Flaveria bidentis*

Transgenic *F. bidentis* were generated according to Chitty (1994) by means of *Agrobacterium* AGL1 containing pBI121-PGLPsiRNA gene under ambient air on media containing 3 % Sucrose. The presence of the transgene within the genome of each single independent *F. bidentis* T₀ and T₁ line was verified by PCR with the primers (TGCAAACACACAAGACAATGGAC and CCAACCACGTCTTCAAAGCAAG) after DNA isolation as described by Edwards (1991).

Growth of T₀ *Flaveria bidentis* on soil

Transformed calli were taken out of the media described by Chitty (1994) and were put on soil in a growth cabinet with 15.5 h of light with 400-500 μ E and 27 °C and 8.5 h of darkness with 22 °C.

Isolation of Protein for Protein-Blot analysis

For the isolation of protein shock frozen leaf material was grinded in liquid nitrogen and boiled for 2 min in protein isolation buffer according to Heintz (2006). The protein concentration was measured with the Lowry method (Lowry et al. 1951) via the RC DC™ Protein Assay Kit (BIO-RAD). Isolated protein solutions were stored at -80°C.

Protein-Blot analysis

For protein-Blot analysis 60 µg Protein were loaded on a 12,5 % PAGE according to Schägger and von Jagow (1987) and transferred with a semi dry procedure on a 0,1 µm Nitrocellulose membran (Kyhse-Andersen 1984) for 2 h at 0.8 mA/cm². After the transfer the membrane was blocked with 5 % Non Fat Milk-Powder in TBS-T buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.6; 137 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween). For protein detection membranes were incubated with the accordant antibody for one hour till overnight at room temperature and 4 °C, respectively. After incubation with the second antibody protein was visualized via a LAS-2000 and accordant incubation media.

O₂-sensitivity measurement

Plants were grown for 12 weeks in a growth cabinet with 1 % CO₂, 100 µE light and 22 °C on a 16 h day and a 16 °C on a 8 h night. According to Zelitch (2009) the IRGA system was used to determine the photosynthetic activity of accordant plants under a low (5 %), ambient (21 %) and high (40 %) O₂-concentration. Therefore plants were taken out of the growth cabinet and one third leaf was clamped into an infrared gas analyzer with a block temperature was 25 °C a light intensity of 1000 µE and a CO₂-concentration was 0,04 %. The leaf was incubated under the specific condition and than measured every 3 min for 20 min. Afterwards the next higher O₂-concentration was applied on the same leaf and the measurement was repeated.

Metabolite measurements

For metabolite analysis the second and fourth leaf-pair of plants grown in 1 % CO₂ with 100 μE light and 22 °C on a 16 h day and a 16 °C on a 8 h night, were collected at 1 % CO₂ (HC) as well as after one (AC1) and three days (AC3) in ambient air. Growth under ambient air was done in a similar growth cabinet without elevated CO₂. From each line and wild type *F. bidentis* plants, four individual plants were used and discarded afterwards. Accordant plants were taken out of the growth cabinet 8 h after the begin of the photoperiod one by one and leaves were directly cut and put in pre-cooled aluminum bag shock-frozen in liquid nitrogen.

Literature

- Allan Wendy L, Clark Shawn M, Hoover Gordon J, Shelp Barry J** (2009) Role of Plant Glyoxylate Reductases during Stress: a Hypothesis. *Biochemical Journal* 423: 15-22
- Anderson LE** (1971) Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes II. Pea Leaf Triose Phosphate Isomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 235: 237-244
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR** (2010) Photorespiration: Players, Partners and Origin. *Trends in Plant Science* 15: 330-336
- Bloom A** (2014) Photorespiration and Nitrate Assimilation: a Major Intersection between Plant Carbon and Nitrogen. *Photosynthesis Research*: 1-12
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY** (2003) Complete Sequence of the Binary Vector pBI121 and Its Application in Cloning T-DNA Insertion from Transgenic Plants. *Molecular Breeding* 11: 287-293
- Chitty JA, Furbank RT, Marshall JS, Chen Z, Taylor WC** (1994) Genetic Transformation of the C₄ Plant, *Flaveria bidentis*. *The Plant Journal* 6: 949-956
- Dai Z, Ku MB, Edwards G** (1996) Oxygen Sensitivity of Photosynthesis and Photorespiration in Different Photosynthetic Types in the Genus *Flaveria*. *Planta* 198: 563-571
- Dai Z, Ku MSB, Edwards GE** (1993) C₄ Photosynthesis. The CO₂-Concentrating Mechanism and Photorespiration. *Plant Physiology* 103: 83-90
- Döring F, Streubel M, Bräutigam A, Gowik U** (2016) Most Photorespiratory Genes are Preferentially Expressed in the Bundle Sheath Cells of the C₄ Grass *Sorghum bicolor*. *Journal of Experimental Botany* 67: 3053-3064
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349
- 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. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 105: 17199-17204
- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie AR** (2008) Highway or Byway: the Metabolic Role of the GABA Shunt in Plants. *Trends in Plant Science* 13: 14-19

- Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J** (2012) Photosynthetic Control of Electron Transport and the Regulation of Gene Expression. *Journal of Experimental Botany* 63: 1637-1661
- Furbank RT** (2016) Walking the C₄ Pathway: Past, Present, and Future. *Journal of Experimental Botany* 67 4057-4066
- Givan CV, Kleczkowski LA** (1992) The Enzymic Reduction of Glyoxylate and Hydroxypyruvate in Leaves of Higher Plants. *Plant Physiology* 100: 552-556
- Guo HS, Fei JF, Xie Q, Chua NH** (2003) A Chemical-Regulated Inducible RNAi System in Plants. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 34: 383-392
- Haberlandt G** (1904) *Physiologische Pflanzenanatomie*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Haimovich-Dayana M, Lieman-Hurwitz J, Orf I, Hagemann M, Kaplan A** (2015) Does 2-phosphoglycolate Serve as an Internal Signal Molecule of Inorganic Carbon Deprivation in the Cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803? *Environmental Microbiology*: 17:1794-1804
- Hall N, Kendall A, Lea P, Turner J, Wallsgrove R** (1987) Characteristics of a Photorespiratory Mutant of Barley (*Hordeum vulgare L.*) Deficient in Phosphogly Collate Phosphatase. *Photosynthesis Research* 11: 89-96
- Hatch MD** (1971) The C₄-Pathway of Photosynthesis. Evidence for an Intermediate Pool of Carbon Dioxide and the Identity of the Donor C₄-Dicarboxylic Acid. *Biochemical Journal* 125: 425-432
- Hatch MD** (1987) C₄ Photosynthesis: a Unique Blend of Modified Biochemistry, Anatomy and Ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta* 895: 81-106
- Heintz D, Erxleben A, High AA, Wurtz V, Reski R, Van Dorsselaer A, Sarnighausen E** (2006) Rapid Alteration of the Phosphoproteome in the Moss *Physcomitrella patens* after Cytokinin Treatment. *Journal of Proteome Research* 5: 2283-2293
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS Fusions: β -Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. *European Molecular Biology Organization Journal* 6: 3901-3907
- Keech O, Gardeström P, Kleczkowski LA, Rouhier N** (2016) The Redox Control of Photorespiration: from Biochemical and Physiological Aspects to Biotechnological Considerations. *Plant. Cell and Environment*: 10.1111/pce.12713
- Kelly GJ, Latzko E** (1976) Inhibition of Spinach-Leaf Phosphofructokinase by 2-Phosphoglycollate. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 68: 55-58
- Kyhse-Andersen J** (1984) Electroblotting of Multiple Gels: a Simple Apparatus without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10: 203-209
- Laisk A, Edwards GE** (1998) Oxygen and Electron Flow in C₄ Photosynthesis: Mehler Reaction, Photorespiration and CO₂ Concentration in the Bundle Sheath. *Planta* 205: 632-645
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Myers CR, Reidel EJ, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell TP** (2010) The Developmental Dynamics of the Maize Leaf Transcriptome. *Nature Genetics* 42: 1060-1067
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275
- Mallmann J, Heckmann D, Bräutigam A, Lercher MJ, Weber APM, Westhoff P, Gowik U** (2014) The Role of Photorespiration during the Evolution of C₄ Photosynthesis in the Genus *Flaveria*. *eLife* 3: e02478

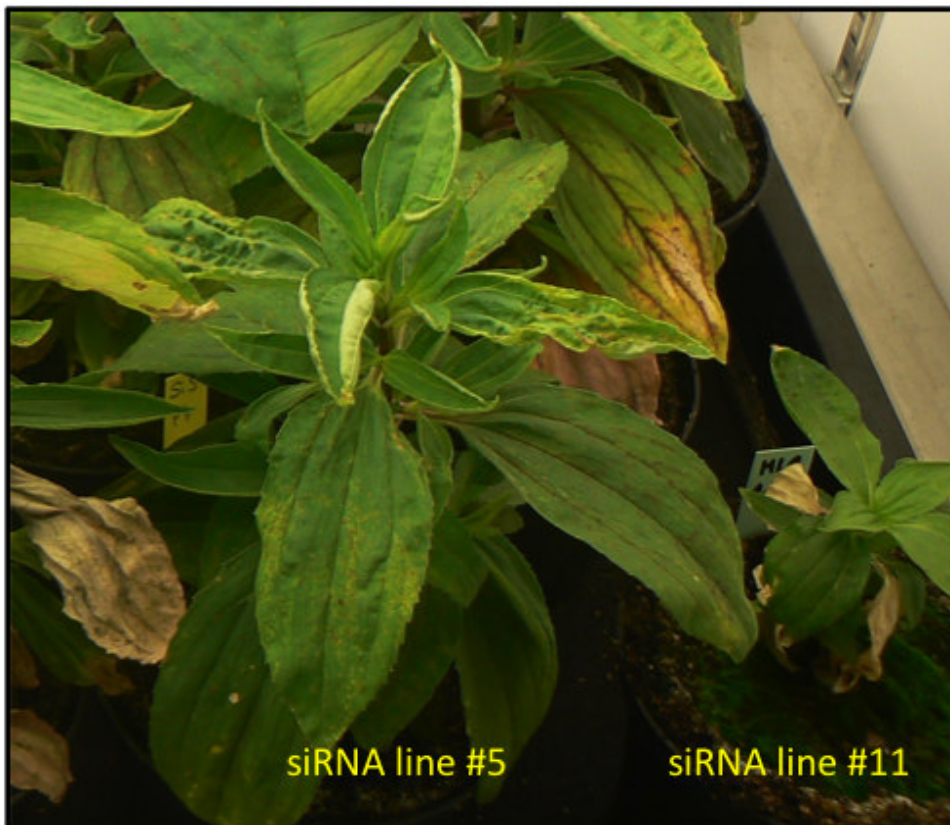
- Nakamura Y, Kanakagiri S, Van K, He W, Spalding MH** (2005) Disruption of the Glycolate Dehydrogenase Gene in the High-CO₂-Requiring Mutant HCR89 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Canadian Journal of Botany* 83: 820-833
- Nishimura T, Takahashi Y, Yamaguchi O, Suzuki H, Maeda S-I, Omata T** (2008) Mechanism of Low CO₂-Induced Activation of the *cmp* Bicarbonate Transporter Operon by a LysR Family Protein in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. *Molecular Microbiology* 68: 98-109
- Ogren WL** (1984) Photorespiration: Pathways, Regulation, and Modification. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 415-442
- Queval G, Neukermans J, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G** (2012) Day Length is a Key Regulator of Transcriptomic Responses to Both CO₂ and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 35: 374-387
- Sage RF** (2004) The Evolution of C₄ Photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341-370
- Sage RF** (2016) Tracking the Evolutionary Rise of C₄ Metabolism. *Journal of Experimental Botany* 67: 2919-2922
- Sage RF, Khoshravesh R, Sage TL** (2014) From Proto-Kranz to C₄ Kranz: Building the Bridge to C₄ Photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 65: 3341-3356
- Schägger H, von Jagow G** (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379
- Schwarte S, Bauwe H** (2007) Identification of the Photorespiratory 2-Phosphoglycolate Phosphatase, PGLP1, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 1580-1586
- Somerville CR** (2001) An Early *Arabidopsis* Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration. *Plant Physiology* 125: 20-24
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) A Phosphoglycolate Phosphatase-Deficient Mutant of *Arabidopsis*. *Nature* 280: 833-836
- Sørhagen K, Laxa M, Peterhänsel C, Reumann S** (2013) The Emerging Role of Photorespiration and Non-Photorespiratory Peroxisomal Metabolism in Pathogen Defence. *Plant Biology* 15: 723-736
- Suzuki K, Marek LF, Spalding MH** (1990) A Photorespiratory Mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 93: 231-237
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not Just a Circle: Flux Modes in the Plant TCA Cycle. *Trends in Plant Science* 15: 462-470
- Timm S, Bauwe H** (2013) 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 AR, Bauwe H** (2013) Serine Acts as a Metabolic Signal for the Transcriptional Control of Photorespiration-Related Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162: 379-389
- Timm S, Mielewicz M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H** (2012) High-to-Low CO₂ Acclimation Reveals Plasticity of the Photorespiratory Pathway and Indicates Regulatory Links to Cellular Metabolism of *Arabidopsis*. *Public Library of Science ONE* 7: e42809
- Usuda H, Edwards GE** (1980) Localization of Glycerate Kinase and Some Enzymes for Sucrose Synthesis in C₃ and C₄ Plants. *Plant Physiology* 65: 1017-1022
- Vogan P, Sage R** (2012) Effects of Low Atmospheric CO₂ and Elevated Temperature during Growth on the Gas Exchange Responses of C₃, C₃-C₄ Intermediate, and C₄ Species from Three Evolutionary Lineages of C₄ Photosynthesis. *Oecologia* 169: 341-352

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

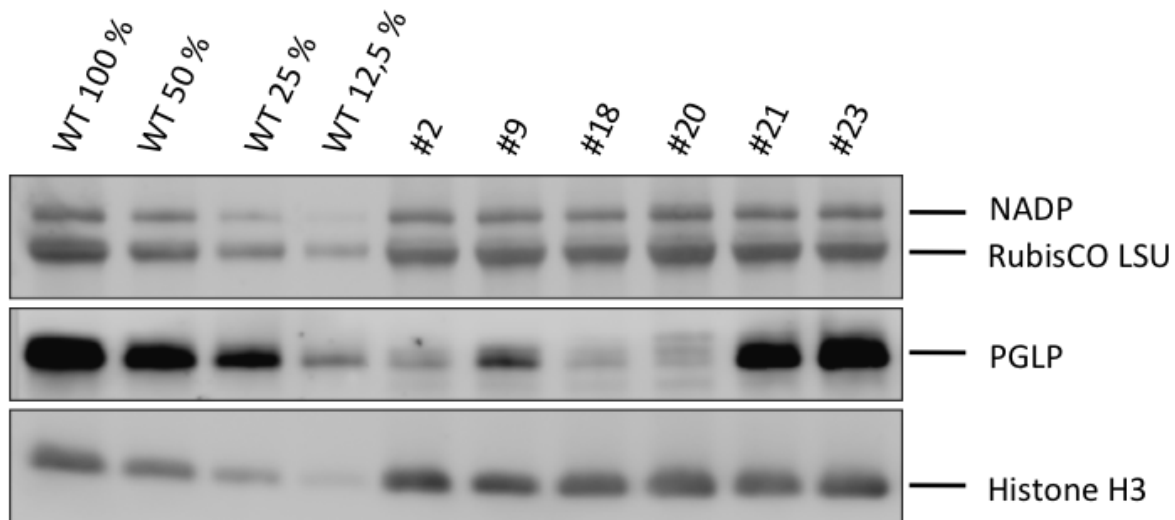
Zelitch I, Gotto AM (1962) Properties of a New Glyoxylate Reductase from Leaves. *Biochemical Journal* 84: 541-546

Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP (2009) High Glycolate Oxidase Activity is Required for Survival of Maize in Normal Air. *Plant Physiology* 149: 195-204

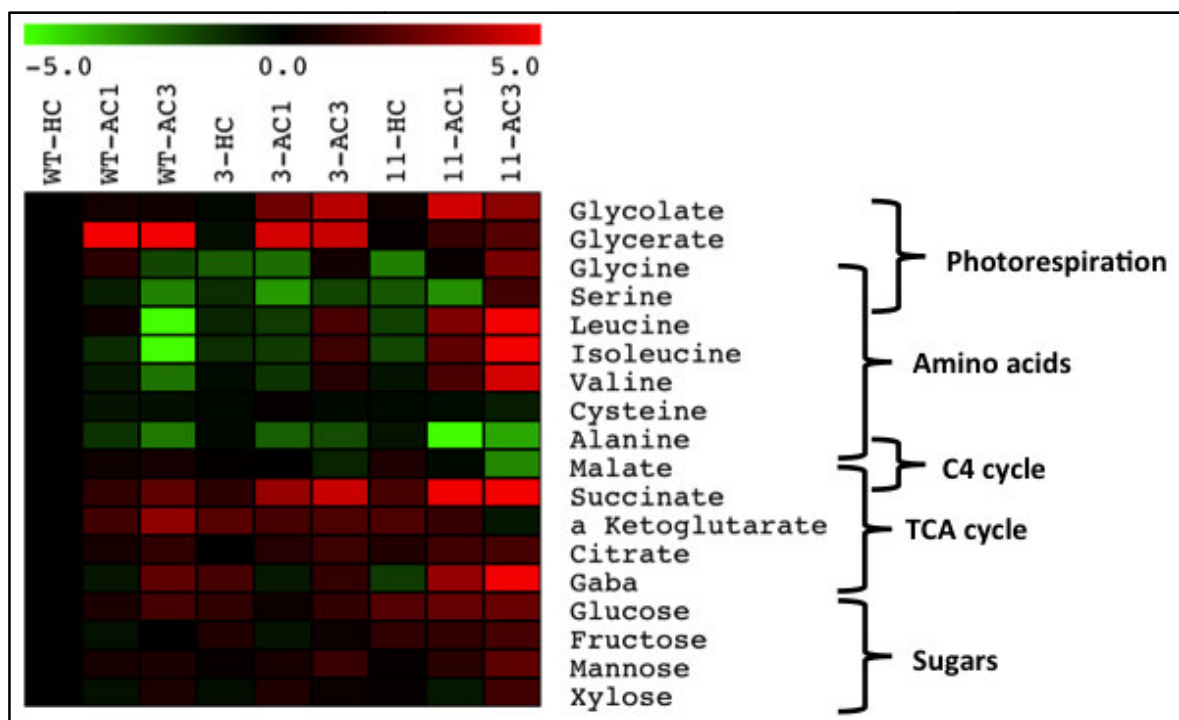
Supplement



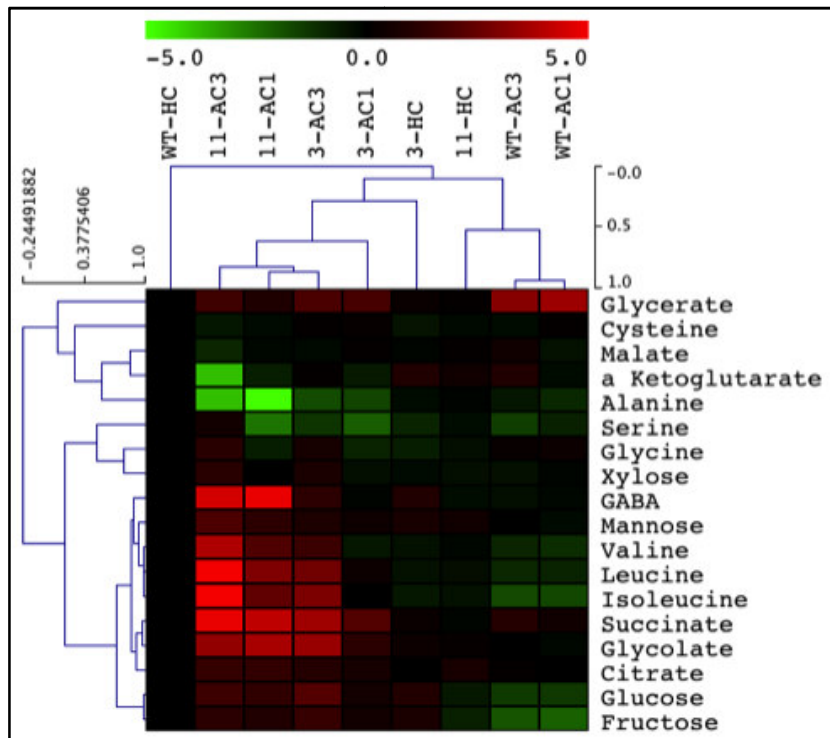
Supplemental figure 1: Growth of the siRNA-lines #5 and #11 under 1 % CO₂. Both plants were transferred from media to soil on the same date.



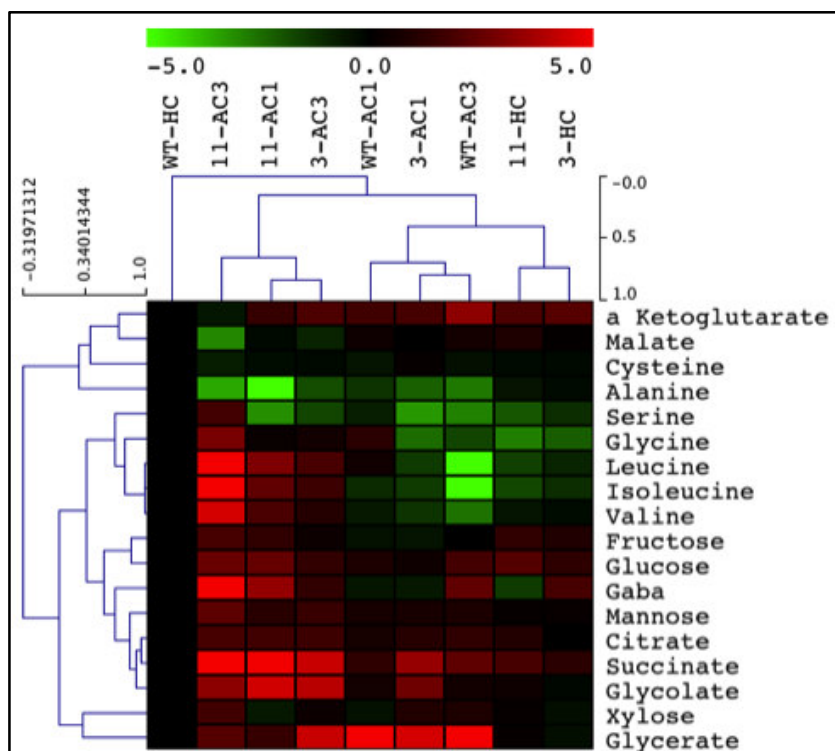
Supplemental figure 2: Protein blot of six siRNA-lines that don't show a photorespiratory phenotype. For this blot one plant of the T_0 generation was used. Plants were grown under ambient air for three weeks in a growth chamber with 400 μE and 15.5 h light and 8.5 h dark. The experiment was repeated three times and with three plants per line with similar results.



Supplemental figure 3: Relative abundance of metabolites in the developing leaf of wild type *F. bidentis*, siRNA-line #3 and #11 after a shift from 1 % CO_2 to ambient air . The values represent the \log_2 fold change of relative metabolite concentrations after one "AC1" and three days "AC3" after the shift from 1 % CO_2 to ambient air, compared to the relative concentration in the wild type under 1 % CO_2 "WT-HC". The figure was created via the "Multi Experiment Viewer" program (<http://www.tm4.org/mev.html>).



Supplemental figure 4: Variation of metabolic profiles from wild type *F. bidentis*, siRNA-line #3 and #11 in the mature leaf after a shift from from 1 % CO₂ to ambient air. The hierachical clustering was calculated with the “Multi Experiment Viewer” programm using the HCL module with pearson correlation and average linkage method (<http://www.tm4.org/mev.html>).



Supplemental figure 5: Variation of metabolic profiles from wild type *F. bidentis*, siRNA-line #3 and #11 in the developing leaf after a shift from from 1 % CO₂ to ambient air. The hierachical clustering was calculated with the “Multi Experiment Viewer” programm using the HCL module with pearson correlation and average linkage method (<http://www.tm4.org/mev.html>).

Addendum

1 Einleitung

In Rahmen der Photosynthese wird CO_2 aus der Luft fixiert und zur Bildung von Glucose eingesetzt. Verantwortlich für die Fixierung von CO_2 ist das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), welches somit ein Schlüsselenzym der Photosynthese ist. Neben der Fixierung von CO_2 kann RubisCO jedoch auch die Fixierung von O_2 katalysieren (Bowes et al. 1971). Die Fixierung von O_2 führt zu einem Molekül 2-Phosphoglycolat (2-PG) und einem Molekül 3-Phosphoglycerat (3-PGA), während durch die Fixierung von CO_2 zwei Moleküle 3-PGA gebildet werden. Im Gegensatz zu 3-PGA kann 2-PG nicht zur Bildung von Glucose genutzt werden und gilt zudem als ein toxisches Metabolit, da es verschiedene Enzyme des Stoffwechsels hemmt (Anderson 1971; Kelly and Latzko 1976). Aus diesem Grund haben photosynthetisch-aktive Organismen den Mechanismus der Photorespiration entwickelt, der 2-PG zu 3-PGA umsetzt und somit entfernt.

Als erstes Enzym der Photorespiration dephosphoryliert die 2-Phosphoglycolat-Phosphatase (PGLP) 2-PG zu Glycolat. Ein völliger Ausfall dieses Enzyms führt zu einem Phänotyp, der in normaler Luft nicht lebensfähig ist, aber durch erhöhte CO_2 -Konzentrationen komplementiert werden kann (Schwarte and Bauwe 2007). Solch ein photorespiratorischer Phänotyp tritt ebenfalls auf, wenn andere Enzyme der Photorespiration beeinträchtigt sind. Die entsprechenden Mutanten sind dabei teilweise auch ohne erhöhte CO_2 -Konzentrationen lebensfähig, in ihrem Wachstum jedoch beeinträchtigt (Somerville 2001; Somerville and Ogren 1979). Selbst C_4 -Pflanzen, welche weit weniger Photorespiration betreiben als C_3 -Pflanzen, zeigen diesen photorespiratorischen Phänotyp (Zelitch et al. 2009). Somit kann postuliert werden, dass die Photorespiration auch in C_4 -Pflanzen eine wichtige Funktion besitzt. Allerdings ist in C_4 -Pflanzen bislang nur eine Mutante des Gens *Glycolat-Oxidase* in *Zea mays* untersucht worden. Um nun die Photorespiration als solche und ihre Bedeutung für C_4 -Pflanzen im Allgemeinen zu verstehen, bedarf es der Untersuchung weiterer photorespiratorischer Mutanten in C_4 -Pflanzen. Zu diesem Zweck sollen hier die Folgen

einer Reduktion des photorespiratorischen Gens *PGLP* für die C4-Pflanze *Flaveria bidentis* analysiert werden.

2 Ergebnis

Herstellung eines induzierbaren Konstrukts zur Reduktion der mRNA-Spiegel von *PGLP*

Zur Untersuchung der Folgen einer Reduktion von *PGLP* in *F. bidentis*, soll die Expression des *PGLP*-Gens durch eine siRNA reduziert werden. Dabei wird jedoch ein starker photorespiratorischer Phänotyp erwartet, welcher den Transformationsprozess von *F. bidentis* erheblich erschweren könnte (Timm and Bauwe 2013; Timm et al. 2012). Zur Umgehung dieses Problems wird hier das dauerhaft induzierbare CRE-loxP-XVE-System (Abb. 1) verwendet, durch welches die Expression der siRNA auf einen Zeitpunkt nach der Transformation verschoben werden kann (Guo et al. 2003).

Dieses CRE-loxP-XVE-System basiert auf der CRE-loxP-Rekombinase und dem chimären XVE-Transkriptionsfaktor. Im nicht-induzierten Zustand sind die Gene der CRE-loxP-Rekombinase und des XVE-Transkriptionsfaktors Teil einer Gen-Kassette, welche den konstitutiv aktiven G10-90-Promotor von dem *siRNA*-Gen trennt. Aufgrund dieser Trennung fehlt dem *siRNA*-Gen der Promotor und es kommt folglich zu keiner Expression. Stattdessen wird das *XVE*-Gen konstitutiv durch den G10-90-Promotor exprimiert. Der XVE-Transkriptionsfaktor enthält unter anderem die Glukokortikoid-Bindedomäne aus *Homo sapiens*, welche nach Translation von XVE durch das Chaperon HSP-90 gebunden wird (Zuo et al. 2000). Durch die Bindung von HSP-90 an XVE, kann dieser nicht in den Nukleus transportiert werden. Ohne die Bindung von XVE an den Olex-A-Promotor unterbleibt auch die Expression der CRE-Rekombinase.

Induzieren lässt sich das System durch Zugabe von 17- β -Estradiol (Estradiol). Dieses Hormon gilt als spezifisch für Säugetiere und ist in der Lage HSP-90 von der Glukokortikoid-Bindedomäne des XVE zu verdrängen. Nach Bindung des Estradiols kann XVE in den Nukleus eindringen und dort an den Olex-A-Promotor binden. Durch diese Bindung wird nun die Expression der CRE-LoxP-Rekombinase ermöglicht. Dieses Enzym entfernt durch eine Rekombinations-Reaktion spezifisch die Gen-Kassette aus der DNA. In der jetzt rekombinierten DNA grenzt der G10-90-Promotor an das *siRNA*-

Gen, wodurch fortan eine dauerhafte und konstitutive Expression der siRNA ermöglicht wird.

Das hier verwendete *PGLP-siRNA*-Gen ist modular aufgebaut. Zwei Module bilden die „Arme“ der siRNA, welche durch das dritte Modul, ein Loop-bildendes Intron, verbunden sind. Beide „Arme“ bestehen dabei jeweils aus 152 bp der 5'UTR und 597 bp der kodierenden Sequenz des *PGLP*-Gens aus *F. bidentis*. Diese Sequenz ist bei einem „Arm“ in Leserichtung und beim anderen „Arm“ entgegen der Leserichtung eingefügt.

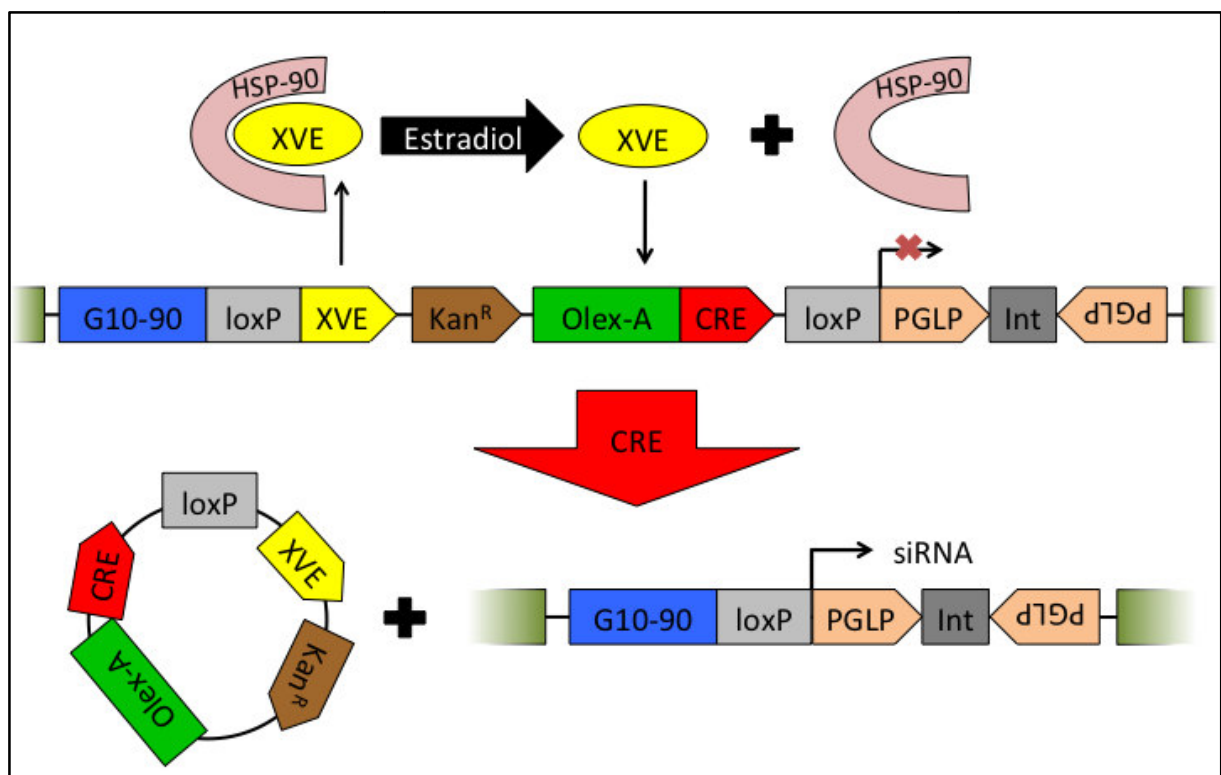


Abbildung 1: Mechanismus des CRE-loxP-XVE-Systems. Die Abkürzungen stehen für den G10-90-Promotor (G10-90), die Rekombinationsstelle (loxP), den XVE-Transkriptionsfaktor (XVE), das Kanamycin-Resistenzgen (Kan^R), den Olex-A-Promotor (Olex-A), die CRE-Rekombinase (CRE) sowie die eingefügten PGLP-cDNA-Fragmente, die mit einem Intron (Int) verbunden sind.

Die Genotypisierung transformierter Calli von *F. bidentis*

Für die Herstellung einer PGLP-reduzierten *F. bidentis*-Mutante wurde ein *PGLP-siRNA*-Gen konstruiert (Abb. 2 A) und in wildtypische *F. bidentis*-Calli transformiert (Chitty et al. 1994). Bei der Genotypisierung der transformierten nicht-induzierten Calli konnte in den Linien 2, 3, 4 und 7 sowohl die nicht-rekombinierte Ausgangsversion des

Konstrukts (Abb. 2 B) als auch die rekombinierte Version (Abb. 2 C) nachgewiesen werden. In vier von zehn Fällen hatten die Pflanzen also einen chimären Genotyp bestehend aus Zellen mit dem rekombinierten und dem nicht-rekombinierten Konstrukt. Erwartet wurde jedoch, dass die Rekombination nur nach Zugabe des Induktionsmittels Estradiol stattfinden kann. Offensichtlich kommt es in *F. bidentis* aber auch ohne die Anwesenheit von Estradiol zu einer Rekombination des Konstrukts.

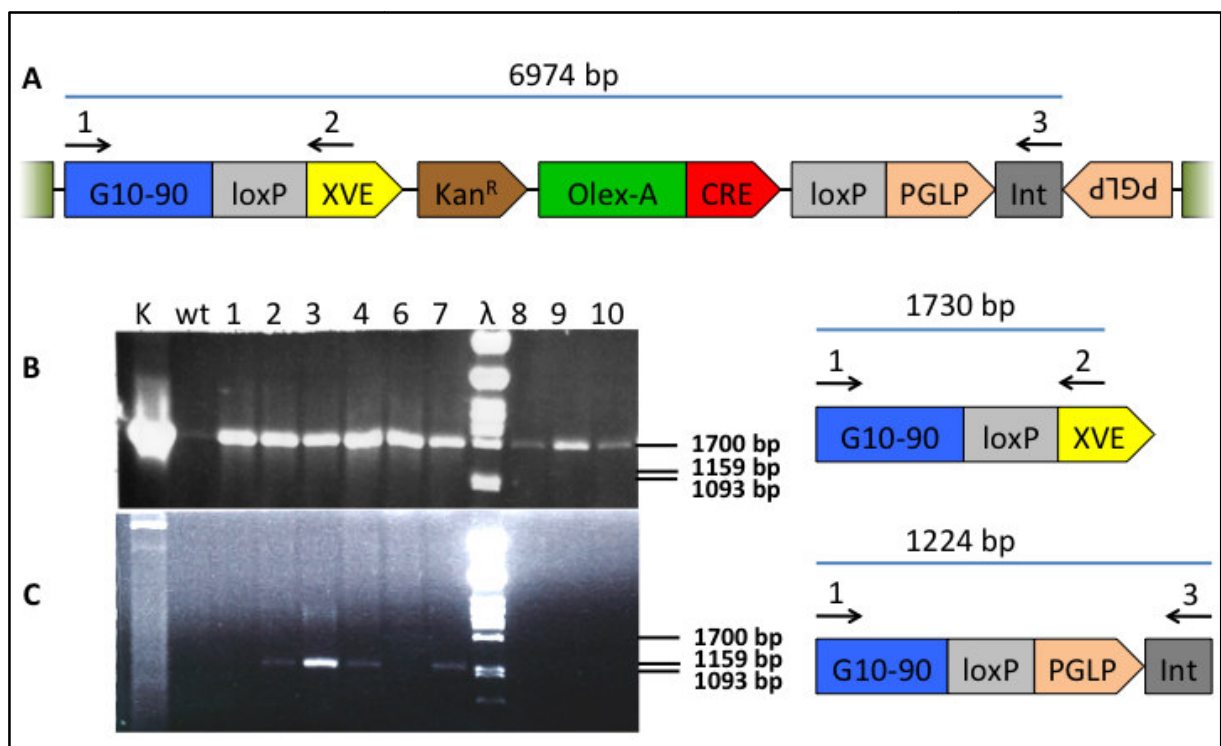


Abbildung 2: PCR zur Genotypisierung transformierter Calli von *F. bidentis*. Gezeigt sind das Ausgangskonstrukt sowie die Position der Primer 1, 2 und 3 (A), das PCR-Ergebnis mit den Primern 1 und 2 zur Detektion nicht-rekombinierter Konstrukte (B) und das PCR-Ergebnis mit den Primern 1 und 3 zur Detektion rekombinierter Konstrukte (C). Als Kontrolle „K“ wurde das Plasmid als Matrize eingesetzt. Zum Größenvergleich wurde mit dem Restriktionsenzym *Pst*I restringierte Lambda-DNA als „λ“ aufgetragen.

Induktion von transformierten T₀-Pflanzen auf Erde

Nach dem Umsetzen transformierter Pflanzen auf Erde wurde getestet, ob die Induktion des Systems einen photorespiratorischen Phänotyp hervorruft. Dabei wurde, um die Pflanzen zu induzieren, eine 20 μM Estradiol-Lösung direkt auf die Blattober- und Unterseiten sowie den Apex der Pflanze appliziert (Bleckmann et al. 2010). Diese Applikation wurde einmal wöchentlich über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt. Danach wurden die induzierten Pflanzen genotypisiert. Die

Genotypisierung ergab erneut einen chimären Genotyp mit der rekombinierten und der nicht-rekombinierten Ursprungsvariante des Konstrukts. Da nicht zu ermitteln war, wie viele Zellen der Pflanze die siRNA-exprimierende rekombinierte Version des Konstrukts enthielten, konnten mit diesen chimären Pflanzen keine physiologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

Da für die Versuche nur Pflanzen mit ausschließlich rekombinierter Variante des Konstrukts in Frage kommen, wurden die bereits induzierten T₀-Pflanzen weitere vier Wochen induziert, wobei nun die Applikationshäufigkeit auf fünfmal pro Woche erhöht wurde. Hierbei wurden auch alle Blüten sowie Blüten-Anlagen behandelt. Während dieser Behandlung zeigten die Pflanzen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Die zusätzliche Applikation des Estradiols auf die Blüten und Blütenanlagen wurde durchgeführt, um die Keimbahn-Zellen zu erreichen. Da vorausgegangene Studien zeigten, dass das CRE-loxP-XVE-System über Generationen stabil bleibt, wenn es einmal rekombiniert ist, würden Keimbahnzellen bei einmaliger Rekombination nur die rekombinierte Version des Konstrukts an ihre Nachkommen weitergeben (Guo et al. 2003). Als Folge würden alle Pflanzen der T₁-Generation, die aus solchen Keimbahn-Zellen hervorgingen, ihrerseits ebenfalls diese rekombinierte Version des Konstrukts enthalten und somit die *PGLP*-siRNA exprimieren.

Für den Test der ausschließlichen Weitergabe des rekombinierten Konstrukts wurden je 50 Samen von sechs verschiedenen Linien induzierter T₀-Pflanzen mit chimärem Genotyp auf Erde ausgebracht. Keine der resultierenden T₁-Pflanzen zeigte jedoch einen rekombinierten oder chimären Genotyp, sondern ausschließlich die Ausgangsversion des Konstrukts.

Demzufolge wurde das rekombinierte Konstrukt in diesem Fall nicht, wie von Zuo und Kollegen beobachtet, an 29 - 66 % der Nachkommen weitergegeben (Zuo et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Rekombination nur in den somatischen und nicht in den Keimbahn-Zellen stattgefunden hat.

Induktion von T₁-Pflanzen über estradiolhaltiges Medium

Die Induktion von T₀-Pflanzen über die Applikation von Estradiol auf Blätter und Meristeme führte nicht zu Pflanzen mit chimärem Genotyp in der T₁-Generation. Es wurden also möglicherweise keine Keimbahn-Zellen induziert. Um alle Zellen einer Pflanze inklusive der Keimbahn- bzw. Meristem-Zellen zu induzieren, ist die Applikation von Estradiol über das Leitgewebe der Pflanze in einem möglichst frühen Entwicklungsstadium vermutlich am effektivsten (Coppoolse et al. 2003).

Daher wurden T₁-Samen verschiedener nicht-induzierter T₀-Pflanzen wie in vorangegangenen Studien auf estradiolhaltiges Medium (1 x Murashige & Skoog; 3 % Sucrose, pH 6/KOH) ausgebracht und so das System induziert (Guo et al. 2003; Zuo et al. 2000). Die kleinen Sämlinge wurden alle drei Tage auf frisches estradiolhaltiges Medium umgesetzt, um so den Zerfall des Estradiols zu kompensieren (Xu et al. 2009). Insgesamt verblieben die Pflanzen 30 Tage auf dem Medium und wurden anschließend genotypisiert. Alle Pflanzen mit chimärem Genotyp wurden auf Erde umgesetzt. Die neu entstandenen Blätter wurden genotypisiert, aber es konnte nur noch die nicht-rekombinierte Version des Konstrukts festgestellt werden. Da die Möglichkeit bestand, dass Zellen der Keimbahn das rekombinierte Konstrukt enthielten, wurde das Saatgut dieser T₁-Pflanzen bzw. die T₂-Generation geerntet. Je 100 Samen von drei verschiedenen Linien der T₂-Generation sowie vom Wildtyp *F. bidentis* wurden auf Medium ausgebracht. Parallel dazu wurden auch je 20 Samen der entsprechenden T₁-Mutterpflanze ausgebracht, um die Keimungsraten zu vergleichen. Dadurch, dass sucrosehaltiges Medium statt Erde zur Anzucht verwendet wurde, sollten eventuell auftretende photorespiratorische Phänotypen gerettet werden (Igarashi et al. 2003; Timm and Bauwe 2013).

Insgesamt zeigte sich kein Unterschied in den Keimungsraten zwischen dem T₂- und dem entsprechenden T₁-Saatgut. Alle gekeimten T₂-Pflanzen wurden genotypisiert, wobei jedoch keine der Pflanzen positiv auf das rekombinierte Konstrukt getestet werden konnte. Demzufolge wurde auch bei diesem Experiment die rekombinierte Version des Konstrukts nicht an die nächste Generation weiter gegeben.

3 Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war es, die Folgen einer Reduktion des photorespiratorischen Gens *PGLP* für die C4-Pflanze *Flaveria bidentis* zu analysieren und so einen Rückschluss auf die Bedeutung der Photorespiration für C4-Pflanzen ziehen zu können. Im Verlauf dieser Studie verhielt sich das zur Reduktion von PGLP verwendete CRE-loxP-XVE-System jedoch nicht wie erwartet.

In *F. bidentis* kommt es auch ohne Zugabe von Estradiol zu einer Rekombination des Konstrukts

Bei der Genotypisierung der nicht induzierten Calli konnte das rekombinierte Konstrukt nachgewiesen werden (Abb. 2). Erwartet worden war aber, dass ohne Zugabe von Estradiol der XVE-Transkriptionsfaktor nicht in den Nukleus eindringen kann. Ohne XVE im Nukleus sollte die durch die CRE-loxP-Rekombinase vermittelte Rekombinationsreaktion nicht stattfinden und das Konstrukt folglich nur in der Ausgangsvariante vorliegen (Zuo et al. 2001).

Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch ist, dass der Olex-A-Promotor durch einen anderen Faktor als XVE gebunden wird. Dies hätte zur Folge, dass die CRE-loxP-Rekombinase auch ohne Zugabe von Estradiol exprimiert und das Konstrukt durch die folgende Rekombinationsreaktion aktiviert wird. Eine zweite Möglichkeit ist, dass HSP-90 auch von einer anderen Substanz als Estradiol von der Glukokortikoid-Bindedomäne des XVE verdrängt werden kann. So zeigen Untersuchungen mit dem CRE-loxP-XVE-System in *Glycine max* (Soja), dass ein Soja-eigenes Hormon in der Lage ist, die Glukokortikoid-Bindedomäne des XVE zu besetzen (Zuo et al. 2000). Die Stoffgruppe dieses Hormons wird als Phyto-Östrogene bezeichnet. Solche Phyto-Östrogene wurden in verschiedenen *Asteraceae* wie der Gattung *Helianthus* oder der mit *F. bidentis* verwandten Pflanze *Flaveria chloraefolia* gefunden (Grandmaison and Ibrahim 1995; Mazur 1998). Es ist daher anzunehmen, dass auch *F. bidentis* über Phyto-Östrogene verfügt. Diese könnten die Glukokortikoid-Bindedomäne des XVE gebunden und so die Expression der CRE-loxP-Rekombinase auch ohne Zugabe von Estradiol ermöglicht haben (Ososki and Kennelly 2003).

Zu welchem Zeitpunkt und in welchen Zellen die Bildung von Phyto-Östrogene stattfindet ist noch nicht bekannt. Folglich ist es möglich, dass die verschiedenen untersuchten Pflanzen hier variierende Phyto-Östrogen-Spiegel aufwiesen. Möglicherweise kommt es aufgrund dieser Variation in einigen Pflanzen zur Rekombination ohne Estradiol-Zugabe, während diese in anderen Pflanzen ausbleibt (Abb. 2). Ein anderer möglicher Faktor, der diese Beobachtung erklärt könnte der Insertionsort und die Insertionshäufigkeit des Konstruktes sein. Beides könnte einen Einfluss auf die Stärke der Expression von *XVE* in der Zelle haben und somit die Wahrscheinlichkeit einer Bindung von Phyto-Östrogenen an den *XVE* variieren.

Die Induktion der transgenen Pflanzen führt zu chimären Genotypen, welche sich nicht in die nächste Generation fortsetzen

Die Induktion der transformierten Calli bzw. Pflanzen der T_0 -Generation resultierte in chimären Genotypen. In der nächsten Generation konnte die Rekombination aber nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung widerspricht früheren Arbeiten, in denen 29-66 % der Nachkommen das rekombinierte Konstrukt aufwiesen (Zuo et al. 2001). Für diesen Widerspruch gibt es zwei mögliche Erklärungen. Erstens könnten die Zellen des Keimbahnmeristems unerreichbar für die Induktions-Lösung gewesen sein. Zweitens konnten Coppoolse und Kollegen zeigen, dass die durch die CRE-Rekombinase verursachte Rekombination, umso effektiver in die nächste Generation übermittelt wird, je jünger die CRE-exprimierenden Pflanzen sind (Coppoolse et al. 2003). Die hier induzierten T_0 -Pflanzen waren jedoch bereits mehrere Wochen alt und könnten somit schon zu alt gewesen sein, um eine Rekombination in den Keimbahnzellen noch zu ermöglichen.

Da die Induktion der transformierten Calli nicht erfolgreich war, wurden zur Induktion der Rekombination des Konstrukts auch Pflanzen der T_1 -Generation auf estradiolhaltigem Medium angezogen. Nach der Induktion konnte aber ausschließlich die nicht-rekombinierte Ausgangsversion des Konstrukts nachgewiesen werden. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass eventuell gegen siRNA-exprimierende Zellen selektiert wird, da die Auswirkungen der PGLP-Reduktion zu gravierend sind (Schwarte and Bauwe 2007; Timm et al. 2012). Infolgedessen geht die rekombinierte Version des Konstrukts wieder verloren, weshalb PGLP nie in allen Zellen reduziert

wird. Zur Umgehung dieses Problems könnte die Induktion unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen durchgeführt werden, wie von Timm und Bauwe dargelegt wurde (Timm and Bauwe 2013). Es ist anzunehmen, dass unter diesen Bedingungen die Reduktion von PGLP keinen oder zumindest einen schwächeren negativen Effekt auf die Pflanze bzw. die Zelle hat. Als Folge dessen wird auch nicht gegen Zellen mit dem rekombinierten Konstrukt selektiert. Es ist bei diesem Ansatz also möglich, dass induzierte Zellen die rekombinierte Version des Konstrukts weitervererben können. Dies muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das eigentliche Ziel dieser Studie, die Reduktion von PGLP in der C4-Pflanze *F. bidentis*, nicht erreicht werden konnte. Für das Ziehen von Rückschlüssen aus der Reduktion von PGLP auf die Bedeutung der Photorespiration für C4-Pflanzen, sind zwangsläufig Pflanzen mit dauerhafter Expression der *PGLP*-siRNA notwendig. Diese konnten aber trotz verschiedener Ansätze nicht erzeugt werden. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass sich das verwendete CRE-loxP-XVE-System für diese Untersuchung im Genus *Flaveria* nicht eignet, da vermutlich pflanzeneigene Phyto-Hormone das System auch ohne die Zugabe von Estradiol rekombinieren lassen.

4 Material und Methoden

Konstruktion des Gens der *PGLP*-siRNA

Zur Konstruktion des Gens der *PGLP*-siRNA wurde RNA aus *F. bidentis* über das QIAprep RNeasy Kit (QIAGEN) isoliert und mittels des SMARTer RACE cDNA-Synthesis Kits (Clontech) in cDNA umgeschrieben. Für die Amplifizierung des siRNA-Teils in Leserichtung aus der *F. bidentis* cDNA wurden die Primer ATAAAGCTTCCACCATCTTCCGGACCCCAA und ATACTCGAGGGTACACAAACCACCTTGAACCATTGG und für den Teil entgegen der Leserichtung ATAGAATTCTCCACCATCTTCCGGACCCCAA und ATAGGATCCGGTACACAAACCACCTTGAACCATTGG verwendet. Beide PCR-Produkte wurden in den pJET cloning vector (thermofisher) ligiert und in *Escherichia coli* (*E. coli*) vermehrt. Der Teil in Leserichtung wurde durch die Enzyme *Hind*III und *Xho*I aus dem Vektor restringiert und der Teil entgegen der Leserichtung durch *Eco*RI und *Bam*HI. Hiernach

wurden beide Fragmente in den pSK-Int Vektor legiert (Guo et al. 2003). Anschließend wurde der Vektor in *E. coli* vermehrt und das Gen der *PGLP-siRNA* über die Enzyme *BcuI* und *XhoI* aus dem Vektor restringiert und anschließend in den ebenso restringierten Vektor pX6 legiert (Zuo et al. 2001).

Transformation von *F. bidentis*

Die Transformation von *F. bidentis* erfolgte gemäß Chitty et al. (1994) über den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL1 und anschließender Regeneration transgener Calli auf Medium (1 x Murashige & Skoog; 3 % Sucrose, pH 6/KOH)(Hood et al. 1986; Lazo et al. 1991).

Nachweis von Transformation und Rekombination

Der Nachweis der Transformation von *F. bidentis* erfolgte über eine PCR mit den Primern 1 (GGCGGGAAACGACAATCTGATCCAAGC) und 2 (AGGCAGAGGGTTCCCTGCCA-CA). Die benötigte genomische DNA wurde dafür gemäß Edwards et al. (1991) isoliert. Für den Nachweis der Rekombination wurde neben den Primern 1 und 2 auch der Primer 3 (ACCATTGTCCATTGTCTTGTGTGTTTGCAG) in Kombination mit dem Primer 1 verwendet.

Induktion von transgenen *F. bidentis*-Pflanzen auf Erde

Zur Induktion des CRE-loxP-XVE-Systems auf Erde wurden die entsprechenden Pflanzen wiederholt mit einer 20 µM Estradiol-Lösung (20 µM 17-β-Estradiol; 0,1 % Tween) benetzt (Bleckmann et al. 2010). Das Wachstum der Pflanzen erfolgte unter Gewächshausbedingungen.

Induktion von transgenen *F. bidentis*-Pflanzen auf Medium

Zur Induktion des CRE-loxP-XVE-Systems über Medium (1 x Murashige & Skoog; 3 % Sucrose, pH 6/KOH) wurde dem Medium kurz vor dem Gießen der Platten eine 20 µM

Estradiol-Lösung (20 μ M 17- β -Estradiol; 0,1 % Tween) zugesetzt (Bleckmann et al. 2010; Guo et al. 2003). Um den Zerfall des Estradiols zu kompensieren, wurden die Pflanzen über einen Zeitraum von 30 Tagen alle drei Tage auf frisches Medium umgesetzt (Xu et al. 2009). Das Wachstum der Pflanzen erfolgte bei ca. 100 μ E, 23°C Tagestemperatur und 16 °C Nachttemperatur bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 zu 8 h.

5 Literatur

- Anderson LE** (1971) Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes II. Pea Leaf Triose Phosphate Isomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 235: 237-244
- Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CA, Simon R** (2010) Stem Cell Signaling in Arabidopsis Requires CRN to Localize CLV2 to the Plasma Membrane. *Plant Physiology* 152: 166-176
- Bowes G, Ogren WL, Hageman RH** (1971) Phosphoglycolate Production Catalyzed by Ribulose Diphosphate Carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45: 716-722
- Chitty JA, Furbank RT, Marshall JS, Chen Z, Taylor WC** (1994) Genetic Transformation of the C4 Plant, *Flaveria bidentis*. *The Plant Journal* 6: 949-956
- Coppoolse E, de Vroomen M, Roelofs D, Smit J, van Gennip F, Hersmus BM, Nijkamp HJ, van Haaren MJ** (2003) Cre Recombinase Expression Can Result in Phenotypic Aberrations in Plants. *Plant Molecular Biology* 51: 263-279
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349
- Grandmaison J, Ibrahim RK** (1995) Evidence for Nuclear Protein Binding of Flavonol Sulfate Esters in *Flaveria chloraefolia*. *Journal of Plant Physiology* 147: 653-660
- Guo HS, Fei JF, Xie Q, Chua NH** (2003) A Chemical-Regulated Inducible RNAi System in Plants. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 34: 383-392
- Hood E, Helmer GL, Fraley RT, Chilton M-D** (1986) The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 Is Encoded in a Region of pTiBo542 Outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* 168: 1291-1301
- Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C** (2003) Identification of Photorespiratory Glutamate:glyoxylate Aminotransferase (GGAT) Gene in Arabidopsis. *The Plant Journal* 33: 975-987
- Kelly GJ, Lutzko E** (1976) Inhibition of Spinach-Leaf Phosphofructokinase by 2-Phosphoglycollate. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 68: 55-58
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA** (1991) A DNA Transformation-Competent *Arabidopsis* Genomic Library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)* 9: 963-967
- Mazur W** (1998) 11 Phytoestrogen Content in Foods. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12: 729-742
- Ososki AL, Kennelly EJ** (2003) Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research* 17: 845-869
- Schwarte S, Bauwe H** (2007) Identification of the Photorespiratory 2-Phosphoglycolate Phosphatase, PGLP1, in Arabidopsis. *Plant Physiology* 144: 1580-1586

- Somerville CR** (2001) An Early Arabidopsis Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration. *Plant Physiology* 125: 20-24
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) A Phosphoglycolate Phosphatase-Deficient Mutant of Arabidopsis. *Nature* 280: 833-836
- Timm S, Bauwe H** (2013) The Variety of Photorespiratory Phenotypes – Employing the Current Status for Future Research Directions on Photorespiration. *Plant Biology* 15: 737-747
- Timm S, Mielewczik M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H** (2012) High-to-Low CO₂ Acclimation Reveals Plasticity of the Photorespiratory Pathway and Indicates Regulatory Links to Cellular Metabolism of Arabidopsis. *Public Library of Science ONE* 7: e42809
- Xu H, Zhang J, Zeng J, Jiang L, Liu E, Peng C, He Z, Peng X** (2009) Inducible Antisense Suppression of Glycolate Oxidase Reveals Its Strong Regulation over Photosynthesis in Rice. *Journal of Experimental Botany* 60: 1799-1809
- Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP** (2009) High Glycolate Oxidase Activity is Required for Survival of Maize in Normal Air. *Plant Physiology* 149: 195-204
- Zuo JR, Niu QW, Chua NH** (2000) An Estrogen Receptor-Based Transactivator XVE Mediates Highly Inducible Gene Expression in Transgenic Plants. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 24: 265-273
- Zuo JR, Niu QW, Moller SG, Chua NH** (2001) Chemical-Regulated, Site-Specific DNA Excision in Transgenic Plants. *Nature Biotechnology* 19: 157-161

VIII Danksagung

Ich danke ganz herzlich ...

... Prof. Dr. Peter Westhoff für die Betreuung dieser Arbeit, seine Geduld mit mir und diesem Projekt, die vielen hilfreichen Ideen und Ratschläge und die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen

... Prof. Dr. Andreas Weber für die Übernahme des Koreferats und die Unterstützung in meinem Committee.

... Prof. Dr. Simon für seine Tipps in den Committee-Meetings und während der Retreats.

... allen Professoren, Doktoren, Doktoranden und natürlich Koordinatoren des iGRAD plant und des PROMICS für die tolle Zeit und die Unterstützung.

... Dr. Udo Gowik für die Betreuung und Hilfe bei sämtlichen Computer-Arbeiten

... Dr. Stefan Timm für die praktische und theoretische Unterstützung, die weit über eine normale Kollaboration hinausgeht.

... Prof. Dr. Hermann Bauwe für die Möglichkeit eines Gastaufenthalts an seinem Institut.

... Dr. Stefanie Schulze für die Beratung, Trost, viele interessante Pausen und Nestwärme

... Sandra Kirschner für die Wortgefechte und Albernheiten.

... Maria Koczor für die Aufzucht und Pflege meiner mutierten Lieblinge, welche ihr so viel Kummer bereiteten.

... allen Kollegen der Botanik IV für die interessante Gespräche und Hilfe.

... allen Mitarbeitern des MS-Labors für die Unterstützung und die Unterweisung in entspannter Atmosphäre.

... Dr. Marion Eisenhut und Dr. Urte Schlüter für eine unendliche Geduld bei der Paarberatung zwischen mir und IRGA.

... Frau Helga Oellers-Blum, deren Unterstützung ich niemals vergessen werde.

... meiner Frau Dr. Tatjana Levey für ihren Trost, ihre Expertise und ihren Glauben an mich und unsere gemeinsame Zukunft, der mich mehr als alles andere motiviert hat.

IX Referenzen und Koautoren

Zu Manuskript I

Titel:

Die Expression des photorespiratorischen Gens *2-Phosphoglycolat-Phosphatase* im Genus *Flaveria*

Autoren:

Myles Levey¹, Stefanie Schulze¹, Maria Koczor¹, Monika Streubel¹, Udo Gowik¹ und Yuri Munekage²

¹ Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Universitätsstraße 1, Heinrich-Heine-Universität, 40225 Düsseldorf, Deutschland

² School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, 2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo, 669-1337 Japan

Beiträge der Autoren:

Myles Levey...

- isolierte die 5'flankierende Region des *PGLP*-Gens aus *Flaveria trinervia*, *Flaveria brownii*, *Flaveria pubescens* und *Flaveria pringlei*.
- verglich die 5'flankierenden Regionen miteinander.
- isolierte das *PGLP*-Gen aus *F. trinervia* sowie das erste und zweite Exon und das erste Intron des *PGLP*-Gens aus *F. brownii*, *F. pubescens* und *F. pringlei*.
- verglich das *PGLP*-Gen von *F. trinervia* mit dem von *Flaveria bidentis* und *Flaveria robusta*.
- verglich das erste Intron sowie das erste und zweite Exon des *PGLP*-Gens in den verschiedenen *Flaveria*-Spezies.
- erstellte die zur Transformation genutzten Konstrukte mit der β -*Glucuronidase* (*GUS*).
- transformierte *Arabidopsis thaliana* mit den Konstrukten mit *GUS*.
- führte die *GUS*-Fluorometrie in *F. bidentis* und *A. thaliana* durch.
- führte die *in-situ*-Lokalisation des *GUS*-Proteins in *F. bidentis* und *A. thaliana* durch.
- erstellte die Abbildungen.
- schrieb das Manuskript.

Stefanie Schulze...

- erstellte die Konstrukte FtppcA::HF-Tag-FbRPL18 und FtGLDPA::HF-Tag-FbRPL18.
- isolierte die RNA aus Bündelscheiden- und Mesophyll-Zellen von *F. bidentis*.

- machte eine quantitative Real Time PCR mit den isolierten RNAs und wertete diese aus.

Maria Koczor und Monika Streubel...

- transformierten alle verwendeten Konstrukte in *F. bidentis*.

Udo Gowik und Yuri Munekage...

- erzeugten die verwendeten Genomsequenzen von *F. bidentis* und *F. robusta*.

Zu Manuskript II

Titel:

The reduction of the photorespiratory enzyme 2-phosphoglycolate phosphatase (PGLP) in the C4 plant *Flaveria bidentis* and its consequence

Autoren:

Myles Levey¹, Stefan Timm², Udo Gowik¹, Maria Koczor¹, Kathrin Jahnke² und Katrin Weber³

¹ Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Universitätsstraße 1, Heinrich-Heine-Universität, 40225 Düsseldorf, Deutschland

² Universität Rostock, Abteilung Pflanzenphysiologie, Albert-Einstein-Straße 3, 18051 Rostock, Deutschland

³ Biochemie der Pflanzen Heinrich-Heine-Universität Universitätsstraße 1

Beiträge der Autoren:

Myles Levey...

- erstellte das siRNA-Konstrukt.
- dokumentierte das Wachstum transformierter *F. bidentis* auf Erde und auf Medium unter normaler Luft.
- isolierte und quantifizierte Proteine aus *F. bidentis*.
- analysierte die Gaswechsel-Messung.
- extrahierte und analysierte Metabolite aus *F. bidentis*.
- erstellte die Abbildungen.
- schrieb das Manuskript.
- überarbeitete das Manuskript.

Stefan Timm...

- führte die Gaswechsel-Messung durch.
- dokumentierte das Wachstum von *F. bidentis* unter 1 % CO₂ und normaler Luft auf Erde.
- überarbeitete das Manuskript.

Udo Gowik...

- überarbeitete das Manuskript.

Maria Koczor...

- transformierte *F. bidentis* mit dem siRNA-Konstrukt.

Kathrin Jahnke...

- führte die Gaswechsel-Messung durch.

Katrin Weber...

- führte die Massenspektrometrie durch.