

Kurzzusammenfassung und Abstract

Kurzzusammenfassung

2-Hydroxysäuren bestehen aus einer Carboxylgruppe und einer Hydroxylgruppe an ihrem α -Kohlenstoffatom. Zu dieser Stoffklasse gehören beispielsweise Glykolat, Laktat und 2-Hydroxyglutarat. Diese Metabolite sind an den verschiedensten pflanzlichen Stoffwechselwegen beteiligt. Ihre Verstoffwechslung erfolgt häufig über ihre Ketosäuren, zu denen sie durch entsprechende Flavin-abhängige Oxidasen oder Dehydrogenasen oxidiert werden. Eine der wichtigsten 2-Hydroxysäureoxidasen ist die Glykolatoxidase (GOX). Sie oxidiert Glykolat im Rahmen der Photorespiration zu Glyoxylat. Die Photorespiration spielt, insbesondere für C_3 -Pflanzen, eine wichtige Rolle, weil sie 2-Phosphoglykolat, das durch die Oxygenasereaktion der RuBisCO produziert wird, zu 3-Phosphoglycerat regeneriert. 3-Phosphoglycerat ist ein wesentliches Molekül des Calvin-Zyklus und kann daher im Anschluss an seine Regenerierung in diesen zurückgeführt werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasst die weiterführende Analyse, der kürzlich in Pflanzen entdeckten D-2-Hydroxyglutaratdehydrogenase (D-2HGDH) sowie die Charakterisierung der Glykolatoxidase-Familie in *A. thaliana*. Die in dieser Arbeit erworbenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die D-2HGDH in Prozesse der natürlichen Seneszenz involviert ist und sehr wahrscheinlich eine Rolle während des Lysin-Katabolismus spielt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in der photorespiratorischen Mutante *shm1-1*, die einen Defekt in der Serin-Hydroxymethyltransferase aufweist, D-2HG, das Substrat der D-2HGDH akkumuliert, nachdem die Mutante von erhöhten zu normalen CO_2 -Konzentrationen transferiert wurde. Parallel dazu wurde eine Akkumulation von Glycin und 2-Oxoglutarat (2OG) beobachtet. Eine denkbare Erklärung für die Akkumulation von 2HG ist, dass die D-2HGDH von 2OG inhibiert wird, da diese Inhibition am rekombinanten Enzym *in vitro* gezeigt werden konnte. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass D-2HG aufgrund von Seneszenz akkumuliert, die in diesen Pflanzen möglicherweise bereits nach dem Transfer in normale Bedingungen einsetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Verbindung zwischen der Photorespiration und zellulären Prozessen besteht, bei denen D-2HG eine Rolle spielt.

Die Evolution von GOX und GOX-ähnlichen Enzymen führte zur Entwicklung von zwei Unterfamilien innerhalb der GOX Familie, den GOX und den HAOX (Hydroxysäureoxidasen), die durch eine Genduplikation nach der Abspaltung von den Algen erfolgt sein muss. Eine solche Genduplikation ist unabhängig von den Pflanzen

auch im Tierreich erfolgt. In Pflanzen fanden neben der Aufspaltung in die zwei Unterfamilien auch zahlreiche Art-spezifische Genduplikationen statt. Sehr wahrscheinlich führte eine weitere Genduplikation zur Evolution eines speziellen GOX-ähnlichen Enzyms, der GOX3. *Arabidopsis* ist jedoch die einzige Gattung, die dieses Gen nicht nachträglich wieder verloren hat. Die biochemische Charakterisierung der gesamten GOX-Familie in *A. thaliana* konnte zeigen, dass die beiden photorespiratorischen Isoformen, AtGOX1 und AtGOX2, sehr ähnliche biochemische Eigenschaften besitzen, wie die bereits gut beschriebene GOX aus Spinat. Im Vergleich zu diesen Enzymen hat AtGOX3 eine geringere Substratspezifität, weil sie Glykolat und L-Laktat ähnlich effektiv als Substrat nutzen kann. Die weiter entfernt verwandten AtHAOX besitzen ein noch breiteres Substratspektrum und favorisieren mittel- und langkettige 2-Hydroxysäuren sowie Leucinsäure. Jedoch weisen sie auch zueinander unterschiedliche Substratpräferenzen auf, was darauf hindeutet, dass sie wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen in der Pflanze ausführen. Die Analyse von verschiedenen Seneszenzarten deutet darauf hin, dass AtGOX3 eine Rolle während der Seneszenz spielt. Es konnte eine Hypothese entwickelt werden, die vorschlägt, dass AtGOX3 während Seneszenz an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sein könnte, wobei sie dazu H₂O₂ als Signalmolekül generieren würde.

Abstract

2-Hydroxy acids consist of a carboxyl group and a hydroxyl group at their alpha carbon. Important 2-hydroxy acids in plant metabolism are glycolate, lactate and 2-hydroxyglutarate. These molecules are involved in different metabolic pathways and converted into their corresponding keto acids by 2-hydroxy acid oxidases or dehydrogenases. These enzymes are usually flavin dependent. One of the most prominent 2-hydroxy acid oxidases is glycolate oxidase (GOX), as it is involved in photorespiration. Photorespiration is a very important pathway, especially for C₃-plants, because it regenerates 2-phosphoglycolate produced by the oxygenation reaction of RuBisCO to 3-phosphoglycerate, a Calvin-Benson cycle molecule.

The aim of this work was the extended analysis of the recently described plant D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (D-2HGDH) and the characterization of the *A. thaliana* glycolate oxidase family. The results suggested that AtD-2HGDH is involved in developmental senescence and participates in lysine catabolism. Furthermore, the substrate of AtD-2HGDH, D-2HG, accumulated in the photorespiratory *shm1-1* mutant after this mutant was shifted from elevated to ambient CO₂

conditions, concomitantly with glycine and 2-oxoglutarate (2OG). The high accumulation of D-2HG in *shm1-1* may be a consequence of a direct negative metabolic feedback by its product, 2-OG, as 2OG competitively inhibits the recombinant enzyme *in vitro*. However it cannot be ruled out that D-2HG may also accumulate due to an active senescence program that is initiated in these plants after transfer to photorespiratory conditions. These findings link cellular processes involving D-2HG to photorespiration.

The evolution of GOX and GOX-like enzymes in plants resulted in the evolution of a GOX and a HAOX subfamily due to an early gene duplication after the split from algae. Independently, a similar gene duplication occurred within the animals. The evolution in plants led to many lineage specific gene duplications. *Arabidopsis* is the only known genus that kept AtGOX3, a special isoform of the GOX-like proteins. The biochemical characterization revealed that the photorespiratory isoforms, AtGOX1 and AtGOX2, have highly similar kinetic properties compared to the well described spinach enzyme. AtGOX3 is less substrate specific and uses L-lactate as effective as glycolate. The more distantly related AtHAOX1 and AtHAOX2 display a broader substrate spectrum including medium- and long-chain 2-hydroxy acids and leucic acid. This suggests that both enzymes would have different functions *in vivo*. It is hypothesized that AtGOX3 would produce H₂O₂ as signalling molecule during senescence.