

**Auswirkungen der Reduzierung einer
regulatorischen Untereinheit des SnRK1-Proteins in
Arabidopsis thaliana.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Martin Gänsheimer

München, 11. August 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Geigenberger
Zweitgutachter: PD Dr. Tatjana Kleine
Datum des Rigorosums: 18.11.20016

Zusammenfassung

Die Anpassung an biotische und abiotische Stressfaktoren ist für Pflanzen als sessile Organismen lebenswichtig. Um diese zu gewährleisten, haben Pflanzen verschiedenste Mechanismen entwickelt. Das Verständnis dieser Mechanismen ist essentiell um auch in Zukunft Pflanzen züchten zu können, die sich an die sich verändernden Klima- und Umweltbedingungen adaptieren können. Auf metabolischer Ebene spielt das SnRK1-Protein („Sucrose-non-fermenting related Protein Kinase 1“) eine wichtige Rolle bei diesen Anpassungen. Von Vergleichen mit den homologen Proteinen in Säugern (AMPK; „AMP activated Protein Kinase“) und Hefen (SNF1; „Sucrose non fermenting 1“) ist bekannt, dass diese Proteine auf Energiemangel, der eine der Folgen von Stress ist, reagieren. Dabei lösen sie eine Signalkaskade aus, die energiesparende, katabole Prozesse induziert und zugleich den Anabolismus inhibiert. In Pflanzen sind die Funktion und die Regulation des SnRK1-Trimers weniger gut verstanden. Daher wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der Reduktion einer regulatorischen Untereinheit (AKIN $\beta\gamma$) des SnRK1-Komplexes in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen untersucht. Dazu wurde diese mit Hilfe eines artifiziellen MicroRNA Konstruktes sowohl transkriptionell als auch auf Proteinebene auf ungefähr ein Drittel des Kontrolllevels verringert. Ein komplettes Ausschalten war auf Grund der essentiellen Natur des SnRK1-Proteins nicht möglich.

Es zeigte sich, dass diese Verringerung im AKIN $\beta\gamma$ -Level zu einer verzögerten Entwicklung und einem geringeren Wachstum sowohl hinsichtlich der Wurzel als auch des Frischgewichts in den untersuchten Keimlingen führte. Dieser Phänotyp verstärkte sich unter Niedriglicht-Bedingungen ($10 \mu\text{mol Photonenfluss m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und konnte auch durch die Zugabe von Zucker ins Anzuchtmedium nicht verändert werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass auch die Überlebensrate in Keimlingen mit AKIN $\beta\gamma$ -Defizit abnimmt. Unter Licht-limitierenden Bedingungen verschlechterte sich diese sogar deutlich. Überraschenderweise war der Energiegehalt nicht betroffen. Eine metabolische Analyse zeigte neben verringerten Metabolit-Gehalten im Saccharose-Stoffwechsel, die besonders bei den Hexosephosphaten deutlich wurden, ein erniedrigtes C/N-Verhältnis durch die Akkumulation von Aminosäuren. Des Weiteren führte das AKIN $\beta\gamma$ -Defizit zu einer Hemmung des TCA-Zyklus und zu einer verringerten Atmungsrate. Auch die photosynthetische Leistung wird dadurch negativ beeinflusst, da die Quanteneffizienz des Photosystems II sinkt und die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (Quenching), also der Verlust von absorbierter Lichtenergie in Form von Wärme, steigt. Als Erklärung für diese Auswirkungen wird hauptsächlich eine konstitutiv aktive Pathogenantwort vermutet, die sich in der Anhäufung der Abwehrmetabolite Homoprolin und Salizylsäure manifestiert.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die T-Loop Phosphorylierung der α -Untereinheit des SnRK1-Komplexes, ein Maß für die Kinase-Aktivität dessen, als Antwort auf Saccharose im Wachstumsmedium verringert und als Antwort auf Glukose im Wachstumsmedium erhöht. Dadurch konnte ein Beitrag zur andauernden Diskussion in der Fachliteratur über die Wirkung verschiedener Zucker auf den SnRK1-Komplex geleistet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Verständnis der Rolle des SnRK1-Komplexes in der Entwicklung und im Stoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* in Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen. Da nicht wie in vielen anderen Studien eine der katalytischen Untereinheiten sondern eine regulatorischen Untereinheit in ihrer Abundanz verändert wurde, konnten neue Zusammenhänge aufgedeckt werden. Speziell die Verbindung des SnRK1-Komplexes zum Salizylsäure-Gehalt und damit zur Pathogenabwehr ermöglicht neue Herangehensweisen und Interpretationsmöglichkeiten in der Erforschung der SnRK1-Signaltransduktion.

Summary

Plants are sessile organisms and therefore they have to adjust to biotic and abiotic stresses. To be able to properly respond to different stress conditions plants have developed several strategies. Understanding how these strategies work is crucial for the breeding and engineering of new plant species that are able to sustain the challenges of climate change. With respect to metabolism the SnRK1-protein (Sucrose-non-fermenting related Protein Kinase 1) is an important part of stress signaling and adaptation. It is known from the mammalian homologue AMPK (AMP activated Protein Kinase) and the yeast SNF1 (Sucrose non fermenting 1) that members of this protein family react to energy limitation caused for example by stress by turning down energy-consuming anabolic pathways and up-regulating energy-producing catabolic pathways. In the plant system the SnRK1-trimer, its function and regulation are less well characterized. Therefore this study investigates the consequences of the down-regulation of a SnRK1 regulatory subunit (AKIN $\beta\gamma$) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. This was done by artificial microRNA induced silencing of the AKIN $\beta\gamma$, because knock-outs of SnRK1 are not viable. With the help of this technique it was possible to down-regulate the RNA and protein level of AKIN $\beta\gamma$ to about 30% of wildtype level.

Seedlings with reduced an AKIN $\beta\gamma$ level showed a delayed development, reduced root growth and reduced fresh weight. Under low light conditions (10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) this phenotype was more severe. It was not possible to rescue this phenotype by the addition of sugars (sucrose or glucose) to the growth medium. Additionally it was observed that a reduced AKIN $\beta\gamma$ content leads to a decreased survival rate of the seedlings specifically under low light conditions. Surprisingly the energy level of the AKIN $\beta\gamma$ deficient seedlings was not significantly changed. Metabolomic analyses of these seedlings showed several alterations: Metabolites involved in the sucrose metabolism, especially hexose phosphates, were decreased, amino acids accumulated leading to a decrease in the C/N balance and there were changes in the levels of tricarboxylic acid cycle intermediates. In addition respiration rate was lowered and photosynthetic efficiency was decreased by means of decreased photosystem II (PSII) quantum yield and increased non-photochemical quenching of light energy. The main reason for most of these alterations was seen in a constitutive active pathogen defense response indicated by elevated homoproline and salicylic acid contents.

Furthermore it could be shown that T-loop phosphorylation of a SnRK1 α -subunit, a measurement of SnRK1 kinase activity, was decreased by the addition of sucrose to wildtype plants via the growth medium and increased by the addition of glucose. This contributes to the still ongoing debate in literature about the role of different sugars in (de-)activating SnRK1 kinase activity.

The results of this work extend our knowledge in the role of the SnRK1 complex with respect to seedling development and metabolism under different conditions in *Arabidopsis thaliana*. As the experiments were performed using plants deficient in a regulatory rather than a catalytic subunit, as done

in several other studies, some new branches to the complex SnRK1 regulatory network could be added. Especially the connection to pathogen defense via salicylic acid opens new and interesting perspectives.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGEN	X
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die AMPK/SNF/SnRK1-Protein Familie	1
1.1.1 Die α -Untereinheit.....	2
1.1.2 Die β -Untereinheit.....	2
1.1.3 Die γ -Untereinheit	3
1.1.4 Homologe in anderen Reichen - Der SNF1-Komplex in Hefe	4
1.1.5 Homologe in anderen Reichen - Der AMPK-Komplex in tierischen Zellen	5
1.1.6 Funktionen und Regulation des SnRK1-Komplexes.....	7
1.1.7 Ziele dieser Arbeit.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Chemikalien und Enzyme	13
2.1.1 Chemikalien.....	13
2.1.2 Enzyme und Metabolite.....	13
2.1.3 Kits	13
2.1.4 Antikörper.....	13
2.2 Pflanzenanzucht und verwendete Linien	14
2.2.1 Linien.....	14
2.2.2 Anzucht auf Erde.....	14
2.2.3 Anzucht in Sterilkultur.....	14
2.2.4 Anzucht im hydroponischen System	15
2.3 Induktionssysteme	16
2.3.1 Induktion in Sterilkultur	16
2.3.2 Induktion auf Erde.....	16
2.3.3 Induktion im hydroponischen System.....	16
2.4 Nachweis der Wirksamkeit des amiR-SNF4 Konstrukts	16
2.4.1 RNA-Extraktion.....	17
2.4.2 Reverse Transkription	17
2.4.3 Quantitative real time PCR	17
2.5 Western Blots	18
2.5.1 Proteinextraktion und SDS-Gelelektrophorese	18
2.5.2 Proteintransfer und Immunodekoration	19
2.5.3 Immunpräzipitation und Überprüfung der T-Loop Phosphorylierung von AKIN10	19
2.6 Überprüfung der snf4-Linie.....	20
2.6.1 DNA-Extraktion	20
2.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	20
2.7 Messungen von Enzymaktivitäten	21
2.7.1 Nitrate Reduktase	21
2.7.2 Saccharose Phosphat Synthase.....	21
2.7.3 Saccharose Synthase	23
2.7.4 Hexokinase	23

2.7.5 Alanin Aminotransferase	24
2.8 Entwicklungsexperimente und Messung physiologischer Parameter	24
2.8.1 Beschreibung der Entwicklung	24
2.8.2 Wurzellängenmessung	25
2.8.3 Keimungsrate	25
2.8.4 Überlebensrate	25
2.8.5 Frischgewichtsbestimmung	26
2.9 Metabolitmessung	26
2.9.1 Stärkemessung	26
2.9.2 Zuckermessung	27
2.9.3 Messung der Purin-Nukleotide ATP, ADP und AMP	28
2.9.4 Metabolitprofil via GC-TOF-MS	29
2.9.5 Metabolitprofil via LC-MS/MS	30
2.10 Chlorophyllfluoreszenzmessung	31
2.11 Atmungsmessung	31
3. ERGEBNISSE	33
3.1 Überprüfung einer unbekanntes T-DNA Insertionslinie für AKIN $\beta\gamma$	33
3.2 Überprüfung der Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes	34
3.2.1 Induktion in Sterilkultur	34
3.2.2 Andere Induktionssysteme	35
3.3 T-Loop Phosphorylierung	35
3.3.1 Antwort der T-Loop Phosphorylierung auf verschiedene Zucker im Licht	36
3.3.2 Antwort der T-Loop Phosphorylierung auf verschiedene Zucker im Dunkeln	37
3.4 Phänotypische Analyse	38
3.4.1 Keimlingsentwicklung bei verschiedenen Lichtintensitäten mit und ohne Zucker im Medium	40
3.4.2 Keimungsrate	44
3.4.3 Frischgewicht	45
3.4.4 Entwicklung der Wurzel	47
3.4.5 Überlebensrate bei niedrigen Lichtintensitäten	50
3.5 Metabolische Analyse	52
3.5.1 Auswirkungen der AKIN $\beta\gamma$ -Reduzierung auf Zucker und Stärke	53
3.5.2 Auswirkungen der AKIN $\beta\gamma$ -Reduzierung auf den Energiegehalt	55
3.5.3 Metabolitprofil bei normalem Wachstumslicht (50 μ E)	58
3.5.4 Metabolitprofil bei niedriger Lichtintensität	65
3.6 Auswirkungen auf Enzymaktivitäten	73
3.6.1 Nitrat Reduktase	73
3.6.2 Saccharose Phosphat Synthase	74
3.6.3 Weitere Enzyme	75
3.7 Auswirkungen auf die Photosynthese	76
3.7.1 Integrität des photosynthetischen Apparates	77
3.7.2 Photosynthetische Leistung	78
3.8 Auswirkungen auf die Atmung	82
4. DISKUSSION	84
4.1 Erfolgreiche Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes in Sterilkultur	84
4.2 Schwache Änderung in der T-Loop Phosphorylierung durch amiR-SNF4	84
4.3 Reduzierter AKIN $\beta\gamma$ -Gehalt verursacht Entwicklungsverzögerungen, verringerte Wachstumsraten und verringerte Überlebensraten bei limitierenden Lichtbedingungen	86
4.4 AKIN $\beta\gamma$ -Defizit hat keine signifikanten Auswirkungen auf Kohlenstoff- und Energiegehalt	89
4.5 Änderungen im Stoffwechsel in den amiR-SNF4 Keimlingen	91
4.5.1 AKIN $\beta\gamma$ -Defizit führt zu verringerten Metabolit-Gehalten im Saccharose-Stoffwechsel	91

<i>4.5.2 Akkumulation von Aminosäuren und erniedrigtes C/N-Verhältnis bei verringertem AKIN$\beta$$\gamma$-Gehalt besonders nach Saccharose-Fütterung</i>	94
<i>4.5.3 Hemmung des TCA-Zyklus und verringerte Atmungsraten durch AKIN$\beta$$\gamma$-Defizit</i>	95
<i>4.5.4 AKIN$\beta$$\gamma$-Defizit führt zu erhöhten Gehalten an SA und Homoprolin, die an der konstitutive Pathogenabwehr beteiligt sind</i>	97
<i>4.5.5 Schlechtere Umsetzung der Metabolite in Wachstum durch AKIN$\beta$$\gamma$-Defizit?</i>	100
4.6 Verringerung der Photosynthese-Effizienz durch AKIN$\beta$$\gamma$-Defizit	101
4.7 Fazit und Ausblick	102
5. LITERATURVERZEICHNIS	104
6. ANHANG	113
6.1 Metabolitprofile	113
6.2 Änderungen im Stoffwechsel	118
DANKSAGUNGEN	120
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	121

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Das SnRK1 Heterotrimer	1
Abb.2: Die Untereinheiten des SnRK1 Komplexes	2
Abb.3: Regulation und Funktion des SnRK1-Komplexes.....	8
Abb.4: Das hydroponische System	15
Abb.5: Reaktionsschema Stärkemessung	27
Abb.6: Reaktionsschema Zuckermessung.....	28
Abb.7: Überprüfung von SALK_205800c (<i>snf4</i>).....	33
Abb.8: Nachweis der Induktion in 7 Tage alten <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen nach Zugabe von 10 μ M β -Estradiol	34
Abb.9: T-Loop Phosphorylierung in 7 Tage alten <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	35
Abb.10: T-Loop Phosphorylierung nach Anzucht auf zuckerhaltigem Medium in <i>Arabidopsis</i> Keimlingen	36
Abb.11: T-Loop Phosphorylierung in <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen im Dunkeln.....	38
Abb.12: Phänotyp von amiR-SNF4 Keimlingen im Langtag	39
Abb.13: Phänotyp von amiR-SNF4 Keimlingen im Kurztag.....	39
Abb.14: Phänotyp von amiR-SNF4 Keimlingen nach Wachstum auf Laborbank.....	40
Abb.15: Entwicklung von amiR-SNF4 Keimlingen bei verschiedenen Lichtintensitäten	41
Abb.16: Entwicklung von amiR-SNF4 Keimlingen bei Anzucht auf Saccharose-haltigem Medium ..	42
Abb.17: Entwicklung von amiR-SNF4 Keimlingen bei Anzucht auf Glukose-haltigem Medium	43
Abb.18: Keimungsrate in der amiR-SNF4 Linie unter verschiedenen Bedingungen	45
Abb.19: Frischgewichte der amiR-SNF4 Keimlinge unter verschiedenen Bedingungen	46
Abb.20: Wurzellängen von amiR-SNF4 Keimlingen unter verschiedenen Bedingungen	48
Abb.21: Überlebensrate von amiR-SNF4 Keimlingen bei verschiedenen Lichtintensitäten	51
Abb.22: Zucker- und Stärke-Gehalt von amiR-SNF4 Keimlingen im Langtag.....	53
Abb.23: Zucker- und Stärke-Gehalt von amiR-SNF4 Keimlingen im Kurztag.....	54
Abb.24: Energiegehalt von amiR-SNF4 Keimlingen im Langtag	56
Abb.25: Energiegehalt von amiR-SNF4 Keimlingen im Kurztag.....	57
Abb.26: Redox-Äquivalente von amiR-SNF4 Keimlingen.....	58
Abb.27: Zucker-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E	59
Abb.28: Aminosäure-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E.....	60
Abb.29: Zuckeralkohol-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E	62
Abb.30: Gehalte an Organische Säuren von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E.....	63
Abb.31: Zuckerphosphat-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E.....	64
Abb.32: Zucker-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E	66
Abb.33: Aminosäure-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E.....	67
Abb.34: Gehalt an Zuckeralkoholen von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E.....	69
Abb.35: Gehalt an Organische Säuren von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E.....	71
Abb.36: Zuckerphosphate-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E.....	72
Abb.37: Nitrat Reduktase Aktivität von amiR-SNF4 Keimlingen.....	74
Abb.38: Saccharose Phosphate Synthase Aktivität von amiR-SNF4 Keimlingen	75
Abb.39: Aktivität weiterer Enzyme in amiR-SNF4 Keimlingen	76
Abb.40: Abundanz ausgewählter Proteine des photo-synthetischen Apparates in amiR-SNF4 Keimlingen	77
Abb.41: Chlorophyllfluoreszenzmessung in amiR-SNF4 Keimlingen	78
Abb.42: Induktionskurve und Regeneration der Chlorophyllfluoreszenz in amiR-SNF4 Pflanzen	81
Abb.43: Analyse der Atmung in amiR-SNF4 Keimlingen	82
Abb.44: Übersicht der metabolomischen Änderungen in der amiR-SNF4 Linie.....	93

Abb.45: Induktion der SA Synthese in induzierten amiR-SNF4 Keimlingen..... 98

Abkürzungen

μE	μmol Photonenfluss m ⁻² s ⁻¹	mg	Milligramm
μl	Microliter	ml	Milliliter
ABA	Abscisinsäure	mm	Millimeter
ABI	ABA-insensitiv	mM	Millimol
ADP	Adenosindiphosphat	MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
AGPase	ADP-Glukose Pyrophosphorylase	mTOR	mechanistic/mammalian target of rapamycin
AMP	Adenosinmonophosphat	NAD(P)H	Nicotinamidadenin-dinukleotid(phosphate)
AMPK	AMP aktivierte Protein Kinase	N-,NEDA	N-Naphtyl Ethylendiamin
ASC	Assoziiert mit dem <u>SNF-K</u> omplex	NO	Nicht reguliertes nicht-photochemisches Quenching
ATP	Adenosintriphosphat	NPQ	Reguliertes nicht-photochemisches Quenching
BSA	Bovine Serum-Albumine	NR	Nitrat Reduktase
CBS	Cystathionin <u>beta-S</u> ynthase	OD	Optische Dichte
cm	Centimeter	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser	PIC	Proteinaseinhibitor-Cocktail
DMSO	Dimethylsulfoxid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTPs	desoxy-Nukleotidtriphosphate	PP2C	Protein Phosphatase
DTT	Dithiothreitol	PSII	Photosystem II
ECL	Enhanced chemiluminescence	PVDF	Polyvinylidenfluorid
EtOH	Ethanol	ROS	Reactive Oxygen Species
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	RT	Raumtemperatur (22°C)
FG	Frischgewicht	SA	Salizylsäure
GABA	γ-Aminobuttersäure	SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Natriumlaurylsulfat)
GBD	Glykogen Bindedomäne	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
GRIK	Geminivirus-Rep-interacting Kinases	Ser	Serin
G1P	Glukose-1-Phosphat	SF	Standardfehler
G6P	Glukose-6-Phosphat	SKIN	SnRK1 interacting negative regulators
G6PDH	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase	SNF1	Sucrose non fermenting 1
h	Stunde	SnRK1	Sucrose-non-fermenting related Protein Kinase 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	SPS	Saccharose Phosphat Synthase
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)	SUS	Saccharose Synthase
LKB1	Leber-Kinase B1		
MES	2-(N-Morpholino)ethan-sulfonsäure		
MeOH	Methanol		
mA	Milliampere		

TBS(T)	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (plus Tween)
Thr	Threonin
T6P	Trehalose-6-Phosphat
U(Units)	Units in $\mu\text{mol Substrat min}^{-1}$
UpM	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Pflanzen sind sessile und autotrophe Organismen. Diese Tatsache hat weitreichende Konsequenzen für verschiedenste Aspekte des pflanzlichen Lebens. Von der Fortpflanzung über die Verteidigung gegen Fressfeinde und Pathogene bis hin zur Anpassung an unterschiedlichste Umweltbedingungen müssen Pflanzen ihre Strategien dahingehend optimieren, dass sie, ohne einen potentiell nachteiligen Standort verlassen zu können, überleben und möglichst viele Samen produzieren. Fast alle Stressfaktoren führen aber zu Wachstumseinschränkungen, die negative Auswirkungen auf die Samenproduktion und den Ertrag haben. Wenn sich zum Beispiel die Umweltbedingungen (z.B. Sonneneinstrahlung, Verfügbarkeit von Wasser) ändern und die Pflanze nicht in adäquater Weise reagiert, kann das zu einem Energiemangel und zu Wachstumseinschränkungen führen (Buchanan et al., 2006). Für diese Reaktion ist eine gut ausgebildete Signalperzeption und -transduktion essentiell. Ein in diesem Zusammenhang wichtiger Signalweg wird von der Sucrose-non-fermenting related Protein Kinase 1 (SnRK1) reguliert (Polge and Thomas, 2007; Robaglia et al., 2012).

1.1 Die AMPK/SNF/SnRK1-Protein Familie

Der SnRK1-Komplex ist Bestandteil einer konservierten Proteinfamilie, deren Mitglieder in fast allen Eukaryoten zu finden sind (Polge and Thomas, 2007). Die einzige derzeit beschriebene Ausnahme betrifft einen obligat intrazellulär lebenden Parasiten mit dem Namen *Encephalitozoon cuniculi*, der allerdings ein sehr stark reduziertes Genom aufweist (Miranda-Saavedra et al., 2007). Am bekanntesten und besten untersucht sind die Sucrose-non-fermenting (SNF1) Kinase in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Säugetieren. Diese Kinasen reagieren auf den Energiezustand der Zelle. Bei Energiemangel inhibieren sie ATP-verbrauchende, anabole Prozesse und aktivieren gleichzeitig ATP-produzierende, katabole Prozesse (Hardie et al., 2012). In *Arabidopsis thaliana* gibt es drei SnRK Familien (SnRK1, SnRK2 und SnRK3), wobei SnRK1 näher verwandt ist zu SNF1 und AMPK als zu den anderen beiden SnRK-Familien (Baena-Gonzalez et al., 2007). Mitglieder der SnRK2 Familie werden mit hyperosmotischem Stress und ABA-Signaling in Verbindungen gebracht (Ding et al., 2015; Hartmann et al., 2015), Mitglieder der SnRK3 Familie mit Kalzium-Signaling (Wang et al., 2015). Grundsätzlich sind SnRK1 Proteine Heterotrimerer (siehe Abb.1). Die einzelnen Untereinheiten werden im Folgenden genauer vorgestellt.

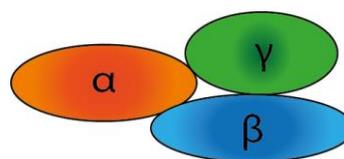


Abb.1: Das SnRK1 Heterotrimer
Schematische Zeichnung des SnRK1-Komplexes mit einer α -Untereinheit (rot), einer β -Untereinheit (blau) und γ -Untereinheit (grün).

1.1.1 Die α -Untereinheit

Die α -Untereinheit des SnRK1-Komplexes ist die katalytisch aktive Untereinheit (Mackintosh et al., 1992). Sie überträgt eine Phosphat-Gruppe von ATP auf ein Zielprotein. In *Arabidopsis thaliana* gibt es drei Isoformen: AKIN10 (At3g01090), AKIN11 (At3g29160) und AKIN12 (At5g39440). *AKIN12* wird nur sehr schwach exprimiert (Baena-Gonzalez et al., 2007; Bitrian et al., 2011). Die beiden anderen Isoformen werden hingegen ubiquitär exprimiert, wobei *AKIN10* den größeren Anteil ausmacht (Jossier et al., 2009; Williams et al., 2014). Hinsichtlich ihrer Struktur lassen sich die α -Untereinheiten in zwei Domänen einteilen (siehe Abb.2), die ihrerseits wiederum mehrere Sub-Domänen enthalten (Crozet et al., 2014). In der Kinase-Domäne findet sich neben einer Sequenz, die typisch ist für Ser/Thr Kinasen ist, auch der sogenannte Aktivierungs- oder T-Loop. Innerhalb dieser Aminosäuresequenz befindet sich ein konservierter Threonin-Rest, welcher phosphoryliert sein muss, damit der SnRK1 Komplex aktiv sein kann (Sugden et al., 1999a). Bislang sind nur GRIK1 und GRIK2 (Geminivirus-Rep-Interacting Kinases) als vorgeschaltete Kinasen identifiziert worden (Crozet et al., 2010; Shen et al., 2009). Allerdings sind diese nur unter bestimmten Bedingungen beziehungsweise nicht in allen Geweben aktiv, daher ist die genaue Regulation der T-Loop Phosphorylierung noch unklar. Besser charakterisiert sind die für die Dephosphorylierung nötigen Phosphatasen. Es wurden zwei Protein Phosphatasen 2C (PP2C) aus der Klade A gefunden, PP2CA und ABI (Rodrigues et al., 2013), sowie PP2C74 in einer weiteren Studie (Tsugama et al., 2012). Erstere werden durch Abscisinsäure (ABA) gehemmt. Dies führt zu einer Aktivierung des SnRK1 Komplexes und verknüpft somit das SnRK1 Signaling mit dem ABA Signaling. PP2C74 ist eine Protein Phosphatase 2C, von der gezeigt wurde, dass sie myristoyliert werden kann und mit AKIN10 interagiert (Tsugama et al., 2012). Allerdings wurde keine direkte Dephosphorylierung von AKIN10 nachgewiesen. Deshalb bleibt abzuwarten, ob PP2C74 einen direkten Einfluss auf die SnRK1 Aktivität hat.

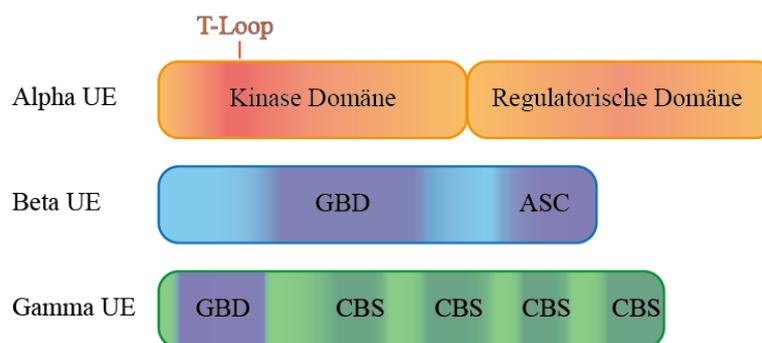


Abb.2: Die Untereinheiten des SnRK1 Komplexes

Schematische Zeichnung der wichtigsten Domänen der einzelnen Untereinheiten des SnRK1-Komplexes, wobei die Länge der farbigen Segmente proportional zu ihrer tatsächlichen Größe im Komplex ist. Dargestellt sind eine typische α -Untereinheit (AKIN10/11) in Rot, eine typische β -Untereinheit (AKIN β 1/2) in Blau und die funktionelle γ -Untereinheit AKIN β 3 in Grün. Die Erklärung zur Funktion der einzelnen Domänen sind dem Fließtext zu entnehmen. GBD: Glycogen binding domain; ASC: associated with the Snf complex; CBS: Cystathionine beta-synthase.

1.1.2 Die β -Untereinheit

Die β -Untereinheit des SnRK1-Komplexes hat regulatorische Funktionen (Polge et al., 2008). Sie wird mit der subzellulären Lokalisation und der Substratspezifität des Komplexes in Verbindung

gebracht (Jiang and Carlson, 1997; Vincent et al., 2001). In *Arabidopsis thaliana* gibt es drei Isoformen: AKIN β 1 (At5g21170), AKIN β 2 (At4g16360) und AKIN β 3 (At2g28060). Sie werden größtenteils in allen Geweben exprimiert (Baena-Gonzalez et al., 2007), wobei zumindest immer eine der drei Isoformen präsent ist (Polge et al., 2008). AKIN β 3 ist eine pflanzenspezifische, verkürzte Isoform (Gissot et al., 2004). Ihr fehlt die N-terminale Aminosäuresequenz, welche die sogenannte „glycogen-binding-domain“ (GBD) enthält. Trotzdem ist sie in der Lage die grundsätzlichen Funktionen einer β -Untereinheit zu erfüllen und eine Hefe-Mutante, der alle drei β -Untereinheiten fehlen, zu komplementieren. Es wird vermutet, dass dies durch die ASC-Domäne („associated with the Snf complex“) gewährleistet wird (Gissot et al., 2004). Die anderen beiden β -Untereinheiten in *Arabidopsis thaliana* weisen den typischen Aufbau einer β -Untereinheit eines SnRK-Komplexes mit sowohl einer GBD-Domäne als auch einer ASC-Domäne auf (siehe Abb.2). Des Weiteren legen Vergleiche mit den β -Untereinheiten aus Hefe oder Säugerzellen nahe, dass der variable N-Terminus eine wichtige Rolle in der subzellulären Lokalisation spielt (Hedbacker and Carlson, 2006) und/oder hilft die Interaktion mit den Zielproteinen der α -Untereinheit zu gewährleisten (Polge et al., 2008). Reguliert werden die β -Untereinheiten durch verschiedene Mechanismen. Zum einen wurde Phosphorylierung im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod beschrieben, welche zu einer Inaktivierung des SnRK1-Komplexes führt (Avila et al., 2012). Zum anderen können AKIN β 1 und AKIN β 2 myristoyliert werden (Pierre et al., 2007). Die genauen Auswirkungen dieser Modifikation auf dem SnRK1-Komplex sind noch unbekannt. Des Weiteren wurde eine Regulation auf transkriptioneller Ebene durch Licht beschrieben, die AKIN β 1 und AKIN β 3 induziert, sowie eine Repression des AKIN β 1-Transkripts durch Saccharose (Polge et al., 2008).

1.1.3 Die γ -Untereinheit

Auch die γ -Untereinheit des SnRK1-Komplexes hat regulatorische Funktionen. In *Arabidopsis thaliana* gibt es zwei Isoformen, sowie eine Vielzahl von Proteinen, die eine Ähnlichkeit mit dem C-terminalen Teil dieser beiden Isoformen aufweisen (Ramon et al., 2013). Als γ -Untereinheit des SnRK1-Komplexes werden aber nur KIN γ (At3g48530) und AKIN $\beta\gamma$ (At1g09020, auch als SNF4 bekannt, beides wird in dieser Arbeit synonym verwendet) bezeichnet. Obwohl KIN $\beta\gamma$ erst nach AKIN γ als Teil des SnRK1-Komplexes identifiziert wurde (Bouly et al., 1999; Lumberras et al., 2001), ist inzwischen bekannt, dass nur diese Isoform die grundsätzlichen Funktionen einer γ -Untereinheit erfüllen kann (Ramon et al., 2013) und Teil des heterotrimeren Komplexes ist (Emanuelle et al., 2015b). Sie wird in der gesamten Entwicklung und in allen Geweben mit vorwiegend nukleärer und cytoplasmatischer Lokalisation exprimiert (Baena-Gonzalez et al., 2007; Bitrian et al., 2011; Gissot et al., 2006). Strukturell bestehen γ -Untereinheiten in allen Organismen aus einem divergenten N-Terminus und vier Wiederholungen einer sogenannten CBS-Domäne (Cystathionine beta-synthase) (siehe Abb.2). Paare dieser CBS-Domänen bilden sogenannte „Bateman“-Domänen, welche Adenosin-Nukleotide binden können (Kemp, 2004). AKIN $\beta\gamma$ besitzt zusätzlich eine GBD-Domäne (Lumberras et al., 2001) und kann somit als eine Art Hybrid-Untereinheit aus einer β - und einer γ -Untereinheit angesehen werden (siehe

Abb.2). Allerdings kann sie nur die Funktion einer γ -Untereinheit übernehmen (Ramon et al., 2013). Ansonsten ist über die Regulation der γ -Untereinheit noch relativ wenig bekannt. Es gibt sich widersprechende Berichte über die Fähigkeit der GBD-Domäne zur Bindung von langkettigen Kohlenwasserstoffen (Avila-Castaneda et al., 2014; Emanuelle et al., 2015b), ein Regulationsmechanismus, der auch in tierischen Zellen bei β -Untereinheiten diskutiert wird (Steinberg and Kemp, 2009).

1.1.4 Homologe in anderen Reichen - Der SNF1-Komplex in Hefe

Der SNF1-Komplex („Sucrose non fermenting“) in *Saccharomyces cerevisiae* wurde schon im Jahr 1981 zum ersten Mal bei der Untersuchung von Mutanten, die Probleme mit der Verwertung von Saccharose als Kohlenstoffquelle aufweisen, beschrieben (Carlson et al., 1981). Damit ist er das Mitglied der AMPK/SNF/SnRK1-Proteinfamilie, welches am längsten bekannt ist. In dieser ersten Untersuchung wurde allerdings nur die α -Untereinheit Snf1 gefunden. Der SNF1-Komplex besteht aber wie die anderen Mitglieder der Proteinfamilie aus drei Untereinheiten (Hedbacker and Carlson, 2008). In *Saccharomyces cerevisiae* sind dies neben der α -Untereinheit Snf1 drei Isoformen einer β -Untereinheit (Sip1, Sip2 und Gal83) sowie eine γ -Untereinheit (Snf4), die in den darauffolgenden Jahren identifiziert wurden (Celenza and Carlson, 1989; Erickson and Johnston, 1993; Yang et al., 1992). Auch die Funktionen der einzelnen Untereinheiten sind in den verschiedenen Reichen vergleichbar. Die α -Untereinheit Snf1 ist die katalytisch aktive Kinase. Genau wie in *Arabidopsis thaliana* muss auch in *Saccharomyces cerevisiae* ein Threonin-Rest im T-Loop phosphoryliert werden, damit die Kinase aktiv sein kann (McCartney and Schmidt, 2001). Die für diese Phosphorylierung zuständigen Kinasen sind im Gegensatz zu ihren pflanzlichen Homologen bekannt: Sak1, Elm1 und Tos3 haben überlappende Funktionen, wobei Sak1 die wichtigste dieser drei Kinasen darstellt (McCartney and Schmidt, 2001). Auch die zur Dephosphorylierung notwendige Phosphatase wurde bereits charakterisiert. Die Reg1-Glc7 Protein Phosphatase entfernt den Phosphat-Rest im T-Loop in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Glukose (Sanz et al., 2000). Von den drei β -Untereinheiten Sip1, Sip2 und Gal83 ist immer mindestens eine für einen funktionierenden SNF1-Komplex notwendig (Schmidt and McCartney, 2000). Ihre subzelluläre Lokalisation und damit auch die des zugehörigen SNF1-Komplexes unterscheidet sich je nach Verfügbarkeit von Glukose (Vincent et al., 2001). Die γ -Untereinheit Snf4 weist, wie in *Arabidopsis thaliana* auch, zwei Bateman-Domänen auf. Allerdings wurde auch hier keine direkte Aktivierung durch AMP *in vitro* beobachtet (Wilson et al., 1996). Trotzdem wird Snf4 für die Aktivität des SNF1-Komplexes benötigt (Celenza and Carlson, 1989). Es bindet an eine bestimmte Sequenz der α -Untereinheit und hebt dabei deren Autoinhibierung auf (Leech et al., 2003).

Die wichtigste und namensgebende Funktion dieses SNF1-Komplexes besteht darin, dass er Hefezellen erlaubt andere Kohlenstoffquellen als Glukose zu nutzen (z.B. Saccharose, Ethanol oder Galaktose) (Carlson, 1999). Die Expression von mehr als 400 Genen wird als Antwort auf Glukose-Mangel durch SNF1 verändert (Young et al., 2003). Des Weiteren wird auch der Fettsäurestoffwechsel

(durch Inhibition der Acetyl-CoA-carboxylase) und die Kohlenstoffspeicherung unter diesen Bedingungen beeinflusst (François and Parrou, 2001; Woods et al., 1994). Wie AMPK oder SnRK1 in den anderen Reichen hat aber auch der SNF1-Komplex andere, wichtige Funktionen. Neben der Anpassung an verschiedene Stresssituationen (Hong and Carlson, 2007) ist er auch involviert in den Alterungsprozess (Ashrafi et al., 2000), sowie in die Meiose und die Sporenbildung (Honigberg and Lee, 1998). Schließlich ist der SNF1-Komplex auch ein positiver Regulator der Autophagie (Wang et al., 2001). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der SNF1-Komplex neben vielen Gemeinsamkeiten zum pflanzlichen SnRK1-Komplex (heterotrimerer Aufbau, Regulation durch Phosphorylierung, überlappende Ziele hinsichtlich der Regulation zellulärer Prozesse) auch einige Eigenschaften aufweist, die in Pflanzen nicht benötigt werden oder möglicherweise nur noch nicht entdeckt wurden.

1.1.5 Homologe in anderen Reichen - Der AMPK-Komplex in tierischen Zellen

Der AMPK-Komplex („5'-AMP-activated protein kinase“) ist das am meisten untersuchte Homologe der AMPK/SNF1/SnRK1-Proteinfamilie (ungefähr 10 x mehr Veröffentlichungen als für SNF1 und SnRK1 zusammen; Stand: März 2016; Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Er ist zum ersten Mal 1973 in der Literatur aufgetaucht, allerdings stellte sich erst Jahre später heraus, dass der AMPK-Komplex der entscheidende Teil der untersuchten Proteinfraktion war (Beg et al., 1973). Molekular identifiziert wurde AMPK erst 1987 als eine Kinase, die den Fettsäure- und Cholesterolfstoffwechsel beeinflusst (Carling et al., 1987). Im Jahr 1994 wurde schließlich die enge Verwandtschaft zum SNF1-Komplex und zum SnRK1-Komplex nachgewiesen (Carling et al., 1994). Aufgebaut ist auch der AMPK-Komplex aus drei Untereinheiten, wobei es in tierischen Zellen zwei katalytische α -Untereinheiten (Stapleton et al., 1997), drei regulatorische β -Untereinheiten (Chen et al., 1999) und zwei regulatorische γ -Untereinheiten (Cheung et al., 2000) gibt. Die α -Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sind im Aufbau ihrer Domänenstruktur den α -Untereinheiten des SnRK1-Komplexes sehr ähnlich: Im N-terminalen Bereich findet sich die katalytische Domäne mit dem charakteristischen T-Loop und im C-terminalen Bereich die regulatorische Domäne (Kemp et al., 1999). Auch im T-Loop des AMPK-Komplexes muss ein bestimmter Threonin-Rest phosphoryliert werden, damit die Kinase aktiv sein kann (Hawley et al., 1996). Sehr gut charakterisiert sind auch die beiden wichtigsten aktivierenden Kinasen LKB1 („Leber Kinase B1“) und CaMKK („Ca²⁺/Calmodulin abhängige Kinase Kinase“), welche für die T-Loop Phosphorylierung verantwortlich sind (Hawley et al., 2003; Hurley et al., 2005). Die drei β -Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ haben verschiedene, regulatorische Funktionen. Sie besitzen wie die β -Untereinheiten des SnRK1-Komplexes auch eine sogenanntes CBM-Motiv (in SnRK1 GBD genannt), welches Kohlenhydrate, in diesem Fall Glykogen, binden kann. Damit binden sie den AMPK-Komplex an Glykogen-Partikel (McBride et al., 2009). Da der AMPK-Komplex gleichzeitig auch eine inhibierende Wirkung auf Glykogen Synthasen hat, kann damit möglicherweise der weitere Aufbau von Reservestoffen inhibiert werden (Carling and Hardie, 1989). Die beiden γ -Untereinheiten $\gamma 1$ und $\gamma 2$ haben, wie im SNF1- und im SnRK1-Komplex auch, regulatorische Funktionen. Sie sind in der Lage

mit ihren zwei „Bateman“-Domänen Adenosin-Nukleotide zu binden (Cheung et al., 2000). Für diese Bindung wurde, im Gegensatz zu den Homologen in Hefe oder in Pflanzen, nachgewiesen, dass sie die Aktivierung des AMPK-Komplexes durch T-Loop Phosphorylierung fördert (Oakhill et al., 2011). Für die Phosphorylierung durch die LKB1 ist eine AMP-Bindung an eine γ -Untereinheit sogar Voraussetzung (Gowans et al., 2013). In derselben Studie wurde gezeigt, dass ADP-Bindung dies nicht fördert, aber es schützt vor Dephosphorylierung.

Die Funktionen des AMPK-Komplexes in tierischen Zellen sind vielfältig und es gibt zahlreiche Übersichtsartikel, welche diese zum Thema haben (Hardie, 2007; Hardie, 2014; Hardie, 2015; Rutter et al., 2003; Steinberg and Kemp, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollen die wichtigsten Funktionen kurz erwähnt werden. Grundsätzlich wird der AMPK-Komplex bei Stress und Energiemangel aktiviert und modifiziert den Stoffwechsel in einer Weise, dass Energie verbrauchende, anabole Prozesse inhibiert und Energie produzierende, katabole Prozesse gefördert werden (Hardie et al., 2012). Dazu reguliert AMPK den zellulären Stoffwechsel, indem es zum Beispiel die Glukoseaufnahme in Muskelzellen steuert (O'Neill et al., 2011), die Biogenese von Mitochondrien beeinflusst (Jäger et al., 2007) oder die Fettsäuresynthese durch Inaktivierung der ACCase (Acetyl-CoA Carboxylase) hemmt (Davies et al., 1992). Des Weiteren wird unter Energiemangel der mTOR-Signalweg, der am Wachstum als Antwort auf ausreichende Nährstoffversorgung beteiligt ist, inaktiviert. Dies führt zu einem Arrest des Zell-Zyklus (Gwinn et al., 2008). Unter den eben genannten Bedingungen fördert der AMPK-Komplex auch die Autophagie (Egan et al., 2011). Auch auf die Regulierung des Appetites und des Energieverbrauchs hat er Einfluss (Hardie, 2015). Interessanterweise konnte für den AMPK-Komplex auch eine direkte Aktivierung durch oxidativen Stress gezeigt werden (Zmijewski et al., 2010). Diese Verbindung konnte bis jetzt weder für den SNF1- noch für den SnRK1-Komplex gezeigt werden. Neben diesen direkten Auswirkungen auf den Energiehaushalt spielt der AMPK-Komplex auch eine Rolle bei anderen Prozessen. So konnte gezeigt werden, dass AMPK von einigen Medikamenten und pflanzlichen Sekundärmetaboliten beeinflusst wird (Steinberg and Kemp, 2009). Diese Erkenntnis ging einher mit der Entdeckung, dass der AMPK-Komplex Entzündungsreaktionen und sogar die Tumorentstehung unterdrücken kann (O'Neill and Hardie, 2013). Schließlich wurde auch ein Einfluss auf die circadiane Rhythmik (Lamia et al., 2009) und auf die Erregbarkeit bestimmter Nervenzellen (Ikematsu et al., 2011) gezeigt.

All dies zeigt, dass der AMPK-Komplex in tierischen Zellen eine zentrale Rolle spielt und Gegenstand zahlreicher, aktueller Forschungsprojekte ist. Vor wenigen Jahren ist es sogar erstmals gelungen eine Kristallstruktur eines kompletten AMPK-Heterotrimer zu erzeugen (Xiao et al., 2011). Somit lässt sich festhalten, dass das Verständnis der Rolle dieses Komplexes um einiges größer ist als in seinen Homologen SNF1 und SnRK1.

1.1.6 Funktionen und Regulation des SnRK1-Komplexes

Der SnRK1-Komplex in Pflanzen taucht zum ersten Mal 1991 in der Literatur auf. In einem Screen wurde eine Roggen (*Secale cereale*) cDNA gefunden, welche eine *snf1*-Mutante in *Saccharomyces cerevisiae* komplementieren kann (Alderson et al., 1991). In den darauf folgenden Jahren wurden weitere Verwandte dieser Kinase in anderen Pflanzenarten beschrieben (Bhalerao et al., 1999; Dale et al., 1995) und auch erste regulierte Proteine wie zum Beispiel die Nitrate Reduktase, die durch den SnRK1-Komplex mittels Phosphorylierung inhibiert wird, gefunden (Sugden et al., 1999b).

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass der SnRK1-Komplex wie seine Homologen in Hefe und tierischen Zellen in die Anpassung und Regulation des Energiehaushaltes involviert ist (Ghillebert et al., 2011). So ist SnRK1 unter anderem wichtig für das Überleben von *Arabidopsis thaliana* in verlängerter Nacht (Baena-Gonzalez et al., 2007). Ähnliches wurde in dem Moos *Physcomitrella patens* gezeigt: Knock-out Mutanten, in denen beide α -Untereinheiten fehlen, können nur bei konstanter Belichtung überleben (Thelander et al., 2004). Reis (*Oryza sativa*) Keimlinge benötigen den SnRK1-Komplex um sich an den Sauerstoffmangel während der Überflutungsphasen anpassen zu können (Lee et al., 2009). Auch in anderen Pflanzenarten ist der SnRK1-Komplex in den frühen Entwicklungsphasen wichtig. So sind in Erbsenpflanzen (*Pisum sativa*) die Embryonalentwicklung und das Keimlingswachstum gestört, wenn die α -Untereinheit des SnRK1-Komplexes durch ein RNAi-Konstrukt in verringertem Ausmaße exprimiert wird (Radchuk et al., 2010). In Gerste (*Hordeum vulgare*) ist unter ähnlichen Bedingungen die Pollenentwicklung betroffen (Zhang et al., 2001). Aber auch auf spätere Entwicklungsphasen hat der SnRK1-Komplex Einfluss. Überexpression von AKIN10 in *Arabidopsis thaliana* führt zu einem verzögerten Übergang der einzelnen Wachstumsphasen, da der FUS3-Transkriptionsfaktor, dessen Abbau für den Übergang dieser Phasen mitverantwortlich ist, stabilisiert wird (Tsai and Gazzarrini, 2012).

Auf zellulärer Ebene beeinflusst der SnRK1-Komplex unter anderem den Zell-Zyklus von Pflanzen. Ein Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor (AtKRP6) muss von diesem phosphoryliert und damit inhibiert werden um die Zellproliferation zu gewährleisten (Guérinier et al., 2013). Es gibt aber auch einen Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod. Ein Suppressor dessen (*Adi3*) phosphoryliert eine β -Untereinheit des SnRK1-Komplexes und unterdrückt damit möglicherweise den Zelltod. Ein genauer Mechanismus hierzu ist nicht bekannt (Avila et al., 2012).

Auf molekularer Ebene spielt vor allem die Kinase-Aktivität des SnRK1-Komplexes eine Rolle. Aus *in-vitro* Studien sind mehrere Enzyme im Stoffwechsel von Pflanzen bekannt, die direkt durch SnRK1-abhängige Phosphorylierung reguliert werden. Als Erstes wurde hierbei die 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase (HMG-CoA Reduktase), ein in der Isoprenoid-Biosynthese wichtiges Enzym, gefunden, welche durch SnRK1 inhibiert wird (Dale et al., 1995). Auch die Nitrate Reduktase (NR) und die Saccharose Phosphat Synthase (SPS) werden durch den SnRK1-Komplex mittels Phosphorylierung gehemmt (Sugden et al., 1999b). Näheres zu diesen beiden Enzymen folgt später in der Arbeit. Ein weiteres Enzym, welches möglicherweise durch den SnRK1-Komplex reguliert wird, ist

die Fruktose-2,6-Bisphosphatase. Es konnte gezeigt werden, dass dessen Phosphorylierung zur Bindung von 14-3-3 Proteinen und damit zur Inhibition führt. Für die Phosphorylierung allerdings konnte nur gezeigt werden, dass sie von AMPK oder einem Pflanzenextrakt durchgeführt werden kann. Somit fehlt ein direkter Beweis für eine Phosphorylierung durch SnRK1, auch wenn dies nicht unwahrscheinlich erscheint (Kulma et al., 2004). Auch die Aktivierung der ADP-Glukose Pyrophosphorylase (AGPase), einem wichtigen Enzym im Stärkestoffwechsel, wird durch den SnRK1-Komplex beeinflusst (Tiessen et al., 2003). Allerdings ist der genaue Mechanismus auch hier noch unklar, da die AGPase durch Reduktion einer Disulfidbrücke zwischen ihren beiden kleinen Untereinheiten aktiviert wird und es bis jetzt für direkte Phosphorylierung noch keinen Beweis gibt (Geigenberger, 2011).

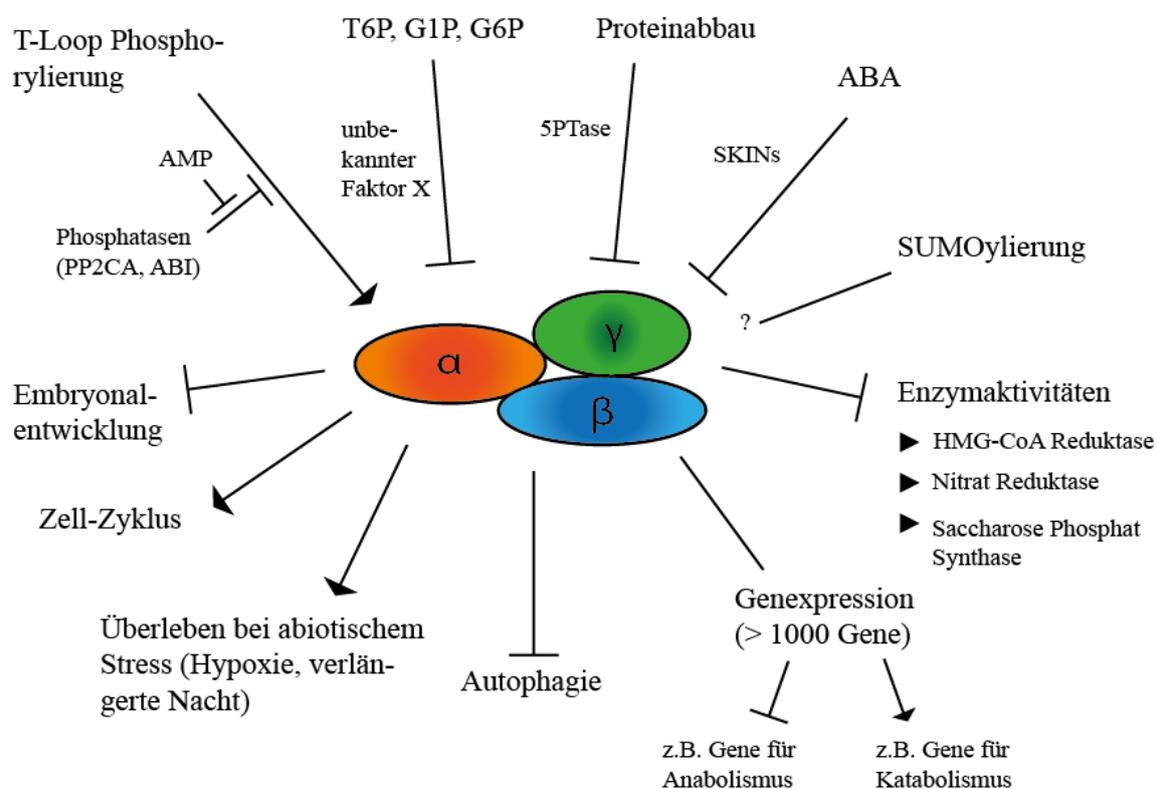


Abb.3: Regulation und Funktion des SnRK1-Komplexes

Schematische Zeichnung der regulatorischen Mechanismen, die auf den SnRK1-Komplex wirken, sowie der Funktionen dieses Komplexes. Genauere Erläuterungen hierzu sind dem Fließtext zu entnehmen.

ABA: Abscisinsäure; ABI und PP2CA: 2C-Typ Phosphatasen; AMP: Adenosinmonophosphat; G1P: Glukose-1-Phosphat; G6P: Glukose-6-Phosphat; 5PTase: Myoinositol Polyphosphat 5-Phosphatase; SKIN: SnRK1 interagierende negative Regulatoren; T6P: Trehalose-6-Phosphat.

Schließlich hat der SnRK1-Komplex auch direkten Einfluss auf die Expression einiger Gene. Es wurde zum Beispiel in Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) nachgewiesen, dass die Expression der Saccharose Synthase (SUS) durch SnRK1 kontrolliert wird (Purcell et al., 1998). In Weizenembryos (*Triticum aestivum*) wird die Repression der α -Amylase ebenfalls durch den SnRK1-Komplex gesteuert (Laurie et al., 2003). Neben diesen Untersuchungen zu einzelnen Genen gibt es auch zwei Studien, in denen das Transkriptom in Antwort auf veränderte SnRK1-Expression untersucht wurde. Zum einen wurde in Erbsenembryos der SnRK1-Komplex reprimiert. Daraufhin veränderte sich die Expression von

mehr als 180 Genen. Verringerter Expression wurde unter anderem in Genen beobachtet, die mit mitotischer Aktivität oder Stressantwort in Verbindung stehen, erhöhte Expression in Genen, die mit Synthese von Speicherproteinen zu tun haben (Radchuk et al., 2006). Die größte und bekannteste Studie zu diesem Thema wurde mit *Arabidopsis thaliana* Protoplasten durchgeführt, welche AKIN10 überexprimieren. Darin wurden über 1000 Gene gefunden, die von SnRK1 kontrolliert werden. Des Weiteren wurde festgestellt, dass ein Teil dieser Kontrolle mit Hilfe sogenannter bZIP-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Baena-Gonzalez et al., 2007). Eine Aufzählung aller in der Transkription durch den SnRK1-Komplex veränderten Gene würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Zusammenfassend lässt sich aber festhalten, dass die beobachteten Änderungen zur bekannten Rolle des SnRK1-Komplexes in der Aufrechterhaltung der Energiehomeostase passen (Baena-González and Sheen, 2008).

Die oben genannten Punkte zeigen, dass der SnRK1-Komplex einen großen Einfluss auf das Leben von Pflanzen hat, auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen oft nur im Ansatz verstanden sind. Deshalb hat auch die Frage der Regulation dieses Komplexes eine sehr große Bedeutung. Im Folgenden soll dargestellt werden, welche regulatorischen Mechanismen im pflanzlichen System bekannt sind.

Wie bei der Beschreibung der Untereinheiten bereits kurz erwähnt, wird die Aktivität α -Untereinheit durch Phosphorylierung im T-Loop gesteuert (Crozet et al., 2010; Sugden et al., 1999a). Die einzigen in Pflanzen bisher bekannten Kinasen, welche diese Phosphorylierung durchführen, sind GRIK1 und GRIK2. Im Gegenzug zur Phosphorylierung der α -Untereinheit des SnRK1-Komplexes werden die aktivierenden Kinasen von diesem in einem negativen Feedback-Loop wieder inaktiviert (Shen et al., 2009). Es muss auch erwähnt werden, dass diese beiden Kinasen nur in jungen Blättern oder in von Pathogenen befallenen Gewebe nachgewiesen wurden (Shen and Hanley-Bowdoin, 2006). Eine weitere aktivierende Kinase könnte CIPK15 („Calcineurin B-like interacting Protein Kinase 15“) sein, welche in Experimenten in Reis im Zusammenhang mit Überflutungstoleranz gefunden wurde. Allerdings fehlt hier noch der biochemische Beweis einer direkten Phosphorylierung des SnRK1-Komplexes (Lee et al., 2009). Somit ist das Bild der aktivierenden Kinasen noch unvollständig und bedarf weiterer Untersuchung. Auf Seiten der Dephosphorylierung sind wie bereits erwähnt die beiden 2C-Typ Phosphatasen PP2CA und ABI bekannt (Rodrigues et al., 2013), sowie PP2C74, welche in einer weiteren Studie gefunden wurde (Tsugama et al., 2012). Interessanterweise ist der Phosphorylierungsstatus nicht in allen Situationen der entscheidende Marker für die Aktivität des SnRK1-Komplexes. So konnte in Protoplasten, die einer verlängerten Nacht ausgesetzt wurden, keine Korrelation zwischen der T-Loop Phosphorylierung und der Aktivität des SnRK1-Komplexes in Form von Expressionsänderungen bekannter Zielgene festgestellt werden (Baena-Gonzalez et al., 2007). Ähnliches wurde auch in Blättern gefunden (Rodrigues et al., 2013). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass bei PO_4^- -Mangel die Aktivität des SnRK1-Komplexes abnimmt, aber die T-Loop Phosphorylierung gleich bleibt (Fragoso et al., 2009). Auch bei einer Verringerung der absoluten SnRK1-Menge durch Behandlung mit Abscisinsäure verändert sich der Anteil an phosphorylierter α -

Untereinheit nicht (Coello et al., 2012). Somit kann die T-Loop Phosphorylierung nicht der einzige und in vielen Situationen auch nicht der entscheidende Regulationsmechanismus sein.

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation stellen allosterische Effektoren dar. Wie zuvor beschrieben spielt dabei vor allem für den AMPK-Komplex AMP eine wichtige Rolle. Für den SnRK1-Komplex konnte bislang noch keine direkte Aktivierung mittels AMP nachgewiesen werden (Crozet et al., 2014), allerdings ist bekannt, dass AMP-Bindung die Dephosphorylierung des T-Loops hemmt (Sugden et al., 1999a). Ein Grund dafür könnte sein, dass die Modellierung der CBS-Domänen zeigt, dass wichtige Aminosäuren für die Bindung von Adenosin-Nukleotiden im SnRK1-Komplex nicht konserviert sind (Emanuelle et al., 2015a). Ein in den Homologen von SnRK1 unbekannter allosterischer Effektor ist Trehalose-6-Phosphat (T6P). Dieses inhibiert SnRK1, wobei allerdings ein noch zu identifizierender Faktor benötigt wird, welcher nur in jungem Gewebe gefunden wurde (Zhang et al., 2009). Dieser Regulationsmechanismus wurde neben *Arabidopsis thaliana* auch in Weizenkörnern (Martinez-Barajas et al., 2011), in Kartoffeln (Debast et al., 2011) sowie in Zuckerrohr (Wu and Birch, 2010) gefunden und scheint damit in der Pflanzenwelt verbreitet zu sein. Da T6P ein Indikator für das Saccharose-Level in Pflanzen darstellt und auch mit Stress-Signaling in Verbindung gebracht wird (Lunn et al., 2014; Lunn et al., 2006), stellt dies eine interessante Verbindung zum Zuckerstoffwechsel dar. Diese wird noch intensiviert durch die Tatsache, dass auch andere Zuckerphosphate in der Lage sind den SnRK1-Komplex zu inhibieren. Dazu gehören Glukose-6-Phosphat (G6P) und Glukose-1-Phosphat (G1P), wobei sich die Effekte von G1P und T6P sogar addieren (Nunes et al., 2013). In der selben Studie wurde gezeigt, dass die Inhibierung des SnRK1-Komplexes durch Ribose-5-Phosphat, welche zwei Jahre zuvor in Weizen postuliert wurde (Piattoni et al., 2011), ein indirekter Effekt war. Der Grund waren ungenügende ATP-Konzentrationen im Versuchsansatz, so dass die Inhibierung der SnRK1-Aktivität auf einen Substratmangel zurückgeführt werden konnte. Über die Effekte von Glukose und Saccharose selbst gibt es unterschiedliche Ergebnisse. In Protoplasten führte die Zugabe dieser Zucker zu einer Verringerung der SnRK1-abhängigen Änderung der Genexpression (Baena-Gonzalez et al., 2007). In anderen Systemen führte die Zugabe von Saccharose zur Erhöhung der SnRK1-Aktivität sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf der Kinase-Ebene (Bhalerao et al., 1999; Jossier et al., 2009; Kolbe et al., 2005; Tiessen et al., 2003). Eine Erklärung hierfür könnten die unterschiedlichen Systeme bzw. die heterotrophe Natur des eingesetzten Materials in den verschiedenen Untersuchungen sein (Crozet et al., 2014). Ein weiterer, noch unbekannter Effektor auf die SnRK1-Aktivität wurde erst vor kurzem gefunden. Seine genaue Natur ist noch unbekannt, man weiß bisher nur, dass es ein Protein ist, welches größer als 30 kDa sein muss, und dass es unabhängig von den Zuckerphosphaten agiert (Emanuelle et al., 2015b). Kontrovers wird die Regulation des SnRK1-Komplexes über Stärke diskutiert. Es gibt eine Untersuchung, die zeigen soll, dass die GBD von AKIN β 2 und auch die von AKIN β in der Lage ist Stärke zu binden (Avila-Castaneda et al., 2014). Allerdings ist dies der einzige Bericht in Pflanzen, der etwas Vergleichbares zeigt. Im Jahr darauf wurde dieser Gruppe deutlich widersprochen (Emanuelle et al., 2015b). Was des Weiteren gegen eine Bindung von Stärke durch die GBD spricht, ist die Tatsache,

dass bislang keine SnRK1-Untereinheit in Plastiden gefunden wurde (Bitrian et al., 2011). Trotzdem besteht eine Verbindung zwischen dem Stärkegehalt und SnRK1, da die Expression von SnRK1 mit dem Stärkegehalt in Kartoffelknollen und Gerstepollen korreliert (McKibbin et al., 2006; Zhang et al., 2001).

Zu den bisher beschriebenen regulatorischen Mechanismen mittels T-Loop Phosphorylierung und allosterischer Effektoren kommen weitere hinzu, die vor allem, aber nicht ausschließlich posttranslationale Modifikationen darstellen. So kann AKIN β 3 myristoyliert werden. Dadurch verändert sich die subzelluläre Lokalisation des Komplexes und die Aktivität wird verringert (Pierre et al., 2007). In einem Screen für SUMOylierte Proteine in *Arabidopsis thaliana* wurde AKIN10 als möglicher Kandidat gefunden (Elrouby and Coupland, 2010). Auf dieser Grundlage wird zur Zeit über einen Zusammenhang zwischen dieser Modifikation und der SnRK1-Aktivität spekuliert (Crozet et al., 2014), weil SUMOylierung als Antwort auf abiotischen Stress bekannt ist (Castro et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit zur Regulation stellt die Proteindegradation dar. Erste Hinweise darauf lieferte die Tatsache, dass Kinase-inaktive α -Untereinheiten in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten akkumulieren (Baena-Gonzalez et al., 2007). Außerdem wird, als Antwort auf Nährstoffmangel, AKIN10 mit Hilfe der Myoinositol Polyphosphat 5-Phosphatase (5PTase) für den Abbau markiert (Ananieva et al., 2008). Der SnRK1-Komplex reagiert auch auf den Befall durch Herbivore. Als Antwort darauf wird in *Nicotiana attenuata* eine β -Untereinheit transkriptionell verringert und anschließend der Kohlenstoff aus den Blättern in die Wurzel verlagert (Schwachtje et al., 2006). Auch die Ausbildung von Oligomeren wird diskutiert (Nunes et al., 2013). In Mais (*Zea mays*) wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Dimere der $\beta\gamma$ -Untereinheit gefunden (López-Paz et al., 2009). Schließlich gibt es auch eine Verbindung zwischen SnRK1 und den Pflanzenhormonen. Vor allem in vielen Abscisinsäure (ABA) regulierten Prozessen wie zum Beispiel der Samenreife und der Keimung spielt der SnRK1-Komplex eine Rolle (Lu et al., 2007; Radchuk et al., 2010). Zum Beispiel sind AKIN10-Überexpressoren hypersensitiv gegenüber ABA während der Keimung (Jossier et al., 2009; Tsai and Gazzarrini, 2012). Des Weiteren sei hier nochmal die Verbindung über die 2C-Typ Phosphatase ABI („ABA insensitiv“) erwähnt (Rodrigues et al., 2013). Außerdem unterdrückt ABA SnRK1-Signale durch spezifische negative Regulatoren, sogenannte SKINs („SnRK1A interacting negative regulators“) in Getreidekeimlingen (Lin et al., 2014). Schließlich wurde auch nachgewiesen, dass ABA in Weizenwurzeln direkt den Abbau von SnRK1 fördert (Coello et al., 2012).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Funktionen des SnRK1-Komplexes ebenso wie seine Regulation vielfältig sind. Allerdings sind viele Aspekte nur unvollständig charakterisiert oder es gibt sogar widersprüchliche Studien. Daher gibt es noch viele offene Fragen zu klären bis der SnRK1-Komplex und seine Rolle in Pflanzen vollständig aufgeklärt sind.

1.1.7 Ziele dieser Arbeit

Wie im vorigen Kapitel beschrieben ist die Rolle des SnRK1-Komplexes in Pflanzen komplex und erst teilweise verstanden. Es gibt noch eine Menge unbeantworteter Fragen: Wie wichtig ist die T-Loop Phosphorylierung in Pflanzen *in vivo*? Ist der SnRK1-Komplex auch in Pflanzen vor allem ein Energiesensor? Wie sieht die genaue Rolle der pflanzenspezifischen Untereinheiten AKIN β 3 und AKIN β γ im Vergleich zu ihren Isoformen aus? (siehe auch „Outstanding Questions“ in einem aktuellen Übersichtsartikel (Emanuelle et al., 2015a)). Hinzu kommt, dass sehr viele Fragestellungen hinsichtlich der Funktion des SnRK1-Komplexes mit Hilfe von Mutanten mit veränderter Expression der α -Untereinheiten untersucht werden (siehe zum Beispiel: (Baena-Gonzalez et al., 2007) oder (Jossier et al., 2009)). Auf die regulatorischen β - und γ -Untereinheiten wird nur in einzelnen Studien eingegangen (Gissot et al., 2004; Gissot et al., 2006). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen einer Verringerung der regulatorischen γ -Untereinheit AKIN β γ in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Da diese wie bereits beschrieben die einzige funktionelle γ -Untereinheit in *Arabidopsis* darstellt und es keine Knock-Out Mutanten des SnRK1-Komplexes gibt, wurde mit einem artifiziellen MircoRNA System gearbeitet (Schwab et al., 2006), welches zu einem Knock-Down von AKIN β γ führt (diese Linie wird im Folgenden als „amiR-SNF4“ bezeichnet; SNF4 und AKIN β γ sind synonyme Bezeichnung für das selbe Protein). Diese Pflanzen wurden freundlicherweise von den Kooperationspartnern bei diesem Projekt (Arbeitsgruppe von Prof. C. Koncz am Max-Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln) zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurden die Pflanzen einer phänotypischen Analyse unterzogen um die Auswirkungen eines verringerten AKIN β γ -Gehaltes festzustellen. Gleichzeitig wurde auch eine metabolische Analyse dieser Pflanzen durchgeführt. Des Weiteren wurden physiologische Parameter wie die Anpassung an niedrige Lichtintensität, sowie die photosynthetische Leistung und die Atmung gemessen. In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen von Saccharose und Glukose sowohl auf die Anpassung an niedrige Lichtintensitäten als auch auf die T-Loop Phosphorylierung im Wildtyp sowie in den Pflanzen mit verringertem AKIN β γ -Gehalt untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen von folgenden Herstellern: Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Roche (Penzberg, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Duchefa (Haarlem, Niederlande).

2.1.2 Enzyme und Metabolite

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stammen von Roche (Penzberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland).

2.1.3 Kits

Es wurden Kits von folgenden Herstellern in dieser Arbeit verwendet: Qiagen (Venlo, Niederlande), Bio-Rad (München, Deutschland)

2.1.4 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzen Antikörper sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Name	Quelle	Arbeitskonzentration	Herkunft
α pThr172 (AMPKa)	Kaninchen, polyklonal	1:2000 in 5% BSA (TBST)	Millipore PK1204 (Darmstadt, Deutschland)
α GFP	Kaninchen, polyklonal	1:2000 in 5% BSA (TBST)	Invitrogen A11122 (Carlsbad, Kalifornien)
α AKIN β γ	Kaninchen, polyklonal	1:2000 in 5% BSA (TBST)	Agrisera AS09 463 (Vännas, Schweden)
α PsaA	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS06 172
α PsbA	Kaninchen, polyklonal	1:10.000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS05 084
α PsbD	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS06 146
α Lhca1	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS01 005
α Lhcb1	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS01 004
α PetC	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS08 330
α RbcL	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS03 037
α Atp β	Kaninchen, polyklonal	1:5000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS05 085
α AOX1/2	Kaninchen, polyklonal	1:1000 in 5% Milch (TBST)	Agrisera AS04 054
α UCP	Kaninchen, polyklonal	1:2000 in 5% BSA (TBST)	Agrisera AS12 1850

2.2 Pflanzenanzucht und verwendete Linien

2.2.1 Linien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende transgene *Arabidopsis thaliana* Linien verwendet: Eine induzierbare artifizielle microRNA Linie (amiR-SNF4), in der ein induzierbares Konstrukt gegen das *akinβγ*-Transkript (Synonym: *snf4*) im *Columbia-0* (Col-0) Hintergrund exprimiert wird. Diese Linie wurde von den Kooperationspartner bei diesem Projekt (AG Prof C. Koncz am Max-Planck Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln) nach der Methode von Schwab und Kollegen erzeugt (Schwab et al., 2006). Der Promotor ist durch β -Estradiol induzierbar. Eine weitere Linie (AKIN10-GFP), in der *akin10* im Col-0 Hintergrund mit einem GFP markiert wurde (Bitrian et al., 2011), wurde für das Überprüfen des pThr172-Antikörpers verwendet. Die Expression des Transgenes war vergleichbar mit der *akin10*-Expression im Wildtyp (Col-0) (Bitrian et al., 2011). Außerdem wurde eine Kreuzung der beiden genannten Linien für Versuche zur T-Loop Phosphorylierung verwendet (abgekürzt: 10/4). Als Kontrolle wurde die amiR-SNF4 Linie ohne Induktor verwendet, in bestimmten Fällen auch *Columbia 0* (entsprechend gekennzeichnet). Des Weiteren wurde eine T-DNA Linie aus der SALK Kollektion (SALK 205800c; Bestellnummer bei NASC: N695110; ab jetzt: *snf4*) (Scholl et al., 2000) untersucht. Diese weist eine Insertion in das *AKINβγ*-Gen im 3'-Bereich des vorletzten Exons auf (siehe Abb.7).

2.2.2 Anzucht auf Erde

Die Samen wurde für 1-2 Tage bei 4 °C auf einem feuchten Filterpapier (Macherey-Nagel GmbH, Deutschland) stratifiziert. Anschließend wurden sie einzeln auf Erde ausgebracht und in einer Klimakammer im Kurztag (8h Belichtung) bei 160 μ E (entspricht: μ mol Photonenfluss $m^{-2}s^{-1}$) und 22 °C am Tag / 18 °C in der Nacht angezogen.

2.2.3 Anzucht in Sterilkultur

Für die Anzucht in Sterilkultur wurden die Samen zunächst oberflächlich sterilisiert. Dazu wurde zunächst eine geeignete Menge Samen in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und für 7 min in einer 70%igen EtOH Lösung mit 0,5% SDS geschüttelt. Anschließend wurden sie für 7 min in einer 100%igen EtOH Lösung geschüttelt. Abschließend wurde 4-6-mal mit autoklaviertem ddH₂O gewaschen. Die sterilisierten Samen wurden entweder auf runde Petrischalen (\varnothing 94 mm) oder auf quadratischen Petrischalen (12 cm x 12 cm) (beide von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit Medium folgender Zusammensetzung gegeben: 0,5 x MS (Murahige & Skoog Medium M0222, Duchefa, Niederlande), 2,5 mM MES pH 5,7 (KOH), 0,8% oder 2% Phytoagar (Duchefa, Niederlande). Andere Zusätze (Zucker, β -Estradiol) sind in den entsprechenden Abbildungen kenntlich gemacht. Je nach Zielsetzung des Versuchs wurden die Samen in unterschiedlichen Anordnungen auf die Petrischalen gegeben (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Anordnung der Samen und Wachstumsbedingungen in Sterilkultur

Versuchsart	Anzahl Samen	Anordnung	Wachstumsbedingungen
Entwicklung Niedriglicht	10	Vereinzelt, in Linie	Kurztag (8 h), 22°C, Lichtregime 10 μ E, 30 μ E, 50 μ E
Überleben Niedriglicht	15	Vereinzelt, in Linie	Kurztag (8 h), 22°C, Lichtregime 10 μ E, 30 μ E, 50 μ E
Induziertes Wachstum	>100	Verteilt, ohne Muster	Langtag (16 h), 22°C, 50 μ E

Die fertig ausgesäten Sterilkulturplatten wurden für 1-3 Tage im Dunkeln bei 4°C stratifiziert und anschließend entweder in einer Klimakammer oder einem Klimaschrank (Percival Scientific, USA) kultiviert. Die Wachstumsbedingungen sind in Tab. 2 und in den entsprechenden Abschnitten dargestellt. Diese Art der Anzucht wurde standardmäßig für alle Versuche verwendet.

2.2.4 Anzucht im hydroponischen System

Für die hydroponische Anzucht wurde das System von Loqué et al. modifiziert (Loqué et al., 2003). Die Samen wurden für zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert. Eine Siebträger-Schale wurde mit Steinwolle (Firma) ausgelegt, welche zuvor in Nährlösung (1 mM NH_4NO_3 , 250 μM CaCl_2 , 100 μM FeEDTA, 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 100 μM H_3BO_3 , 1,5 μM CuSO_4 , 50 μM KCl , 10 μM MnSO_4 , 0,1 μM Na_2MoO_4 , 100 μM $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$, 2 μM ZnSO_4) getränkt wurde. Die nasse Steinwolle wurde mit schwarzer Folie abgedeckt, die Löcher für die Samen enthält. Pro Siebträger wurden 60 Samen ausgebracht. Es wurden immer zwei Siebträger in eine Unterschale gehängt, von denen immer einer Col-0 und der andere die amiR-SNF4 Linie enthielt. Pro Versuch wurden mindesten zwei Trays verwendet. Die fertig ausgesäten und zusammengebauten Trays wurden mit Frischhaltefolie umwickelt und in eine Klimakammer (Bedingungen siehe 2.2.2) gebracht. Innerhalb der ersten Woche wurden mit einer Pinzette Löcher in die Frischhaltefolie gestochen. Nach einer Woche wurden 2,5 l Nährlösung in die Unterschale gegeben, so dass die Steinwolle mit der Flüssigkeit in Kontakt ist, die Pflänzchen aber nicht überschwemmt werden. Nach drei Wochen wurde die Nährlösung erneuert.



Abb.4: Das hydroponische System

Bestehend aus einer Unterschale als Reservoir für die Nährlösung, zwei Siebträger-Einsätzen, in denen die mit Nährlösung getränkte Steinwolle ruht, sowie der darauf liegenden Algenfolie mit Löcher für die Samen.

2.3 Induktionssysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Systeme zur Induktion des amiR-SNF4 Konstrukts getestet. Diese unterscheiden sich sowohl in der Art und Weise der Zugabe des Induktors β -Estradiol als auch in der zeitlichen Abfolge (Induktion vom Beginn der Keimung an oder spätere Zugabe). In allen Fällen wurde das β -Estradiol in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 100 mM gelöst. Aus dieser Stocklösung (maximal einmal eingefroren) wurden die entsprechenden Verdünnungen hergestellt.

2.3.1 Induktion in Sterilkultur

Bei der Anzucht in Sterilkultur wurde jeweils die Hälfte der Platten von Beginn an induziert, die andere Hälfte diente als Kontrolle. Das β -Estradiol wurde dem warmen, noch flüssigen Medium in einer Konzentration von 10 μ M zugesetzt und die Platten anschließend gegossen. Die Samen wurden wie in Tab. 2 beschrieben ausgesät. Dadurch sollte das amiR-SNF4 Konstrukt ständig aktiv sein. Dieses Induktionssystem wurde nach ausführlichen Tests (Daten nicht gezeigt) als Standard verwendet.

2.3.2 Induktion auf Erde

Für die Induktion auf Erde wurden 3 Wochen alte amiR-SNF4 Pflanzen verwendet (siehe 2.2.2). Diese wurden an Tag 21 einzeln mit einer Induktionslösung (0,1% Triton X-100, 0,1% DMSO, 10 μ M β -Estradiol) besprüht. Die Kontrolllösung enthielt keine β -Estradiol. Vor dem Sprühen wurde eine T0-Probe geerntet. Die Induktion wurde täglich für insgesamt drei Tage wiederholt. Es wurden jeweils am Ende des Tages und am Ende der Nacht vor dem Sprühen Proben genommen. Der Sprühzeitpunkt wechselte in den verschiedenen Ansätzen zwischen dem Ende des Tages und dem Ende der Nacht.

2.3.3 Induktion im hydroponischen System

Im hydroponischen System erfolgte die Induktion nach drei Wochen beim Wechsel der Nährlösung. Zu einem von beiden Trays pro Ansatz wurden in die Nährlösung 10 μ M β -Estradiol (in DMSO) gegeben um die amiR-SNF4 Linie zu induzieren. Zuvor wurde eine T0-Probe geerntet. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen um die Wirksamkeit der Induktion zu überprüfen

2.4 Nachweis der Wirksamkeit des amiR-SNF4 Konstrukts

Um die Wirksamkeit der amiR-SNF4 Konstruktes gegen das *akin β* Transkript zu überprüfen, wurde zunächst eine (semi-)quantitative real-time PCR durchgeführt. Ein Antikörper gegen das Protein lag erst zum Ende der Arbeit vor. Mit diesem wurden Western Blots gegen das AKIN β -Protein durchgeführt (siehe 2.5).

2.4.1 RNA-Extraktion

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits von Qiagen (Venlo, Niederlande) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Es wurden 25 – 40 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial pro Probe eingesetzt. Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometers (Thermo Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

2.4.2 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des iScript™ cDNA Synthesis Kits (Biorad, München, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers. Der Versuchsansatz wurde auf 5 µl pro Reaktion verkleinert. Es wurden 500 ng RNA pro Ansatz eingesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben mit sterilem ddH₂O auf 30 µl aufgefüllt. Um auf Verunreinigungen mit genomischer DNA zu prüfen wurde ein PCR mit Primern gegen das Actin-Transkript (Actin-F_ TGCGACAATGGAAGTGAATG und Actin-R_ GGATAGCATGTGGAAGTGCATACC, siehe Tab. 3) durchgeführt, wobei die beiden Primer an benachbarte Exons binden. Somit konnte durch die Größe des PCR-Produktes auf cDNA oder genomische DNA geschlossen werden. Der PCR-Ansatz war wie in 2.6.2 (Einsatzvolumen cDNA: 1 µl). Es wurde nachfolgendes PCR-Programm verwendet: 95 °C für 3 min; 35 Zyklen mit 95 °C für 20 sec, gefolgt von 55 °C für 20 sec und 72 °C für 1 min; zum Abschluss 72 °C für 5 min. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und die Größen mit Hilfe eines Markers (Gene Ruler™ 1kb Plus DNA ladder, Fermentas, Waltham, USA) bestimmt.

Tab. 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Name	Sequenz	Gen	Anwendung	Tm (°C)
Actin_F	TGCGACAATGGAAGTGAATG	At2g37620	Überprüfung cDNA	52
Actin_R	GGATAGCATGTGGAAGTGCATACC	At2g37620	Überprüfung cDNA	57
SNF4fwd	GCCACTTGTTTCAGGTTGGAC	At1g09020	qRT-PCR	54
SNF4rev	CTGCGGATATGAACCATCCT	At1g09020	qRT-PCR	52
UBIfw	CTGTTACGGAACCCAATTC	At4g36800	qRT-PCR	58
UBIrev	GGAAAAGGTCTGACCGACA	At4g36800	qRT-PCR	58
SALKfwd	TTGTGAAAAGTGATGGAGC	At1g09020	Überprüfung <i>snf4</i> -Linie	52
SALKrev	TTCCGGTAGCCAATATCT	At1g09020	Überprüfung <i>snf4</i> -Linie	57
LBb1	ATTTTGCCGATTTCCGAAC		Insertionsprimer T-DNA	55

2.4.3 Quantitative real time PCR

Das Expressionslevel des *akinβγ*-Transkriptes wurde durch (semi-)quantitative real-time PCR bestimmt. Hierzu wurde die in 2.4.2 erzeugte cDNA verwendet. Diese wurde zunächst 1:10 verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden pro technischem Replikat 2 µl eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand des Weiteren aus: 10 µl 2x SYBR Green (Biorad, München, Deutschland); 6 µl H₂O; 1 µl Primer 1

(10 μM); 1 μl Primer 2 (10 μM). Für das *akinβy*-Transkript wurden die Primer SNF4fwd (GCCACTTGTTTCAGGTTGGAC) und SNF4rev (CTGCGGATATGAACCATCCT) benutzt (siehe auch Tab. 3). Als Referenz wurde das Transkript des RUB1 (Ubiquitin verwandtes Protein 1) konjugierenden Enzymes (At4g36800) mit folgenden Primer verwendet: UBIfw (CTGTTTCACGG AACCCAATTC) und UBIREV (GGAAAAAGGTCTGACCGACA). Für jede Probe und jedes Transkript wurden drei technische Replikate pipettiert. Es wurden ABgene PCR plates (Thermo Scientific, Waltham, USA) im 96 well Format benutzt. Die Reaktion wurde in einem iQ5 iCycler von Biorad (München, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 95 °C für 5 min; 35 Zyklen mit 95 °C für 10 sec gefolgt von 55 °C für 30 sec und 72 °C für 10 sec; abschließend eine Schmelzpunktanalyse mit 95 °C für 1 min gefolgt von 55 °C für 1 min und 81x eine Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C angefangen bei 55 °C. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der zum Gerät gehörenden Software (Biorad iQ5) und Excel. Die relativen Änderungen wurden mit der sogenannten $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet. Kurz gesagt wurden dazu die Änderungen im Ct („threshold cycle“, der Zyklus der PCR, ab dem sich die DNA bei jedem Zyklus verdoppelt) für jede Probe zuerst auf das Referenz-Transkript (RUB1 konjugierendes Enzym) und anschließend auf eine Kontrollprobe bezogen (Pfaffl, 2004; Pfaffl, 2001; Ramakers et al., 2003).

2.5 Western Blots

2.5.1 Proteinextraktion und SDS-Gelelektrophorese

Für die Proteinextraktion wurden 30 – 40 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial in 50 μl Extraktionspuffer (50 mM HEPES pH 7,4; 30 mM NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM EGTA; 5 mM NaF; 0,1% Phosphatase Inhibitor [PhosSTOP, Roche, Penzberg, Deutschland]; 0,1% Triton X-100; 1 mM DTT_{red}; 1 mM PMSF; 0,1% Protease Inhibitor Cocktail [cOmplete Mini EDTA-free, Roche, Penzberg, Deutschland]) gevortext. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C und 21.000xg zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde zunächst eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dies geschah mit Hilfe der Roti®-Quant Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Für die anschließende SDS-PAGE wurde eine definierte Proteinmenge mit Laemmli-Puffer (4% SDS; 10% Glycerin, 125 mM Tris pH 6,8; 0,1% Bromphenolblau; 5% β -Mercaptoethanol) und ddH₂O auf eine Endkonzentration von 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95 °C und 1400 UpM erhitzt. Nach Abkühlen wurden die Proben auf ein acht- oder zehnprozentiges denaturierendes Polyacrylamidgel (ca. 1/5 Sammelgel pH 6,8; Rest Trenngel pH 8,8; in beiden 0,1% SDS) geladen und elektrophoretisch (ca. 1,5 h bei 25 – 40 mA/Gel) aufgetrennt. Gele, die nicht für einen Western Blot bestimmt waren, wurden mit Colloidalem Coomassie nach Dyballa und Metzger gefärbt (Dyballa and Metzger, 2009).

2.5.2 Proteintransfer und Immunodekoration

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde für 10 min in 1x Towbin Puffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 10% MeOH) equilibriert. Pro Blot wurde ein Sandwich aus (von Anode nach Kathode) 3 Lagen Whatman Papier (MN 218 B, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), PVDF-Membran (Immobilion P 0,45 µm; Millipore; Darmstadt, Deutschland), SDS-Gel, 3 Lagen Whatman Papier aufgebaut. Die PVDF-Membran wurde zuvor für 1 min in 100% MeOH aktiviert und 10 min in 1x Towbin Puffer geschüttelt. Das Whatman Papier wurde für 10 min in 1x Towbin Puffer equilibriert. Der Proteintransfer wurde für 1 h bei 0,8 mA /cm² Gel in einem Semi-Dry Blotter (TW77, GE Healthcare, München, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 1 h in 5% BSA (in TBST; 10 mM Tris pH 7,5 [HCl], 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) geblockt. Der primäre Antikörper wurde wie in Tab. 1 beschrieben vorbereitet. Die Membran wurde in 2 ml dieser Lösung über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Membran für 3 x 5 min in TBST gewaschen. Anschließend wurde sie für ungefähr 1,5 h bei RT unter leichtem Schütteln mit dem passenden sekundären Antikörper (AS09 602, anti-rabbit IgG gekoppelt mit HRP, 1:10.000 in TBS [TBST ohne Tween 20]) (Agrisera, Vännas, Schweden) inkubiert. Abschließend wurde die Membran 2 x 5 min in TBST und 2 x 5 min in TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Pierce™ ECL Western Blotting Substrate Kits (Thermo Scientific, Waltham, USA) nach Anweisung des Herstellers mit der Ausnahme, dass das Volumen pro Membran auf 0,5 ml Detektions-Lösung verringert wurde. Die Chemilumineszenz wurde auf Röntgenfilmen (Super RX, FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland) festgehalten. Die Auswertung erfolgte nach Digitalisierung mit Hilfe des Programmes ImageJ. Hierzu wurde die Intensität der Banden des zu untersuchenden Proteins auf die zum jeweiligen Versuch gehörige Kontrolle bezogen. Wurden für einen Versuch mehrere Blots benötigt, so wurde auf jeden auch die Kontrollprobe aufgetragen um eine vergleichbare Auswertung zu gewährleisten.

2.5.3 Immunpräzipitation und Überprüfung der T-Loop Phosphorylierung von AKIN10

Für diese Versuche wurde die Kreuzung aus der amiR-SNF4 Linie und der AKIN10-GFP Linie verwendet (abgekürzt: 10/4). 50 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial wurden mit 50 µl Extraktionspuffer (siehe 2.5.1) versetzt und gevortext. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 21.000xg zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford mit Hilfe der Roti®-Quant Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Immunpräzipitation wurden 200 µg Gesamtprotein mit 20 µl GFP-Trap®_A Kügelchen (Chromotek, Martinsried, Deutschland) in 200 µl Extraktionspuffer gemischt. Die GFP-Trap Kügelchen wurden zuvor nach Angaben des Herstellers dreimal in Extraktionspuffer gewaschen. Die fertig vorbereiteten Proben wurden anschließend für 2 h bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Danach wurden die Proben für 2 min bei 2.500xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Kügelchen mit den gebundenen Proteinen zweimal mit 200 µl Extraktionspuffer gewaschen.

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt mit 50 µl Laemmli-Puffer (siehe 2.5.1) bei 95 °C für 10 min bei 1.400 UpM. Anschließend wurden eine SDS-Gelelektrophorese und ein Western Blot durchgeführt (siehe 2.5.1 und 2.5.2). Es wurden 15 µl der jeweiligen Eluate pro Probe für die SDS-PAGE verwendet. Jede Probe wurde in gleicher Menge auf zwei Gele aufgetragen, so dass zwei identische Blots erzeugt werden konnten. Der eine Blot wurde mit dem pThr172-Antikörper (spezifisch für die phosphorylierte Form von AKIN10) inkubiert, der andere mit dem GFP-Antikörper (siehe Tab. 1). Zur Bestimmung des Levels der T-Loop Phosphorylierung wurden die beiden Blots mit Hilfe von ImageJ ausgewertet (siehe 2.5.2). Anschließend wurden die relative (auf die Kontrollprobe bezogene) Bandenintensität des α -pThr172 Blots durch die des α -GFP Blots geteilt. Damit wurde die Menge an phosphoryliertem AKIN10 auf die Gesamtmenge an AKIN10 bezogen und somit der relative Anteil an T-Loop Phosphorylierung berechnet.

2.6 Überprüfung der *snf4*-Linie

2.6.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden einzelne Blätter von 3 Wochen alten Pflanzen aus Erdkultur geerntet. Diese wurden für 3 min in 200 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris pH 7,5 [HCl]; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) mit zwei Stahlkugeln geretscht. Nach Entfernen der Stahlkugeln wurden die Proben für 7 min bei RT mit 21.000xg zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 150 µl eiskaltem (-20 °C) Isopropanol durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Anschließend wurden die Proben bei 15 °C für 15 min bei 21.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80% EtOH gelöst. Die Proben wurden nochmals wie zuvor zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 100 µl H₂O gelöst.

2.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit Hilfe der TAQ DNA Polymerase (Qiagen, Venlo, Niederlande) durchgeführt. Pro Ansatz wurde 1 µl der extrahierten DNA zu 9 µl Mastermix (0,1 mM dNTPs; 10 µM Primer 1; 10 µM Primer 2; 1x Reaktionspuffer; 0,02 U/µl Polymerase) gegeben. Es wurde nachfolgendes PCR-Programm verwendet: 95 °C für 3 min; 35 Zyklen mit 95 °C für 30 s, gefolgt von 55 °C für 30 s und 72 °C für 1 min; zum Abschluss 72 °C für 5 min. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch ein einprozentiges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Für den Nachweis des *akinβγ*-Gens wurden der SALKfwd- (TTGTGAAAGTGATGGAGC) und der SALKrev-Primer (TTCCGGTAGCCAATATCT), für den Nachweis der Insertion der LBb1- (ATTTTGCCGATTTTCGGAAC) und der SALKrev-Primer verwendet (siehe auch Tab. 3).

2.7 Messungen von Enzymaktivitäten

2.7.1 Nitrat Reduktase

In *Arabidopsis thaliana* gibt es zwei Nitrate Reduktasen *NIA1* (At1g77760) und *NIA2* (At1g37130), wobei *NIA2* für 90% der Aktivität verantwortlich ist (Wilkinson and Crawford, 1991). Für die Messung der Aktivität der NADH-abhängigen Nitrate Reduktase (EC 1.7.1.1) wurde ein kolorimetrisches Testverfahren verwendet. 20 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial wurde mit 100 μ l Extraktionspuffer (100 mM HEPES pH 7,5 [KOH]; 5 mM Mg(OAc)₂; 1 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin; 1% Polyvinyl-polypyrrolidon; 5 μ M Na₂MoO₄; 1% (g/v) BSA; 0,1% (v/v) Triton X-100; frisch zugegeben: 5 mM DTT_{red}; 0,5 mM PMSF; 25 μ M Leupeptin; 20 μ M FAD) gevortext und zügig weiterverarbeitet. Jede Probe wurde in drei verschiedenen Ansätzen inkubiert. Mit Ansatz A (100 mM HEPES pH 7,5 [KOH]; 6 mM KNO₃; 6 mM EDTA; 20 μ M Leupeptin; 10 μ M FAD; 0,25 μ M DTT_{red}; 5 μ M Na₂MoO₄; 0,5 mM NADH) wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt, mit Ansatz B (100 mM HEPES pH 7,5 [KOH]; 6 mM KNO₃; 12 mM Mg-Acetat; 20 μ M Leupeptin; 10 μ M FAD; 0,25 μ M DTT_{red}; 5 μ M Na₂MoO₄; 0,5 mM NADH) die selektive (= *in planta* aktiver Anteil, der nicht durch Phosphorylierung und anschließende Bindung von 14-3-3 Proteinen inaktiviert wurde (Nemie-Feyissa et al., 2013)). Ansatz C (100 mM HEPES pH 7,5 [KOH]; 6 mM KNO₃; 6 mM EDTA; 20 μ M Leupeptin; 10 μ M FAD; 0,25 μ M DTT_{red}; 5 μ M Na₂MoO₄; 0,5 mM NADH; 12 nmol NO₂⁻) diente als probeninterner Nitrit-Standard. Es wurden jeweils 11 μ l Pflanzen-Extrakt zu 55 μ l von jedem der drei Puffer gegeben und für 18, 24 oder 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 3 mmol Zn-Acetat gestoppt. Die Probe mit dem Nitrit-Standard (C) wurde sofort nach dem Ansetzen gestoppt. Zur Quantifizierung wurden 15 μ l H₂O, 60 μ l 1% Sulfanilamid (in 3 M HCl) und 60 μ l 0,02% N,NEDA zugegeben, gevortext und für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei RT und 12.000xg wurden pro Probe 150 μ l (von 200 μ l Gesamtvolumen) in ein Well einer Mikrotiterplatte gegeben und die Absorption bei 540 nm in einem Anthos HT - III Reader (anthos Mikrosysteme, Krefeld, Deutschland) gemessen. Für die Auswertung wurde für jede Probe mit Hilfe des Standard das entstandene Nitrit berechnet und die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Zusätzlich wurde aus der maximalen und der selektiven Reaktionsgeschwindigkeit ein Verhältnis gebildet und somit der Aktivierungszustand jeder Probe berechnet.

2.7.2 Saccharose Phosphat Synthase

In *Arabidopsis thaliana* gibt es vier Gene, die für eine Saccharose Phosphat Synthase (SPS) codieren: *AtSPSA1* (At5g20280), *AtSPSA2* (At5g11110), *AtSPSB* (At1g04920) und *AtSPSC* (At4g10120) (Volkert et al., 2014). Die Messung der Aktivität der Saccharose Phosphat Synthase wurde angelehnt an das Protokoll von Gibon und Kollegen durchgeführt (Gibon et al., 2004). Dazu wurden 10 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial mit 2 ml Extraktionspuffer (50 mM HEPES pH 7,4 [KOH]; 10 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM Benzamidin; 1 mM 6-Aminocapronsäure; 0,25%

(w/v) BSA (Protease-frei); 10 μ M Leupeptin; 0,1% (v/v) Triton X-100; 1 mM DTT_{red}; 1 mM PMSF; 20% (v/v) Glycerin) gevortext. Für die Messung wurden vier verschiedene Reaktionsansätze (V_{\max} , $V_{\max \text{ blank}}$, V_{sel} , $V_{\text{sel blank}}$, siehe Tab. 4) verwendet. Es wird zwischen der maximalen Aktivität, bei der die allosterischen Effektoren in optimaler Konzentration vorliegen, und der selektiven Aktivität, bei der die allosterischen Effektoren in limitierender Konzentration vorliegen, unterschieden. Zusätzlich wurden auch Standards mitgemessen (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Reaktionsansätze für die SPS Aktivitätsmessung

	$V_{\max, \text{ blank}}$	$V_{\text{sel, blank}}$	V_{may}	V_{sel}	Standard
HEPES/KOH, pH 7,5	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
UDP-Glukose	-	-	10 mM	10 mM	-
AMP	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
ADP	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M
UMP-Kinase	0,03 U/ml	0,03 U/ml	0,03 U/ml	0,03 U/ml	0,03 U/ml
Glycerinkinase	5 U/ml	5 U/ml	5 U/ml	5 U/ml	5 U/ml
K ₃ PO ₄	-	5 mM	-	5 mM	-
Fruktose-6-Phosphat	-	-	10 mM	3 mM	-
Glukose-6-Phosphat	-	-	40 mM	12 mM	-
PIC (Roche)	0,125 x	0,125 x	0,125 x	0,125 x	0,125 x

Die UMP-Kinase wurde selbst überexprimiert und aufgereinigt. Der verwendete Klon wurde freundlicherweise von Dr. J. Lunn (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Potsdam) zur Verfügung gestellt. Jede extrahierte Probe wurde mit den vier verschiedenen Reaktionsansätzen inkubiert. Dazu wurden 15 μ l des Extrakts zu 145 μ l des jeweiligen Ansatzes gegeben. Nach kurzem Mischen wurde für 20 min bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 64 μ l 0,5 M HCl und Erhitzen für 2 min bei 95 °C gestoppt. Nach Abkühlen wurden die Proben auf Eis mit 64 μ l 0,5 M NaOH neutralisiert. Die Proben wurden anschließend für 2 min bei 4 °C mit 21.000xg zentrifugiert und drei technische Replikate á 90 μ l in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Determination der SPS Aktivität wurden 50 μ l Determinationsmix (100 mM Tricine pH 8 [KOH]; 1,5 mM MgCl₂; 1,32 mM NADH; 2,125 U/ml Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase; 5 U/ml Glycerol-3-Phosphat Oxidase) pro Well hinzugegeben und die Absorption bei 340 nm in einer Kinetik (Messintervall: 1 min) in einem Anthos HT - III Reader gemessen. Die negative Steigung der optischen Dichte ist direkt proportional zur SPS Aktivität und wurde mit Hilfe einer zuvor aufgenommenen Eichkurve umgerechnet. Zur Auswertung wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Ansätze V_{\max} bzw. V_{sel} von ihren Blindproben $V_{\max \text{ blank}}$ bzw. $V_{\text{sel blank}}$ abgezogen und somit die maximale und die selektive Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Zusätzlich wurde noch ein Verhältnis aus der selektiven geteilt durch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt (Aktivierungszustand).

2.7.3 Saccharose Synthase

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält sechs Gene, die für eine Saccharose Synthase codieren: *AtSUS1* (At5g20830), *AtSUS2* (At5g49190), *AtSUS3* (At4g02280), *AtSUS4* (At3g43190), *AtSUS5* (At5g37180), *AtSUS6* (At1g73370) (Bieniawska et al., 2007). Die Aktivität der Saccharose Synthasen (*AtSUS1-6*) wurde mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wie die Aktivität der SPS gemessen. Es wurden die Extrakte aus eben dieser Messung (siehe 2.7.2) verwendet. Die Reaktion erfolgte in Richtung der Spaltung von Saccharose mit Hilfe von UDP in UDP-Glukose und Fruktose. Dazu wurden zwei Reaktionsansätze hergestellt: V_{\max} (20 mM HEPES pH 7,5 [KOH], 5 mM $MgCl_2$; 0,01 % Triton X-100; 10 mM UDP; 200 mM Saccharose; 200 μM $Na_4O_7P_2$; 2,7 U/ml Glycerinkinase; 0,11 U/ml UDP-Glukose Pyrophosphorylase; 0,125x PIC) für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und V_{blank} (wie V_{\max} ohne UDP) als Blindprobe. Zu jeweils 144 μl eines Reaktionsansatzes wurden 16 μl des Pflanzenextraktes gegeben und für 10 min bei 25°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte wie bei der Messung der SPS Aktivität. Nach Zentrifugation bei 21.000xg für 2 min bei RT der neutralisierten Proben wurden 3 technische Replikate á 90 μl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 50 μl eines Determinationsmixes (200 mM Tricine pH 8 [KOH]; 4 mM $MgCl_2$; 1,32 mM NADH; 2 U/ml Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase; 5 U/ml Glycerol-3-Phosphat Oxidase) hinzugefügt. Abschließend wurde die Absorption bei 340 nm in einem Filtermax F5 (Molecular Devices, Biberach, Deutschland) gemessen (Kinetik über 1 h, Messintervall 1 min). Die Steigung der daraus resultierenden Kurve ist proportional zur Aktivität der Saccharose Synthasen und wurde mit Hilfe einer zuvor aufgenommenen Eichkurve umgerechnet. Als Standard wurden verschiedene UDP-Glukose Konzentrationen verwendet (0 – 10 nmol/well).

2.7.4 Hexokinase

Zur Bestimmung der Hexokinase-Aktivität wurden 10 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial mit 1 ml Extraktionspuffer (siehe 2.7.2 Extraktionspuffer für SPS) gevortext. Anschließend wurden die Extrakte für 2 min bei 4 °C und 21.000xg zentrifugiert. Pro Probe wurden 50 μl des Überstandes zusammen 200 μl eines Mastermixes (50 mM HEPES pH 7 [KOH]; 5 mM $MgCl_2$; 0,7 mM $NADP^+$; 1,75 mM ATP; 0,7 U/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zum Starten der Reaktion wurde pro Well 1 μl einer 400 mM Glukose Lösung (= 1,6 mM pro well) zugegeben (oder 1 μl H_2O für die Blindproben) und die Platte für 30 s bei 600 UpM geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption bei 340 nm für 60 min (Messintervall 30 s) in einem Filtermax F5 (Molecular Devices, Biberach, Deutschland) gemessen. Zur Bestimmung der Hexokinase Aktivität wurde die Steigung im linearen Bereich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Absorptionskoeffizient für $NADH/H^+$ in Mikrotiterplatten $\epsilon_{340nm} = 6,2 \text{ l}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$; Schichtdicke für Mikrotiterplatte $d = 2,85 \text{ cm}$) umgerechnet: $c' = \frac{E}{\epsilon * d}$ wobei $E = \text{mOD}/\text{min}$ (Absorptionsänderung pro Zeit), $c' = \text{mmol}/\text{min}$ (Stoffmengenänderung pro Zeit $\hat{=}$ U). Wenn nun c' auf das Frischgewicht der jeweiligen Proben bezogen wird, kann die Aktivität in Units (U)/g angegeben werden.

2.7.5 Alanin Aminotransferase

Die Messung der Alanin Aminotransferase wurde nach Hatch & Mau (1973) mit kleinen Veränderungen durchgeführt (Hatch and Mau, 1973). Es wurde die Extrakte aus der Hexokinase Aktivitätsmessung (siehe 2.7.4) verwendet. 30 μ l des Extraktes wurden mit 170 μ l des Reaktionsmixes (50 mM HEPES pH 7,5 [KOH]; 2 mM EDTA; 200 μ M NADH; 10 mM L-Alanin; 37,7 μ M Pyridoxal-5-Phosphat) in einer Mikrotiterplatte gemischt. Pro Probe wurden 4 technische Replikate angefertigt. Die Platte wurde anschließend für 5 min bei RT und 300 UpM auf einem Thermomixer (Thermomix comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Danach wurde 1 U/well LDH (Laktatdehydrogenase aus Kaninchen) und 2 μ l 250 mM α -Ketoglutarat pro well (zu 2 technischen Replikaten) zugegeben. Die Messung der Absorption bei 340 nm wurde in einem Filtermax F5 (Molecular Devices, Biberach, Deutschland) für 1 h (Messintervall 30 s) durchgeführt. Die Steigung im linearen Bereich wurde wie in 2.7.4 in Aktivität umgerechnet.

2.8 Entwicklungsexperimente und Messung physiologischer Parameter

Um Unterschiede in der Entwicklung feststellen und quantifizieren zu können, wurden die Samen wie in Tab. 2 (Entwicklung Niedriglicht) beschrieben ausgesät. Es wurden 2% Phytoagar ins Wachstumsmedium gegeben um die Sterilkulturplatten vertikal anordnen zu können. Die Versuche wurden in einem Klimaschrank (Percival Scientific, Perry, USA) durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Lichtintensitäten gleichzeitig auf drei verschiedenen Ebenen verwendet: 10 μ E (Niedriglicht), 30 μ E und 50 μ E (normale Lichtintensität). Die Tageslänge betrug 8 h bei einer konstanten Temperatur von 22 °C.

2.8.1 Beschreibung der Entwicklung

Zur Beschreibung der Entwicklung wurde eine modifizierte Version des BBCH-Indexes (die Abkürzung BBCH setzt sich aus den ursprünglichen Verfasser zusammen: BBA, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft; BSA, Bundessortenamt; Chemische Industrie, Industrieverband Agrar) verwendet (Boyes et al., 2001; Hess et al., 1997). Die Samen wurden nach zweitägigem Stratifizieren, wobei die Samen bereits auf die Sterilkulturplatten verteilt worden waren, zu Beginn der Lichtperiode in den Klimaschrank gestellt. Der BBCH-Index wurde jeden zweiten bzw. dritten Tag circa eine Stunde nach Beginn der Lichtperiode bestimmt. Die Tage, an denen gemessen wurde, waren: 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16 und 19. Nach Tag 19 wurde das Experiment beendet. Die genaue Zuordnung der Entwicklungsstufen ist Tab. 5 zu entnehmen. Es wurden pro Genotyp (Col-0, amiR-SNF4 induziert und nicht induziert [= Kontrolle]) und Lichtbedingung jeweils 5 Platten mit je 10 Samen verwendet, sowohl für die Kontrolle als auch für induzierende Bedingungen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert jeder Platte als ein biologisches Replikat betrachtet.

Tab. 5: Zuordnung Entwicklungsstufen BBCH-Index

Entwicklungsstufe	Phänotypische Beschreibung
3	Nicht gekeimt
5	Gekeimt; nur Keimwurzel sichtbar
7	Kotyledonen sichtbar, aber nicht voll entfaltet
9	Kotyledonen voll entfaltet
10	Kotyledonen voll entfaltet und erstes Laubblattpaar sichtbar
12	Erstes Laubblattpaar voll entfaltet und drittes Laubblatt sichtbar
13	Drittes Laubblatt voll entfaltet und viertes sichtbar
14	Viertes Laubblatt voll entfaltet und fünftes sichtbar

2.8.2 Wurzellängenmessung

Im Zuge der Bestimmung des BBCH-Indexes wurden auch die Wurzellängen der Pflänzchen bestimmt. Dazu wurden die Platten auf einem 4 x 4 mm Raster fotografiert. Anschließend wurden die Wurzeln mit Hilfe des Programmes ImageJ vermessen und die Pixel mit Hilfe des Rasters in Millimeter umgerechnet. Die Messung der Wurzellänge erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten wie die Bestimmung des BBCH-Indexes. Zusätzlich zur absoluten Wurzellänge konnte somit auch eine Wachstumsrate berechnet werden, die eine Auflösung von zwei bis drei Tagen besitzt.

2.8.3 Keimungsrate

Die Keimungsrate wurde an Tag 5 des Experiments bestimmt. Alle Samen, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht gekeimt waren, wurden für die weiteren Messungen nicht berücksichtigt. Die Keimungsrate wurde berechnet nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Keimungsrate}(\%) = \frac{\text{Anzahl nicht gekeimter Samen}}{\text{Gesamtanzahl Samen}} * 100$$

2.8.4 Überlebensrate

Auch die Überlebensrate wurde im Zuge der Bestimmung des BBCH-Indexes gemessen. Dazu wurde an jedem Zeitpunkt notiert, wie viele Pflänzchen tot waren. Als tot galten Pflänzchen mit chlorotischen oder vertrockneten Blättern bzw. vertrocknetem Hypokotyl. Die Überlebensrate wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Überlebensrate}(\%) = \frac{(\text{Gesamtanzahl Pflänzchen} - \text{tote Pflänzchen})}{\text{Gesamtanzahl Pflänzchen}} * 100$$

Die nicht gekeimten Samen wurden nicht berücksichtigt.

2.8.5 Frischgewichtsbestimmung

Für die Bestimmung des Frischgewichts wurden Sterilkulturplatten mit 15 Samen verwendet und unter den gleichen Bedingungen wie in 2.8.1 angezogen. Es wurde an den Zeitpunkten Tag 7, Tag 14 und Tag 19 gemessen. Für jeden dieser Zeitpunkte wurden pro Genotyp und Lichtbedingung 5 biologische Replikate (ein Replikat entspricht einer Sterilkulturplatte mit 15 Samen) verwendet, sowohl für induzierende wie für Kontrollbedingungen. Das Frischgewicht pro Pflänzchen wurde bestimmt, indem alle Pflänzchen einer Platte gemeinsam gewogen wurden und anschließend durch die Anzahl an Pflänzchen geteilt wurde. Dieses Vorgehen war notwendig, damit der minimal detektierbare Unterschied der Feinwaage (Kern ABT 220-4 M, d = 0,1 mg) nicht unterschritten wurde. Somit entstand ein mittleres Frischgewicht pro Pflänzchen für jede Sterilkulturplatte. Dieses wurde für die weiteren Berechnung und die statistische Auswertung eingesetzt.

2.9 Metabolitmessung

2.9.1 Stärkemessung

Für die Extraktion der Stärke und der löslichen Zucker wurde 20 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial verwendet. Es wurde die Methode von Hendriks und Kollegen mit leichten Veränderungen genutzt (Hendriks et al., 2003). Zu dem noch tiefgefrorenen Material wurden 250 µl 80% EtOH gegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Proben für mindestens 30 min bei 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden die Proben für 5 min bei RT und 21.000xg zentrifugiert. Der Überstand (enthält u.a. die löslichen Zucker) wurde abgenommen auf Eis aufbewahrt. Das Pellet (enthält u.a. Stärke, Proteine, Zellwand) wurde wiederum in 250 µl 80% EtOH gelöst und für mindestens 30 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde verfahren wie nach dem ersten Erhitzen. Die Überstände wurden vereinigt. Das jeweilige Pellet wurde in 250 µl 50% EtOH gelöst und auf dieselbe Weise wie zuvor behandelt. Auch der dritte Überstand wurde mit den beiden ersten vereinigt, so dass am Ende ein Volumen von 750 µl pro extrahierter Probe an zuckerhaltigen Überständen vorhanden war. Diese wurden für die Zuckermessung (siehe 2.9.2) verwendet. Das jeweilige Pellet wurde für 20 min in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei RT getrocknet. Zum Entspiralisieren der Stärke wurde das Pellet anschließend für 1 h bei 95 °C und 1400 UpM in 400 µl 0,1 M NaOH inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung mit einem passenden Volumen HCl/Acetate-Puffer (0,5 M HCl + 0,1 M Acetat (pH 4,9 [NaOH])) neutralisiert. Für die Hydrolyse der Stärke wurden 40 µl der neutralisierten Lösung mit 110 µl Degradationsmix (50 mM Acetat pH 4,9 [NaOH]; 0,35 U/Probe Amyloglucosidase; 0,44 U/Probe α-Amylase) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Messung des Stärkegehalts wurden 40 µl der verdauten Stärkelösung mit 160 µl Determinationsmix (0,1 M HEPES pH 7[KOH]; 3 mM MgCl₂; 1,3 mM NADP⁺; 3,1 mM ATP; 0,14 U/Probe Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) in einer Mikrotiterplatte gemischt. Es wurden 2

technische Replikate pro Probe vorbereitet. Anschließend wurde die Absorption bei 340 nm in einem Anthos HT - III Reader gemessen (Messintervall 1 min) bis die OD stabil war (= Baseline). Zur Messung der aus der Stärke entstandenen Glukose wurden pro Well 0,45 U Hexokinase zugegeben. Wiederum wurde die OD gemessen bis sie stabil war (= Hexokinase-Plateau).

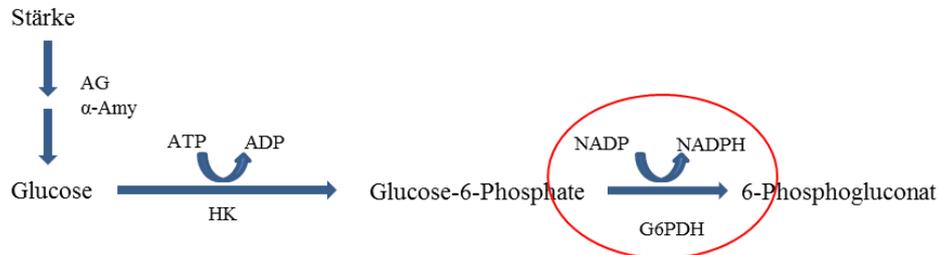


Abb.5: Reaktionsschema Stärkemessung

Die Stärkeextrakte wurden durch AG und α-Amylase verdaut. Die entstandene Glukose wurde mit Hilfe von ATP durch die HK in Glukose-6-Phosphat (G6P) umgesetzt. Dieses wurde durch die G6PDH in 6-Phosphogluconat umgesetzt. Bei dieser Reaktion wird stöchiometrisch auch ein Mol NADPH pro umgesetztem G6P gebildet, welches durch Absorptionsmessung detektiert werden kann. AG: Amyloglukosidase; α-Amylase: α-Amylase; HK: Hexokinase; G6PDH: Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase.

Zur Berechnung des Stärkegehaltes wurde folgende Formel benutzt: $c = \frac{E}{\epsilon * d}$, wobei $E = \Delta OD$ (OD [Hexokinase-Plateau] - OD [Baseline]), ϵ und d siehe 2.7.4. c entspricht jetzt der Stoffmenge an umgesetztem $NADP^*$, welche direkt proportional ist zur Menge an gebildeter Glukose. Diese wiederum ist ein Maß für die Stärke, welche sich in den Proben befand (siehe Abb.5). Zuletzt wurden die verschiedenen Verdünnungen berücksichtigt und c auf das Frischgewicht der jeweiligen Probe bezogen um ein Ergebnis in $\mu\text{mol Glukose g}^{-1}$ (Frischgewicht) zu erhalten.

2.9.2 Zuckermessung

Für die Messung der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose wurden die vereinigten Überstände aus der Ethanol Extraktion (siehe 2.9.1) verwendet. Von diesen wurden 50 μl mit 200 μl Mastermix (50 mM HEPES pH 7 [KOH]; 5 mM MgCl_2 ; 0,7 mM NADP^+ ; 1,75 mM ATP; 0,7 U/ml G6PDH) in einer Mikrotiterplatte gemischt. Es wurden 2 technische Replikate pro Probe angefertigt. Anschließend wurde die OD bei 340 nm in einem Anthos HT – III Reader gemessen (Messintervall 1 min), bis sie stabil war (= Baseline). Dann wurden in jedes Well 0,5 U Hexokinase pipettiert und wiederum die OD bei 340 nm gemessen bis sie stabil war (= Glukose-Plateau). Als Nächstes wurden in jedes Well 1,2 U Phosphoglucoisomerase gegeben und die OD bei 340 nm gemessen bis sie stabil war (= Fruktose-Plateau). Als Letztes wurden in jedes Well 120 U Invertase gegeben und wie zuvor verfahren (= Saccharose-Plateau). Die Berechnung erfolgte wie die Berechnung des Glukosegehaltes in 2.9.1, wobei für Glukose der OD Unterschied zwischen der Baseline und dem Glukose-Plateau als E verwendet wurde, für Fruktose der Unterschied zwischen dem Fruktose-Plateau und dem Glukose-Plateau und für Saccharose der Unterschied zwischen dem Saccharose-Plateau und dem Fruktose-Plateau. Bei der Berechnung des Saccharose-Gehaltes wurde der Wert durch den Faktor 2 dividiert, da pro Moleküle Saccharose zwei Moleküle NADPH/H^+ gebildet werden (siehe Abb.6).

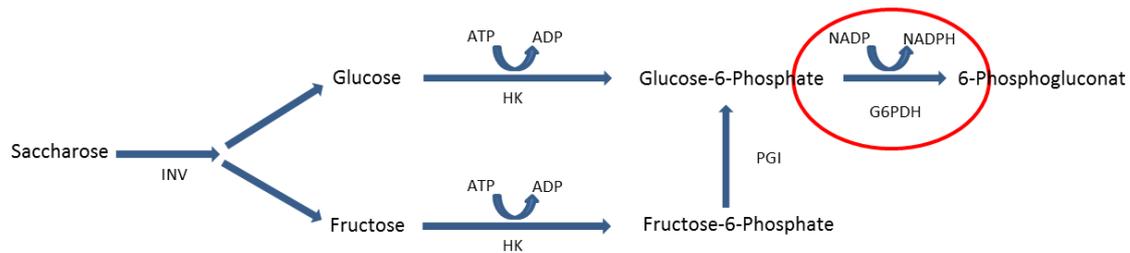


Abb.6: Reaktionsschema Zuckermessung

Die Messung der löslichen Zucker erfolgte sequentiell: Zunächst wurde der Ethanol-Extrakt mit einem Mastermix versehen, welcher die mit dem Photometer messbare Reaktion katalysiert (roter Kreis). Als erster Zucker wurde der Glukose-Gehalt gemessen, dazu wurde jede Probe mit 0,5 U HK versetzt. Nach Abschluss dieser Reaktion wurde der Fruktose-Gehalt durch Zugabe von 1,2 U PGI gemessen. Abschließend wurde der Saccharose-Gehalt durch Zugabe von 120 U INV gemessen.

G6PDH: Glukose-6-Phosphate Dehydrogenase; HK: Hexokinase; INV: Invertase; PGI Phosphoglukoisomerase

2.9.3 Messung der Purin-Nukleotide ATP, ADP und AMP

Um den Energiestatus der amiR-SNF4 Linie bestimmen zu können, wurden ATP, ADP und AMP mit Hilfe einer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt. Die Methode ist angelehnt an eine von Haink und Deussen publizierte Methode (Haink and Deussen, 2003). Dabei wird die Derivatisierung von Purin-Nukleotiden unter Verwendung von Chloroacetaldehyd zu einem Imidazopurine-Derivat genutzt (Kochetkov et al., 1971), welches mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Anregungswellenlänge: 280 nm; Emissionswellenlänge: 410 nm) nachgewiesen werden kann. Bei der Auswahl der Säule sowie den Bedingungen für den Lauf wurde ein Protokoll der AG Pflanzenphysiologie der TU Kaiserslautern unter Leitung von Prof. Neuhaus verwendet. Bei der Ernte des Pflanzenmaterials wurde darauf geachtet, dass diese so schnell wie möglich durchgeführt wurde um möglichst wenig Veränderung im Nukleotid-Spiegel artifiziell zu erzeugen.

Zur Extraktion der Purin-Nukleotide wurden im Kühlraum 50 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial von 7 Tage alten Keimlingen der induzierten amiR-SNF4 Linie sowie der Kontrolle mit 600 µl einer kalten (4 °C) 16% Trichloressigsäure-Lösung (+ 5 mM EGTA) versetzt und für 1 h bei 4 °C gevortext. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C mit 21.000xg zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Um die Säure zu entfernen wurde der Überstand anschließend mit 4 ml 4 °C kaltem, mit H₂O gesättigtem Diethylether (DEE) versetzt und gevortext. Zur besseren Trennung der Phasen wurde für 5 min bei 4 °C mit 3.220xg zentrifugiert. Die obere, organische Phase wurde verworfen und die untere Phase wie zuvor gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die untere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der pH Wert wurde mit Hilfe einer 5 M KOH, 1 M Triethanolamin Lösung auf 6 - 7 eingestellt. Zum Schluss wurden die Proben für mindestens 1 h unter den Abzug gestellt, damit der verbliebene DEE verdampfen konnte.

Zur Derivatisierung wurden 85 µl des neutralisierten Extrakts mit 20 µl Citrat-Puffer (62 mM Zitronensäure, 76 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 5,4 [KOH]) und 20 µl 50% (v/v) Chloroacetaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt, gevortext und für 15 min bei 80 °C inkubiert. Nach Abkühlen für 1 min auf Eis wurden die Proben für 4 min bei RT mit 18.000xg zentrifugiert.

Für die chromatographische Trennung wurde eine 250/4 Nucleodur 100-5 C18 ec Säule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Trennung wurde mit Hilfe einer Rheos 2200 Pumpe (Flux Instruments, Basel, Schweiz) kombiniert mit einem HTC PAL Autosampler (PAL System, Zwingen, Schweiz) und einem LaChrom Elite L-2485 Fluoreszenz Detektor (Hitachi, Berkshire, England) durchgeführt. Die Bedingungen für die Chromatographie waren wie folgt: Flussrate 800 µl/min; Injektionsvolumen 20 µl; Gradient: 0 min (100% A / 0% B); 18 min (86% A / 14% B); 36 min (56% A / 44% B); 38,4 min (17,5% A / 82,5% B); 39,6 min (0% A / 100% B); 42 min (0% A / 100% B). Es wurde eine geeignete Vorsäule (HPLC-Vorsäule EC 4/3 UNIVERSAL RP Länge 4 mm, Ø 3 mm von Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Mobile Phase A bestand aus 10 mM KH₂PO₄ + 5,7 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat bei einem pH Wert von 5,4 (KOH), die mobile Phase B aus 90% (v/v) Acetonitril. Die derivatisierten Nukleotide wurden auf Grund ihrer Fluoreszenz detektiert und mit Hilfe interner Standards und einer Eichkurve quantifiziert. Dazu wurde mit der Xcalibur™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) Software die Fläche der einzelnen Peaks ermittelt und unter Verwendung der Eichgeraden die Menge jedes Nukleotides bestimmt. Schließlich wurden die Verdünnungsschritte berücksichtigt und die Stoffmenge am Ende auf das eingesetzte Frischgewicht bezogen. Neben den Mengen an einzelnen Nukleotiden wurden auch die Verhältnisse untereinander sowie der „energy charge“ (Energieladung E) nach Atkinson berechnet (Atkinson, 1968):

$$E = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

wobei [A-T/D/M-P] dem jeweiligen Nukleotid in nmol/g FG entspricht.

2.9.4 Metabolitprofil via GC-TOF-MS

Für diese Versuche wurden 7 Tage alte Keimlinge der induzierten amiR-SNF4 Linie sowie der Kontrolle verwendet. Diese wurden in Sterilkultur entweder auf 0,5x MS-Medium (siehe 2.2.3) oder auf 0,5x MS-Medium, das 1% Saccharose enthielt, in einem Klimaschrank angezogen. Die Lichtintensität betrug 10 µE bzw. 50 µE unter Kurztagsbedingungen (8 h / 16 h). Die Erntezeitpunkte waren Ende der Nacht und Ende des Tages. Pro Ansatz wurden 5 biologische Replikate geerntet. Von diesen wurden 40 mg geretschtes, gefrorenes Material für die GC-TOF-MS Analyse verwendet. Die Analysen wurden von Dr. Martin Lehmann (Metabolomics Service, AG Leister, Biozentrum der LMU München) durchgeführt. Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Metabolite wurden nach einer schon beschriebenen, etwas modifizierten Methode extrahiert und derivatisiert (Erban et al., 2007; Lisec et al., 2006; Roessner et al., 2001). Für die Extraktion wurde die oben angegebene Menge an gefrorenem Pflanzenmaterial mit 115 µl eiskaltem (-20 °C) Methanol gemahlen, das 10 µl Ribitol (0,2 mg/ml in Wasser) und 10 µl ¹³C-Sorbitol (0,2 mg/ml in Wasser) enthielt, die als interne Standards für die spätere Quantifizierung der Metabolite verwendet wurden. Nach Inkubation bei 70 °C für 15 min wurden die Extrakte vorsichtig mit 64 µl Chloroform und 128 µl Wasser gemischt. Um die polare und die unpolare Phase zu trennen wurden die Proben für 15 min bei 25.000xg zentrifugiert. Für die weiteren Analysen

wurden 30 µl der oberen, polaren Phase *in vacuo* getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl Methoxyaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridin) gelöst und für 90 min bei 37 °C derivatisiert. Nach Zugabe von 20 µl BSTFA (N,O-Bis[trimethylsilyl]-trifluoroacetamid), welches 2,5 µl eines Retentionszeitsstandardmixes (n-Decan, n-Dodecan, n-Pentadecan, n-Nonadecan, n-Docosan, n-Octacosan, n-Dotriacontan) enthielt, wurde der Mix für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde von jeder Probe 1 µl in das GC-TOF-MS System (Pegasus HT, Leco, St Joseph, USA) injiziert. Die Proben wurden von einem Autosampler System (Combi PAL, CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz) derivatisiert und injiziert. Helium wurde als Trägergas mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Gaschromatographie wurde mit einer Agilent GC (7890A, Agilent, Santa Clara, USA) durchgeführt unter Verwendung einer 30 m VF-5ms Säule und einer 10 m EZ Vorsäule. Die Injektionstemperatur des CIS Injektors (CIS4, Gerstel, Mühlheim, Germany) stieg mit einer Rate von 12 °C/s von anfangs 70 °C auf 275 °C. Die „Transfer Line“ und die Ionenquelle wiesen eine Temperatur von 250 °C auf. Die Temperatur des Ofens stieg von anfangs 70 °C stetig auf 320 °C mit einer Rate von 9 °C/min. Um Verunreinigungen durch das Lösungsmittel zu vermeiden wurde die Lösungsmittelverzögerung auf 340 s eingestellt. Wegen der physikalischen und chemischen Eigenschaften der verschiedenen Metabolite wurde die Probe auf der Säule nach Zeit getrennt. Metabolite, welche die Säule durchlaufen hatten, wurden in das TOF-MS entlassen. Die Verbindung von GC und TOF-MS wurde genau wie die Ionenquelle, in der die durchströmenden Metabolite durch einen Ionenpuls von 70 eV ionisiert und fraktioniert wurden, auf eine Temperatur von 250 °C eingestellt. Die geladenen Massenfragmente flogen durch das Flugrohr, an dem ein Vakuum anlag, bis sie den Massendetektor erreichten. Jedes Fragment besitzt abhängig von seinem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) eine spezifische Flugzeit, bis es den Detektor erreicht. Die Massenspektren wurden mit 20 Scans pro Sekunde aufgenommen mit einem m/z 35 – 800 Scanbereich. Die Chromatogramme und Massenspektren wurden mit Hilfe von ChromaTOF 4.5 und der TagFinder 4.1 Software ausgewertet (Luedemann et al., 2008).

2.9.5 Metabolitprofil via LC-MS/MS

Für die LC-MS/MS Analyse wurden die gleichen Proben verwendet wie für die GC-MS/MS Analyse. Die Messung an sich wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm von der Abteilung Stitt durchgeführt. Die Extraktion und die Messung wurden nach bestehenden Protokollen durchgeführt (Arrivault et al., 2009; Lunn et al., 2006), wobei das Extraktionsprotokoll leicht modifiziert wurde. Für die Extraktion wurden 15 – 20 mg geretschtes, gefrorenes Pflanzenmaterial eingesetzt. Diese wurde, während es in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff stand, mit 175 µl einer eiskalten (0 °C) $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ Mischung (3:7, v/v) versetzt. Anschließend wurde die immer noch gefrorene Probe in der Hand aufgetaut. Währenddessen wurde sie mit einem Plastikpistill durchmischt. Die aufgetaute Probe wurde auf Eis gestellt und der Plastikpistill mit ein wenig der $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ Mischung abgespült. Auch diese Flüssigkeit wurde zur Probe gegeben. Die Proben wurden anschließend

für 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Gefrierschrank gelagert. Zwischendurch wurden sie 2 – 3-mal gevortext. Im Anschluss wurden $350\text{ }\mu\text{l}$ eiskaltes ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) Wasser zugegeben und die Proben unter gelegentlichem Durchmischen auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Als nächstes wurden sie für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $13.000\times g$ zentrifugiert. Die obere, wässrige Methanolphase wurde in ein neues Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Die untere CHCl_3 -Phase wurde erneut wie oben beschrieben mit $300\text{ }\mu\text{l}$ eiskaltem ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) Wasser extrahiert. Wiederum wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit der vorigen vereinigt. Abschließend wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge bei $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Die LC-MS/MS Messung wurde durchgeführt wie in Lunn et al. (2006) und Arrivault et al. (2009) beschrieben (Arrivault et al., 2009; Lunn et al., 2006).

2.10 Chlorophyllfluoreszenzmessung

Für die Chlorophyllfluoreszenzmessung wurden 7 bzw. 14 Tage alte Keimlinge der induzierten amiR-SNF4 Linie sowie der Kontrolle aus Sterilkultur verwendet. Diese wurden vor der jeweiligen Messung mindestens 20 min dunkeladaptiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Imaging PAM M-series Chlorophyll Fluorometers (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland). Es wurden zwei unterschiedliche Messungen durchgeführt. Zum einen wurde die Anpassung an Hochlichtstress überprüft. Dazu wurde in den dunkeladaptierten Keimlingen zunächst die maximale PS II Quanteneffizienz F_v/F_m bestimmt. Anschließend wurden sie für 10 min mit einer Lichtintensität von $56\text{ }\mu\text{E}$ inkubiert. Am Ende dieser Zeit erfolgte die Bestimmung der effektiven Quantenausbeute des PS II („Yield Y“). Im Anschluss wurden die Pflanzen für 20 min mit der maximal möglichen Lichtintensität (ca. $1200\text{ }\mu\text{E}$) inkubiert. Nach einer fünfminütigen Regeneration im Dunkeln wurde wiederum der Yield gemessen. Diese Hochlichtsequenz wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Danach erfolgte eine abschließende Regenerationsphase für 30 min im Dunkeln, bei der alle 10 min eine Messung der effektiven PS II Quantenausbeute erfolgte. Die Berechnung der einzelnen Parameter PS II Quantenausbeute (Yield), reguliertes nicht-photochemisches Quenching (NPQ) und nicht reguliertes nicht-photochemisches Quenching (NO) erfolgte automatisch durch die zum Gerät gehörende Software. Die zweite Messung war eine sogenannte Induktionskurve mit Regeneration. Diese Art der Messung ist in der Software voreingestellt und nur einzelne Parameter wurden geändert. Die Lichtintensität wurde auf $56\text{ }\mu\text{E}$ eingestellt, die Dauer der Belichtungsphase auf 10 min und die Dauer der Regenerationsphase auf 15 min. Kurz zusammengefasst wird bei dieser Art der Messung eine dunkeladaptierte Probe mit einer definierten Lichtintensität inkubiert bis sich ein Gleichgewicht im Elektronenfluss eingestellt hat. Anschließend wird auch noch die Regeneration des photosynthetischen Apparates im Dunkeln gemessen. Es wurden dieselben Parameter wie im Hochlichtexperiment bestimmt.

2.11 Atmungsmessung

Für die Atmungsmessungen wurden 7 Tage alte Keimlinge der induzierten amiR-SNF4 Linie sowie der Kontrolle aus Sterilkultur verwendet. Von diesen wurde am Ende der Nacht das Hypocotyl mit den

Keimblättern geerntet, indem die Wurzel mit einer Rasierklinge entfernt wurde. Ungefähr 25 mg Pflanzenmaterial wurden anschließend im Dunkeln in ein Gläschen gegeben, welches 1,9 ml 50 mM MES-Puffer pH 6,5 [KOH] enthielt. Zusätzlich enthielt jeder Ansatz einen Magnetrührfisch um eine optimale Durchmischung zu gewährleisten. Die Gläschen wurden anschließend luftdicht verschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass so viel Puffer im Gläschen war, dass sich auch direkt unterhalb des Deckels keine Luft mehr befand. Die Sauerstoffmessung wurde mit Hilfe eines OXY-4 mini Sauerstoffmessgerätes (PreSens Precision Sensing, Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Pro Versuch wurde immer vier Ansätze gemessen; je zweimal eine Kontrolle und zweimal die induzierte amiR-SNF4 Linie. Die Sensoren wurden bei jeder Messung kalibriert. Es wurde so lange gemessen bis die Sauerstoffsättigung nicht mehr fiel. Für die Auswertung wurde die Sauerstoffabnahme in $\text{nmol O}_2/\text{min} \cdot \text{g FG}$ berechnet. Dazu wurde eine O_2 -Löslichkeit von 9,08 mg pro l 50 mM MES-Puffer angenommen. Dieser Wert wurde der zum Gerät gehörenden Betriebsanleitung entnommen. Damit erhält man pro Gläschen einen O_2 -Gehalt von 539,6 nmol, welcher einer O_2 -Sättigung von 100% entspricht. Mit diesem Wert kann per Dreisatz die Abnahme des O_2 -Gehaltes in nmol berechnet werden. Schließlich wurde diese Abnahme noch auf die Zeit und das entsprechende Frischgewicht bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Überprüfung einer unbekanntem T-DNA Insertionslinie für AKIN β

Nach derzeitigem Erkenntnisstand gibt es keine Linien, in denen eine Untereinheit des SnRK1-Komplexes komplett ausgeschaltet ist. Dies gilt auch für AKIN β . Die Arbeitsgruppe von Prof. C. Koncz (Kooperationspartner bei diesem Projekt) am Max-Planck Institut für Züchtungsforschung in Köln hat dies im Vorfeld bereits überprüft (siehe Abb.7a, GK 364E und SALK 074210). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine bisher unbekannte T-DNA Insertionslinie (SALK_205800c; Bestellnummer N695110; ab jetzt: *snf4*) untersucht. Diese wurde mittels PCR auf das Vorhandensein der Insertion überprüft. In Abb.7c ist zu erkennen, dass von einer zufälligen Auswahl von *snf4*-Pflanzen alle positiv auf die Insertion und negativ auf das Vorhandensein des *akin β* -Wildtypgens getestet wurden. Anschließend wurden einige dieser Pflanzen mit Hilfe einer qRT-PCR auf das Vorhandensein des *akin β* -Transkripts getestet. Wie in Abb.7d zu sehen ist, konnte dieses mittels qRT-PCR in allen Linien nachgewiesen werden. Auch phänotypisch weisen die *snf4*-Pflanzen keinen Unterschied zum Wildtyp auf (siehe Abb.7b). Daher wurde mit dieser Linie nicht weitergearbeitet.

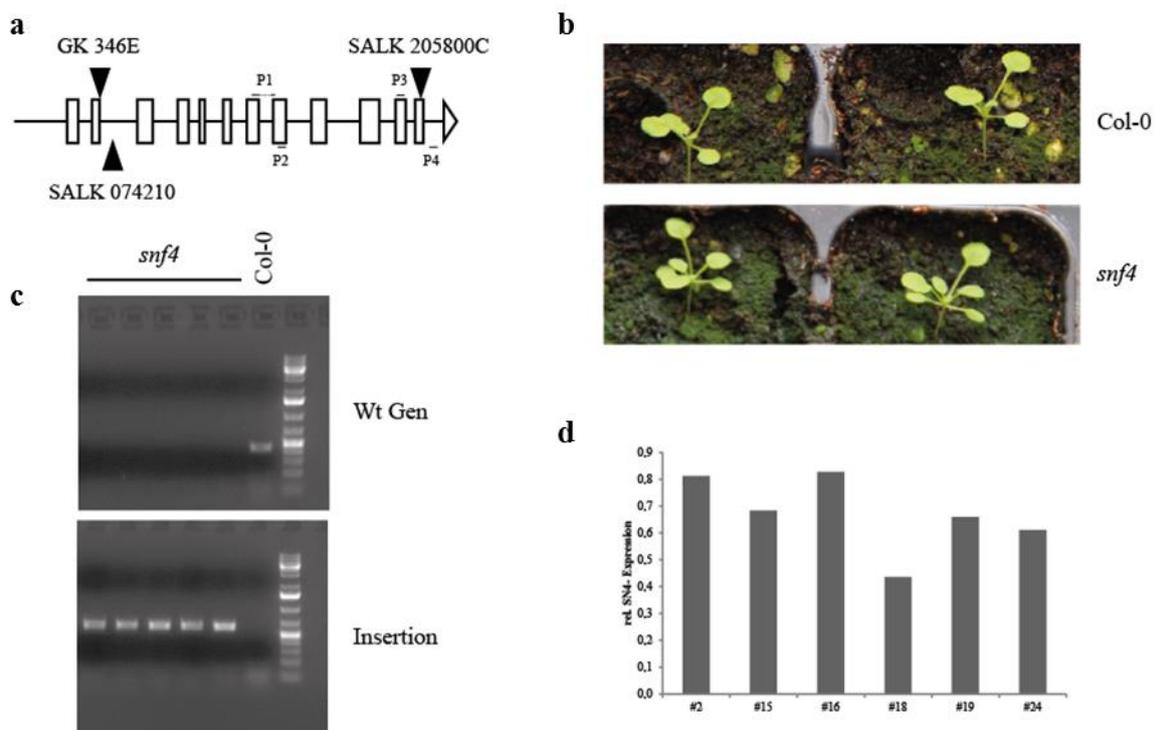


Abb.7: Überprüfung von SALK_205800c (*snf4*)

a) Schematische Zeichnung von At1g09020 (AKIN β) mit drei verschiedenen Insertionen (GK 346E, SALK 074210, SALK 205800c). Die beiden erstgenannten Linien sind bereits bekannt, die dritte Linie wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft.

P1-P4: Primer, wobei P1: SNF4fwd; P2: SNF4rev; P3: SALKfwd; P4: SALKrev.

b) Phänotyp von 14d alten *Col-0* und *snf4*-Pflänzchen in Erdkultur, die in einem Gewächshaus angezogen wurden.

c) T-DNA Insertionsprüfung mittels PCR in 14 Tage alten *Col-0* und *snf4*-Pflänzchen aus Erdkultur; oberer Teil: Wt Gen; unterer Teil: Insertion; Spuren 1-5: *snf4*-Proben; Spur 6: Wildtyp *Col-0*

d) Relatives AKIN β -Transkriptlevel (relativ zum Wildtyp) in zufälligen *snf4*-Pflanzen mittels qRT-PCR, die zuvor auf das Vorhandensein der T-DNA Insertion positiv getestet wurden.

3.2 Überprüfung der Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes

Zunächst wurde die Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes (siehe 2.3) auf ihre Wirksamkeit getestet. Neben der Bestimmung des Expressionslevels von *akinβγ* (=SNF4, synonyme Bezeichnung) wurde auch das Proteinlevel mittels Western Blots überprüft.

3.2.1 Induktion in Sterilkultur

Die Wirksamkeit des amiR-SNF4 Konstruktes wurde zunächst auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dazu wurde in 7 Tage alten Keimlingen die Menge an noch vorhandener *akinβγ*-mRNA bei Anzucht auf 10 μM β-Estradiol mit Hilfe von qRT-PCR gemessen (siehe Abb.8a).

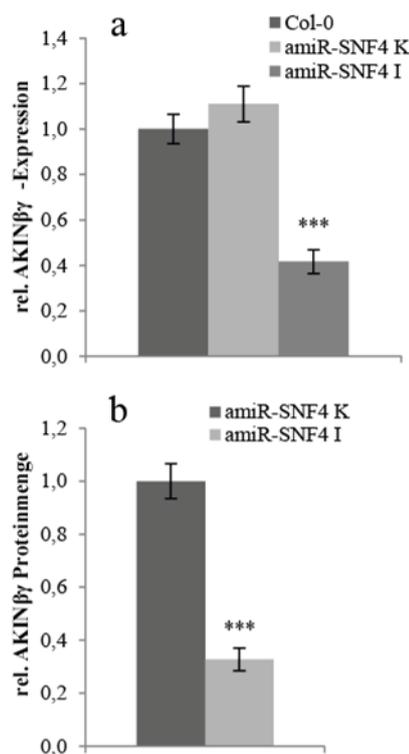


Abb.8: Nachweis der Induktion in 7 Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen nach Zugabe von 10 μM β-Estradiol

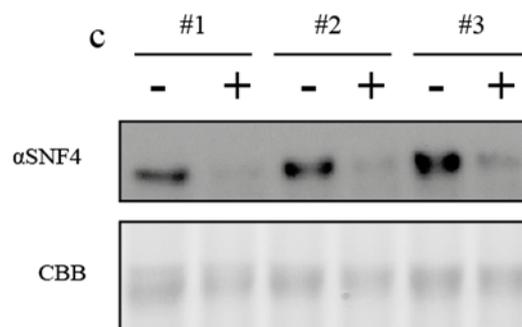
a) Relatives Expressionslevel des *akinβγ*-Transkriptes

b) relative AKINβγ-Proteinmenge; gemessen durch Quantifizierung des nebenstehenden (und weiterer) Western Blots

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β-Estradiol)

c) Western Blot zum Nachweis des AKINβγ-Proteins in amiR-SNF4 Keimlingen; oberer Teil: αSNF4 (AS09 463); unterer Teil: Coomassie Staining (CBB)

- : Kontrolle; +: Induziert (10 μM β-Estradiol); ***: $p < 0,001$ (Students t-Test; $n = 18-20$ (a) bzw. 14 (b)); Fehlerbalken zeigen SF.



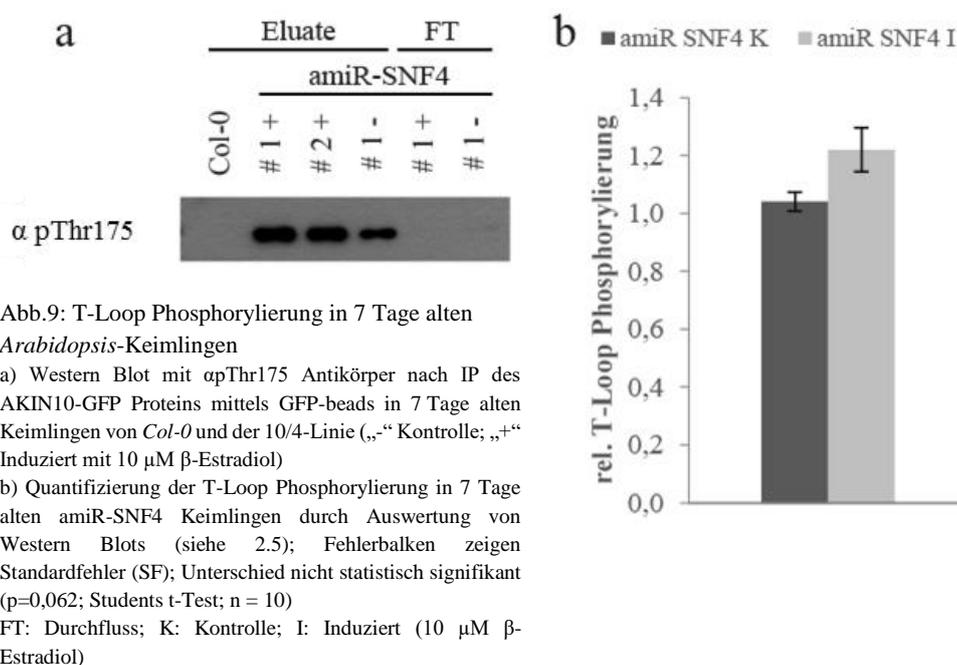
Die Induktion des RNAi-Konstruktes führt zu einer Reduktion des mRNA-Levels von *akinβγ* um 60% – 70%. Unter Kontrollbedingungen ist in der amiR-SNF4 Linie kein Unterschied zum Wildtyp *Col-0* messbar. Im letzten Jahr der Arbeit war schließlich auch ein Antikörper zum Nachweis des AKINβγ-Proteins verfügbar. Damit konnte auch auf Proteinebene der Nachweis erbracht werden, dass die Menge an AKINβγ signifikant um ungefähr 70% im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist (siehe Abb.8 b + c). Diese Art der Induktion (Zugabe von 10 μM β-Estradiol direkt ins Wachstumsmedium von Beginn der Aussaat an; siehe 2.3.1) war somit erfolgreich und wurde als Standardansatz für alle Versuche verwendet. Es wurden auch höhere Konzentrationen als die hier verwendeten 10 μM β-Estradiol getestet (Daten nicht gezeigt). Die Wirksamkeit der Induktion erhöhte sich dadurch aber nicht.

3.2.2 Andere Induktionssysteme

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit auch verschiedene, andere Induktionssysteme (Sprühinduktion, Hydroponics) getestet (Daten nicht gezeigt). Diese zeigten aber eine wesentlich geringere Wirksamkeit als die hier beschriebene Induktion in Sterilkultur. Deshalb wurde mit diesen Systemen nicht weiter gearbeitet.

3.3 T-Loop Phosphorylierung

Die Kinase-Aktivität von SnRK1 ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus der α -Untereinheiten (Harthill et al., 2006; Mackintosh et al., 1992). Um diesen zu überprüfen, wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch ist für die phosphorylierte Form von AMPK α , der α -Untereinheit des SnRK1-Orthologs von Säugetieren. Dieser wurde zunächst auf seine Spezifität für die α -Untereinheiten von Pflanzen getestet. In Abb.9a ist zu sehen, dass der Western Blot nach zuvor durchgeführter Immunpräzipitation eine deutliche Protein-Bande bei der erwarteten Größe von 85 kDa für das mit GFP markierte AKIN $\beta\gamma$ -Protein nur in den Eluaten der amiR-SNF4 Linie zeigt. In den beiden Durchfluss-Proben und in der Wildtyp-Probe ist keine Bande zu sehen. Dieser Antikörper wurde außerdem erfolgreich von anderen Gruppen in Pflanzen eingesetzt (Nunes et al., 2013; Shen et al., 2009). Deshalb wurde er für die weiteren Versuche zum Phosphorylierungsstatus von SnRK1 eingesetzt. Zur besseren Quantifizierung wurde die Intensität der Banden nach Normalisierung auf die Kontrollprobe zusätzlich auf die Menge an eingesetztem AKIN10 Protein bezogen, die mit Hilfe eines GFP-Antikörpers bestimmt wurde. Dieser erkennt beide Formen von AKIN10, die phosphorylierte und die nicht-phosphorylierte, da mit der GFP-markierten Linie („10/4“ siehe 2.2.1) gearbeitet wurde.



3.3.1 Antwort der T-Loop Phosphorylierung auf verschiedene Zucker im Licht

Zunächst wurde getestet, wie sich der Phosphorylierungsstatus des T-Loops nach Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes ändert. In Abb.9b ist zu sehen, dass AKIN10 in induzierten Pflänzchen um ungefähr 20% mehr phosphoryliert ist als in der Kontrolle.

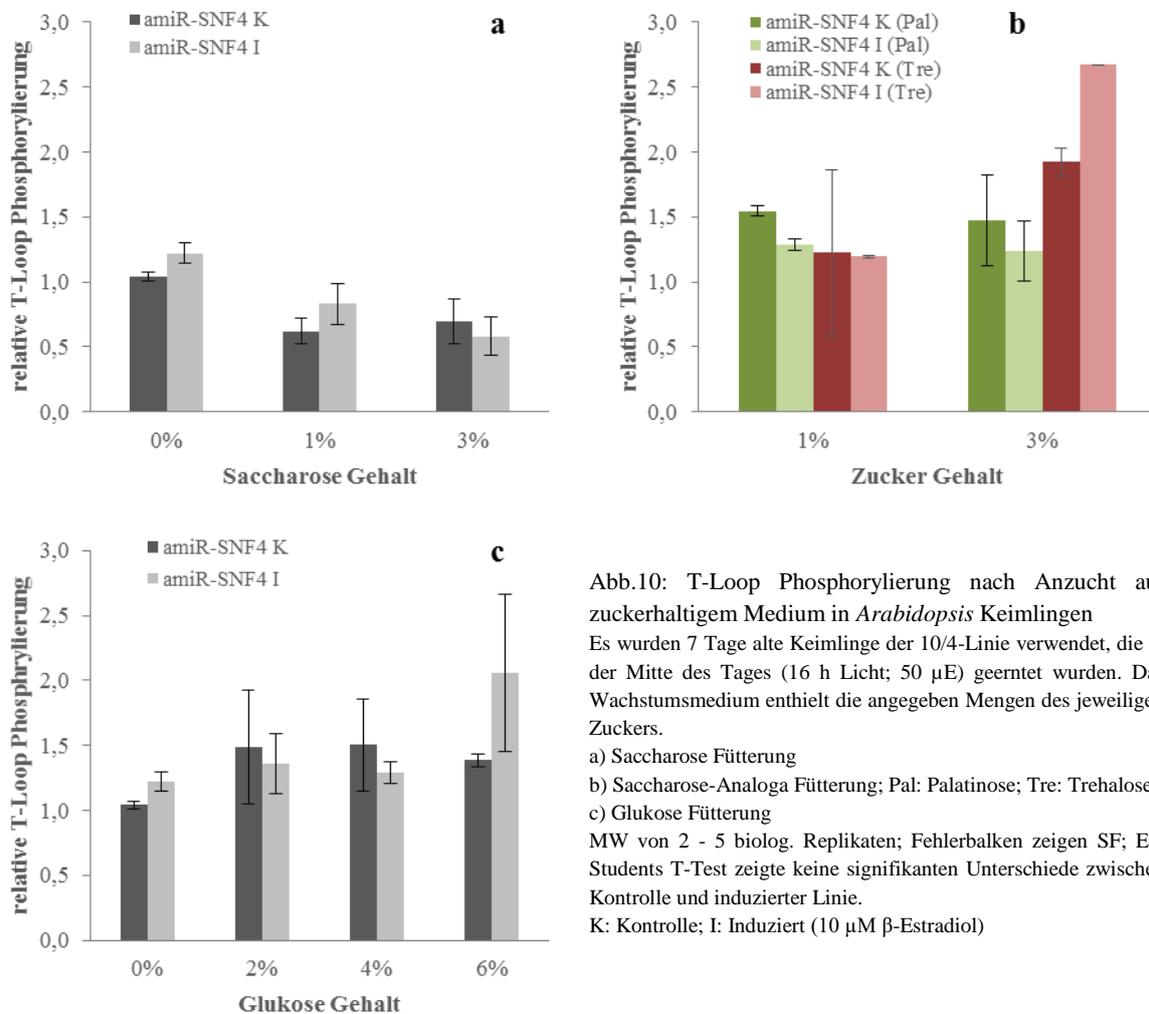


Abb.10: T-Loop Phosphorylierung nach Anzucht auf zuckerhaltigem Medium in *Arabidopsis* Keimlingen

Es wurden 7 Tage alte Keimlinge der 10/4-Linie verwendet, die in der Mitte des Tages (16 h Licht; 50 μ E) geerntet wurden. Das Wachstumsmedium enthielt die angegebenen Mengen des jeweiligen Zuckers.

a) Saccharose Fütterung

b) Saccharose-Analoga Fütterung; Pal: Palatinose; Tre: Trehalose

c) Glukose Fütterung

MW von 2 - 5 biolog. Replikaten; Fehlerbalken zeigen SF; Ein Students T-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und induzierter Linie.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol)

Da in Pflanzen Zucker nicht nur als Metabolite sondern auch als Signalmolekül verwendet wird (Hanson and Smeekens, 2009; Lastdrager et al., 2014), wurde getestet, wie sich der Phosphorylierungsstatus des T-Loops und damit die Aktivität des SnRK1-Komplexes als Antwort auf verschiedene Zucker ändert. In Abb.10a ist die Änderung der T-Loop Phosphorylierung nach Anzucht auf Saccharose-haltigem Medium dargestellt. Es ist zu erkennen, dass diese in der Kontrolle bereits bei Zugabe von 1% Saccharose auf ungefähr 70% im Vergleich zu Keimlingen ohne Saccharose fällt. Eine höhere Saccharose-Konzentration führt nicht zu einer weiteren Verringerung des Phosphorylierungsstatus. Auch in den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen nimmt die T-Loop Phosphorylierung mit steigender Saccharose-Konzentration ab. Bei einem Prozent Saccharose im Medium ist der Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Keimlingen ähnlich ausgeprägt

wie in Keimlingen ohne zusätzlichen Zucker. Bei 3% Saccharose hingegen verschwindet eben dieser Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie.

Um einen osmotischen Effekt auszuschließen, wurden die Keimlinge auch auf Saccharose-Analoga angezogen (Abb.10b). Die Zugabe von Palatinose (Isomaltose) bewirkt keine Verringerung der T-Loop Phosphorylierung, sondern in den Kontrollproben sogar eine leichte Erhöhung. Auch eine Anzucht auf Trehalose führt nicht zu einer Verringerung des Phosphorylierungsstatus. Bei einer Konzentration von einem Prozent Trehalose ist dieser unverändert im Vergleich zu den Proben ohne Zucker. Bei 3% Trehalose erhöht er sich sogar. In einem weiteren Versuch wurden verschiedenen Mengen von Glukose in das Wachstumsmedium gegeben. In Abb.10c ist zu sehen, dass in den Kontrollproben bereits 2% Glukose ausreichen um die Menge an phosphoryliertem AKIN10 im Vergleich zu Proben ohne Zucker zu erhöhen. Eine weitere Erhöhung der Glukose Menge bis zu 6% kann diesen Effekt nicht steigern. In den induzierten Keimlingen bewirkt eine Zugabe 2% - 4% Glukose ins Medium keine deutliche Erhöhung der T-Loop Phosphorylierung. Erst aber einer Konzentration von 6% Glukose im Wachstumsmedium erhöht sich diese deutlich. Allerdings ist dieser Wert mit einem großen Fehler behaftet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Zugabe von Saccharose zu einer Verringerung der T-Loop Phosphorylierung im Wildtyp und in der induzierten amiR-SNF4 Linie führt. Diese ist spezifisch für Saccharose, da Analoga diese nicht hervorrufen. Die Zugabe von Glukose hingegen führt zu einer Erhöhung der T-Loop Phosphorylierung im Wildtyp. Wird nun der Gehalt an AKIN β reduziert, so hat dies auf die Veränderungen in der T-Loop Phosphorylierung nur bei Zugabe von Glukose ins Medium eine Auswirkung. Diese steigt nicht im selben Maße an wie in den Kontrollproben.

3.3.2 Antwort der T-Loop Phosphorylierung auf verschiedene Zucker im Dunkeln

Die obigen Versuche zum Phosphorylierungsstatus von AKIN10 wurden mit Keimlingen durchgeführt, die in der Lichtphase geerntet wurden. Da sich der Stoffwechsel von Pflanzen im Dunkeln von dem Stoffwechsel im Licht unterscheidet, wurde die T-Loop Phosphorylierung auch im Dunkeln untersucht.

In Abb.11a ist zu sehen, dass sich ohne Zugabe von Zucker ins Wachstumsmedium die T-Loop Phosphorylierung im Dunkeln nicht von der im Licht unterscheidet (die abgebildeten relativen Werte sind bezogen auf ein Kontrollprobe, welche im Licht geerntet wurde). Der Wert der Kontrollprobe im Dunkeln (0,92) ist vergleichbar zum Wert der Kontrollprobe im Licht (1,04; siehe Abb.9b). Der Anstieg der T-Loop Phosphorylierung in der induzierten amiR-SNF4 Linie ist im Dunkeln ebenfalls vergleichbar zu dem im Licht beobachteten. Wird Saccharose ins Wachstumsmedium gegeben, dann steigt die T-Loop Phosphorylierung im Dunkeln sowohl in der Kontrolle als auch in der induzierten amiR-SNF4 Linie jedoch an (siehe Abb.11a). Sowohl bei Zugabe von einem Prozent als auch bei Zugabe von drei Prozent Saccharose wird der Anteil an phosphoryliertem AKIN10 in den Kontrollproben im Vergleich zu Keimlingen ohne Zucker verdoppelt. Ähnliches gilt für die induzierten

amiR-SNF4 Keimlinge, auch wenn der Anstieg im Verhältnis zur Kontrolle etwas schwächer ausfällt. Betrachtet man den Phosphorylierungsstatus der Keimlinge, die auf Saccharose-Analoga angezogen und im Dunkeln geerntet wurden (siehe Abb.11b), so fällt für die mit Palatinose gefütterten Keimlingen auf, dass sich in der Kontrolle die T-Loop Phosphorylierung gegenüber nicht gefütterten Keimlingen leicht erhöht. Allerdings ist diese Erhöhung geringer als die in den mit Saccharose gefütterten, im Dunkeln geernteten Pflanzen. In den induzierten, auf Palatinose angezogenen Pflanzen erhöht sich der Phosphorylierungsstatus des T-Loops nur bei einer Konzentration von 3%. Diese Erhöhung ist vergleichbar mit der Erhöhung in den mit 3% Saccharose gefütterten, induzierten Pflanzen. Zugabe von Trehalose ins Wachstumsmedium bewirkt in den Kontrollproben eine leichte Erhöhung der T-Loop Phosphorylierung im Vergleich zu nicht gefütterten Keimlingen. In den induzierten, auf Trehalose angezogenen Keimlingen verändert sich die T-Loop Phosphorylierung nicht.

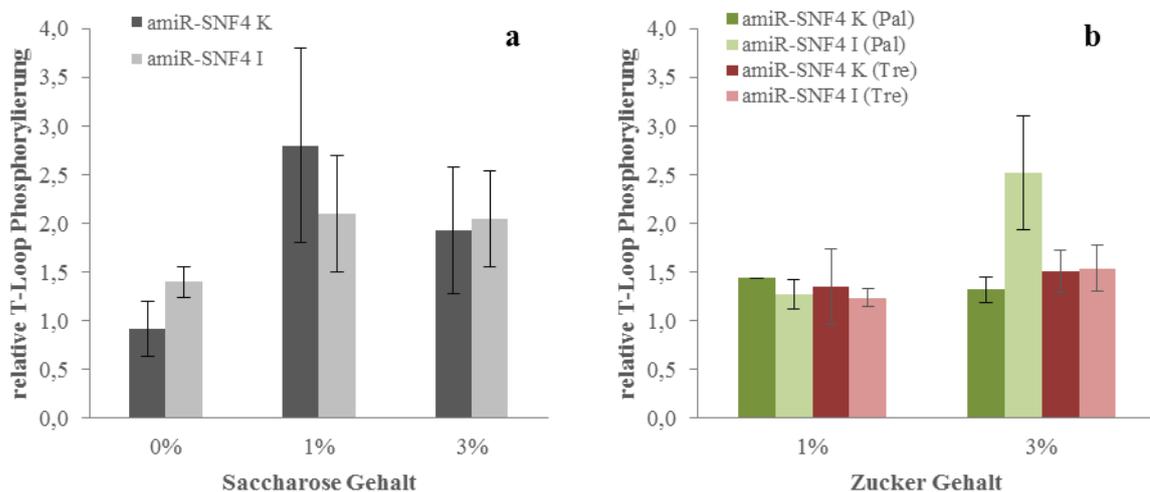


Abb.11: T-Loop Phosphorylierung in *Arabidopsis*-Keimlingen im Dunkeln

Es wurden 7 Tage alte Keimlinge der 10/4-Linie verwendet, die am Ende der Nacht (16 h Licht; 50 μ E) geerntet wurden. Das Wachstumsmedium enthielt die angegebenen Mengen des jeweiligen Zuckers.

a) Anzucht auf Saccharose, b) Anzucht auf Saccharose-Analoga; Pal: Palatinose; Tre: Trehalose

MW von 2 - 3 biolog. Replikaten; Fehlerbalken zeigen SF. Alle Werte wurden auf eine im Licht geerntet Kontrolle ohne Zuckerfütterung normalisiert. Ein Students T-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und induzierter Linie. K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol).

Wird der Phosphorylierungsstatus des T-Loops von AKIN10 bei im Dunkeln geernteten Pflänzchen untersucht, so kann festgehalten werden, dass dieser ohne Zugabe von Zucker sowohl in der Kontrolle als auch in der induzierten amiR-SNF4 Linie ähnlich zu dem im Licht ist. Wird jedoch Saccharose ins Medium gegeben, so steigt die relative Menge an phosphoryliertem AKIN10 in der Kontrolle und in der induzierten amiR-SNF4 Linie deutlich an. Dies wurde bei Fütterung mit Saccharose-Analoga nicht beobachtet.

3.4 Phänotypische Analyse

Da sich auf molekularer Ebene gezeigt hatte, dass die Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes wirksam ist und sich somit das Level an *AKIN β* sowohl auf Transkript- wie auch Proteinebene deutlich

verringert, wenn β -Estradiol im Wachstumsmedium ist (siehe 3.2.1), wurden die amiR-SNF4 Pflänzchen auf phänotypische Veränderungen untersucht. In Abb.12 ist zu sehen, dass nach sieben Tagen die induzierte amiR-SNF4 Linie im Langtag (16 h Licht / 8 h Dunkel) sehr schwache phänotypische Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen aufweist (genaue Anzuchtbedingungen: siehe Tab. 2; induziertes Wachstum). Die Wurzeln sind etwas kürzer und das erste Laubblattpaar ist ein bisschen verzögert in seiner Entwicklung. Es sind aber keine Chlorosen oder tote Pflanzen zu finden. Die nicht induzierte amiR-SNF4 Linie weist keine Veränderungen zur Wildtyp-Kontrolle auf. Die Zugabe von β -Estradiol ins Wachstumsmedium des Wildtyps führt ebenfalls nicht zu Veränderungen.

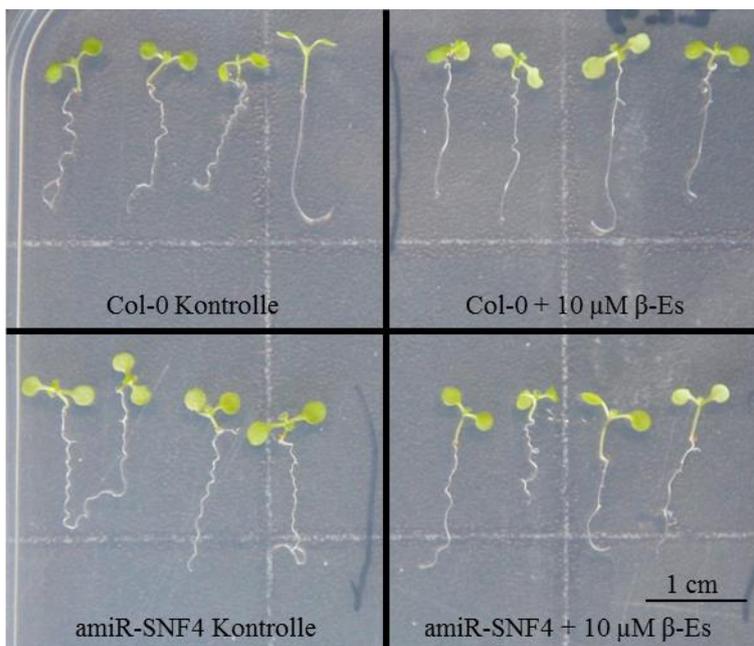


Abb.12: Phänotyp von amiR-SNF4 Keimlingen im Langtag
Aufnahmen von 7d alten Keimlingen der amiR-SNF4 Linie und *Col-0* in Sterilkultur. Sie wurden bei einer Lichtintensität 50 μ E im Langtag (16h Licht) angezogen.
 β -Es: β -Estradiol

Neben der Anzucht im Langtag wurden die amiR-SNF4 Keimlinge auch unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht / 16 h Dunkel) angezogen. Wie in Abb.13 zu sehen ist, verstärkt sich der im Langtag beobachtete Phänotyp. Die Wurzeln sind in der induzierten amiR-SNF4 Linie deutlicher verkürzt gegenüber der Kontrolle verglichen mit den Langtag-Keimlingen. Bei genauerer Betrachtung sind in der Kontrolle auch schon Ansätze des ersten Laubblattpaares zu erkennen, die in der induzierten amiR-SNF4 Linie nicht zu sehen sind.

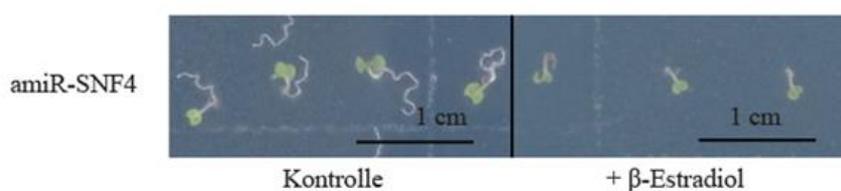


Abb.13: Phänotyp von amiR-SNF4 Keimlingen im Kurztag
Aufnahmen von 7d alten, amiR-SNF4 Keimlingen in Sterilkultur. Sie wurden bei einer Lichtintensität 50 μ E im Kurztag (8h Licht) entweder unter Kontrollbedingungen (Abbildung links) oder auf β -Estradiol-haltigem Medium (10 μ M; Abbildung rechts „+ β -Estradiol“) angezogen.

Um den beobachteten, schwachen Phänotyp zu replizieren und möglicherweise zu verstärken, wurden diese Versuche mehrmals mit leicht veränderten Bedingungen wiederholt. Im Zuge dessen wurde durch Zufall festgestellt, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie einen noch stärkeren Phänotyp (Chlorosen, einige bereits tote Keimlinge) aufweist, wenn sie versehentlich mehrere Tage im Labor wächst (siehe Abb.14). In der Kontrolle hingegen zeigen die Keimlinge keine Anzeichen von Apoptose. Die Keimblätter sind noch grün und es wurde auch langsames Wachstum beobachtet. Als Grund für den verstärkten Phänotyp in der induzierten amiR-SNF4 Linie wird die niedrige Lichtintensität (ca. 10 μE ; μE wird zur Vereinfachung definiert als $\mu\text{mol Photonenfluss m}^{-2}\text{s}^{-1}$) im Labor vermutet. Um dies zu überprüfen, wurde Experimente zur Entwicklung bei niedrigen Lichtintensität durchgeführt.

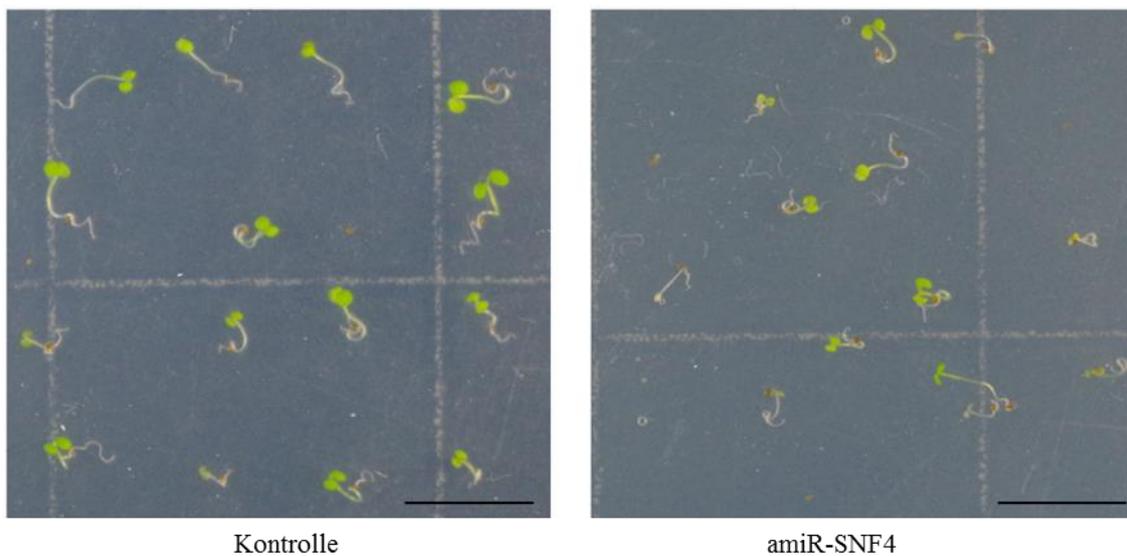


Abb.14: Phänotyp von amiR-SNF4 Keimlingen nach Wachstum auf Laborbank

Aufnahmen von 14 Tage alten amiR-SNF4 Keimlingen in Sterilkultur. Sie wurden für 5 Tage in der Klimakammer (16 h Licht / 8 h Dunkel) entweder unter Kontrollbedingungen (Abbildung links) oder auf β -Estradiol-haltigem Medium (10 μM , Abbildung rechts) angezogen und dann für weitere 9 Tage auf Labortische gestellt. Die Lichtintensität beträgt dort ungefähr 10 μE , die Tageslänge war unkontrolliert und die Zusammensetzung des Wachstumsmediums unverändert. Die Länge der Größenskala entspricht 1 cm.

3.4.1 Keimlingsentwicklung bei verschiedenen Lichtintensitäten mit und ohne Zucker im Medium

Für diese Experimente wurde die amiR-SNF4 Linie mit und ohne β -Estradiol bei drei verschiedenen Lichtintensitäten (10, 30 und 50 μE) im Kurztag (8 h Licht) angezogen. Über 19 Tage hinweg wurde der BBCH-Index bestimmt. Dieser weist jeder Entwicklungsstufe der Pflanze eine Zahl zu (siehe Tab. 5). In Abb.15 ist ein repräsentatives Ergebnis von vier Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen dargestellt. Betrachtet man zunächst die Entwicklung bei einer Lichtintensität von 50 μE (Abb.15c), so kann man feststellen, dass sich die induzierte amiR-SNF4 Linie langsamer entwickelt als die Kontrolle. Der Unterschied beginnt bei Tag 5 und bleibt bis zum Ende des Experiments (Tag 19) bestehen. Hinsichtlich der Entwicklungsstufe beginnt der Unterschied beim Übergang von 7 (Kotyledonen sichtbar) zu 9 (Kotyledonen voll entfaltet). Bemerkenswert ist außerdem, dass sowohl die Kontrolle als auch die induzierte amiR-SNF4 Linie sich stetig weiterentwickeln. Die Geschwindigkeit der Entwicklung in der induzierten amiR-SNF4 Linie ist nach Auftreten des Unterschied ähnlich zur Geschwindigkeit der

Kontrolle. Wird die Lichtintensität auf 30 μE (Abb.15b) reduziert, so ändert sich an der Entwicklung im Vergleich zu den Beobachtungen bei 50 μE wenig. Die Verzögerung im Wachstum der induzierten amiR-SNF4 Linie tritt zum selben Zeitpunkt und bei derselben Entwicklungsstufe auf. Allerdings zeigt sich sowohl in der induzierten amiR-SNF4 Linie als auch in der Kontrolle zwischen Tag 5 und Tag 9 eine Phase, in der keine Weiterentwicklung stattfindet. Insgesamt ist die Entwicklung in beiden Ansätzen langsamer als bei 50 μE und nach 19 Tagen auch noch nicht so weit fortgeschritten. Betrachtet man die Entwicklung bei 10 μE (Abb.15a), der Lichtintensität, die auch bei der zufälligen Entdeckung des stärksten Phänotyps im Labor herrschte, so zeigt sich, dass der bei den beiden höheren Lichtintensitäten beobachtete Unterschied mit zwei Tagen Verzögerung aber bei den gleichen Entwicklungsstufen auftritt. Des Weiteren ist zu beobachten, dass sich die induzierte amiR-SNF4 Linie ab Tag 5 nicht mehr weiterentwickelt. Bei der Kontrolle hingegen ist eine langsame Weiterentwicklung feststellbar, die jedoch deutlich hinter der Geschwindigkeit der Weiterentwicklung der Kontrollen bei den höheren Lichtintensitäten zurückbleibt. Deshalb wird der Unterschied bei diesen Bedingungen im Verlaufe des Experimentes auch größer.

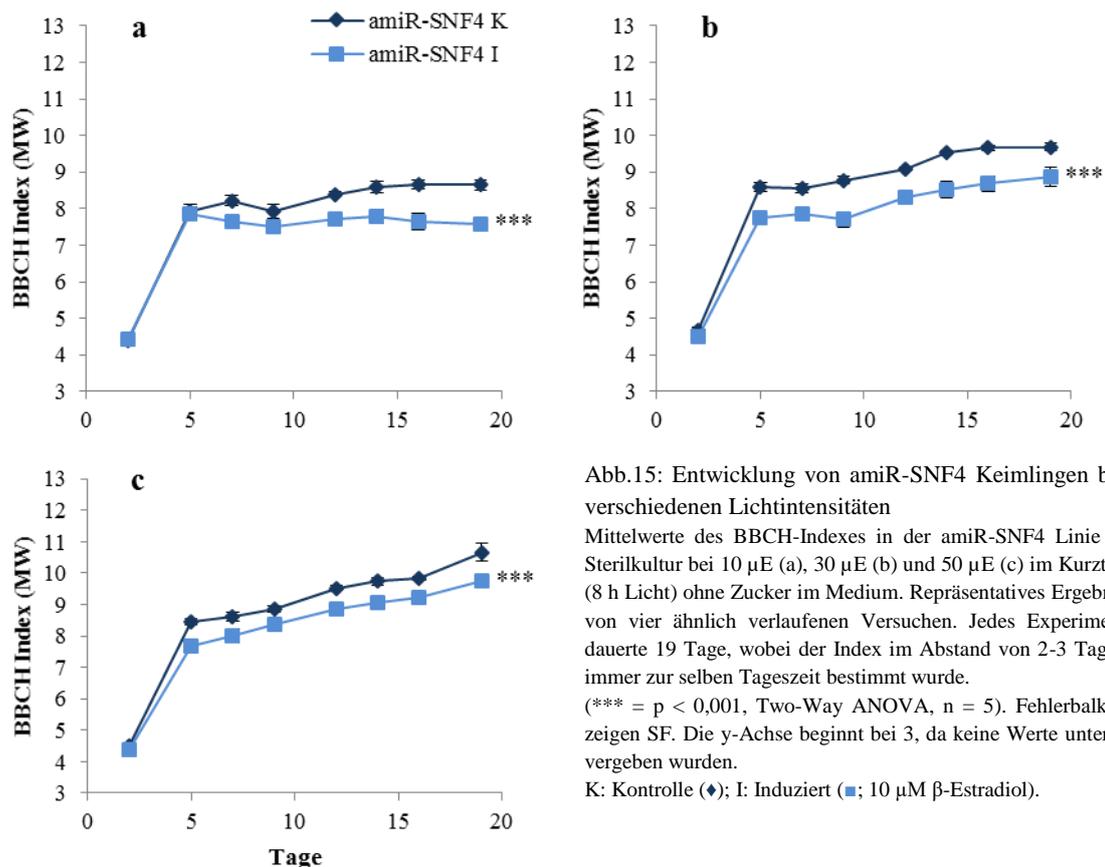


Abb.15: Entwicklung von amiR-SNF4 Keimlingen bei verschiedenen Lichtintensitäten

Mittelwerte des BBCH-Indexes in der amiR-SNF4 Linie in Sterilkultur bei 10 μE (a), 30 μE (b) und 50 μE (c) im Kurztag (8 h Licht) ohne Zucker im Medium. Repräsentatives Ergebnis von vier ähnlich verlaufenen Versuchen. Jedes Experiment dauerte 19 Tage, wobei der Index im Abstand von 2-3 Tagen immer zur selben Tageszeit bestimmt wurde.

(*** = $p < 0,001$, Two-Way ANOVA, $n = 5$). Fehlerbalken zeigen SF. Die y-Achse beginnt bei 3, da keine Werte unter 3 vergeben wurden.

K: Kontrolle (\blacklozenge); I: Induziert (\blacksquare , 10 μM β -Estradiol).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie unabhängig von der Lichtintensität eine Verzögerung in der Entwicklung aufweist. Diese tritt bei Übergang der Entwicklungsstufen 7 zu 9, also beim vollständigen Entfalten der Keimblätter auf.

In weiteren Experimenten wurde versucht, diese Entwicklungsverzögerung durch die Zugabe von Zucker in das Wachstumsmedium zu verhindern. In Abb.16 ist das Ergebnis nach Zugabe von einem Prozent Saccharose dargestellt. Auch in diesem Versuch wurden wieder die drei Lichtintensitäten 10, 30 und 50 μE getestet. Betrachtet man zunächst die Entwicklung bei 50 μE (Abb.16c), so kann man feststellen, dass wie in den Keimlingen ohne Zucker die Entwicklungsverzögerung bei Tag 5 beginnt. Auch die Entwicklungsstufen sind mit 7 bis 9 vergleichbar. Über die gesamte Dauer des Versuchs verläuft die Entwicklung stufenförmig. In der induzierten amiR-SNF4 Linie sind diese Stufen flacher. So erreicht die Kontrolle die Stufe 10 schon an Tag 9 während die induzierte amiR-SNF4 Linie bis Tag 12 benötigt. An Tag 14 ist die Entwicklungsstufe in beiden Ansätzen sehr ähnlich. An Tag 16 hingegen ist der Unterschied wieder sehr deutlich, da die Kontrolle eine neue Entwicklungsstufe erreicht, die induzierte amiR-SNF4 Linie aber noch nicht.

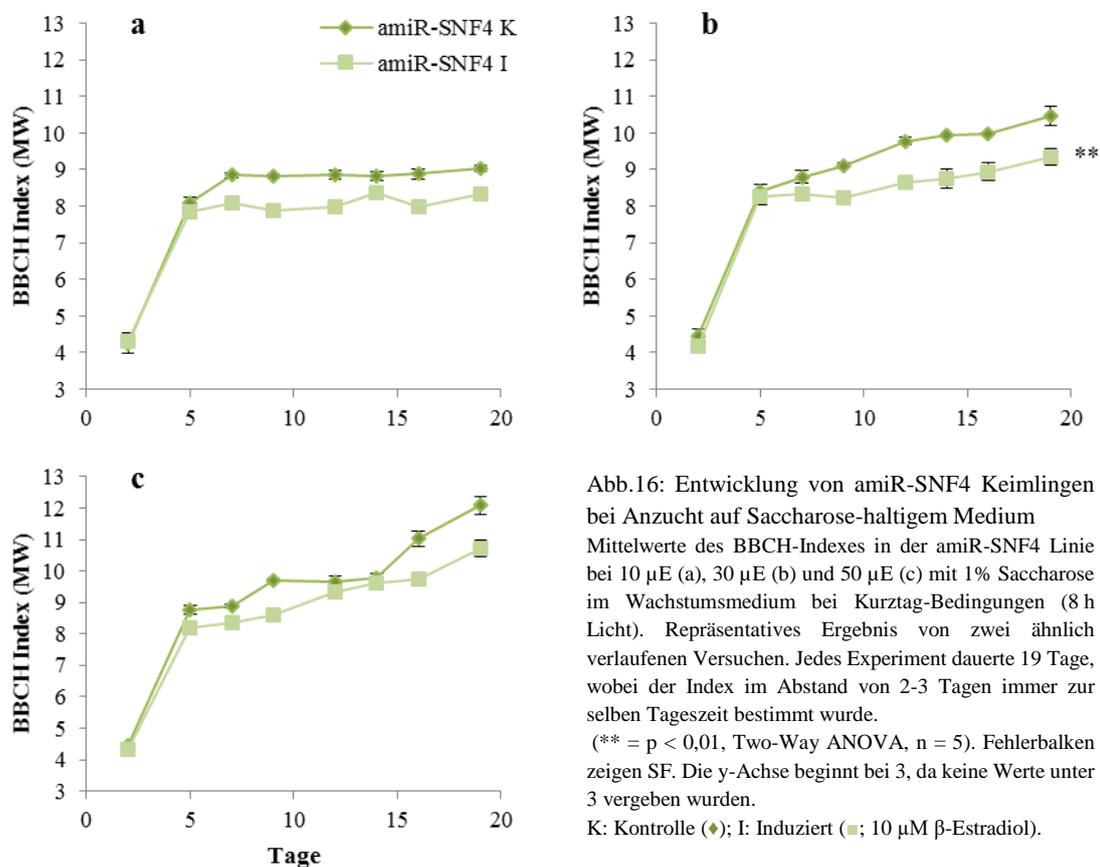


Abb.16: Entwicklung von amiR-SNF4 Keimlingen bei Anzucht auf Saccharose-haltigem Medium Mittelwerte des BBCH-Indexes in der amiR-SNF4 Linie bei 10 μE (a), 30 μE (b) und 50 μE (c) mit 1% Saccharose im Wachstumsmedium bei Kurztag-Bedingungen (8 h Licht). Repräsentatives Ergebnis von zwei ähnlich verlaufenen Versuchen. Jedes Experiment dauerte 19 Tage, wobei der Index im Abstand von 2-3 Tagen immer zur selben Tageszeit bestimmt wurde. (** = $p < 0,01$, Two-Way ANOVA, $n = 5$). Fehlerbalken zeigen SF. Die y-Achse beginnt bei 3, da keine Werte unter 3 vergeben wurden.

K: Kontrolle (◆); I: Induziert (■; 10 μM β -Estradiol).

Die Entwicklung bei einer auf 30 μE reduzierten Lichtintensität ist in Abb.16b abgebildet. Auch hier tritt die Entwicklungsverzögerung in der induzierten amiR-SNF4 Linie wieder beim Übergang von Stufe 7 zu Stufe 9 auf, allerdings erst an Tag 7. Der zu diesem Zeitpunkt noch relativ kleine Unterschied wird im Verlauf des Experiments bis Tag 12 größer, da sich die Kontrolle und die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge unterschiedlich schnell entwickeln. Ab Tag 12 gleichen sich die Geschwindigkeiten an. Auch bei der geringsten Lichtintensität (10 μE , siehe Abb.16a) tritt die Verzögerung in der amiR-SNF4 Linie bei Tag 7 auf. Sie bleibt bis zum Ende des Experiments in gleichbleibendem Ausmaße bestehen. Es ist außerdem festzustellen, dass die Kontrolle an Tag 9 die Entwicklungsstufe 9 erreicht

und diese sich bis zum Ende des Experiments nicht weiter erhöht. Erst an Tag 19 ist ein leichter Anstieg feststellbar. Die induzierte amiR-SNF4 Linie erreicht im Mittel nur Stufe 8. Das bedeutet, dass sich, da Stufe 8 nicht vergeben wird, die Hälfte der Keimlinge bei Stufe 7 und die andere Hälfte bei Stufe 9 befindet. Auch die induzierte amiR-SNF4 Linie zeigt keinen weiteren Anstieg in der Entwicklungsstufe nach Tag 9.

Somit bleibt festzuhalten, dass auch bei Anzucht auf einem Prozent Saccharose eine Entwicklungsverzögerung auftritt. Diese ist bei allen drei Lichtintensitäten feststellbar. Sie betrifft wie in den Ansätzen ohne Zucker die vollständige Entfaltung der Keimblätter (Übergang von Entwicklungsstufe 7 zu 9).

Da auch Glukose einen Einfluss auf die Aktivität des SnRK1-Komplexes hat (siehe 3.3.1 und (Jossier et al., 2009)), wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob die Anzucht auf Glukose Auswirkungen auf den beobachtete Entwicklungsverzögerung hat. Dazu wurden die Pflänzchen auf Wachstumsmedium mit 2% Glukose angezogen.

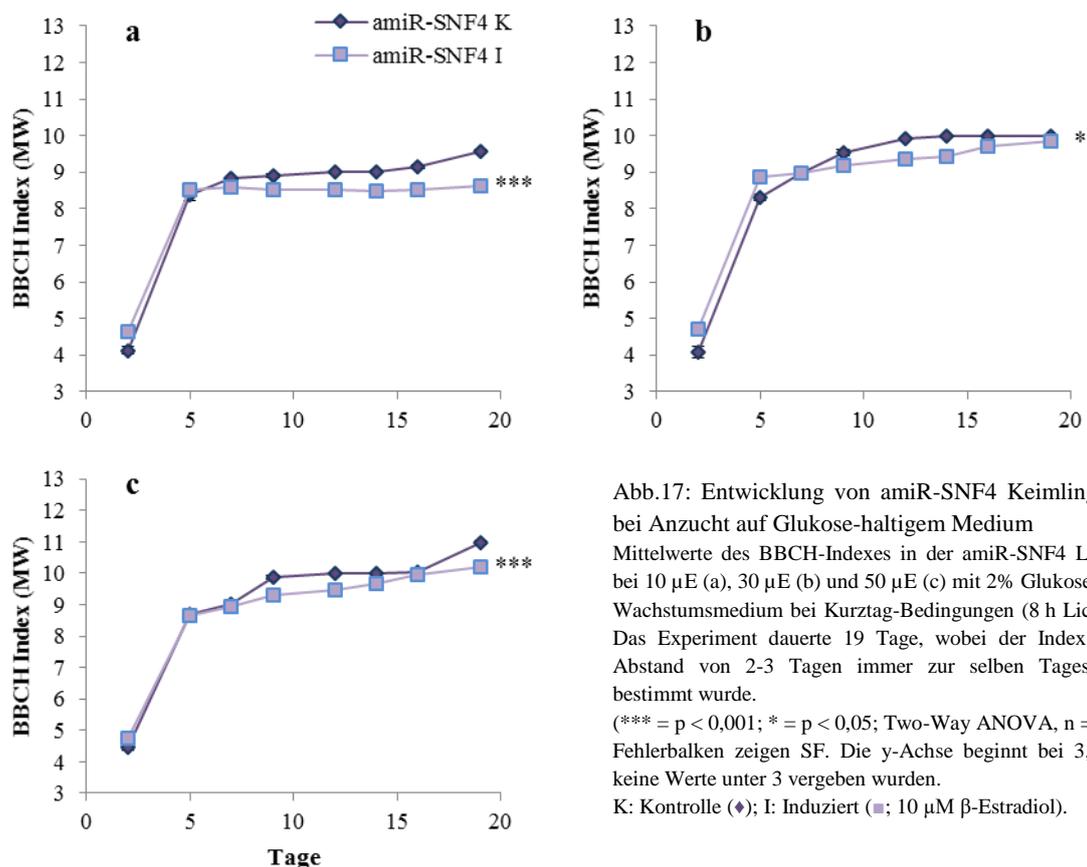


Abb.17: Entwicklung von amiR-SNF4 Keimlingen bei Anzucht auf Glukose-haltigem Medium
Mittelwerte des BBCH-Indexes in der amiR-SNF4 Linie bei 10 µE (a), 30 µE (b) und 50 µE (c) mit 2% Glukose im Wachstumsmedium bei Kurztag-Bedingungen (8 h Licht). Das Experiment dauerte 19 Tage, wobei der Index im Abstand von 2-3 Tagen immer zur selben Tageszeit bestimmt wurde.
(*** = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$; Two-Way ANOVA, $n = 5$). Fehlerbalken zeigen SF. Die y-Achse beginnt bei 3, da keine Werte unter 3 vergeben wurden.
K: Kontrolle (♦); I: Induziert (■; 10 µM β -Estradiol).

In Abb.17c ist die Entwicklung bei einer Lichtintensität von 50 µE dargestellt. Es fällt auf, dass die Entwicklungsverzögerung der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge, die in den beiden vorigen Versuchen bereits bei Tag 5 zu sehen war, in diesem Ansatz erst bei Tag 9 auftritt. Des Weiteren zeigt sich diese erst beim Übergang von Zustand 9 zu Zustand 10, also bei Erscheinen des ersten Laubblattpaars, und nicht wie bisher beim Übergang von 7 zu 9. Bemerkenswert ist außerdem, dass die induzierte amiR-

SNF4 Linie an Tag 2 einen höheren BBCH-Index aufweist als die Kontrolle. Über den gesamten Verlauf des Versuchs hinweg fällt auf, dass die Kontrolle eine mehr stufenförmige Entwicklung nimmt, die induzierte amiR-SNF4 Linie hingegen eine eher kontinuierliche. Dadurch entsteht jeweils bei Anstieg der Kontrolle in die nächsthöhere Entwicklungsstufe ein Unterschied (siehe Tag 9 und Tag 19), der sich bis zum nächsten Anstieg wieder verkleinert. Auch bei einer auf 30 μE reduzierten Lichtintensität (Abb.17b) zeigt sich die Entwicklungsverzögerung der induzierten amiR-SNF4-Linie erst an Tag 9. Genauso hat sich der Entwicklungszustand, bei dem diese Verzögerung auftritt, verschoben auf den Übergang von 9 zu 10. Deutlich zu sehen ist, dass zu Beginn des Versuch die induzierte amiR-SNF4 Linie einen höheren BBCH-Index aufweist als die Kontrolle (Tag 2 und Tag 5). An Tag 7 hat sich dieser angeglichen und von Tag 9 an weist die Kontrolle den höheren Index auf. Wird die Lichtintensität auf 10 μE reduziert (Abb.17a), so zeigt sich, dass bei diesem Lichtregime die Entwicklungsverzögerung der induzierten amiR-SNF4 Linie wieder, wie bei den anderen Versuchen zur Entwicklung, an Tag 7 auftritt. Auch der Entwicklungszustand, bei dem diese Auftritt, ist wieder beim Übergang von Zustand 7 zu Zustand 9, also beim vollständigen Entfalten der Keimblätter und nicht wie bei den höheren Lichtintensitäten der Glukose-Anzucht beim Erscheinen des ersten Laubblattpaares. Bemerkenswert ist auch hier, dass sich die induzierte amiR-SNF4 Linie zunächst etwas schneller entwickelt (Tag 2 und Tag 5), dann aber beim einem gemittelten Index von ungefähr 8,5 stehen bleibt, wohingegen die Kontrolle nach einem langsameren Start die induzierte amiR-SNF4 Linie an Tag 7 überholt und sich langsam aber stetig weiterentwickelt.

Insgesamt zeigt sich bei der Zugabe von 2% Glukose ins Wachstumsmedium, dass die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge eine schnellere Entwicklung direkt bei und kurz nach der Keimung aufweisen. Die Kontrolle holt diesen Rückstand jedoch bereits bei Tag 7 oder Tag 9 auf und entwickelt sich im weiteren Verlauf dann etwas schneller. Bei höheren Lichtintensitäten (30 μE und 50 μE) verschiebt sich die Entwicklungsverzögerung der induzierten amiR-SNF4 Linie vom vollständigen Entfalten der Keimblätter (Übergang von Zustand 7 zu 9) zum Erscheinen des ersten Laubblattpaares (Übergang von Zustand 9 zu 10).

3.4.2 Keimungsrate

Um zu überprüfen, ob die Entwicklungsverzögerung an einer verzögerten oder schlechteren Keimung der induzierten amiR-SNF4 Linie im Vergleich zur Kontrolle liegt, wurde die Keimungsrate im Rahmen des Entwicklungsexperiments gemessen (siehe 2.8). Dazu wurde an Tag 5 gezählt, wie viele der 10 ausgebrachten Samen pro Platte (Replikat) gekeimt waren. Abb.18 zeigt die Abhängigkeit der Keimung von der Lichtintensität und dem Vorhandensein von Zucker im Wachstumsmedium. Betrachtet man die Ansätze, die auf Wachstumsmedium ohne Zucker angezogen wurden, so ist zu sehen, dass es keinen Unterschied gibt zwischen der Kontrolle und der induzierten amiR-SNF4 Linie. Auch bei den verschiedenen Lichtintensitäten zeigt sich kein Unterschied, weder innerhalb der Linie noch zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie. Gibt man 1% Saccharose ins

Wachstumsmedium, so sinkt die Keimungsrate bei 10 μE sowohl in der Kontrolle wie auch in der induzierten amiR-SNF4 Linie ein wenig. Bei 30 μE und 50 μE ist sie im Vergleich zu Ansätzen ohne Zucker im Medium unverändert. Vergleicht man die induzierte amiR-SNF4 Linie mit der Kontrolle, so ist kein Unterschied feststellbar. Gibt man 2% Glukose ins Medium und betrachtet die Keimungsrate, dann ist zu sehen, dass es auch hier keinen Unterschied gibt, weder innerhalb der beiden Ansätze bei unterschiedlichen Lichtintensitäten noch zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die induzierte amiR-SNF4 Linie hinsichtlich der Keimungsrate nicht von der Kontrolle unterscheidet.

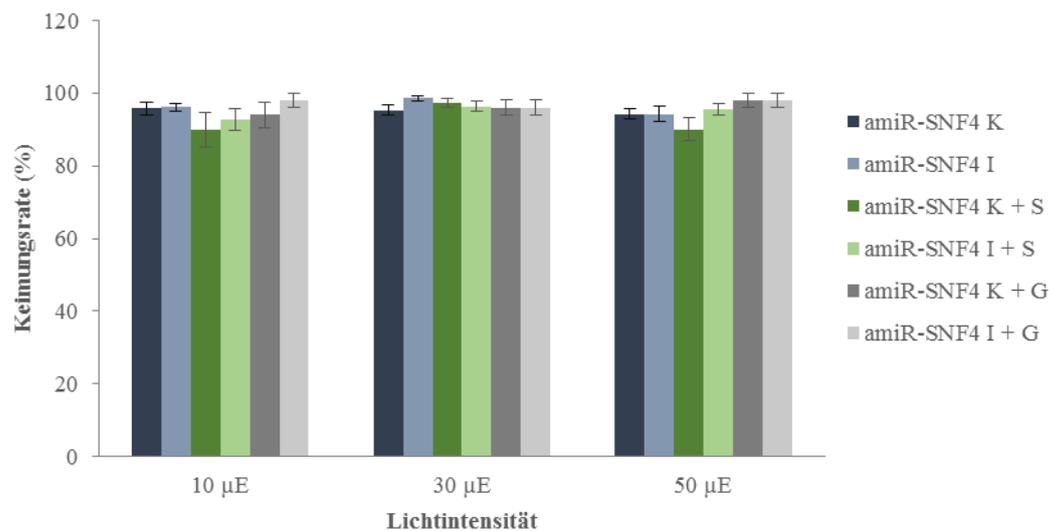


Abb.18: Keimungsrate in der amiR-SNF4 Linie unter verschiedenen Bedingungen

Keimungsrate der amiR-SNF4 Linie in Abhängigkeit der Lichtintensität und verschiedener Zucker im Wachstumsmedium unter Kurztag-Bedingungen (8 h Licht). Gemessen im Rahmen des Entwicklungsexperiments an Tag 5. Mittelwerte von 5 (Glukose-Fütterung), 11 (Saccharose-Fütterung) oder 21 biolog. Replikaten. Fehlerbalken zeigen SF. Ein Students T-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und induzierter Linie.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β -Estradiol); S: 1% Saccharose; G: 2% Glukose

3.4.3 Frischgewicht

Schließlich wurde noch das Frischgewicht im Rahmen der phänotypischen Analyse bestimmt. Aus Platzmangel wurde auf die Bestimmung in den Anzuchten mit Glukose im Wachstumsmedium verzichtet, da pro Ansatz, Zeitpunkt und Lichtintensität fünf Platten notwendig waren. Deshalb wurden pro Versuch insgesamt 180 Platten ausgesät. Es wurden drei Zeitpunkte ausgewählt: Tag 7, Tag 14 und Tag 19. In Abb.19c ist das Ergebnis der Frischgewichtsbestimmung bei einer Lichtintensität von 50 μE dargestellt. In den beiden Ansätzen ohne Zucker im Medium ist zu erkennen, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie zu allen drei Zeitpunkten ein geringeres Frischgewicht pro Keimling aufweist als die Kontrolle. Die Zunahme ist in beiden Ansätzen im Verlauf des Versuchs ähnlich. Betrachtet man die auf Saccharose angezogenen Ansätze, so fällt als Erstes auf, dass das Frischgewicht in beiden deutlich höher ist als in den Ansätzen ohne Zucker. Außerdem besteht ein großer Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie. Bereits an Tag 7 weist die induzierte amiR-SNF4 Linie rund ein Viertel weniger Frischgewicht auf. An Tag 19 ist diese nur noch halb so schwer wie die zugehörige

Kontrolle. Das bedeutet, dass sich auch die Zunahme an Frischgewicht im Verlaufe des Versuchs in der induzierten amiR-SNF4 Linie geringer ist als in der Kontrolle. Auffällig ist auch, dass die mit Saccharose gefütterte, induzierte amiR-SNF4 Linie mehr Frischgewicht aufweist als die Kontrolle ohne Zucker. Wird die Lichtintensität auf 30 μE reduziert (Abb.19b), so reduziert sich in allen Ansätzen auch das Frischgewicht deutlich. In den Keimlingen ohne Zucker im Medium ist der Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie an Tag 7 noch ziemlich gering (ungefähr 10%), an den Tagen 14 und 19 vergrößert er sich auf 20% - 30%. Die Zunahme im Frischgewicht ist in der Kontrolle konstant über alle drei Zeitpunkte, in der induzierten amiR-SNF4 Linie nimmt das Frischgewicht zwischen Tag 7 und Tag 14 kaum zu. Die Steigerung zwischen Tag 14 und Tag 19 ist vergleichbar mit der in der Kontrolle beobachteten. Ein ähnliches Phänomen zeigt sich in den beiden Ansätzen, die 1% Saccharose im Wachstumsmedium enthielten. Der prozentuale Unterschied ist zwar etwas größer (20% an Tag 7; 40% - 50% an den Tagen 14 und 19), aber der Verlauf der Graphen ist analog. Im Gegensatz zu den Ansätzen bei 50 μE weist die Kontrolle ohne Zucker aber nur an Tag 7 ein geringeres Frischgewicht auf als die induzierte, mit Saccharose gefütterte amiR-SNF4 Linie.

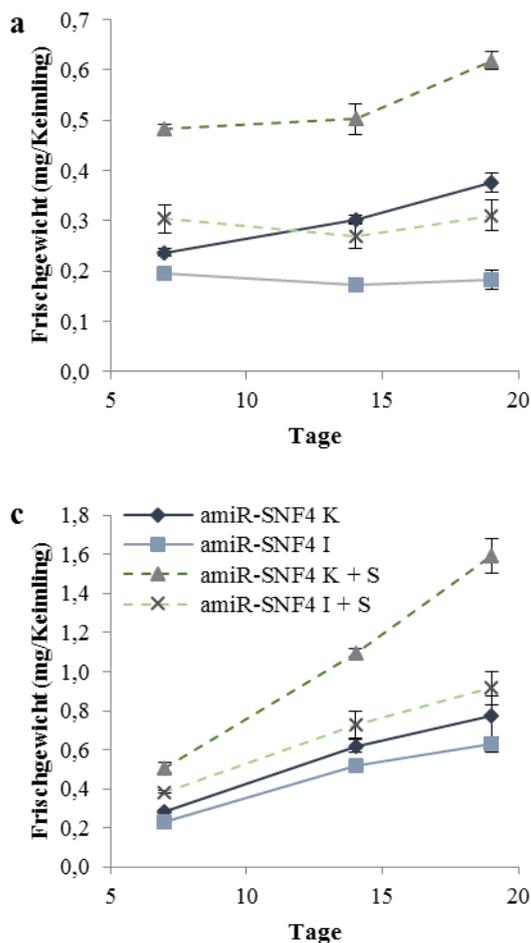


Abb.19: Frischgewichte der amiR-SNF4 Keimlinge unter verschiedenen Bedingungen

Frischgewicht in mg/Keimling bei 10 μE (a), 30 μE (b) und 50 μE (c) Lichtintensität in der amiR-SNF4 Linie im Kurztag (8 h Licht). Das Wachstumsmedium enthielt in zwei Ansätzen zusätzlich 1% Saccharose. Das Frischgewicht wurde an Tag 7, Tag 14 und Tag 19 bestimmt. Mittelwert von 5 - 10 biolog. Replikaten, wobei ein Replikat einer Sterilkulturplatte mit 10 Keimlingen entspricht.

Die induzierten amiR-SNF4 Keimlingen unterscheiden sich unter allen Bedingungen signifikant von der Kontrolle (Two-Way ANOVA; $p < 0,05$; $n = 5 - 10$).

Fehlerbalken zeigen SF. Nicht gekeimt Samen wurden nicht berücksichtigt.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β -Estradiol); S: 1% Saccharose

Bei einer Lichtintensität von 10 μE (Abb.19a) ist zu beobachten, dass nur noch in den beiden Kontrollen eine Zunahme des Frischgewichts stattfindet. Die absoluten Werte an Tag 7 sind

vergleichbar mit den Werten bei 30 μE und 50 μE , die Zunahme im Verlauf des Versuchs ist aber wesentlich geringer oder gar nicht vorhanden (in den induzierten amiR-SNF4 Ansätzen). Betrachtet man die Ansätze ohne Zucker, so beträgt der Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie an Tag 7 ungefähr 20%. Im weiteren Verlauf des Experiments bleibt das Frischgewicht in der induzierten amiR-SNF4 Linie konstant bei circa 0,2 mg/Keimling, in der Kontrolle nimmt es jedoch zu und erreicht an Tag 19 fast 0,4 mg/Keimling. Dadurch ist die Kontrolle am Ende des Versuchs doppelt so schwer wie die induzierte amiR-SNF4 Linie. Das ist ein deutlich größerer Unterschied als bei höheren Lichtintensitäten. Betrachtet man die Ansätze mit 1% Saccharose im Medium, so zeigt sich in diesen ein ähnlicher Verlauf wie in den Ansätzen ohne Zucker. Die Werte an Tag 7 sind vergleichbar mit den höheren Lichtintensitäten und damit auch der Unterschied zwischen den beiden. Die induzierte amiR-SNF4 Linie bleibt im weiteren Verlauf aber bei einem Frischgewicht von 0,3 mg/Keimling während die Kontrolle ihres von 0,48 mg/Keimling auf 0,62 mg/Keimling an Tag 19 steigert. Das bedeutet wiederum, dass auch in diesem Fall die Kontrolle am Ende des Versuches doppelt so schwer ist wie die induzierte amiR-SNF4 Linie. Bemerkenswert ist auch, dass, wie bei einer Lichtintensität von 30 μE , an Tag 7 die Kontrolle ohne Zucker leichter ist als die induzierte, mit Saccharose gefütterte amiR-SNF4 Linie, sich dieses Bild aber ab Tag 14 umdreht.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie unabhängig von der Lichtintensität ein geringeres Frischgewicht pro Keimling aufweist als die Kontrolle. Wird Saccharose ins Medium gegeben, so vergrößert sich dieser Unterschied. Bei sehr geringen Lichtintensitäten erhöht sich das Frischgewicht in der induzierten amiR-SNF4 Linie im Gegensatz zur Kontrolle nicht mehr. Zugabe von Saccharose ins Wachstumsmedium ändert auch dieses Verhalten nicht.

3.4.4 Entwicklung der Wurzel

Bei der phänotypischen Analyse wurde eine Verkürzung der Wurzel in der induzierten amiR-SNF4 Linie im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (siehe Abb.12). Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurden im Rahmen der Entwicklungsexperimente auch die Wurzellängen gemessen. In Abb.20 a-c sind die Ergebnisse dieser Messungen zu sehen. Betrachtet man die Wurzellängen bei einer Lichtintensität von 50 μE (Abb.20c), so ist erkennbar, dass ohne Zugabe von Zucker ins Wachstumsmedium die induzierte amiR-SNF4 Linie signifikant kürzere Wurzeln hat. Zu Beginn der Messung an Tag 5 sind diese ungefähr ein Drittel kürzer. Im Verlauf des Experiments vergrößert sich der Unterschied auf ungefähr 60%. Das bedeutet, dass sich auch die Wachstumsrate in den beiden Ansätzen unterscheidet. Gibt man 1% Saccharose ins Wachstumsmedium, so weisen sowohl die Kontrolle als auch die induzierte amiR-SNF4 Linie deutlich längere Wurzeln auf als ohne Zucker im Medium. Der signifikante Unterschied zwischen den beiden bleibt aber bestehen. Auch unter diesen Bedingungen beträgt er zu Beginn des Experiments ungefähr ein Drittel. Er steigert sich im Verlaufe des Experiments auf etwas mehr als 50%. Bemerkenswert ist außerdem, dass sich die Wurzellänge in der induzierten, mit Saccharose gefütterten amiR-SNF4 Linie in etwa auf dem Niveau der Kontrolle ohne Zucker befindet.

Werden die Keimlinge mit 2% Glukose im Wachstumsmedium angezogen, dann steigert sich die Wurzellänge auch in diesem Fall in beiden Ansätzen im Vergleich zu den Ansätzen ohne Zucker. Die Wurzeln sind ähnlich lang wie in den Keimlingen, die mit Saccharose gefüttert wurden. Zum Ende des Versuchs hin (ab Tag 12) weisen die auf Glukose-haltigem Medium angezogenen Keimlinge auch längere Wurzeln als die auf Saccharose-haltigem Medium angezogenen Keimlinge auf. Wie auch bei den beiden anderen Anzuchtbedingungen gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrolle und der induzierten amiR-SNF4 Linie. Letztere hat beim ersten Messzeitpunkt (Tag 5) um ungefähr ein Drittel kürzere Wurzeln als die Kontrolle. Wie bei den auf Saccharose angezogenen Ansätzen vergrößert sich auch hier der Unterschied auf circa 50% zum Ende des Experiments hin.

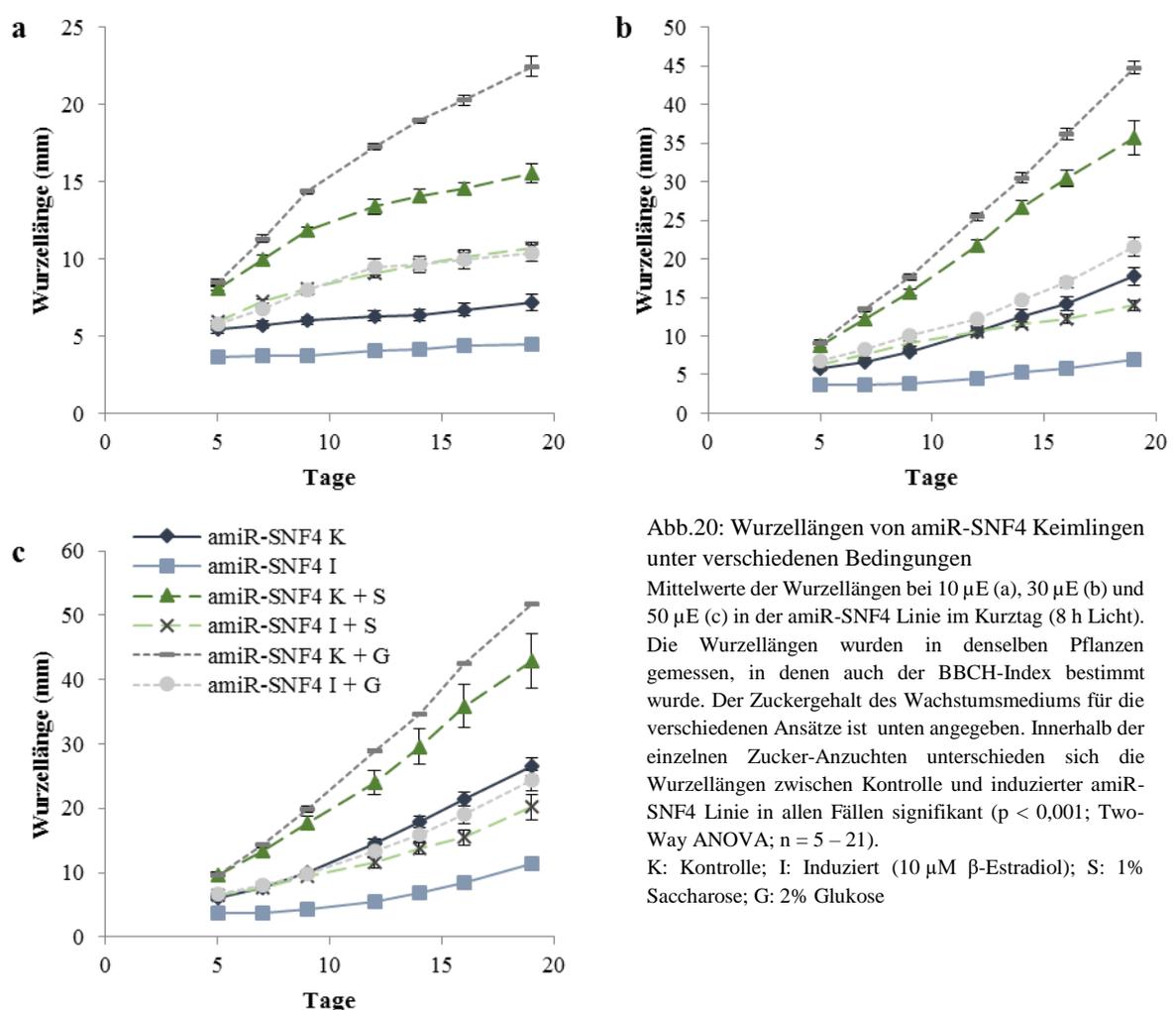


Abb.20: Wurzellängen von amiR-SNF4 Keimlingen unter verschiedenen Bedingungen

Mittelwerte der Wurzellängen bei 10 µE (a), 30 µE (b) und 50 µE (c) in der amiR-SNF4 Linie im Kurztag (8 h Licht). Die Wurzellängen wurden in denselben Pflanzen gemessen, in denen auch der BBCH-Index bestimmt wurde. Der Zuckergehalt des Wachstumsmediums für die verschiedenen Ansätze ist unten angegeben. Innerhalb der einzelnen Zucker-Anzuchten unterschieden sich die Wurzellängen zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie in allen Fällen signifikant ($p < 0,001$; Two-Way ANOVA; $n = 5 - 21$).

K: Kontrolle; I: Induziert (10 µM β -Estradiol); S: 1% Saccharose; G: 2% Glukose

Wird die Lichtintensität auf 30 µE reduziert (Abb.20b), so reduziert sich auch die Wurzellänge sowohl in der Kontrolle als auch in der induzierten amiR-SNF4 Linie unter allen drei Anzuchtbedingungen (ohne Zucker, 1% Saccharose, 2% Glukose). Vergleicht man die maximalen Wurzellängen am Ende des Versuchs, so sind diese bei der geringeren Lichtintensität ungefähr 20% geringer. Betrachtet man die Wurzellängen bei Keimlingen ohne Zucker im Wachstumsmedium unter diesen Bedingungen, so fällt auf, dass die Wurzeln in der induzierten amiR-SNF4 Linie signifikant

kürzer sind als in der Kontrolle. Der Unterschied zu Beginn des Versuchs an Tag 5 beträgt ungefähr ein Drittel und vergrößert sich kontinuierlich auf 60% am Ende des Versuchs. Weiterhin fällt auf, dass die Wurzeln in der induzierten Linie nur sehr langsam wachsen. An den ersten drei Messpunkten ist keine Veränderung in der Wurzellänge zu beobachten. Erst ab Tag 12 ist eine Zunahme erkennbar. Wird zum Wachstumsmedium 1% Saccharose gegeben, so wachsen die Wurzeln deutlich schneller. Es bleibt aber weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der induzierten amiR-SNF4 Linie, die kürzere Wurzeln aufweist, bestehen. Dieser beträgt zu Beginn ungefähr 25% und steigert sich im Verlauf des Experiments auf circa 60%. Bemerkenswert ist außerdem, dass die induzierten, auf Saccharose-haltigem Medium gewachsenen Wurzeln zu Beginn länger sind als die Wurzeln der Kontrolle ohne Zucker. Dies ändert sich an Tag 12, da die Zunahme der Wurzellänge in der induzierten, mit Saccharose gefütterten amiR-SNF4 Linie konstant bleibt, sich in der Kontrolle ohne Zucker aber wie in den anderen Ansätzen steigert. Gibt man 2% Glukose ins Wachstumsmedium, so weisen sowohl die Kontrolle als auch die induzierte amiR-SNF4 Linie die größten, unter diesen Lichtbedingungen beobachteten Wurzellängen auf. Die induzierte amiR-SNF4 Linie zeigt jedoch auch hier signifikant kürzere Wurzeln als die Kontrolle. Der Unterschied beträgt zu Beginn ungefähr 25%; er ist also kleiner als in den Keimlingen ohne Zucker. Er steigert sich bis Tag 12 auf ungefähr 50% und bleibt bis zum Ende des Versuchs stabil bei diesem Wert. Die Wachstumsraten haben sich also bereits an diesem Tag angeglichen. Damit unterscheiden sich die auf Glukose angezogenen Keimlinge von den Keimlingen auf Saccharose und denen ohne Zucker, da sich in diesen der Unterschied bis Tag 16 oder sogar Tag 19 noch vergrößert.

Betrachtet man die Wurzellängen bei einer Lichtintensität von 10 μE (Abb.20a), so fällt auf, dass diese sich im Vergleich zu den Wurzellängen bei 30 μE um mindestens die Hälfte reduziert haben. Dies ist wesentlich mehr als bei der Verringerung der Lichtintensität von 50 μE auf 30 μE (ungefähr 20%). Bei den Proben ohne den Zusatz von Zucker ins Wachstumsmedium fällt auf, dass beide Ansätze kaum noch Wurzelwachstum aufweisen. In der Kontrolle beträgt die Wurzellänge zu Beginn des Versuchs 5,4 mm und am Ende 7,2 mm. Dies bedeutet eine Zunahme von nur 33% im Verlauf von zwei Wochen, während sich die Wurzellängen bei höheren Lichtintensitäten verdreifacht oder vervierfacht haben. In der induzierten amiR-SNF4 Linie beträgt die Wurzellänge zu Beginn des Versuchs 3,6 mm und am Ende 4,5 mm. Dies bedeutet eine Verlängerung der Wurzel um 25% in zwei Wochen. Auch dieser Wert ist wesentlich geringer verglichen mit der Zunahme der Wurzellänge bei höheren Lichtintensitäten in der amiR-SNF4 Linie (verdoppelt bis verdreifacht). Der Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie beträgt über den gesamten Versuch hinweg ungefähr ein Drittel. Um diesen Wert sind die Wurzeln in der induzierten amiR-SNF4 Linie konstant kürzer. Der Unterschied vergrößert sich damit nicht wie bei den beiden höheren Lichtintensitäten. Gibt man 1 % Saccharose ins Wachstumsmedium, so zeigt sich wieder eine deutlichere Zunahme der Wurzellänge sowohl in der Kontrolle als auch in der induzierten amiR-SNF4 Linie im Verlaufe des Experiments (fast eine Verdoppelung). Diese ist jedoch auch hier deutlich geringer als bei den höheren Lichtintensitäten, bei denen sich die Wurzellängen im

Verläufe des Versuchs verdoppeln bis vervierfachen. Erkennbar wird dieses Phänomen auch an den Verläufen der Graphen. Während bei 30 μE und 50 μE die Kurven nach Tag 12 einen eher steileren Verlauf nehmen, flachen sie bei 10 μE deutlich ab. Der Unterschied zwischen der Kontrolle und der induzierten amiR-SNF4 Linie beträgt konstant ungefähr 30%. Damit verhalten sich die Ansätze auf Saccharose-haltigem Medium in diesem Punkt analog zu denen ohne Zucker. Werden 2% Glukose ins Wachstumsmedium gegeben, so zeigt sich in der Kontrolle eine noch deutlichere Zunahme in der Wurzellänge als in den auf Saccharose angezogenen Pflanzen. Die Wurzellänge nimmt um das 2,5fache von Tag 5 bis Tag 19 zu, während sie sich in letzterer nicht ganz verdoppelt. Der Verlauf der Wurzellängenkurve ist jedoch vergleichbar: An Tag 12 zeigt sich auch in der mit Glukose gefütterten Kontrolle ein leichtes Abflachen. Die induzierte, auf Glukose gewachsene amiR-SNF4 Linie hingegen verhält sich ziemlich genau so wie die auf Saccharose gewachsene. Dadurch wird auch der Unterschied zwischen der Kontrolle und der induzierten amiR-SNF4 Linie im Verlaufe des Versuchs mit Glukose im Medium größer. Zu Beginn beträgt er ungefähr 30% und steigert sich auf circa 50% an Tag 19.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie auch empirisch belegbar kürzere Wurzeln aufweist als die Kontrolle. Dieser Phänotyp tritt bei allen drei untersuchten Lichtintensitäten in ähnlichem Maße auf. Auch die Zugabe von Saccharose oder Glukose ins Wachstumsmedium ändert daran nichts.

3.4.5 Überlebensrate bei niedrigen Lichtintensitäten

Wie in Abb.14 beobachtet, waren einige Keimlinge nach längerer Inkubation bei niedrigen Lichtintensitäten tot. Dieses Phänomen wurde im Rahmen des Entwicklungsexperiments genauer beobachtet und quantifiziert. Dazu wurden bei jeder Bestimmung des BBCH-Indexes auch die toten Keimlinge gezählt. Abb.21 zeigt das Ergebnis dieser Quantifizierung. Sie beginnt bei Tag 5, da zuvor keine toten Keimlinge beobachtet wurden. Nicht gekeimte Samen wurden nicht berücksichtigt, sondern von der Gesamtanzahl an Beobachtungen subtrahiert. Bei einer Lichtintensität von 50 μE (Abb.21c), die den normalen Anzuchtbedingungen entspricht, ist zu sehen, dass in den Ansätzen ohne Zucker im Medium die Kontrolle über den gesamten Zeitraum keine toten Keimlinge aufweist. In der induzierten amiR-SNF4 Linie hingegen treten an Tag 9 die ersten toten Keimlinge auf. Bis zum Ende des Experiments sterben ungefähr 10% der Keimlinge in dieser Linie. Betrachtet man die beiden Ansätze, die mit 1% Saccharose im Wachstumsmedium unterstützt wurden, so fällt auf, dass in der Kontrolle wiederum alle Keimlinge überleben. Im Gegensatz dazu sind in der induzierten amiR-SNF4 Linie bereits an Tag 7, also sogar zwei Tage früher als in dem entsprechenden Ansatz ohne Zucker, die ersten toten Keimlinge zu beobachten. Bis zum Ende des Experiments sterben in diesem Ansatz ungefähr 20% der Keimlinge, das sind doppelt so viele wie in dem entsprechenden Ansatz ohne Zucker. Die Zugabe von Glukose ins Wachstumsmedium zeigt den Effekt, dass in der induzierten amiR-SNF4 Linie die Überlebensrate im Vergleich zu den Pflanzen ohne Zucker/mit Saccharose ansteigt. Die ersten toten Keimlinge treten zwar zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie in den anderen beiden Ansätzen auf, bis zum

Ende sterben aber nur ungefähr 5% aller Keimlinge. Die Kontrolle mit Glukose verhält sich wie die Kontrollen in den beiden anderen Ansätzen: Es überleben alle Keimlinge. Bei einer auf 30 μE reduzierten Lichtintensität (Abb.21b) zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei 50 μE . In den Ansätzen ohne Zuckerfütterung überlebt die Kontrolle zu 100% bis zum Ende des Experiments. Die induzierte amiR-SNF4 Linie zeigt die ersten toten Keimlinge an den Tagen 9 bis 12. Schließlich sterben wiederum ungefähr 10% dieser Keimlinge bis zum Ende des Versuchs.

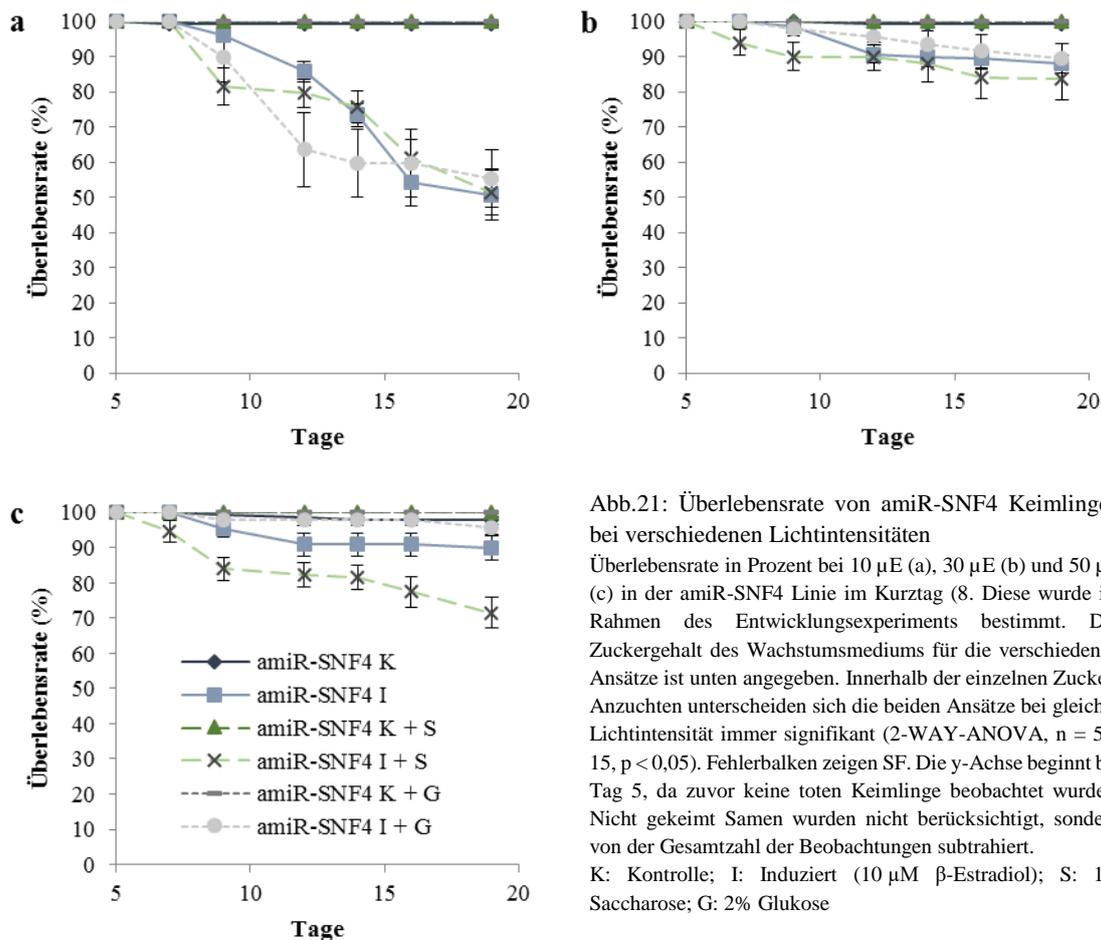


Abb.21: Überlebensrate von amiR-SNF4 Keimlingen bei verschiedenen Lichtintensitäten

Überlebensrate in Prozent bei 10 μE (a), 30 μE (b) und 50 μE (c) in der amiR-SNF4 Linie im Kurztag (8. Diese wurde im Rahmen des Entwicklungsexperiments bestimmt. Der Zuckergehalt des Wachstumsmediums für die verschiedenen Ansätze ist unten angegeben. Innerhalb der einzelnen Zuckeranzuchten unterscheiden sich die beiden Ansätze bei gleicher Lichtintensität immer signifikant (2-WAY-ANOVA, $n = 5 - 15$, $p < 0,05$). Fehlerbalken zeigen SF. Die y-Achse beginnt bei Tag 5, da zuvor keine toten Keimlinge beobachtet wurden. Nicht gekeimt Samen wurden nicht berücksichtigt, sondern von der Gesamtzahl der Beobachtungen subtrahiert. K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β -Estradiol); S: 1% Saccharose; G: 2% Glukose

Bei den auf Saccharose angezogenen Keimlingen zeigen sich auch unter diesen Lichtbedingungen keine toten Keimlinge in der Kontrolle. In der induzierten amiR-SNF4 Linie, die auf Saccharosehaltigem Medium angezogen wurde, hingegen treten die ersten toten Keimlinge an Tag 7 auf. Dies ist vergleichbar mit dem entsprechenden Ansatz bei 50 μE , aber deutlich früher als in der induzierten amiR-SNF4 Linie ohne Zucker bei gleicher Lichtintensität. Bis zum Ende des Versuchs sterben circa 15% der Keimlinge ab. Das ist überraschenderweise weniger als im entsprechenden Ansatz bei 50 μE . Betrachtet man die Keimlinge mit 2% Glukose im Wachstumsmedium, so ist zu sehen, dass in der Kontrolle wie in den andern Ansätzen auch keine Toten auftreten. In der induzierten amiR-SNF4 Linie hingegen zeigen sich die ersten toten Keimlinge an den Tagen 9 bis 12, vergleichbar mit dem entsprechenden Ansatz ohne Zucker. Die Anzahl der toten Keimlinge steigt bis zum Ende des Experiments konstant auf

ungefähr 10%. Dies ist eine deutliche Erhöhung im Vergleich zum entsprechenden Ansatz bei 50 μ E, aber sehr ähnlich zur induzierten amiR-SNF4 Linie ohne Zucker bei 30 μ E.

Wird die Lichtintensität noch weiter auf 10 μ E reduziert (Abb.21a), so fällt zunächst auf, dass weiterhin in allen drei Ansätzen (ohne Zucker, + 1% Saccharose, + 2% Glukose) die Kontrollen zu 100% überleben. Die Überlebensrate in den induzierten amiR-SNF4 Ansätzen sinkt jedoch deutlich. Bei den Pflanzen ohne Zucker treten die ersten toten Keimlinge an Tag 9 auf. Von diesem Zeitpunkt an nehmen die toten Keimlinge mit jeder Messung deutlich zu, so dass am Ende des Experiments (Tag 19) nur noch ungefähr 50% der Keimlinge am Leben sind. In ähnlicher Weise verläuft auch die Überlebensrate in den Keimlingen, die auf Saccharose-haltigem Medium angezogen wurden. Die ersten Toten zeigen sich an Tag 9, wobei es zu diesem Zeitpunkt schon deutlich mehr (ungefähr 20%) sind als in den Pflanzen ohne Zucker im Medium (ungefähr 5%). An den Tagen 12 und 14 verändert sich wenig, die Überlebensrate sinkt nur ein bisschen, erst an Tag 16 ist ein deutlicherer Abfall zu erkennen. An Tag 19 sind schließlich wie bei den Pflanzen ohne Zucker nur noch etwa 50% der Keimlinge am Leben. Auch in den auf 2% Glukose angezogenen, induzierten amiR-SNF4 Keimlingen sinkt die Überlebensrate deutlich im Vergleich zu den entsprechenden Ansätzen bei höheren Lichtintensitäten. Bereits an Tag 9 sind 10% der Keimlinge tot. Das sind genauso viele wie am Ende des Experiments mit einer Lichtintensität von 30 μ E. An Tag 12 steigt der Anteil der toten Keimlinge auf 40% an und ist damit sogar größer als in den beiden anderen induzierten Ansätzen bei 10 μ E. Von Tag 12 an steigt der Anteil der toten Keimlinge bis zum Ende des Experiments kaum noch an, so dass schließlich mit ungefähr 55% ein paar Keimlinge mehr als in den anderen beiden induzierten Ansätzen bei 10 μ E überleben.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass in der induzierten amiR-SNF4 Linie schon bei einer Lichtintensität von 50 μ E einige Keimlinge sterben. Daran ändert auch die Zugabe von Zucker ins Wachstumsmedium kaum etwas. Bei sehr niedrigen Lichtintensitäten (10 μ E) sinkt die Überlebensrate in der induzierten amiR-SNF4 Linie auf ungefähr 50%, während die Kontrolle selbst diese ohne Verluste überlebt. Auch unter diesen Bedingungen verbessert die Zugabe von Zucker ins Wachstumsmedium das Überleben nicht.

3.5 Metabolische Analyse

Als Nächstes wurde versucht dem oben beschriebenen Phänotypen (verzögerte Entwicklung, kürzere Wurzeln und schlechteres Überleben) der amiR-SNF4 Keimlinge auf den Grund zu gehen. Da der SnRK1-Komplex eine wichtige Rolle im Primärstoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* spielt (Baena-Gonzalez et al., 2007; Jossier et al., 2009; Robaglia et al., 2012), wurden metabolische Analysen durchgeführt. Diesen sollten zunächst den Einfluss der Reduzierung des *akin β* -Transkriptes und des AKIN β -Proteins auf zentrale Metabolite testen. Des Weiteren wurden der Energiegehalt (Adenosin-Nukleotide) gemessen, sowie metabolische Profile im Rahmen des Entwicklungsexperiments angelegt.

3.5.1 Auswirkungen der *AKINβγ*-Reduzierung auf Zucker und Stärke

Zunächst wurden die Gehalte an Zucker (Glukose, Fruktose und Saccharose) und Stärke in sieben Tage alten Keimlingen bestimmt, die unter Langtagbedingungen (16 h Licht) angezogen wurden. Dazu wurde je ein Zeitpunkt im Dunkeln (Ende der Nacht) und ein Zeitpunkt im Licht (Mitte des Tages; ungefähr 6 – 7 h Belichtung) gewählt. Abb.22 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Der Stärke-Gehalt (Abb.22a) in der Kontrolle ist sowohl am Ende der Nacht wie auch im Licht mit dem in den induzierten *amiR-SNF4* Keimlingen gemessenen Stärke-Gehalt vergleichbar. Zudem ist in beiden Ansätzen der erwartete Anstieg des Stärke-Gehalts im Licht zu sehen. Betrachtet man den Gehalt an Saccharose (Abb.22b), so ist dieser am Ende der Nacht ein wenig erhöht in den induzierten *amiR-SNF4* Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle. In der Mitte des Tages weisen die beiden Ansätze jedoch wieder sehr ähnliche Saccharose-Gehalte auf, die ein wenig größer sind als die am Ende der Nacht.

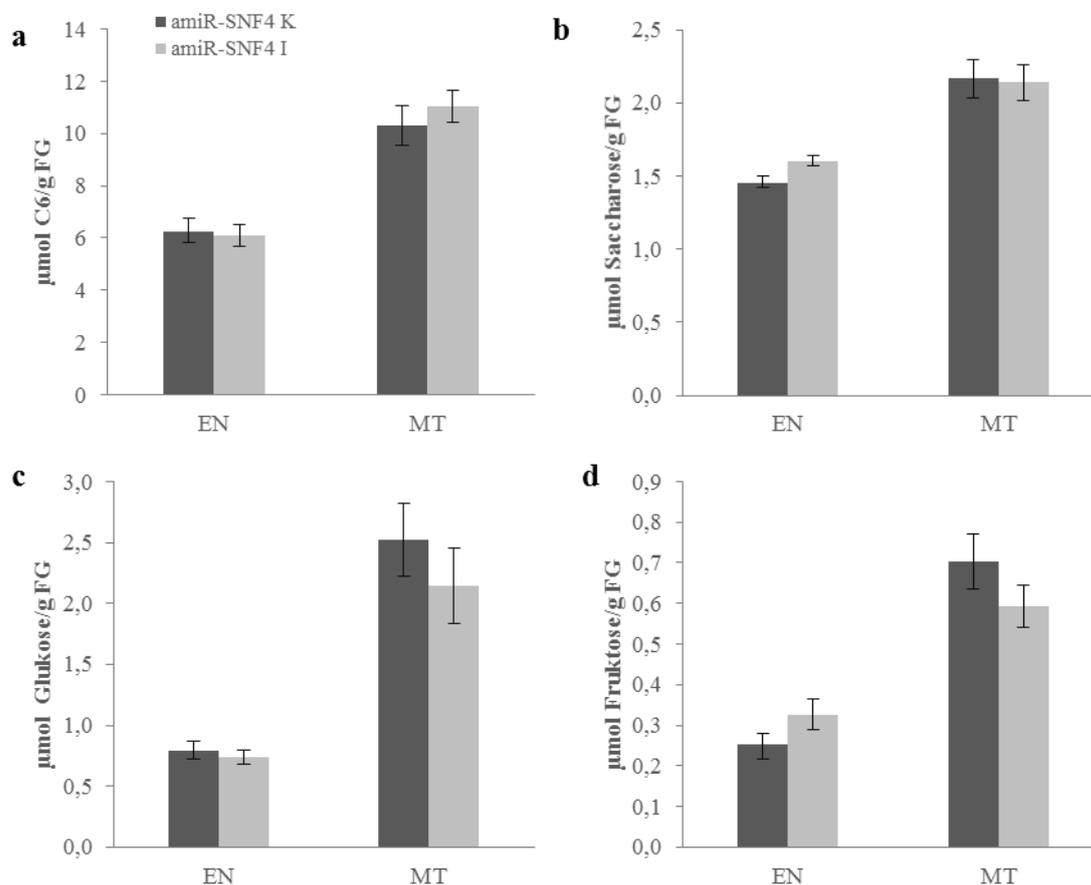


Abb.22: Zucker- und Stärke-Gehalt von *amiR-SNF4* Keimlingen im Langtag

a) Stärke-Gehalt, b) Saccharose-Gehalt, c) Glukose-Gehalt und d) Fruktose-Gehalt in 7 Tage alten Keimlingen der *amiR-SNF4* Linie im Langtag (50 μE ; 16 h Licht) in Sterilkultur. Die Keimlinge wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Mittelwerte von 3 - 14 biologischen Replikaten. Fehlerbalken zeigen SF. Ein Students T-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und induzierter Linie.

K: Kontrolle; I: Induziert; (10 μM β -Estradiol) EN: Ende der Nacht; MT: Mitte des Tages

Auch hinsichtlich des Glukose-Gehalts (Abb.22c) zeigt sich zwischen den induzierten *amiR-SNF4* Keimlingen und der Kontrolle kein deutlicher Unterschied. Eine leichte Tendenz zu einem etwas geringeren Gehalt an Glukose in den induzierten *amiR-SNF4* Keimlingen besteht im Licht. Schließlich

wurde auch der Fruktose-Gehalt gemessen (Abb.22d). Wie auch bei den anderen beiden Zuckern besteht kein deutlicher Unterschied zwischen der induzierten amiR-SNF4 Linie und der Kontrolle. Am Ende der Nacht ist er in den amiR-SNF4 Keimlingen leicht erhöht, in der Mitte des Tages etwas erniedrigt.

Damit kann festgehalten werden, dass im Langtag im Gehalt der drei wichtigsten Zucker (Glukose, Fruktose und Saccharose) sowie im Stärke-Gehalt kein deutlicher Unterschied zwischen Keimlingen mit reduziertem *akinβγ*-Level und Wildtyp-Keimlingen besteht. Es sollte noch angemerkt werden, dass die hier erwähnten leichten Unterschiede Mittelwerte aus mehreren Messungen sind und nicht in jeder Messung auftraten. Dies ist ein weiterer Hinweis auf sehr ähnliche Gehalte an Glukose, Fruktose, Saccharose und Stärke.

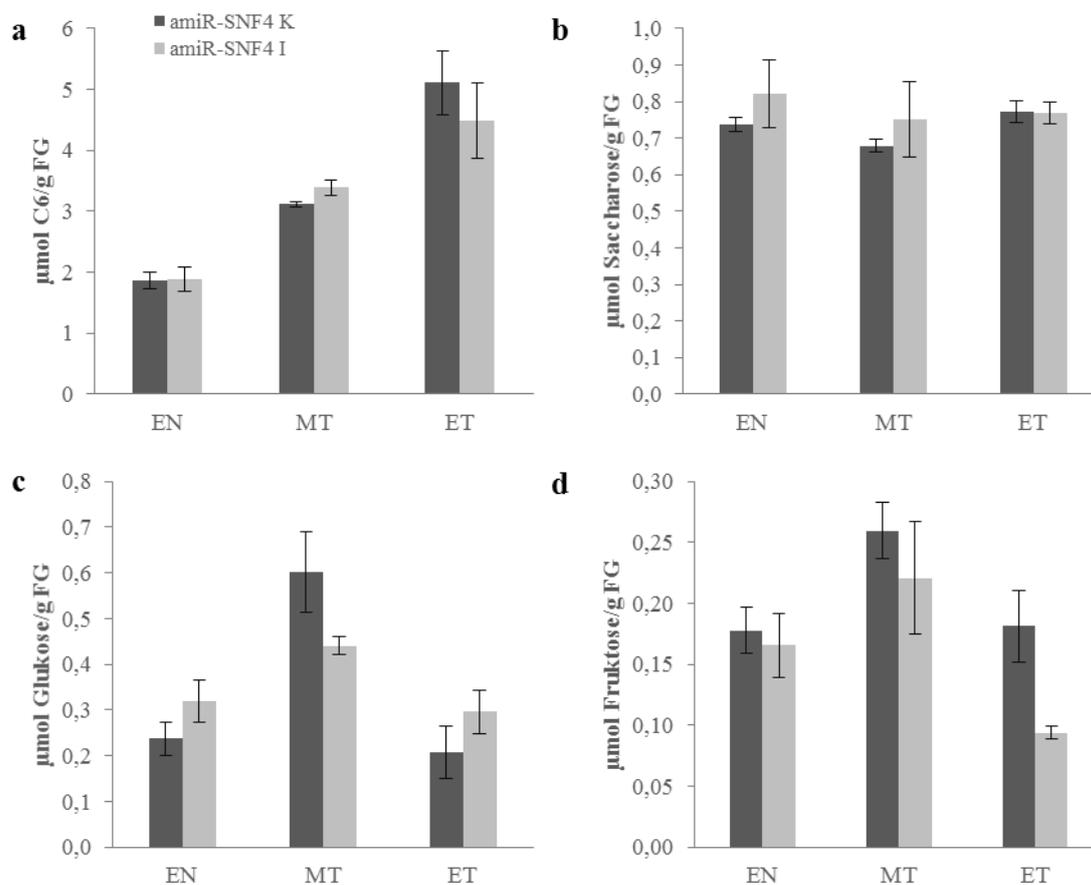


Abb.23: Zucker- und Stärke-Gehalt von amiR-SNF4 Keimlingen im Kurztag

a) Stärke-Gehalt, b) Saccharose-Gehalt, c) Glukose-Gehalt und d) Fruktose-Gehalt in 7 Tage alten Keimlingen der amiR-SNF4 Linie im Kurztag (50 µE; 8 h Licht) in Sterilkultur. Die Keimlinge wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Mittelwerte von 2 - 5 biologischen Replikaten. Fehlerbalken zeigen SF. Ein Students T-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und induzierter Linie.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 µM β-Estradiol); EN: Ende der Nacht; MT: Mitte des Tages; ET: Ende des Tages

Da die Entwicklungsexperimente unter Kurztagbedingungen (siehe Tab. 2) durchgeführt wurden, erfolgte eine Messung der Zucker- und Stärke-Gehalte auch unter diesen (Abb.23). Es wurde ein zusätzlicher Zeitpunkt (Ende des Tages) mit einbezogen. In Abb.23a sind die Ergebnisse der Stärkemessung dargestellt. Am Ende der Nacht ist kein Unterschied zwischen der induzierten amiR-SNF4 Linie und der Kontrolle feststellbar. Auch in der Mitte des Tages und am Ende des Tages sind die

Unterschiede sehr gering. Somit unterscheidet sich auch im Kurztag der Stärke-Gehalt zwischen Kontrolle und induzierten amiR-SNF4 Keimlingen nicht. Der Saccharose-Gehalt ist in Abb.23b zu sehen. Die induzierte amiR-SNF4 Linie weist an den ersten beiden Messzeitpunkten leicht erhöhte Saccharose-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle auf, allerdings sind bei diesen die Schwankungen in den Werten auch relativ groß. Am Ende des Tages sind sich die Werte sehr ähnlich. Bei den Glukose-Gehalten (Abb.23c) zeigt sich in beiden Ansätzen ein Anstieg von 0,2 – 0,3 $\mu\text{mol/g}$ FG am Ende der Nacht zu 0,5 – 0,6 $\mu\text{mol/g}$ FG in der Mitte des Tages, der am Ende des Tages wieder verschwunden ist. Allerdings ist dieser Rhythmus in der Kontrolle deutlicher ausgeprägt als in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen. Dadurch sind deren Glukose-Gehalte am Ende der Nacht und am Ende des Tages höher als in Kontrolle und in der Mitte des Tages geringer. Betrachtet man die Fruktose-Gehalte (Abb.23d), so zeigt sich auch bei diesen ein ähnlicher Tagesverlauf wie in den Glukose-Gehalten. Es gibt eine Erhöhung hin zur Mitte des Tages und dann wieder einen Abfall zum Ende des Tages. Im Unterschied zu den Glukose-Gehalten ist der Verlauf in der induzierten amiR-SNF4 Linie aber ähnlich dem der Kontrolle. Allerdings sind die Werte konstant etwas niedriger.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass sich die Zucker- und Stärke-Gehalte auch unter Kurztagbedingungen zwischen der induzierten amiR-SNF4 Linie und der Kontrolle nicht deutlich unterscheiden. Abgesehen von kleinen Abweichungen sind sie in beiden Ansätzen im Tagesverlauf sehr ähnlich.

3.5.2 Auswirkungen der *AKIN $\beta\gamma$* -Reduzierung auf den Energiegehalt

Der SnRK1-Komplex fungiert unter anderem auch als Energiesensor (Ghillebert et al., 2011). Er reagiert auf Energiemangel und passt den Stoffwechsel an die veränderten Bedingungen an (Baena-Gonzalez et al., 2007; Tome et al., 2014). Mit den Messungen des Energiegehalts soll geklärt werden, ob die Verringerung von *AKIN $\beta\gamma$* auch ohne Stress von außen Auswirkungen auf den Energiestatus hat. Dazu wurden die drei Adenosin-Nukleotide ATP, ADP und AMP mit Hilfe einer HPLC basierten Methode sowohl unter Langtagbedingungen als auch unter Kurztagbedingungen quantifiziert. Es wurde jeweils ein Zeitpunkt am Ende der Nacht und in der Mitte des Tages gewählt. Abb.24 zeigt den Energiestatus von sieben Tage alten Keimlingen im Langtag (50 μE ; 16 h Licht). Der ATP-Gehalt unterscheidet sich zwischen der Kontrolle und den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant. Dasselbe gilt für den ADP-Gehalt. Auch der AMP-Gehalt ist vergleichbar (Abb.24a-c) mit der Ausnahme, dass die Kontrolle zum Zeitpunkt Mitte des Tages einen höheren AMP-Gehalt aufweist als die induzierte amiR-SNF4 Linie. Allerdings ist in diesem Fall auch die Schwankung sehr hoch. Neben den absoluten Gehalten der einzelnen Adenosin-Nukleotide sind auch die Verhältnisse zwischen den einzelnen Nukleotiden (Abb.24 d + e) in beiden Ansätzen vergleichbar. Sowohl das ATP zu ADP Verhältnis als auch das ATP zu AMP Verhältnis unterscheiden sich zu beiden Messzeitpunkten kaum. Schließlich wurde noch die Energieladung E berechnet. Dazu werden alle drei Nukleotide miteinbezogen (siehe 2.9.3). In Abb.24f ist zu sehen, dass sich auch diese zwischen der Kontrolle und

der induzierten amiR-SNF4 Linie kaum unterscheidet. Nur in der Mitte des Tages ist E etwas höher in der induzierten amiR-SNF4 Keimlingen als in der Kontrolle. Auch die absolute Menge an Adenosin-Nukleotiden (Summe von ATP, ADP und AMP) ist in beiden Linien vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Somit kann festgehalten werden, dass sich der Energielevel unter Langtagbedingungen zwischen der Kontrolle und der induzierten amiR-SNF4 Linie nicht unterscheidet.

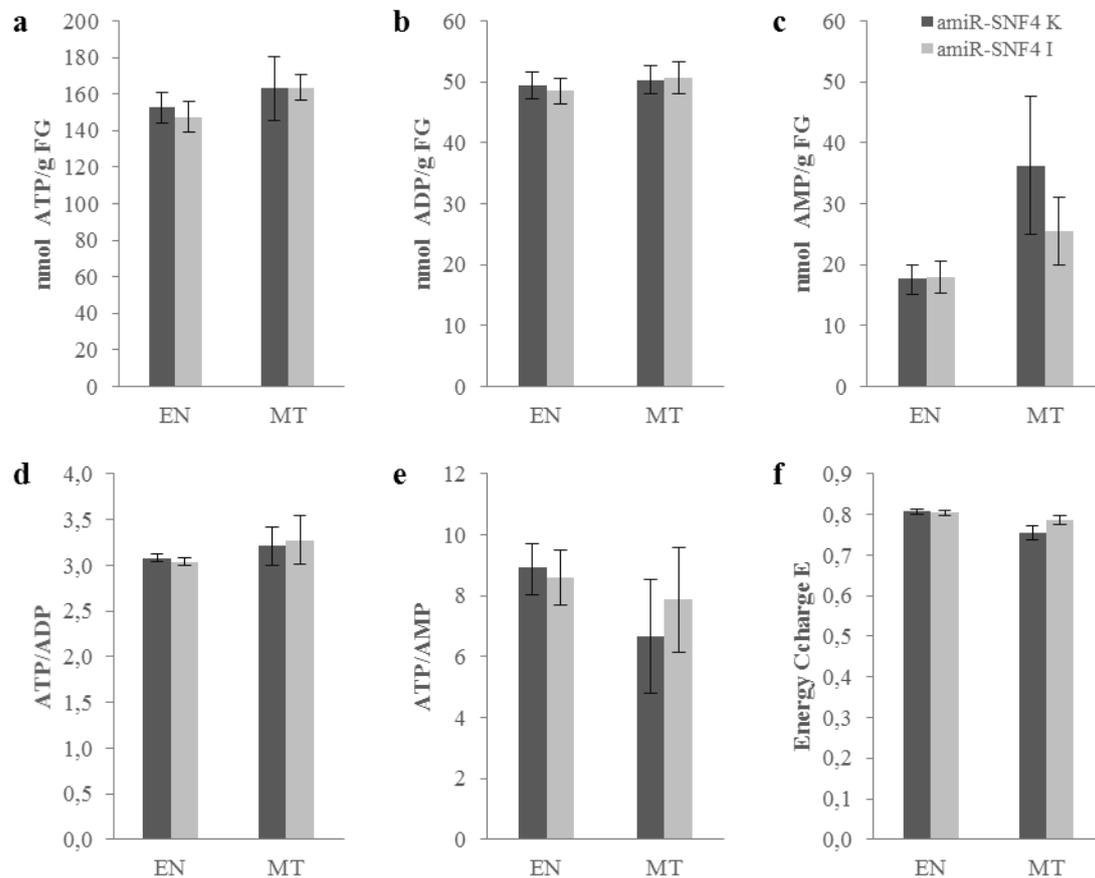


Abb.24: Energiegehalt von amiR-SNF4 Keimlingen im Langtag

a) ATP-Gehalt; b) ADP-Gehalt; c) AMP-Gehalt; d) Verhältnis ATP zu ADP; e) Verhältnis ATP zu AMP; f) Energieladung E wobei

$$E = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

. Die Werte wurden in 7 Tage alten amiR-SNF4 Keimlingen zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen, die im Langtag (16 h Licht) bei einer Lichtintensität von 50 μ E in Sterilkultur angezogen wurden. Fehlerbalken zeigen SF mit n = 3 – 4. Ein Students T-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und induzierter Linie.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; MT: Mitte des Tages

Die Auswirkungen einer Reduzierung von AKIN $\beta\gamma$ auf den Energiestatus wurden auch unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 50 μ E) getestet (Abb.25). Auch hier wurden Proben am Ende der Nacht und in der Mitte des Tages genommen. In Abb.25a ist der ATP-Gehalt dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge zu beiden Zeitpunkten tendenziell mehr ATP enthalten als die Kontrolle. Der ADP-Gehalt hingegen ist in beiden Ansätzen vergleichbar (Abb.25b). Der AMP-Gehalt unterscheidet sich zumindest in der Mitte des Tages (Abb.25c). In den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen ist zu diesem Zeitpunkt tendenziell mehr AMP gemessen worden. Ähnliches könnte für den Zeitpunkt Ende der Nacht gelten, allerdings sind dort die Schwankungen der Werte größer. Bildet man das Verhältnis von ATP zu ADP (Abb.25d), so zeigt sich eine deutliche Erhöhung

dessen in der induzierten amiR-SNF4 Linie im Vergleich zur Kontrolle. Dies gilt in ähnlichem Ausmaße für beide Messzeitpunkte, wobei der Unterschied am Ende der Nacht signifikant ist. Auch das Verhältnis von ATP zu AMP ist tendenziell erhöht in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen (Abb.25e). Am Ende der Nacht ist diese Erhöhung deutlicher als in der Mitte des Tages. Auffällig ist außerdem, dass das ATP zu AMP Verhältnis in beiden Linien vom Ende der Nacht zur Mitte des Tages hin deutlich ansteigt. Schließlich wurde auch hier die Energieladung berechnet. In Abb.25f ist zu erkennen, dass die Energieladung in der induzierten amiR-SNF4 Linie erhöht ist im Vergleich zur Kontrolle. Dies gilt für beide Zeitpunkte, wobei die Erhöhung wiederum am Ende der Nacht signifikant ist.

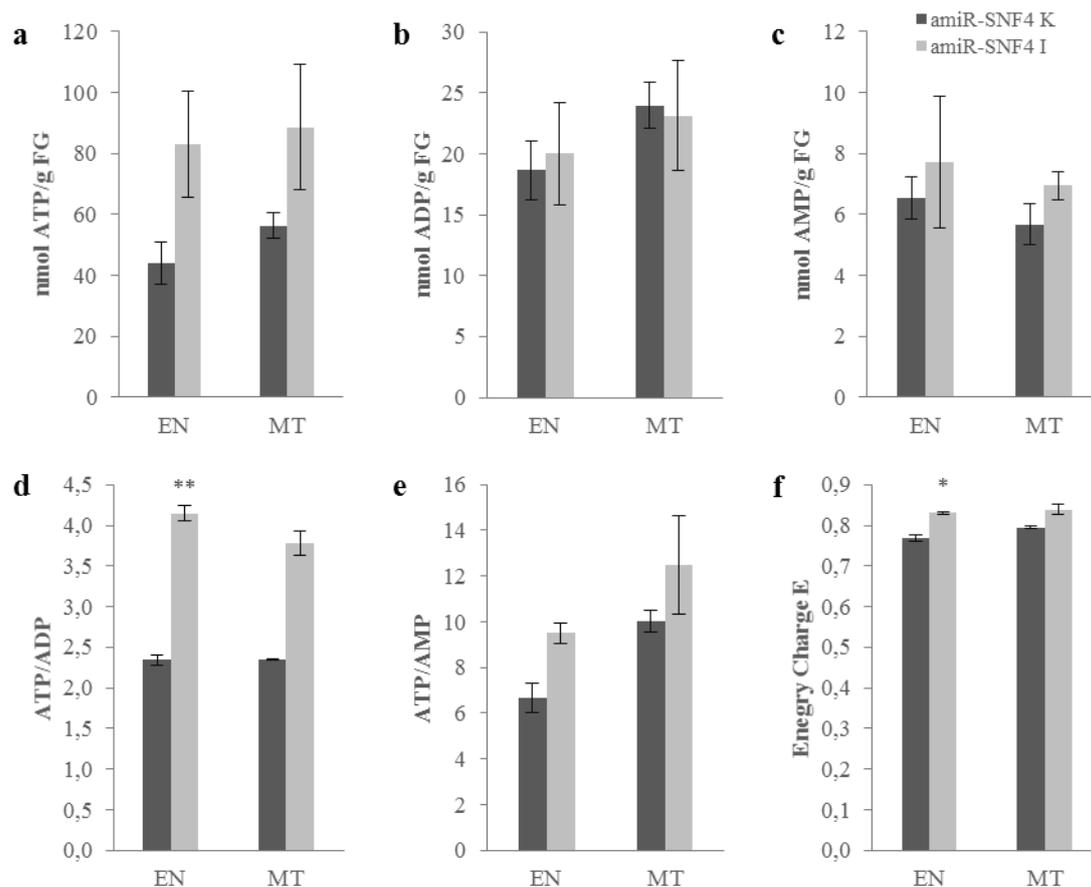


Abb.25: Energiegehalt von amiR-SNF4 Keimlingen im Kurztag

a) ATP-Gehalt; b) ADP-Gehalt; c) AMP-Gehalt; d) Verhältnis ATP zu ADP; e) Verhältnis ATP zu AMP; f) Energieladung E wobei

$E = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$. Die Werte wurden in 7 Tage alten amiR-SNF4 Keimlingen zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen, die im Kurztag (8 h Licht) bei einer Lichtintensität 50 μ E in Sterilkultur angezogen wurden. Fehlerbalken zeigen SF. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 2 - 3$)

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; MT: Mitte des Tages

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass sich unter Kurztagbedingungen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen tendenziell mehr ATP ansammelt als in der Kontrolle. Der ADP- und der AMP-Gehalt hingegen bleiben unverändert oder nur schwach erhöht. Dadurch erhöhen sich die beiden Verhältnisse (ATP/ADP und ATP/AMP) und auch die Energieladung ist, zumindest zu einem Messzeitpunkt,

signifikant erhöht. Somit weist die induzierte amiR-SNF4 Linie unter diesen Bedingungen einen teilweise signifikant erhöhten Energiegehalt auf.

Schließlich wurden auch noch die Redox-Äquivalente NAD^+/NADH und $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ gemessen. Diese wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 50 μE) in der Mitte des Tages in sieben Tage alten Keimlingen bestimmt. In Abb.26 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge enthalten sowohl signifikant mehr NAD^+ als auch mehr NADH im Vergleich zur Kontrolle. Bildet man das Verhältnis NADH zu NAD^+ , so ist auch dieses erhöht. Betrachtet man hingegen die Gehalte an NADP^+ und NADPH , so sind diese in der Kontrolle und in der induzierten amiR-SNF4 Linie vergleichbar. Auch das Verhältnis aus diesen beiden unterscheidet sich nicht. Somit kann festgehalten werden, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie auch hinsichtlich der Redox-Äquivalente nicht limitiert ist, sondern sogar eine leichte Überreduktion des NADH -Pools aufweist.

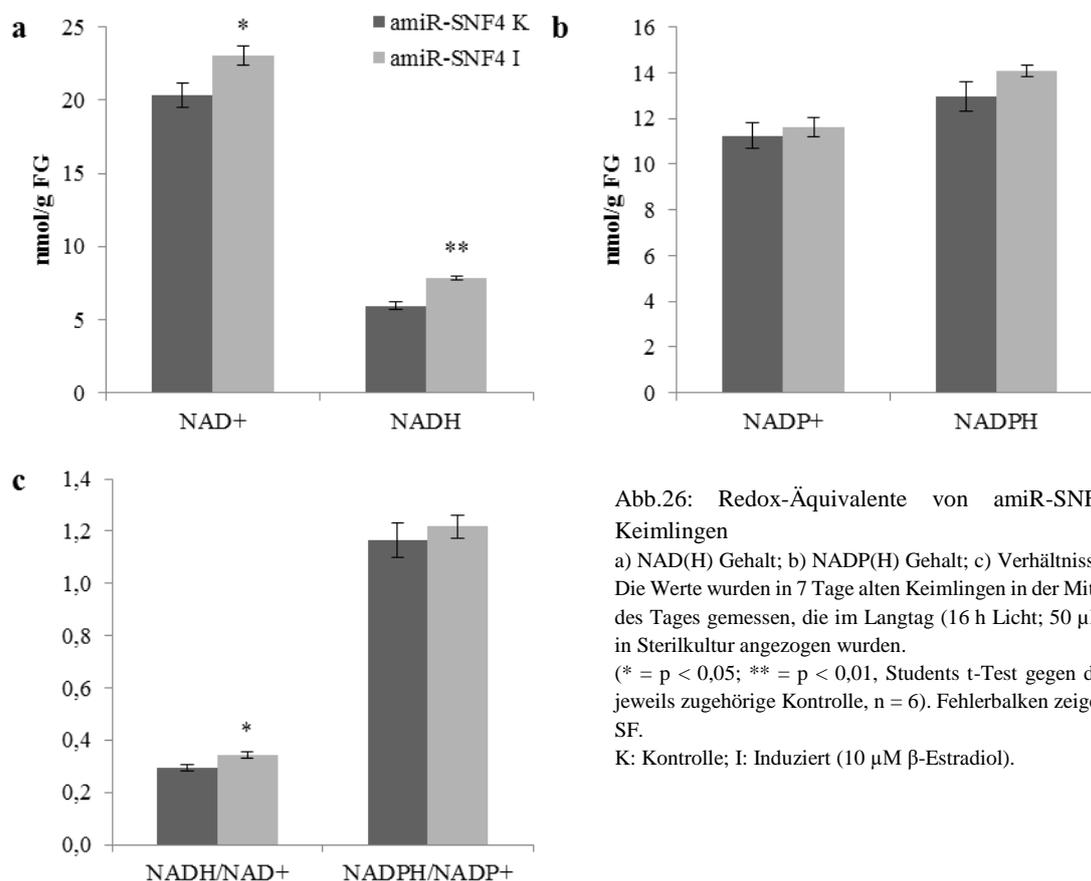


Abb.26: Redox-Äquivalente von amiR-SNF4 Keimlingen
a) $\text{NAD}(\text{H})$ Gehalt; b) $\text{NADP}(\text{H})$ Gehalt; c) Verhältnisse.
Die Werte wurden in 7 Tage alten Keimlingen in der Mitte des Tages gemessen, die im Langtag (16 h Licht; 50 μE) in Sterilkultur angezogen wurden.
(* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 6$). Fehlerbalken zeigen SF.
K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β -Estradiol).

3.5.3 Metabolitprofil bei normalem Wachstumslicht (50 μE)

Zusätzlich zur enzymatischen, spektroskopischen und chromatographischen Messung zentraler Metabolite wurde auch ein metabolisches Profil der induzierten amiR-SNF4 Linie im Vergleich zur Kontrolle angefertigt. Dazu wurden sieben Tage alte Keimlinge (mit und ohne Zucker im Wachstumsmedium), die bei einer Lichtintensität von 50 μE angezogen wurden, sowohl am Ende der

Nacht als auch am Ende des Tages geerntet. Von diesen Proben wurde sowohl ein GC-MS Profil (in Zusammenarbeit mit Dr. M. Lehmann, Metabolomics Service Unit, Biozentrum der LMU München) als auch ein LC-MS Profil (in Zusammenarbeit mit Dr. J. Lunn, Department Stitt, Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie Golm) der Metabolit-Gehalte gemessen (siehe 2.9.4 bzw. 2.9.5). Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Messungen nach Gruppen geordnet vorgestellt. Um die Lesbarkeit zu erleichtern, werden für alle Metabolite relative Änderungen angegeben. Das bedeutet, dass jeweils der Wert der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge durch den Wert der Kontrolle geteilt wurde. Somit bekommt ein in beiden Ansätzen unveränderter Metabolit den Wert 1. Ein Metabolit, der in der induzierten amiR-SNF4 Linie in größerer Menge vorhanden ist als in der Kontrolle, bekommt einen Wert größer 1, ein Metabolit, der in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen geringer konzentriert ist, einen Wert zwischen 0 und 1. Die statistische Analyse in diesen Abbildungen bezieht sich dementsprechend immer auf den Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie.

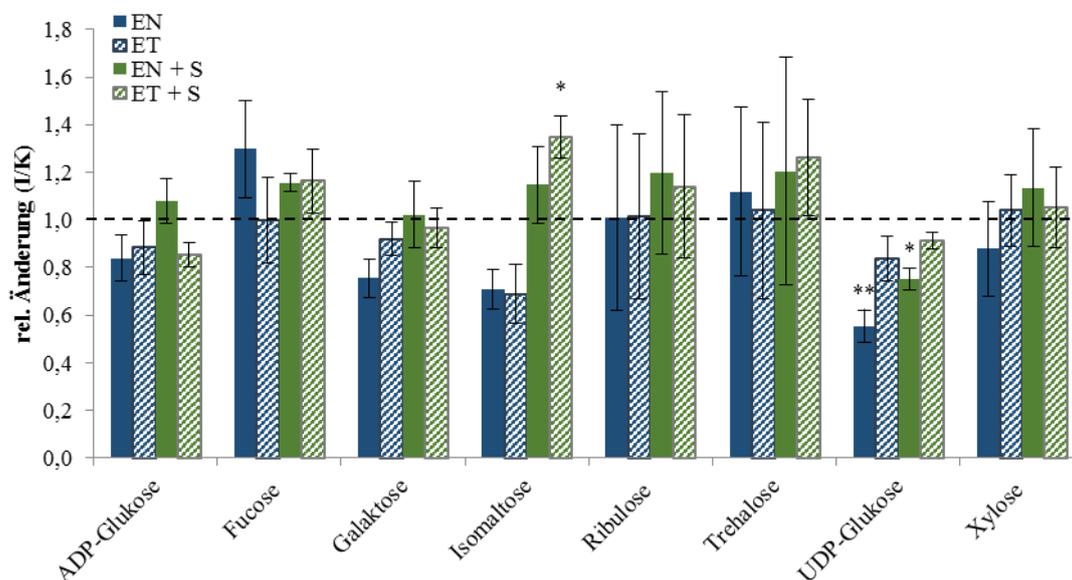


Abb.27: Zucker-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 µE

Relative Änderungen der Zucker-Gehalte zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle im Kurztag (8 h Licht, 50 µE) in 7 Tage alten Keimlingen aus Sterilkultur. Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. ADP- und UDP-Glukose wurden per LC-MS/MS gemessen, die restlichen Zucker per GC-TOF-MS. Fehlerbalken zeigen SF. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$).

K: Kontrolle; I: Induziert (10 µM β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose.

In Abb.27 sind die in diesem Ansatz gemessenen Zucker-Gehalte dargestellt. Glukose, Fruktose und Saccharose sind bereits in Abb.23 b-d enthalten. Die Werte für die mit Saccharose gefütterten Keimlinge unterscheiden sich in diesen drei Zucker nicht (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man die Keimlinge ohne Zucker im Wachstumsmedium, so ist zu sehen, dass nur für UDP-Glukose eine signifikante Erniedrigung am Ende der Nacht in der induzierten amiR-SNF4 Linie gemessen wurde. Die Änderungen in den anderen Zucker sind nicht signifikant, tendieren aber in die gleiche Richtung. In den Pflanzen, die mit 1% Saccharose gefüttert wurden, sind zwei signifikante Änderungen gemessen worden. Zum einen zeigt sich ein erhöhter Isomaltose-Gehalt am Ende des Tages in der induzierten amiR-SNF4 Linie,

zum anderen ein erniedrigter UDP-Glukose-Gehalt am Ende der Nacht ebendort. Für die andern Zucker lassen sich keine Tendenzen feststellen, die relativen Änderungen schwanken nur sehr wenig um den Wert 1.

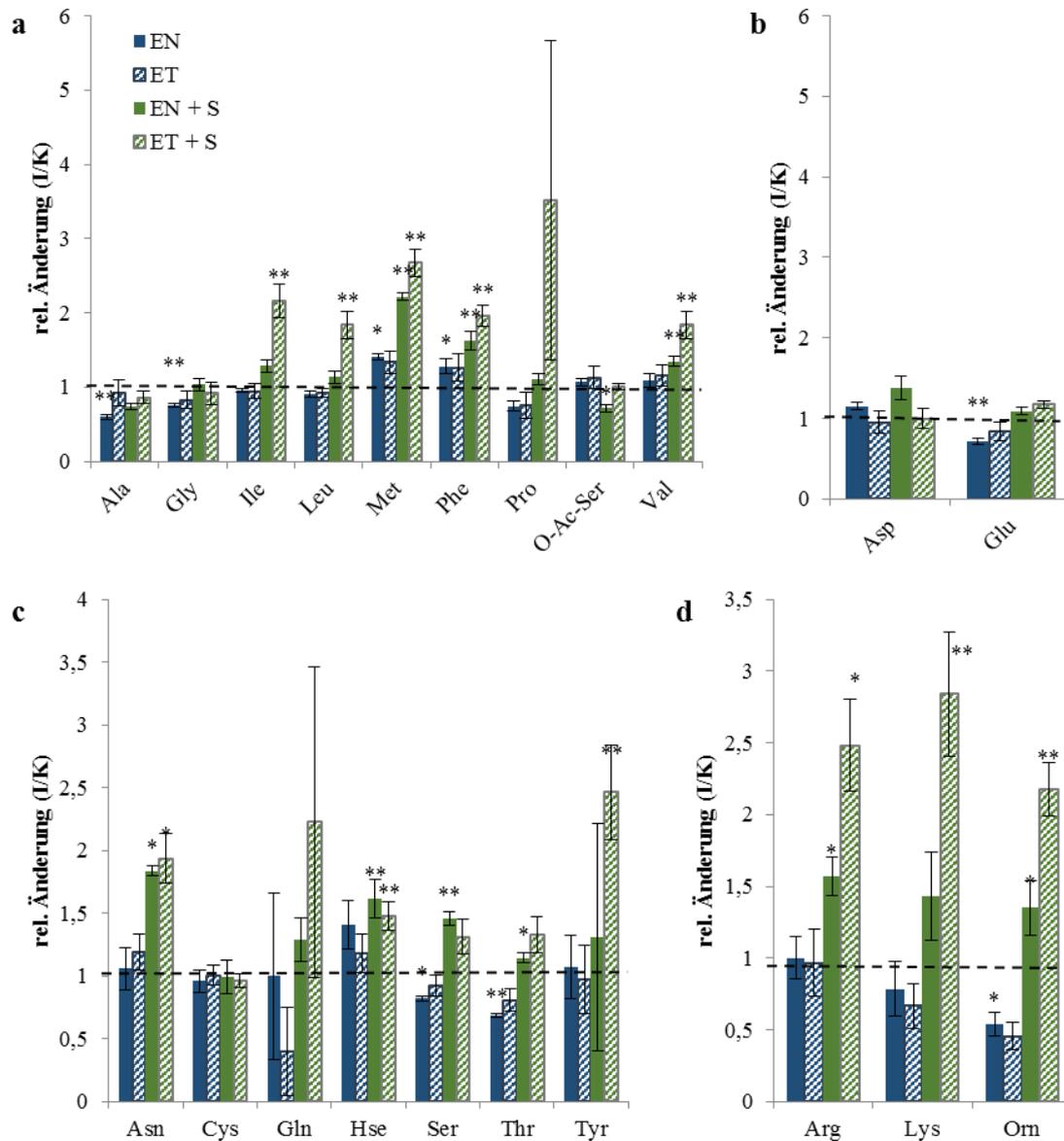


Abb.28: Aminosäure-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E

Relative Änderungen der Aminosäure-Gehalte in 7 Tage alten Keimlingen im Kurztag (8 h Licht; 50 μ E) zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle aus Sterilkultur aufgeteilt nach Gruppen: a) unpolare, b) saure, c) polare und d) basische Aminosäuren (gemessen per GC-TOF-MS). Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. Fehlerbalken zeigen SF. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$)

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose

In Abb.28 sind die Änderungen in den Aminosäuren aufgeteilt nach Gruppen dargestellt. Betrachtet man die unpolaren Aminosäuren (Abb.28a), so fällt auf, dass in Pflanzen ohne Zucker nur Alanin und Glycin am Ende der Nacht in der induzierten amiR-SNF4 Linie signifikant verringert sind, sowie O-acetyl-Serin zum selben Zeitpunkt in den Pflanzen mit Saccharose. Die anderen unpolaren Aminosäuren sind in den Keimlingen ohne Zucker zu beiden Zeitpunkten unverändert mit der Ausnahme von

Methionin und Phenylalanin. Diese sind erhöht am Ende der Nacht. In den Keimlingen, die mit einem Prozent Saccharose gefüttert wurden, zeigt sich ein anderes Bild. In diesen sind, vor allem zum Ende des Tages hin, einige unpolare Aminosäuren (Ile, Leu, Met, Phe, Val am Ende des Tages; Met, Phe, Val auch am Ende der Nacht) in der induzierten amiR-SNF4 Linie signifikant erhöht.

Die beiden sauren Aminosäuren (Abb.28b) Aspartat und Glutamat zeigen bis auf eine Ausnahme keine signifikanten Änderungen zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle. Nur Glutamat ist signifikant verringert am Ende der Nacht in den Keimlingen ohne Zucker. Bei den polaren Aminosäuren (Abb.28c) zeigen sich für die Keimlinge ohne Zucker im Wachstumsmedium wiederum nur am Ende der Nacht signifikante Veränderungen. Die Gehalte an Serin und Threonin sind verringert. Betrachtet man hingegen die Pflanzen, die mit einem Prozent Saccharose gefüttert wurden, so zeigt sich auch für diese Gruppe von Aminosäuren in einigen Fällen eine signifikante Erhöhung in der induzierten amiR-SNF4 Linie. Dies betrifft Asparagin und Homoserin an beiden Messzeitpunkten, Serin und Threonin am Ende der Nacht sowie Tyrosin am Ende des Tages. Bleiben zuletzt noch die basischen Aminosäuren (Abb.28d). Auch in dieser Gruppe zeigt sich in den Pflanzen ohne Zugabe von Zucker entweder eine Verringerung (Ornithin) oder keine Änderung zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie. In den Keimlingen mit Saccharose hingegen zeigt sich zu allen Zeitpunkten eine deutliche, meist signifikante Erhöhung in der induzierten amiR-SNF4 Linie für alle gemessenen basischen Aminosäuren.

Zusammenfassend kann für die Aminosäuren bei einer Lichtintensität von 50 μE festgehalten werden, dass die Keimlinge ohne Zucker im Wachstumsmedium wenige Veränderungen aufweisen. Diese sind dann meist Verringerungen in der induzierten amiR-SNF4 Linie hinsichtlich einzelner Aminosäuren am Ende der Nacht. In den Keimlingen mit Saccharose im Wachstumsmedium hingegen treten in vielen Fällen signifikante Erhöhungen in der induzierten amiR-SNF4 Linie auf.

Eine weitere Gruppe an Metaboliten, die in diesem Experiment gemessen wurde, ist die der Zuckeralkohole. In Abb.29 sind die relativen Änderungen zwischen induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und Kontrolle in dieser Gruppe dargestellt. In den Pflanzen ohne Zucker im Wachstumsmedium fällt auf, dass am Ende der Nacht diese relative Änderung in allen gemessenen Zuckeralkoholen bis auf Maltitol kleiner als 1 ist. Das bedeutet, dass die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge in diesen Fällen weniger des jeweiligen Zuckeralkohols enthalten. Signifikant sind jedoch nur die Änderungen in Erythritol, Myoinositol und Threitol. Die Erniedrigung in diesen drei Zuckeralkoholen bleibt auch, im Gegensatz zu den anderen beobachteten, nicht signifikanten Erniedrigungen am Ende der Nacht, am Ende des Tages bestehen. Bei den mit Saccharose gefütterten Keimlingen zeigen sich nur zwei signifikante Änderungen. Der Gehalt an Maltitol ist am Ende der Nacht in der induzierten amiR-SNF4 Linie erhöht und der Gehalt an Myoinositol ist zu beiden Zeitpunkten in diesen Pflanzen verringert. Des Weiteren fällt auf, dass die Änderung im Myoinositol-Gehalt die bisher einzige ist, bei der die Verringerung in den mit Zucker gefütterten Keimlingen größer ist als in den Keimlingen ohne Zucker. Die in den Keimlingen ohne Zucker im Medium beobachteten Verringerungen

an Erythritol und Threitol in der induzierten amiR-SNF4 Linie sind in den mit Saccharose gefütterten Keimlingen nicht mehr (Erythritol) oder nur in abgeschwächter Form (Threitol) zu beobachten.

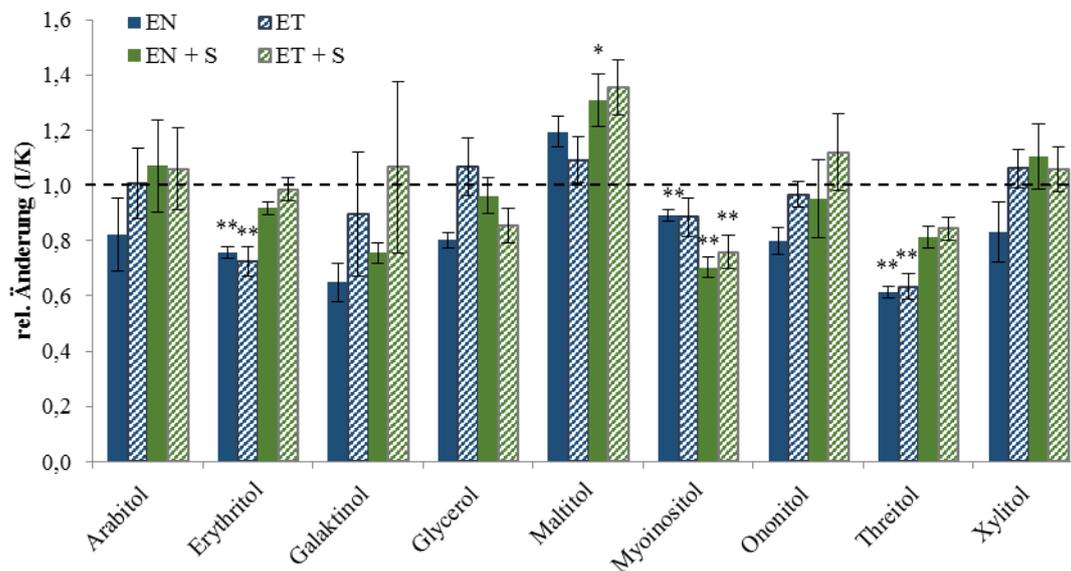
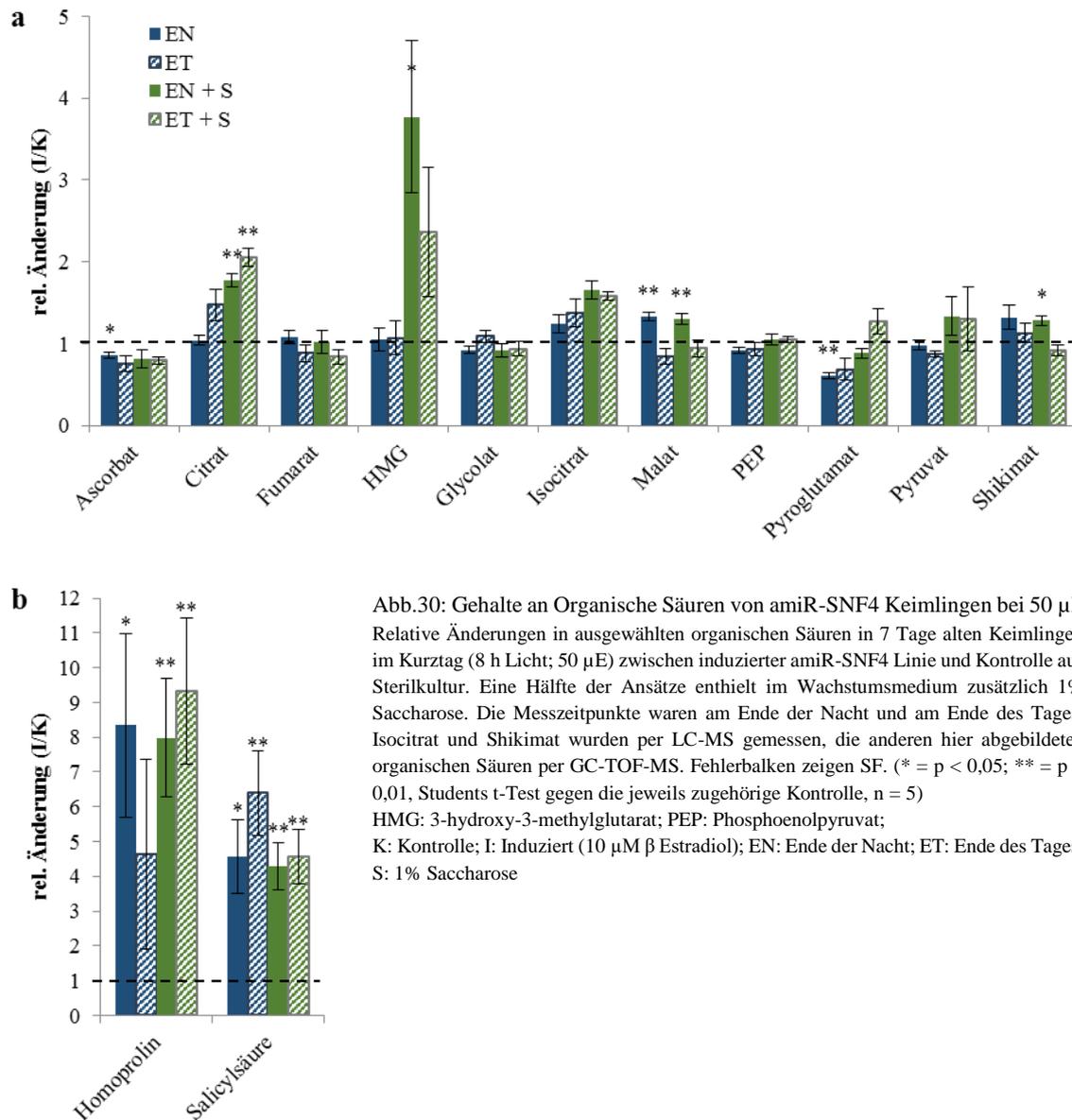


Abb.29: Zuckeralkohol-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E

Relative Änderungen der Zuckeralkohole in 7 Tage alten Keimlingen im Kurztag (8 h Licht; 50 μ E) zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle aus Sterilkultur (gemessen per GC-TOF-MS). Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. Fehlerbalken zeigen SF. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$)
K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose

Ein weitere, große Gruppe von gemessenen Metaboliten sind die organischen Säuren. In Abb.30 ist eine Auswahl dieser dargestellt. Die gesamten Ergebnisse für diese Gruppe sind im Anhang (siehe Anhang Tab. 1 und Anhang Tab. 2) zu finden. Betrachtet man die Pflanzen ohne Zucker im Medium, so sind am Ende der Nacht signifikante Verringerungen an Ascorbat und Pyroglutamat, einem Abbauprodukt von Glutathion, in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zu erkennen. Diese bestehen in einem ähnlichen Maße auch am Ende des Tages. Im Gegensatz dazu zeigt sich die signifikante Erhöhung im Malat-Gehalt nur am Ende der Nacht. Eine weitere signifikante Erhöhung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen stellt die Verachtfachung im Homoprolin-Gehalt am Ende der Nacht dar. Homoprolin, auch Pipecolinsäure genannt, ist ein Bestandteil der erworbenen Pathogenabwehr (Navarova et al., 2012). Diese Erhöhung bleibt auch am Ende des Tages in abgeschwächter Form bestehen. Außerdem ist in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen auch der Salizylsäure-Gehalt zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht. Betrachtet man die mit Saccharose gefütterten Keimlinge, so ist zu sehen, dass die Verringerung im Ascorbat-Gehalt in der induzierten amiR-SNF4 Linie in ähnlichem Ausmaße wie in den Pflanzen ohne Zucker auftritt. Ansonsten treten in dieser Gruppe keine Verringerungen in einem Metaboliten in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen auf. Erhöht sind hingegen der Gehalt an Citrat zu beiden Zeitpunkten, der Gehalt an HMG (3-hydroxy-3-methylglutarat) vor allem am Ende der Nacht, sowie der Gehalt an Malat und Shikimat am Ende der

Nacht. Des Weiteren sind auch in diesen Pflanzen der Homoprolin-Gehalt und der Salizylsäure-Gehalt an beiden Messzeitpunkten signifikant erhöht.



Für die organischen Säuren kann festgehalten werden, dass bis auf eine Verringerung des Ascorbat-Gehalts in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen unter allen Bedingungen Veränderungen vor allem in den Pflänzchen mit 1% Saccharose im Wachstumsmedium in Form von Erhöhungen am Ende der Nacht auftreten. Dies betrifft auch TCA-Zyklus-Intermediate. Interessant sind auch die sehr deutlichen Erhöhungen im Homoprolin- und im Salizylsäure-Gehalt.

Als letzte Gruppe von Metaboliten, die im Rahmen dieser metabolischen Analyse gemessen wurden, werden die Zuckerphosphate betrachtet. Diese sind in Abb.31 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Zuckerphosphate ohne Fruktose- und Glukosephosphate (Abb.31a), so fällt auf, dass in den Keimlingen ohne Zucker im Medium in den meisten Fällen eine Verringerung in der induzierten amiR-SNF4 Linie im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde. Vor allem am Ende der Nacht ist die Hälfte der Zuckerphosphate in diesen Pflänzchen signifikant verringert (Gal-1-P; Man-6-P; 3-PGA; Suc-6-P;

Tre-6-P). Zwei weitere sind deutlich, aber nicht signifikant verringert (Man-1-P; Myo-2-P). Schließlich gibt es noch zwei unveränderte Zuckerphosphate (Gly-3-P, Myo-1-P) und Gal-6-P ist deutlich erhöht. Die meisten dieser Änderungen sind am Ende des Tages nur noch in abgeschwächter Form erkennbar. Einzig die Reduktion im Man-6-P-Gehalt und die Erhöhung im Gal-6-P-Gehalt bleiben in ähnlicher Ausprägung bestehen.

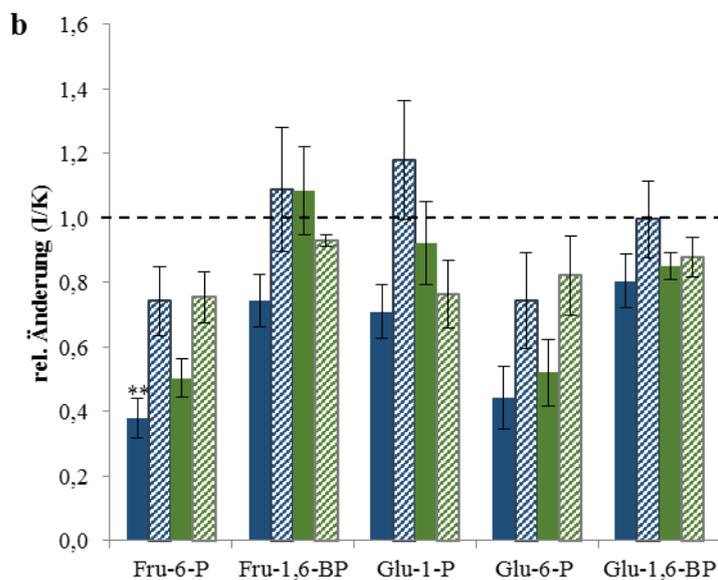
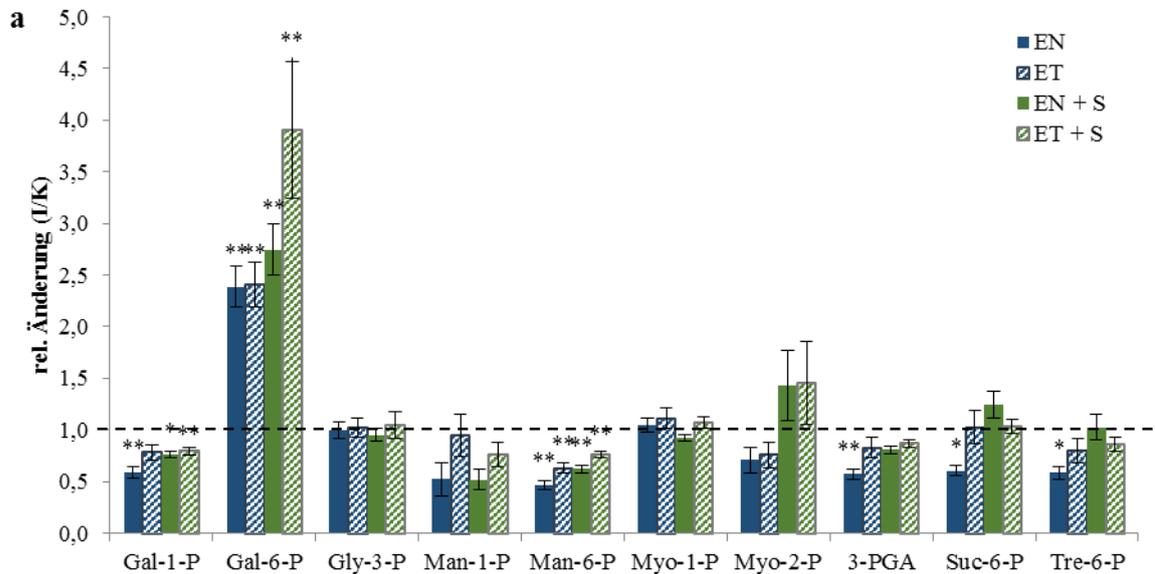


Abb.31: Zuckerphosphat-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 50 μ E

Relative Änderungen in den Zuckerphosphaten in 7 Tage alten Keimlingen im Kurztag (8 h Licht, 50 μ E) zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle aus Sterilkultur. Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. a) Zuckerphosphate ohne Fruktose und Glukose. b) Fruktose- und Glukose-phosphate. Fehlerbalken zeigen SF

Gal: Galaktose; Gly: Glycerol; Man: Mannose; Myo: Myoinositol; PGA: Phosphoglycerin-aldehyd; Suc: Saccharose; Tre: Trehalose; Fru: Fruktose; Glu: Glukose; P: Phosphat; BP: Bisphosphat..

Fru-6-P, Gal-6-P, Glu-1-P, Glu-6-P, Myo-1-P, Myo-2-P und Man-1-P wurden per GC-TOF-MS gemessen, die anderen Zuckerphosphate per LC-MS

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose

Für die mit 1% Saccharose gefütterten Keimlinge zeigt sich am Ende der Nacht ein vergleichbares Muster wie in den Keimlingen ohne Zucker. Einzig die Disaccharid-Phosphate Suc-6-P und Tre-6-P zeigen nicht die zuvor beobachtete Verringerung in der induzierten amiR-SNF4 Linie genauso wie Myo-2-P, wobei für Tre-6-P zu beachten ist, dass es auch eine wichtige Funktion als Signalmetabolit für die Verfügbarkeit von Saccharose einnimmt (Lunn et al., 2014). Des Weiteren fällt auf, dass die

Unterschiede zwischen den beiden Messzeitpunkten geringer sind als in den Keimlingen ohne Zucker. Sie sind in vielen Fällen gänzlich verschwunden. Die deutliche Erhöhung im Gal-6-P-Gehalt ist auch in diesen Pflänzchen messbar.

In Abb.31b sind die relativen Änderungen in den Fruktose- und Glukosephosphaten dargestellt. In den Keimlingen ohne Zucker im Wachstumsmedium sind diese am Ende der Nacht immer kleiner als 1. Das bedeutet, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie im Vergleich zur Kontrolle zu diesem Zeitpunkt verringerte Gehalte in allen fünf gemessenen Fruktose- und Glukosephosphaten aufweist. Zum Ende des Tages steigt die relative Änderung in diesen zwar an, aber nur für Fru-1,6-BP, Glu-1-P und Glu-1,6-BP erreicht diese den Wert 1 und zeigt somit einen ausgeglichenen Gehalt in beiden Ansätzen an. Besonders stark reduziert sind die Gehalte der beiden zentralen Hexose-Phosphate Fru-6-P und Glu-6-P. Diese wurden sowohl per GC-MS-TOF als auch per LC-MS/MS gemessen. In der hier nicht gezeigten LC-MS/MS Messung waren die Unterschiede zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle ähnlich deutlich und in fast allen Fällen auch statistisch signifikant. Das Gleiche gilt für die mit 1% Saccharose gefütterten Ansätze. In diesen sind die Änderungen in den anderen drei Fruktose- bzw. Glukosephosphaten jedoch geringer als in den Keimlingen ohne Zucker.

Zusammenfassend kann man für die Zuckerphosphat-Messung festhalten, dass besonders in den Pflänzchen ohne Zucker im Medium die induzierte amiR-SNF4 Linie in vielen Fällen einen geringeren Gehalt aufweist als die Kontrolle. Dies gilt vor allem zum Zeitpunkt Ende der Nacht. In den Keimlingen mit 1% Saccharose im Wachstumsmedium tritt dies in abgeschwächter Form auf. Eine Ausnahme bilden die Gehalte an Gal-6-P, welche in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen in allen Fällen deutlich erhöht sind. Schließlich bleibt noch festzuhalten, dass auch die im Stoffwechsel zentralen Metabolite Fru-6-P und Glu-6-P in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen deutlich verringert sind.

3.5.4 Metabolitprofil bei niedriger Lichtintensität

Da sich der beobachtete Wachstums-Phänotyp bei einer Lichtintensität von 10 μ E noch verstärkt, wurde auch unter diesen Bedingungen ein Metabolitprofil gemessen. Die Versuchsanordnung und die Datenaufbereitung wurden vergleichbar mit dem schon beschriebenen Metabolitprofil bei 50 μ E durchgeführt. Allerdings wurde keine LC-MS/MS Messung durchgeführt, da bei einer Lichtintensität von 10 μ E nicht genügend Pflanzenmaterial gewonnen werden konnte. Im Folgenden werden die Metabolite wie zuvor nach Gruppen geordnet beschrieben. Auch in diesen Abbildungen ist wieder die relative Änderung zwischen induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und Kontrolle dargestellt. Statistische Signifikanz bezieht sich dementsprechend immer auf den Unterschied zwischen diesen beiden Ansätzen.

Die erste Gruppe von Metaboliten, die in diesem Versuch gemessen wurden, sind die Zucker (Abb.32). Betrachtet man zunächst die Keimlinge ohne Saccharose im Wachstumsmedium, so fällt auf, dass am Ende der Nacht fast alle Zucker in der induzierten amiR-SNF4 Linie tendenziell geringer konzentriert sind als in der Kontrolle. Signifikant verringert sind Psicose, Raffinose und Saccharose.

Interessanterweise weisen Glukose und Trehalose keine Tendenzen auf. Am Ende des Tages sind die oben erwähnten Tendenzen in den meisten Zuckern verschwunden. Auch die signifikanten Änderungen sind nicht mehr messbar. Auffällig zu diesem Zeitpunkt ist der deutlich verringerte Glukose-Gehalt der induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen, der sich im Laufe des Tages entwickelt hat. Auch der Saccharose-Gehalt ist zu diesem Zeitpunkt in diesen Keimlingen noch verringert, wenn auch nicht mehr so deutlich wie am Ende der Nacht. In den auf einem Prozent Saccharose angezogenen Keimlingen zeigen sich am Ende der Nacht in der induzierten amiR-SNF4 Linie signifikante Verringerungen in den drei wichtigsten Zuckern Glukose, Fruktose und Saccharose. Für die restlichen, gemessenen Zucker sind keine deutlichen Änderungen feststellbar. Einzig Cellubiose und Psicose zeigen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen tendenziell erhöhte Werte und der Sorbose-Gehalt ist signifikant erhöht. Am Ende des Tages zeigt sich für Fruktose und Glukose ein verändertes Bild. Beide Gehalte sind in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen etwas erhöht. Auch die anderen Zucker zeigen zu diesem Zeitpunkt tendenziell höhere Gehalte in dieser Linie. Der Saccharose-Gehalt bleibt jedoch als einziger Zucker signifikant verringert.

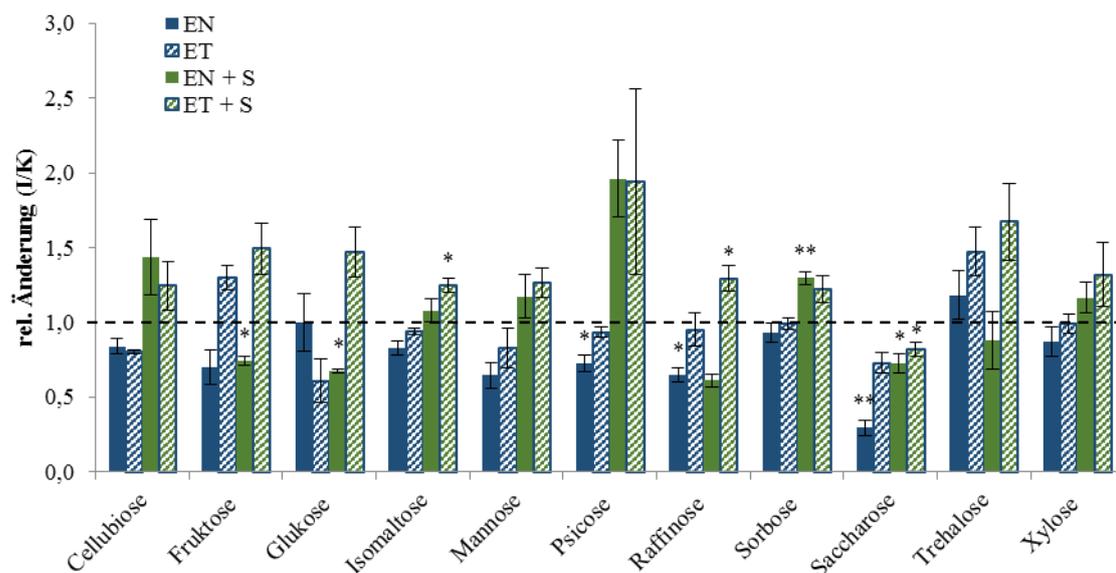


Abb.32: Zucker-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E

Relative Änderungen der Zucker-Gehalte in 7 Tage alten Keimlingen im Kurztag (8 h Licht; 10 μ E) zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle aus Sterilkultur. Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. Fehlerbalken zeigen SF. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$)

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge ohne Zucker im Medium vor allem am Ende der Nacht deutlich weniger Zucker aufweisen als die Kontrolle (insbesondere Saccharose). Auch die auf einem Prozent Saccharose angezogenen Keimlinge weisen am Ende der Nacht in den drei wichtigsten Zucker geringere Gehalte in den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen auf. Ansonsten zeigen die Zucker in diesen Pflänzchen kaum Änderungen.

Betrachtet man als Nächstes die unpolaren Aminosäuren (Abb.33a), so zeigt sich für die Keimlinge ohne Zucker im Wachstumsmedium ein geringerer Gehalt in der induzierten amiR-SNF4 Linie in sieben von neun Aminosäuren zum Zeitpunkt Ende der Nacht. Besonders der Alanin-, der Isoleucin-, der Prolin- sowie der Valin-Gehalt sind signifikant erniedrigt.

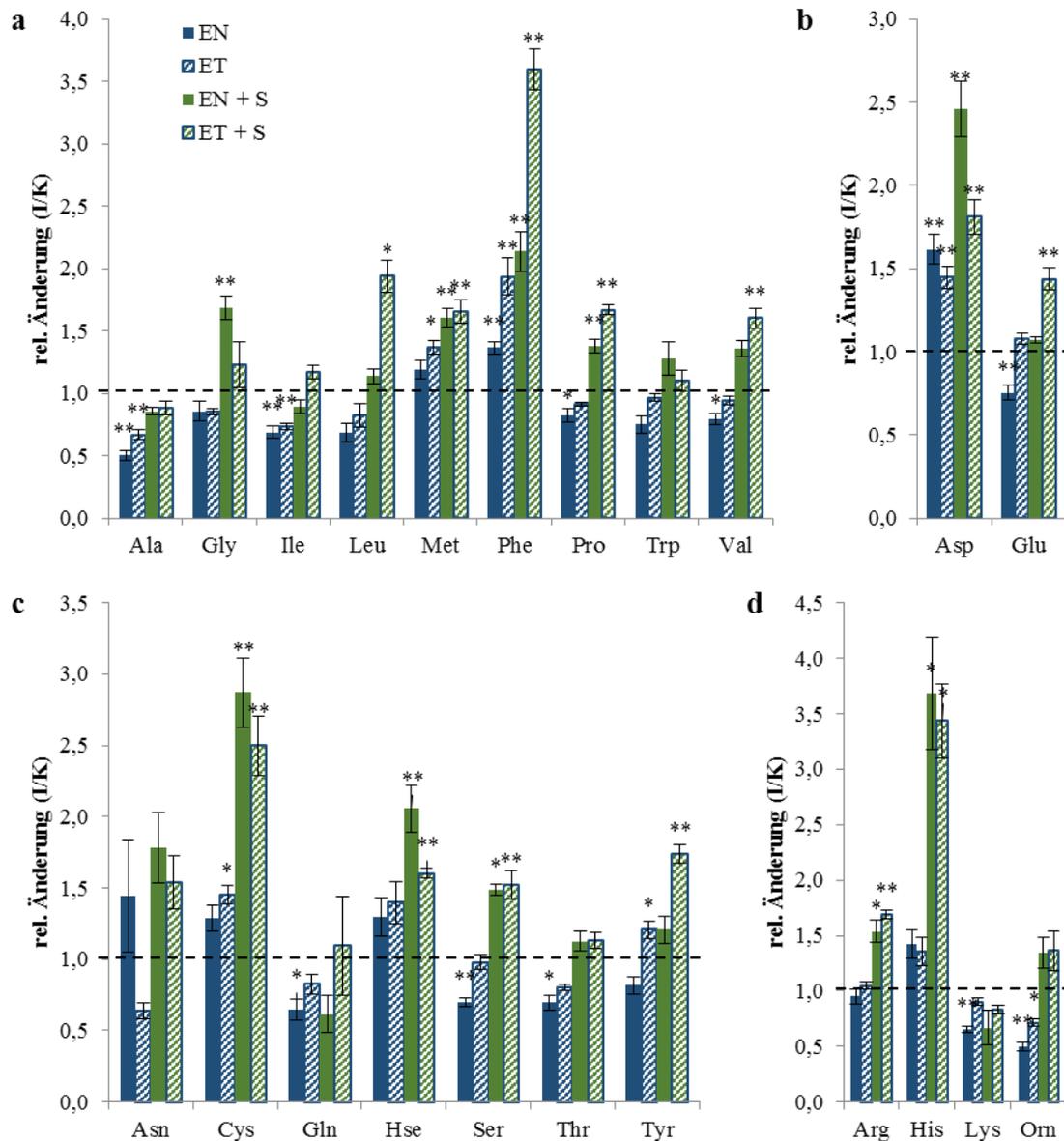


Abb.33: Aminosäure-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E

Relative Änderungen der Aminosäuren in 7 Tage alten Keimlingen im Kurztag (8 h Licht; 10 μ E) zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle aus Sterilkultur aufgeteilt nach Gruppen: a) unpolare, b) saure, c) polare und d) basische Aminosäuren. Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. Fehlerbalken zeigen SF.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose

Im Gegensatz dazu ist der Gehalt an Phenylalanin zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöht. Zum Zeitpunkt Ende des Tages erhöht sich die relative Änderung in fast allen Aminosäuren. Das bedeutet eine relative Erhöhung des Gehalts der jeweiligen Aminosäure in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verglichen mit dem Zeitpunkt Ende der Nacht. Trotzdem bleibt das Verhältnis zwischen

induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle in den Aminosäuren, die am Ende der Nacht in der induzierten amiR-SNF4 Linie erniedrigt waren, kleiner als 1 und somit der Gehalt in der betreffenden Aminosäure auch am Ende des Tages im induzierten Ansatz geringer als in der Kontrolle.

In den auf einem Prozent Saccharose angezogenen Keimlingen zeigt sich für keine der unpolaren Aminosäuren ein verringerter Gehalt in der induzierten amiR-SNF4 Linie. Signifikante Erhöhungen dagegen sind am Ende der Nacht bei vier Aminosäuren zu finden (Gly, Met, Phe, Pro). Für Methionin, Phenylalanin und Prolin sind diese Änderungen auch am Ende des Tages gemessen worden. Des Weiteren ist auch der Gehalt an Leucin und an Valin am Ende des Tages signifikant erhöht. Interessanterweise verschwindet die deutliche Erhöhung im Glycin-Gehalt, die am Ende der Nacht gemessen wurde, am Ende des Tages. Nur bei dieser Aminosäure und bei Tryptophan steigt die relative Änderung im Tagesverlauf nicht an.

Die Messungen der sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat (Abb.33b) zeigen einer signifikante Erhöhung im Aspartat-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen unter allen Bedingungen. Auch hier fällt auch, dass die relative Änderungen im Tagesverlauf abnimmt, aber trotzdem am Ende des Tages noch signifikant höher ist als 1. Der Glutamat-Gehalt hingegen ist in den Pflänzchen ohne Zucker im Medium am Ende der Nacht in der induzierten amiR-SNF4 Linie signifikant erniedrigt. Am Ende des Tages ist dieser Unterschied verschwunden. In den Keimlingen mit einem Prozent Saccharose im Wachstumsmedium hingegen ist der Glutamat-Gehalt am Ende der Nacht in der induzierten amiR-SNF4 Linie unverändert und am Ende des Tages signifikant erhöht.

In der Gruppe der polaren Aminosäuren (Abb.33c) sind in den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen ohne Zucker im Wachstumsmedium zum Zeitpunkt Ende der Nacht von sieben gemessenen Aminosäuren drei signifikant verringert (Gln, Ser, Thr) und der Gehalt an Tyrosin ist fast signifikant verringert ($p = 0,056$; Students t-Test gegen die Kontrolle; $n = 5$). Die Gehalte der anderen drei polaren Aminosäuren (Asn, Cys, Hse) sind unverändert oder leicht erhöht. Zum Zeitpunkt Ende des Tages erhöht sich die relative Änderung in allen polaren Aminosäuren im Vergleich zum Ende der Nacht (mit einer Ausnahme: Asn). Das führt dazu, dass die signifikanten Verringerungen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen, die am Ende der Nacht gemessen wurden (Gln, Ser, Thr), verschwinden. Des Weiteren sind zu diesem Zeitpunkt erhöhte Gehalte an Cystein und Tyrosin im induzierten Ansatz verglichen mit der Kontrolle nachweisbar. In den Pflänzchen mit einem Prozent Saccharose im Wachstumsmedium sind am Ende der Nacht bis auf Glutamin alle gemessenen, polaren Aminosäuren in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen unverändert (Thr, Tyr) oder erhöht (Asn, Cys, Hse, Ser) im Vergleich zur Kontrolle. Zum Ende des Tages hin bleiben die bereits beobachteten erhöhten Gehalte bestehen. Außerdem zeigt sich zu diesem Zeitpunkt auch eine Erhöhung im Tyrosin-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen.

Die letzte Gruppe umfasst die basischen Aminosäuren (Abb.33d). Hier zeigen sich am Ende der Nacht in den Keimlingen ohne Zucker im Medium keine Änderungen im Arginin- und Histidin-Gehalt zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle. Der Lysin- und der Ornithin-Gehalt hingegen

sind in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zu diesem Zeitpunkt signifikant verringert. Am Ende des Tages bleibt einzig die signifikante Verringerung im Ornithin-Gehalt bestehen. Die drei anderen, gemessen basischen Aminosäuren sind in diesen Keimlingen im Vergleich zur Kontrolle zu diesem Zeitpunkt unverändert. Betrachtet man die Keimlinge, welche mit einem Prozent Saccharose gefüttert wurden, so fällt auf, dass in diesen der Arginin- und der Histidin-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht sind. Der Lysin- und der Ornithin-Gehalt hingegen sind im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei einer Lichtintensität von 10 μE und ohne Zugabe von Zucker ins Wachstumsmedium rund die Hälfte der gemessenen Aminosäuren (10 von 22) am Ende der Nacht in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen signifikant verringert sind. Nur zwei Aminosäuren zeigen zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung. Diese Änderungen verteilen sich gleichmäßig über alle vier Gruppen. Am Ende des Tages hingegen nimmt die Zahl der Aminosäuren mit geringerem Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen stark ab (3 von 22). In den mit einem Prozent Saccharose gefütterten Pflänzchen ist zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Verringerung einer Aminosäure in der induzierten amiR-SNF4 Linie messbar. Die beobachteten signifikanten Erhöhungen verteilen sich gleichmäßig über die vier betrachteten Gruppen und über beide Messzeitpunkte.

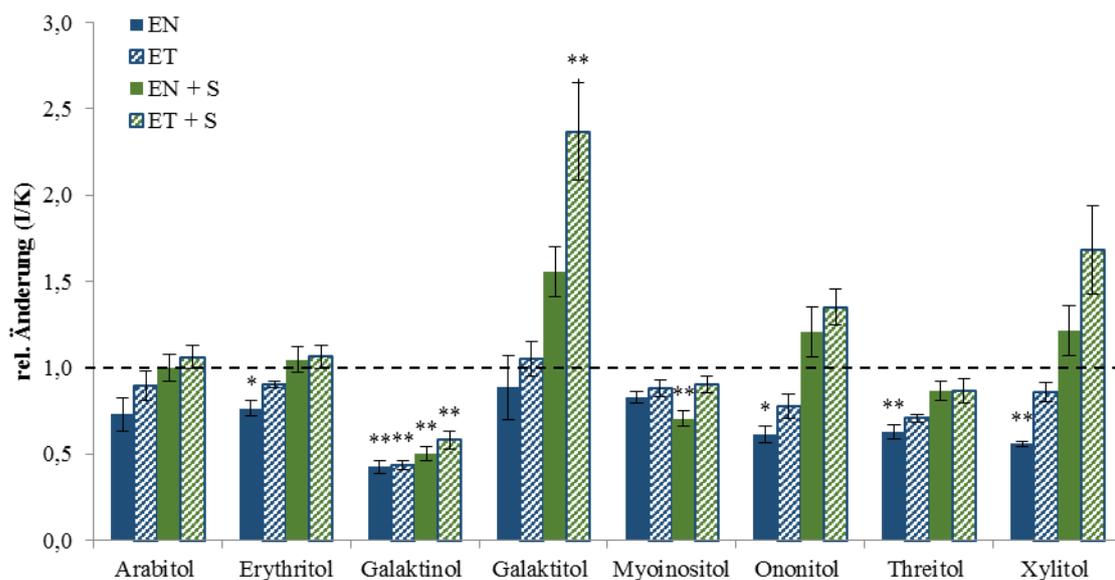


Abb.34: Gehalt an Zuckeralkoholen von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μE

Relative Änderungen der Zuckeralkohole in 7 Tage alten Keimlingen im Kurztag (8 h Licht; 10 μE) zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle aus Sterilkultur. Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. Fehlerbalken zeigen SF.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose

Eine weitere Gruppe von Metaboliten, die unter diesen Niedriglicht-Bedingungen gemessen wurden, sind die Zuckeralkohole (Abb.34). Auch in dieser Gruppe fällt auf, dass in den Keimlingen ohne Zucker im Medium am Ende der Nacht der induzierte amiR-SNF4 Ansatz tendenziell einen geringeren Gehalt an dem jeweiligen Zuckeralkohol aufweist als die Kontrolle. In fünf von acht Fällen ist diese Änderung signifikant. Wie auch schon zuvor beobachtet, nimmt das Ausmaß dieser Verringerung am Ende des

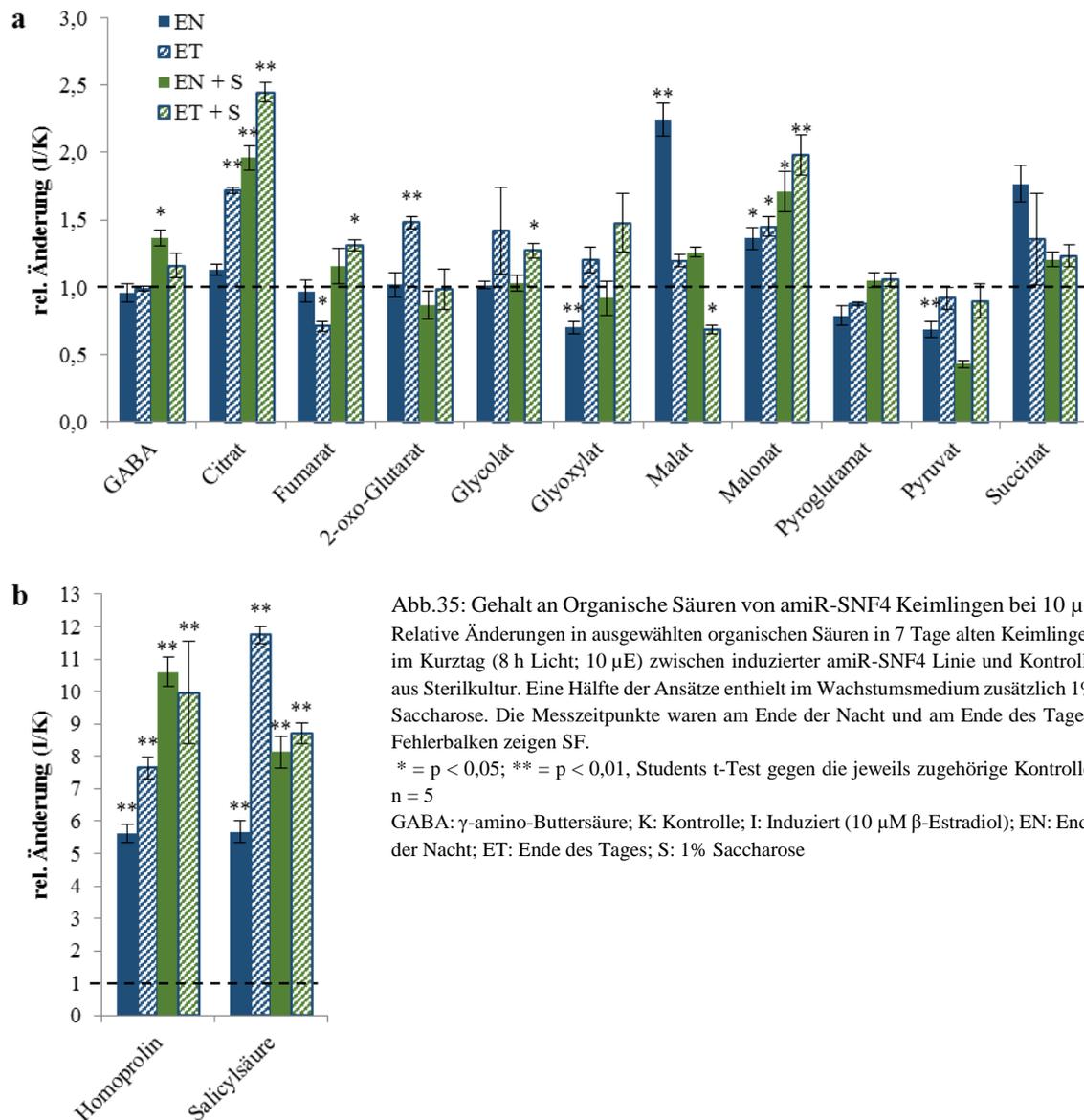
Tages in fast allen Fällen ab. Einzig der Galaktinol-Gehalt bleibt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen signifikant verringert. In den Keimlingen mit einem Prozent Saccharose im Wachstumsmedium sind am Ende der Nacht zwei Zuckeralkohole in der induzierten amiR-SNF4 Linie im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert. Die sechs anderen gemessenen Zuckeralkohole zeigen bis auf Galaktitol, welches leicht erhöht scheint, keine Tendenz. Am Ende des Tages zeigt sich ein ähnliches Bild. Der Galaktinol-Gehalt ist in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen signifikant verringert, die restlichen Zuckeralkohole zeigen kaum Änderungen zwischen den beiden Ansätzen; nur Galaktitol, Ononitol und Xylitol scheinen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen leicht erhöht.

Insgesamt zeigen die Zuckeralkohole nur wenige Änderungen. In den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen ohne Zucker im Medium sind sie vor allem am Ende der Nacht teilweise reduziert. Eine Ausnahme bildet hier Galaktinol; dieses ist unter allen getesteten Bedingungen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen signifikant reduziert.

Ein weitere große Gruppe an Metaboliten, die im Rahmen dieser Analyse gemessen wurden, sind die organischen Säuren. In Abb.35 ist eine Auswahl der wichtigsten, gemessenen organischen Säuren dargestellt. Eine gesamte Auflistung aller gemessenen organischen Säuren ist im Anhang zu finden (siehe Anhang Tab. 2). Betrachtet man zunächst die Keimlinge ohne Zucker im Wachstumsmedium, so fällt auf, dass in der induzierten amiR-SNF4 Linie nur der Glyoxylat- und der Pyruvat-Gehalt am Ende der Nacht verglichen mit der Kontrolle signifikant verringert sind. Im Gegensatz dazu stehen signifikante Erhöhungen der TCA-Zyklus-Säuren Malat und Succinat sowie von Malonat, Homoprolin und Salizylsäure. Am Ende des Tages sind die Erhöhungen des Malat- und des Succinat-Gehaltes in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verschwunden. Andere TCA-Zyklus-Säuren hingegen sind nur an diesem Zeitpunkt signifikant erhöht (Citrat und 2-oxo-Glutarat). Des Weiteren fällt auf, dass der Fumarat-Gehalt im induzierten amiR-SNF4 Ansatz zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert ist. Die Erhöhungen des Malonat-, des Homoprolin- und des Salizylsäure-Gehaltes bleiben auch am Ende des Tages bestehen. Die Erhöhung in Letzterem steigt zu diesem Zeitpunkt verglichen mit dem Ende der Nacht sogar nochmals deutlich an.

Betrachtet man die Keimlinge, die mit einem Prozent Saccharose im Wachstumsmedium angezogen wurden, so fällt auf, dass es keine signifikanten Verringerungen in der induzierten amiR-SNF4 Linie am Ende der Nacht verglichen mit der Kontrolle gibt. Allerdings ist der Pyruvat-Gehalt deutlich verringert. Signifikante Erhöhung zeigen GABA, Citrat und wie in den Keimlingen ohne Zucker Malonat, Homoprolin und Salizylsäure. Die drei letztgenannten Erhöhungen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen bleiben auch am Ende des Tages bestehen. Des Weiteren fällt auf, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Erhöhung des Citrat-Gehaltes in den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen gegenüber dem Ende der Nacht noch weiter steigert. Zusätzlich zeigen sich auch signifikante Erhöhungen in den Gehalten an Fumarat und Glycolat. Die einzige signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrolle am Ende des Tages tritt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen im Malat-Gehalt auf.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unter allen Bedingungen der Malonat-, der Homoprolin- und der Salizylsäure-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen deutlich erhöht sind. Ansonsten fällt auf, dass in den Ansätzen ohne Zucker im Wachstumsmedium alle gemessenen TCA-Zyklus-Säuren bis auf Fumarat zumindest zu einem Zeitpunkt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen erhöht sind. In den Ansätzen mit einem Prozent Saccharose im Wachstumsmedium ist unter den TCA-Zyklus-Säuren nur der Citrat-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen im Vergleich zur Kontrolle erhöht.



Als letzte Gruppe sollen an dieser Stelle die Zuckerphosphate betrachtet werden. Diese Gruppe ist in diesem Ansatz (Lichtintensität 10 μ E) wesentlich kleiner als in dem Ansatz mit 50 μ E Lichtintensität, da auf Grund der geringeren Lichtintensität nicht genügend Material für ein zusätzliches LC-MS/MS Profil gewonnen werden konnte. Betrachtet man zunächst die Keimlinge ohne Zucker im Wachstumsmedium, so ist zu sehen, dass es am Ende der Nacht signifikante Verringerungen in der induzierten amiR-SNF4 Linie im Hexosephosphat-Gehalt (Fru-6-P und Glu-6-P) verglichen mit der

Kontrolle gibt. Des Weiteren ist auch 6-Phosphogluconat (Gla-6-P), ein Zwischenprodukt des Pentosephosphatwegs, signifikant verringert. Außerdem fällt auf, dass sowohl der AMP-Gehalt als auch der Rib-5-P-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen am Ende der Nacht tendenziell verringert sind. Diese Tendenz nimmt am Ende des Tages ab. Die signifikante Verringerung der Hexosephosphate bleibt für Glu-6-P in abgeschwächter Form bestehen. Sehr ähnlich verhält sich der 6-Phosphogluconat-Gehalt. Fru-6-P zeigt nur noch eine Tendenz zu einer Verringerung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen. In den mit einem Prozent Saccharose gefütterten Pflänzchen zeigen die Hexosephosphate ein ähnliches Verhalten wie im Ansatz ohne Zucker im Medium. Sie sind am Ende der Nacht in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen signifikant verringert im Vergleich zur Kontrolle; am Ende des Tages zeigen sie tendenziell immer noch eine Verringerung, allerdings ist diese nicht mehr signifikant. Der 6-Phosphogluconat-Gehalt verhält sich auch in diesen Pflänzchen zu den Hexosephosphaten vergleichbar. Des Weiteren fällt in diesen Keimlingen auf, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie einen signifikant erhöhten Gehalt an Myo-2-P als die Kontrolle zu beiden Zeitpunkten aufweist. Die anderen gemessenen Zuckerphosphate zeigen keine Tendenz.

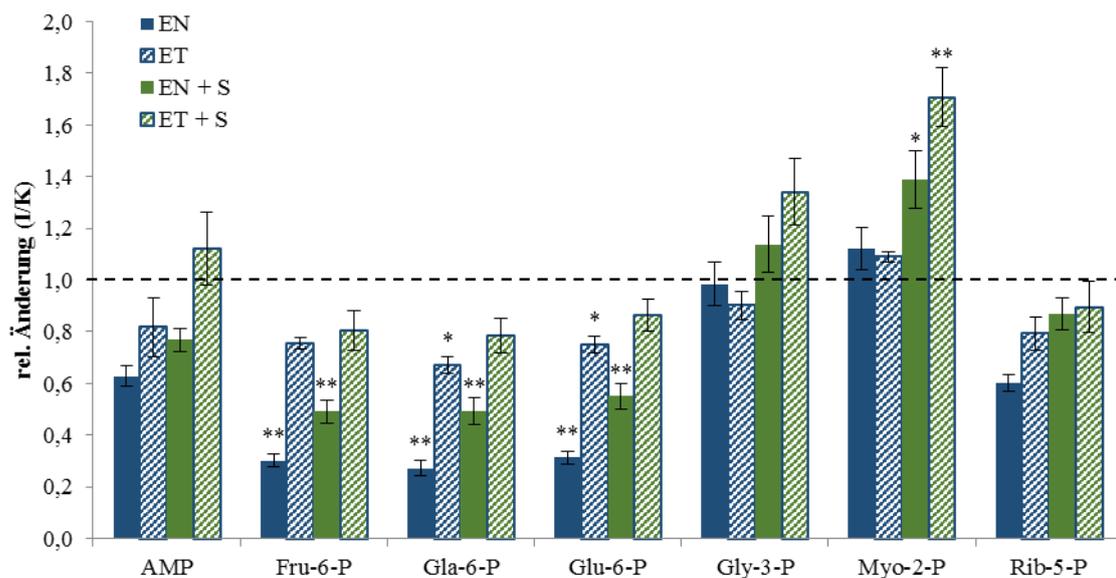


Abb.36: Zuckerphosphate-Gehalte von amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E

Relative Änderungen in den Zuckerphosphaten in 7 Tage alten Keimlingen im Kurztag (8 h Licht; 10 μ E) zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle aus Sterilkultur. Eine Hälfte der Ansätze enthielt im Wachstumsmedium zusätzlich 1% Saccharose. Die Messzeitpunkte waren am Ende der Nacht und am Ende des Tages. Fehlerbalken zeigen SF.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 5$

AMP: Adenosinmonophosphat; Fru: Fruktose; Gla: Gluconat; Glu: Glukose; Gly: Glycerol; Myo: Myoinositol; P: Phosphat; Rib: Ribulose; K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol); EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages; S: 1% Saccharose.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die induzierte amiR-SNF4 Linie unabhängig vom Vorhandensein von Saccharose im Wachstumsmedium einen signifikant geringeren Gehalt an Hexosephosphaten aufweist. Dies ist am Ende der Nacht am deutlichsten sichtbar. Das Zwischenprodukt des Pentosephosphatwegs 6-Phosphogluconat verhält sich interessanterweise sehr ähnlich. Die anderen gemessenen Zuckerphosphate zeigen keine deutlichen Tendenzen.

3.6 Auswirkungen auf Enzymaktivitäten

Wie bereits erwähnt und im Namen erkennbar ist eines der wichtigsten Merkmale des SnRK1-Komplexes, dass er andere Proteine phosphorylieren kann. Bei Enzymen kann die posttranslationale Addition eines Phosphat-Restes Auswirkungen auf die Aktivität haben. Im Zusammenhang mit dem SnRK1-Komplex wurde bereits gezeigt, dass unter anderem die Nitrat Reduktase (siehe 2.7.1) und die Saccharose Phosphat Synthase (siehe 2.7.2) durch diesen inaktiviert wird (Nemie-Feyissa et al., 2013; Sugden et al., 1999b). Deshalb wurde zunächst versucht diese Ergebnisse mit dem hier verwendeten System zu reproduzieren. Außerdem wurden die Aktivitäten von weiteren Enzymen untersucht, von denen entweder vermutet wurde, dass sie vom SnRK1-Komplex beeinflusst werden (Saccharose Synthase), oder die auf Grund der bereits gefundenen Ergebnisse ins Auge gefasst wurden (Hexokinase; Alanin Aminotransferase).

3.6.1 Nitrat Reduktase

Für die Nitrat Reduktase (*NIA1* (At1g77760) und *NIA2* (At1g37130) in *Arabidopsis thaliana*) wurde bereits gezeigt, dass sie durch Phosphorylierung mittels des SnRK1-Komplexes inaktiviert wird (Nemie-Feyissa et al., 2013; Sugden et al., 1999b). Allerdings wurde in den meisten Versuchen mit Pflanzen aus Erdkultur gearbeitet, die sich nicht mehr im Keimlingsstadium befanden. Deshalb wurde der Einfluss des SnRK1-Komplexes auf die Nitrat Reduktase auch in diesem Stadium überprüft. Dazu wurde in der induzierte amiR-SNF4 Linie und der Kontrolle die Aktivität des Enzyms im Licht gemessen. Es wurden sieben Tage alte Keimlinge aus Sterilkultur verwendet. Die Proben hierfür wurden von unseren Kooperationspartner am Max-Planck-Institut in Köln (AG Prof. C. Koncz) zur Verfügung gestellt.

Die Aktivität der Nitrat Reduktase *in vivo* wird nicht allein durch Phosphorylierung gehemmt (Mackintosh et al., 1995). Zusätzlich muss ein 14-3-3 Protein binden (Lambeck et al., 2012). Dieses bindet nur an die phosphorylierte Form der Nitrate Reduktase. Somit ist nur nicht phosphorylierte Nitrate Reduktase aktiv (V_{sel} , Abb.37a). Um den Anteil der aktiven, nicht phosphorylierten Nitrate Reduktase zu bestimmen wurde im Experiment zusätzlich die Aktivität der gesamten Nitrat Reduktase gemessen (V_{max} , Abb.37b). Dies geschah durch die Zugabe von EDTA zu einem Ansatz. Dieses komplexiert Mg^{2+} -Ionen, welche für den Prozess der Inhibition notwendig sind. Betrachtet man zunächst die maximale Aktivität (Abb.37b), so ist zu sehen, dass diese im Licht in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ist. Betrachtet man die selektive Aktivität (Abb.37a), so ist zu sehen, dass auch diese in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen signifikant erhöht ist. Diese Erhöhung ist deutlich größer als die Erhöhung in der maximalen Aktivität: Die selektive Aktivität in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen ist mehr als doppelt so hoch wie in der Kontrolle, die maximale Aktivität hingegen ist nur um ungefähr 25% erhöht. Auf den Aktivierungszustand der Nitrat Reduktase (Abb.37c) hat dies folgende Auswirkungen: Dieser ist in der induzierten amiR-SNF4

Keimlingen signifikant höher als in der Kontrolle. Mit circa 30% im Ansatz mit den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen ist er doppelt so hoch wie in der Kontrolle (circa 15%).

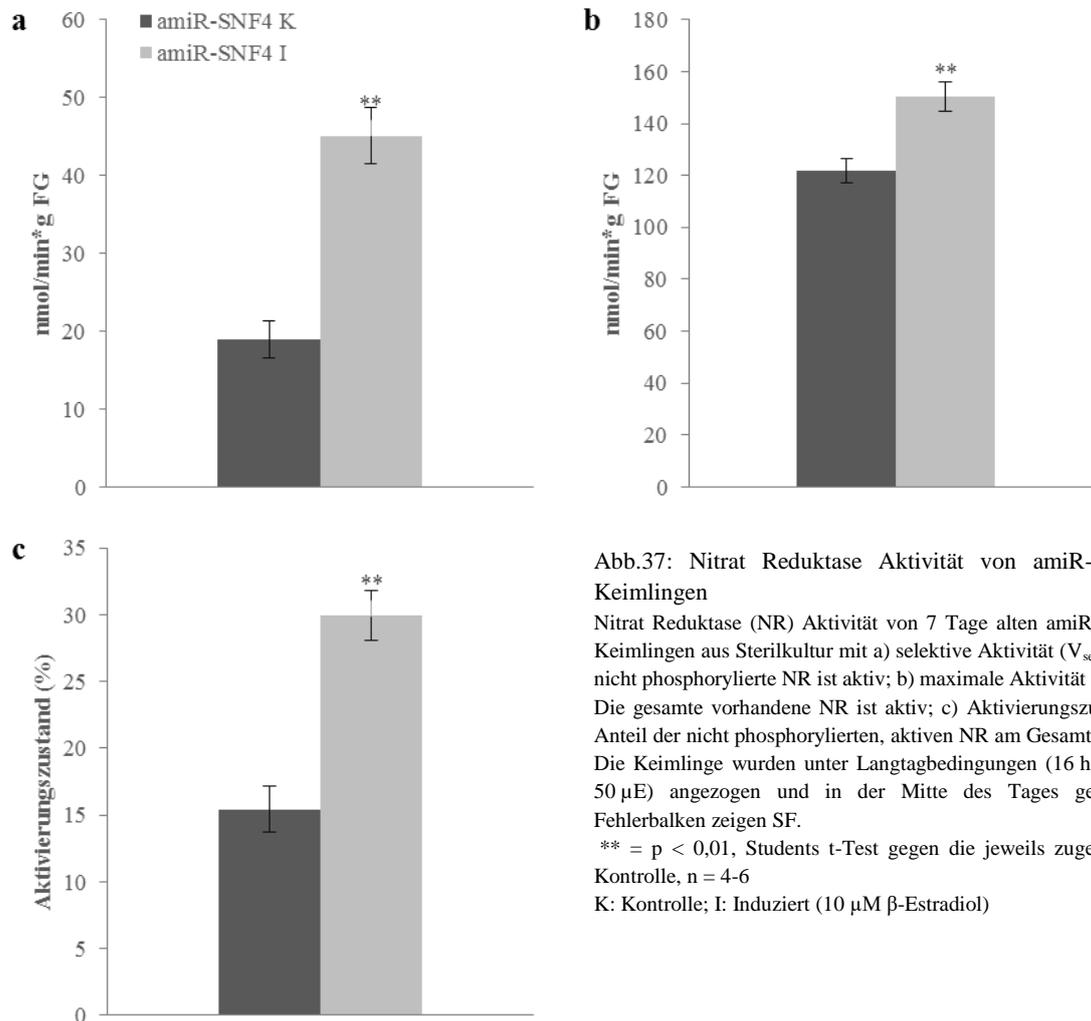


Abb.37: Nitrat Reduktase Aktivität von amiR-SNF4 Keimlingen

Nitrat Reduktase (NR) Aktivität von 7 Tage alten amiR-SNF4 Keimlingen aus Sterilkultur mit a) selektive Aktivität (V_{sel}): Nur nicht phosphorylierte NR ist aktiv; b) maximale Aktivität (V_{max}): Die gesamte vorhandene NR ist aktiv; c) Aktivierungszustand: Anteil der nicht phosphorylierten, aktiven NR am Gesamtgehalt. Die Keimlinge wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht; 50 μ E) angezogen und in der Mitte des Tages geerntet. Fehlerbalken zeigen SF.

** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 4-6$

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol)

3.6.2 Saccharose Phosphat Synthase

Ein weiteres Enzym, von dem gezeigt wurde, dass es durch den SnRK1-Komplex mittels Phosphorylierung reguliert werden kann, ist die Saccharose Phosphat Synthase (SPS) (Sugden et al., 1999b). Auch diese wird durch Phosphorylierung inaktiviert. Wie bereits für die Nitrate Reduktase beschrieben, wurde auch für die SPS getestet, ob in dem in dieser Arbeit verwendeten System mit sieben Tagen alten Keimlingen, in denen die γ -Untereinheit des SnRK1-Komplexes betroffen ist, auch die Aktivität der SPS betroffen ist. Erschwerend kommt für diese hinzu, dass es vier SPS-Isoformen in *Arabidopsis thaliana* gibt (Langenkämper et al., 2002). Nichtsdestotrotz wurde versucht die Auswirkungen der Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes auf die SPS zu messen.

Betrachtet man zunächst die selektive Aktivität (Abb.38a), welche durch Zugabe geeigneter Konzentrationen allosterischer Effektoren (siehe Tab. 4) gemessen wurde, so ist zu sehen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen besteht. Möglicherweise ist die selektive Aktivität tendenziell etwas geringer in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen. Dies wird aber durch den relativ großen Fehler in der Kontrolle überdeckt. Auch die

maximale Aktivität der SPS ist nur tendenziell geringer in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb.38b). Schließlich wurde noch der Aktivierungszustand der SPS berechnet, in dem die selektive durch die maximale Aktivität geteilt wurde (Abb.38c). Auch hier ist zu sehen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und der Kontrolle gibt. Auffällig ist aber, dass der Aktivierungszustand im Gegensatz zur selektiven und maximalen Aktivität in den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen tendenziell höher ist als in der Kontrolle.

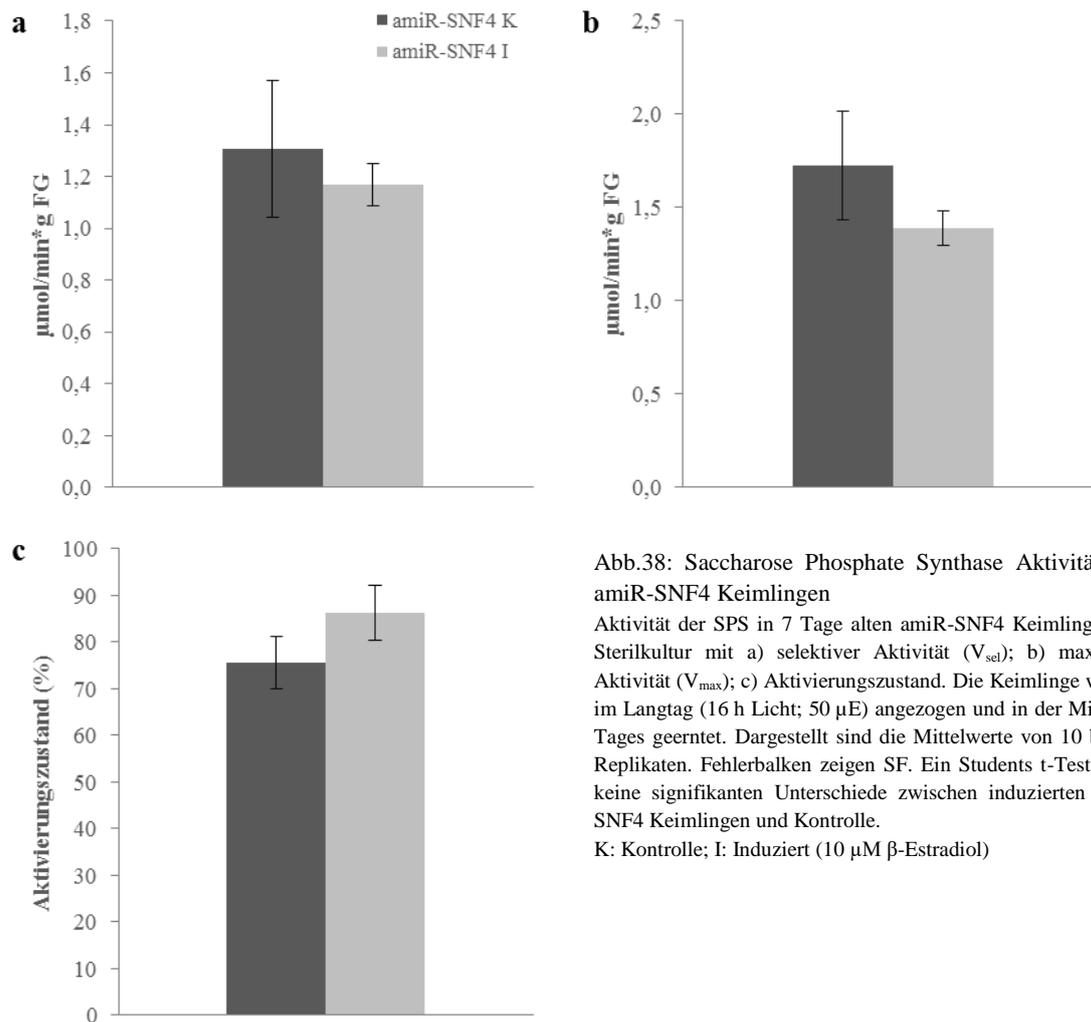


Abb.38: Saccharose Phosphate Synthase Aktivität von amiR-SNF4 Keimlingen

Aktivität der SPS in 7 Tage alten amiR-SNF4 Keimlingen aus Sterilkultur mit a) selektiver Aktivität (V_{sel}); b) maximaler Aktivität (V_{max}); c) Aktivierungszustand. Die Keimlinge wurden im Langtag (16 h Licht; 50 μE) angezogen und in der Mitte des Tages geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte von 10 biolog. Replikaten. Fehlerbalken zeigen SF. Ein Students t-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und Kontrolle.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β -Estradiol)

3.6.3 Weitere Enzyme

Schließlich wurde auch die Aktivität von Enzymen überprüft, von denen noch nicht gezeigt wurde, dass sie vom SnRK1-Komplex direkt oder indirekt beeinflusst werden. Dies waren die Saccharose Synthase, die Alanin Aminotransferase und die Hexokinase. Erste wurde ausgewählt, da es neben der SPS ein zweites wichtiges Enzym im Saccharose-Metabolismus darstellt und zu Beginn des Projektes über einen Einfluss des SnRK1-Komplexes auf dieses Enzym spekuliert wurde. Die anderen beiden Enzyme wurden untersucht, da sich in der metabolischen Analyse gezeigt hatte, dass sowohl Alanin als

auch die Hexosephosphate in der induzierten amiR-SNF4 Linie deutlich verringert sind. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine veränderte Aktivität der beiden genannten Enzyme.

Betrachtet man zunächst die Aktivität der Saccharose Synthase (Abb.39a), so ist zu sehen, dass sich die Aktivität zwischen Kontrolle und induzierten amiR-SNF4 Keimlingen nicht signifikant unterscheidet. Es ist jedoch eine leichte Tendenz zur einer erhöhten Saccharose Synthase Aktivität in den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen feststellbar. Auch die Aktivität der Alanin Aminotransferase ist in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen tendenziell, aber nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abb.39b). Für die Aktivität der Hexokinase konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und der Kontrolle festgestellt werden (Abb.39c).

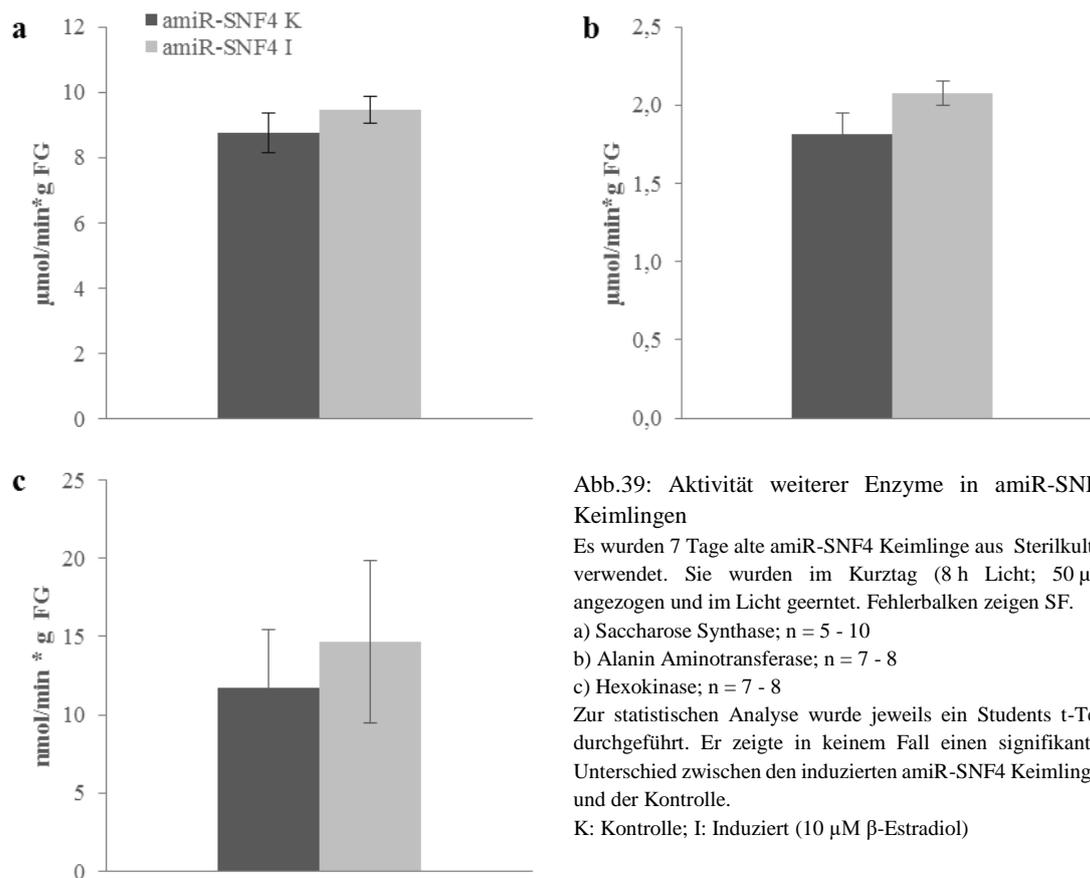


Abb.39: Aktivität weiterer Enzyme in amiR-SNF4 Keimlingen

Es wurden 7 Tage alte amiR-SNF4 Keimlinge aus Sterilkultur verwendet. Sie wurden im Kurztag (8 h Licht; 50 µE) angezogen und im Licht geerntet. Fehlerbalken zeigen SF.

a) Saccharose Synthase; n = 5 - 10

b) Alanin Aminotransferase; n = 7 - 8

c) Hexokinase; n = 7 - 8

Zur statistischen Analyse wurde jeweils ein Students t-Test durchgeführt. Er zeigte in keinem Fall einen signifikanten Unterschied zwischen den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und der Kontrolle.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 µM β-Estradiol)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für keines der drei untersuchten Enzyme (Saccharose Synthase, Alanin Aminotransferase, Hexokinase) ein signifikanter Unterschied zwischen der induzierten amiR-SNF4 Linie und der Kontrolle gefunden wurde.

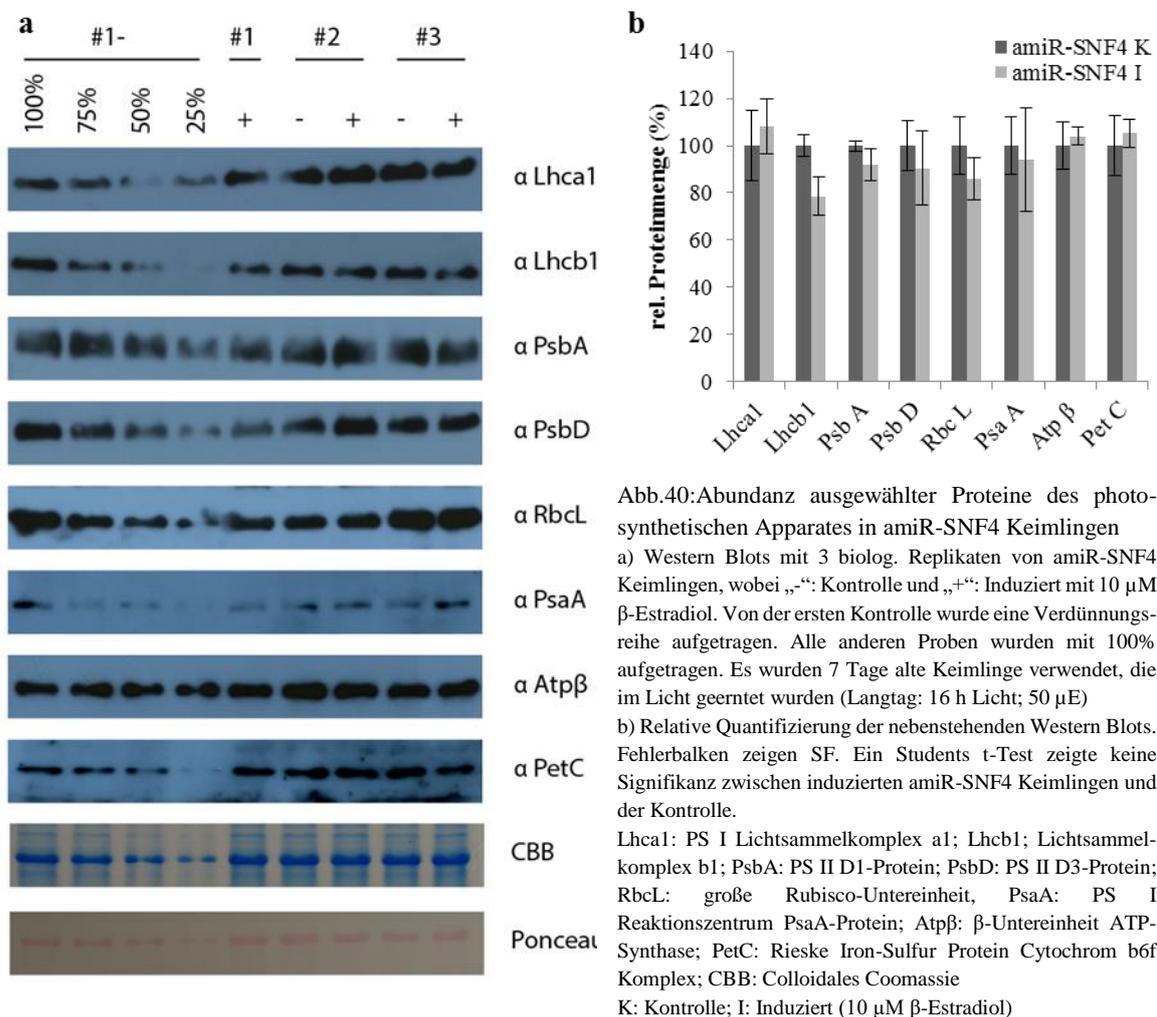
3.7 Auswirkungen auf die Photosynthese

Neben den bisher beschriebenen Auswirkungen auf phänotypischer und metabolischer Ebene wurde auch überprüft, ob die Verringerung des AKINβγ-Levels in der induzierten amiR-SNF4 Linie einen Einfluss auf die Photosysteme und die photosynthetische Leistung der Keimlinge hat. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe von Western Blots ausgewählte Proteine des photosynthetischen Apparates überprüft.

Zusätzlich wurde mittels Chlorophyllfluoreszenzmessung die Effizienz der Photosynthese in den Keimlingen bei normalen Lichtbedingung und bei Lichtstress bestimmt.

3.7.1 Integrität des photosynthetischen Apparates

Zur Überprüfung des photosynthetischen Apparates wurden Proben sieben Tage alter Keimlinge verwendet, die in der Mitte der Lichtperiode geerntet wurden. Für den anschließenden Western Blot wurden Antikörper gegen ausgewählte Proteine der Photosysteme (PsaA, PsbA, PsbD), der Lichtsammelkomplexe (Lhca1, Lhcb1), des Cytochrom b6f Komplexes (PetC), der RubisCo (RbcL) sowie der ATP Synthase (Atp β) verwendet (siehe auch Tab. 1). Diese wurden freundlicherweise von Dr. Anja Schneider (AG Leister, LMU) zur Verfügung gestellt.



In Abb.40a sind die Ergebnisse dieser Western Blots zu sehen. In den ersten vier Spuren ist eine Verdünnungsreihe einer Kontrollprobe zu sehen. In den restlichen Spuren sind jeweils 100% von drei induzierten amiR-SNF4 Proben („+“) und von zwei Kontrollen („-“) aufgetragen. Vergleicht man die beiden Ansätze miteinander, so ist auf den ersten Blick für keinen Antikörper ein Unterschied zu erkennen. Um eine genauere Aussage treffen zu können, wurden die Signale der einzelnen Banden für jeden Antikörper separat quantifiziert und auf die zugehörige Kontrolle normalisiert (Abb.40b). Auch

diese Quantifizierung zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle. Nur im Lhcb1-Gehalt zeigt sich eine leichte Verringerung in der induzierten amiR-SNF4 Linie, welche aber nicht signifikant ist. Somit zeigen sich für die getesteten Proteine des photosynthetischen Apparates keine deutlichen Veränderungen in den amiR-SNF4 Keimlingen verglichen mit der Kontrolle.

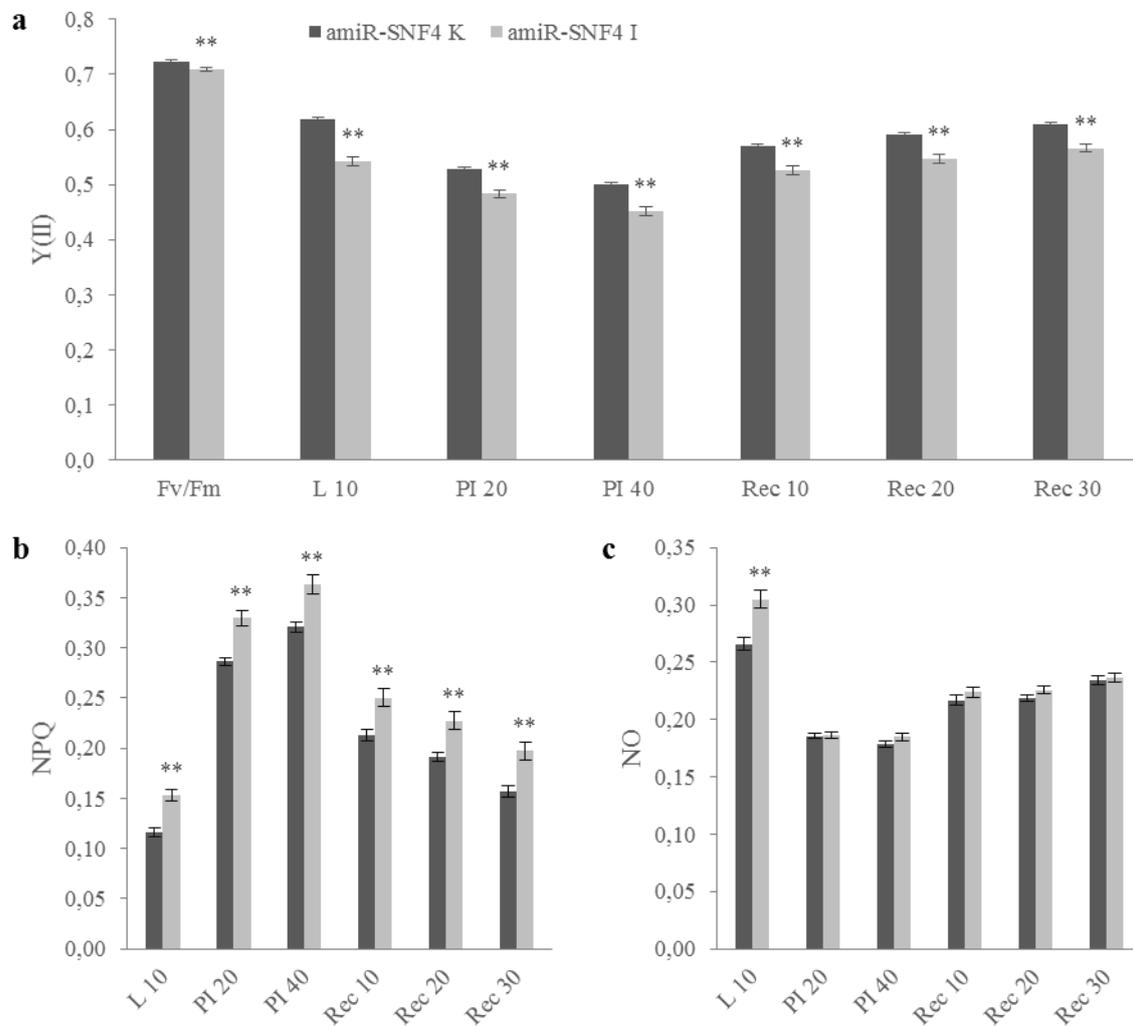


Abb.41: Chlorophyllfluoreszenzmessung in amiR-SNF4 Keimlingen

Ergebnisse der Chlorophyllfluoreszenzmessung in sieben Tage alten amiR-SNF4 Keimlingen. Dargestellt sind die Quantenausbeute des PSII (a), das regulierte nicht-photochemische Quenching NPQ (b) und das nicht regulierte nicht-photochemische Quenching NO (c). Fehlerbalken zeigen SF.

Zunächst wurde die maximale PSII Quantenausbeute (Fv/Fm) in dunkeladaptierten Keimlingen bestimmt. Anschließend folgten 10 min bei normalem Wachstumslicht von 50 μ E (L 10), gefolgt von einer Photoinhibition bei Maximallicht von 1200 μ E und einer fünfminütigen Dunkelphase (PI 20). Diese Photoinhibition wurde wiederholt (PI 40). Anschließend gab es eine 30 minütige Regenerationsphase, während der alle 10 min eine Messung erfolgte (Rec 10, Rec 20 und Rec 30).

(* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, Students t-Test gegen die jeweils zugehörige Kontrolle, $n = 28 - 35$)

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol)

3.7.2 Photosynthetische Leistung

Um die Auswirkungen der Verringerung des AKIN β -Gehaltes auf die Leistung und die Effizienz der Photosynthese zu überprüfen, wurden Chlorophyllfluoreszenzmessungen mit Hilfe eines Imaging PAM Chlorophyll Fluorometers durchgeführt. Bei diesen wurde die effektive Quantenausbeute des

PSII, der sogenannte Yield Y(II), sowohl unter Lichtbedingungen, die vergleichbar mit dem Wachstumslicht von 50 μE („L 10“) sind, gemessen als auch unter Hochlichtstress (Abb.41). Dazu wurden die Keimlinge sowohl der Kontrolle als auch der induzierten amiR-SNF4 Linie zweimal in Folge für 20 min mit der maximal möglichen Lichtintensität (ca. 1200 μE) inkubiert. Nach einer fünfminütigen Dunkelphase wurde dann die effektive Quantenausbeute („PI 20“ und „PI 40“) gemessen. Anschließend wurde eine dreißigminütige Regeneration der Photosysteme im Dunkeln durchgeführt, bei der zu drei Zeitpunkten die effektive Quantenausbeute bestimmt wurde („Rec 10“, „Rec 20“ und „Rec 30“). Neben der Quantenausbeute wurden auch das regulierte und das nicht regulierte nicht-photochemische Quenching (NPQ bzw. NO) bestimmt.

Betrachtet man zunächst die Quantenausbeute des PSII (Abb.41a), so kann man feststellen, dass diese in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen immer signifikant niedriger ist als in der Kontrolle. Bei der maximalen Quanteneffizienz F_v/F_m ist dieser Unterschied noch ziemlich gering ($F_v/F_m_{\text{Kontrolle}} = 0,724$; $F_v/F_m_{\text{induziert}} = 0,709$). Die effektive Quanteneffizienz nach 10 min Belichtung mit 50 μE zeigt schon einen wesentlich größeren Unterschied zwischen den beiden Linien ($Y[L10]_{\text{Kontrolle}} = 0,619$; $Y[L10]_{\text{induziert}} = 0,542$). Nach Photoinhibition fällt in beiden Ansätzen die effektive Quantenausbeute noch etwas weiter ab, der Unterschied zwischen den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und der Kontrolle bleibt aber ähnlich prominent. Auch in der Regenerationsphase, in der die effektive Quantenausbeute sowohl in der Kontrolle als auch in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen wieder ansteigt, bleibt der Unterschied zwischen beiden Ansätzen bei ca. 0,05. Betrachtet man hingegen das regulierte nicht-photochemische Quenching NPQ (Abb.41b), so ist zu sehen, dass dieses in den induzierten amiR-SNF4 Pflänzchen zu allen Messzeitpunkten signifikant erhöht ist. Nach 10 min normaler Belichtung (L10) ist der Wert in beiden Versuchsansätzen zwischen 0,10 und 0,15. Nach Photoinhibition steigt dieser deutlich an (0,35 – 0,40 bei PI 40) und in der Regenerationsphase fällt er fast wieder auf das Ausgangsniveau ab. Der Unterschied zwischen Kontrolle und induzierten amiR-SNF4 Keimlingen bleibt aber zu allen Zeitpunkten bei circa 0,04. Beim nicht regulierten nicht-photochemischen Quenching NO (Abb.41c) zeigt sich ein anderes Bild. Dieses ist nach 10 min Belichtung in beiden Ansätzen am höchsten. Dies ist aber auch der einzige Zeitpunkt, zu dem sich ein signifikanter Unterschied findet: Die induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zeigen einen deutlich erhöhten NO-Wert. Bei Photoinhibition fällt dieser Wert in beiden Versuchsansätzen ein wenig ab, wobei auch der Unterschied zwischen den beiden verschwindet. In der Regenerationsphase steigt der NO-Wert wieder an. Er erreicht aber nicht mehr das Niveau der ersten Belichtungsphase. Ein Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter amiR-SNF4 Linie ist auch in der Regenerationsphase nicht feststellbar.

In einem weiteren Versuch wurde mit 14 Tage alten Keimlingen eine Induktionskurve bei einer Lichtintensität von 50 μE mit anschließender Erholungsphase gemessen. In diesem Ansatz wurden die dunkel adaptierten Keimlinge für 10 min mit eben dieser Lichtintensität inkubiert und dabei im 20 Sekunden-Takt eine Messung der effektiven Quantenausbeute des PSII durchgeführt. Für die

anschließende Erholungsphase wurden die Pflanzen im Dunkeln inkubiert und die Messungen wurden in steigenden Intervallen für insgesamt 15 min durchgeführt. Betrachtet man zunächst die PSII Quantenausbeute (Abb.42a), so sieht man am ersten Messzeitpunkt, der die maximale Quantenausbeute F_v/F_m darstellt, keinen deutlichen Unterschied zwischen den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und der Kontrolle. Während der zehnminütigen Induktionsphase hingegen, in der die effektive PSII Quantenausbeute in beiden Ansätzen bis zu einem stabilen Gleichgewichtszustand ansteigt, zeigt sich, dass die induzierten amiR-SNF4 Keimlingen bei einer geringeren Quantenausbeute ihr Gleichgewicht erreichen ($Y[PSII]_{\text{Kontrolle}} = 0,534$; $Y[PSII]_{\text{induziert}} = 0,471$). Der Anstieg erfolgt aber in beiden Ansätzen in einer vergleichbaren Dynamik. In der Erholungsphase ist zwischen den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und der Kontrolle kein deutlicher Unterschied in der effektiven PSII Quantenausbeute feststellbar. Eine statistische Analyse mittels eines Two-Way ANOVA Testes ergibt eine insgesamt signifikant geringere effektive PSII Quantenausbeute in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verglichen mit der Kontrolle. Bei genauerer Analyse durch den Tukey Post-hoc Test mit paarweisem Vergleich der einzelnen Mittelwerte zeigt sich, dass dieser Unterschied vor allem in der Induktionsphase signifikant ist. In der Regenerationsphase (ab 10 min) unterscheiden sich die beiden Ansätze nicht mehr signifikant.

Das regulierte nicht-photochemische Quenching (NPQ) steigt zu Beginn der Induktionskurve sowohl in der Kontrolle als auch in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen deutlich an (Abb.42b). In dieser Phase und im anschließenden steilen Abfall bis Minute 5 unterscheiden sich die Kontrolle und die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge nicht. Von Minute 5 bis zum Ende der Induktionsphase bei Minute 10 steigt der NPQ-Wert in der induzierten amiR-SNF4 Linie aber deutlich schneller an als in der Kontrolle. Damit ist am Ende der Induktion ein deutlicher Unterschied im regulierten nicht-photochemischen Quenching zu beobachten. In der Regenerationsphase ist dieser Unterschied kaum noch messbar. Auch für diesen Parameter ergibt eine statistische Analyse durch eine Two-Way ANOVA einen insgesamt signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und induzierten amiR-SNF4 Pflanzen, welche ein erhöhtes reguliertes nicht-photochemisches Quenching aufweisen. Der Tukey Post-hoc Test zeigt außerdem, dass diese Erhöhung im NPQ in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen vor allem zwischen Minute 5 und Minute 10, also zum Ende der Induktionsphase hin, signifikant ist.

Das nicht regulierte nicht-photochemische Quenching (NO) zeigt am zweiten Messpunkt einen Maximalwert (Abb.42c). Direkt anschließend fällt es in beiden Ansätzen wieder deutlich ab und findet seinen Gleichgewichtszustand bis zum Ende der zehnminütigen Induktion. In den induzierten amiR-SNF4 Pflanzen zeigt sich in dieser Phase ein auffälliger Kurvenverlauf, der in der Kontrolle nicht zu beobachten ist: Zwischen Minute 2 und Minute 6 steigt der NO-Wert in dieser Linie nochmals kurzzeitig an. Ab Minute 6 passt sich der Verlauf wieder dem Verlauf des NO-Wertes der Kontrolle an. Am Ende der Induktionsphase ist zwischen induzierter amiR-SNF4 Linie und Kontrolle nur noch ein kleiner Unterschied auszumachen, der in der Regenerationsphase vollständig verschwindet. Die statistische Analyse durch eine Two-Way ANOVA ergibt auch für NO eine insgesamt signifikante Erhöhung in den

induzierten amiR-SNF4 Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle. Die genauere Untersuchung der einzelnen Mittelwerte mit dem Tukey Post-hoc Test zeigt außerdem, dass sich die beiden Ansätze vor allem in Induktionsphase der Messung signifikant unterscheiden. In der Regenerationsphase ist der Unterschied der einzelnen Werte nicht mehr signifikant.

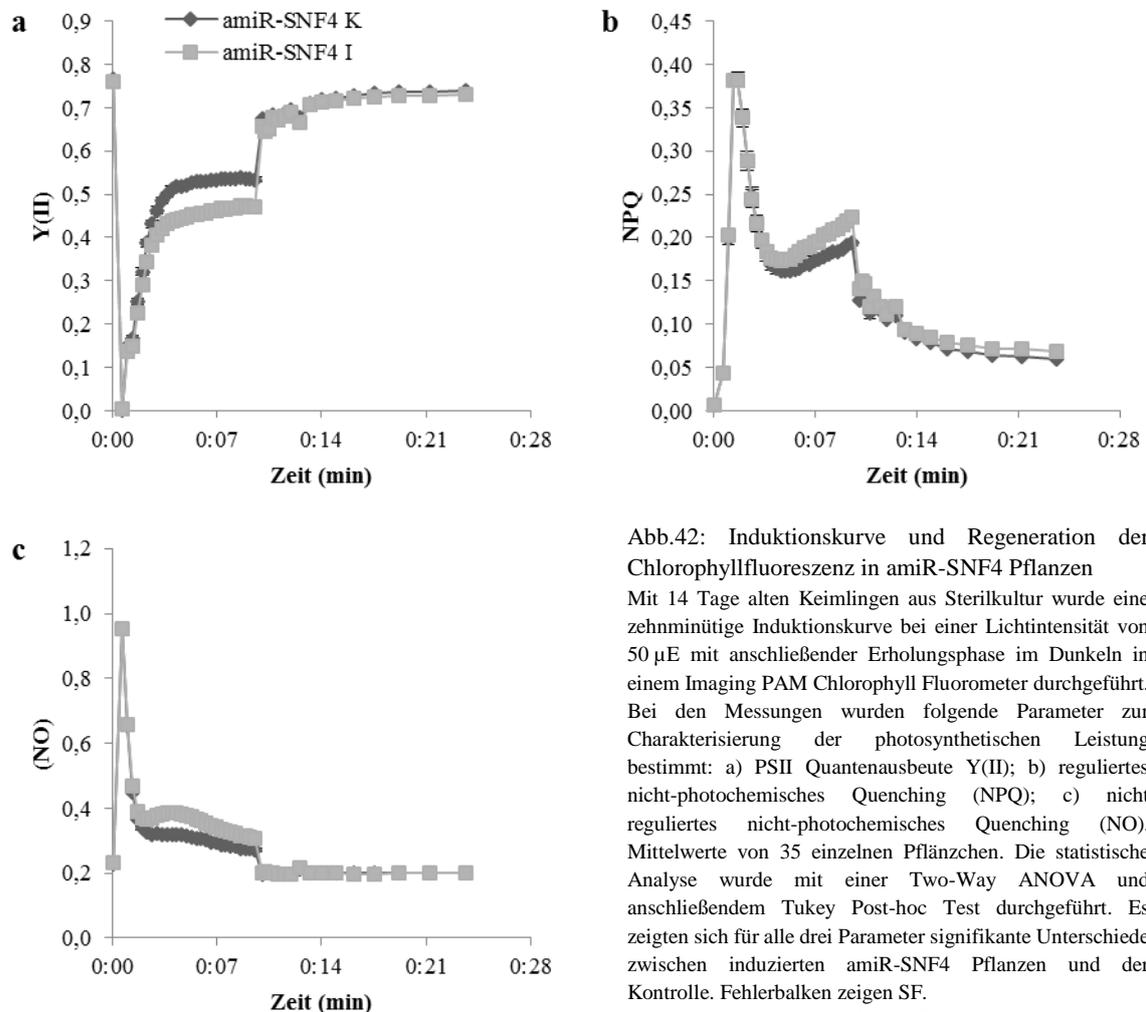


Abb.42: Induktionskurve und Regeneration der Chlorophyllfluoreszenz in amiR-SNF4 Pflanzen

Mit 14 Tage alten Keimlingen aus Sterilkultur wurde eine zehnmütige Induktionskurve bei einer Lichtintensität von 50 μE mit anschließender Erholungsphase im Dunkeln in einem Imaging PAM Chlorophyll Fluorometer durchgeführt. Bei den Messungen wurden folgende Parameter zur Charakterisierung der photosynthetischen Leistung bestimmt: a) PSII Quantenausbeute Y(II); b) reguliertes nicht-photochemisches Quenching (NPQ); c) nicht reguliertes nicht-photochemisches Quenching (NO). Mittelwerte von 35 einzelnen Pflänzchen. Die statistische Analyse wurde mit einer Two-Way ANOVA und anschließendem Tukey Post-hoc Test durchgeführt. Es zeigten sich für alle drei Parameter signifikante Unterschiede zwischen induzierten amiR-SNF4 Pflanzen und der Kontrolle. Fehlerbalken zeigen SF.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μM β -Estradiol)

Insgesamt kann für die photosynthetische Leistung festgehalten werden, dass es in der maximalen PSII Quantenausbeute nur eine kleine, aber signifikante Verringerung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen gibt. Stellt man die Keimlinge jedoch vom Dunkeln ins Licht, so verringert sich die effektive Quantenausbeute in den induzierten amiR-SNF4 Pflanzen signifikant. Gleichzeitig steigen zunächst das nicht regulierte nicht-photochemische Quenching und anschließend das regulierte signifikant an. Auch Hochlichtstress führt zu einer verringerten effektiven PSII Quantenausbeute und zu erhöhtem NPQ. Dieses Phänomen bleibt nur nach Hochlichtstress auch über längere Zeit in der Regenerationsphase bestehen.

3.8 Auswirkungen auf die Atmung

Zusätzlich zu den Auswirkungen der Verringerung des AKIN β -Gehaltes auf die Photosynthese wurden auch die Auswirkungen auf die Atmung überprüft. Dazu wurde in sieben Tage alten Keimlingen die Atmungsrate bei normaler Sauerstoffsättigung bestimmt. Dabei wurde der Sauerstoffverbrauch von Keimlingen in Pufferlösung im Dunkeln gemessen. Außerdem wurden mit Hilfe von Western Blots zwei Proteine der Atmungskette auf veränderte Expression hin untersucht (Abb.43).

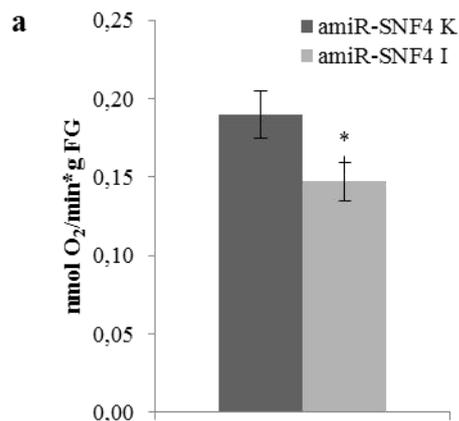


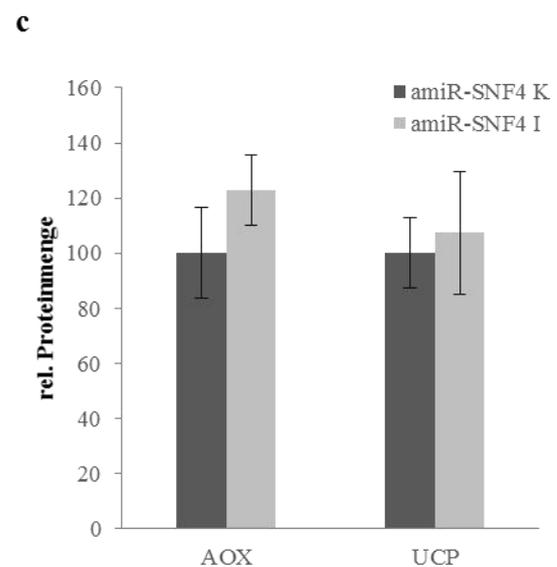
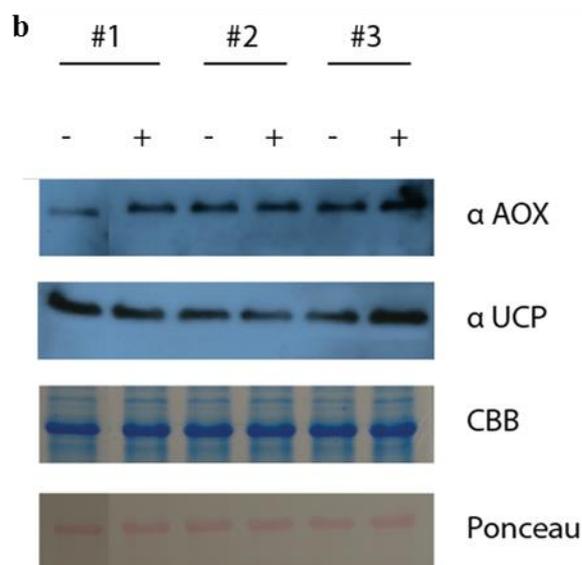
Abb.43: Analyse der Atmung in amiR-SNF4 Keimlingen
a) Atmungsrate in 7 Tage alten Keimlingen aus Sterilkultur, die im Langtag (16 h Licht; 50 μ E) angezogen wurden, im Dunkeln gemessen. Fehlerbalken zeigen SF. (* = $p < 0,05$; Students t-Test, $n = 12 - 15$)

b) Western Blots der gleichen Keimlinge mit 3 biolog. Replikaten, wobei „-“: Kontrolle und „+“: Induziert (mit 10 μ M β -Estradiol) für zwei Proteine der Atmungskette.

AOX: Alternative Oxidase; UCP: Uncoupling Protein; CBB: Colloidales Coomassie

c) Relative Quantifizierung der nebenstehenden Western Blots. Ein Students t-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und induzierten amiR-SNF4 Keimlingen. Fehlerbalken zeigen SF.

K: Kontrolle; I: Induziert (10 μ M β -Estradiol)



Betrachtet man zunächst die Atmungsrate, so fällt auf, dass die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge eine signifikant verringerte Atmungsrate im Vergleich zur Kontrolle aufweisen (Abb.43a). Anschließend wurde versucht einzelne Bestandteile der Atmungskette hinsichtlich ihrer Expression unter normalen Bedingungen zu überprüfen. Es konnten leider nur zwei passende, funktionierende Antikörper beschafft werden, da diese Versuche in den letzten Wochen der Arbeit durchgeführt wurden. Mit deren Hilfe konnte die Expression der Alternativen Oxidase (AOX) und des sog. „Uncoupling Protein“ (UCP) untersucht werden. Betrachtet man die beiden Western Blots (Abb.43b), so ist zu sehen, dass es keine substantiellen Unterschiede in der Abundanz der beiden Protein zwischen der Kontrolle („-“) und den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen („+“) gibt. Zur genaueren Auswertung wurde die

Intensität der durch die Antikörper erkannten Banden der Western Blots quantifiziert. In Abb.43c ist das Ergebnis dieser Quantifizierung dargestellt. Wie vermutet zeigt diese, dass es keine Unterschiede in der relativen Menge des AOX- und des UCP-Proteins zwischen Kontrolle und den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen gibt.

Somit bleibt für die Atmung festzuhalten, dass diese in der induzierten amiR-SNF4 Linie beeinträchtigt ist. Es konnte für zumindest zwei Proteine der Atmungskette ausgeschlossen werden, dass der Grund eine verringerte Abundanz dieser Proteine ist.

4. Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer Reduktion des Gehaltes der regulatorischen γ -Untereinheit AKIN $\beta\gamma$ des SnRK1-Komplexes auf Keimlinge von *Arabidopsis thaliana*. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass diese Reduktion zu einer Beeinträchtigung der Keimlingsentwicklung führt. Des Weiteren werden auch andere physiologische Parameter wie die Photosynthese und die Atmung negativ beeinflusst. Auf Ebene des Stoffwechsels fällt neben einer leicht verschobenen C/N-Balance vor allem die Anhäufung der Abwehrmetabolite Homoprolin und Salizylsäure in den Keimlingen mit reduziertem AKIN $\beta\gamma$ -Gehalt auf. Im Folgenden werden die oben genannten Ergebnisse diskutiert und mit bereits veröffentlichten Erkenntnissen über den SnRK1-Komplex verglichen.

4.1 Erfolgreiche Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes in Sterilkultur

Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst getestet, ob die Induktion in dem hier verwendeten System (siehe 2.3.1) erfolgreich durchgeführt werden konnte. Es zeigt sich, dass sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene eine Verringerung von AKIN $\beta\gamma$ in induzierten, sieben Tagen alten amiR-SNF4 Keimlingen auf ungefähr 30% – 40% des Wildtyp- (*Col-0*) und des Kontrolllevels (nicht induzierte amiR-SNF4 Linie) erreicht werden konnte. Das bedeutet eine signifikante Verringerung im Gehalt an AKIN $\beta\gamma$, die nicht ganz an die von Schwab und Kollegen publizierte Verringerungen in den von ihnen getesteten Konstrukten heranreicht. Aber da in diesem Fall ein essentielles Protein Ziel des Konstruktes ist (es gibt bisher keine lebensfähigen, homozygoten T-DNA Linien für AKIN $\beta\gamma$, siehe 3.1), wurde auch kein komplettes Verschwinden des Transkriptes oder des Proteins erwartet. Ein weiterer Hinweis auf die erfolgreiche Induktion des amiR-SNF4 Konstruktes zeigt sich in der erhöhten Nitrate Reduktase Aktivität in der induzierten amiR-SNF4 Linie (siehe 3.6.1). Wie bereits beschrieben wird die Nitrate Reduktase durch Phosphorylierung des SnRK1-Komplexes inhibiert (Nemie-Feyissa et al., 2013; Sugden et al., 1999b). Wenn die Induktion erfolgreich und damit weniger AKIN $\beta\gamma$ vorhanden ist, sollte sich dies in erhöhter Nitrate Reduktase Aktivität zeigen. Dies wurde auch so beobachtet. Somit war die Induktion durch Zugabe von 10 μ M β -Estradiol ins Wachstumsmedium von Beginn der Aussaat an erfolgreich.

4.2 Schwache Änderung in der T-Loop Phosphorylierung durch amiR-SNF4

Da für AMPK gezeigt wurde, dass die γ -Untereinheit einen positiven Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der α -Untereinheit nimmt (Gowans et al., 2013), wurde dieser zunächst auch für den SnRK1-Komplex in der amiR-SNF4 Linie mit Hilfe spezifischer Antikörper überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass trotz eines verringerten AKIN $\beta\gamma$ -Gehaltes der relative Anteil an phosphorylierter α -Untereinheit tendenziell leicht erhöht ist (siehe Abb.9). Für AMPK spielt in diesem Zusammenhang aber auch die Bindung von AMP bzw. ADP eine Rolle, welche in Pflanzen bisher nicht gezeigt werden konnte (Crozet et al., 2014). Daher ist der Einfluss unter „normalen“ Wachstumsbedingungen

möglicherweise nicht sehr groß. Deshalb wurde in weiteren Versuchen der Einfluss verschiedener Zucker auf die T-Loop Phosphorylierung in sieben Tage alten Keimlingen gemessen. In der Literatur gibt es sich widersprechende Berichte dazu: Baena-Gonzalez und Kollegen beobachteten eine inhibierende Wirkung von Saccharose und Glukose auf SnRK1-abhängige Änderungen in der Genexpression (Baena-Gonzalez et al., 2007); mehrere andere Gruppen hingegen berichten von einem gegenteiligen Effekt von Saccharose nicht nur auf Genexpressionsebene sondern auch auf Ebene der Kinase-Aktivität (Bhalerao et al., 1999; Jossier et al., 2009; Kolbe et al., 2005; Tiessen et al., 2003). Deshalb wurden sowohl Kontroll-Keimlinge zur Überprüfung der Auswirkungen der Zucker auf die T-Loop Phosphorylierung als auch induzierte amiR-SNF4 Keimlinge zur Abklärung des Einflusses der γ -Untereinheit auf diesen Regulationsmechanismus untersucht. Die Zugabe von Saccharose ins Wachstumsmedium führte zu einer leichten Verringerung der T-Loop Phosphorylierung in beiden Ansätzen, die weder mit dem Saccharose-Analogen Palatinose noch mit Trehalose auftrat. Eine inhibierende Wirkung von Saccharose wurde auch schon von Baena-Gonzalez und Kollegen beschrieben (Baena-Gonzalez et al., 2007), widerspricht allerdings anderen publizierten Ergebnissen (Jossier et al., 2009; Tiessen et al., 2003). Zu beachten ist dabei allerdings, dass Jossier und Kollegen vor allem mit Glukose gearbeitet haben und nur sehr wenige Ergebnisse auch für Saccharose gezeigt wurden und dass Tiessen und Kollegen ihre Versuche an Kartoffelknollen durchgeführt haben, welche nur schwer mit sieben Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen vergleichbar sind. Für eine inhibierende Wirkung von Saccharose spricht außerdem die Verbindung von Saccharose, Trehalose-6-Phosphat und der nachgewiesenen inhibierenden Wirkung von letzterem. (Zhang et al., 2009). Zhang und Kollegen konnten zeigen, dass, abhängig von einem noch unbekanntem Faktor, Trehalose-6-Phosphat die SnRK1-Aktivität in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* stark inhibiert. Da der Trehalose-6-Phosphat-Gehalt unter fast allen Bedingungen mit dem Saccharose-Gehalt korreliert (Yadav et al., 2014), könnte damit die Saccharose abhängige Erhöhung im Trehalose-6-Phosphat-Gehalt für die beobachtete inhibierende Wirkung von eben diesem Zucker verantwortlich sein. Interessanterweise erhöht sich die T-Loop Phosphorylierung in auf Saccharose angezogenen Keimlingen im Dunkeln sowohl in der Kontrolle als auch im induzierten amiR-SNF4 Ansatz. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich die Keimlinge im Dunkeln möglicherweise wie sogenanntes „sink“-Gewebe (verbrauchendes Gewebe) verhalten und damit die Regulation im Dunkeln ähnlich abläuft wie die in den von Tiessen und Kollegen beschriebenen Kartoffelknollen.

Die Zugabe von Glukose ins Wachstumsmedium führt hingegen zu einer Erhöhung der T-Loop Phosphorylierung im Licht. Dies geschah sowohl in der Kontrolle als auch, in etwas schwächerem Ausmaß, in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen (siehe Abb.10c). Dieses Verhalten passt zu den bisher veröffentlichten Ergebnissen von Jossier und Kollegen, die intensiv an diesem Zusammenhang gearbeitet haben (Jossier et al., 2009). Baena-Gonzalez und Kollegen hingegen fanden eine inhibierende Wirkung von Glukose auf den SnRK1-Komplex (Baena-Gonzalez et al., 2007), allerdings vor allem

hinsichtlich der Wirkung dessen auf die Genexpression. Die T-Loop Phosphorylierung hingegen war in ihren Experimenten meist unverändert.

Insgesamt bleibt für den Einfluss eines reduzierten AKIN $\beta\gamma$ -Gehaltes auf die T-Loop Phosphorylierung festzuhalten, dass er unter den hier getesteten Bedingungen sehr gering ist. Es zeigt sich eine leichte Erhöhung unter „normalen“ Wachstumsbedingungen, die Anpassung an verschiedene Zucker im Wachstumsmedium bleibt unverändert. Zur Diskussion in der Fachliteratur um den Einfluss von Zucker auf die T-Loop Phosphorylierung konnte mit der vorliegenden Arbeit beigetragen werden, da in den hier untersuchten sieben Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen, Saccharose eine inhibierende und Glukose eine gegenteilige, aktivierende Wirkung haben.

4.3 Reduzierter AKIN $\beta\gamma$ -Gehalt verursacht Entwicklungsverzögerungen, verringerte Wachstumsraten und verringerte Überlebensraten bei limitierenden Lichtbedingungen

Nachdem zu Beginn erfolgreich ein Induktionssystem für die amiR-SNF4 Linie etabliert wurde, wurde anschließend der Phänotyp der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge untersucht. Zunächst wurden sieben Tage alte Keimlinge aus Langtag-Anzuchtbedingungen (16 h Licht, 50 μ E) betrachtet, die einen schwachen Phänotyp mit etwas kürzeren Wurzeln und einem etwas kleineren ersten Laubblattpaar aufweisen (siehe Abb.12). Verkürzt man die Tageslänge auf acht Stunden, so wird der Phänotyp ausgeprägter (siehe Abb.13). Wird die Entwicklungsverzögerung unter diesen Bedingungen quantitativ mit Hilfe des BBCH-Indexes analysiert, so fällt auf, dass die Verzögerung bereits 5 Tage nach Aussaat deutlich gemessen werden kann (siehe Abb.15). Besonders interessant ist die Entwicklungsphase, in der diese auftritt: Betroffen ist die vollständige Entfaltung der Keimblätter. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit der in Erbsen beobachteten verzögerten Entwicklung der Keimblätter nach SnRK1-Reprimierung (Radchuk et al., 2010). Im weiteren Verlauf bleibt die Entwicklungsverzögerung bestehen, der Unterschied vergrößert sich aber nicht. Das bedeutet, dass sich die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge nach der anfänglichen Entwicklungsverzögerung mit derselben Geschwindigkeit weiterentwickeln wie die Kontrolle. Verringerte Lichtintensitäten (30 μ E und 10 μ E) verändern dieses Phänomen nicht. Der Entwicklungsunterschied tritt weiterhin immer in derselben Phase auf. Somit ist dieser unabhängig von der Lichtintensität. Eine verringerte Keimungsrate konnte als Ursache ausgeschlossen werden (Abb.18). Es wurde weiterhin versucht die Entwicklungsverzögerung durch Zugabe von Saccharose oder Glukose ins Wachstumsmedium zu beheben. In beiden Fällen zeigte sich keine Veränderung des beobachteten Phänotyps (Abb.16 und Abb.17). Allerdings zeigte sich in den mit Glukose gefütterten Keimlingen eine schnellere Entwicklung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verglichen mit der Kontrolle in den ersten fünf Tagen bzw. bis zum Sichtbarwerden der Keimblätter. Dies könnte ein Aufheben der verzögerten Keimung darstellen, welche die Zugabe von Glukose normalerweise auslöst (Dekkers et al., 2003). Interessanterweise wurde ein gegenteiliger Effekt bei Keimlingen mit erhöhtem SnRK1-Gehalt festgestellt. Diese weisen in den ersten sieben Tagen eine verzögerte Entwicklung im Vergleich zu

Kontrollpflanzen auf, die allerdings verschwindet, wenn die ABA-Synthese inhibiert wird (Jossier et al., 2009). Der Übergang zum vollständigen Entfalten der Keimblätter ist in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen aber trotz Zugabe von Glukose auch weiterhin gehemmt. Eine sich in allen drei Ansätzen (ohne Zucker, mit Saccharose oder mit Glukose) wiederholende Beobachtung konnte in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen bei 10 μ E gemacht werden. Nach Erreichen der Entwicklungsstufe „Keimblätter sichtbar, aber nicht vollständig entfaltet“ tritt im Gegensatz zur Kontrolle keine Weiterentwicklung mehr ein.

Eine weitere sichtbare Auswirkung der Verringerung des AKIN β -Gehaltes ist ein verlangsamtes Wurzelwachstum (siehe Abb.20). Von Beginn der Messungen an sind die Wurzeln in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen kürzer als in der Kontrolle. Dies ist konsistent mit den Beobachtungen, die in Reiskeimlingen gemacht wurden, in denen eine α -Untereinheit fehlt (Lu et al., 2007). Im Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten Wurzellängenmessungen vergrößert sich der Unterschied zwischen der Kontrolle und den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen mit zunehmender Dauer des Experiments immer weiter. Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht allein die Entwicklungsverzögerung für die verkürzten Wurzeln verantwortlich sein kann, da diese im Verlauf des Experiments gleich bleibt. Außerdem tritt die Verzögerung erst nach dem Durchbrechen der Keimwurzel auf. Dieser Entwicklungsschritt erfolgt in der Kontrolle und in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen parallel. Durch diese Beobachtung kann ausgeschlossen werden, dass ein verzögerter Beginn des Wurzelwachstums eine Ursache für die verkürzten Wurzeln in den amiR-SNF4 Pflanzen ist. Verringerte Lichtintensitäten verändern die Verkürzung der Wurzel in der induzierten amiR-SNF4 Linie nur insoweit, dass bei 10 μ E kaum noch Wurzelwachstum stattfindet. Die Zugabe von Zucker ins Wachstumsmedium führt interessanterweise sowohl in der Kontrolle als auch in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen bei allen untersuchten Lichtintensitäten zu einem gesteigerten Wurzelwachstum, der Unterschied bleibt aber dennoch bestehen. Daraus lässt sich ableiten, dass der Grund für das verringerte Wurzelwachstum nicht Kohlenstoffmangel sein kann. Allerdings ist die Regulation des Wurzelwachstums sehr komplex (Satbhai et al., 2015), daher kommen mehrere Ursachen für die gemessenen Unterschiede in Frage. Ein interessanter Kandidat ist sicherlich die Regulation des Wurzelwachstums durch Hormone. Aber auch eine veränderte Genexpression durch den verringerten AKIN β -Gehalt könnte hier eine Rolle spielen (Satbhai et al., 2015). Allerdings sind die Änderungen der Genexpression in der amiR-SNF4 Linie kein Thema dieser Arbeit. Daher bleibt dieser Punkt spekulativ.

Eine weitere Auswirkung, die im Zusammenhang mit dem Entwicklungsexperiment gemessen wurde, ist eine Verringerung des Frischgewichts in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen gegenüber der Kontrolle (Abb.19). Auch diese Veränderung ist unabhängig von der Lichtintensität, aber der Unterschied wird größer, wenn Saccharose ins Wachstumsmedium gegeben wird. Eine mögliche Erklärung für das verringerte Frischgewicht in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen könnten die verkürzten Wurzeln sein. Dagegen spricht, dass das Verhältnis vom Gewicht der Wurzel zum Gewicht des Sprosses bei dieser Nährstoffzusammensetzung ungefähr 0,08 beträgt (López-Bucio et al., 2002).

Damit ist der Anteil des Wurzelgewichtes nicht groß genug für die beobachteten Differenzen. Auch der Entwicklungsunterschied könnte eine Erklärung für das geringere Frischgewicht sein. Höchstwahrscheinlich trifft dies auch für einen Teil des beobachteten Unterschiedes im Frischgewicht zu. Allerdings wird letzter deutlich größer in den auf Saccharose angezogenen Keimlingen, der Entwicklungsunterschied aber nicht. Somit kann vermutet werden, dass die Verringerung des AKIN $\beta\gamma$ -Gehaltes auch einen direkten Einfluss auf das Frischgewicht der Keimlinge hat, der unabhängig ist von der Entwicklung und dem Wurzelwachstum.

Die am deutlichsten sichtbare phänotypische Änderung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen tritt in der Anpassung an niedrige Lichtintensitäten auf. Durch Zufall wurde entdeckt, dass diese Keimlinge bei einer Lichtintensität von ungefähr 10 μE eine deutlich erhöhte Sterblichkeit aufweisen (Abb.14). Bei genauerer Untersuchung stellte sich heraus, dass innerhalb von 19 Tagen ungefähr die Hälfte der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge sterben. Die Zugabe von Glukose oder Saccharose ins Wachstumsmedium verändert dies nicht. Interessanterweise stirbt auch bei einer Lichtintensität von 50 μE ein kleiner Teil der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge. Bei genauerer Betrachtung der Daten wurde festgestellt, dass der überwiegende Teil der gestorbenen Keimlinge die Entwicklungsstufe 7 („Keimblätter sichtbar, aber nicht voll entfaltet“) aufwies. Dies ist genau die Entwicklungsstufe, bei der auch die Wachstumsverzögerung eintritt. Daraus kann geschlossen werden, dass induzierte amiR-SNF4 Keimlinge, welche die Entwicklungsstufe 9, also das vollständige Entfalten der Keimblätter, erreichen, in den meisten Fällen auch überleben. Bei den Keimlingen, die zu lange in der vorigen Entwicklungsstufe verbleiben, tritt häufig der Fall ein, dass sie nicht überleben. Auch dieses Phänomen war unabhängig von der Zuckerzugabe ins Wachstumsmedium. Ein im Zusammenhang mit der Keimlingsentwicklung wichtiges Hormon ist ABA (Lopez-Molina et al., 2001). Da es wie bereits beschrieben eine Verknüpfung zwischen ABA und SnRK1 gibt, könnte eine fehlerhafte Regulation durch einen reduzierten AKIN $\beta\gamma$ -Gehalt zumindest eine teilweise Erklärung für den beobachteten Phänotyp sein. Des Weiteren ist bemerkenswert, dass es soweit bekannt keine vollständigen Knock-Out Linien für den SnRK1-Komplex in *Arabidopsis thaliana* gibt (siehe auch 3.1). Da das Level der Induktion in diesem System von Pflanze zu Pflanze ein wenig schwanken kann, könnte in den Keimlingen, die nicht überleben, die Induktion auch durch Zufall am stärksten sein und dadurch, ähnlich wie ein vollständiger Knock-Out, zum Absterben beitragen. Allerdings ist das Problem mit den Knock-Out Linien nicht ein Absterben, sondern dass keine homozygoten Samen gewonnen werden können (siehe 3.1). Deshalb könnten diese beiden Phänomene auch unterschiedliche Ursachen haben.

Die phänotypische Analyse der amiR-SNF4 Linie hat gezeigt, dass Keimlinge mit einem reduzierten AKIN $\beta\gamma$ -Gehalt eine verzögerte Entwicklung und ein geringeres Wachstum sowohl der Wurzel als auch des gesamten Keimlings aufweisen. Ein ähnlicher Phänotyp (veränderte Entwicklung, Pflanze insgesamt kleiner) in einer späteren Entwicklungsphase wurde von Baena-Gonzalez und Kollegen in Pflanzen mit verringerter Expression der α -Untereinheiten beobachtet (Baena-Gonzalez et al., 2007). Allerdings ist auch dort keine genaue Erklärung dessen zu finden. Interessanterweise zeigen auch

Reiskeimlinge ein verzögertes Wachstum, wenn sogenannte SKINs, negative Regulatoren des SnRK1-Signalings, überexprimiert werden und damit SnRK1 inhibiert wird (Lin et al., 2014). Um einen Hinweis auf die Ursachen des hier beobachteten Phänotyps zu bekommen und zur genaueren Charakterisierung der amiR-SNF4 Keimlinge wurden deshalb metabolische Messungen durchgeführt.

4.4 AKIN β -Defizit hat keine signifikanten Auswirkungen auf Kohlenstoff- und Energiegehalt

Dazu wurden zunächst die löslichen Zucker (Glukose, Fruktose und Saccharose) sowie der Stärkegehalt bei verschiedenen Tageslängen gemessen (Abb.22 und Abb.23). Weder im Kurztag (8 h Licht) noch im Langtag (16 h Licht) zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und der Kontrolle. Dies passt mit Einschränkungen zu den Ergebnissen, die von Jossier und Kollegen veröffentlicht wurden. Auch sie fanden keine Unterschiede zwischen Wildtyp und in ihrem Fall SnRK1-Überexpressoren hinsichtlich Glukose, Fruktose und Stärke (Jossier et al., 2009). Somit verändert auch bei ihnen eine veränderte SnRK1-Menge die Kohlenstoffbalance unter Kontrollbedingungen nicht. Baena-Gonzalez und Kollegen konnten hingegen zeigen, dass in Ihren *AKIN10/AKIN11* Doppelmutanten die Mobilisation der Stärke während der Nacht betroffen war. Das führte zu einem erhöhten Stärkegehalt am Ende der Nacht (Baena-Gonzalez et al., 2007). Dies konnte in den Versuchen mit der amiR-SNF4 Linie nicht bestätigt werden. Sowohl im Kurztag wie auch im Langtag wurden ein Anstieg des Stärkegehaltes im Tagesverlauf sowie eine Abnahme während der Nacht gemessen. Da in den beiden Experimenten aber unterschiedliche Untereinheiten betroffen waren, muss das kein Widerspruch sein.

Eine größere Überraschung sind die geringen Auswirkungen eines reduzierten AKIN β -Gehaltes auf den Energiestatus. Der SnRK1-Komplex in Pflanzen wird ähnlich wie seine Homologen AMPK und SNF1 als ein wichtiger Regulator im Energiehaushalt angesehen (Ghillebert et al., 2011; Polge and Thomas, 2007; Robaglia et al., 2012). Daher wurde vermutet, dass eine Veränderung in der Abundanz einer regulatorischen Untereinheit des SnRK1-Komplexes negative Auswirkungen auf diesen hat. Aber unter Langtag-Bedingungen wurden keine Unterschiede festgestellt (siehe Abb.24). Bei einer Verkürzung der Lichtperiode auf 8 Stunden zeigten sich zwar Unterschiede, allerdings zeigte sich entgegen der Erwartungen ein erhöhtes ATP/ADP-Verhältnis in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen, welches die gesamte Energieladung erhöhte (siehe Abb.25). Somit führt eine De-regulierung des AKIN β -Gehaltes unter diesen Bedingungen in keiner Weise zu einem Energieproblem, welches den beschriebenen Phänotyp der amiR-SNF4 Keimlinge erklären könnte. In der Literatur gibt es kaum Studien, die in einem ähnlichen System den Energiegehalt von Pflanzen bestimmt haben. Aber für den AMPK-Komplex wurden die Auswirkungen eines Knock-outs der AMPK α -Untereinheit $\alpha 2$ in Mäusen vor und nach körperlicher Anstrengung gemessen (Jørgensen et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl im Ruhezustand und noch deutlicher nach Anstrengung der ATP-Gehalt in den KO-Mäusen erniedrigt und der AMP-Gehalt erhöht ist. Allerdings ist in dem in dieser Arbeit verwendeten System die γ -Untereinheit betroffen. Dadurch könnte die Regulation des Energiehaushalts

auch in einer Weise verändert werden, welche diesen erhöht. Des Weiteren ist der Zusammenhang zwischen Adenosin-Nukleotiden und dem SnRK1-Komplex in Pflanzen wesentlich schlechter charakterisiert als in Tieren und möglicherweise nicht so prominent (Emanuelle et al., 2015a). Dafür spricht auch, dass der SnRK1-Komplex nicht direkt von AMP aktiviert wird (Crozet et al., 2014). Somit ist die Erhöhung im ATP/ADP-Verhältnis sowie in der Energieladung unter Kurztag-Bedingungen möglicherweise ein sekundärer Effekt.

In den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen wurde auch ein signifikant erhöhter Gehalt an Phosphat gemessen (siehe Anhang Abb.1). Da der Energie-Gehalt (Energieladung bzw. ATP/ADP- und ATP/AMP-Verhältnis) nicht verändert beziehungsweise sogar teilweise erhöht ist (siehe Abb.25), scheidet eine verringerte ATP-Synthese als Ursache dafür aus. Eine der größten Pi-Quellen in der Pflanze neben den Adenosin-Nukleotiden sind die Myoinositol-Polyphosphate (Lott et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur Myoinositol-1-P, Myoinositol-2-P, welche beide keine Veränderung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verglichen mit der Kontrolle aufweisen, sowie das Edukt Myoinositol bestimmt werden. Letzteres ist unter allen Bedingungen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verringert. Diese Messungen deuten nicht auf einen verringerten Gehalt an Myoinositol-Polyphosphaten hin, da sich Edukte wie Myoinositol dann anstauen sollten. Allerdings könnte der verringerte Gehalt an Myoinositol auch mit dessen Signalfunktion und den Auswirkungen davon auf den SnRK1-Komplex zusammenhängen (siehe 4.5.1). Des Weiteren ist für die Speicherung von Pi vor allem Myoinositol-Hexaphosphat (Phytat) verantwortlich (Loewus and Murthy, 2000; Lott et al., 2000), welches nicht gemessen werden konnte. Da der Phytat-Gehalt und der Pi-Gehalt oft korrelieren (Raboy et al., 2001), deutet ein erhöhter Pi-Gehalt entweder auf einen gleichfalls erhöhten Phytat-Gehalt hin oder auf eine Störung in dessen Stoffwechsel, welche zu einem erhöhten Pi-Gehalt führt. Diese Störung im Phytat-Stoffwechsel könnte eine Erhöhung der Aktivität der sogenannten „purple acid phosphatases“ (PAPs) sein, welche nicht allein von Phytat sondern mehr oder weniger unspezifisch von allen Phosphat-haltigen, organischen Verbindungen Pi abspalten (Zhu et al., 2005). Möglicherweise besteht also ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der PAPs und dem SnRK1-Komplex. Eine andere Möglichkeit wäre die erhöhte Aufnahme aus dem Wachstumsmedium, welches eine Phosphatquelle enthält. Dazu müsste der SnRK1-Komplex Einfluss auf einen der neun bekannten Phosphat-Transporter nehmen (Mudge et al., 2002). Bisher ist allerdings nur bekannt, dass als Antwort auf Phosphat-Mangel die katalytische α -Untereinheit AKIN10 aktiviert wird (Fragoso et al., 2009). Es gibt also einen Zusammenhang zwischen dem Pi-Gehalt und SnRK1. Möglicherweise führt eine gestörte SnRK1-Signalübertragung durch den verringerten AKIN β γ -Gehalt schlussendlich zu einer Störung im Pi-Stoffwechsel. An welcher Stelle diese Störung auftritt, bleibt aber zu diesem Zeitpunkt spekulativ.

Auch die Pyridin-Nukleotide NAD^+/NADH und $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ wurden überprüft (siehe Abb.26). Es konnte gezeigt werden, dass auch an diesen kein Mangel besteht, weder in ihrer Abundanz noch in ihrem Verhältnis zueinander, welcher eine Erklärung für den beobachteten Phänotyp in den amiR-SNF4 Keimlingen sein könnte. Auffällig ist allerdings eine signifikante Erhöhung im NADH/NAD^+ -

Verhältnis, die ein Anzeichen für oxidativen Stress sein könnte. Allerdings gibt es bisher in der Literatur keine Hinweise auf einen direkten Einfluss des SnRK1-Komplexes in die Redox-Balance. Nur für die Trehalose-6-Phosphat (T6P) abhängige Redox-Aktivierung der AGPase ist SnRK1 nötig (Kolbe et al., 2005), aber auch in diesem Fall hängt SnRK1 wahrscheinlich mehr mit dem T6P-Signal als mit der direkten Redox-Aktivierung zusammen (Geigenberger, 2011). Daher kann auch in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Änderungen sekundäre Effekte sind.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass weder ein deutlicher Kohlenstoff- noch ein Energiemangel in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen unter Kontrollbedingungen herrschen, die den zuvor beschriebenen Phänotyp erklären. Um ein genaueres Bild des Stoffwechsel sowohl unter „normalen“ Lichtbedingungen (50 μ E) wie auch unter Niedriglicht (10 μ E) in der induzierten amiR-SNF4 Linie zu bekommen und um eine Erklärung für die phänotypischen Veränderungen unter den genannten Bedingungen zu finden, wurde metabolische Profile angelegt.

4.5 Änderungen im Stoffwechsel in den amiR-SNF4 Keimlingen

Es wurden metabolische Profile von sieben Tage alten Keimlingen angelegt, die entweder bei 50 μ E („normale“ Lichtbedingungen) oder bei 10 μ E (Niedriglicht) angezogen wurden. Eine graphische Übersicht über alle signifikanten Änderung ist im Anhang Abb.1 zu finden, eine tabellarische Auflistung aller gemessenen Werte in Anhang Tab. 1 und Anhang Tab. 2.

4.5.1 AKIN β -Defizit führt zu verringerten Metabolit-Gehalten im Saccharose-Stoffwechsel

Neben den bereits erwähnten löslichen Zucker Glukose, Fruktose sowie Saccharose wurden im Rahmen dieser metabolischen Profile auch weitere Zucker untersucht (siehe Abb.27). Auch bei diesen wurden unter normalen Lichtbedingungen (50 μ E) kaum signifikanten Änderungen zwischen Kontrolle und induzierten amiR-SNF4 Keimlingen festgestellt. Auffällig ist nur die Verringerung im UDP-Glukose-Gehalt am Ende der Nacht. UDP-Glukose ist ein Ausgangsprodukt für die Synthese von Cellulose (Ordin and Hall, 1968) und ein Ausgangs- bzw. Abbauprodukt von Saccharose durch die Saccharose Synthase (Bieniawska et al., 2007) und die Saccharose Phosphat Synthase (Huber and Huber, 1996). Dies könnte auf eine Beeinträchtigung des Saccharose-Stoffwechsels hindeuten. Verstärkt wird dieser Eindruck durch die Messungen bei Niedriglicht (10 μ E, siehe Abb.32). Dort wurde eine signifikante Verringerung des Saccharose-Gehaltes in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen gemessen, die sogar in Pflanzen auftritt, die auf einem Prozent Saccharose angezogen wurden. Leider konnte der UDP-Glukose-Gehalt nicht bestimmt werden, da auf Grund von Materialmangel keine zusätzliche LC-MS/MS-Messung durchgeführt werden konnte. In verschiedenen Endprodukten dieses Stoffwechselweges wie Cellulose und Xylose konnte jedoch keine Veränderung festgestellt werden (siehe Anhang Tab. 2). Ansonsten ist in den Niedriglicht-Proben zu erkennen, dass vor allem am Ende der Nacht einige Zucker in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen tendenziell oder signifikant erniedrigt sind. Das könnte ein Teil der Erklärung für den stärkeren Phänotyp sein, der unter diesen

Bedingungen beobachtet wurde, da in dieser Entwicklungsphase Änderungen im Gehalt einzelner Zucker wichtige Signale sind (Rolland et al., 2006). Des Weiteren steht in dieser Linie insgesamt weniger Kohlenstoff in Form von Zucker am Ende der Nacht im Vergleich zur Kontrolle zur Verfügung. Dieser Mangel vor allem an Saccharose kann zu einem Arrest des Zell-Zyklus führen, da der Übergang von der G1- zur S-Phase unter anderem durch die verfügbare Menge an Saccharose kontrolliert wird (Menges et al., 2006). Dies könnte im Zusammenspiel mit einer möglicherweise gestörten Funktion des SnRK1-Komplexes in der Promotion des Zell-Zyklus (Guérinier et al., 2013) einen Beitrag zum geringeren Wachstum der amiR-SNF4 Keimlinge leisten.

Noch deutlicher wird der Mangel an Kohlenstoff für das Wachstum, wenn die Zuckerphosphate betrachtet werden (Abb.31 und Abb.36). Diese aktivierten Formen der Zucker sind wichtige Intermediate im Primärstoffwechsel von Pflanzen. Sowohl Glukose als auch Fruktose werden zunächst phosphoryliert, bevor sie weiter verstoffwechselt werden. Die Reduktion der Gehalte an diesen Hexosephosphaten ist in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen bereits bei 50 μ E vor allem am Ende der Nacht sehr deutlich. Das bedeutet, dass der Pflanze weniger aktivierter Kohlenstoff für das Wachstum zur Verfügung steht. Noch deutlicher ist die Verringerung im Hexose-Phosphat Pool bei verringerter Lichtintensität (10 μ E). In diesem Fall erreichen die Level an F6P und G6P in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zu keinem Zeitpunkt die der Kontrolle. Damit verdeutlicht sich der Phänotyp in ähnlichem Maße wie sich die Hexose-Phosphate verringern. Neben den zentralen Hexose-Phosphaten F6P, G1P und G6P zeigen auch die meisten anderen, gemessenen Zuckerphosphate einen verringerten Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen an mindestens einem Messzeitpunkt. Interessanterweise ist dieser Zeitpunkt zumeist „Ende der Nacht“. Dies deutet zusammen mit dem bereits beschriebenen verringerten Gehalt an UDP-Glukose auf Schwierigkeiten mit der Kohlenstoffversorgung während der Nacht hin, welche nicht direkt mit dem Stärke-Gehalt verbunden sind, da dieser am Ende der Nacht nicht verändert ist. Des Weiteren gibt es bei normalen Lichtbedingungen (50 μ E) zwei Zuckerphosphate, die unter allen Bedingungen verändert sind. Zum einen ist der Mannose-6-Phosphat-Gehalt (Man-6-P) in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen signifikant verringert. Man-6-P ist ein Zwischenprodukt der Ascorbat-Synthese (Maruta et al., 2008), welches dabei über eine Phosphomannose Isomerase (PMI1) auch in enger Verbindung mit F6P steht. Auch der F6P-Gehalt ist wie bereits erwähnt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verringert. Zum anderen ist der Galaktose-6-Phosphat-Gehalt unter diesen Lichtbedingungen als einziges Zuckerphosphat stets signifikant erhöht. Diesem Metabolit konnte in Pflanzen bislang keine Funktion zugeordnet werden. Interessanterweise ist auch Trehalose-6-Phosphat in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen teilweise verringert. Damit reguliert der SnRK1-Komplex möglicherweise seinen eigenen Inhibitor (Zhang et al., 2009). Andererseits könnte dies im Zusammenhang mit dem verringerten UDP-Glukose-Gehalt stehen, welche ein Ausgangsprodukt für die Synthese von T6P darstellt.

Insgesamt ist bei den Zuckerphosphaten ein genereller Trend zu einer Verringerung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen gemessen worden. Dieser könnte durchaus mit dem beobachteten

Phänotyp in Zusammenhang stehen, da die Zuckerphosphate im Kohlenstoff-Metabolismus und damit in der Versorgung mit Kohlenstoffgerüsten eine wichtige Rolle spielen.

	50 μ E				10 μ E			
	$\frac{1}{2}$ MS		1% Suc		$\frac{1}{2}$ MS		1% Suc	
Zuckerstoffwechsel								
Zucker	-	-	-	-	-	-	↓	-
Zuckeralkohole	↓	-	-	-	↓	-	-	-
Zuckerphosphate	↓	-	-	-	↓	↓	↓	-
Aminosäuren								
basisch	-	-	↑	↑	↓	-	↑	↑
polar	-	-	↑	↑	↓	-	↑	↑
sauer	-	-	-	-	-	↑	↑	↑
unpolar	-	-	-	↑	↓	-	↑	↑
Organische Säuren								
TCA-Zyklus	-	-	↑	↑	-	-	-	-
Shikimat-Weg (SA)	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Zuckersäuren	-	-	-	-	-	-	↑	↑
Verschiedenes								
Phosphat	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Stärke	-	-	-	-	↓	-	-	↑

Abb.44: Übersicht der metabolomischen Änderungen in der amiR-SNF4 Linie

Zusammenfassung der Änderungen im Stoffwechsel von 7 Tage alten Keimlingen. Erstellt aus den Daten der beiden Metabolitprofil-Experimente (siehe 3.5.3 und 3.5.4). Die Pfeile bedeuten eine mehrheitliche Erhöhung (↑) bzw. Verringerung (↓) in der jeweiligen Metabolit-Gruppe in der induzierten amiR-SNF4 Linie verglichen mit der Kontrolle unter den jeweiligen Bedingungen. Der erste Pfeil steht hierbei für den Zeitpunkt „Ende der Nacht“, der zweite für „Ende des Tages“. SA: Metabolite, die mit der Salizylsäure-Synthese in Verbindung stehen (Shikimat; Phenylalanin, Benzoat).

Eine weitere Komponente im Zuckerstoffwechsel sind die Zuckeralkohole. Ihnen wird eine Rolle in der Protektion gegen osmotischen Stress, oxidative Schädigungen und in der Stresstoleranz zugeschrieben (Loescher, 1987; Nishizawa et al., 2008). Auch in dieser Gruppe, wie in den anderen zuckerhaltigen Metaboliten, sind zumeist verringerte Gehalte in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zu beobachten, die zumeist am Ende der Nacht gemessen wurden. Außerdem treten sie verstärkt in den Keimlingen ohne Zucker im Wachstumsmedium auf, da möglicherweise durch den dessen Zusatz eine verringerte Synthese ausgeglichen werden kann. Ein unter allen Bedingungen verringerter Zuckeralkohol ist Myoinositol. Dieser ist in Stressantworten in Pflanzen involviert (Loewus and Murthy, 2000). Interessanterweise interagiert ein Terminator der Myoinositol-Signaltransduktion mit dem SnRK1-Komplex (Ananieva et al., 2008). Dieser schützt den SnRK1-Komplex vor der

Degradation durch das Proteasom. Die hier gezeigten Messungen deuten nun darauf hin, dass möglicherweise eine Feedback-Schleife vorhanden ist, mit welcher der SnRK1-Komplex den Myoinositol-Gehalt regeln kann. Interessanterweise ist der Myoinositol-1-Phosphat-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen trotzdem nicht verändert. Ein vor allem unter Niedriglicht verringerter Zuckeralkohol ist Galaktinol. Dieses wird vor allem mit Osmoprotektion und Schutz gegen oxidativen Stress in Verbindung gebracht (Nishizawa et al., 2008). Eine direkte Verbindung zum SnRK1-Komplex ist bisher nicht bekannt, daher könnte es sich hier um einen indirekten Effekt handeln.

4.5.2 Akkumulation von Aminosäuren und erniedrigtes C/N-Verhältnis bei verringertem AKIN β -Gehalt besonders nach Saccharose-Fütterung

Ein anderes Bild als im Zuckerstoffwechsel zeigt sich in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen für den Aminosäure-Stoffwechsel. Unter Normallicht-Bedingungen (50 μ E) sind nur einzelne Aminosäuren in ihrem Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen verringert. Ähnliches gilt für Niedriglicht. Interessanterweise befinden sich unter diesen Glutamat, Serin und Glycin, die alle drei an der Photorespiration beteiligt sind (Zelitch, 1975). Weil diese im Tagesverlauf wieder auf das Niveau der Kontrolle ansteigen, scheint die Photorespiration aber nicht betroffen zu sein, da die Photorespiration nur im Licht stattfindet. Zu den am Ende der Nacht verringerten Aminosäuren gehört auch noch Alanin. Genau wie die drei zuvor genannten gehört diese zu den abundantesten Aminosäuren (Chiang and Dandekar, 1995). Des Weiteren sind diese Aminosäuren im Stoffwechsel sehr nahe am primären Kohlenstoffmetabolismus und teilweise Ausgangsstoff für einige weitere Aminosäuren (siehe Anhang Abb.1). Möglicherweise erklärt sich aus dieser Nähe der verringerte Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen am Ende der Nacht, welcher auch bei einigen Metaboliten des Zuckerstoffwechsels gemessen wurde. Für Alanin wurde zudem ausgeschlossen, dass es der Grund eine verringerte Synthese durch die Alanin Aminotransferase ist, da sich ihre Aktivität in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen nicht von der in der Kontrolle gemessenen unterscheidet (siehe Abb.39b). Bei Zugabe von Saccharose sind mehr als die Hälfte der Aminosäuren in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen unabhängig von den Lichtbedingungen sogar erhöht. Normalerweise ist der Aminosäure-Stoffwechsel eng mit den Zuckerstoffwechsel verknüpft (Gutiérrez et al., 2007; Stitt et al., 2002), da für die Synthese von Aminosäuren Kohlenstoffgerüste zur Verfügung stehen müssen. In den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen hingegen scheint die Zugabe von einem Prozent Saccharose zu einer Überproduktion von Aminosäuren im Vergleich zur Kontrolle zu führen, auch wenn die Zucker-Level nicht erhöht sind. Diese Überproduktion beschränkt sich nicht auf eine Gruppe der Aminosäuren oder auf einen Syntheseweg, sondern verteilt sich gleichmäßig. Eine mögliche Erklärung könnte die erhöhte Nitrate Reduktase Aktivität in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen sein (siehe Abb.37). Diese stellt genügend reduzierten Stickstoff zur Verfügung, welcher dann besonders bei Zugabe von Kohlenstoff in Form von Saccharose in Aminosäuren umgewandelt wird. Daher treten die erhöhten Gehalte in den Aminosäuren auch vor allem bei den Anzuchten auf Zucker auf. Ohne Zugabe von Zucker, vor allem

am Ende der Nacht, sind die Gehalte der Aminosäuren generell unverändert oder sogar geringer (bei Niedriglicht, siehe Abb.44). Unter diesen Bedingungen ist auch die Versorgung mit Kohlenstoff am schlechtesten.

Für einzelne Aminosäuren gibt es aber auch direkte Verbindungen zum SnRK1-Komplex. So wird ein wichtiges Enzym in der Asparagin-Synthese, DIN6 (auch ASN1 genannt; Asparagin Synthase; At3g47340), von AKIN10-Überexpressoren transkriptionell aktiviert (Baena-Gonzalez et al., 2007). Gleichzeitig sollte dieses Enzym aber auch bei Zucker-Fütterung reprimiert werden (Lam et al., 1994). Daher sollte bei Zuckerzugabe der Asn-Gehalt abnehmen. Dies scheint in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen nicht zu funktionieren, da der Asn-Gehalt unter diesen Bedingungen in der induzierten amiR-SNF4 Linie signifikant erhöht ist. Interessanterweise wird die Repression von DIN6 durch den Zucker-regulierten Transkriptionsfaktor bZip11 vermittelt (Hanson et al., 2008). Auch dieser wurde mit dem SnRK1-Komplex schon in Zusammenhang gebracht (Baena-Gonzalez et al., 2007), allerdings konnte noch kein direkter Einfluss dessen auf bZip11 nachgewiesen werden. In einer Studie mit einem verwandten Transkriptionsfaktor bZip63, welcher auch Heterodimere mit bZip11 ausbilden kann, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von bZip63 durch den SnRK1-Komplex notwendig ist für seine Funktion (Mair et al., 2015). Wenn diese Phosphorylierung der bZip-Transkriptionsfaktoren in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen gestört wäre, könnte das unter anderem den erhöhten Gehalt an Asparagin in den auf Zucker angezogenen Keimlingen dieser Linie erklären, da die Zucker-induzierte Repression durch bZip11 nicht mehr funktionieren würde.

Interessanterweise sind bei Anzucht auf Saccharose alle basischen Aminosäuren erhöht. Speziell Arginin spielt auch in der Keimung eine Rolle (Catoni et al., 2003) und der erhöhte Arginin-Gehalt könnte auf ein Hinweis auf eine schlechtere Nutzung dieser Aminosäure sein. Da dies aber in den Keimlingen ohne Saccharose nicht gemessen wurde und diese einen vergleichbaren Phänotyp wie die Keimlingen mit Saccharose im Wachstumsmedium aufweisen, ist dies wohl keine Ursache für den eben erwähnten Phänotyp. Des Weiteren scheint die Entwicklungsverzögerung erst zu einem Zeitpunkt einzusetzen, an dem der Keimling schon nicht mehr auf die Speicherstoffe aus dem Endosperm angewiesen ist. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Aminosäure-Synthese unter allen Bedingungen (mit einzelnen Ausnahmen) in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen mindestens das Niveau der Kontrolle aufweist. Damit fällt eine Unterversorgung hinsichtlich dieser Metabolite als Erklärung für den beobachteten Phänotyp weg, insbesondere da selbst bei Niedriglicht die Aminosäure-Level vor allem in den auf Saccharose angezogenen, induzierten amiR-SNF4 Keimlingen die der Kontrolle bei weitem übersteigen. Trotzdem sind auch diese Keimlinge entwicklungsverzögert, weisen weniger Frischgewicht auf und ein großer Teil stirbt sogar innerhalb der ersten 19 Tage ab.

4.5.3 Hemmung des TCA-Zyklus und verringerte Atmungsraten durch AKIN β -Defizit

Für die Gehalte an organischen Säuren gilt im Allgemeinen Ähnliches wie für die Aminosäuren: Die Änderungen sind zumeist Erhöhung in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen, einzig am Ende der

Nacht gibt es wenige organische Säuren, die in diesen einen geringeren Gehalt aufweisen als die Kontrolle. Da diese Gruppe sehr inhomogen in ihrer Verteilung im Stoffwechsel auftritt, sollen hier einzelne Untergruppen näher betrachtet werden. Betrachtet man zunächst die organischen Säuren des TCA-Zyklus, so fällt auf, dass in den Keimlingen mit Saccharose im Medium die Gehalte an Citrat und Isocitrat in der induzierten amiR-SNF4 Linie erhöht sind. Da die nachfolgenden organischen Säuren 2-oxo-Glutarat, Succinat und Fumarat unter diesen Bedingungen nicht erhöht sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Umsetzung von Isocitrat zu 2-oxo-Glutarat gehemmt ist (siehe Anhang Abb.1). Des Weiteren sind die nachfolgenden organischen Säuren in eine Vielzahl vom TCA-Zyklus abzweigender Reaktionen involviert (Sweetlove et al., 2010). Dadurch kann eine mögliche Blockade wie die eben erwähnte durch verschiedene Bypass-Reaktionen umgangen werden und ein normaler 2-oxo-Glutarat-Gehalt wieder hergestellt werden. Eine dieser Reaktionen ist der sogenannte „GABA shunt“, bei dem über Glutamat, γ -Aminobutyrat (GABA) und Succinat-Semialdehyd (SSA) der Succinat-Pool in den Mitochondrien wieder aufgefüllt wird (Fait et al., 2008). Dies könnte auch positive Effekte auf den 2-oxo-Glutarat-Gehalt haben. Da aber weder der GABA- noch der SSA-Gehalt erhöht sind, erscheint dies unwahrscheinlich. Der 2-oxo-Glutarat Pool ist auch direkt in eine Vielzahl von Nebenreaktionen involviert. So entsteht zum Beispiel in einer Reihe von Transaminierungsreaktionen in der Aminosäuresynthese bei der Umsetzung von Glutamat 2-oxo-Glutarat (Sweetlove et al., 2010). Da wie schon zuvor erwähnt die Synthese einiger Aminosäuren vor allem bei Zugabe von Saccharose erhöht ist, könnten diese Reaktionen den verringerten Zufluss aus der Decarboxylierung von Citrat bzw. Isocitrat ausgleichen. Des Weiteren könnte der 2-oxo-Glutarat Pool durch die Umsetzung von Glutarat und 2-hydroxy-Glutarat aus dem Lysin-Abbau gespeist werden (Araújo et al., 2010; Engqvist et al., 2009). Für diese Möglichkeit spricht ein erhöhter Glutarat-Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen, der Lysin-Gehalt ist allerdings meist unverändert. Eine weitere mögliche Erklärung für einen normalen 2-oxo-Glutarat-Gehalt bei erhöhtem Citrat- bzw. Isocitrat-Gehalt wäre ein erhöhter Abfluss von 2-oxo-Glutarat in die eben erwähnten Bypass-Reaktionen, der in einem mit der Kontrolle vergleichbaren Gehalt dessen resultieren würde. Welche der möglichen Erklärung zutrifft, ist anhand der vorhandenen Daten schwer zu beurteilen, da der SnRK1-Komplex auf Grund der unterschiedlichen Lokalisation keinen direkten Einfluss auf den TCA-Zyklus nehmen kann. Erschwerend zur Beurteilung des Ganzen kommt hinzu, dass der TCA-Zyklus nicht unter allen Bedingungen vornehmlich zyklisch verläuft. Ein zyklischer Verlauf findet vor allem nachts statt, während im Licht die abzweigenden Reaktionen zur Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten einen großen Teil des Stoffflusses ausmachen (Sweetlove et al., 2010). Da die in Bezug auf Citrat gemessenen Veränderungen aber sowohl am Ende der Nacht als auch am Ende des Tages auftreten sowie unabhängig von der Lichtintensität, ist es schwierig zu beurteilen, wo genau die Ursache schlussendlich zu finden ist. Am Plausibelsten ist wohl die Theorie des durch Bypass-Reaktionen wieder aufgefüllten 2-oxo-Glutarat Spiegels. Die Gründe hierfür sind die erhöhten Aminosäuren-Gehalte unter denselben Bedingungen, die zu vermehrten Transaminase-Reaktionen und damit zu mehr 2-oxo-Glutarat führen, sowie ein erhöhter Zufluss aus dem Lysin-Abbau.

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der erhöhten Citrat- bzw. Isocitrat-Gehalte könnte ein gestörter Glyoxylat-Zyklus sein. In diesem wird Isocitrat von der Isocitrat-Lyase zu Succinat und Glyoxylat gespalten; letzteres steht dann nach mehreren Umwandlungsschritten der Gluconeogenese zur Verfügung (Cornah et al., 2004). Da in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen Isocitrat und andere Zwischenprodukte im Glyoxylat-Zyklus wie Serin und Glycin akkumulieren, gleichzeitig aber Zucker fehlen, könnte dies eine mögliche Erklärung für die beobachteten Veränderungen im Stoffwechsel sein. Interessanterweise sind *Arabidopsis thaliana* Keimlinge, welchen die Isocitrat-Lyase fehlt unter Niedriglicht- und Kurztag-Bedingungen in der Keimlingsentwicklung betroffen (Eastmond et al., 2000). Allerdings kann dieser Phänotyp durch die Zugabe von Zucker aufgehoben werden, während im hier untersuchten Fall die Zugabe von Zucker keinen Unterschied im Phänotyp hervorruft und die Akkumulation von Citrat und Isocitrat nur bei Zugabe von Zucker auftritt. Allerdings ist im hier untersuchten Fall die Gluconeogenese möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt betroffen, da wie erwähnt auch weitere Zwischenprodukte akkumulieren und auch der Glyoxylat- und der Succinat-Gehalt nicht betroffen sind. Eine weitere interessante Beobachtung im TCA-Zyklus Stoffwechsel der amiR-SNF4 Linie ist die Anhäufung von Malat am Ende der Nacht unabhängig von Lichtintensität und dem Vorhandensein von Zucker. Malat wird unter Kurztag-Bedingung am Ende der Nacht als Substrat für die Respiration genutzt (Zell et al., 2010). Der erhöhte Malat-Gehalt könnte also in Zusammenhang mit der beobachteten, verringerten Atmungsrate in der induzierten amiR-SNF4 Linie (siehe Abb.43) stehen, denn eine verringerte Atmung würde diesen erklären. Dazu passt auch, dass der Malat-Gehalt am Ende des Tages nicht mehr erhöht ist.

Ein weiterer Grund für eine gehemmte Atmung könnte der erhöhte SA-Gehalt sein (siehe Abb.45). Es ist bekannt, dass ein erhöhter SA-Gehalt neben anderen Auswirkungen, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden, die Atmung hemmt (Norman et al., 2004). Es wird vermutet, dass SA die Elektronenübergabe an den Ubiquinon-Pool verhindert. Allerdings wurden in dieser Studie auch erhöhte Level an AOX-Proteinen gemessen, welche hier nicht auftraten. Nichtsdestotrotz ist in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen die Atmung verringert. Eine verringerte Atmung sollte zudem speziell bei den in dieser Arbeit verwendeten niedrigen Lichtintensitäten (10 μ E und 30 μ E) zusammen mit der langen Nacht deutliche Auswirkungen auf die Keimlinge haben, da diese nur sehr eingeschränkt Photosynthese betreiben können. Und in der Tat ist feststellbar, dass das Absterben der Keimlinge mit zunehmend geringer werdender Lichtintensität auch zunimmt. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass auch die verringerte Atmung für einen Teil des Phänotyps der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge verantwortlich ist und dass dieser Anteil bei niedrigen Lichtintensitäten größer wird.

4.5.4 AKIN β -Defizit führt zu erhöhten Gehalten an SA und Homoprolin, die an der konstitutive Pathogenabwehr beteiligt sind

Neben den im TCA-Zyklus involvierten organischen Säuren wurden zwei organischen Säuren gefunden, die unter allen Bedingungen in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen stark erhöht sind:

Homoprolin (auch: Pipecolinsäure) und Salizylsäure (SA). Beide sind an der Pathogenabwehr beteiligt (Navarova et al., 2012; Yan and Dong, 2014).

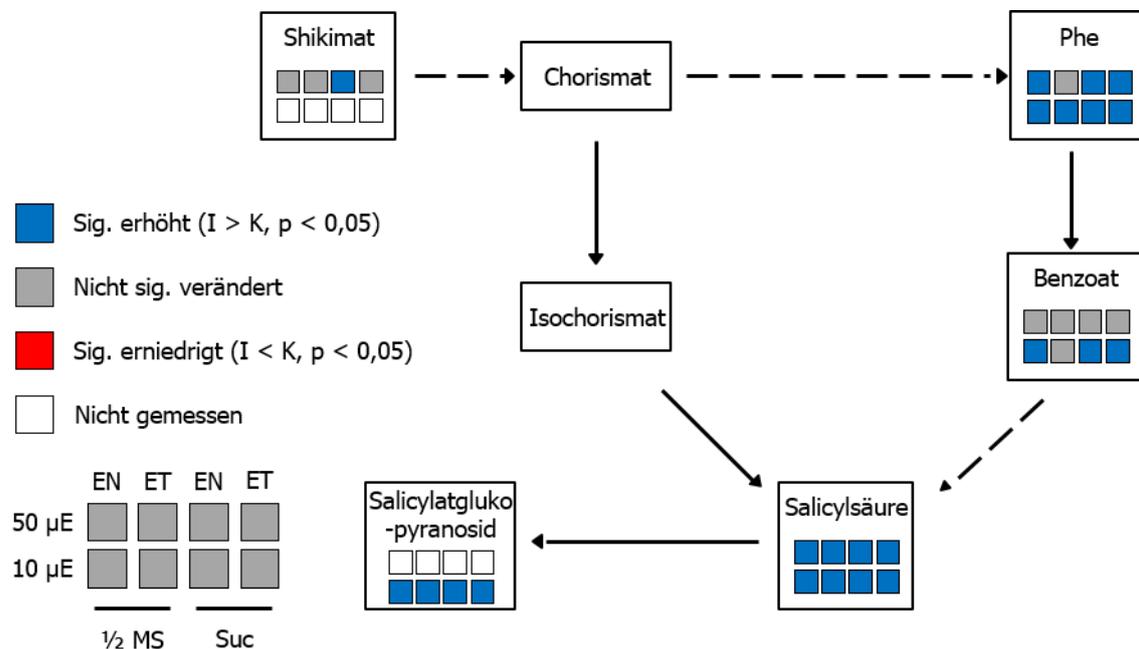


Abb.45: Induktion der SA Synthese in induzierten amiR-SNF4 Keimlingen

Änderungen in der Salizylsäure (SA) Synthese von 7 Tage alten, induzierten amiR-SNF4 Keimlingen („I“) im Vergleich zur Kontrolle („K“). SA kann ausgehend von Shikimat und Chorismat auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert werden. Zum einen über Isochorismat, welches direkt in SA umgewandelt wird, zum anderen über den Phenylalanin-Weg, welcher noch diverse Zwischenschritte beinhaltet. Die Keimlinge wurden bei zwei verschiedenen Lichtintensitäten (10 µE und 50 µE) angezogen. Des Weiteren wurden einige Keimlinge zusätzlich mit 1% Saccharose gefüttert. Geerntet wurde an zwei Zeitpunkten: Ende der Nacht („EN“) und Ende des Tages („ET“). Gemessen wurde per GC-TOF-MS bzw. LC-MS/MS (Shikimat). Für die statistische Analyse wurde ein Student's t-Test (Kontrolle gegen induzierte amiR-SNF4 Linie; $n = 5; p < 0,05$) verwendet. Signifikante Änderungen sind farblich markiert.

Salizylsäure wird ausgehend von Shikimat auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert: Zum einen wird Chorismat über Isochorismat im Plastiden direkt in SA umgewandelt (Wildermuth et al., 2001), zum anderen wird Chorismat im Zytosol über mehrere Zwischenschritte in Phenylalanin, Benzoat und schließlich in SA umgewandelt (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). Im Rahmen der metabolischen Analyse wurden erhöhte Gehalte (Benzoat, Phenylalanin und teilweise Shikimat) in allen gemessenen Bestandteilen des Weges in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen hin zu Salizylsäure gefunden (siehe Abb.45). Auch ein glukosyliertes Produkt der Salizylsäure (Salicylatglukopyranosid) wurde in deutlich erhöhtem Maße in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen gefunden. Glukosylierte Derivate der SA stehen im Verdacht als nicht aktiver Speicher zu dienen (Dean et al., 2004). Dies zeigt, dass in der induzierten amiR-SNF4 Linie die Synthese der Salizylsäure stark induziert ist. Eine der wichtigsten Funktionen von SA ist die Signalfunktion bei Pathogeninfektion. Hierbei spielt SA sowohl bei der ETI („effector triggered immunity“), also der Immunität, die durch das Erkennen eines Proteins des Pathogenes durch ein Protein des Wirtes ausgelöst wird, wie auch bei der PTI („pathogen associated molecular pattern = PAMP triggered immunity“), der Immunität, welche durch das Erkennen von

Pathogen assoziierten, molekularen Mustern durch Rezeptoren der Wirtszelle ausgelöst wird, eine Rolle: Die SA-Konzentration steigt als Antwort auf Pathogenbefall (Vlot et al., 2009).

Im Zusammenhang mit dem SnRK1-Komplex wurde bisher keine direkte Verbindung von SA und SnRK1 nachgewiesen, jedoch ist bekannt, dass der tierische AMPK-Komplex von SA *in vivo* aktiviert wird (Hawley et al., 2012). Ein Anstieg von SA in pflanzlichen Zellen hat verschiedene Konsequenzen. Ein schon lange bekanntes Ziel von SA ist die Katalase; diese wird von SA inhibiert und damit steigt die Konzentration von sogenannten ROS („reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffverbindungen) in Form von H₂O₂ (Chen et al., 1993). Ein weiterer Anstieg von ROS wird durch die Inhibition der zytosolischen Ascorbat Peroxidase, welche normalerweise im Abbau von ROS beteiligt ist, als Folge erhöhter SA-Konzentration herbeigeführt (Dempsey et al., 1999). Diese Anhäufung von ROS ist normalerweise ein Teil der Pathogenabwehr (Vlot et al., 2009). Zusammen mit dem Anstieg in Homoprolin, welches wie erwähnt auch an der Pathogenabwehr beteiligt ist, zeigt sich also in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen eine Abwehrreaktion ohne das Vorhandensein von Pathogenen, welche durch den verringerten Gehalt an AKIN $\beta\gamma$ ausgelöst wurde. Diese fehlerhaft induzierte Pathogenabwehr kann wie beschrieben zu einem erhöhten ROS-Gehalt führen, zusammen mit diesem Nekrosen auslösen und sogar bis zum programmierten Zelltod (PCD) führen (Love et al., 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass eine konstitutive aktive Abwehrantwort zu spontanem Zelltod führen kann (Durner et al., 1997). Damit könnte der erhöhte Gehalt an SA in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen eine wichtige Ursache für den beobachteten Phänotyp dieser Pflänzchen sein. Dafür sprechen auch die folgenden, mit SA in Zusammenhang stehenden Beobachtungen: (I) Es ist bekannt, dass der SA induzierte ROS-Anstieg unter Niedriglicht-Bedingungen größer wird (Mateo et al., 2006). Diese Erkenntnis passt zu dem im Rahmen dieser Arbeit beobachteten verschlimmerten Phänotyp der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge bei Niedriglicht: Die Keimlinge sterben zu einem deutlich größeren Prozentsatz bei 10 μ E verglichen mit dem Anteil der toten Keimlinge bei 50 μ E (siehe Abb.21). (II) Zudem wurde bereits im Jahr 2000 von Kang und Singh beobachtet, dass eine Überexpression des OBP3-Transkriptionsfaktors zu verzögerter Entwicklung, verkürzten Wurzeln und einem zufälligen Absterben eines Teil der OBP3-überexprimierenden Keimlinge führt (Kang and Singh, 2000). Dieser Phänotyp ist dem hier beobachteten sehr ähnlich. Interessanterweise kann der OBP3-Transkriptionsfaktor von SA induziert werden (Kang and Singh, 2000), wodurch eine Verbindung zwischen dem OBP3-Transkriptionsfaktor, SA und dem Phänotyp der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge entsteht. (III) Schließlich ist SA in der Lage den Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette zu entkoppeln und damit die Atmung zu hemmen (Norman et al., 2004). Eine gehemmte Atmung wurde auch in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen beobachtet (siehe Abb.43). Dies alles zeigt, dass es auch in Pflanzen eine Verbindung zwischen dem SnRK1-Komplex und SA gibt. Ein reduzierter Gehalt der regulatorischen AKIN $\beta\gamma$ -Untereinheit führt zu einem drastisch erhöhten SA-Gehalt, welcher vermutlich eine der Hauptursachen für den Phänotyp der amiR-SNF4 Keimlinge darstellt. Die Erhöhung im Homoprolin-Gehalt ist möglicherweise auf den erhöhten SA-Gehalt

zurückzuführen, da zwischen diesen beiden Abwehr-Metaboliten eine Verstärker-Schleife besteht (Navarova et al., 2012). Auch die Möglichkeit, dass zunächst der Homoprolin-Gehalt ansteigt und anschließend als Folge davon der SA-Gehalt, kann nicht ausgeschlossen werden. Dadurch wäre der Einfluss des SnRK1-Komplexes auf SA nur indirekt. Da es bisher weder einen Beweis für eine direkte Erhöhung des SA-Gehaltes durch einen fehlerhaft regulierten SnRK1-Komplex noch für einen direkten Einfluss dessen auf die Homoprolin-Synthese gibt, sind beide Varianten möglich.

4.5.5 Schlechtere Umsetzung der Metabolite in Wachstum durch AKIN $\beta\gamma$ -Defizit?

Eine Beobachtung, die unabhängig von der Metabolit-Gruppe und den Anzuchtbedingungen gemacht wurde, ist der Anstieg der relativen Änderung im Gehalt vieler Metabolite zwischen induzierten amiR-SNF4 Keimlingen und Kontrolle vom Ende der Nacht zum Ende des Tages hin. Das bedeutet, dass im Verlauf der Lichtperiode der jeweilige Metabolit-Gehalt relativ zur Dunkelperiode im Vergleich zur Kontrolle ansteigt. Das könnte entweder auf eine gesteigerte Produktion, die nicht notwendigerweise höher ist als in der Kontrolle, oder auf einen verringerten Verbrauch am Tage zurückzuführen sein. Besonders deutlich wird dies, wenn man sich die Gehalte an Aminosäuren sowohl bei normalen Lichtbedingungen wie auch bei Niedriglicht betrachtet (siehe Abb.28 und Abb.33). Aber auch in den anderen Metabolit-Gruppen ist dieses Phänomen deutlich zu sehen. Eine mögliche Erklärung wäre eine schlechte Umsetzung der jeweiligen Metabolite am Tage in Wachstum. Dadurch würden diese akkumulieren und zugleich würde sich der Phänotyp mit der langsameren Entwicklung und dem schlechteren Wachstum dadurch erklären. Dazu müsste der SnRK1-Komplex auf noch unbekannte Weise ein Wachstumssignal unterdrücken oder nicht in entsprechender Weise weiterleiten, so dass trotz des Vorhandenseins einer ausreichenden Menge an Metaboliten die amiR-SNF4 Keimlinge im Vergleich zur Kontrolle schlechter wachsen.

Die beiden Metabolitprofile haben gezeigt, dass der verringerte AKIN $\beta\gamma$ -Gehalt in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen auf Ebene des Stoffwechsel deutliche Auswirkungen hat. Neben einem vor allem unter Niedriglicht beeinträchtigten Kohlenstoff-Haushalt, der sich vor allem durch einen Mangel an phosphorylierten Zucker zeigt, findet sich in diesen Keimlingen eine interessante Anhäufung von Aminosäuren, besonders in den auf Saccharose angezogenen Pflänzchen. Dies spricht für eine verschobene und falsch regulierte C/N-Balance. Da vermutet wird, dass der SnRK1-Komplex auch mit dem TOR-Signalweg, welcher unter anderem für den Stickstoff-Haushalt verantwortlich ist, interagiert (Smeekens et al., 2010), könnte an dieser Schnittstelle durch das Fehlen der regulatorischen AKIN $\beta\gamma$ -Untereinheit des SnRK1-Komplexes die Ursache für die verschobene C/N-Balance liegen. Eine weitere Auswirkung in den amiR-SNF4 Keimlingen ist eine Anhäufung von Citrat, die ihre Ursache entweder in einer Blockade des TCA-Zyklus oder der Gluconeogenese hat. Schließlich zeigen die erhöhten Level von Homoprolin und SA, dass durch das Fehlen von AKIN $\beta\gamma$ die Pathogenabwehr konstitutiv aktiviert wurde. Dies ist vermutlich eine der Hauptursachen für den Phänotyp der induzierten amiR-SNF4

Keimlinge, da durch die konstitutiv aktive Abwehrantwort ROS akkumulieren und diese zusammen mit weiteren Auswirkungen eines erhöhten SA-Gehaltes einen derartigen Phänotyp verursachen können (vgl. Love et al., 2008 und Kang and Singh, 2000). Somit lässt sich durch die Auswirkungen des AKIN β -Defizits auf metabolischer Ebene eine logische Erklärung für den beobachteten Phänotyp finden. Zur weiteren Charakterisierung der amiR-SNF4 Keimlinge wurde auch die photosynthetische Performance untersucht.

4.6 Verringerung der Photosynthese-Effizienz durch AKIN β -Defizit

Um die Auswirkungen eines reduzierten AKIN β -Gehaltes auf die Photosynthese zu untersuchen, wurden PAM-Messungen durchgeführt. Da bislang keine direkten Verbindungen zwischen der photosynthetischen Leistung und dem SnRK1-Komplex bekannt sind, wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz zunächst unter Lichtbedingungen vergleichbar mit den Anzuchtbedingungen (50 μ E) untersucht und anschließend die Antwort auf Hochlichtstress. Überraschenderweise zeigen die induzierten amiR-SNF4 Keimlinge sowohl eine signifikant verringerte maximale wie auch effektive Quantenausbeute (siehe Abb.41; Fv/Fm bzw. „L 10“). Zugleich steigt unter diesen Bedingungen das nicht-photochemische Quenching NPQ an. Das bedeutet, dass ein verringerter AKIN β -Gehalt auch negative Einflüsse auf die Photosynthese hat. Höchstwahrscheinlich wird dieser Effekt durch den erhöhten SA-Gehalt vermittelt, da bekannt ist, dass konstant hohe SA-Level die Photosynthese, auf sehr ähnliche Weise wie hier beobachtet, beeinflussen (Mateo et al., 2006). Wird Hochlichtstress appliziert, so zeigen die amiR-SNF4 Keimlinge eine ähnliche Reaktion wie die Kontrolle, die Beeinträchtigung der Photosynthese weist eine ähnliche Ausprägung in beiden Ansätzen auf.

Ein weiterer interessanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen zeigt sich im nicht regulierten nicht-photochemischen Quenching NO. Ein hoher NO-Wert zeigt an, dass sowohl das photochemische Quenching, also die für die Photosynthese genutzte Energie, wie auch das regulierte nicht-photochemische Quenching NPQ nicht ausreichen um die bereitgestellte Energie zu verarbeiten. Deshalb wird die überschüssige Energie in nicht-regulierter Weise abgegeben, was zu Schäden am photosynthetischen Apparat führen kann (Kramer et al., 2004). In den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen ist dieser NO-Wert vor allem in den ersten 10 Minuten nach Belichtung signifikant erhöht. Anschließend verschwindet trotz Hochlicht-Inkubation der Unterschied. Bei genauerer Betrachtung dieses Phänomens mit Hilfe einer Induktionskurve (siehe Abb.42) wird deutlich, dass der Anstieg im NO-Parameter in den induzierten amiR-SNF4 Keimlingen innerhalb der ersten 6 Minuten nach Belichtung erfolgt. Anschließend normalisiert sich dieser Wert wieder auf das Kontrollniveau und der NPQ-Wert, also das regulierte nicht-photochemische Quenching, steigt im Vergleich zur Kontrolle an. Daraus lässt sich schließen, dass die amiR-SNF4 Keimlinge Probleme mit der kurzfristigen Anpassung an Licht-Dunkel Wechsel haben, da sie nicht in der Lage sind, die überschüssige, nicht für die Photosynthese nutzbare Energie auf regulierte Weise abzugeben. Interessanterweise kann ein erhöhter NO-Wert auch bei einer Infektion mit Pathogenen beobachtet

werden (Bonfig et al., 2006). Da wie bereits beschrieben die amiR-SNF4 Keimlinge eine konstitutive Abwehrantwort ausführen, steht wahrscheinlich auch dieses Phänomen mit dem erhöhten SA- und Homoprolin-Gehalt in Zusammenhang. Eine weitere mögliche Ursache für die geringere photosynthetische Leistung der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge könnte der gestörte Metabolismus dieser Pflanzen sein. Es ist bekannt, dass ein verringerter Stoffwechsel die Photosynthese hemmt (Paul and Pellny, 2003). Wenn sich die amiR-SNF4 Keimlinge allerdings auf Licht eingestellt haben, dann können sie auch hohe Lichtintensitäten verarbeiten. Allerdings bleibt die Quanteneffizienz trotzdem geringer als in der Kontrolle. Deshalb leistet wohl auch die geringere photosynthetische Leistung ihren Beitrag zum Phänotyp der induzierten amiR-SNF4 Keimlinge. Es konnte durch Western Blot Analysen ausgeschlossen werden, dass der negative Effekt auf die Photosynthese durch veränderte Level der Proteine des photosynthetischen Apparates in der amiR-SNF4 Linie ausgelöst wird (siehe Abb.40).

4.7 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass mit Hilfe eines induzierbaren artifiziellen MicroRNA-Konstruktes die regulatorische γ -Untereinheit AKIN $\beta\gamma$ (SNF4) des SnRK1-Komplexes sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Level in ihrer Abundanz auf ungefähr 30% des Kontrolllevels verringert werden konnte. Dies hat deutliche Auswirkungen auf den Phänotyp der untersuchten Keimlinge: Neben einer verzögerten Entwicklung sind auch das Frischgewicht und das Wurzelwachstum teilweise stark beeinträchtigt. Ein Teil der betroffenen Keimlinge stirbt während der ersten 19 Tage nach der Keimung. Bei verringerten Lichtintensitäten (30 μ E und 10 μ E) verschlimmert sich dieser Phänotyp. Eine Erleichterung des Phänotyps durch die Zugabe von Saccharose konnte nicht erreicht werden. Dies passt zu der Erkenntnis, dass sich die Phosphorylierung des T-Loops in der α -Untereinheit des SnRK1-Komplexes, ein Maß für die katalytische Aktivität der Kinase, sowohl unter normalen Wachstumsbedingungen als auch in Antwort auf Zucker in den amiR-SNF4 Keimlingen verglichen mit der Kontrolle nicht deutlich verändert. Die genauere Untersuchung der Auswirkungen eines verringerten AKIN $\beta\gamma$ -Gehaltes zeigte auf metabolischer Ebene, dass überraschenderweise der Energiehaushalt nicht betroffen ist. Hingegen scheint die C/N-Balance verschoben zu sein, da einige, vor allem phosphorylierte, Zucker in ihrem Gehalt verringert, die Aminosäuren jedoch erhöht sind. Außerdem zeigte sich eine Anhäufung von TCA-Zyklus Intermediaten, vor allem Citrat, welche auf eine Inhibition dessen hinweist. Eine überraschende Beobachtung war die Anhäufung der Abwehrmetabolite Homoprolin und Salizylsäure. Vor allem letztere weist auf eine konstitutiv aktive Pathogenantwort hin, welche weitreichende Konsequenzen in der Pflanze hat. Diese reichen von der Akkumulation von ROS über eine Beeinträchtigung der Atmung bis hin zu schlechterer Photosyntheseleistung. Da auch in der amiR-SNF4 Linie diese Phänomene beobachtet wurden, wird die konstitutiv aktive Pathogenantwort als eine der Hauptursachen für den Phänotyp dieser Keimlinge angesehen. Vor allem die Kombination aus einer beeinträchtigten Atmung und einer verschlechterten Photosyntheseleistung verursacht unter Niedriglicht große Probleme. Dazu kommen noch die verschobene C/N-

Balance und ein möglicherweise gestörtes Wachstumssignal, da vorhandene Metabolite schlecht genutzt werden. Somit tragen viele Faktoren dazu bei, dass ein reduzierter AKIN β zu deutlichen Problemen in der Keimlingsentwicklung führt. Für die Funktion des SnRK1-Komplexes in der Pflanze wurde im Rahmen dieser Arbeit auch festgestellt, dass das bislang vorherrschende Bild eines reinen Energiesensors offenbar nicht mehr zutrifft. Die hier gefundenen Ergebnisse erweitern das inzwischen ohnehin schon komplexe Bild der Interaktionen um die Pathogenabwehr bzw. das SA-Signaling. Dadurch eröffnet sich eine neue Richtung in der Erforschung des SnRK1-Komplexes.

Die nächsten wichtigen Schritte zur genaueren Klärung der Interaktion mit dem SA-Signaling wären die Untersuchung einer SA-Mutante hinsichtlich des SnRK1-Komplexes und die Kreuzung derer mit der amiR-SNF4 Linie zur Abgrenzung der individuellen Einflüsse der beiden Komponenten. Zusätzlich könnten die Level der einzelnen ROS-Arten untersucht werden, da auch deren Verhältnis möglicherweise Rückschlüsse auf ihren Ursprung zulässt. Hinsichtlich der Atmung wäre eine genaue Untersuchung der Funktionalität der einzelnen Komplexe interessant, da bekannt ist, wie der Einfluss der SA aussieht. Somit könnte auch hier der Einfluss der verschiedenen Komponenten ermittelt werden. Zur Abklärung der genauen Ursachen des verringerten Wurzelwachstums könnte der Einfluss der Reduktion der regulatorischen AKIN β -Untereinheit des SnRK1-Komplexes auf verschiedene Pflanzenhormone untersucht werden, da diese großen Einfluss auf die Entwicklung der Wurzel nehmen (Satbhai et al., 2015). Auch eine detaillierte transkriptomische Analyse der amiR-SNF4 Keimlinge könnte helfen, den komplexen Phänotyp dieser Linie genauer zu verstehen und diese besser mit den schon bekannten Erkenntnissen über den SnRK1-Komplex zu vergleichen, da wichtige Studien zum SnRK1-Komplex auf transkriptionellen Daten beruhen (z.B. Baena-Gonzalez et al., 2007).

5. Literaturverzeichnis

- Alderson, A., Sabelli, P.A., Dickinson, J.R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P.R., Halford, N.G. (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**(19), 8602-8605.
- Ananieva, E.A., Gillaspay, G.E., Ely, A., Burnette, R.N., Erickson, F.L. (2008) Interaction of the WD40 domain of a myo-inositol polyphosphate 5-phosphatase with SnRK1 links inositol, sugar, and stress signaling. *Plant Physiol*, **148**(4), 1868-1882.
- Araújo, W.L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T.R., Tohge, T., Krahnert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I.A., Leaver, C.J., Fernie, A.R. (2010) Identification of the 2-Hydroxyglutarate and Isovaleryl-CoA Dehydrogenases as Alternative Electron Donors Linking Lysine Catabolism to the Electron Transport Chain of Arabidopsis Mitochondria. *Plant Cell*, **22**(5), 1549-1563.
- Arrivault, S., Guenther, M., Ivakov, A., Feil, R., Vosloh, D., Van Dongen, J.T., Sulpice, R., Stitt, M. (2009) Use of reverse-phase liquid chromatography, linked to tandem mass spectrometry, to profile the Calvin cycle and other metabolic intermediates in Arabidopsis rosettes at different carbon dioxide concentrations. *The Plant Journal*, **59**(5), 826-839.
- Ashrafi, K., Lin, S.S., Manchester, J.K., Gordon, J.I. (2000) Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes & Development*, **14**(15), 1872-1885.
- Atkinson, D.E. (1968) Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, **7**(11), 4030-4034.
- Avila-Castaneda, A., Gutierrez-Granados, N., Ruiz-Gayosso, A., Sosa-Peinado, A., Martinez-Barajas, E., Coello, P. (2014) Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKINbeta2 and AKINbetagamma. *Front Plant Sci*, **5**, 199.
- Avila, J., Gregory, O.G., Su, D., Deeter, T.A., Chen, S., Silva-Sanchez, C., Xu, S., Martin, G.B., Devarenne, T.P. (2012) The beta-subunit of the SnRK1 complex is phosphorylated by the plant cell death suppressor Adi3. *Plant Physiol*, **159**(3), 1277-1290.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., Sheen, J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, **448**(7156), 938-942.
- Baena-González, E. and Sheen, J. (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, **13**(9), 474-482.
- Beg, Z.H., Allmann, D.W., Gibson, D.M. (1973) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **54**(4), 1362-1369.
- Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bakó, L., Ökrész, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Schell, J., Koncz, C. (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(9), 5322-5327.
- Bieniawska, Z., Paul Barratt, D.H., Garlick, A.P., Thole, V., Kruger, N.J., Martin, C., Zrenner, R., Smith, A.M. (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **49**(5), 810-828.
- Bitrian, M., Roodbarkelari, F., Horvath, M., Koncz, C. (2011) BAC-recombineering for studying plant gene regulation: developmental control and cellular localization of SnRK1 kinase subunits. *Plant J*, **65**(5), 829-842.
- Bonfig, K.B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., Berger, S. (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in Arabidopsis leaves. *Planta*, **225**(1), 1-12.
- Bouly, J.-P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M., Thomas, M. (1999) Arabidopsis thaliana proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINα1, an SNF1-like protein kinase. *The Plant Journal*, **18**(5), 541-550.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., Görlach, J. (2001) Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell*, **13**(7), 1499-1510.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R. (2006) *Biochemistry & molecular biology of plants* American Soc. of Plant Physiologists, Rockville, Md.: pp.1158-1203.
- Carling, D., Aguan, K., Woods, A., Verhoeven, A.J., Beri, R.K., Brennan, C.H., Sidebottom, C., Davison, M.D., Scott, J. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(15), 11442-11448.
- Carling, D. and Hardie, D.G. (1989) The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1012**(1), 81-86.
- Carling, D., Zammit, V.A., Hardie, D.G. (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, **223**(2), 217-222.

- Carlson, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, **2**(2), 202-207.
- Carlson, M., Osmond, B., Botstein, D. (1981) Genetic Evidence for a silent SUC gene in Yeast. *Genetics*(98), 41-54.
- Castro, P.H., Tavares, R.M., Bejarano, E.R., Azevedo, H. (2012) SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**(19), 3269-3283.
- Catoni, E., Desimone, M., Hilpert, M., Wipf, D., Kunze, R., Schneider, A., Flügge, U.-I., Schumacher, K., Frommer, W.B. (2003) Expression pattern of a nuclear encoded mitochondrial arginine-ornithine translocator gene from Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, **3**(1), 1-10.
- Celenza, J.L. and Carlson, M. (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Molecular and Cellular Biology*, **9**(11), 5034-5044.
- Chen, Z.-p., Heierhorst, J., Mann, R.J., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Witters, L.A., Lynch, G.S., Kemp, B.E., Stapleton, D. (1999) Expression of the AMP-activated protein kinase β 1 and β 2 subunits in skeletal muscle. *FEBS Letters*, **460**(2), 343-348.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, **262**(5141), 1883-1886.
- Cheung, P.C.F., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G., Carling, D. (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochemical Journal*, **346**(3), 659-669.
- Chiang, H.H. and Dandekar, A.M. (1995) Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environ*, **18**(11), 1280-1290.
- Coello, P., Hirano, E., Hey, S.J., Muttucumar, N., Martinez-Barajas, E., Parry, M.A.J., Halford, N.G. (2012) Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *J Exp Bot*, **63**(2), 913-924.
- Cornah, J.E., Germain, V., Ward, J.L., Beale, M.H., Smith, S.M. (2004) Lipid Utilization, Gluconeogenesis, and Seedling Growth in *Arabidopsis* Mutants Lacking the Glyoxylate Cycle Enzyme Malate Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(41), 42916-42923.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Vidal, J., Thomas, M. (2010) Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J Biol Chem*, **285**(16), 12071-12077.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C.A., Baena-Gonzalez, E. (2014) Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Front Plant Sci*, **5**, 190.
- Dale, S., Arro, M., Becerra, B., Morrice, N.G., Boronat, A., Hardie, D.G., Ferrer, A. (1995) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem*, **233**(2), 506-513.
- Davies, S.P., Carling, D., Munday, M.R., Hardie, D.G. (1992) Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. *European Journal of Biochemistry*, **203**(3), 615-623.
- Dean, J.V., Mohammed, L.A., Fitzpatrick, T. (2004) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, **221**(2), 287-296.
- Debast, S., Nunes-Nesi, A., Hajirezaei, M.R., Hofmann, J., Sonnewald, U., Fernie, A.R., Börnke, F. (2011) Altering Trehalose-6-Phosphate Content in Transgenic Potato Tubers Affects Tuber Growth and Alters Responsiveness to Hormones during Sprouting. *Plant Physiol*, **156**(4), 1754-1771.
- Dekkers, B.J.W., Schuurmans, J.A.M.J., Smeekens, S.C.M. (2003) Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **218**(4), 579-588.
- Dempsey, D.M.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999) Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **18**(4), 547-575.
- Ding, S., Zhang, B., Qin, F. (2015) *Arabidopsis* RZFP34/CHYR1, a Ubiquitin E3 Ligase, Regulates Stomatal Movement and Drought Tolerance via SnRK2.6-Mediated Phosphorylation. *Plant Cell*.
- Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, **2**(7), 266-274.
- Dyballa, N. and Metzger, S. (2009) Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp*(30).
- Eastmond, P.J., Germain, V., Lange, P.R., Bryce, J.H., Smith, S.M., Graham, I.A. (2000) Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(10), 5669-5674.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., Asara, J.M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Violette, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R.J. (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science*, **331**(6016), 456-461.

- Elrouby, N. and Coupland, G. (2010) Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(40), 17415-17420.
- Emanuelle, S., Doblin, M.S., Stapleton, D.I., Bacic, A., Gooley, P.R. (2015a) Molecular Insights into the Enigmatic Metabolic Regulator, SnRK1. *Trends Plant Sci.*
- Emanuelle, S., Hossain, M.I., Moller, I.E., Pedersen, H.L., van de Meene, A.M., Doblin, M.S., Koay, A., Oakhill, J.S., Scott, J.W., Willats, W.G., Kemp, B.E., Bacic, A., Gooley, P.R., Stapleton, D.I. (2015b) SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *Plant J*, **82**(2), 183-192.
- Engqvist, M., Drincovich, M.F., Flügge, U.-I., Maurino, V.G. (2009) Two d-2-Hydroxy-acid Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with Catalytic Capacities to Participate in the Last Reactions of the Methylglyoxal and β -Oxidation Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(37), 25026-25037.
- Erban, A., Schauer, N., Fernie, A.R., Kopka, J. (2007) Nonsupervised Construction and Application of Mass Spectral and Retention Time Index Libraries From Time-of-Flight Gas Chromatography-Mass Spectrometry Metabolite Profiles. In *Metabolomics: Methods and Protocols* (W. Weckwerth, ed, Humana Press, Totowa, NJ: pp 19-38.
- Erickson, J.R. and Johnston, M. (1993) Genetic and molecular characterization of GAL83: its interaction and similarities with other genes involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **135**(3), 655-664.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., Fernie, A.R. (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci*, **13**(1), 14-19.
- Fragoso, S., Espíndola, L., Páez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martínez-Barajas, E., Coello, P. (2009) SnRK1 Isoforms AKIN10 and AKIN11 Are Differentially Regulated in *Arabidopsis* Plants under Phosphate Starvation. *Plant Physiol*, **149**(4), 1906-1916.
- François, J. and Parrou, J.L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**(1), 125-145.
- Geigenberger, P. (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol*, **155**(4), 1566-1577.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F., Winderickx, J. (2011) The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J*, **278**(21), 3978-3990.
- Gibon, Y., Blaesing, O.E., Hannemann, J., Carillo, P., Hohne, M., Hendriks, J.H., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J., Stitt, M. (2004) A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*, **16**(12), 3304-3325.
- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J.-P., Lemaitre, T., Kreis, M., Thomas, M. (2004) AKIN β 3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic β -subunits. *Plant Mol Biol*, **56**(5), 747-759.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.P., Kreis, M., Thomas, M. (2006) AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol*, **142**(3), 931-944.
- Gowans, Graeme J., Hawley, Simon A., Ross, Fiona A., Hardie, D.G. (2013) AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *Cell Metabolism*, **18**(4), 556-566.
- Guérinier, T., Millan, L., Crozet, P., Oury, C., Rey, F., Valot, B., Mathieu, C., Vidal, J., Hodges, M., Thomas, M., Glab, N. (2013) Phosphorylation of p27KIP1 homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. *The Plant Journal*, **75**(3), 515-525.
- Gutiérrez, R.A., Lejay, L.V., Dean, A., Chiaromonte, F., Shasha, D.E., Coruzzi, G.M. (2007) Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, **8**(1), 1-13.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J. (2008) AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, **30**(2), 214-226.
- Haink, G. and Deussen, A. (2003) Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds. *Journal of Chromatography B*, **784**(1), 189-193.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M.M.W.B., Smeeckens, S. (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *The Plant Journal*, **53**(6), 935-949.
- Hanson, J. and Smeeckens, S. (2009) Sugar perception and signaling--an update. *Curr Opin Plant Biol*, **12**(5), 562-567.

- Hardie, D.G. (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**(10), 774-785.
- Hardie, D.G. (2014) AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab*, **20**(6), 939-952.
- Hardie, D.G. (2015) AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, **33**, 1-7.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**(4), 251-262.
- Harthill, J.E., Meek, S.E.M., Morrice, N., Pegg, M.W., Borch, J., Wong, B.H.C., MacKintosh, C. (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *The Plant Journal*, **47**(2), 211-223.
- Hartmann, L., Pedrotti, L., Weiste, C., Fekete, A., Schierstaedt, J., Gottler, J., Kempa, S., Krischke, M., Dietrich, K., Mueller, M.J., Vicente-Carbajosa, J., Hanson, J., Droge-Laser, W. (2015) Crosstalk between Two bZIP Signaling Pathways Orchestrates Salt-Induced Metabolic Reprogramming in Arabidopsis Roots. *Plant Cell*, **27**(8), 2244-2260.
- Hatch, M.D. and Mau, S.-L. (1973) Activity, location, and role of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase isoenzymes in leaves with C4 pathway photosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, **156**(1), 195-206.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., Hardie, D.G. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, **2**(4), 1-16.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., Hardie, D.G. (1996) Characterization of the AMP-activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(44), 27879-27887.
- Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevzoff, C., Walker, K.J., Pegg, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., Kemp, B.E., Sakamoto, K., Steinberg, G.R., Hardie, D.G. (2012) The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. *Science*, **336**(6083), 918-922.
- Hedbacker, K. and Carlson, M. (2006) Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. *Eukaryot Cell*, **5**(12), 1950-1956.
- Hedbacker, K. and Carlson, M. (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **13**, 2408-2420.
- Hendriks, J.H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., Geigenberger, P. (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiol*, **133**(2), 838-849.
- Hess, M., Barralis, G., Bleiholder, H., Buhr, L., Eggers, T.H., Hack, H., Stauss, R. (1997) Use of the extended BBCH scale—general for the descriptions of the growth stages of mono; and dicotyledonous weed species. *Weed Research*, **37**(6), 433-441.
- Hong, S.-P. and Carlson, M. (2007) Regulation of Snf1 Protein Kinase in Response to Environmental Stress. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(23), 16838-16845.
- Honigberg, S.M. and Lee, R.H. (1998) Snf1 Kinase Connects Nutritional Pathways Controlling Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **18**(8), 4548-4555.
- Huber, S.C. and Huber, J.L. (1996) ROLE AND REGULATION OF SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE IN HIGHER PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**(1), 431-444.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., Witters, L.A. (2005) The Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(32), 29060-29066.
- Ikematsu, N., Dallas, M.L., Ross, F.A., Lewis, R.W., Rafferty, J.N., David, J.A., Suman, R., Peers, C., Hardie, D.G., Evans, A.M. (2011) Phosphorylation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by AMP-activated protein kinase regulates membrane excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(44), 18132-18137.
- Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., Spiegelman, B.M. (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(29), 12017-12022.
- Jiang, R. and Carlson, M. (1997) The Snf1 Protein Kinase and Its Activating Subunit, Snf4, Interact with Distinct Domains of the Sip1/Sip2/Gal83 Component in the Kinase Complex. *Molecular and Cellular Biology*, **17**(4), 2099-2106.
- Jørgensen, S.B., Wojtaszewski, J.F.P., Viollet, B., Andreelli, F., Birk, J.B., Hellsten, Y., Schjerling, P., Vaulont, S., Neufer, P.D., Richter, E.A., Pilegaard, H. (2005) Effects of α -AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *The FASEB Journal*, **19**(9), 1146-1148.

- Jossier, M., Bouly, J.P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., Thomas, M. (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **59**(2), 316-328.
- Kang, H.-G. and Singh, K.B. (2000) Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *The Plant Journal*, **21**(4), 329-339.
- Kemp, B.E. (2004) Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *Journal of Clinical Investigation*, **113**(2), 182-184.
- Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Michell, B.J., Chen, Z.-P., Witters, L.A. (1999) Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**(1), 22-25.
- Kochetkov, N.K., Shibaev, V.N., Kost, A.A. (1971) New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acids modification. *Tetrahedron Letters*, **12**(22), 1993-1996.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., Geigenberger, P. (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(31), 11118-11123.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. (2004) New Fluorescence Parameters for the Determination of QA Redox State and Excitation Energy Fluxes. *Photosynthesis Research*, **79**(2), 209-218.
- Kulma, A., Villadsen, D., Campbell, D.G., Meek, S.E.M., E. Harthill, J., Nielsen, T.H., MacKintosh, C. (2004) Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *The Plant Journal*, **37**(5), 654-667.
- Lam, H.M., Peng, S., Coruzzi, G.M. (1994) Metabolic Regulation of the Gene Encoding Glutamine-Dependent Asparagine Synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **106**(4), 1347-1357.
- Lambeck, I.C., Fischer-Schrader, K., Niks, D., Roeper, J., Chi, J.-C., Hille, R., Schwarz, G. (2012) Molecular Mechanism of 14-3-3 Protein-mediated Inhibition of Plant Nitrate Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(7), 4562-4571.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., Thompson, C.B., Evans, R.M. (2009) AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science*, **326**(5951), 437-440.
- Langenkämper, G., Fung, W.M.R., Newcomb, D.R., Atkinson, G.R., Gardner, C.R., MacRae, A.E. (2002) Sucrose Phosphate Synthase Genes in Plants Belong to Three Different Families. *Journal of Molecular Evolution*, **54**(3), 322-332.
- Lastdrager, J., Hanson, J., Smeekens, S. (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot*, **65**(3), 799-807.
- Laurie, S., McKibbin, R.S., Halford, N.G. (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot*, **54**(383), 739-747.
- Lee, K.-W., Chen, P.-W., Lu, C.-A., Chen, S., Ho, T.-H.D., Yu, S.-M. (2009) Coordinated Responses to Oxygen and Sugar Deficiency Allow Rice Seedlings to Tolerate Flooding. *Science Signaling*, **2**(91), ra61-ra61.
- Leech, A., Nath, N., McCartney, R.R., Schmidt, M.C. (2003) Isolation of Mutations in the Catalytic Domain of the Snf1 Kinase That Render Its Activity Independent of the Snf4 Subunit. *Eukaryotic Cell*, **2**(2), 265-273.
- Lin, C.R., Lee, K.W., Chen, C.Y., Hong, Y.F., Chen, J.L., Lu, C.A., Chen, K.T., Ho, T.H., Yu, S.M. (2014) SnRK1A-interacting negative regulators modulate the nutrient starvation signaling sensor SnRK1 in source-sink communication in cereal seedlings under abiotic stress. *Plant Cell*, **26**(2), 808-827.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protocols*, **1**(1), 387-396.
- Loescher, W.H. (1987) Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **70**(3), 553-557.
- Loewus, F.A. and Murthy, P.P.N. (2000) myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, **150**(1), 1-19.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M.a.F., Simpson, J., Herrera-Estrella, L. (2002) Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the *Arabidopsis* Root System. *Plant Physiol*, **129**(1), 244-256.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., Chua, N.-H. (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(8), 4782-4787.
- López-Paz, C., Vilela, B., Riera, M., Pagès, M., Lumberras, V. (2009) Maize AKIN β dimerizes through the KIS/CBM domain and assembles into SnRK1 complexes. *FEBS Letters*, **583**(12), 1887-1894.
- Loqué, D., Tillard, P., Gojon, A., Lepetit, M. (2003) Gene Expression of the NO $_3^-$ Transporter NRT1.1 and the Nitrate Reductase NIA1 Is Repressed in *Arabidopsis* Roots by NO $_2^-$, the Product of NO $_3^-$ Reduction. *Plant Physiol*, **132**(2), 958-967.
- Lott, J.N.A., Ockenden, I., Raboy, V., Batten, G.D. (2000) Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Science Research*, **10**(01), 11-33.

- Love, A.J., Milner, J.J., Sadanandom, A. (2008) Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci*, **13**(11), 589-595.
- Lu, C.A., Lin, C.C., Lee, K.W., Chen, J.L., Huang, L.F., Ho, S.L., Liu, H.J., Hsing, Y.I., Yu, S.M. (2007) The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *Plant Cell*, **19**(8), 2484-2499.
- Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A., Kopka, J. (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography—mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, **24**(5), 732-737.
- Lumbreras, V., Mar Alba, M., Kleinow, T., Koncz, C., Pages, M. (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO reports*, **2**(1), 55-60.
- Lunn, J.E., Delorge, I., Figueroa, C.M., Van Dijck, P., Stitt, M. (2014) Trehalose metabolism in plants. *Plant J*, **79**(4), 544-567.
- Lunn, J.E., Feil, R., Hendriks, J.H., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W.R., Carillo, P., Hajirezaei, M.R., Stitt, M. (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, **397**(1), 139-148.
- Mackintosh, C., Douglas, P., Lillo, C. (1995) Identification of a Protein That Inhibits the Phosphorylated Form of Nitrate Reductase from Spinach (*Spinacia oleracea*) Leaves. *Plant Physiol*, **107**(2), 451-457.
- Mackintosh, R.W., Davies, S.P., Clarke, P.R., Weekes, J., Gillespie, J.G., Gibb, B.J., Hardie, D.G. (1992) Evidence for a protein kinase cascade in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, **209**(3), 923-931.
- Mair, A., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Anrather, D., Simeunovic, A., Weiste, C., Valerio, C., Dietrich, K., Kirchner, T., Nagele, T., Vicente Carbajosa, J., Hanson, J., Baena-Gonzalez, E., Chaban, C., Weckwerth, W., Droge-Laser, W., Teige, M. (2015) SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *Elife*, **4**.
- Martinez-Barajas, E., Delatte, T., Schlupepmann, H., de Jong, G.J., Somsen, G.W., Nunes, C., Primavesi, L.F., Coello, P., Mitchell, R.A., Paul, M.J. (2011) Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiol*, **156**(1), 373-381.
- Maruta, T., Yonemitsu, M., Yabuta, Y., Tamoi, M., Ishikawa, T., Shigeoka, S. (2008) Arabidopsis Phosphomannose Isomerase 1, but Not Phosphomannose Isomerase 2, Is Essential for Ascorbic Acid Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(43), 28842-28851.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., Karpinski, S. (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J Exp Bot*, **57**(8), 1795-1807.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A., Hardie, D.G. (2009) The Glycogen-Binding Domain on the AMPK β Subunit Allows the Kinase to Act as a Glycogen Sensor. *Cell Metabolism*, **9**(1), 23-34.
- McCartney, R.R. and Schmidt, M.C. (2001) Regulation of Snf1 Kinase: ACTIVATION REQUIRES PHOSPHORYLATION OF THREONINE 210 BY AN UPSTREAM KINASE AS WELL AS A DISTINCT STEP MEDIATED BY THE Snf4 SUBUNIT. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(39), 36460-36466.
- McKibbin, R.S., Muttucumar, N., Paul, M.J., Powers, S.J., Burrell, M.M., Coates, S., Purcell, P.C., Tiessen, A., Geigenberger, P., Halford, N.G. (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnology Journal*, **4**(4), 409-418.
- Menges, M., Samland, A.K., Planchais, S., Murray, J.A.H. (2006) The D-Type Cyclin CYCD3;1 Is Limiting for the G1-to-S-Phase Transition in Arabidopsis. *Plant Cell*, **18**(4), 893-906.
- Miranda-Saavedra, D., Stark, M.J., Packer, J.C., Vivares, C.P., Doerig, C., Barton, G.J. (2007) The complement of protein kinases of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* in relation to those of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics*, **8**(1), 1-21.
- Mudge, S.R., Rae, A.L., Diatloff, E., Smith, F.W. (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **31**(3), 341-353.
- Navarova, H., Bernsdorff, F., Doring, A.C., Zeier, J. (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell*, **24**(12), 5123-5141.
- Nemie-Feyissa, D., Krollicka, A., Forland, N., Hansen, M., Heidari, B., Lillo, C. (2013) Post-translational control of nitrate reductase activity responding to light and photosynthesis evolved already in the early vascular plants. *J Plant Physiol*, **170**(7), 662-667.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S. (2008) Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiol*, **147**(3), 1251-1263.
- Norman, C., Howell, K.A., Millar, A.H., Whelan, J.M., Day, D.A. (2004) Salicylic Acid Is an Uncoupler and Inhibitor of Mitochondrial Electron Transport. *Plant Physiol*, **134**(1), 492-501.

- Nunes, C., Primavesi, L.F., Patel, M.K., Martinez-Barajas, E., Powers, S.J., Sagar, R., Fevereiro, P.S., Davis, B.G., Paul, M.J. (2013) Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol Biochem*, **63**, 89-98.
- O'Neill, H.M., Maarbjerg, S.J., Crane, J.D., Jeppesen, J., Jørgensen, S.B., Schertzer, J.D., Shyroka, O., Kiens, B., van Denderen, B.J., Tarnopolsky, M.A., Kemp, B.E., Richter, E.A., Steinberg, G.R. (2011) AMP-activated protein kinase (AMPK) $\beta 1\beta 2$ muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(38), 16092-16097.
- O'Neill, L.A.J. and Hardie, D.G. (2013) Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*, **493**(7432), 346-355.
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., Kemp, B.E. (2011) AMPK Is a Direct Adenylate Charge-Regulated Protein Kinase. *Science*, **332**(6036), 1433-1435.
- Ordin, L. and Hall, M.A. (1968) Cellulose synthesis in higher plants from UDP glucose. *Plant Physiol*, **43**(3), 473-476.
- Paul, M.J. and Pellny, T.K. (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot*, **54**(382), 539-547.
- Pfaffl, M. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, **1**, 92-95.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**(9), e45.
- Piattoni, C.V., Bustos, D.M., Guerrero, S.A., Iglesias, A.Á. (2011) Nonphosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated in Wheat Endosperm at Serine-404 by an SNF1-Related Protein Kinase Allosterically Inhibited by Ribose-5-Phosphate. *Plant Physiol*, **156**(3), 1337-1350.
- Pierre, M., Traverso, J.A., Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., Meinel, T. (2007) N-Myristoylation Regulates the SnRK1 Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**(9), 2804-2821.
- Polge, C., Jossier, M., Crozet, P., Gissot, L., Thomas, M. (2008) Beta-subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKINbeta1-subunit. *Plant Physiol*, **148**(3), 1570-1582.
- Polge, C. and Thomas, M. (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci*, **12**(1), 20-28.
- Purcell, P.C., Smith, A.M., Halford, N.G. (1998) Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *The Plant Journal*, **14**(2), 195-202.
- Raboy, V., Young, K.A., Dorsch, J.A., Cook, A. (2001) Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *J Plant Physiol*, **158**(4), 489-497.
- Radchuk, R., Emery, R.J., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J.E., Feil, R., Weschke, W., Weber, H. (2010) Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J*, **61**(2), 324-338.
- Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L., Weber, H. (2006) Repressing the Expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE Gene in Pea Embryo Causes Pleiotropic Defects of Maturation Similar to an Abscisic Acid-Insensitive Phenotype. *Plant Physiol*, **140**(1), 263-278.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., Moorman, A.F.M. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, **339**(1), 62-66.
- Ramon, M., Ruelens, P., Li, Y., Sheen, J., Geuten, K., Rolland, F. (2013) The hybrid four-CBS-domain KINbetagamma subunit functions as the canonical gamma subunit of the plant energy sensor SnRK1. *Plant J*, **75**(1), 11-25.
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot*, **62**(10), 3321-3338.
- Robaglia, C., Thomas, M., Meyer, C. (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Opin Plant Biol*, **15**(3), 301-307.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumbreras, V., Gonzalez-Guzman, M., Antoni, R., Rodriguez, P.L., Baena-Gonzalez, E. (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **25**(10), 3871-3884.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2001) Metabolic Profiling Allows Comprehensive Phenotyping of Genetically or Environmentally Modified Plant Systems. *Plant Cell*, **13**(1), 11-29.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) SUGAR SENSING AND SIGNALING IN PLANTS: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, **57**(1), 675-709.
- Rutter, G.A., da Silva Xavier, G., Leclerc, I. (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochemical Journal*, **375**(1), 1-16.

- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A.J., Carlson, M. (2000) Regulatory Interactions between the Reg1-Glc7 Protein Phosphatase and the Snf1 Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, **20**(4), 1321-1328.
- Satbhai, S.B., Ristova, D., Busch, W. (2015) Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *J Exp Bot*, **66**(4), 1099-1112.
- Schmidt, M.C. and McCartney, R.R. (2000) β -subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *The EMBO Journal*, **19**(18), 4936-4943.
- Scholl, R.L., May, S.T., Ware, D.H. (2000) Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. *Plant Physiol*, **124**(4), 1477-1480.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riestter, M., Warthmann, N., Weigel, D. (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell*, **18**(5), 1121-1133.
- Schwachtje, J., Minchin, P.E., Jahnke, S., van Dongen, J.T., Schittko, U., Baldwin, I.T. (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(34), 12935-12940.
- Shen, W. and Hanley-Bowdoin, L. (2006) Geminivirus Infection Up-Regulates the Expression of Two Arabidopsis Protein Kinases Related to Yeast SNF1- and Mammalian AMPK-Activating Kinases. *Plant Physiol*, **142**(4), 1642-1655.
- Shen, W., Reyes, M.I., Hanley-Bowdoin, L. (2009) Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol*, **150**(2), 996-1005.
- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J., Rolland, F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol*, **13**(3), 274-279.
- Stapleton, D., Woollatt, E., Mitchelhill, K.I., Nicholl, J.K., Fernandez, C.S., Michell, B.J., Witters, L.A., Power, D.A., Sutherland, G.R., Kemp, B.E. (1997) AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Letters*, **409**(3), 452-456.
- Steinberg, G.R. and Kemp, B.E. (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*, **89**(3), 1025-1078.
- Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W.R., Krapp, A. (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot*, **53**(370), 959-970.
- Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G., Hardie, D.G. (1999a) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J*, **19**(4), 433-439.
- Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N.G., Hardie, D.G. (1999b) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol*, **120**(1), 257-274.
- Sweetlove, L.J., Beard, K.F.M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G. (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci*, **15**(8), 462-470.
- Thelander, M., Olsson, T., Ronne, H. (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *The EMBO Journal*, **23**(8), 1900-1910.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N.G., Geigenberger, P. (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J*, **35**(4), 490-500.
- Tome, F., Nagele, T., Adamo, M., Garg, A., Marco-Llorca, C., Nukarinen, E., Pedrotti, L., Peviani, A., Simeunovic, A., Tatkievicz, A., Tomar, M., Gamm, M. (2014) The low energy signaling network. *Front Plant Sci*, **5**, 353.
- Tsai, A.Y.-L. and Gazzarrini, S. (2012) AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **69**(5), 809-821.
- Tsugama, D., Liu, S., Takano, T. (2012) A putative myristoylated 2C-type protein phosphatase, PP2C74, interacts with SnRK1 in Arabidopsis. *FEBS Letters*, **586**(6), 693-698.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., Carlson, M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes & Development*, **15**(9), 1104-1114.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., Klessig, D.F. (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, **47**(1), 177-206.
- Volkert, K., Debast, S., Voll, L.M., Voll, H., Schiessl, I., Hofmann, J., Schneider, S., Bornke, F. (2014) Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in Arabidopsis thaliana limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *J Exp Bot*, **65**(18), 5217-5229.
- Wang, L., Hu, W., Sun, J., Liang, X., Yang, X., Wei, S., Wang, X., Zhou, Y., Xiao, Q., Yang, G., He, G. (2015) Genome-wide analysis of SnRK gene family in Brachypodium distachyon and functional characterization of BdSnRK2.9. *Plant Sci*, **237**, 33-45.

- Wang, Z., Wilson, W.A., Fujino, M.A., Roach, P.J. (2001) Antagonistic Controls of Autophagy and Glycogen Accumulation by Snf1p, the Yeast Homolog of AMP-Activated Protein Kinase, and the Cyclin-Dependent Kinase Pho85p. *Molecular and Cellular Biology*, **21**(17), 5742-5752.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**(6863), 562-565.
- Wilkinson, J.Q. and Crawford, N.M. (1991) Identification of the Arabidopsis CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene NIA2. *Plant Cell*, **3**(5), 461-471.
- Williams, S.P., Rangarajan, P., Donahue, J.L., Hess, J.E., Gillaspay, G.E. (2014) Regulation of Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1 genes in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci*, **5**, 324.
- Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Current Biology*, **6**(11), 1426-1434.
- Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D. (1994) Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(30), 19509-19515.
- Wu, L. and Birch, R.G. (2010) Physiological basis for enhanced sucrose accumulation in an engineered sugarcane cell line. *Functional Plant Biology*, **37**(12), 1161-1174.
- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., Saiu, P., Howell, S.A., Aasland, R., Martin, S.R., Carling, D., Gamblin, S.J. (2011) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, **472**(7342), 230-233.
- Yadav, U.P., Ivakov, A., Feil, R., Duan, G.Y., Walther, D., Giavalisco, P., Piques, M., Carillo, P., Hubberten, H.M., Stitt, M., Lunn, J.E. (2014) The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *J Exp Bot*, **65**(4), 1051-1068.
- Yan, S. and Dong, X. (2014) Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr Opin Plant Biol*, **20**, 64-68.
- Yang, X., Hubbard, E., Carlson, M. (1992) A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science*, **257**(5070), 680-682.
- Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., Ideker, T. (2003) Multiple Pathways Are Co-regulated by the Protein Kinase Snf1 and the Transcription Factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(28), 26146-26158.
- Zelitch, I. (1975) Pathways of Carbon Fixation in Green Plants. *Annual Review of Biochemistry*, **44**(1), 123-145.
- Zell, M.B., Fahnenstich, H., Maier, A., Saigo, M., Voznesenskaya, E.V., Edwards, G.E., Andreo, C., Schleifenbaum, F., Zell, C., Drincovich, M.F., Maurino, V.G. (2010) Analysis of Arabidopsis with Highly Reduced Levels of Malate and Fumarate Sheds Light on the Role of These Organic Acids as Storage Carbon Molecules. *Plant Physiol*, **152**(3), 1251-1262.
- Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A., Powers, S.J., Schluempmann, H., Delatte, T., Winkler, A., Paul, M.J. (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol*, **149**(4), 1860-1871.
- Zhang, Y., Shewry, P.R., Jones, H., Barcelo, P., Lazzeri, P.A., Halford, N.G. (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *The Plant Journal*, **28**(4), 431-441.
- Zhu, H., Qian, W., Lu, X., Li, D., Liu, X., Liu, K., Wang, D. (2005) Expression Patterns of Purple Acid Phosphatase Genes in Arabidopsis Organs and Functional Analysis of AtPAP23 Predominantly Transcribed in Flower. *Plant Mol Biol*, **59**(4), 581-594.
- Zmijewski, J.W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E.R., Abraham, E. (2010) Exposure to Hydrogen Peroxide Induces Oxidation and Activation of AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **285**(43), 33154-33164.

6. Anhang

6.1 Metabolitprofile

Anhang Tab. 1: Metabolitprofil bei 50 μ E

Vollständiges Metabolitprofil von 7 Tage alten Keimlingen bei einer Lichtintensität von 50 μ E unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (1/2 MS: normales 1/2 MS Wachstumsmedium; 1% Suc: 1/2 MS mit 1% Saccharose). Gezeigt sind auf die Kontrolle normalisierte Werte der induzierten amiR-SNF4 Linie mit Standardfehler. Gemessen wurde per GC-TOF-MS bzw. LC-MS/MS („x“). Für die statistische Analyse wurde ein Student's t-Test (Kontrolle gegen induzierte amiR-SNF4 Linie; n = 5; *: p < 0,05) verwendet.

EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages.

<u>Metabolite</u>	<u>EN (1/2 MS)</u>	<u>ET (1/2 MS)</u>	<u>EN (1% Suc)</u>	<u>ET (1% Suc)</u>
<u>Aminosäuren</u>				
Alanin	0,60 +/- 0,03 *	0,92 +/- 0,18	0,74 +/- 0,04	0,86 +/- 0,09
Alanin, 3-cyano-	1,04 +/- 0,29	1,17 +/- 0,25	1,67 +/- 0,42	1,90 +/- 0,36
Alanin, beta-	0,99 +/- 0,03	1,04 +/- 0,17	1,01 +/- 0,08	1,62 +/- 0,31
Arginin	1,00 +/- 0,15	0,97 +/- 0,23	1,57 +/- 0,13 *	2,48 +/- 0,32 *
Asparagin	1,06 +/- 0,17	1,19 +/- 0,15	1,83 +/- 0,17 *	1,93 +/- 0,20 *
Aspartat	1,15 +/- 0,05	0,95 +/- 0,14	1,38 +/- 0,15	1,00 +/- 0,12
Cystein	0,96 +/- 0,09	1,00 +/- 0,08	0,99 +/- 0,05	0,97 +/- 0,05
Cystein, S-methyl-	3,84 +/- 0,24 *	4,26 +/- 0,21 *	2,48 +/- 0,17 *	2,48 +/- 0,45 *
Glutamat	0,71 +/- 0,04 *	0,83 +/- 0,11	1,09 +/- 0,04	1,17 +/- 0,05
Glutamin	1,00 +/- 0,66	0,40 +/- 0,35	1,29 +/- 0,90	2,22 +/- 1,24
Glycin	0,75 +/- 0,03 *	0,83 +/- 0,11	1,03 +/- 0,08	0,92 +/- 0,15
Homoserin	1,40 +/- 0,19	1,18 +/- 0,16	1,62 +/- 0,17 *	1,48 +/- 0,11 *
Isoleucin	0,96 +/- 0,03	0,94 +/- 0,10	1,29 +/- 0,08 *	2,16 +/- 0,23 *
Leucin	0,91 +/- 0,05	0,92 +/- 0,06	1,13 +/- 0,09	1,84 +/- 0,18 *
Lysin	0,79 +/- 0,19	0,66 +/- 0,15	1,43 +/- 0,31	2,84 +/- 0,43 *
Methionin	1,41 +/- 0,05 *	1,33 +/- 0,15	2,22 +/- 0,05 *	2,67 +/- 0,18 *
Ornithin	0,54 +/- 0,08 *	0,46 +/- 0,09 *	1,35 +/- 0,19	2,18 +/- 0,18 *
Ornithin-1,5-lactam	0,98 +/- 0,13	0,89 +/- 0,15	1,56 +/- 0,10 *	1,58 +/- 0,17 *
Phenylalanin	1,28 +/- 0,10 *	1,26 +/- 0,18	1,62 +/- 0,12 *	1,95 +/- 0,14 *
Prolin	0,74 +/- 0,07	0,76 +/- 0,17	1,10 +/- 0,07	3,52 +/- 2,15
Serin	0,82 +/- 0,02 *	0,92 +/- 0,08	1,46 +/- 0,02 *	1,31 +/- 0,14
Serin, N-acetyl-	1,15 +/- 0,23	1,19 +/- 0,15	1,67 +/- 0,35	1,32 +/- 0,22
Serin, O-acetyl-	1,07 +/- 0,05	1,13 +/- 0,15	0,72 +/- 0,05 *	1,01 +/- 0,04
Threonin	0,69 +/- 0,02 *	0,81 +/- 0,09	1,14 +/- 0,02 *	1,33 +/- 0,15
Tyrosin	1,08 +/- 0,25	0,97 +/- 0,27	1,31 +/- 0,31	2,46 +/- 0,37 *
Valin	1,09 +/- 0,10	1,16 +/- 0,14	1,35 +/- 0,07 *	1,84 +/- 0,19 *
<u>Zucker</u>				
x ADP-Glukose	0,84 +/- 0,10	0,88 +/- 0,11	1,08 +/- 0,09	0,86 +/- 0,05
Fruktose	1,41 +/- 0,73	2,15 +/- 0,37 *	0,94 +/- 0,08	0,97 +/- 0,02
Fukose	1,30 +/- 0,20	1,00 +/- 0,18	1,15 +/- 0,04	1,16 +/- 0,14
Galaktose	0,75 +/- 0,08	0,92 +/- 0,07	1,02 +/- 0,14	0,97 +/- 0,08
Glukose	0,73 +/- 0,08 *	1,30 +/- 0,11	0,89 +/- 0,17	0,97 +/- 0,06
Isomaltose	0,71 +/- 0,08	0,69 +/- 0,13	1,15 +/- 0,16	1,35 +/- 0,09 *
Raffinose	0,64 +/- 0,05 *	1,95 +/- 0,14 *	0,83 +/- 0,05	1,38 +/- 0,73
Ribulose	1,01 +/- 0,39	1,02 +/- 0,35	1,20 +/- 0,34	1,14 +/- 0,30
Saccharose	0,68 +/- 0,10 *	1,02 +/- 0,13	0,91 +/- 0,04	0,89 +/- 0,07
Trehalose, α,α -	1,12 +/- 0,35	1,04 +/- 0,37	1,20 +/- 0,48	1,26 +/- 0,24
Trehalose, α,β -	1,50 +/- 0,05 *	1,53 +/- 0,15 *	2,72 +/- 0,12 *	3,40 +/- 0,31 *
Trehalose, β,β -	2,99 +/- 0,23 *	2,73 +/- 0,37 *	3,71 +/- 0,27 *	3,56 +/- 0,27 *
x UDP-Glukose	0,55 +/- 0,07 *	0,84 +/- 0,10	0,75 +/- 0,04 *	0,91 +/- 0,04
Xylose	0,88 +/- 0,20	1,04 +/- 0,15	1,14 +/- 0,25	1,05 +/- 0,17

Organische Säuren

Aminooxy-Acetat	0,89 +/- 0,20	1,12 +/- 0,26	1,04 +/- 0,21	1,12 +/- 0,28
Aconitat	1,01 +/- 0,22	1,10 +/- 0,09	1,06 +/- 0,16	0,92 +/- 0,06
Ascorbat	0,86 +/- 0,03 *	0,76 +/- 0,09	0,81 +/- 0,11	0,80 +/- 0,05
Benzoat	1,05 +/- 0,20	1,08 +/- 0,14	1,15 +/- 0,15	1,31 +/- 0,17
2,4-dihydroxy-Butanoat	0,96 +/- 0,02	0,99 +/- 0,09	1,24 +/- 0,02 *	1,27 +/- 0,12
γ -amino-Buttersäure	0,66 +/- 0,03 *	0,69 +/- 0,12	1,04 +/- 0,04	1,03 +/- 0,06
Citrat	1,04 +/- 0,06	1,47 +/- 0,19	1,78 +/- 0,08 *	2,05 +/- 0,11 *
Fumarat	1,08 +/- 0,08	0,89 +/- 0,10	1,02 +/- 0,15	0,84 +/- 0,09
Furan-2-carboxylat	1,19 +/- 0,17	0,92 +/- 0,17	1,20 +/- 0,28	1,00 +/- 0,19
Galaktarat	1,12 +/- 0,07	1,31 +/- 0,17	1,28 +/- 0,05 *	1,46 +/- 0,16 *
Galaktonat	0,88 +/- 0,07	0,86 +/- 0,12	1,12 +/- 0,06	1,09 +/- 0,08
Glucoheptonat-1,4-lactone	0,61 +/- 0,03 *	0,57 +/- 0,16	0,95 +/- 0,05	1,15 +/- 0,05
Gluconat	1,07 +/- 0,15	1,12 +/- 0,12	1,95 +/- 0,22 *	1,78 +/- 0,36
Glucuronat	0,57 +/- 0,04 *	0,73 +/- 0,09	0,60 +/- 0,03 *	0,94 +/- 0,13
Glutarat	0,94 +/- 0,04	1,34 +/- 0,10 *	0,87 +/- 0,04	1,83 +/- 0,16 *
2-oxo-Glutarat	0,88 +/- 0,10	0,94 +/- 0,11	1,10 +/- 0,11	1,07 +/- 0,11
3-hydroxy,3-methyl-Glutarat (HMG)	1,05 +/- 0,14	1,07 +/- 0,21	3,77 +/- 0,93 *	2,37 +/- 0,79
3-oxo-Glutarat	0,84 +/- 0,13	0,97 +/- 0,06	0,92 +/- 0,07	0,80 +/- 0,06
Glycerat	0,89 +/- 0,05	1,00 +/- 0,08	0,72 +/- 0,06 *	0,93 +/- 0,20
Glycolat	0,92 +/- 0,05	1,09 +/- 0,07	0,92 +/- 0,08	0,93 +/- 0,09
Heptanoat	0,89 +/- 0,10	1,10 +/- 0,12	1,06 +/- 0,16	1,09 +/- 0,14
Homoprolin	8,35 +/- 2,64 *	4,62 +/- 2,73	7,99 +/- 1,69 *	9,32 +/- 2,10 *
x Isocitrat	1,24 +/- 0,11	1,37 +/- 0,16	1,66 +/- 0,10 *	1,58 +/- 0,05 *
Lactat	1,30 +/- 0,09 *	0,96 +/- 0,08	1,20 +/- 0,11	1,22 +/- 0,32
Maleat	0,97 +/- 0,11	1,07 +/- 0,03	0,96 +/- 0,05	0,87 +/- 0,09
Malat	1,33 +/- 0,04 *	0,85 +/- 0,10	1,30 +/- 0,07 *	0,95 +/- 0,10
Malonat	1,23 +/- 0,13	1,03 +/- 0,10	1,68 +/- 0,12 *	1,60 +/- 0,15 *
Nicotinat	0,74 +/- 0,06	0,73 +/- 0,09	0,99 +/- 0,08	1,10 +/- 0,14
Nonanoat	0,90 +/- 0,09	1,03 +/- 0,11	1,03 +/- 0,20	0,94 +/- 0,09
Dihydro-Orotat	0,76 +/- 0,06	0,92 +/- 0,14	0,69 +/- 0,13	1,29 +/- 0,34
Phosphoenolpyruvat	0,92 +/- 0,04	0,93 +/- 0,08	1,05 +/- 0,06	1,05 +/- 0,04
Pyroglutamat	0,61 +/- 0,04 *	0,69 +/- 0,13	0,88 +/- 0,06	1,27 +/- 0,15
Pyruvat	0,98 +/- 0,06	0,87 +/- 0,04	1,34 +/- 0,23	1,30 +/- 0,39
Quinat	0,76 +/- 0,02 *	0,81 +/- 0,05	0,85 +/- 0,11	0,61 +/- 0,09 *
Ribonat	0,82 +/- 0,07	0,93 +/- 0,10	0,94 +/- 0,08	0,92 +/- 0,12
Saccharat (Glucarat)	0,83 +/- 0,08	0,68 +/- 0,13	1,07 +/- 0,17	1,30 +/- 0,11
Salicylsäure	4,57 +/- 1,07 *	6,39 +/- 1,22 *	4,29 +/- 0,66 *	4,57 +/- 0,76 *
x Shikimat	1,32 +/- 0,15	1,13 +/- 0,12	1,28 +/- 0,06 *	0,92 +/- 0,07
Sinapat	0,97 +/- 0,10	0,95 +/- 0,08	1,03 +/- 0,15	0,84 +/- 0,10
Succinat	1,11 +/- 0,07	1,24 +/- 0,09	1,04 +/- 0,05	1,09 +/- 0,09
2,2-dimethyl-Succinat	0,83 +/- 0,15	1,16 +/- 0,29	1,29 +/- 0,26	0,92 +/- 0,21
Threonolacton	0,80 +/- 0,06 *	0,93 +/- 0,07	0,92 +/- 0,09	0,84 +/- 0,09
Urat	0,56 +/- 0,07 *	0,58 +/- 0,13	1,37 +/- 0,25	2,09 +/- 0,39

Verschiedenes

Agmatin	0,92 +/- 0,12	1,04 +/- 0,07	0,93 +/- 0,12	1,11 +/- 0,12
Butylamin	1,39 +/- 0,17	1,45 +/- 0,11 *	1,62 +/- 0,17 *	1,56 +/- 0,17 *
Cytosin	0,66 +/- 0,16	0,71 +/- 0,17	1,13 +/- 0,14	1,11 +/- 0,12
5-methyl-Cytosin	0,99 +/- 0,30	1,06 +/- 0,26	1,40 +/- 0,41	1,41 +/- 0,32
Ethanolamin	0,54 +/- 0,05 *	0,70 +/- 0,11	1,01 +/- 0,19	1,00 +/- 0,15
Hydroquinon	0,98 +/- 0,27	1,02 +/- 0,21	1,22 +/- 0,34	1,13 +/- 0,23
N-acetyl-Mannosamin	0,87 +/- 0,08	0,93 +/- 0,07	0,85 +/- 0,03	0,91 +/- 0,07
Phosphat-monomethylester	0,88 +/- 0,04	1,04 +/- 0,11	1,01 +/- 0,06	1,08 +/- 0,14
Phosphat	1,40 +/- 0,08 *	1,57 +/- 0,20 *	1,34 +/- 0,07 *	1,62 +/- 0,14 *
Putrescin	0,96 +/- 0,08	0,94 +/- 0,15	1,11 +/- 0,08	1,32 +/- 0,16
Succinat-semialdehyd (SSA)	1,29 +/- 0,12	1,06 +/- 0,11	1,07 +/- 0,07	0,91 +/- 0,06
Uracil	1,09 +/- 0,21	1,12 +/- 0,22	1,23 +/- 0,26	1,14 +/- 0,18

Zuckeralkohole

Arabitol	0,82 +/- 0,13	1,01 +/- 0,13	1,07 +/- 0,17	1,06 +/- 0,15
Erythritol	0,76 +/- 0,02 *	0,72 +/- 0,05 *	0,92 +/- 0,02	0,99 +/- 0,04
Galaktinol	0,65 +/- 0,07	0,90 +/- 0,22	0,76 +/- 0,04	1,07 +/- 0,31
Glycerol	0,80 +/- 0,03	1,07 +/- 0,10	0,96 +/- 0,06	0,85 +/- 0,06
Maltitol	1,19 +/- 0,05 *	1,09 +/- 0,08	1,31 +/- 0,09 *	1,35 +/- 0,10 *
Myoinositol	0,89 +/- 0,02	0,89 +/- 0,07	0,70 +/- 0,04 *	0,76 +/- 0,06
Ononitol	0,80 +/- 0,05	0,97 +/- 0,05	0,95 +/- 0,14	1,12 +/- 0,14
Threitol	0,61 +/- 0,02 *	0,63 +/- 0,05 *	0,81 +/- 0,04	0,84 +/- 0,04
Xylitol	0,83 +/- 0,11	1,06 +/- 0,07	1,11 +/- 0,12	1,06 +/- 0,08

Zuckerphosphate

Fruktose-6-phosphat	0,38 +/- 0,06 *	0,74 +/- 0,11	0,50 +/- 0,06	0,75 +/- 0,08
x Fruktose-1,6-bisphosphat	0,75 +/- 0,08	1,09 +/- 0,19	1,09 +/- 0,14	0,93 +/- 0,02
x Galaktose-1-phosphat	0,59 +/- 0,05 *	0,78 +/- 0,07	0,76 +/- 0,03 *	0,79 +/- 0,03 *
Galaktose-6-phosphat	2,39 +/- 0,20 *	2,40 +/- 0,21 *	2,74 +/- 0,25 *	3,90 +/- 0,66 *
Glukose-1-phosphat	0,71 +/- 0,08	1,18 +/- 0,19	0,92 +/- 0,13	0,76 +/- 0,11
Glukose-6-phosphat	0,44 +/- 0,10	0,74 +/- 0,15	0,52 +/- 0,10	0,82 +/- 0,12
x Glukose-1,6-bisphosphat	0,80 +/- 0,08	1,00 +/- 0,12	0,85 +/- 0,04	0,88 +/- 0,06
x Glycerol-3-phosphat	1,00 +/- 0,08	1,02 +/- 0,09	0,95 +/- 0,06	1,05 +/- 0,13
Mannose-1-phosphat	0,52 +/- 0,16	0,95 +/- 0,20	0,52 +/- 0,10	0,76 +/- 0,12
x Mannose-6-phosphat	0,47 +/- 0,04 *	0,63 +/- 0,05 *	0,62 +/- 0,04 *	0,76 +/- 0,03 *
Myo-Inositol-1-phosphat	1,05 +/- 0,07	1,11 +/- 0,10	0,92 +/- 0,03	1,07 +/- 0,06
Myo-Inositol-2-phosphat	0,71 +/- 0,13	0,76 +/- 0,12	1,43 +/- 0,34	1,45 +/- 0,40
x 3-Phosphoglycerat	0,57 +/- 0,05 *	0,83 +/- 0,10	0,80 +/- 0,04	0,87 +/- 0,04
x Saccharose-6-phosphat	0,60 +/- 0,05 *	1,02 +/- 0,16	1,25 +/- 0,13	1,03 +/- 0,07
x Trehalose-6-phosphat	0,58 +/- 0,06 *	0,80 +/- 0,12	1,02 +/- 0,13	0,86 +/- 0,07

Anhang Tab. 2: Metabolitprofil bei 10 µE

Vollständiges Metabolitprofil von 7 Tage alten Keimlingen bei einer Lichtintensität von 10 µE unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (1/2 MS: normales 1/2 MS Wachstumsmedium; 1% Suc: 1/2 MS mit 1% Saccharose). Gezeigt sind auf die Kontrolle normalisierte Werte der induzierten amiR-SNF4 Linie mit Standardfehler. Gemessen wurde per GC-TOF-MS. Für die statistische Analyse wurde ein Student's t-Test (Kontrolle gegen induzierte amiR-SNF4 Linie; n = 5; *: p < 0,05) verwendet.

EN: Ende der Nacht; ET: Ende des Tages.

<u>Metabolite</u>	<u>EN (1/2 MS)</u>	<u>ET (1/2 MS)</u>	<u>EN (1% Suc)</u>	<u>ET (1% Suc)</u>
<u>Aminosäuren</u>				
Alanin	0,50 +/- 0,04 *	0,67 +/- 0,04 *	0,85 +/- 0,03	0,88 +/- 0,05
Alanin, 3-cyano-	1,01 +/- 0,12	1,14 +/- 0,13	1,83 +/- 0,21 *	1,83 +/- 0,19 *
Alanin, beta-	0,87 +/- 0,04	1,18 +/- 0,10	1,20 +/- 0,04 *	1,26 +/- 0,05 *
Arginin	0,95 +/- 0,06	1,05 +/- 0,03	1,54 +/- 0,10 *	1,69 +/- 0,04 *
Asparagie	1,44 +/- 0,39	0,64 +/- 0,06	1,78 +/- 0,25	1,54 +/- 0,19
Aspartat	1,62 +/- 0,09 *	1,45 +/- 0,07 *	2,46 +/- 0,17 *	1,81 +/- 0,10 *
Cystein	1,29 +/- 0,09	1,45 +/- 0,07 *	2,87 +/- 0,24 *	2,50 +/- 0,21 *
Glutamat	0,75 +/- 0,04 *	1,08 +/- 0,03	1,07 +/- 0,02	1,44 +/- 0,07 *
Glutamin	0,65 +/- 0,07 *	0,82 +/- 0,07	0,62 +/- 0,13	1,09 +/- 0,35
Glycin	0,86 +/- 0,08	0,85 +/- 0,02	1,69 +/- 0,09 *	1,23 +/- 0,18
Histidin	1,43 +/- 0,13	1,36 +/- 0,13	3,68 +/- 0,51 *	3,43 +/- 0,33 *
Homoserin	1,30 +/- 0,13	1,40 +/- 0,15	2,06 +/- 0,16 *	1,60 +/- 0,04 *
Isoleucin	0,69 +/- 0,05 *	0,73 +/- 0,03 *	0,89 +/- 0,05	1,17 +/- 0,05
Leucin	0,69 +/- 0,07	0,82 +/- 0,10	1,14 +/- 0,06	1,94 +/- 0,13 *
Lysin	0,66 +/- 0,03 *	0,90 +/- 0,04	0,67 +/- 0,16	0,83 +/- 0,04
Methionin	1,19 +/- 0,07	1,37 +/- 0,05 *	1,61 +/- 0,08 *	1,66 +/- 0,10 *
Ornithin	0,50 +/- 0,04 *	0,71 +/- 0,03 *	1,35 +/- 0,14	1,36 +/- 0,18
Ornithin-1,5-lactam	0,96 +/- 0,07	1,08 +/- 0,04	1,59 +/- 0,09 *	1,64 +/- 0,06 *
Phenylalanin	1,37 +/- 0,05 *	1,94 +/- 0,15 *	2,14 +/- 0,15 *	3,59 +/- 0,17 *
Prolin	0,83 +/- 0,06 *	0,91 +/- 0,01	1,38 +/- 0,06 *	1,67 +/- 0,04 *
Serin	0,70 +/- 0,03 *	0,98 +/- 0,05	1,49 +/- 0,04 *	1,52 +/- 0,10 *
Serin, O-acetyl-	0,70 +/- 0,05 *	1,03 +/- 0,03	1,04 +/- 0,05	1,21 +/- 0,08
Threonin	0,70 +/- 0,05 *	0,81 +/- 0,02	1,13 +/- 0,07	1,13 +/- 0,05
Tryptophan	0,75 +/- 0,07	0,97 +/- 0,03	1,28 +/- 0,13	1,10 +/- 0,09
Tyrosin	0,82 +/- 0,06	1,21 +/- 0,06 *	1,21 +/- 0,09	1,74 +/- 0,07 *
Valin	0,79 +/- 0,05 *	0,94 +/- 0,04	1,36 +/- 0,07	1,60 +/- 0,08 *
<u>Zucker</u>				
Cellubiose	0,84 +/- 0,05	0,80 +/- 0,01	1,44 +/- 0,25	1,24 +/- 0,16
Fruktose	0,70 +/- 0,11	1,30 +/- 0,08	0,74 +/- 0,03 *	1,49 +/- 0,17
β -D-Fructofuranosyl-(2,1)- β -D-Fructofuranose	0,36 +/- 0,02 *	0,73 +/- 0,02	0,76 +/- 0,09	1,06 +/- 0,12
Glukose	1,00 +/- 0,19	0,61 +/- 0,14	0,68 +/- 0,01 *	1,47 +/- 0,17
Isomaltose	0,83 +/- 0,04	0,94 +/- 0,02	1,08 +/- 0,08	1,25 +/- 0,05 *
Mannose	0,65 +/- 0,08	0,83 +/- 0,13	1,17 +/- 0,14	1,27 +/- 0,10
Psicose	0,72 +/- 0,05 *	0,93 +/- 0,04	1,96 +/- 0,26	1,94 +/- 0,62
Raffinose	0,65 +/- 0,05 *	0,95 +/- 0,11	0,61 +/- 0,04	1,29 +/- 0,09 *
Sorbose	0,93 +/- 0,07	0,99 +/- 0,04	1,30 +/- 0,04 *	1,22 +/- 0,09
Saccharose	0,30 +/- 0,05 *	0,73 +/- 0,07	0,73 +/- 0,06 *	0,82 +/- 0,05 *
Trehalose α,α -	1,18 +/- 0,16	1,47 +/- 0,16	0,88 +/- 0,20	1,67 +/- 0,26
Trehalose α,β -	0,87 +/- 0,05	0,92 +/- 0,03	1,16 +/- 0,09	1,19 +/- 0,06
Xylose	0,87 +/- 0,10	0,99 +/- 0,06	1,17 +/- 0,10	1,32 +/- 0,21
<u>Zuckeralkohole</u>				
Arabitol	0,73 +/- 0,10	0,90 +/- 0,08	1,00 +/- 0,08	1,06 +/- 0,07
Erythritol	0,77 +/- 0,05 *	0,90 +/- 0,02	1,05 +/- 0,07	1,06 +/- 0,06
Galaktinol	0,43 +/- 0,04 *	0,44 +/- 0,02 *	0,50 +/- 0,04 *	0,58 +/- 0,05 *
Galaktitol	0,89 +/- 0,19	1,05 +/- 0,10	1,56 +/- 0,14	2,37 +/- 0,28 *
Myoinositol	0,83 +/- 0,04	0,88 +/- 0,05	0,70 +/- 0,04 *	0,90 +/- 0,05
Ononitol	0,61 +/- 0,05 *	0,78 +/- 0,07	1,21 +/- 0,14	1,35 +/- 0,11
Threitol	0,63 +/- 0,04 *	0,71 +/- 0,02	0,87 +/- 0,06	0,86 +/- 0,07
Xylitol	0,56 +/- 0,01 *	0,86 +/- 0,05	1,21 +/- 0,14	1,68 +/- 0,26

Zuckerphosphate

Adenosin-monophosphat	0,63 +/- 0,04	0,82 +/- 0,11	0,77 +/- 0,05	1,12 +/- 0,14
Fruktose-6-phosphat	0,30 +/- 0,03 *	0,75 +/- 0,02	0,49 +/- 0,04 *	0,80 +/- 0,08
Glukonat-6-phosphat	0,27 +/- 0,03 *	0,67 +/- 0,03 *	0,49 +/- 0,05 *	0,78 +/- 0,07
Glukose-6-phosphat	0,31 +/- 0,02 *	0,75 +/- 0,03 *	0,55 +/- 0,05 *	0,86 +/- 0,06
Glycerol-3-phosphat	0,98 +/- 0,08	0,90 +/- 0,05	1,14 +/- 0,11	1,34 +/- 0,13
Glycerophosphoglycerol	0,69 +/- 0,06 *	0,79 +/- 0,03	0,67 +/- 0,03	1,00 +/- 0,07
myo-Inositol-2-phosphat	1,12 +/- 0,08	1,09 +/- 0,02	1,39 +/- 0,11 *	1,71 +/- 0,11 *
Phosphat-monomethylester	1,36 +/- 0,14	1,31 +/- 0,09	1,65 +/- 0,15 *	1,81 +/- 0,22 *
Ribulose-5-phosphat	0,60 +/- 0,03	0,79 +/- 0,06	0,87 +/- 0,06	0,90 +/- 0,10

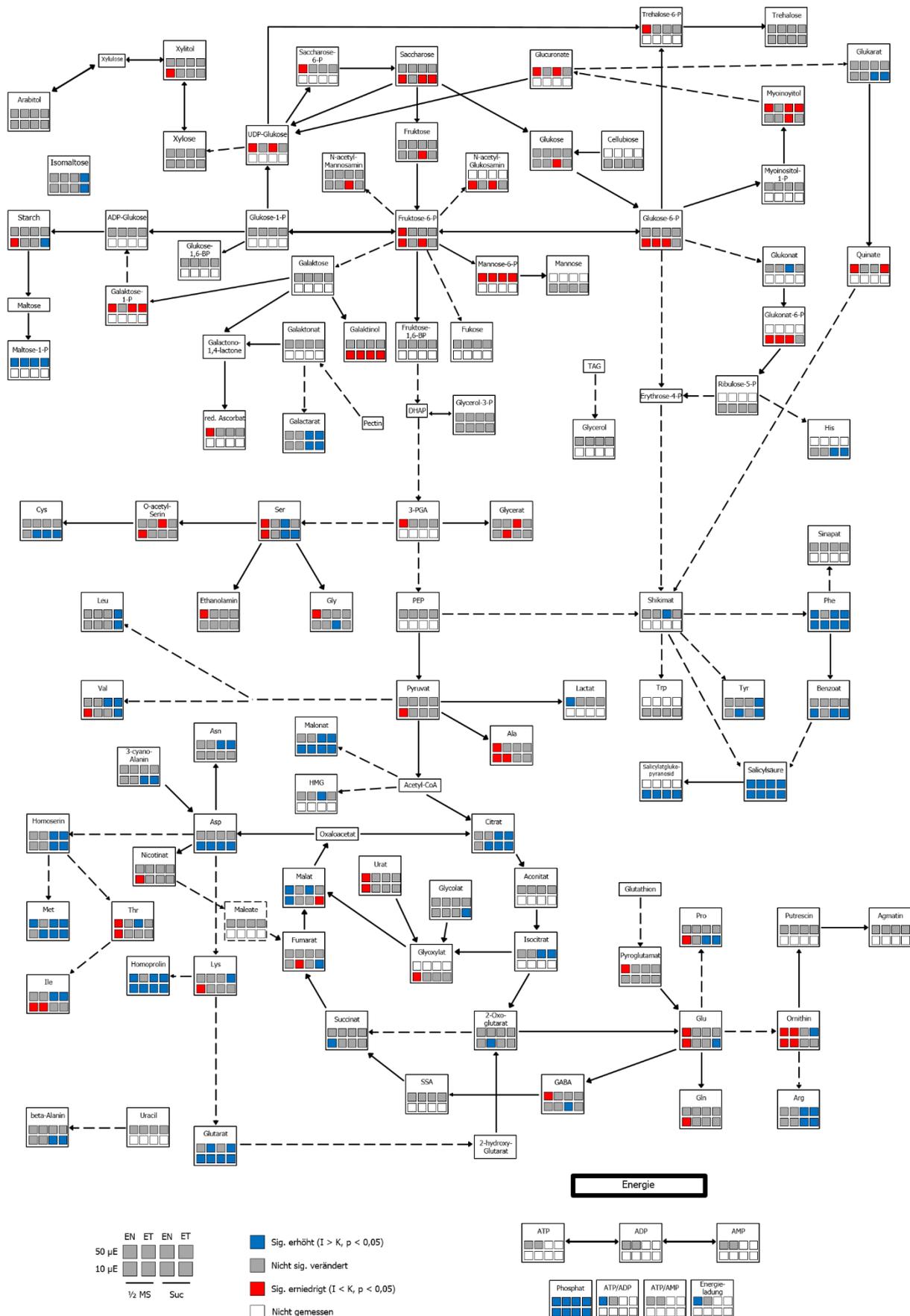
Organische Säuren

Benzoat	1,28 +/- 0,06 *	1,07 +/- 0,06	1,46 +/- 0,06 *	1,31 +/- 0,03 *
γ-amino-Buttersäure	0,96 +/- 0,07	0,99 +/- 0,02	1,37 +/- 0,06 *	1,16 +/- 0,09
Citrat	1,13 +/- 0,04	1,72 +/- 0,02 *	1,96 +/- 0,09 *	2,45 +/- 0,07 *
Erythronat	0,79 +/- 0,06 *	0,97 +/- 0,14	1,10 +/- 0,05	1,16 +/- 0,06
Fumarat	0,97 +/- 0,08	0,71 +/- 0,04 *	1,16 +/- 0,13	1,31 +/- 0,04 *
Furan-2-carboxylat	0,97 +/- 0,08	0,91 +/- 0,06	1,14 +/- 0,09	1,25 +/- 0,11
Galaktarat	0,98 +/- 0,08	1,07 +/- 0,05	1,59 +/- 0,09 *	1,49 +/- 0,11 *
Glucarat-1,4-lacton	0,72 +/- 0,04 *	0,94 +/- 0,01	0,81 +/- 0,01 *	1,49 +/- 0,18
Glutarat	1,73 +/- 0,09 *	2,13 +/- 0,08 *	3,55 +/- 0,13 *	2,94 +/- 0,17 *
2-oxo-Glutarat	1,02 +/- 0,09	1,48 +/- 0,04 *	0,87 +/- 0,11	0,98 +/- 0,15
Glycerat	1,06 +/- 0,14	0,70 +/- 0,03 *	1,00 +/- 0,06	0,98 +/- 0,11
Glycolat	1,02 +/- 0,02	1,42 +/- 0,32	1,03 +/- 0,06	1,27 +/- 0,06 *
Glyoxylat	0,70 +/- 0,05 *	1,21 +/- 0,09	0,92 +/- 0,13	1,48 +/- 0,22
Homoprolin	5,62 +/- 0,28 *	7,64 +/- 0,33 *	10,6 +/- 0,45 *	9,95 +/- 1,58 *
Malat	2,24 +/- 0,12 *	1,20 +/- 0,04	1,26 +/- 0,03	0,69 +/- 0,03 *
Malonat	1,36 +/- 0,08 *	1,45 +/- 0,07 *	1,71 +/- 0,15 *	1,98 +/- 0,15 *
Nicotinat	0,74 +/- 0,04 *	0,81 +/- 0,02	0,98 +/- 0,06	1,05 +/- 0,07
6-hydroxy-Nicotinat	1,05 +/- 0,09	1,09 +/- 0,07	1,37 +/- 0,04 *	1,40 +/- 0,11 *
Oxalat	0,89 +/- 0,05	1,19 +/- 0,10	1,45 +/- 0,05 *	1,49 +/- 0,11 *
Picolinat	0,85 +/- 0,07	1,11 +/- 0,08	1,20 +/- 0,04 *	1,47 +/- 0,26
Pyroglutamat	0,79 +/- 0,07	0,88 +/- 0,02	1,05 +/- 0,05	1,06 +/- 0,05
Pyruvat	0,69 +/- 0,06 *	0,92 +/- 0,08	0,43 +/- 0,03	0,90 +/- 0,13
Ribonat	0,81 +/- 0,04 *	0,88 +/- 0,03	0,84 +/- 0,03 *	1,27 +/- 0,09
Saccharat (Glukarat)	0,89 +/- 0,08	1,02 +/- 0,02	3,07 +/- 0,13 *	2,74 +/- 0,18 *
Salicylsäure	5,67 +/- 0,33 *	11,7 +/- 0,25 *	8,14 +/- 0,49 *	8,70 +/- 0,32 *
Succinat	1,76 +/- 0,14 *	1,36 +/- 0,34	1,21 +/- 0,05	1,23 +/- 0,09
Threonat	0,89 +/- 0,06	0,90 +/- 0,04	1,10 +/- 0,04	0,98 +/- 0,06
Threonolacton	0,68 +/- 0,05 *	0,85 +/- 0,03	0,98 +/- 0,05	0,92 +/- 0,07
Urat	0,59 +/- 0,05 *	0,65 +/- 0,07	1,14 +/- 0,10	1,07 +/- 0,08

Verschiedenes

Ethanolamin	0,85 +/- 0,10	1,12 +/- 0,13	1,37 +/- 0,20	1,48 +/- 0,24
2-amino-2-deoxy-Glukose	0,76 +/- 0,05 *	0,91 +/- 0,03	1,08 +/- 0,11	1,14 +/- 0,03
N-acetyl-Glucosamin	0,49 +/- 0,05 *	0,72 +/- 0,11	2,02 +/- 0,25 *	1,59 +/- 0,15
Guanidin	0,85 +/- 0,10	0,90 +/- 0,12	2,42 +/- 0,58	1,26 +/- 0,16
Guanin	4,16 +/- 0,65 *	3,46 +/- 0,36 *	28,2 +/- 2,83 *	38,1 +/- 1,36 *
N-acetyl-Mannosamin	0,84 +/- 0,03	0,92 +/- 0,04	0,74 +/- 0,05 *	0,92 +/- 0,03
Phosphat	1,23 +/- 0,06 *	1,39 +/- 0,07 *	1,83 +/- 0,08 *	1,78 +/- 0,02 *
Salicin	0,32 +/- 0,01 *	0,52 +/- 0,07 *	0,48 +/- 0,04 *	0,75 +/- 0,08
Salicylat-glucoopyranosid	11,8 +/- 0,87 *	10,8 +/- 0,42 *	27,2 +/- 0,97 *	30,8 +/- 1,07 *
Secologanin	0,45 +/- 0,03 *	0,45 +/- 0,02 *	0,65 +/- 0,07 *	0,61 +/- 0,04 *
Valero-1,5-lactam	0,46 +/- 0,04 *	0,56 +/- 0,01 *	0,73 +/- 0,04 *	0,83 +/- 0,07

6.2 Änderungen im Stoffwechsel



Anhang Abb.1: Stoffwechselwege farbcodiert

Dargestellt sind alle gemessenen Metabolite im Stoffwechsel von 7 Tage alten, induzierten amiR-SNF4 Keimlingen („I“) im Vergleich zur Kontrolle („K“). Die Keimlinge wurden bei zwei verschiedenen Lichtintensitäten (10 μ E und 50 μ E) angezogen. Des Weiteren wurden einige Keimlinge zusätzlich mit 1% Saccharose gefüttert. Geerntet wurde an zwei Zeitpunkten: Ende der Nacht („EN“) und Ende des Tages („ET“). Gemessen wurde per GC-TOF-MS bzw. LC-MS/MS oder enzymatischen Assays. Für die statistische Analyse wurde ein Student's t-Test (Kontrolle gegen induzierte amiR-SNF4 Linie; n = 5; p < 0,05) verwendet. Signifikante Änderungen sind farblich markiert.

Danksagungen

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Geigenberger ganz herzlich danken, dass er mir die Möglichkeit gab diese Arbeit unter seiner Anleitung zu schreiben. Ganz besonders möchte ich Ihm für sein Vertrauen und seine Unterstützung danken, die mir auch in schwierigen Zeiten immer das Gefühl gab, dass ich diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss bringen kann.

Ganz herzlich danken will ich auch allen momentanen und früheren Mitgliedern der AG Geigenberger. Ohne Euch wäre diese Zeit nicht einmal halb so schön gewesen. Nicht nur die Wiesensuche, das Badmintonspielen, die Grillfeste und die vielen kleinen, lustigen Aktionen werden mir immer in Erinnerung bleiben. Auch die langen, immer spannenden Diskussionen im Büro und im Labor haben einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Vielen Dank für insgesamt mehr als vier tolle, abwechslungsreiche und immer freundschaftliche Jahre!

Außerdem möchte ich meinen Kooperationspartner bei diesem Projekt vielfach danken. Prof. Csaba Koncz (MPI für Pflanzengzüchtungsforschung in Köln) und Dr. Marta Bitrian (Universität Strassburg, früher MPI Köln) sind Mittragssteller bei diesem Projekt und haben die transgenen Linien entwickelt. Außerdem möchte ich Ihnen für die freundliche Aufnahme während meines zweiwöchigen Aufenthalts in Köln und ihre Ratschläge danken. Des Weiteren danke ich sehr herzlich Dr. Martin Lehmann (LMU München) und Jennifer Lindstadt für die Bereitstellung und die Unterstützung bei den HPLC und GC-TOF-MS Messungen. Ohne sie wäre ich an unserer alten HPLC wohl verzweifelt.

Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten AG Leister für die gute Nachbarschaft und die unkomplizierte Hilfe, wann immer sie nötig war.

Ich möchte meinem „TAC“ (Thesis Advisory Committee) Prof. Peter Geigenberger, Prof. Ute Vothknecht und PD Dr. Tatjana Kleine für ihre fachliche Unterstützung und ihre hilfreichen Tipps während unserer Treffen herzlich danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Life Science Munich (LSM) für die herzliche Aufnahme und die vielen tollen Eindrücke und Erfahrungen bedanken.

Schließlich möchte ich mich noch bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben, bei meiner Familie und meinen Freunden, für ihre immerwährende und uneingeschränkte Unterstützung bedanken. Ganz besonderes gilt dies für meine Frau Daniela, meine Eltern und meine Schwestern. Ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen. Diese Dissertation liegt weder ganz, noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vor.

München, den 11.08.2016

Martin Gäsheimer

Statutory declaration

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared (re)sources. As well I declare, that I have not submitted a dissertation without success and not passed the oral exam. The present dissertation (neither the entire dissertation nor parts of it) has not been presented to another examination board.

Munich, 11.08.2016

Martin Gäsheimer