

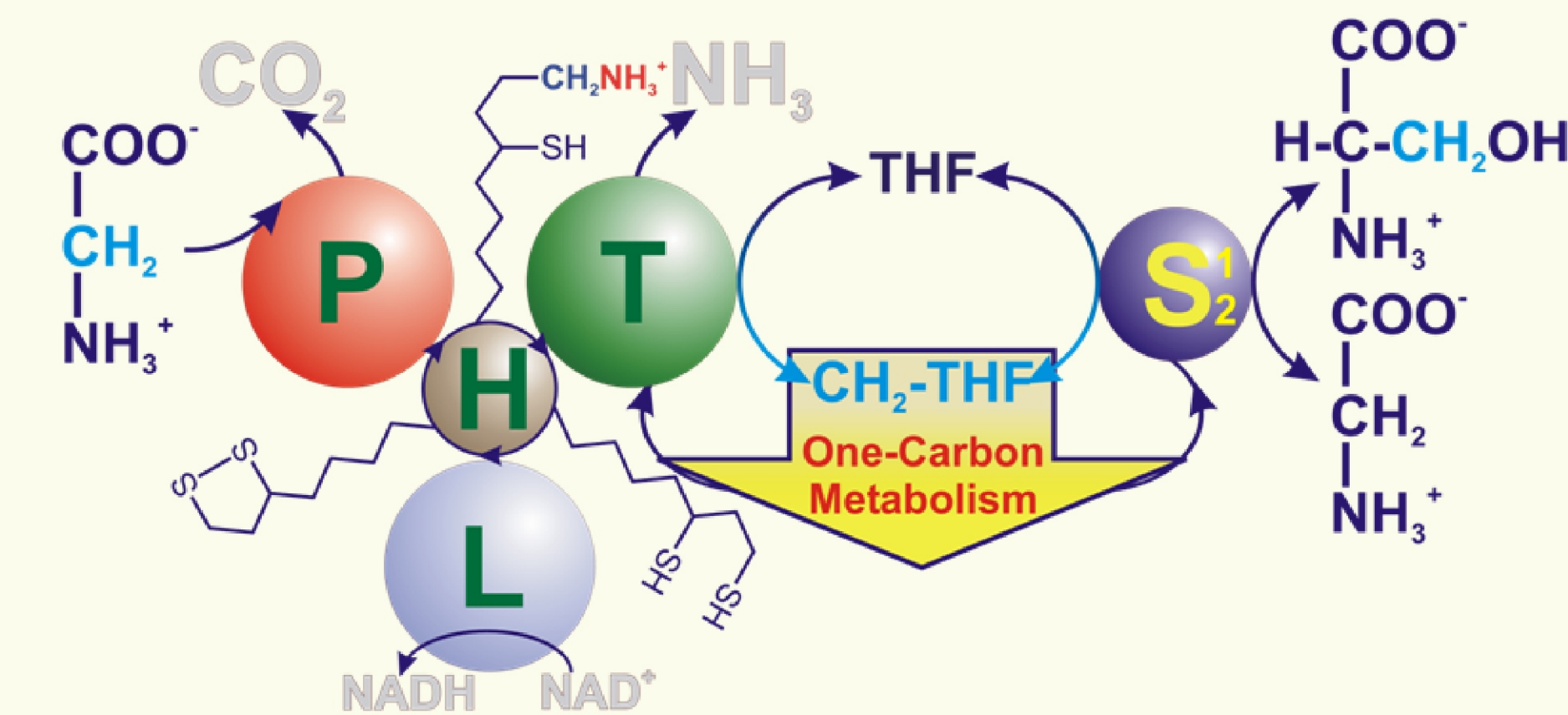
Knock-out der Glycinecarboxylase in Arabidopsis ist lethal - auch bei hoher CO₂-Konzentration



Nadja Engel, Üner Kolukisaoglu und Hermann Bauwe

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

nadja.engel@biologie.uni-rostock.de



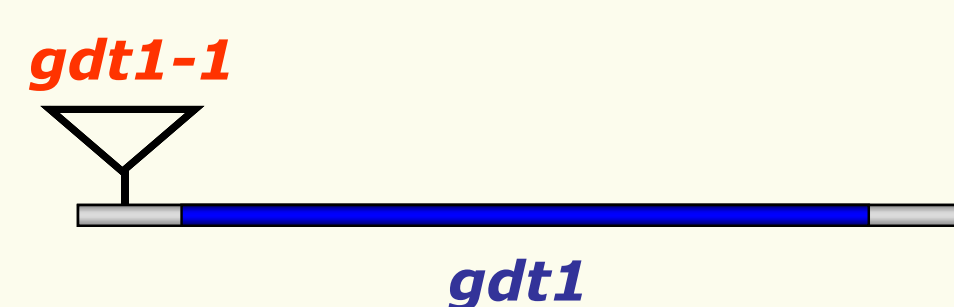
Der in der Mitochondrienmatrix lokalisierte Glycinecarboxylase-Komplex (GDC) ist ein Schlüsselenzym der Interkonversion von Glycin und Serin, der zentralen Quelle von aktiven Ein-Kohlenstoff-Verbindungen in allen Organismen. In photosynthetisierenden Geweben ist die GDC am photorespiratorischen Glykolat-Zyklus beteiligt, wobei CO₂ in großen Mengen freigesetzt wird. Die GDC setzt sich aus vier Komponenten, dem P-, L-, T- und H-Protein, zusammen.

- Ziele:
1. Herstellung einer GDC-Null-Mutante
 2. Komplementation mit heterologen Genen

Schema des GDC-Komplexes in Zusammenarbeit mit der SHMT

T-Protein knock-down Mutante

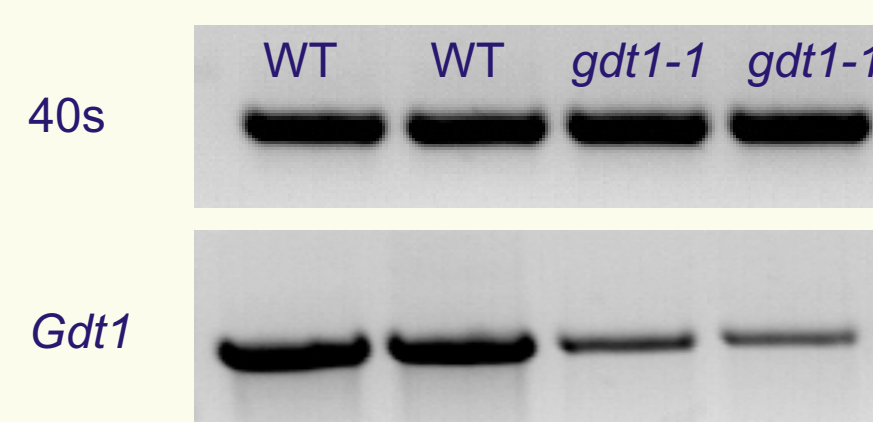
In *A. thaliana* existiert nur ein für das T-Protein codierendes Gen. Zur Verfügung stand uns eine T-DNA-Insertionsmutante, die im Promotor des



Unter ambienten CO₂-Bedingungen weist die homozygote T-Protein-Mutante ein verzögertes Wachstum und leicht gelbliche Blätter auf. Dieses Erscheinungsbild ist unter Hoch-CO₂ revertierbar.

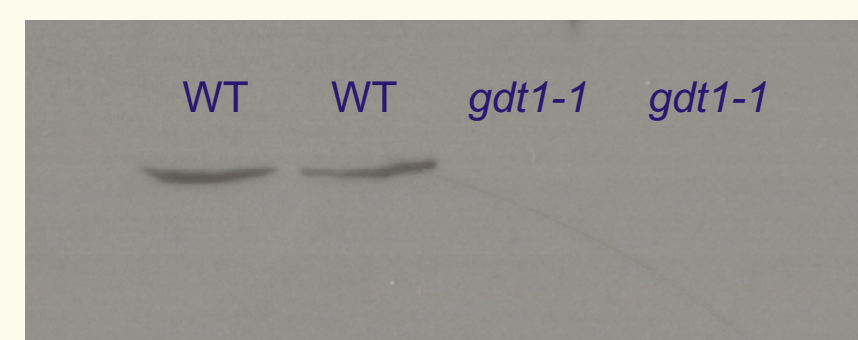


Mittels RT-PCR konnte eine Reduktion des *Gdt1*-Transkriptes nachgewiesen werden.



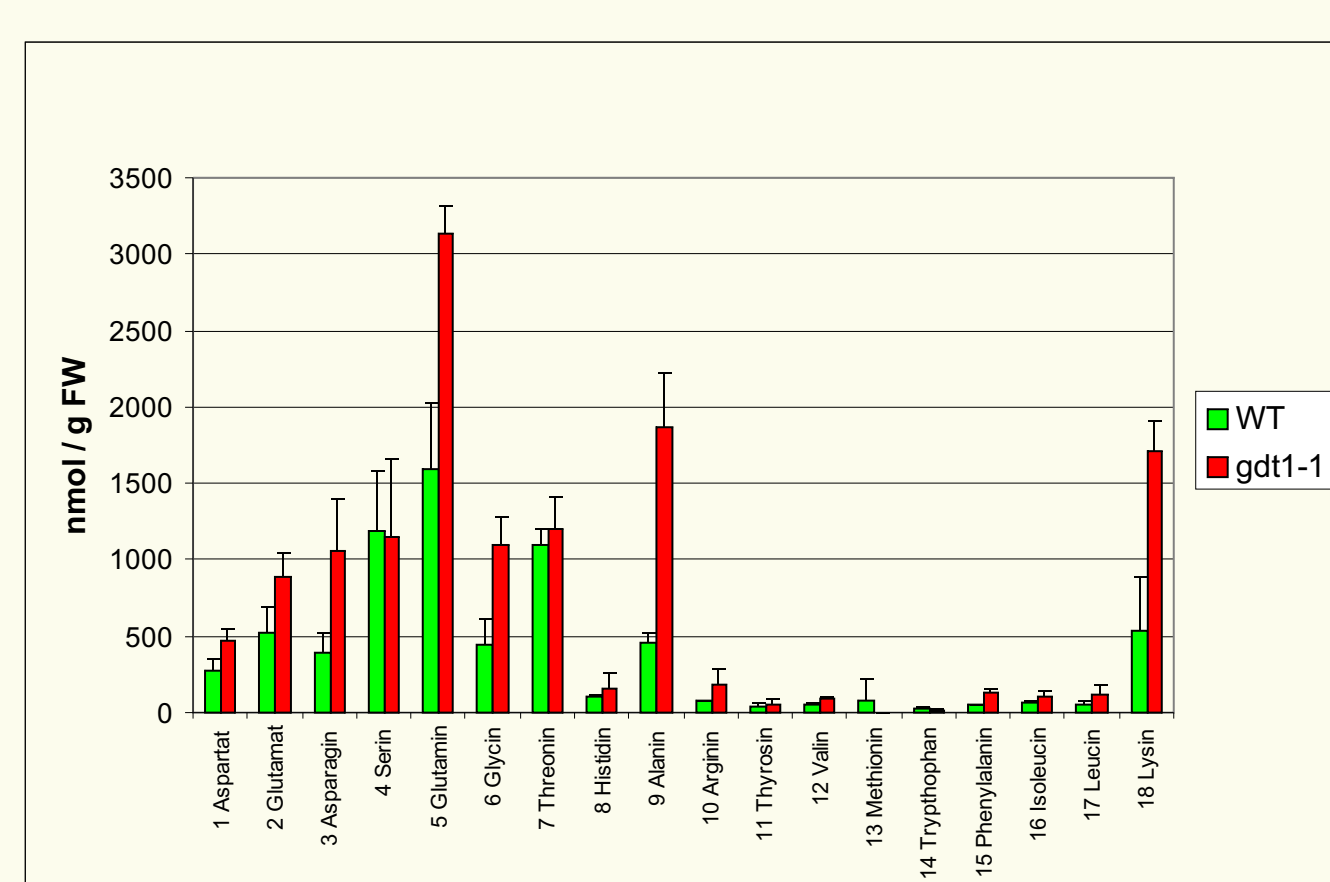
Nachweis des *Gdt1*-Transkriptes mittels RT-PCR

In der *gdt1-1*-Mutante wurde noch kein T-Protein mittels Western Blot detektiert.



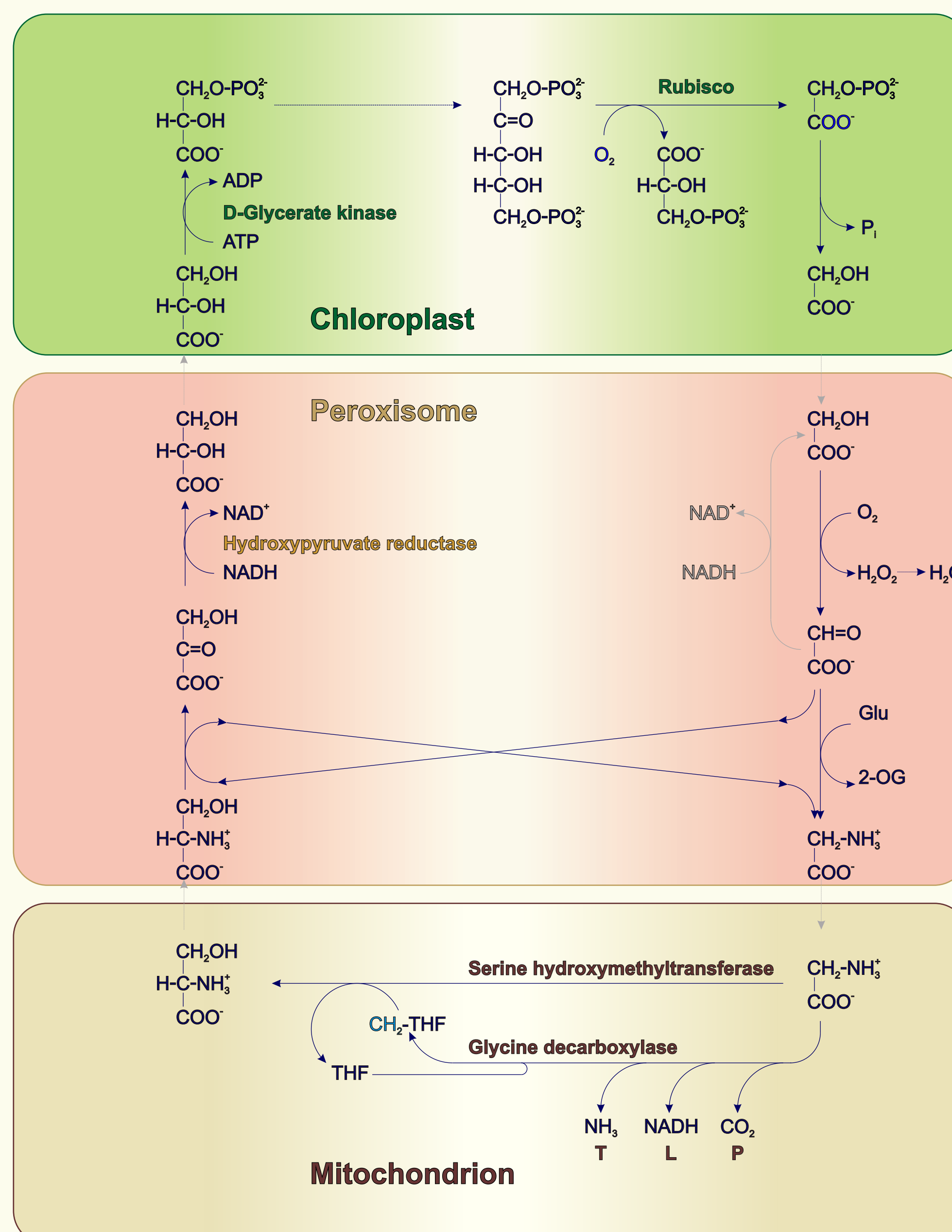
Western Blot zum Nachweis des T-Proteins

Durch HPLC-Analysen auf Aminosäureebene wurden bei der *gdt1-1*-Mutante unter 0,12% CO₂-Bedingungen erhöhte Glycin- und Glutamin-Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp bestimmt.



Die T-DNA-Insertion im Promotor des *Gdt1*-Gens führt zu keinem letalen Phänotyp. Die T-Protein-Mutante ähnelt morphologisch wie auch biochemisch anderen Photorespirations-Mutanten. Es scheint, daß auch sehr geringe, nicht detektierbare Mengen an T-Protein der Pflanze stoffwechselphysiologisch genügen.

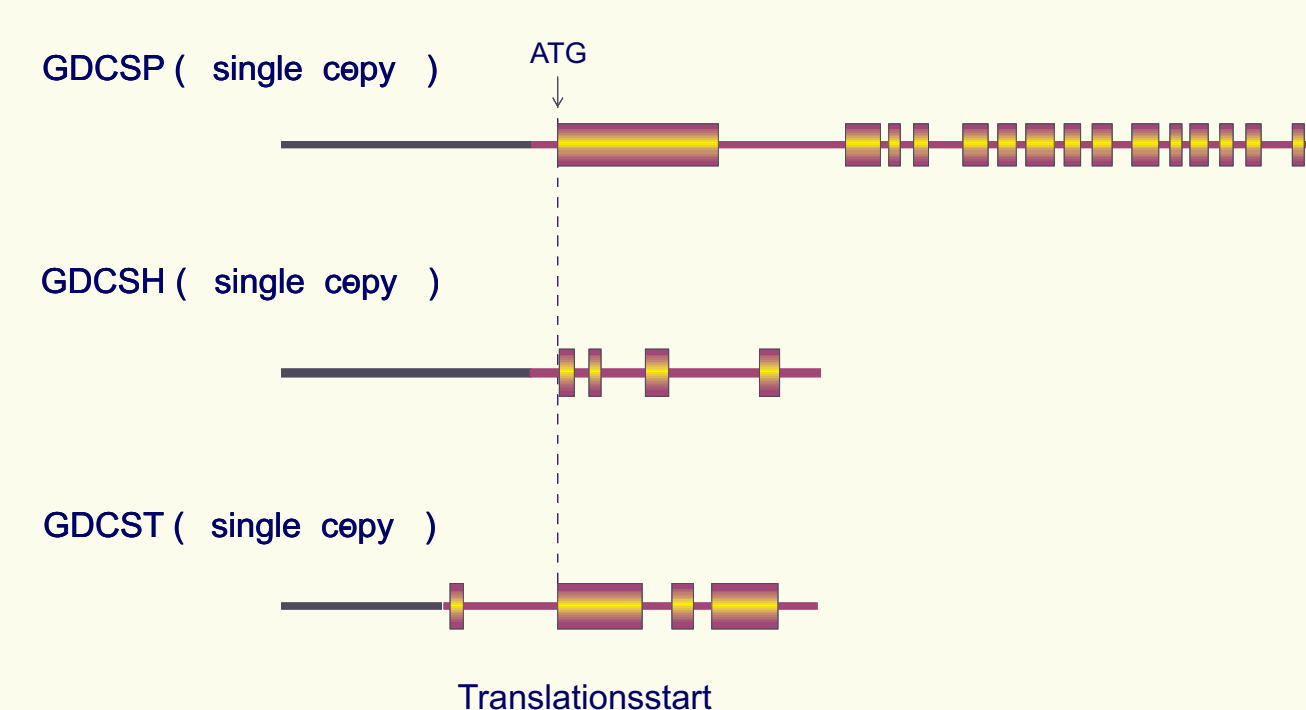
Glykolat-Zyklus



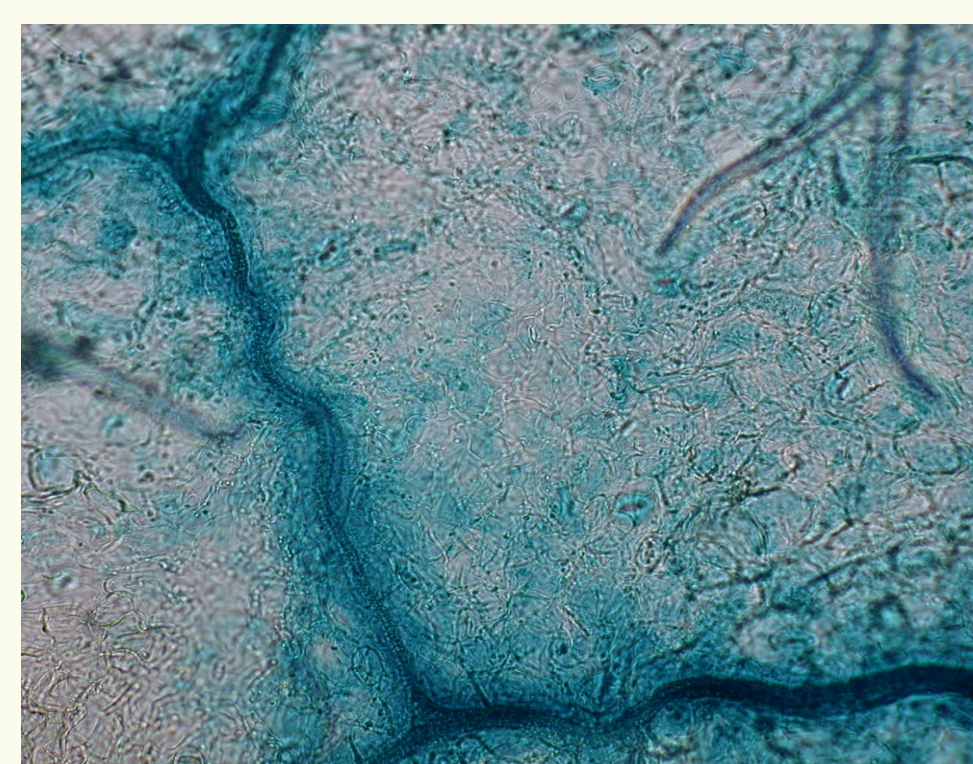
Test der Promotoren von GDC-Genen aus *Flaveria*

Die erzeugten GDC-Null-Mutanten sollen mit heterologen Genen aus *Flaveria anomala* (C₃-C₄-intermediär) ektopisch komplementiert werden. Die GDC-Komponenten von *F. anomala* sind in den Leitbündeln lokalisiert. Dazu wurde zunächst die Zellpräferenz der *Flaveria*-GDC-Promotoren in *A. thaliana* überprüft. Verwendet wurden hierfür Promotor-GUS-Fusionen.

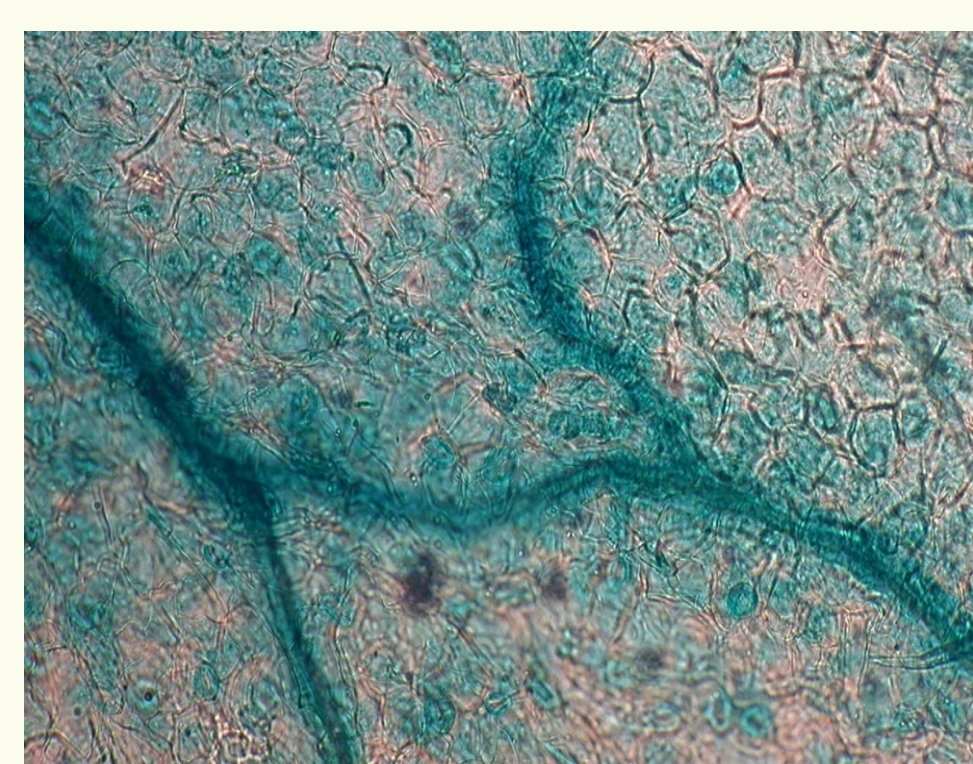
GDCS-Gene von *Flaveria anomala* (C3-C4)



P-Protein (*F. anomala*)

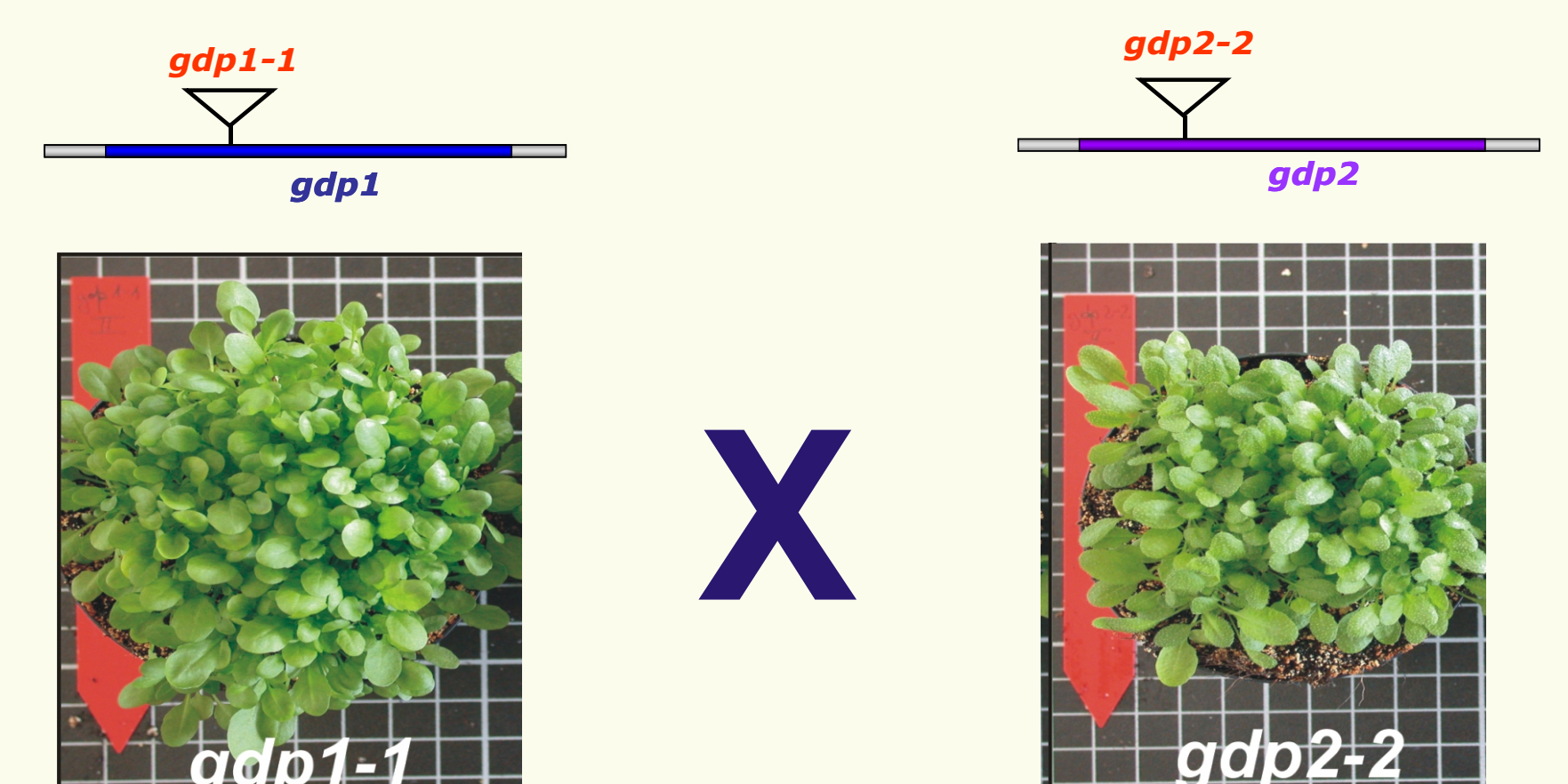


T-Protein (*F. anomala*)

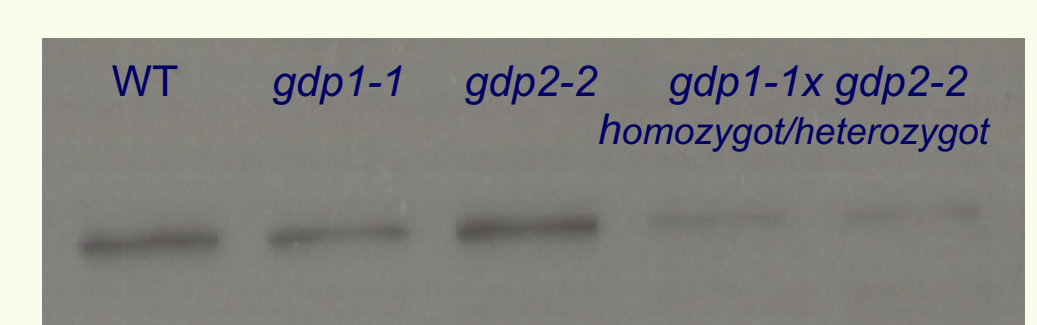
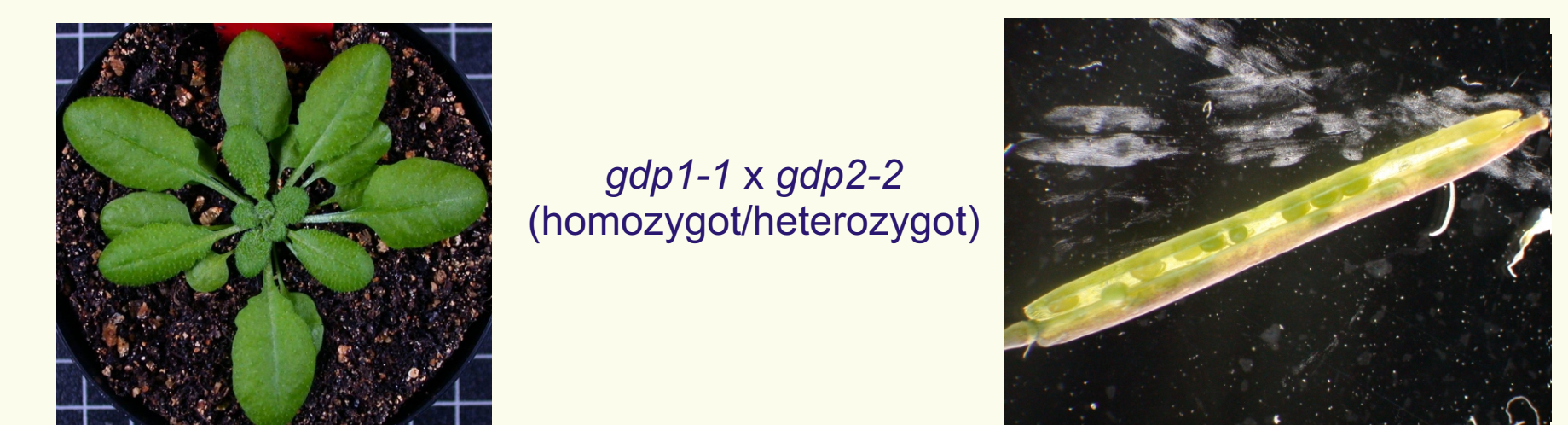


P-Protein knock-out Mutanten

Morphologisch unauffällige T-DNA-Insertionsmutanten für *gdp1-1* und *gdp2-2* wurden miteinander gekreuzt.



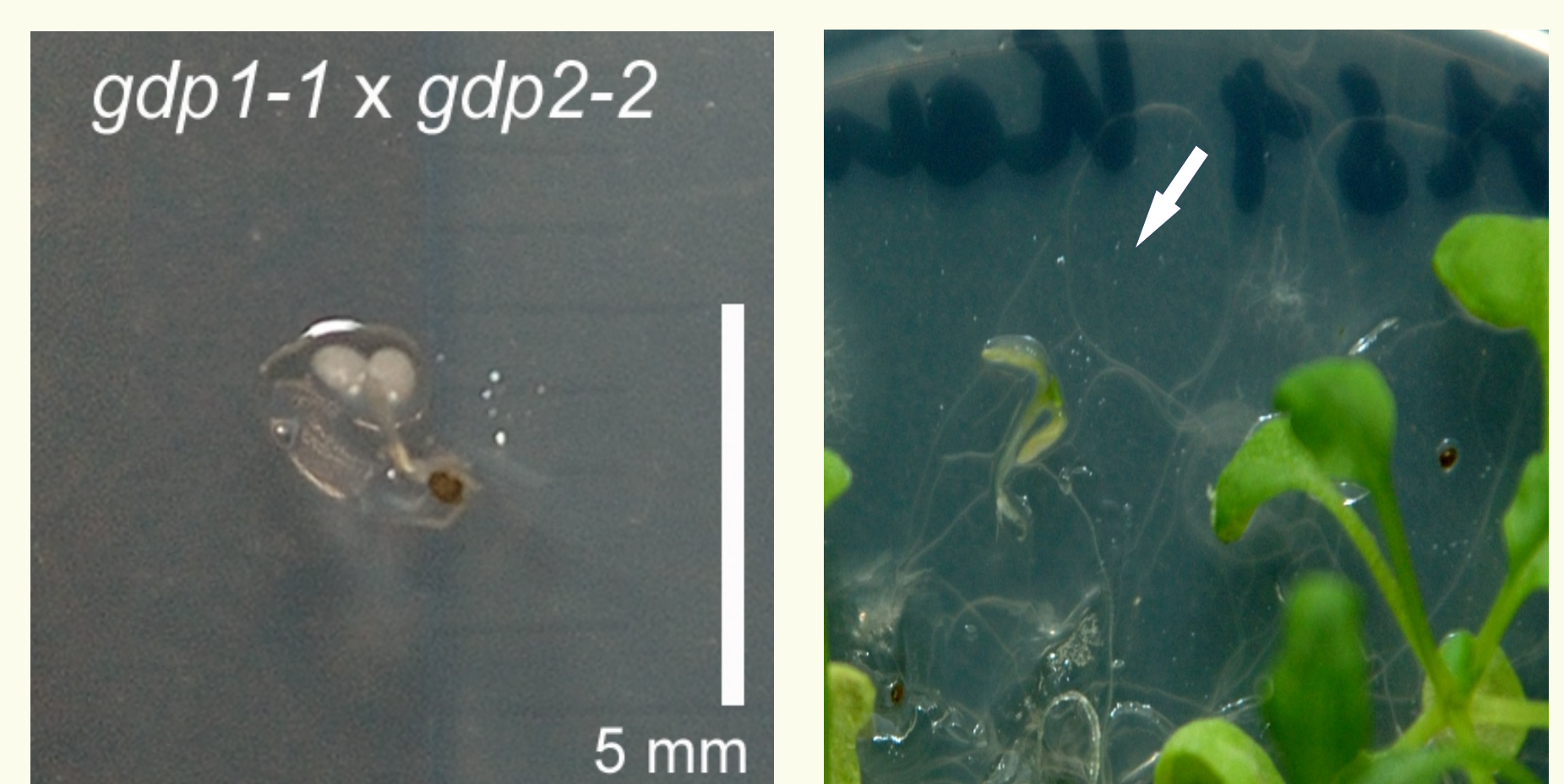
Unter ambienten CO₂-Bedingungen konnten keine Doppelmutanten erzeugt werden. Die zur Analyse verwendeten Mutanten waren homozygot für die *gdp1-1*- und heterozygot für *gdp2-2*-Insertion. Morphologisch gab es keinen Unterschied zum Phänotyp. Auch ein embryoletaler Effekt konnte nicht gezeigt werden.



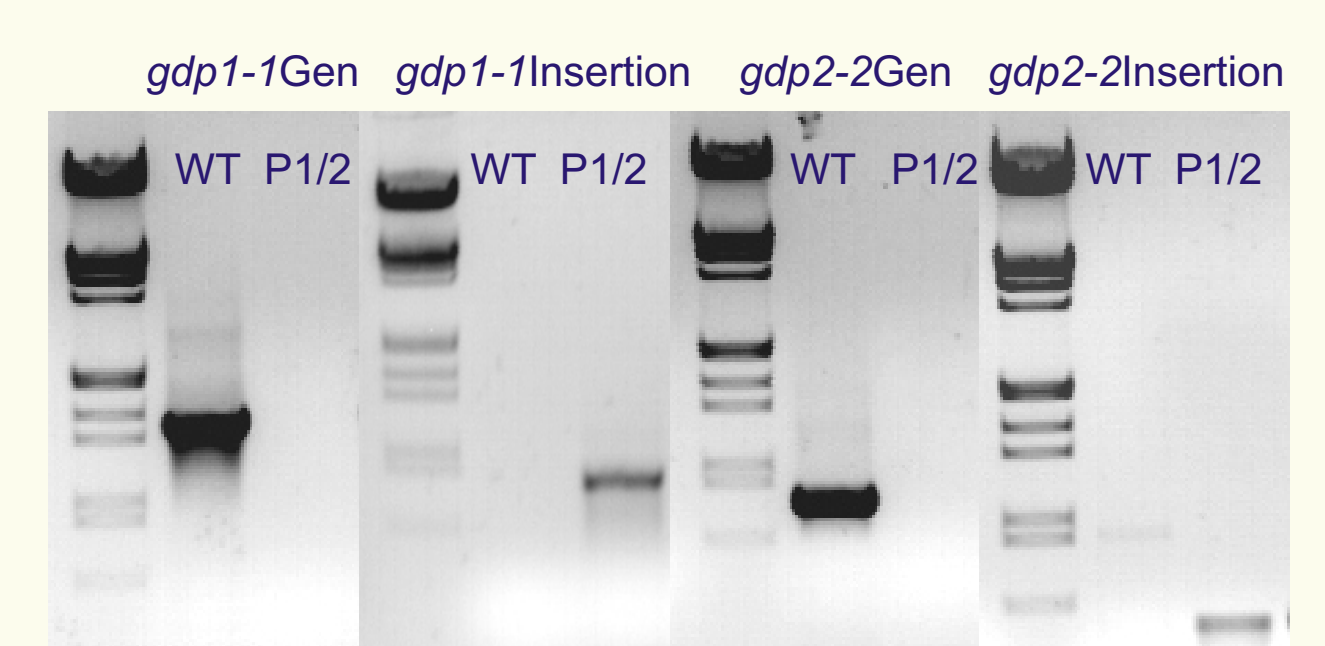
Western Blot zum Nachweis des P-Proteins

+ 2% CO₂

Unter 2% CO₂ konnte eine homozygote Doppelmutante isoliert werden.



Die P-Protein-Doppelmutante konnte nur unter 2% CO₂ und reduzierten Lichtverhältnissen erzeugt werden. So wuchs die Doppelmutante bevorzugt unter Beschattung größerer Pflanzen. Morphologisch fiel die Mutante durch die weißen Blätter und ihr stark retardiertes Wachstum auf. Im Vierblattstadium stirbt die Doppelmutante ab.



Nachweis der Zygote in den *gdp1-1* x *gdp2-2*-Mutanten (WT=Wildtyp; P1/2= *gdp1-1* x *gdp2-2*-Mutante)