

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften
Abteilung Pflanzliche Stoffwechselphysiologie

Masterarbeit

**„Untersuchungen der Auswirkungen der subzellulären
Lokalisation von SnRK1 auf die Anthocyanbildung und
Hochlicht-Akklimatisierung von *Arabidopsis thaliana*“**

Helen Landgraf

geboren am 17.10.1997 in Halle (Saale)

Eingereicht am: 24.07.2024

Erstgutachter:

Jun.-Prof. Dr. Andreas S. Richter

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften

AG Pflanzliche Stoffwechselphysiologie

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Martin Hagemann

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften

AG Pflanzenphysiologie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Anthocyane und ihre Bedeutung.....	1
1.2 Signaltransduktion und Aktivierung der Flavonoidbiosynthese während der HL-Akklimatisierung	2
1.3 Biosyntheseweg und Regulation der Flavonoidbiosynthese.....	4
1.4 SnRK1 spielt wesentliche Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase.....	6
1.5 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	12
2.2 Bestimmung des Anthocyangehalts.....	13
2.3 Quantifizierung von Stärke.....	13
2.4 Analyse löslicher Zucker mittels Gaschromatographie (GC).....	15
2.5 Untersuchungen der Genexpression	15
2.5.1 RNA-Isolation	15
2.5.2 cDNA-Synthese.....	16
2.5.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	17
2.5.4 RNA-Seq	20
2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.6.1 Protein-Isolation	21
2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	21
2.6.3 Western Blot.....	22
2.7 Probenaufbereitung für die Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	23
2.8 Analyse von Photosynthese-Parametern.....	25
2.8.1 Spektrophotometrische Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts	25
2.8.2 Fluoreszenz-Messungen (Pulse-Amplituden-Modulation).....	25

3	Ergebnisse	26
3.1	Charakterisierung der Mutanten mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation der SnRK1	26
3.2	Untersuchungen der Auswirkungen der differentiellen Lokalisation der SnRK1 im Zuge der HL-Akklimatisierung.....	29
3.2.1	Untersuchungen des Anthocyangehalts.....	29
3.2.2	Untersuchungen von Transkriptionsveränderungen der Flavonoidbiosynthese.....	31
3.2.3	Untersuchungen der Zuckergehalte als mögliches Signal.....	36
3.2.4	Auswirkungen der veränderten Zuckergehalte auf stoffwechselrelevante Metabolite.....	42
3.2.5	Auswirkungen auf die Photosynthese.....	46
3.3	Auswirkungen unterschiedlicher Zucker- & AS-Gehalte auf phänotypische Parameter.....	49
4	Diskussion	54
4.1	Charakterisierung der untersuchten Mutanten.....	54
4.2	Flavonoidbiosynthese durch differentielle, subzelluläre Lokalisation der SnRK1 unter HL nicht beeinflusst.....	55
4.3	Einfluss der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 auf Zucker- und AS-Stoffwechsel im Zuge der HL-Akklimatisierung	57
4.3.1	<i>NLSa1</i> zeigt erhöhten Zuckergehalt im HL.....	57
4.3.2	<i>βMYRa1</i> weist hohen AS- und OS-Gehalt auf	58
4.4	Globale Betrachtung von Wachstumsparametern.....	59
4.5	Ausblick.....	60
4.6	Fazit	61
	Danksagung.....	62
	Literaturverzeichnis	63
	Anhang.....	68
	Eidesstattliche Erklärung	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung der Flavonoidbiosynthese unter HL-Bedingungen	3
Abbildung 2: Überblick der Flavonoidbiosynthese.....	4
Abbildung 3: Regulation, Struktur und Funktion des heterotrimeren SnRK1-Komplexes...	7
Abbildung 4: Schematische Übersicht über die katalytische und regulatorische Domäne der α -Untereinheit von SnRK1	7
Abbildung 5: Phänotypische Gegenüberstellung der Blattformen der unterschiedlichen Mutanten	10
Abbildung 6: Gegenüberstellung der Blattphänotypen der verschiedenen Genotypen.....	26
Abbildung 7: Genexpression von <i>KIN10</i> und <i>KIN11</i> zum Ende der Nacht sowie unter HL-Bedingungen.....	27
Abbildung 8: Western Blot mit Anti-pAMPK und Anti-FLAG sowie Coomassie-Gel	28
Abbildung 9: Phänotypische Gegenüberstellung der Blattmorphologie und Anthocyanbildung zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL	30
Abbildung 10: Bestimmung des Anthocyangehalts zum EoN sowie nach 24 h HL	31
Abbildung 11: Änderungen der relativen Genexpression von Flavonoidbiosynthese-Genen unter HL-Bedingungen.....	32
Abbildung 12: Änderungen der relativen Genexpression der TFs <i>PAP1</i> und <i>MYBL2</i> unter HL-Bedingungen	33
Abbildung 13: Änderungen der relativen Genexpression von <i>SEN1</i> und <i>DIN6</i> unter HL-Bedingungen.....	34
Abbildung 14: Principal component analysis (PCA) der RNA-Seq	35
Abbildung 15: Bestimmung der Zuckergehalte Fructose, Glucose und Saccharose unter HL-Bedingungen mittels GC-Analyse	37
Abbildung 16: Änderungen der relativen Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten, cytosolischen Genen unter HL-Bedingungen.....	39
Abbildung 17: Änderungen der relativen Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten, plastidären Genen unter HL-Bedingungen	40
Abbildung 18: Bestimmung des Stärkegehalts zum Ende der Nacht sowie unter HL-Bedingungen.....	41
Abbildung 19: Gesamtgehalt der AS der verschiedenen Genotypen im Zuge der HL-Akklimatisierung	42
Abbildung 20: Prozentuale Verteilung der AS nach 8 h HL.....	43

Abbildung 21: Gesamtgehalt ausgewählter OS des Citratzyklus der verschiedenen Genotypen im Zuge der HL-Akklimatisierung	44
Abbildung 22: Prozentuale Verteilung ausgewählter OS des Citratzyklus nach 8 h HL	45
Abbildung 23: Bestimmung des Gehalts von Chlorophyll a, - b und der Carotinoide zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL	46
Abbildung 24: Bestimmung verschiedener Photosyntheseparameter mittels PAM-Messungen zum Ende der Nacht, nach 24 h HL sowie unter Normalbedingungen	48
Abbildung 25: Gegenüberstellung der Trockenmasse, Frischmasse sowie deren Verhältnis und dem Rosettendurchmesser	50
Abbildung 26: Vergleich der Blütenstände der Genotypen	51
Abbildung 27: Blühzeitpunkt der unterschiedlichen Genotypen	52
Abbildung 28: Violin-Plot der Samenverteilung der verschiedenen Genotypen	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Genotypen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
Tabelle 2: Zusammensetzung der Standardkalibrierungskurve verschiedener Glucosekonzentrationen	14
Tabelle 3: Zusammensetzung der drei Reaktionsmixe für die cDNA-Synthese	16
Tabelle 4: PCR-Programm und Ablauf der cDNA-Synthese	17
Tabelle 5: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.....	18
Tabelle 6: qPCR-Programm.....	18
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer für die qPCR.....	18
Tabelle 8: Zusammensetzung für vier Gele der SDS-PAGE	22
Tabelle 9: Verwendete Standards für die LC-MS/MS	24
Tabelle 10: Spektrophotometrische Chlorophyll- und Carotinoidbestimmung.....	25

Abkürzungsverzeichnis

3-PGA - 3-Phosphoglycerat

A - Absorption

Abb. - Abbildung

ABG - Anthocyanbiosynthese-Gene

ADP - Adenosindiphosphat

AMP - Adenosinmonophosphat

AMPK - Animal AMP-activated kinase

AS - Aminosäure

ATP - Adenosintriphosphat

bHLH - basic helix loop-helix

CBB - Calvin-Benson-Bassham-Zyklus

CBM - Kohlenhydrat-bindendes Modul

CBS - Cystathionin- β -Synthase

Chl - Chlorophyll

CHS - Chalkon-Synthase

CO₂ - Kohlenstoffdioxid

Col-0 - Columbia-0 Wildtyp *Arabidopsis thaliana*

DEPC-H₂O - Diethylpyrocarbonat behandeltes, deionisiertes Wasser

DF - Dilution factor (Verdünnungsfaktor)

DFR - Dihydroflavonol-Reduktase

DIN6 - Dark inducible 6

EBG - Frühe (early) Biosynthese-Gene

EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure

EoN - End of the night (Ende der Nacht)

ExV - Extraktionsvolumen

FM - Frischmasse

GC - Gaschromatographie

Glc-6-P - Glucose-6-Phosphat

HL - High-light (Starklicht)

HPLC - High Pressure Liquid Chromatography

HRP - Horseradish Peroxidase

IT - Interner Standard
LBG - Late biosynthetic genes
LC-MS/MS - Flüssigkeitchromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LDOX - Leucocyanidin-Dioxygenase
MBW - MYB-bHLH-WD40-Komplex
MES - 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MSTFA - N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
NPQ - Nicht-Photochemisches Quenching
OS - Organische Säuren
PAM - Pulse-Amplituden-Modulation
PCA - Principal component analysis
PCR - Polymerase-Kettenreaktion
PS - Photosynthese
PVDF - Polyvinylidenfluorid
qPCR - Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RT - Reverse Transkriptase
RuBisCO - Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
SDS - Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SEN1 - Senescence-associated gene 1
SNF1 - Sucrose Non-Fermenting 1 kinase
SnRK1 - SNF1-related kinase 1
SV40 - Simian-Virus 40
Tab. - Tabelle
TBS(-T) - Tris-buffered saline (-Tween 20)
TBE - Tris-Borat-EDTA
TF - Transkriptionsfaktor
TM - Trockenmasse
T6P - Trehalose-6-Phosphat
TP - Triosephosphat
TPT - Triosephosphat-Phosphat-Translokator

Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase in Pflanzen, während des Wachstums und der Entwicklung sowie bei sich verändernden Umweltbedingungen, wird durch eine hochkonservierte Proteinkinase, die Sucrose Non-Fermenting-1-related Proteinkinase (SnRK1), ermöglicht. Die SnRK1 fungiert als zellulärer Energiesensor und integriert ein Energie-Signal in eine posttranslationale und transkriptionelle Antwort. In Pflanzen wird die SnRK1 durch hohe Zuckergehalte inaktiviert und aktiviert, wenn der energetische Status der Zelle gering ist (wenig Zucker), z. B. unter Stressbedingungen, die die Photosynthese einschränken. Zur Mobilisierung alternativer Energiequellen werden energieaufwändige Prozesse (Anabolismus) durch die SnRK1 inhibiert und Gene kataboler Reaktionen, wie z. B. Stärke- und Aminosäure-Abbau, aktiviert. Die SnRK1 fungiert als heterotrimerer Komplex mit einer katalytischen α -Untereinheit, die in Arabidopsis durch zwei Gene kodiert wird, und regulatorischen β - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Aktuelle Studien zeigten, dass die katalytische α -Untereinheit von SnRK1 eine unabhängige Aktivität von der regulatorischen Untereinheit zeigt und das letztere die Lokalisierung der α -Untereinheit, lokalisiert im Zellkern oder Cytosol, steuert (Ramon *et al.*, 2019).

Die Untersuchungen dieser Arbeiten zeigten, dass die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 einen Einfluss auf eine Reihe von stoffwechsel- und wachstums-spezifischen Parametern hat. Die differentielle Lokalisation zeigte Auswirkungen auf die Zuckerbiosynthese sowie die Aminosäure-Synthese und die Synthese organischer Säuren unter Starklicht. Eine Mutante, die die katalytische α -Untereinheit mit exklusiver Zellkern-lokalisierung (*NLS α 1*) bildet, wies einen erhöhten Zuckergehalt und einen niedrigen Gehalt an Aminosäuren im Vergleich zu Kontrollpflanzen unter Starklicht auf. Des Weiteren zeigten die Pflanzen der *NLS α 1*-Linie eine verstärkte Akkumulation von Biomasse, was in einem größeren Gehalt an Trockenmasse, einem größeren Rosettendurchmesser sowie einer früheren Blüte im Vergleich zum Wildtyp resultierte. Die Mutante *β MYR α 1* hingegen, deren α -Untereinheit im Cytosol lokalisiert ist, wies einen niedrigen Zuckergehalt sowie einen erhöhten Aminosäuregehalt unter Starklicht und einen erhöhten Gehalt an organischen Säuren bereits zum Ende der Nacht sowie unter Starklicht im Vergleich zum Wildtyp auf. Das Wachstum der Pflanzen der *β MYR α 1*-Linie erschien im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt, was sich in einer geringeren Trockenmasse und einer verspäteten Blüte ausdrückte. Die Lokalisierung der α -Untereinheit, unabhängig ob im Zellkern oder im Cytosol lokalisiert, zeigte eine hemmende Wirkung auf die Anthocyanbiosynthese. Lichtabhängige

Photosyntheseparameter wurden weder unter Normalbedingungen noch im Zuge der Akklimatisierung an Starklicht von der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit der SnRK1 beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Masterarbeit weisen auf die entscheidende Rolle der Lokalisierung der katalytischen α -Untereinheit der SnRK1 bei der Regulation der pflanzlichen Energiehomöostase sowie im Zuge der Anpassungen an Stressbedingungen hin. Gleichzeitig zeigt die differentielle Lokalisierung der α -Untereinheit im Zellkern durch einen gesteigerten Zuckergehalt sowie eine erhöhte Wachstumsrate eine ökonomische Relevanz, die zukünftig in landwirtschaftlich bedeutenden Anbaupflanzen, wie der Zuckerrübe, zu einer gesteigerten Ertragsausbeute führen könnte.

1 Einleitung

1.1 Anthocyane und ihre Bedeutung

Pflanzen stellen nicht nur die Nahrungsgrundlage für Menschen und Tiere dar, sie ermöglichen durch die Produktion von Sauerstoff auch das Leben auf der Erde. Im Gegensatz zum Großteil der Tiere sind Pflanzen sessil, das heißt, sie können sich nicht fortbewegen und sind an ihren Standort gebunden. Dies stellt sie vor große Herausforderungen: Sie müssen nicht nur die Energiehomöostase während des Wachstums und der Entwicklung aufrechterhalten, sondern sich auch kontinuierlich an sich verändernde Umweltbedingungen und die Verfügbarkeit von Ressourcen anpassen. Um plötzlichen Umweltveränderungen, wie biotischen und abiotischen Stressfaktoren, standhalten zu können, haben Pflanzen spezifische Mechanismen entwickelt. Diese meist reversiblen physiologischen Anpassungen werden auch als Akklimatisierung bezeichnet. Zu den abiotischen Stressfaktoren gehören unter anderem hohe Konzentrationen von Schwermetallen (z. B. Cadmium, Kupfer, Chrom) und hohe Salzgehalte im Boden sowie Dürre, extreme Temperaturen und hohe Lichtintensitäten (Kadereit *et al.*, 2021). Neben anderen Vorgängen und Mechanismen beinhaltet die Akklimatisierung an hohe Lichtintensitäten eine schnelle transkriptionelle Aktivierung der Flavonoidbiosynthese. Dadurch werden photoprotektive und antioxidative Flavonoide, wie Flavonole und Anthocyane, in den Blattgeweben angereichert (Araguirang & Richter, 2022).

Anthocyane, und andere Flavonoide, sind spezialisierte Pflanzenstoffe, die eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Pflanze an Starklicht (high light, HL) spielen. Sie werden im Rahmen der Flavonoidbiosynthese gebildet, bei der die Aminosäure (AS) Phenylalanin den Ausgangsstoff darstellt (Liu *et al.*, 2021). In der Pflanze haben Anthocyane eine Reihe unterschiedlicher und wichtiger Funktionen. Zum einen sind sie für die Färbung von Geweben und Organen unerlässlich, um Insekten und andere Tiere zur Bestäubung anzulocken. Zum anderen spielen sie eine entscheidende Rolle als Schutzfunktion vor starker Licht- und UV-Bestrahlung und können freie Radikale im Pflanzensaft binden, die bei oxidativem Stress entstehen (Araguirang & Richter, 2022).

1.2 Signaltransduktion und Aktivierung der Flavonoidbiosynthese während der HL-Akklimatisierung

Die Flavonoidbiosynthese ist ein lichtaktivierter Stoffwechselweg für dessen Produkte eine Schutzfunktion unter Stressbedingungen postuliert wird. Wie wird die Flavonoidbiosynthese unter einem abiotischen Stressfaktor wie HL aktiviert und reguliert?

Chloroplasten sind für die Pflanze lebenswichtige Zellorganellen, da bei der dort stattfindenden Photosynthese (PS), Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt wird. Allerdings spielen Chloroplasten auch eine essenzielle Rolle bei der Veränderung der Genexpression im Zellkern als Reaktion auf äußere Stressfaktoren. Sie fungieren dabei als Sensor für Veränderungen in der Umwelt und als Signalgeber zur Anpassung der Genexpression. Dies wird auch als „Retrograde Signalübertragung“ bezeichnet (Chan *et al.*, 2016). Basierend auf experimentellen Ergebnissen, wurde für die Aktivierung der Flavonoidbiosynthese ein neuer Regulationsmechanismus vorgeschlagen. Bis zu einer speziesspezifischen Lichtintensität, steigt unter HL-Bedingungen die PS-Aktivität in den Chloroplasten, was folglich dazu führt, dass eine größere Menge Kohlenstoffdioxid (CO₂) im Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB) mit Hilfe des Schlüsselenzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RuBisCO) fixiert werden kann. Dabei entsteht mehr 3-Phosphoglycerat (3-PGA), welches durch die Reduktion im CBB in größerem Umfang Triosephosphat (TP) freisetzt. Dieses wird daraufhin mit Hilfe des Triosephosphat-Phosphat-Translokators (TPT) aus dem Chloroplasten in das Cytosol exportiert. Dort erfolgt die Wahrnehmung und Weiterleitung des (metabolischen) Signals zur Aktivierung der Flavonoidbiosynthese (Abb. 1).

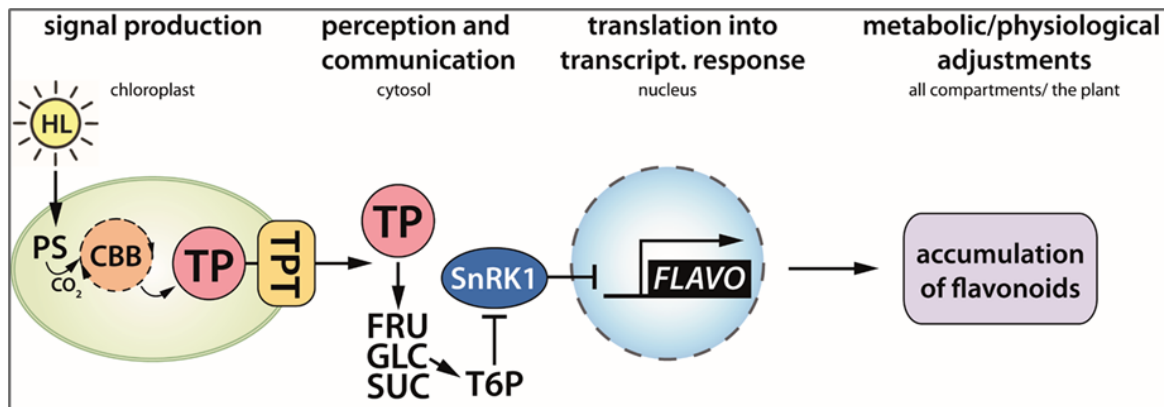


Abbildung 1: Aktivierung der Flavonoidbiosynthese unter HL-Bedingungen

In der Abbildung ist die retrograde Signalübertragung sowie die Aktivierung der Flavonoidbiosynthese unter HL-Bedingungen veranschaulicht. Dargestellt ist die Produktion des Signals im Chloroplasten, die Wahrnehmung und Vermittlung des Signals im Cytosol, die Übersetzung des Signals in eine transkriptionelle Antwort im Nukleus sowie die metabolische und physiologische Anpassung der Pflanze als Antwort auf die sich verändernde Umweltbedingung. Die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen stehen für: HL - high light (Starklicht), PS - Photosynthese, CBB - Calvin-Benson-Bassham-Zyklus, TP - Triosephosphat, TPT - Triosephosphat-Phosphat-Translokator, FRU - Fructose, GLC - Glucose, SUC - Saccharose, T6P - Trehalose-6-phosphat, SnRK1 - Sucrose Non-Fermenting-1-related Proteinkinase (Richter 2022, unveröffentlicht).

Durch die Umwandlung von TP in Zucker wie Saccharose steigt der Zuckergehalt in der Zelle. Die Wahrnehmung des veränderten Zuckergehalts in der Zelle erfolgt durch die zeitlich gesteigerte Bildung von regulatorischen Zuckerphosphaten, wie dem Trehalose-6-Phosphat (T6P). T6P fungiert als regulatorisches Intermediat und wird durch die Sucrose Non-Fermenting-1-related Proteinkinase (SnRK1) wahrgenommen, was zu einer Veränderung der SnRK1-Aktivität führt (Abb. 1). Unter Stressbedingungen und Energiemangel reprimiert die SnRK1 energieaufwändige Prozesse und aktiviert Gene für katabolische Reaktionen, um alternative Energiequellen zu mobilisieren, zum Beispiel durch den Abbau von Stärke. Ein hoher Zuckergehalt bzw. der hohe Gehalt an T6P führt zu einer Inaktivierung der SnRK1 (Nunes *et al.*, 2013; Toroser *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Es wird postuliert, dass die Inaktivierung der SnRK1 durch erhöhte Zuckergehalte im HL zur transkriptionellen Aktivierung der Flavonoidbiosynthese und folglich zur Akkumulation von Flavonoiden unter HL-Bedingungen führt (Araguirang & Richter, 2022). Neben der Flavonoidbiosynthese wirkt sich die SnRK1 auch noch auf eine Reihe anderer Gene (Abschnitt 1.4), die im Rahmen der HL-Anpassung reguliert werden müssen, aus (Zirngibl *et al.*, 2023).

1.3 Biosyntheseweg und Regulation der Flavonoidbiosynthese

Anthocyane, sowie andere Flavonoide, werden im Zuge der Flavonoidbiosynthese ausgehend vom Primärmetabolismus (Aminosäuren, hier: Phenylalanin) synthetisiert. Der Stoffwechselweg verzweigt sich unter anderem in die Flavonol- und Anthocyanbiosynthese, wobei zunächst durch Enzyme wie der Chalkon-Synthase (CHS) über mehrere Syntheseschritte Dihydroflavonol gebildet wird (Abb. 2). Anschließend werden aus Dihydroflavonol mit Hilfe der Dihydroflavonol-Reduktase (DFR) und der Leucocyanidin-Dioxygenase (LDOX) sowie spezifischen Methyl-, Acyl- und Glykosyl-Transferasen (MT, AT, GT) Anthocyane gebildet, die weiter in die Vakuolen transportiert werden (Araguirang & Richter, 2022; Dieckmann *et al.*, 2024; Saito *et al.*, 2013).

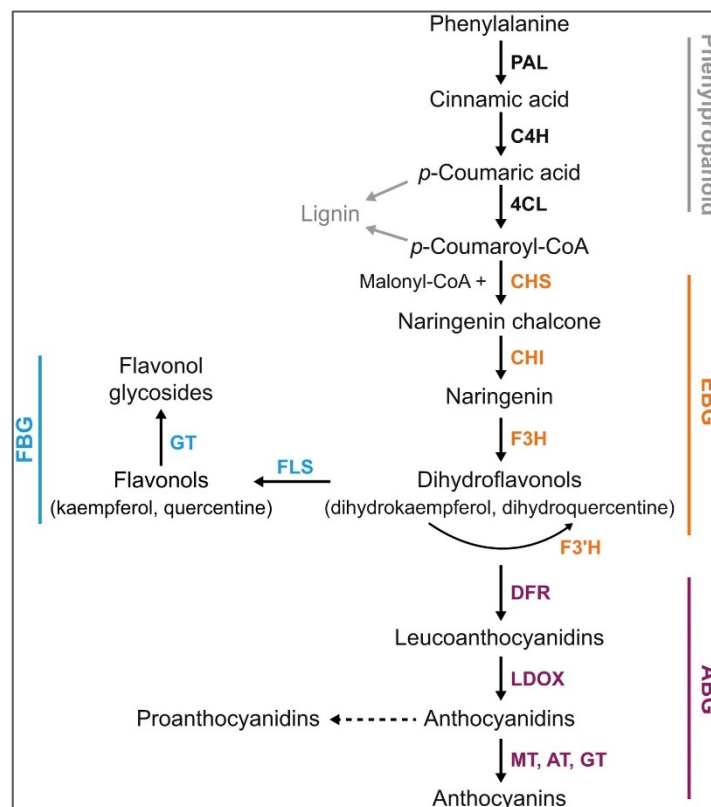


Abbildung 2: Überblick der Flavonoidbiosynthese

Dargestellt sind wichtige biochemische Reaktionen der Flavonoidbiosynthese, mit Fokus auf der Flavonol- und Anthocyanbiosynthese. Aus der Aminosäure Phenylalanin wird über mehrere enzymatische Schritte Dihydroflavonol gebildet. Ausgehend von Dihydroflavonol verzweigt sich der Biosyntheseweg, und Flavonole oder über mehrere Schritte Anthocyane werden synthetisiert. Die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen stehen für: EBG - Frühe (early) Biosynthese-Gene, ABG - Anthocyanbiosynthese-Gene, FBG - Flavonolbiosynthese-Gene, PAL - Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H - Zimtsäure-4-Hydroxylase, 4CL - 4-Coumaroyl-CoA-Ligase, CHS - Chalkon-Synthase, CHI - Chalkon-Isomerase, F3H - Flavanon-3-Hydroxylase, F3'H - Flavonoid-3'-Hydroxylase, FLS - Flavonol-Synthase, DFR - Dihydroflavonol-Reduktase, LDOX - Leucocyanidin-Dioxygenase, MT - Methyl-Transferase, AT - Acyl-Transferase, GT - Glycosyl-Transferase (Araguirang & Richter, 2022).

Die verschiedenen Zweige der Flavonoidbiosynthese werden auf transkriptioneller Ebene als Teil der Akklimatisierungsreaktion bei HL-Bedingungen aktiviert (Garcia-Molina *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2019). Dabei sind mehrere negative und positive Transkriptionsfaktoren (TFs) an der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Expression von Biosyntheseegenen beteiligt. Beispielsweise ist in Arabidopsis eine Untergruppe sogenannter MYB-TFs an der Aktivierung des Zweigs der Anthocyanbiosynthese beteiligt. Diese werden von *MYB75*, *MYB90*, *MYB113* und *MYB114* kodiert (Baena-González *et al.*, 2007; Borevitz *et al.*, 2000). Diese MYB-TFs interagieren mit „basic helix loop-helix“ (bHLH)-TFs und bilden zusammen mit einem WD40-Protein (Transparent Testa Glabra 1) den ternären MYB-bHLH-WD40 (MBW) Komplex (LaFountain & Yuan, 2021; Li, 2014). Der MBW-Komplex wirkt sich positiv auf die Anthocyanbiosynthese, im speziellen die Expression von *DFR* und *LDOX*, als auch auf frühere Schritte der Flavonoidbiosynthese, wie z. B. die Expression von *CHS*, aus (Nakabayashi *et al.*, 2014; Tohge *et al.*, 2005). Einer der hierbei wichtigsten TFs für die positive Kontrolle der Flavonoidbiosynthese des MBWs ist „PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1“ (*PAP1*), welcher durch *MYB75* kodiert wird (Borevitz *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2019). Eine negative Kontrolle der Flavonoidbiosynthese findet z. B. durch die Repression des MBW-Komplexes statt. Beispielsweise interagiert der TF MYB-like 2 (*MYBL2*) mit *PAP1*, bindet folglich an den MBW-Komplex und unterdrückt dadurch dessen Aktivität (Dubos *et al.*, 2008; Matsui *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016). Unter HL-Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PAP1* gesteigert und die Expression von *MYBL2* gehemmt wurde, was einhergeht mit der Akklimatisierung unter HL und der verstärkten Anthocyanbiosynthese (Dubos *et al.*, 2008; Lotkowska *et al.*, 2015). Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, spielt die SnRK1, deren katalytische Untereinheiten durch *KIN10* und *KIN11* kodiert werden, eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Anthocyanbiosynthese unter HL (Baena-González *et al.*, 2007; Zirngibl *et al.*, 2023). Durch posttranslationale Mechanismen, wie Phosphorylierungen, dem Wechsel zwischen Cytosol und Zellkern sowie dem Abbau von Komponenten des MBW-Komplexes, wie z. B. *PAP1*, wirkt sich die SnRK1 auf die Anthocyanbiosynthese aus (Broucke *et al.*, 2023). Dass SnRK1 einen Einfluss auf die Expression von Flavonoidbiosynthese-Genen sowie TFs hat, wurde auch durch die Überexpression der katalytischen Untereinheit *KIN10* und somit einem Überschuss an aktiver SnRK1 gezeigt, die die Expression von *PAP1* unterdrückt und gleichzeitig eine gesteigerte Bildung von *MYBL2* bewirkt (Broucke *et al.*, 2023; Ramon *et al.*, 2019; Zirngibl *et al.*, 2023). Jüngste Studien zeigen, dass durch die ektopische Expression von *PAP1* in Gegenwart von aktiver SnRK1 die verminderte Aktivierung der Anthocyan-

biosynthese umgangen werden kann und SnRK1 folglich stromaufwärts von PAP1 agieren muss. Stromabwärts gerichtete Faktoren müssen jedoch noch identifiziert werden (Dieckmann *et al.*, 2024).

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit soll auf der SnRK1 liegen, die als Mediator durch die Wahrnehmung eines metabolischen (Zucker-)Signals im Cytosol und die Weiterleitung an den Nukleus agiert und somit eine entscheidende Rolle bei der Akklimatisierung unter HL-Bedingungen spielt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von SnRK1 eine Voraussetzung für die Aktivierung der Anthocyanbiosynthese während der HL-Akklimatisierung ist (Zirngibl *et al.*, 2023). Was ist bisher über den Aufbau und die Funktion dieser essenziellen Kinase bekannt und welche Rolle spielt sie für den Energiestoffwechsel in Pflanzen?

1.4 SnRK1 spielt wesentliche Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase

Die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase in eukaryotischen Organismen, während Wachstum und Entwicklung sowie bei sich verändernden Umweltbedingungen, wird durch hochkonservierte Proteinkinasen ermöglicht, die als zelluläre Energiesensoren fungieren. Sie aktivieren katabole Reaktionen und inhibieren, bei limitierter Energieversorgung, anabole energieverbrauchende Prozesse. In Säugetieren übernimmt dies die AMP-aktivierte Kinase (AMPK), während in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) die Sucrose Non-Fermenting 1 Kinase (SNF1) als zellulärer Energiesensor dient. In Pflanzen spricht man von der SNF1-related Kinase 1 (SnRK1). Diese miteinander verwandten Proteinkinasen werden als Antwort auf den zellulären Energiestatus (AMP- oder T6P-Gehalt) reguliert und integrieren das Energie-Signal in eine posttranslationale und transkriptionelle Antwort (Broeckx *et al.*, 2016).

AMPK, SNF1 und SnRK1 sind in ihrer Funktion und Struktur hoch konserviert. Sie bestehen aus einem heterotrimeren Komplex mit einer katalytischen α -Untereinheit und regulatorischen β - und (β) γ -Untereinheiten (Emanuelle *et al.*, 2015; Ghillebert *et al.*, 2011; Hardie *et al.*, 2012; Hedbacker & Carlson, 2008; Polge & Thomas, 2007). In Abbildung 3 ist die Struktur des heterotrimeren SnRK1-Komplexes mit einem zusammenfassenden Überblick über die Regulation und Funktion dargestellt.

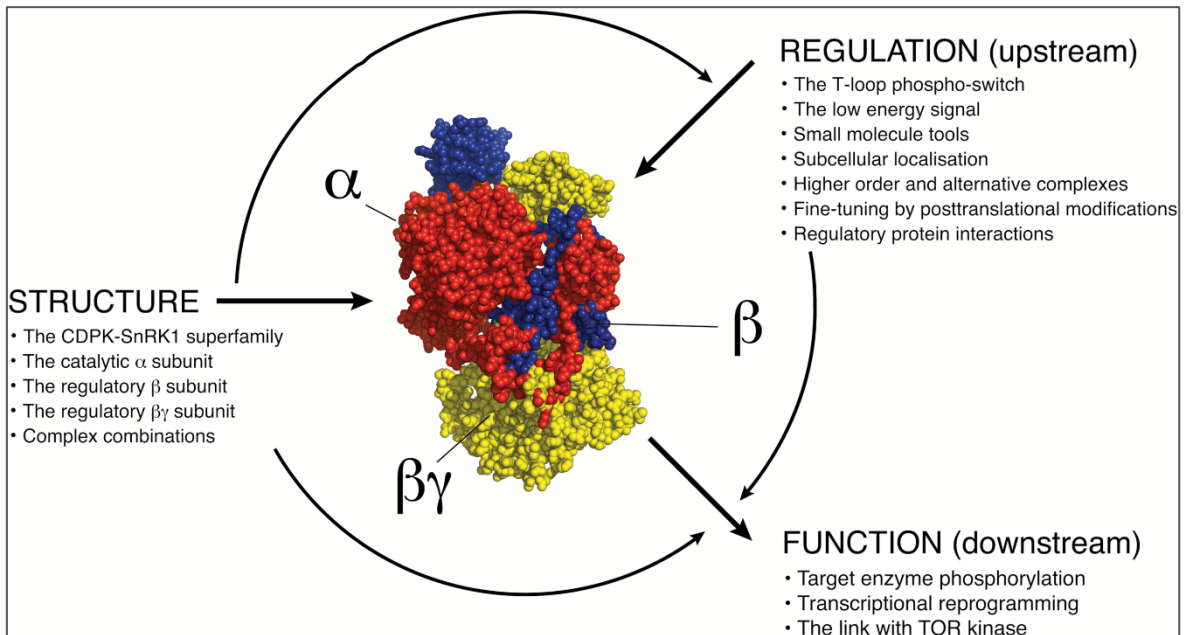


Abbildung 3: Regulation, Struktur und Funktion des heterotrimeren SnRK1-Komplexes

Dargestellt ist die heterotrimerische Komplexstruktur von SnRK1 mit der katalytischen α -Untereinheit (rot) und den regulatorischen Untereinheiten β (blau) und $\beta\gamma$ (gelb). Des Weiteren sind regulatorische Mechanismen sowie die Funktionen der SnRK1 aufgeführt (Broeckx *et al.*, 2016).

Die α -Untereinheit besteht aus einer hoch konservierten N-terminalen Ser/Thr-Kinase Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne, die die Interaktion mit der β - und ($\beta\gamma$)-Untereinheit vermittelt (Abb. 4). Des Weiteren ist die Phosphorylierung des T-Loops der Ser/Thr-Kinase Domäne essenziell für die Aktivität von AMPK, SNF1 und SnRK1 (Baena-González *et al.*, 2007; Estruch *et al.*, 1992; Hawley *et al.*, 1995).

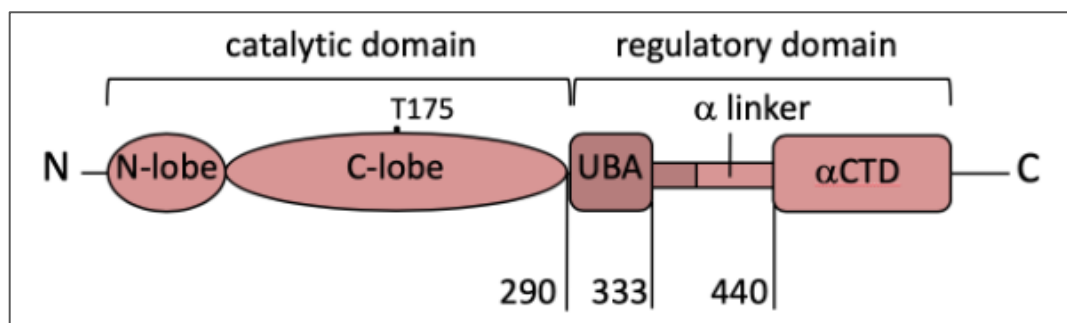


Abbildung 4: Schematische Übersicht über die katalytische und regulatorische Domäne der α -Untereinheit von SnRK1

Dargestellt ist die Domänenzusammensetzung der N-terminalen katalytischen Ser/Thr-Kinase Domäne sowie der C-terminalen regulatorischen Domäne der α -Untereinheit. Die Phosphorylierung des T-Loops ist mit T175 gekennzeichnet (Ramon *et al.*, 2019).

Die β -Untereinheiten dienen als Gerüst des Komplexes. Sie tragen zusätzlich zur Lokalisierung des Komplexes und zur Substratspezifität bei. Sie sind gekennzeichnet durch eine variable N-terminale Domäne, die typischerweise myristoyliert (MYR) ist, ein Kohlenhydrat-bindendes Modul (CBM) sowie eine C-terminale Domäne, die an die α - und

(β) γ -Untereinheiten bindet. Bei Pflanzen ist diese β -Untereinheit stark verkürzt, da der SnRK1 die gesamte N-terminale Verlängerung und das CBM fehlen (Broeckx *et al.*, 2016; Hardie *et al.*, 2012; Hedbacker & Carlson, 2008). Bei der tierischen γ -Untereinheit ist der N-Terminus mit einer Prä-Cystathionin β -Synthase (CBS)-Domäne mit vier CBS-Motiven verbunden, die die beiden Adenin-Nukleotid-bindenden Bateman-Domänen bilden (Kemp, 2004; Scott *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2011). Sie fungieren bei dem AMPK-Komplex als Energie erfassendes Modul. Pflanzen hingegen besitzen eine einzigartige, hybride $\beta\gamma$ -Untereinheit, die ein N-terminales CBM an die vier CBS enthaltene γ -Domäne rekrutiert hat (Emanuelle *et al.*, 2015; Gissot *et al.*, 2006; Lumbreras *et al.*, 2001; Polge & Thomas, 2007; Ramon *et al.*, 2013).

In Pflanzen ist die SnRK1 für die Phosphorylierung von vielen verschiedenen Proteinen sowohl für die metabolische Regulation als auch die Regulation der Genexpression verantwortlich. Zum einen hemmt sie posttranslational metabolische Reaktionen wie die Nitratreduktase oder die Saccharosebiosynthese durch die Hemmung der Saccharose-Phosphat-Synthase (Broucke *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2021). Zum anderem reguliert sie transkriptionell, wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben, TFs der Flavonoidbiosynthese sowie Gene für den Abbau von AS und Stärke (Araguirang & Richter, 2022; Broeckx *et al.*, 2016; Broucke *et al.*, 2023; Ramon *et al.*, 2019). Während bei AMPK und SNF1 die Regulation durch die Adenin-Nukleotid-Ladung reguliert wird, ist dies bei der pflanzlichen SnRK1 nicht der Fall. In Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass SnRK1 sowohl unempfindlich gegenüber AMP und ADP als auch resistent gegen die Dephosphorylierung des T-Loops durch Proteinphosphatasen *in vitro* ist. Dies macht die SnRK1 zu einem atypischen Vertreter der AMPK-Familie, da beispielsweise bei der AMPK AMP und ADP mit ATP um die Bindung an die CBS-Domäne konkurrieren und diese durch die Dephosphorylierung des T-Loops inaktiviert werden kann (Emanuelle *et al.*, 2015). Des Weiteren hemmen Zuckerphosphate wie Glucose-6-Phosphat (Glc-6-P) und T6P die pflanzliche SnRK1, was mit der generellen Bevorzugung von negativen Regulationsmechanismen in Pflanzen einhergeht (Nunes *et al.*, 2013; Toroser *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Zusammenfassend wird die SnRK1 durch hohe Zuckergehalte inaktiviert und aktiviert, wenn der energetische Status der Zelle gering ist (wenig Zucker), z. B. unter Stressbedingungen, um alternative Energiequellen durch die Inhibierung energieaufwändiger Prozesse und Aktivierung der Genexpression kataboler Reaktionen, wie z. B. Stärke- und AS-Abbau, bereitzustellen (Araguirang & Richter, 2022; Broeckx *et al.*, 2016; Broucke *et al.*, 2023; Ramon *et al.*, 2019). Folglich ist der Zuckerstoffwechsel

entscheidend bei der Regulation der SnRK1. Auf der anderen Seite reguliert die SnRK1 jedoch auch den Zuckerstoffwechsel. Die Saccharosebiosynthese wird gehemmt durch die Phosphorylierung der Saccharose-Phosphat-Synthase und an der Synthese beteiligten Genen (Broucke *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2021).

Es wurde festgestellt, dass die katalytische α -Untereinheit von SnRK1 eine unabhängige Aktivität von der regulatorischen β -Untereinheit zeigt und das letztere die Lokalisierung der α -Untereinheit steuert (Ramon *et al.*, 2019). Die β -Untereinheiten besitzen eine lange N-terminale Verlängerung mit einer Myristoylierungsstelle (N-MYR), die durch Anhängen eines Glycin-Rests für die Membranassoziation verantwortlich ist. Die Isolierung und anschließende Immunoblot-Analyse der Nukleus- und Cytoplasmafraktionen von Keimlingen mit spezifischen Antikörpern konnte zeigen, das endogenes WT-SnRK1 β 2 (β -Untereinheit) im Gegensatz zu SnRK1 α 1 nicht im Zellkern vorkommt (Ramon *et al.*, 2019).

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen Lokalisierung der α -Untereinheit auf die Funktion und Signalgebung der SnRK1 zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisierung von der Arbeitsgruppe Ramon *et al.* (2019) erzwungen und Zellkern- und Cytoplasmafraktionen isoliert. Dies geschah zum einen durch die N-terminale Anlagerung einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) des Simian-Virus 40 (SV40). Zum anderen konnte ein Ausschluss vom Zellkern durch das Anhängen eines sonst an der regulatorischen und membranassoziierten β -Untereinheit hängenden β MYR-Motivs erreicht werden. Anschließend konnte durch Experimente mit unterschiedlichen metabolischen Stressbedingungen, die zur Energieverarmung und folglich zur Aktivierung und Signalübertragung von SnRK1 führen, gezeigt werden, dass metabolischer Stress die nukleare Translokation der α -Untereinheit auslöst. Beispielsweise konnte in Dunkelheit durch die Untersuchung der Genexpression von *DARK INDUCIBLE 6 (DIN6)*, welches für eine Glutamin-abhängige Asparagin-Synthetase kodiert, ein durch SnRK1 gesteuerter signifikanter Anstieg der Expression und eine Anreicherung der α -Untereinheit im Zellkern, nicht jedoch bei der Cytoplasmafraktion, durch Immunoblot-Analysen festgestellt werden (Ramon *et al.*, 2019). Gleichzeitig untersuchte die Arbeitsgruppe von Ramon *et al.* (2019) auch die physiologische Bedeutung der Lokalisierung der α -Untereinheit von SnRK1 und erzeugte hierfür transgene Linien, die eindeutig markiertes Wildtyp-, Kern- oder Cytoplasmatisches SnRK1 α 1 in einem homozygoten *snrk1a1/snrk1a2 (kin10/kin11)* Doppel-Knockout-Mutantenhintergrund exprimierten (Material und Methoden 2.1) (Ramon *et al.*, 2019). Tatsächlich zeigten die unterschiedlichen transgenen Linien einen veränderten, auffälligen Phänotyp (Abb. 5).

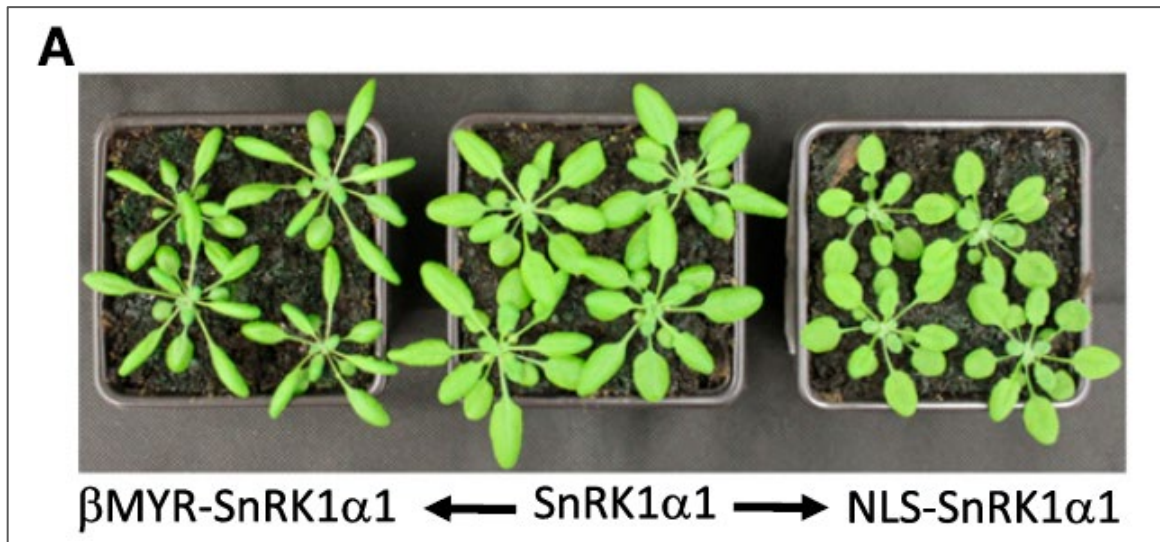


Abbildung 5: Phänotypische Gegenüberstellung der Blattformen der unterschiedlichen Mutanten

Zu sehen sind die auffälligen Blattformen von vier Wochen alten Pflanzen, die die Konstrukte der verschiedenen subzellulär lokalisierten SnRK1 α 1 enthielten. Auf der linken Seite sind Pflanzen dargestellt, deren α -Untereinheit im Cytoplasma lokalisiert ist. Auf der rechten Seite sind Pflanzen dargestellt, deren α -Untereinheit sich im Zellkern befindet (Ramon *et al.*, 2019).

Die Expression von NLS-SnRK1 α 1 im Nukleus führte zu einer runderen Blattform, während bei der im Cytoplasma lokalisierten α -Untereinheit (β MYR-SnRK1 α 1) schmalere Blätter mit einer starken Krümmung der Blattränder nach unten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (SnRK1 α 1-komplementiert) beobachtet wurden (Ramon *et al.*, 2019). Zur Vereinfachung werden im Folgenden die Genotypen mit *al* (Wildtyp-Gen), *NLSal* und *β MYRal* abgekürzt. Dies kann auch der Tabelle 1 im Abschnitt Material und Methoden entnommen werden.

Offen bleibt die Frage, inwiefern sich die differentielle Lokalisierung der SnRK1 unter Stressbedingungen auf verschiedene Funktionen während der Akklimatisierung auswirkt. Die Arbeitsgruppe von Ramon *et al.* (2019) konnte bereits zeigen, dass die Lokalisierung der α -Untereinheit eine entscheidende Rolle bei der Aktivität und Signalgebung der SnRK1 spielt und dass Stress, ausgelöst durch niedrige Energielevel, eine Translokation der α -Untereinheit in den Zellkern auslöst, wodurch die Expression von aktivierenden Zielgenen kontrolliert wird. So löst beispielsweise die SnRK1 auf transkriptioneller Ebene den Abbau von AS sowie Stärke aus. Aber ist dies auch möglich, wenn es zu einer erzwungenen differentielle Lokalisierung der α -Untereinheit kommt? Weisen diese Mutanten im Zuge der Akklimatisierung Unterschiede in ihren AS-, Zucker- und Stärkestoffwechsel auf und wirkt sich dies auf die Aktivität der SnRK1 aus, da die Aktivität vom Zuckergehalt im Cytosol abhängig ist? Werden vielleicht noch andere physiologische Parameter, wie z. B. die Photosynthese oder die Bildung von Anthocyanen, beeinflusst?

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die subzelluläre Lokalisation von SnRK1 eine Rolle für die Anthocyanbildung und die HL-Akklimatisierung spielt. Hierfür sollten Experimente mit Mutanten, deren SnRK1 α 1-Lokalisation sich ausschließlich auf den Nukleus (*NLS α 1*) oder das Cytosol (*β MYR α 1*) beschränkt, unter HL-Bedingungen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollten die Genotypen für unterschiedliche Zeiträume im HL exponiert und hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht werden. Die Quantifizierung der Anthocyangehalte sowie die gezielte Untersuchung der Flavonoidbiosynthese-Gene sollten dabei im Vordergrund stehen und Auskunft über den Zusammenhang zwischen SnRK1-Lokalisation und Aktivierung der Anthocyanbiosynthese geben. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen der differentiellen Lokalisierung der SnRK1 auf globale Genexpressionsveränderungen während der HL-Akklimatisierung mit Hilfe von Gesamt-mRNA-Sequenzierung untersucht werden. Da SnRK1 eine zentrale Komponente der Stoffwechselregulation ist, sollte zudem der Einfluss der SnRK1-Lokalisierung auf den Primärstoffwechsel näher untersucht werden. Abschließend sollten die phänotypisch auffälligen Mutanten hinsichtlich der Auswirkungen der subzellulären Lokalisation von SnRK1 auf die Photosynthese mittels Pulse-Amplituden-Modulation (PAM)-Messungen untersucht, sowie das Wachstum und die Reproduktion betreffende Parameter verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

In dieser Arbeit wurden Mutanten von *Arabidopsis thaliana* untersucht, die eine unterschiedliche Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 aufwiesen (Ramon *et al.*, 2019). Der genetische Hintergrund aller untersuchten Mutanten ist der Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*, Columbia-0 (Col-0). Die Arbeitsgruppe von Ramon *et al.* (2019) erzeugte transgene Linien, die eindeutig markiertes Wildtyp-, Kern- oder Cytoplasmatisches SnRK1 α 1 in einem homozygoten *snrk1a1/snrk1a2* (*kin10/kin11*) Doppel-Knockout-Mutantenhintergrund exprimierten. Die für den Doppel-Knockout verwendeten T-DNA-Linien waren GABI_579_E09 (*snrk1a1/kin10*) und WiscDsLox320B03 (*snrk1a2/kin11*). Da der Doppel-Knockout jedoch letal war, wurden heterozygote T-DNA-Knockout-Pflanzen mit genomischen *SnRK1 α /KIN10*-Fragmenten ergänzt, die einen doppelten FLAG-Tag enthielten, der mit den codierenden Sequenzen fusioniert ist. Durch anschließende Selbstung konnten homozygote Knockout-Mutanten selektiert werden. In Tabelle 1 sind die verwendeten Genotypen sowie eine vereinfachte Bezeichnung für die weitere Arbeit aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Genotypen von *Arabidopsis thaliana*

Linie	Bezeichnung	Beschreibung
Wildtyp Col-0	Col-0	-
<i>kin10 kin11 SnRK1α1</i> → WT(<i>KIN10</i>)	<i>α1</i>	Kontrolle, Überexpression von <i>KIN10</i>
<i>kin10 kin11 SnRK1-NLS-α1</i>	<i>NLSα1</i>	α -Untereinheit lokalisiert im Nukleus
<i>kin10 kin11 SnRK1-βMYR-α1</i>	<i>βMYRα1</i>	α -Untereinheit lokalisiert im Zellkern

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf einem Gemisch aus Erde und Vermiculit (2:1). Die Samen wurden auf dem angefeuchteten Gemisch ausgesät, abgedeckt und für zwei Tage bei 4 °C in Dunkelheit stratifiziert. Die weitere Anzucht erfolgte in der Klimakammer: 12 h Licht bei 22 °C und 12 h Dunkelheit bei 19 °C. Die Lichtintensität betrug 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Keimlinge wurden nach ca. 14 - 21 Tagen vereinzelt. Nach ca. 5 - 6 Wochen Anzucht wurden die Pflanzen für unterschiedliche Zeiträume in Klimaschränke (Convion Gen1000) gestellt und HL (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) exponiert. Anschließend wurden mit einer Pinzette Blattproben oder ganze Rosetten in Reaktionsgefäße mit Stahlkugeln (\varnothing 2 mm) gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren. In einer Lyophylle fand die Gefriertrocknung der

Proben für 1 - 2 Tage statt. Nach der vollständigen Trocknung wurde das Pflanzenmaterial mit Hilfe einer Retsch-Mühle zu feinem Pulver zerkleinert und dieses für weitere Experimente, wie die Isolation von RNA, die Quantifizierung von Stärke und Analysen des Zucker- und Metabolitgehalts, verwendet.

2.2 Bestimmung des Anthocyangehalts

Die Bestimmung des Anthocyangehalts erfolgte nach der Methode von Lotkowska *et al.* (2015). Hierfür wurden 3 - 5 mg Trockenmasse des lyophilisierten Blattmaterials in 1 mL Extraktionspuffer gelöst. Anschließend wurden die Proben für mindestens 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Dunkelinkubation erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und höchstens 24 °C Raumtemperatur. Ca. 800 µL des Überstandes wurden anschließend in Küvetten überführt. Abschließend wurden die verschiedenen Wellenlängen 537 nm, 650 nm und 720 nm am Photometer vermessen. Für die Berechnung des Anthocyangehalts wurde die nachfolgende Formel verwendet:

$$\frac{(A_{537} - A_{720}) - 0,25 \times (A_{650} - A_{720})}{TM [g]} \times ExV \times DF = \frac{A_{537}}{TM [g]}$$

Extraktionspuffer: 1 % HCl (v/v), 18 % 1-Propanol (v/v), in ddH₂O

2.3 Quantifizierung von Stärke

Für die Quantifizierung von Stärke wurden die Stärkekörner hydrolysiert und durch das Enzym Amyloglucosidase enzymatisch aufgeschlossen, wobei Glucosemoleküle freigesetzt werden. Die Glucose konnte anschließend durch eine gekoppelte Glucosidase-Peroxidase-Reaktion photometrisch quantifiziert werden.

3 - 5 mg des lyophilisierten und pulverisierten Blattmaterials wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße eingewogen. Die Proben wurden mit 400 µL 80 %igem Ethanol (v/v) bei 80 °C im Heizblock für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die vorherigen Schritte wiederholt. Der Überstand wurde abpipettiert und für die Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts (Abschnitt 2.8.1) bei -20 °C weggefroren. Auf das Stärke enthaltende Pellet wurden 750 µL 0,5 M NaOH pipettiert und die Proben für 30 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 750 µL 1 M CH₃COOH hinzugefügt und die

Proben homogenisiert. In einem neuen 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 100 µL der Stärkesuspension mit 100 µL der Amyloglucosidase vermischt. Die Inkubation erfolgte bei 55 °C für 2 h. In der Zwischenzeit wurde eine Standardkalibrierungskurve mit einem Gesamtvolumen von 100 µL für jede Glucosekonzentration, wie in Tabelle 2 beschrieben, erstellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Standardkalibrierungskurve verschiedener Glucosekonzentrationen

Glucose Standard [µL]	ddH ₂ O [µL]	Glucosekonzentration [µM]
0	100	0
10	90	100
25	75	250
50	50	500
75	25	750

Nach dem Stärkeverdau wurden jeweils 100 µL in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Je nach Stärkegehalt und HL-Behandlung wurden die Proben mit ddH₂O 1:5 oder 1:10 verdünnt. Zu den Proben sowie zu den Glucose Standards wurden 200 µL der Glucose-Oxidase-Reagenz pipettiert, homogenisiert und für 1h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µL 5 M HCl hinzugegeben, die Proben homogenisiert und kurz zentrifugiert (< 1 min). 200 µL der Proben sowie der Glucose Standards wurden in 96 Well Platten pipettiert und die Absorption bei 540 nm sowie 900 nm (für unspezifische Lichtstreuung) mit dem BioTek Synergy HTX Multimode Reader gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Standardkalibrierungskurve der Glucosekonzentrationen (Abb. A2).

Acetatpuffer: 200 mM CH₃COOH, 100 mM NaOH

Amyloglucosidase: 1 mg Amyloglucosidase pro mL Acetatpuffer; **frisch vorbereiten!**

Tris-Glycerin-Puffer: 0,5 M TrisHCl, 40 % Glycerin (v/v), pH 7,0

Glucose-Oxidase-Reagenz: 1 mg Glucose-Oxidase, 1,5 mg Peroxidase, 5 mg Dianisidin-HCl, gelöst in 50 mL Tris-Glycerin-Puffer; **bei 4 °C lagern und innerhalb von 4 Tagen aufbrauchen**

2.4 Analyse löslicher Zucker mittels Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie (GC) ist eine Methode zur Trennung von Gemischen in ihre Einzelkomponenten. Das Prinzip beruht auf den unterschiedlichen Dampfdrücken der einzelnen Bestandteile, die unterschiedlich schnell in die Gasphase übergehen. Um lösliche Zucker mittels GC analysieren zu können, müssen diese zunächst derivatisiert werden, damit sie beim Verdampfen nicht zerfallen.

Die Extraktion der löslichen Zucker aus den getrockneten und pulverisierten Blattproben erfolgte parallel zur Aufbereitung für die LC-MS/MS-Messungen und ist Abschnitt 2.7 zu entnehmen. Zu den über Nacht in der SpeedVac getrockneten Proben wurden 65 μL Pyridin/methoxylamin (20 mg Methoxylamin in 1 mL Pyridin) hinzugefügt. Alle Arbeiten mit Pyridin fanden unter dem Abzug statt. Die Proben wurden anschließend bei 30 °C für 90 min auf einem Schüttler inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur wurde 35 μL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) zu den Proben pipettiert, homogenisiert und für 90 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und bei Raumtemperatur abgekühlt. Jeweils 50 μL der Proben wurden in spezielle GC-Vials gefüllt und diese mit Hilfe des Gaschromatographen analysiert.

2.5 Untersuchungen der Genexpression

2.5.1 RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA wurden 3 - 5 mg des getrockneten und pulverisierten Blattmaterials in 1,5 mL Reaktionsgefäße abgewogen. Anschließend wurde das Blattmaterial in 300 μL RNA-Extraktionspuffer gelöst, homogenisiert und bei Raumtemperatur für ca. 5 min inkubiert. Zu den Proben wurden 100 μL DNA/Protein-Prezipit-Lösung pipettiert, gemischt und für 10 min auf Eis (4 °C) inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (ca. 350 μL) wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Erneut wurde ca. 300 μL des Überstandes in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 300 μL Isopropanol versehen und homogenisiert. Die Proben wurden anschließend bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 800 μL 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die darauffolgende Zentrifugation wurde bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur für 5 min durchgeführt. Das Ethanol wurde vollständig abpipettiert und die RNA

enthaltenen Pellets bei Raumtemperatur für 10 - 20 min getrocknet. Zum Abschluss wurde die RNA in 25 µL DEPC-H₂O auf Eis für mindestens 10 min gelöst und homogenisiert. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben erfolgte am NanoDrop™, wobei jeweils 1,5 µL der Proben für die Messung eingesetzt wurden. Als Blank diente DEPC-H₂O.

RNA-Extraktionspuffer: 2 % SDS (m/v), 68 mM Natriumcitrat · 2 H₂O, 132 mM Zitronensäure, 1 mM EDTA

DNA/Protein-Prezipit-Lösung: 4 M NaCl, 16 mM Natriumcitrat, 32 mM Zitronensäure

2.5.2 cDNA-Synthese

Aus der in Abschnitt 2.5.1 isolierten RNA wurde mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase (RT) cDNA (complementary DNA) synthetisiert, die essenziell für die weitere Untersuchung der Genexpression war. Der Startpunkt der RT wird durch die Oligo dT Primer definiert, die an den Poly-A-Schwanz der prozessierten RNA binden. Vor dem Einsatz der RT wurde die isolierte RNA durch einen DNase I Verdau von DNA-Verunreinigungen befreit. Hierfür wurden zunächst 1,5 µg der isolierten RNA mit ddH₂O (Endvolumen = 4 µL) verdünnt und in einem 0,2 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden die drei Reaktionsmixe (Tab. 3) für die cDNA-Synthese hergestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der drei Reaktionsmixe für die cDNA-Synthese

Mix	Menge pro Reaktion [µL]	Bestandteil
DNase I Reaktionsmix	4	1,5 µg RNA bis 4 µL mit ddH ₂ O auffüllen
	0,5	10 x DNase Buffer
	0,5	DNase I
DNase I Inaktivierungsmix	0,5	50 mM EDTA
	0,5	ddH ₂ O
Reverse Transkriptase (RT) Reaktionsmix	0,5	100 mM Oligo dT
	2	5 x Buffer RT
	0,75	ddH ₂ O
	1	10 mM dNTPs
	0,25	RiboLock
	0,5	RT

Zu der mit ddH₂O verdünnten RNA wurde 1 µL des DNase I Reaktionsmixes pipettiert und die Proben in den Thermocycler gestellt. Das PCR-Programm sowie die unterschiedlichen Zeitpunkte der Zugabe der Reaktionsmixe sind Tabelle 4 zu entnehmen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde jeweils 1 µL des DNase I Inaktivierungsmixes zu den Proben pipettiert und diese für 10 min bei 65 °C inkubiert. Im letzten Schritt wurden jeweils 5 µL des RT-Reaktionsmixes hinzugegeben und zunächst für eine Stunde bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert. Abschließend wurde die synthetisierte cDNA mit 40 µL ddH₂O (1:5) verdünnt.

Tabelle 4: PCR-Programm und Ablauf der cDNA-Synthese

Reaktion	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zugabe Reaktionsmix
DNase I Reaktion	1	37	Pause	DNase I Reaktionsmix
	2	37	30:00	
	3	37	Pause	
DNase I Inaktivierung	4	65	Pause	DNase I Inaktivierungsmix
	5	65	10:00	
Reverse Transkriptase (RT) Reaktion	6	42	Pause	RT-Reaktionsmix
	7	42	60:00	
	8	70	10:00	
	9	12	∞	

2.5.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) oder auch Real-Time PCR ist eine Methode, die zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren dient. Das Prinzip beruht auf der Methode der PCR, während zusätzlich eine Quantifizierung durch einen an die doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR-Green), der an einen ausgewählten DNA-Abschnitt bindet, stattfindet. Fluoreszenzmessungen in Echtzeit geben anschließend eine Auskunft über die Menge an PCR-Produkt und erlauben so Rückschlüsse auf veränderte Genexpressionen.

Für die qPCR wurden zunächst verschiedene Mastermixe mit unterschiedlichen Primerpaaren hergestellt. Als Fluoreszenzfarbstoff, der an die doppelsträngige DNA bindet, wurde SYBR-Green (2 x ChamQ Universal SYBR qPCR Mastermix) verwendet. Um die Expression der Gene einordnen zu können, wurde ebenfalls das Haushaltsgen *SAND*

(Tab. 7, blau) amplifiziert, dass unabhängig von äußeren Einflüssen und Zellstadium exprimiert wird. Des Weiteren wurden Primerpaare verwendet, die essenzielle Gene für die Flavonoid- und Zuckerbiosynthese amplifizieren (Tab. 7). Die Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes sowie das Programm des qPCR-Cylers (CFX Connect™ Real-Time System) sind den folgenden Tabellen 5 & 6 zu entnehmen.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes

Komponente	Menge [μL]
2 x ChamQ Universal SYBR qPCR Mastermix	3
Primer Forward (100 μM)	0,04
Primer Reverse (100 μM)	0,04
ddH ₂ O	1,92
cDNA-Template (1:5)	1
Σ	6

Tabelle 6: qPCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Reaktion
1	95	1:00	Initiale Denaturierung
2	95	0:15	Denaturierung
3	60	0:15	Primerhybridisierung
4	72	0:20	Elongation
39 Zyklen der Schritte 2-4			
5	95	0:10	Finale Elongation
6	65	0:05	Temperaturerhöhung
7	95	-	in 0,5 °C-Schritten

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer für die qPCR

Name	Locus	Forward (F) / Reverse (R)	Sequenz (5' → 3')
<i>SAND</i>	AT2G28390	F	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT
		R	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
<i>KIN10</i>	AT3G01090	F	ACTTCAGTCTCGGGCTCAT
		R	GCTGCTGTTAGGAACCCAT

Name	Locus	Forward (F) / Reverse (R)	Sequenz (5' → 3')
<i>KIN11</i>	AT3G29160	F	GAGGATGACTGTGCCATGAC
		R	AAGCTCTGTAAGAAAGGCGG
<i>PAP1</i>	AT1G56650	F	TGCTGGAAGATTACCTGGTCG
		R	AGTGCCGGTGTGTAGGAATG
<i>DFR</i>	AT5G42800	F	CGCCAAGACGCTACTCACT
		R	CGGCTTTATCACTTCGTTCTCA
<i>LDOX</i>	AT4G22880	F	GTGATTACATAGAAGCAACGAGTG
		R	CTAAACCTAGACCGACAGAGAGA
<i>CHS1</i>	AT1G17610	F	GGTCTCACCTTCCATCTCCT
		R	AGTATGAAGAGAACGCACGC
<i>SEN1</i>	AT4G35770	F	ATAATCGGTTGTGAGAGCGG
		R	TCTTCTACCGGCAGCTCAT
<i>DIN6</i>	AT3G47340	F	TCTTCCCTCACAACACTCCA
		R	GCCTTTGCAGTCGAACAAG
<i>MYBL2</i>	AT1G71030	F	TTTGCCCATTCOAAGTACCA
		R	AGCGTTTCTTGACCTGTTGA
<i>SPSa1</i>	AT5G20280	F	TGGCACCCGAATAAACGTC
		R	AAGCCCACCAAGCAATCC
<i>PGM1</i>	AT5G51820	F	CGTTTATCCGGAAGTGGCT
		R	TCTCCCTCCCTGTGAAGTC
<i>BAM3</i>	AT4G17090	F	GAGTTCCAGTGCTACGACAA
		R	TCGCTATTCCATGTTCCGTC
<i>INVvac</i>	AT1G12240	F	TTCTGCACAGACACCTCAAG
		R	TCTTCCACCTTGTCCGAATG
<i>cINV1/2</i>	AT1G35580/	F	GGCAGAGCTTGTAGGTGAG
	AT4G09510	R	TGCGGTCTCCCTGTCTTAA
<i>nINV-A</i>	AT1G56560	F	GACCCAAAGAACACGCCTT
		R	CCAACAGTCTCTTCTCAGCC
<i>nINV-E</i>	AT5G22510	F	GCATGGCCAAGTCTGCTA
		R	ACCAAGTCTGGTATAGCCGT

Name	Locus	Forward (F) / Reverse (R)	Sequenz (5' → 3')
<i>Hxk</i>	AT4G29130	F	GTCTGAATCCAGGCGAACA
		R	AAAGCAGCATCTTCAGCCAT
<i>pPGI</i>	AT4G24620	F	CGGTAGAGCCATTGACACTG
		R	GCACTCGCCCAAATACT
<i>cPGI</i>	AT5G42740	F	TGCTTACAATGTTGGCCAGT
		R	GTTCCCTTGAGTGCGTGATGA

2.5.4 RNA-Seq

Die RNA-Seq beruht auf der Methode des „Next-Generation Sequencing“ und wird zur Bestimmung der Nukleotidabfolge der RNA bzw. des Gesamt-Transkriptoms verwendet. Hierfür wurde die RNA, wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, isoliert und am NanoDrop™ die Konzentration bestimmt. Anschließend wurde der DNase-Verdau durchgeführt. 15 µg RNA wurden mit 2 µL DNase und 3 µL 10 x DNase Puffer gemischt und mit ddH₂O auf 30 µL aufgefüllt. Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA gefällt. Zu den 30 µL RNA wurden 70 µL ddH₂O pipettiert. Danach wurden 100 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (pH 6,7) zu der verdünnten RNA gegeben, bevor die Proben bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurden. In ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 60 µL des Überstandes mit 60 µL Chloroform gemischt. Der vorherige Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. 40 µL des Überstandes wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 120 µL 100 % EtOH : NaAc (v/v) (30:1, pH 5,2) über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 800 µL 70 %igem EtOH (v/v) gewaschen. Die Resuspension erfolgte in 27 µL DEPC-H₂O. Die Konzentration der RNA-Proben wurde am NanoDrop™ gemessen und 3 µL der Proben zur Überprüfung der isolierten RNA-Proben ohne DNA-Verunreinigungen auf ein Agarose-Gel geladen. Für das 1,2 %ige Agarose-Gel (m/v) wurden in einem Erlenmeyerkolben 1,8 g Agarose in 225 µL Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und 4,2 µL Ethidiumbromid hinzu pipettiert. Anschließend wurde das flüssige Gel in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen und für ca. 30 min auspolymerisiert. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gespannt, der Kamm vorsichtig gezogen und je 3 µL RNA, gemischt mit 3 µL 2 x RNA Loading-Dye, in die Taschen

pipettiert. Anschließend wurde das Gel für ca. 45 min bei 80 V laufen gelassen, bevor es im Gel iX20 Imager mittels UV-Bestrahlung dokumentiert wurde.

Die vollständige Sequenzierung der RNA erfolgte durch die Firma Novogene. Hierfür wurden die Proben kühl und sicher verpackt und nach Cambridge verschickt.

10 x TBE-Puffer: 108 g Tris, 55 g Borsäure, mit ddH₂O auf 1000 mL auffüllen und pH 8,2 einstellen, für 1 x: 1:10 verdünnen

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Protein-Isolation

Für die Protein-Isolation wurden 3 - 5 mg des getrockneten Blattmaterials in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß eingewogen. Zu dem Blattmaterial wurde pro 1 mg Trockengewicht je 50 µL Protein-Extraktionspuffer pipettiert und anschließend homogenisiert. Die Proben wurden für 20 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Auftrennung der Proteine auf ein SDS-Gel (Abschnitt 2.6.2) geladen. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Protein-Extraktionspuffer: 56 mM Na₂CO₃, 56 mM DTT, 2 % SDS (m/v), 12 % Saccharose (m/v), 2 mM EDTA

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Das SDS-Gel setzt sich aus einem Sammelgel (oberer Teil) und einem Trenngel (unterer Teil) zusammen. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels ist Tabelle 8 zu entnehmen. Die auspolymerisierten Gele wurden in Gelelektrophorese-Kammern gespannt und diese mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt. Die in Abschnitt 2.6.1 isolierten Proteinextrakte wurden, wenn sie zuvor eingefroren waren, für 5 min bei 90 °C im Heizblock erwärmt, um das in Kälte ausgefallene SDS erneut zu lösen. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden je 10 µL der Proteinextrakte in die Gel-taschen geladen. In die erste Tasche wurde 3 µL des Markers „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ (Thermo Fisher Scientific) pipettiert (Abb. A1). In leere Taschen wurde zur gleichmäßigen Beladung ein 1 %iger (m/v) SDS-Ladepuffer aufgetragen. Anschließend wurden die Proben im Sammelgel bei 80 V für ca. 30 min und bei 120 V für ca. 90 min im Trenngel aufgetrennt, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte.

Tabelle 8: Zusammensetzung für vier Gele der SDS-PAGE

Komponente	Trenngel (12 %) [mL]	Sammelgel (5 %) [mL]
ddH ₂ O	6,6	6,8
30 % Acryl-Bisacrylamidmix	8	1,7
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25
10 % SDS (m/v)	0,2	0,1
10 % Ammoniumpersulfat (APS) (m/v)	0,2	0,1
TEMED	0,008	0,01
Σ	20	10

Nach der SDS-PAGE wurde ein Gel mit R-250 Coomassie Brilliant Blau für 1 h angefärbt. Dies diente zur Überprüfung - der bei allen Proben gleichen - aufgetragenen Proteilmengen. Anschließend wurde das Gel mehrfach mit Entfärber-Lösung entfärbt und dokumentiert.

10 x SDS-Laufpuffer: 0,28 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS (m/v), mit ddH₂O auf 2500 mL auffüllen, für 1 x: 1:10 verdünnen

R-250 Coomassie Färbelösung: 0,5 g Coomassie Brilliant Blau R-250, gelöst in 200 mL ddH₂O, 250 mL Methanol, 50 mL Essigsäure

Entfärber-Lösung: 500 mL ddH₂O, 400 mL Methanol, 100 mL Essigsäure

2.6.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Trägermembran, wie Nitrocellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF), durch das Anlegen eines elektrischen Feldes übertragen. Als Blotting-Kammer wurde das Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System verwendet. Zunächst wurden pro Gel vier Whatman-Papiere in 1 x Transferpuffer sowie die Nitrocellulose-Membran für 1 min in Reinstwasser gelegt. Anschließend wurde ebenfalls die Nitrocellulose-Membran in den 1 x Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde aus der SDS-Kammer entfernt und der Blot nach folgendem Schema aufgebaut: 2 x Whatman-Papier, Nitrocellulose-Membran, SDS-Gel, 2 x Whatman-Papier. Mit Hilfe der Blotting-Kammer wurde das Gel bei 25 V und 0,6 A für 30 min geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Ponceau eingefärbt und dokumentiert, um den erfolgreichen Transfer der Proteine überprüfen zu können. Die Entfärbung der Membran erfolgte mittels destilliertem Wasser.

Für die Immunodetektion wurde die Membran zunächst in ein 50 mL Falcon überführt und für min. 1 h bei Raumtemperatur in 4 % Magermilch, gelöst in TBS-T, geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 10 min in TBS-T, danach 2 x für je 10 min in TBS gewaschen. Über Nacht bei 4 °C erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper 1:1000 (in 1 % Magermilch, gelöst in TBS). Nachdem die Membran wie zuvor beschrieben mehrfach gewaschen wurde, erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper Horseradish Peroxidase (HRP) 1:10000 (in 1 % Magermilch, gelöst in TBS). Die Membran wurde nach der Inkubation 10 min mit TBS-T und 5 x 5 min mit TBS gewaschen. Die Dokumentation erfolgte mittels Chemilumineszenz. Hierfür wurden 500 µL der Peroxid-Lösung mit 500 µL der Luminol/Enhancer-Lösung in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt. Das Gemisch wurde mit einer Pipette gleichmäßig auf die auf einer Glasplatte ausgelegte Membran getropft und verteilt. Die Detektion und Dokumentation des bei der Reaktion mit HRP entstehenden Lichtsignals erfolgte mit dem ECL Chemostar Chemilumineszenz Imager.

10 x Transferpuffer:	0,48 M Tris, 0,39 M Glycin, 0,37 % SDS (m/v), mit ddH ₂ O auf 1000 mL auffüllen
1 x Transferpuffer:	100 mL 10 x Transferpuffer, 200 mL Methanol, mit ddH ₂ O auf 1000 mL auffüllen
10 x TBS:	24,3 g Tris, 80 g NaCl, mit ddH ₂ O auf 1000 mL auffüllen und pH 7,6 einstellen, für 1 x: 1:10 verdünnen
10 x TBS-T:	24,3 g Tris, 80 g NaCl, 0,1 % Tween 20 (v/v), mit ddH ₂ O auf 1000 mL auffüllen und pH 7,6 einstellen, für 1 x: 1:10 verdünnen
Ponceau-Lösung:	0,1 % Ponceau S (m/v), 5 % Essigsäure (v/v), in ddH ₂ O lösen

2.7 Probenaufbereitung für die Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die LC-MS/MS ist ein modernes Analyseverfahren, das die Identifizierung und Quantifizierung sowohl von reinen Substanzen als auch von Substanzgemischen ermöglicht. Mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie werden die Substanzen aus der Probe zunächst

getrennt und ionisiert. Anschließend werden die Massen massenspektrometrisch bestimmt und fragmentiert, um sie nachfolgend zu analysieren und einer Substanz zuzuordnen.

Für die Probenaufbereitung der LC-MS/MS wurden 3 - 5 mg des gefriergetrockneten, pulverisierten Blattmaterials in 2 mL Reaktionsgefäße eingewogen. Die Proben wurden unter dem Abzug mit je 500 µL frisch hergestelltem LC-MS/MS-Puffer versetzt, homogenisiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 400 µL eisgekühltes LC-MS/MS-Wasser hinzugegeben und die Proben für 2 h bei -20 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Ca. 900 µL der oberen Phase wurden in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden weitere 400 µL des eisgekühlten LC-MS/MS-Wassers in das erste Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut abpipettiert und mit der zuvor entnommenen oberen Phase vereint. In zwei neue Reaktionsgefäße wurde die obere Phase gleichmäßig verteilt (für GC und LC-MS/MS) und über Nacht in der SpeedVac getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Proben für die LC-MS/MS mit 400 µL LC-MS/MS-Wasser auf einem Schüttler für ca. 30 min inkubiert, bis die Proben vollständig gelöst waren. Die Extrakte wurden mit Hilfe eines HPLC-Filters filtriert und das Filtrat in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. 20 µL der Filtrate sowie der Standards (Tab. 9) wurden in spezielle LC-MS/MS-Vials pipettiert und vermessen.

Tabelle 9: Verwendete Standards für die LC-MS/MS

Standards (Ausgangskonzentration 1 mg/mL)
MES (1:100)
AS-Mix (1:1000)
OS-Mix (1:100)
Citrullin (1:1000)
Ornithin (1:1000)
Aconitat (1:1000)
AMP (1:1000)
3-PGA (1:100)

LC-MS/MS-Puffer (pro Ansatz): 150 µL Chloroform, 350 µL Methanol, 1 µL MES (IT für LC-MS/MS, 1 mg/mL), 1 µL Ribitol (IT für GC, 1 mg/mL)

2.8 Analyse von Photosynthese-Parametern

2.8.1 Spektrophotometrische Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts

Für die spektrophotometrische Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts wurden zunächst die ersten Schritte des Protokolls zur Quantifizierung von Stärke durchgeführt (Abschnitt 2.3). 200 µL des Überstandes wurden in 96 Well Platten pipettiert und die Absorption bei 470 nm, 646 nm, 663 nm und 720 nm mit dem BioTek Synergy HTX Multimode Reader gemessen. Als Blank diente 80 %iges Ethanol (v/v). Der Gehalt der verschiedenen Pigmente wurde mittels nachfolgender Formeln (Tab. 10) berechnet.

Tabelle 10: Spektrophotometrische Chlorophyll- und Carotinoidbestimmung

Pigment	Formel zur Berechnung [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
Chlorophyll a (Chl a)	$12,25 \times (A_{663 \text{ nm}} - A_{720 \text{ nm}}) - 2,79 \times (A_{646 \text{ nm}} - A_{720 \text{ nm}})$
Chlorophyll b (Chl b)	$21,50 \times (A_{646 \text{ nm}} - A_{720 \text{ nm}}) - 5,10 \times (A_{663 \text{ nm}} - A_{720 \text{ nm}})$
Carotinoide	$\frac{(1000 \times (A_{470 \text{ nm}} - A_{720 \text{ nm}}) - 1,82 \times c[\text{Chl a}] - 85,02 \times c[\text{Chl b}])}{198}$

2.8.2 Fluoreszenz-Messungen (Pulse-Amplituden-Modulation)

Die Pulse-Amplituden-Modulation (PAM) ist eine Methode zur Messung der Chlorophyll-fluoreszenz, mit der die Auswirkungen unterschiedlicher Stressfaktoren auf die Photosynthese untersucht werden können. Das „Nicht-photochemische Quenching“ (NPQ) wird mit Hilfe von saturierenden Lichtpulsen ermittelt. Die untersuchten Pflanzen wurden vor der Messung für 20 min dunkeladaptiert. Die Messungen liefen zu folgenden Zeitpunkten ab: EoN, 4 h HL, 8 h HL, 24 h HL und Normalbedingungen (12 Uhr Mittag). Die Dokumentation und Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes ImagingWin v2.47 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Mutanten mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation der SnRK1

Zur Untersuchung der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 wurden die Mutanten *$\alpha 1$* , *NLS $\alpha 1$* und *$\beta MYR\alpha 1$* (Material und Methoden 2.1) zunächst grundlegend charakterisiert. Hierfür wurden die drei Mutanten sowie der Wildtyp Col-0 in der Klimakammer angezogen und ihre Phänotypen nach ca. einem Monat Wachstum dokumentiert (Abb. 6).

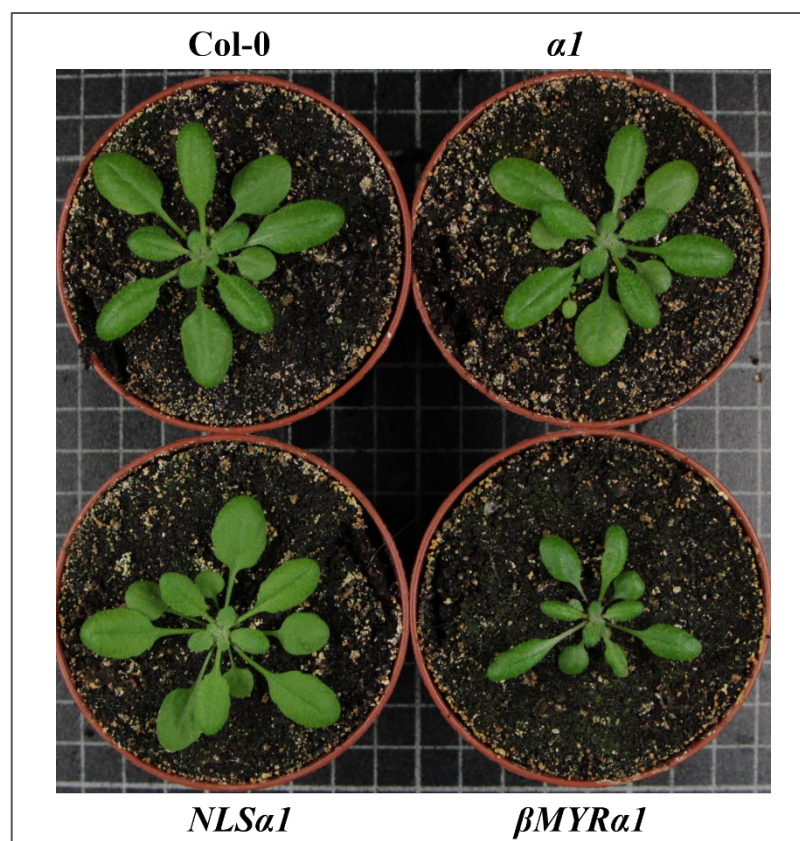


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Blattphänotypen der verschiedenen Genotypen

Die Abbildung zeigt die Phänotypen mit den unterschiedlichen Blattformen der Genotypen, die die Konstrukte der verschiedenen subzellulär lokalisierten SnRK1 enthielten. Zum Zeitpunkt der Aufnahme waren die Pflanzen 36 Tage alt.

Die Kontrollmutante *$\alpha 1$* (Wildtyp-Gen) wies einen ähnlichen Phänotyp wie Col-0 auf und war dementsprechend unauffällig. Die Mutanten *NLS $\alpha 1$* und *$\beta MYR\alpha 1$* hingegen zeigten deutliche phänotypische Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp Col-0. *NLS $\alpha 1$* hatte eine rundere Blattform, die meist sehr flach und an den Blatträndern nicht nach unten gebogen war. *$\beta MYR\alpha 1$* wies lange Petiolen mit länglichen, schmalen Blättern auf, deren Blattränder

stark nach unten gebogen waren. Die auffälligen Blattphänotypen, die von Ramon *et al.* (2019) beschrieben wurden (Abschnitt 1.4), konnten somit bestätigt werden.

Für die weitere Charakterisierung der Mutanten wurde die relative Genexpression von *KIN10* und *KIN11* mittels qPCR-Analyse (Abschnitt 2.5) untersucht. In der folgenden Abbildung 7 ist die relative Genexpression sowie deren Veränderungen im Zuge der HL-Akklimatisierung dargestellt.

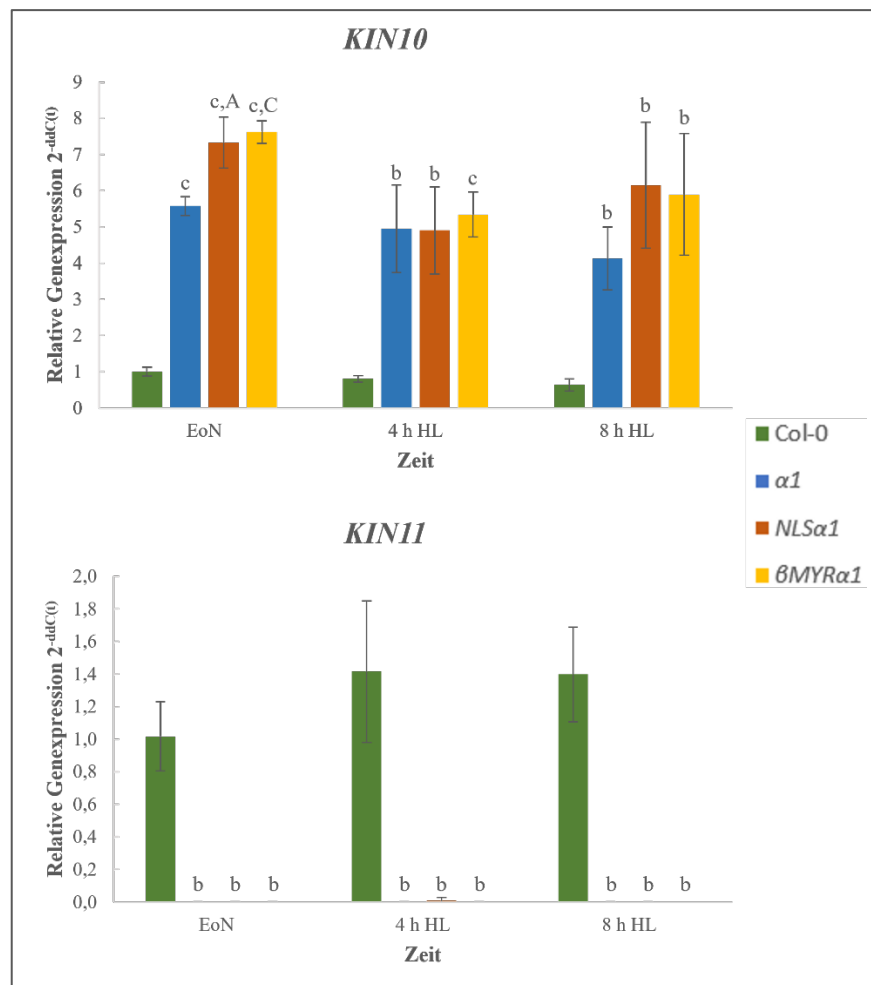


Abbildung 7: Genexpression von *KIN10* und *KIN11* zum Ende der Nacht sowie unter HL-Bedingungen

In der Abbildung ist die Anpassung der relativen Genexpression der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *al* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Für *KIN10* wurden deutliche Unterschiede in *al*, *NLS $\alpha 1$* und *β MYR $\alpha 1$* im Vergleich zu Col-0 zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL detektiert. Die Mutanten besaßen zu allen Zeitpunkten eine mindestens 5-fach höhere relative Genexpression von *KIN10*. Folglich konnte bei *al*, *NLS $\alpha 1$* und *β MYR $\alpha 1$* eine Überexpression von *KIN10* festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte nur beim Wildtyp Col-0 unabhängig vom Zeitpunkt eine relative

Genexpression von *KIN11* nachgewiesen werden. Mit Hilfe von diesem Ergebnis konnte der Knockout von *KIN11* in den Mutanten nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung des Aktivierungszustandes der SnRK1 (Grad der Auto-Phosphorylierung im T-Loop) sowie zum Nachweis der Bildung der KIN10-Varianten auf Proteinebene wurde ein Western Blot (Abschnitt 2.6) mit spezifischen Antikörpern gegen die SnRK1 ähnliche, phosphorylierte AMPK sowie gegen den FLAG-Tag durchgeführt. Abbildung 8 zeigt die zwei Western Blots sowie ein mit Coomassie angefärbtes Gel als Ladungskontrolle.

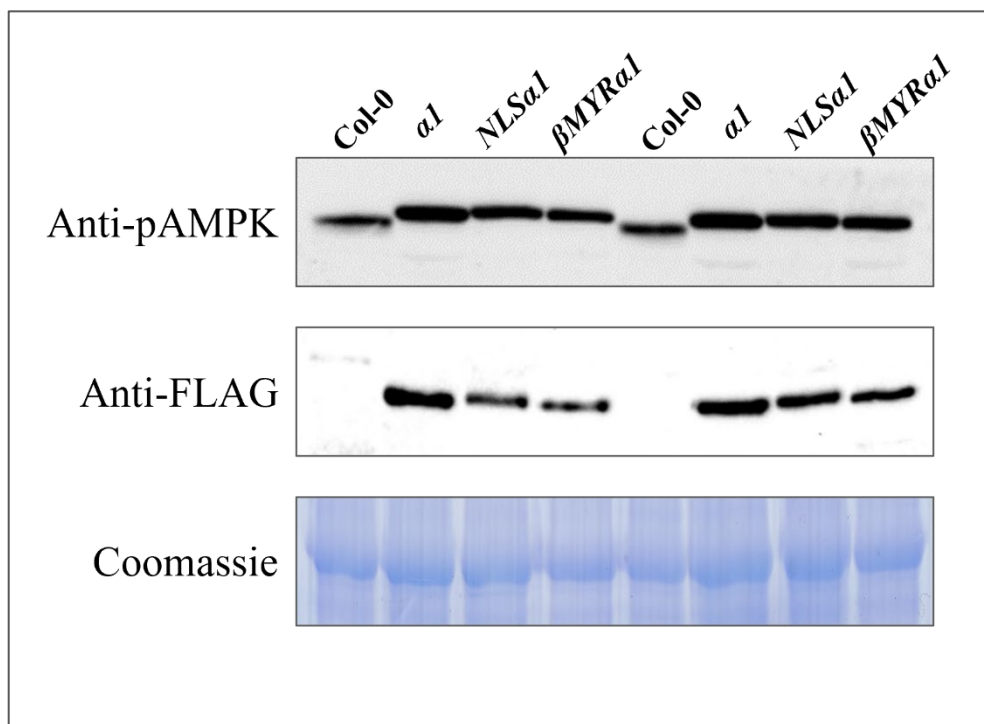


Abbildung 8: Western Blot mit Anti-pAMPK und Anti-FLAG sowie Coomassie-Gel

Dargestellt sind zwei Western Blots mit den spezifischen Antikörpern Anti-pAMPK sowie Anti-FLAG von aus den Genotypen isolierten Proteinen sowie dem Coomassie-Gel als Ladungskontrolle. Es wurden jeweils 10 μL der Proteinextrakte (1 mg TM pro 50 μL PEB-Puffer) in die Taschen geladen. Als Marker wurde der Prestained Protein Molecular Weight Marker (3 μL) verwendet.

Beim Western Blot mit Anti-pAMPK konnten die auto-phosphorylierten KIN10-Proteine durch eine sichtbare Bande in allen Linien nachgewiesen werden. Auffällig war der Größenunterschied der Bande von Col-0 zu den Mutanten, die etwas kleiner als die der transgenen Linien war. Zudem wurde eine etwas erhöhte Abundanz von KIN10 in den transgenen Linien im Vergleich zu Col-0 festgestellt, die sich zwischen den transgenen Linien jedoch nur geringfügig unterschied. Beim Western Blot mit Anti-FLAG konnten nur bei den Mutanten, nicht aber bei Col-0, Banden nachgewiesen werden. Dies hängt mit dem inserierten *SnRK1 α /KIN10*-Konstrukt und dem darin enthaltenen doppelten FLAG-Tag zusammen, der auf natürliche Weise nicht im Wildtyp Col-0 vorkommt.

3.2 Untersuchungen der Auswirkungen der differentiellen Lokalisation der SnRK1 im Zuge der HL-Akklimatisierung

3.2.1 Untersuchungen des Anthocyangehalts

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf den Untersuchungen der Auswirkungen der unterschiedlichen Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 auf die Anthocyanbiosynthese und -regulation. Die Akkumulation von Anthocyanen unter HL-Bedingungen kann nur erfolgen, wenn die SnRK1 durch einen erhöhten Zuckergehalt inaktiviert wird. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung der Flavonoidbiosynthese (Zirngibl *et al.*, 2023).

Zunächst wurde eine phänotypische Gegenüberstellung der gebildeten Anthocyane im Zuge der HL-Akklimatisierung (24 h HL) durchgeführt. Ca. 4 Wochen alte Pflanzen wurden für 24 h dem HL ausgesetzt und ihr Phänotyp in Bezug auf die Akkumulation von Anthocyanen vor und nach der HL-Behandlung miteinander verglichen (Abb. 9). Neben der Blattoberseite wurde auch die Blattunterseite der Genotypen dokumentiert, da Anthocyane als Erstes auf dieser akkumuliert bzw. sichtbar werden.

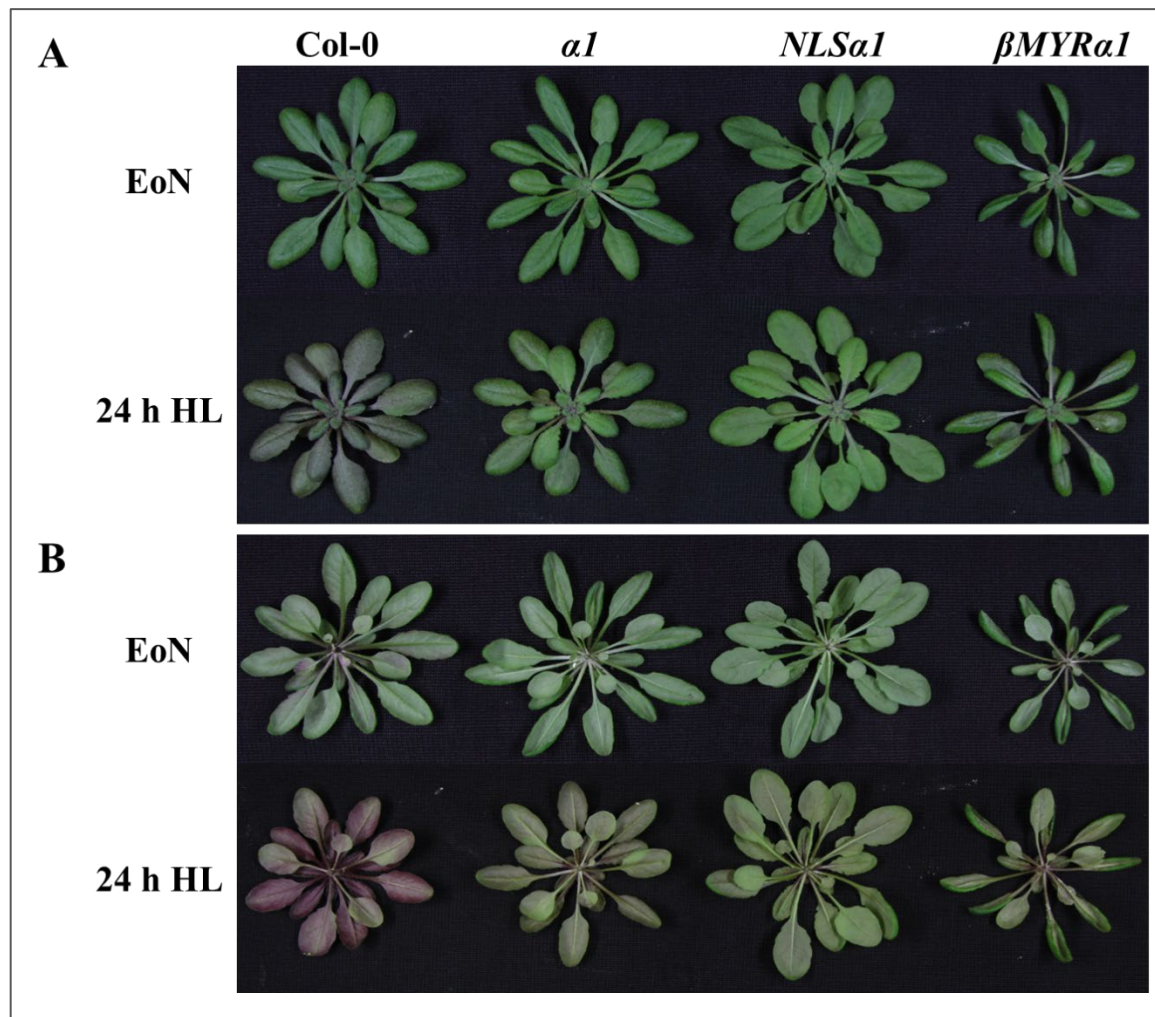


Abbildung 9: Phänotypische Gegenüberstellung der Blattmorphologie und Anthocyanbildung zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL

Die Abbildung stellt die Phänotypen, im speziellen die Blattoberseite (A) und die Blattunterseite (B), von Col-0, *α1*, *NLSa1* und *βMYRa1* am Ende der Nacht sowie nach 24 h HL-Stress dar. Zum Zeitpunkt der Aufnahme waren die Pflanzen ca. einen Monat (36 Tage) alt.

Die Genotypen zeigten am Ende der Nacht sowohl auf der Blattoberseite als auch auf der Blattunterseite keine Anthocyane. Lediglich beim Wildtyp Col-0 wurde eine leichte Akkumulation von Anthocyanen auf der Blattunterseite durch eine violette Verfärbung in der Rosettenmitte festgestellt (Abb. 9 B). Nach 24 h HL zeigte Col-0 auf der Unter- und Oberseite der Blätter eine starke Akkumulation von Anthocyanen, während bei den Mutanten die violette Verfärbung bzw. die Bildung von Anthocyanen deutlich schwächer ausfiel. Bei *α1* und *βMYRa1* wurde auf der Blattoberseite und -unterseite eine schwache violette Verfärbung ersichtlich. *NLSa1* hingegen wies auf der Blattoberseite nur eine schwache Färbung der Blattstiele auf (Abb. 9 A).

Um die Anthocyanengehalte nicht nur phänotypisch einzuordnen, erfolgte anschließend die Quantifizierung des Anthocyanengehalts (Abschnitt 2.2) (Abb. 10).

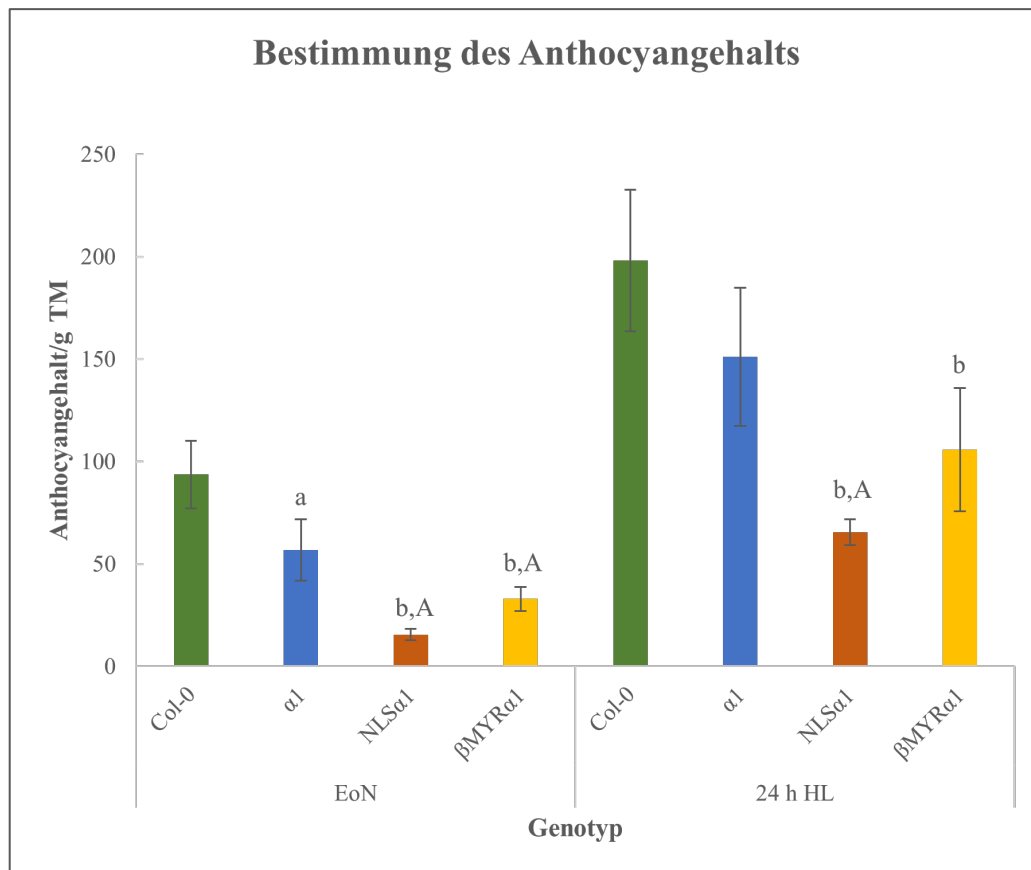


Abbildung 10: Bestimmung des Anthocyanangehalts zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL

Dargestellt ist der Anthocyanin Gehalt pro Gramm Trockenmasse der verschiedenen Genotypen am Ende der Nacht sowie nach 24 h HL-Behandlung. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante $\alpha 1$ (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Col-0 zeigte zum Ende der Nacht von den untersuchten Genotypen den größten Anthocyanin Gehalt pro Gramm Trockenmasse, gefolgt von $\alpha 1$, $\beta MYR\alpha 1$ und *NLSα1*. Auffällig war der Anthocyanin Gehalt von *NLSα1*, der nicht einmal halb so viel wie der von der Kontrollmutante $\alpha 1$ und nur ca. ein Viertel des Anthocyanin Gehalts von Col-0 betrug. Jedoch wies der Anstieg des Anthocyanin Gehalts nach 24 h HL zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede auf. Bei allen Genotypen wurde der Anthocyanin Gehalt min. verdoppelt und das Verhältnis blieb im Vergleich zum Ende der Nacht gleich. Das Ergebnis konnte unabhängig wiederholt und bestätigt werden.

3.2.2 Untersuchungen von Transkriptionsveränderungen der Flavonoidbiosynthese

Um die Auswirkungen der differentiellen Lokalisation der SnRK1 im Zuge der HL-Akklimatisierung auf die Flavonoidbiosynthese zu untersuchen, wurden gezielte qPCR-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus den Blattproben der Genotypen isoliert und mittels cDNA-Synthese (Abschnitt 2.5) für die weitere Analyse der Genexpression vorbereitet. Zunächst wurde die Expression von Genen und TFs untersucht, die an der

Flavonoidbiosynthese beteiligt sind. In Abbildung 11 sind die Expressionsveränderungen der *CHS1*, einem frühen (early) Biosynthese-Gen (EBG), sowie der Anthocyanbiosynthese-Gene (ABG), *DFR* und *LDOX*, unter HL dargestellt.

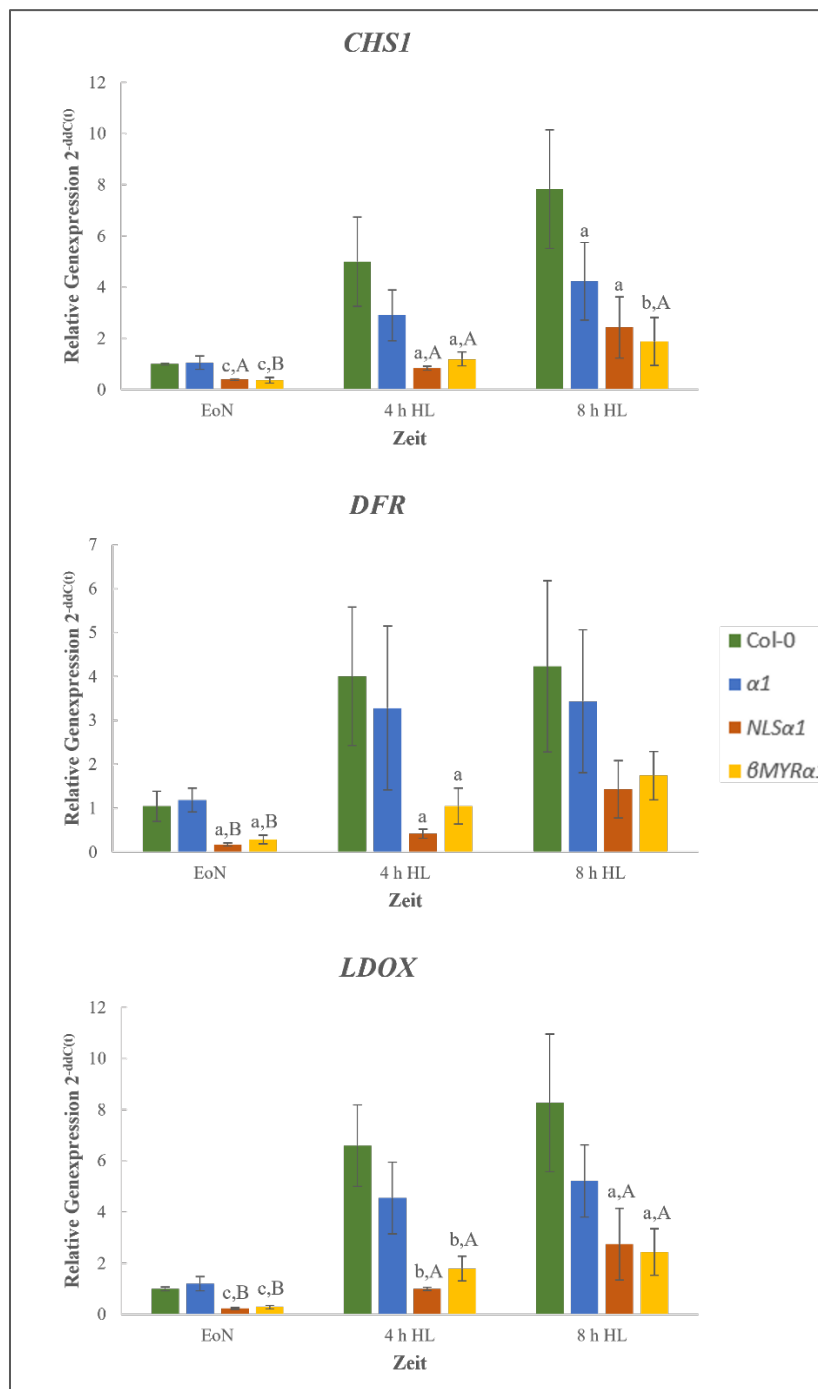


Abbildung 11: Änderungen der relativen Genexpression von Flavonoidbiosynthese-Genen unter HL-Bedingungen

In der Abbildung ist die Anpassung der relativen Genexpression von *CHS1* (EBG), *DFR* (ABG) und *LDOX* (ABG) zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL-Stress der verschiedenen Genotypen dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *al* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Die Untersuchung der Genexpression im Zuge der HL-Akklimatisierung zeigte bei allen drei Genen eine deutlich höhere Expression beim Wildtyp Col-0 sowie bei der Kontrollmutante *α1* im Vergleich zu den Mutanten *NLSα1* und *βMYRα1*. Des Weiteren war bei allen Genotypen zu beobachten, dass die Genexpression nach 4 h und 8 h HL zunahm, allerdings im Verhältnis bei Col-0 und *α1* deutlich stärker. Nach 8 h HL betrug die Genexpression von *NLSα1* und *βMYRα1* nicht mal die Hälfte von *α1* und nur ca. ein Drittel von Col-0. Die Veränderungen auf Transkript-Ebene zeigten, dass die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 bereits zum Ende der Nacht Auswirkungen auf die Expression von Flavonoidbiosynthese-Genen hatte. Ähnliche Beobachtungen ergaben sich bei den Untersuchungen von für die Regulation der Flavonoidbiosynthese essenziellen TFs (Abb. 12).

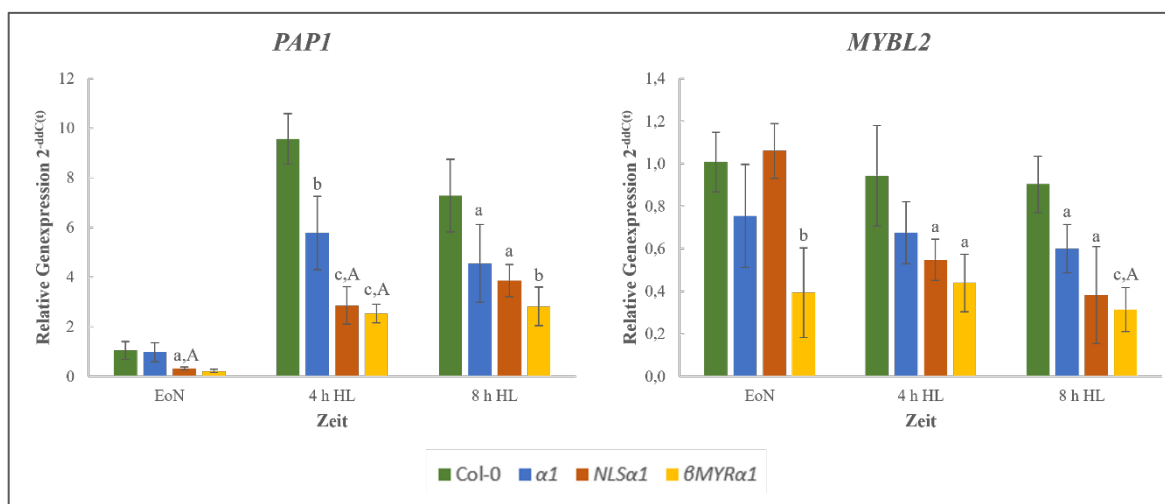


Abbildung 12: Änderungen der relativen Genexpression der TFs *PAPI* und *MYBL2* unter HL-Bedingungen

Dargestellt ist die Anpassung der relativen Genexpression der TFs *PAPI* (kodiert durch *MYB75*) und *MYBL2* zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL-Stress der verschiedenen Genotypen. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *α1* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

PAPI wird kodiert durch *MYB75* und fungiert als positiver Regulator der Flavonoidbiosynthese, wohingegen der TF MYB-like 2 (*MYBL2*) mit *PAPI* interagiert, an den MBW-Komplex bindet und dessen Aktivität unterdrückt. Im Zuge der HL-Akklimatisierung konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PAPI* zunimmt und die Expression von *MYBL2* gehemmt wird (Abschnitt 1.3). Der Wildtyp Col-0 zeigte, wie auch bei der Expression der Flavonoidbiosynthese-Gene, eine deutlich höhere Expression der TFs (Ausnahme: *MYBL2* EoN), gefolgt von *α1*, *NLSα1* und *βMYRα1*. Die Genexpression der TFs bei den Mutanten *NLSα1* und *βMYRα1* verhielt sich nahezu identisch im Laufe der HL-Akklimatisierung und betrug nach 8 h HL nur ca. die Hälfte der Genexpression von Col-0.

Um zu untersuchen, ob durch die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 diese noch responsiv für die zuckerabhängige Regulation im HL war, wurde die Genexpression von sogenannten „starvation markers“, im speziellen *SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 1 (SEN1)* und *DARK INDUCIBLE 6 (DIN6)*, mittels qPCR-Analysen untersucht (Abb. 13). Als „starvation markers“ werden Gene, die unter Energiemangelbedingungen gebildet werden, bezeichnet.

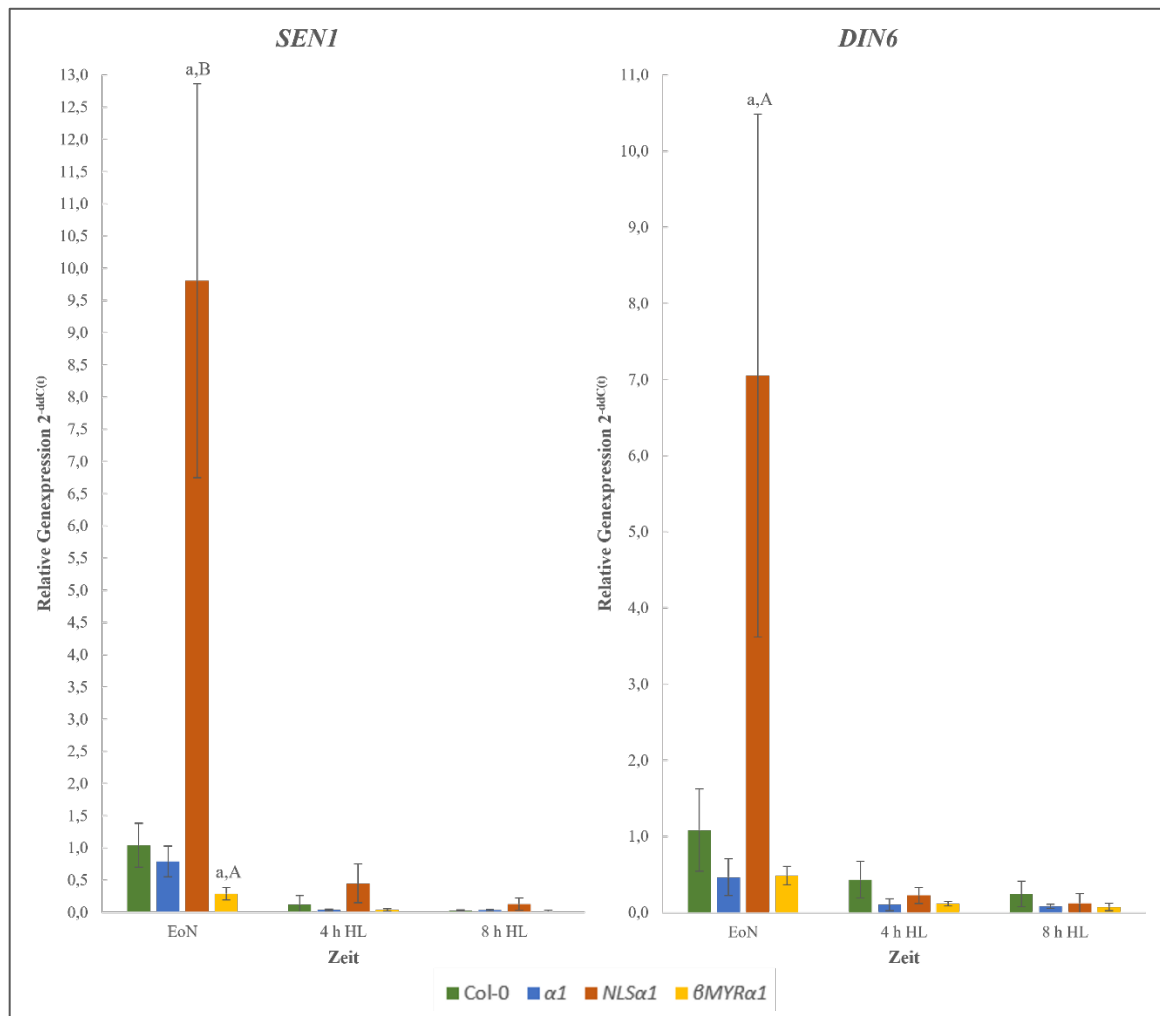


Abbildung 13: Änderungen der relativen Genexpression von *SEN1* und *DIN6* unter HL-Bedingungen

In der Abbildung ist die Anpassung der relativen Genexpression von *SEN1* und *DIN6* der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *a1* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Am Ende der Nacht zeigten alle Genotypen eine Expression von den „starvation markers“, jedoch zeigte besonders *NLS $\alpha 1$* eine 7-fach (*DIN6*) und fast 10-fach (*SEN1*) höhere Genexpression im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Trotz der erhöhten Genexpression bei *NLS $\alpha 1$* nahm diese im HL bei allen untersuchten Genotypen ab und näherte sich Null an. *$\beta MYR\alpha 1$* verhielt sich ähnlich wie *a1* und die Genexpression wurde trotz der schon sehr niedrigen

Expression zum Ende der Nacht unter HL weiter gesenkt. Die Abnahme der Genexpression von *SEN1* und *DIN6* unter HL in allen Genotypen bestätigte, dass die SnRK1 auch in den Mutanten noch responsiv war und die Expression dieser Gene unter HL gehemmt wurde.

Im Rahmen der gerichteten Transkript-Analyse wurden in den Mutanten Veränderungen ersichtlich, die im Zusammenhang mit der differentiellen Lokalisierung der katalytischen α -Untereinheit stehen. Daher wurde zusätzlich eine ungerichtete Untersuchung von Transkriptionsveränderungen durchgeführt. Hierfür wurde RNA isoliert und diese für eine „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“ (RNA-Seq) zur Firma Novogene nach Cambridge verschickt (Abschnitt 2.5.4). Die detaillierte bioinformatische Auswertung steht noch aus und konnte bis zum Zeitpunkt der Abgabe nicht erstellt werden. Dennoch kann in Abbildung 14 ein erstes Ergebnis mit Hilfe der „principal component analysis“ (PCA) gezeigt werden.

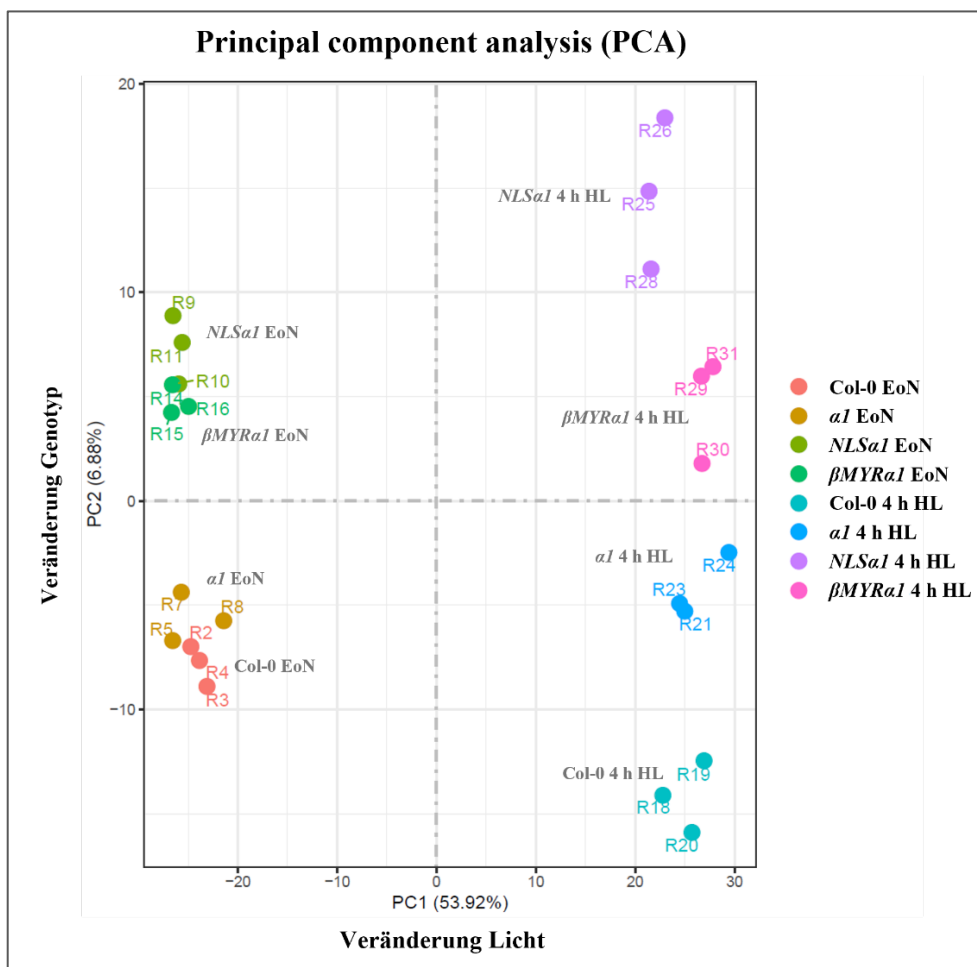


Abbildung 14: Principal component analysis (PCA) der RNA-Seq

Dargestellt sind die prozentualen Transkriptomveränderungen in Bezug auf den jeweiligen Genotyp sowie der Anpassung an 4 h HL. Für die RNA-Seq wurde RNA aus Blattproben von Col-0, *a1*, *NLSa1* und *βMYRa1* zum Ende der Nacht sowie nach 4 h HL isoliert. Die RNA-Seq wurde von der Firma Novogene in Cambridge durchgeführt.

Die PCA der RNA-Seq veranschaulicht hochdimensionale Datensätze und richtet sich dabei speziell auf zwei Hauptkomponenten (Achsen) aus. In diesem Fall stellt die x-Achse Transkriptom-Veränderungen aufgrund der HL-Exposition und die y-Achse Veränderungen, die durch den jeweiligen Genotyp hervorgerufen wurden, dar. Es zeigte sich, dass ca. 60 % der Variationen bzw. Transkriptom-Veränderungen auf die Veränderungen der Lichtverhältnisse und des untersuchten Genotyps zurückzuführen sind (Abb. 14). Die Datenpunkte von Col-0 und *α1* liegen zum Zeitpunkt EoN dicht beieinander. Dies ist auch bei den Mutanten *NLSα1* und *βMYRα1* der Fall, allerdings liegen diese Datenpunkte deutlich über denen vom Wildtyp Col-0 und *α1* und lassen Veränderungen bereits vor der HL-Behandlung erahnen. Nach 4 h HL liegen die Datenpunkte aller Genotypen übereinander bzw. auf einer senkrechten Linie, jedoch besteht nun ein größerer Abstand sowohl zwischen Col-0 und *α1* als auch zwischen *NLSα1* und *βMYRα1*. *NLSα1* weist im Zuge der HL-Akklimatisierung die größten Veränderungen im Transkriptom auf. Dieses vorläufige Ergebnis deutet daraufhin, dass die Lokalisierung der katalytischen α -Untereinheit von SnRK1 eine wichtige Rolle bei der Akklimatisierung unter HL aufgrund von Transkriptom-Veränderungen spielt.

3.2.3 Untersuchungen der Zuckergehalte als mögliches Signal

Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass die SnRK1 durch den Zuckerstoffwechsel reguliert wird: Hohe Zuckergehalte im Cytosol inaktivieren, niedrige Zuckergehalte aktivieren die SnRK1. Gleichzeitig fungiert Zucker als Signal bei der Akklimatisierung unter HL. Umgekehrt reguliert die SnRK1 auch den Zuckerstoffwechsel. Sie hemmt z. B. durch die Phosphorylierung der Saccharose-Phosphat-Synthase die Saccharosebiosynthese (Zirngibl *et al.*, 2023). Aufgrund dieser essenziellen Aspekte wurde der Zuckergehalt sowie die Transkription von an der Zuckerbiosynthese beteiligten Genen untersucht, um mögliche Auswirkungen der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 auf den Zuckerstoffwechsel und die Signalweiterleitung im Zuge der HL-Akklimatisierung aufzudecken.

Hierfür wurde zunächst mittels GC der Zuckergehalt, im speziellen von Fructose, Glucose und Saccharose, von den unterschiedlichen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL bestimmt (Abb. 15).

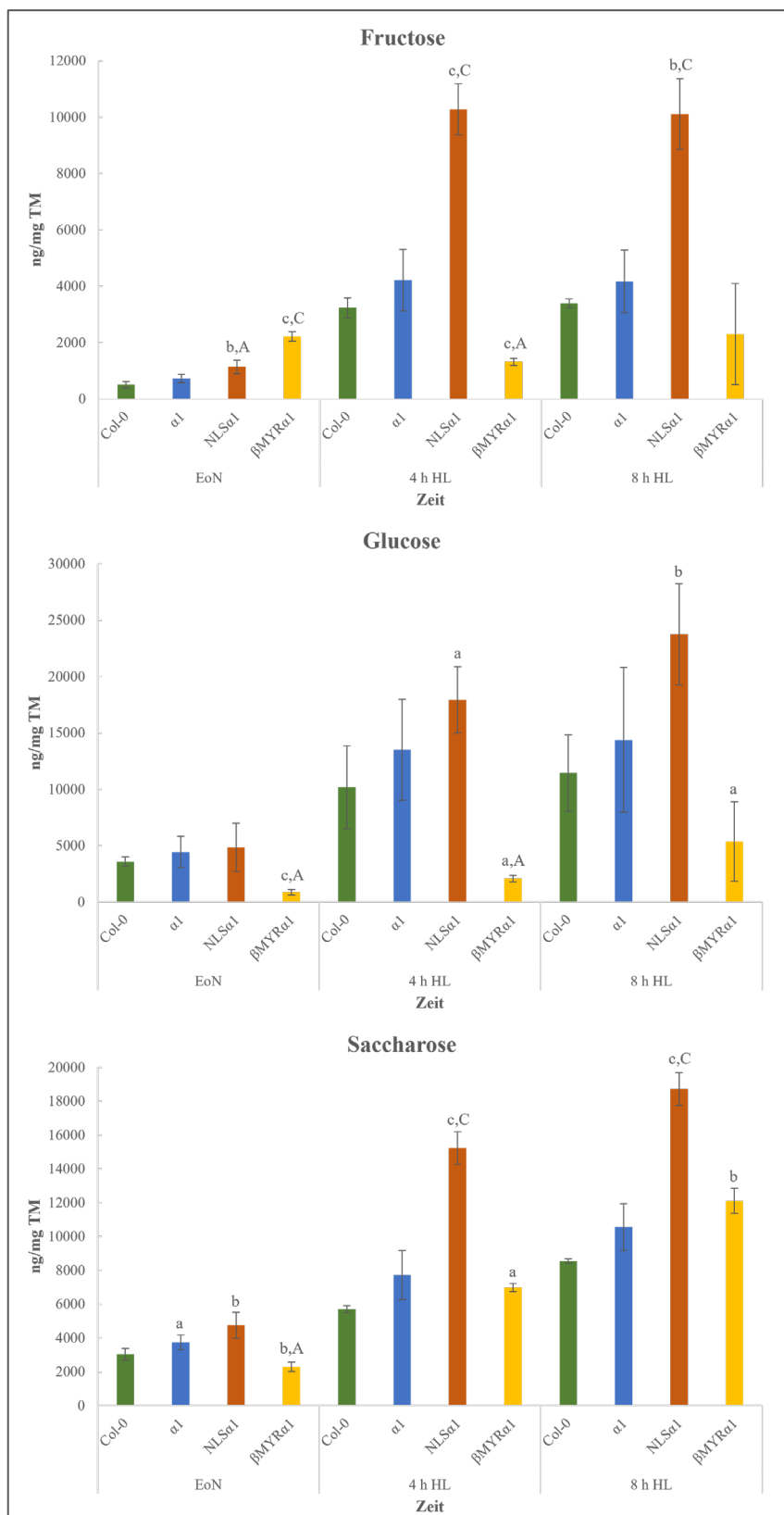


Abbildung 15: Bestimmung der Zuckergehalte Fructose, Glucose und Saccharose unter HL-Bedingungen mittels GC-Analyse

In der Abbildung ist der Zuckergehalt an Fructose, Glucose und Saccharose der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht, nach 4 h -, 8 h - und 24 h HL dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante $\alpha 1$ (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Die Zuckergehalte der Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *α1* signifikant verändert. Bereits zum Ende der Nacht lag der Zuckergehalt von *NLSα1* über dem von Col-0. Im Zuge der HL-Akklimatisierung steigerte sich der Zuckergehalt zwar auch bei Col-0 und *α1*, jedoch nicht in dem signifikanten Ausmaß wie von *NLSα1*. Beispielsweise besaß *NLSα1* nach 8 h HL mindestens doppelt so viel Fructose, Glucose oder Saccharose wie Col-0. Demnach scheint die Lokalisierung der α -Untereinheit von SnRK1 im Zellkern stimulierende Auswirkungen auf die Zuckerbiosynthese zu haben. Im Gegensatz dazu blieb der Gehalt an Fructose und Glucose in *βMYRα1* im HL deutlich unter dem von Col-0. Bei Saccharose jedoch überstieg er den des Wildtyps bereits nach 4 h HL. Neben dem extrem hohen Zuckergehalt der *NLSα1* zeigten jedoch alle Genotypen einen Anstieg des Zuckergehalts im Zuge der HL-Akklimatisierung. Das Ergebnis konnte unabhängig wiederholt und bestätigt werden.

Nachdem signifikante Unterschiede bei dem Zuckergehalt der Mutanten aufgedeckt werden konnten, wurde die Transkription von an der Zuckerbiosynthese beteiligten Genen mittels qPCR-Analysen als mögliche Ursache der veränderten Zuckergehalte analysiert. Hierbei wurden sowohl cytosolische als auch plastidäre Gene untersucht (Abb. 16 & 17).

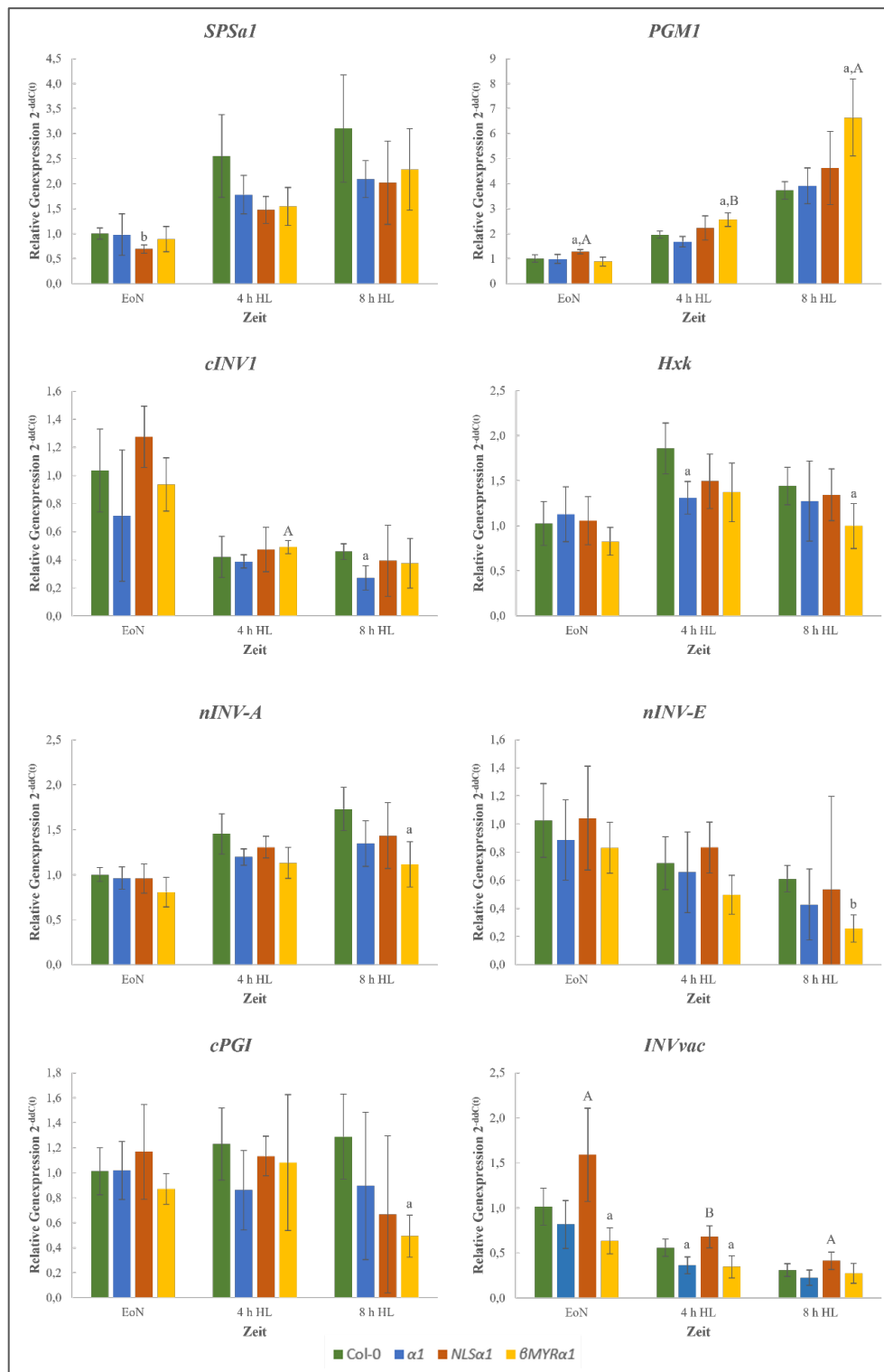


Abbildung 16: Änderungen der relativen Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten, cytosolischen Genen unter HL-Bedingungen

In der Abbildung ist die Anpassung der relativen Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten, cytosolischen Genen (Ausnahme: *INVvac* lokalisiert in Vakuole) der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *al* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$). Die in der Abbildung untersuchten Genexpressionen waren: *SPSa1* - Saccharose-Phosphat-Synthase a1, *PGMI* - Phosphoglucomutase 1, *cINV1* - Cytosolische Invertase 1, *Hxk* - Hexokinase, *nINV-A* - Neutrale Invertase A, *nINV-E* - Neutrale Invertase E, *cPGI* - Cytosolische-Phosphogluucose-Isomerase, *INVvac* - Vakuoläre Invertase.

Die Expression der untersuchten Gene des Kohlenhydratstoffwechsels verhielt sich in den Mutanten *NLSα1* und *βMYRα1* ähnlich zur Kontrollmutante *α1* und zu Col-0, wobei einzelne Transkripte, absolut betrachtet, abwichen, sich im Zuge der HL-Akklimatisierung in der Tendenz jedoch gleich verhielten. Die Untersuchung zeigte keine erhöhte Expression in der *NLSα1*-Linie, der Mutante mit dem stark erhöhten Zuckergehalt, im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 16). Bei der Genexpression der Hexokinase (*Hxk*) waren die Expressionswerte zum Ende der Nacht in allen Genotypen ähnlich, wobei sie bei allen Genotypen nach 4 h HL als Reaktion auf das HL anstiegen und nach 8 h HL wieder leicht absanken. Es konnte nur bei wenigen Genen, wie z. B. bei der *VACUOLÄREN INVERTASE (INVvac)* oder der *PHOSPHOGLUCOMUTASE 1 (PGMI)*, ein signifikanter Unterschied der Expression zwischen den Mutanten und dem Wildtyp Col-0 sowie der Kontrollmutante *α1* festgestellt werden. Ähnlich verhielt es sich auch bei den plastidären, an der Zuckerbiosynthese beteiligten Genen *BETA-AMYLASE 3 (BAM3)* und *PLASTIDÄRE-PHOSPHOGLUCOSE-ISOMERASE (pPGI)* (Abb. 17).

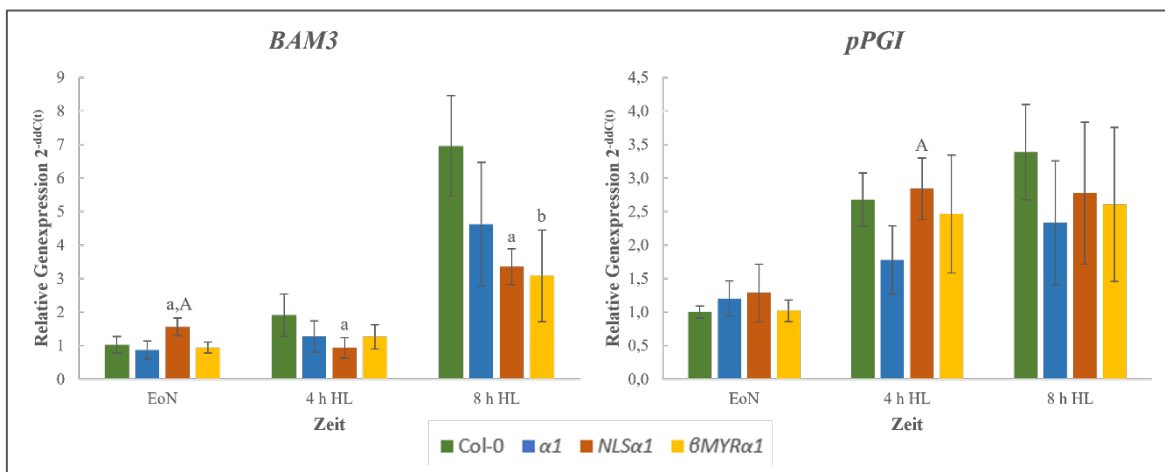


Abbildung 17: Änderungen der relativen Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten, plastidären Genen unter HL-Bedingungen

In der Abbildung ist die Anpassung der relativen Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten, plastidären Genen der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 4 h und 8 h HL dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante $\alpha 1$ (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$). Die in der Abbildung untersuchten Genexpressionen waren: *BAM3* - Beta-Amylase 3, *pPGI* - Plastidäre-Phosphoglucose-Isomerase.

Sowohl für *BAM3* als auch *pPGI* verhielten sich *NLSα1* und $\beta MYR\alpha 1$ ähnlich zum Wildtyp Col-0 und zur Kontrollmutante $\alpha 1$. Im Zuge der HL-Akklimatisierung wies Col-0 nach 8 h HL die höchste Expression von *BAM3* und *pPGI* auf.

In den für die Experimente verwendeten Lichtintensitäten ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurde die SnRK1 aufgrund der stimulierten Photosynthese und dem resultierenden, erhöhten Zuckergehalt in der Zelle inaktiviert. Gleichzeitig erfolgte die Speicherung und Umwandlung der überschüssigen Energie (Glucose) in Form von Stärke in den Chloroplasten. Da die Mutante *NLSa1* erhöhte Fructose-, Glucose- und Saccharose-Gehalte unter HL im Vergleich zu Col-0 und *α1* aufwies, wurde nachfolgend die Stärkeakkumulation zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL untersucht (Abb. 18).

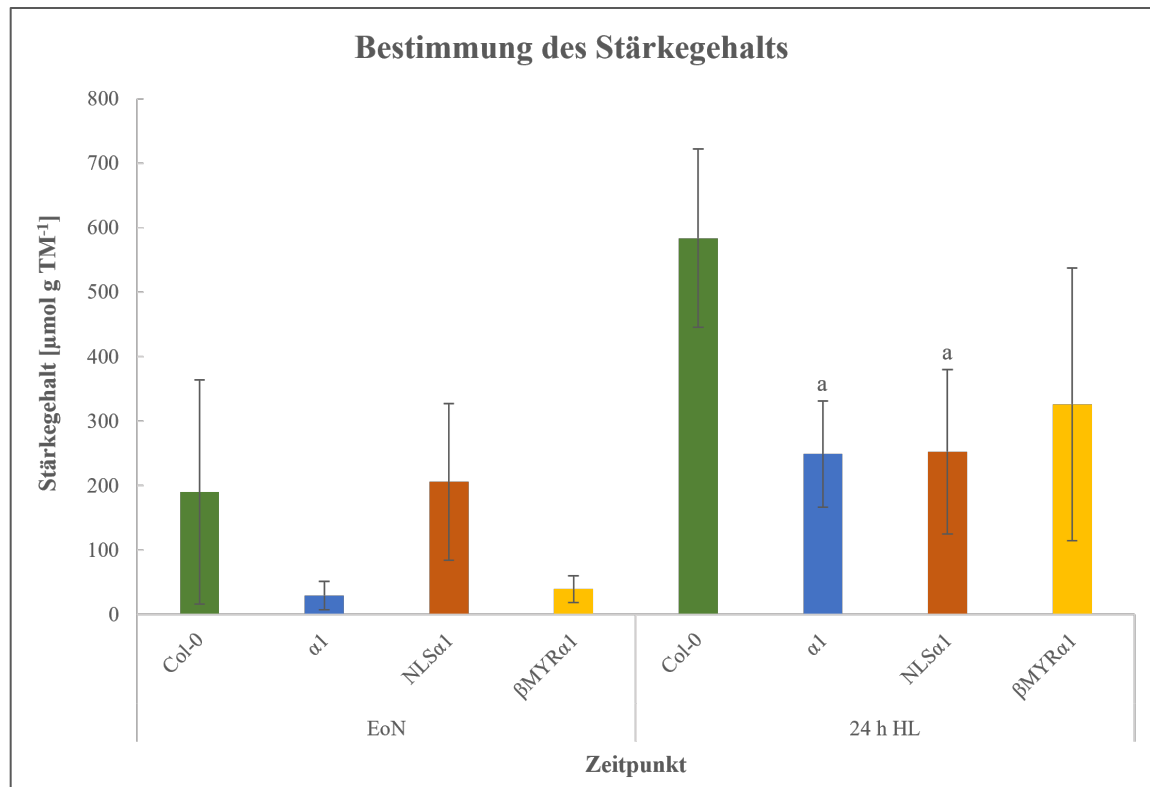


Abbildung 18: Bestimmung des Stärkegehalts zum Ende der Nacht sowie unter HL-Bedingungen

In der Abbildung ist der Stärkegehalt der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *α1* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Zum Ende der Nacht wies *NLSa1* einen sehr ähnlichen Stärkegehalt wie Col-0 auf, während sich *βMYRa1* wie *α1* verhielt. Nach 24 h HL stieg der Stärkegehalt bei allen untersuchten Genotypen an. Während sich der Stärkegehalt bei Col-0 knapp verdreifachte und bei *α1* und *βMYRa1* um mehr als ein achtfaches steigerte, konnte *NLSa1* kaum zusätzliche Stärke akkumulieren. Dieses Ergebnis konnte unabhängig repliziert und bestätigt werden. Dass der Stärkegehalt zum Ende der Nacht in allen Genotypen niedriger als im HL war, ist auf den Verbrauch von Stärke als Energiereserve in der Nacht zurückzuführen.

3.2.4 Auswirkungen der veränderten Zuckergehalte auf stoffwechselrelevante Metabolite

Der zentrale Kohlenhydratstoffwechsel in Pflanzen umfasst die Photosynthese, die CO₂-Fixierung, den Abbau von Kohlenhydraten, den Citratzyklus sowie die Atmungskette. All diese Prozesse versorgen die Pflanze mit Energie, Kohlenhydraten und einer Vielzahl weiterer, essenzieller Stoffwechselprodukte wie z. B. AS, die die Bausteine der Proteine darstellen. Aus den vorhergehenden Untersuchungen konnten veränderte Zuckergehalte, besonders bei *NLSa1* (erhöhte Zuckerwerte), festgestellt werden. Neben der Zuckerbiosynthese gibt es jedoch noch andere Wege des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels, wie z. B. stickstoffabhängige Wege bzw. die C/N-Homöostase. Als Vertreter stickstoffhaltiger Metabolite wurden mittels LC-MS/MS-Analysen die AS untersucht (Abschnitt 2.7). In der folgenden Abbildung 19 ist der Gesamtgehalt an AS der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie im Zuge der HL-Akklimatisierung dargestellt.

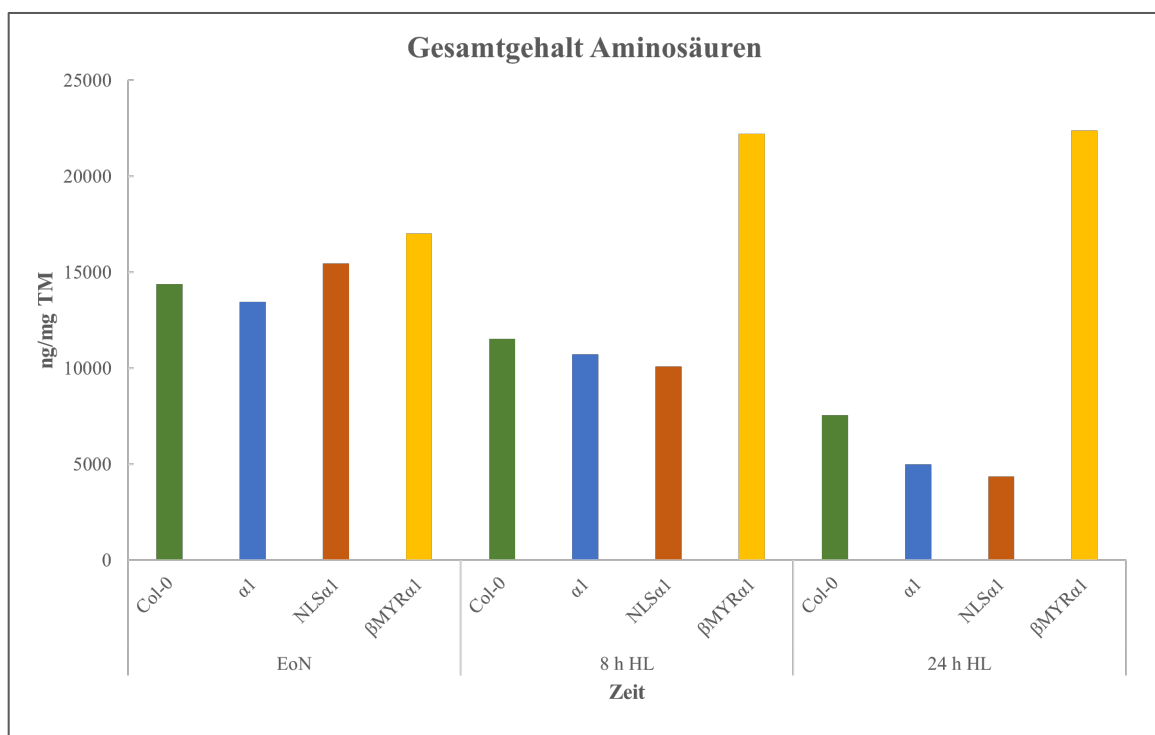


Abbildung 19: Gesamtgehalt der AS der verschiedenen Genotypen im Zuge der HL-Akklimatisierung

In der Abbildung ist der AS-Gehalt der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 8 h und 24 h HL dargestellt. Die Daten wurden mittels LC-MS/MS erhoben. Der Gesamtgehalt der AS umfasst mit Ausnahme von Cystein und Tryptophan die folgenden AS: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin.

Zum Ende der Nacht wiesen alle Genotypen einen AS-Gehalt von um die 15 µg pro mg TM auf, wobei die Mutante *βMYRa1* den höchsten AS-Gehalt besaß. Nach 8 h und 24 h HL nahm der AS-Gehalt bei Col-0, *α1* und *NLSa1* stetig ab. Im Gegensatz dazu steigerte sich im Lauf der HL-Behandlung der AS-Gehalt bei *βMYRa1*. Nach 24 h HL besaß sie einen mehr als dreimal so hohen AS-Gehalt wie Col-0 und *α1*. *NLSa1* hingegen verhielt sich unter HL wie die Kontrollmutante *α1* und besaß einen AS-Gehalt von knapp über der Hälfte von Col-0. Nachfolgend ist beispielhaft die Verteilung der AS der verschiedenen Genotypen nach 8 h HL dargestellt (Abb. 20).

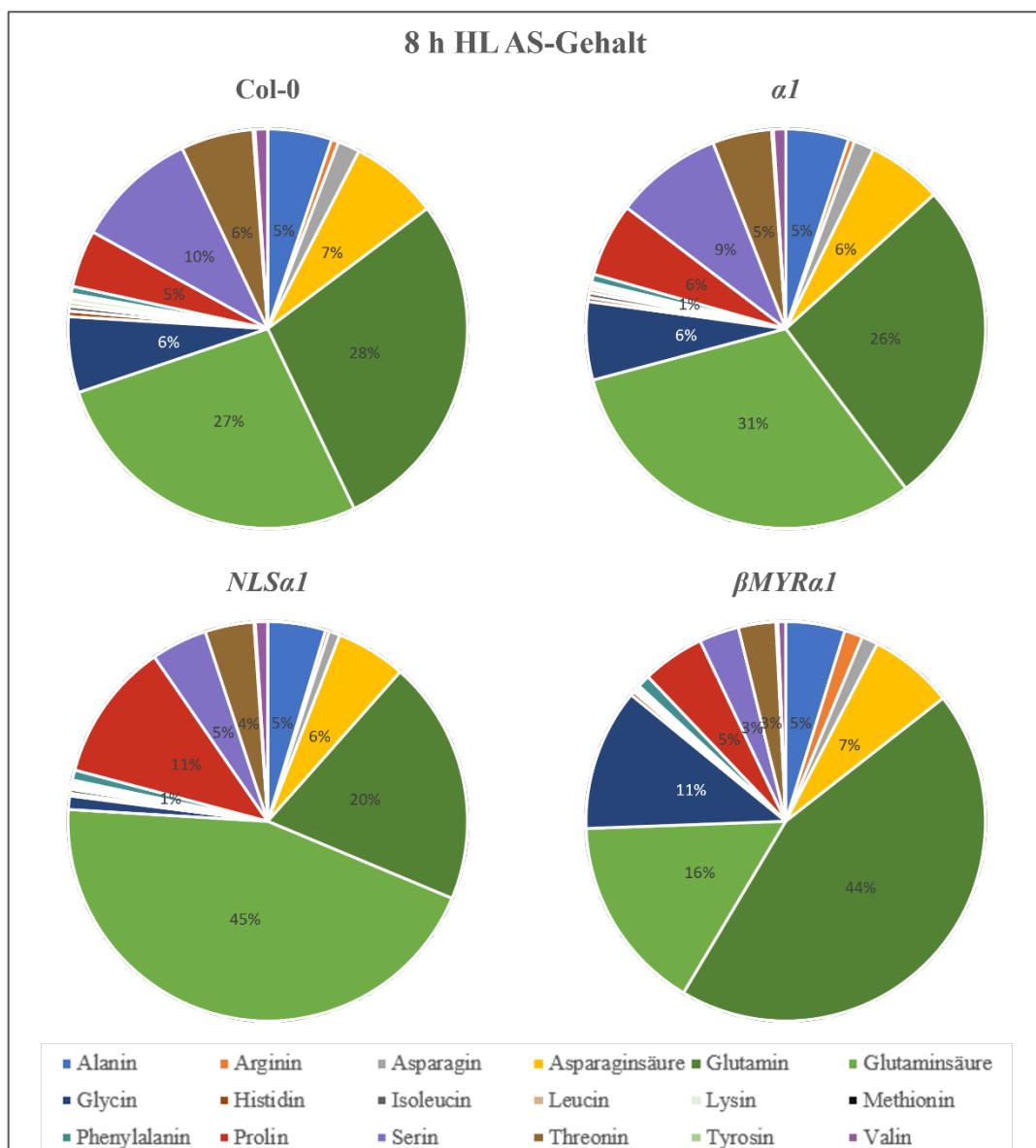


Abbildung 20: Prozentuale Verteilung der AS nach 8 h HL

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der AS mit Ausnahme von Cystein und Tryptophan nach 8 h HL. Die Daten wurden mittels LC-MS/MS erhoben.

Die zwei prozentual am meist vertretenen AS waren Glutamin und Glutaminsäure bei allen Genotypen nach 8 h HL. Bei $\beta MYR\alpha 1$ war im Verhältnis zu den anderen Genotypen die Akkumulation von Glutamin im Vergleich zu Glutaminsäure deutlich höher. Des Weiteren besaß sie einen größeren Anteil an Glycin im Vergleich zu den anderen Genotypen. Die Analyse des AS-Gehalts konnte zeigen, dass die Lokalisation der α -Untereinheit der SnRK1 im Cytosol ($\beta MYR\alpha 1$) Auswirkungen auf den AS-Gehalt, im speziellen eine Zunahme bzw. Anreicherung unter HL, hatte.

Da Veränderungen des AS-Gehalts bei $\beta MYR\alpha 1$ im Zuge der HL-Akklimatisierung festgestellt werden konnten, wurde ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels, der Citratzyklus, untersucht. Der Citratzyklus ist essenziell für die Synthese von AS, da er die Kohlenstoffgerüste, Energie sowie Reduktionsmittel für die Synthese bereitstellt. Im Folgenden wurde der Gehalt von essenziellen, am Citratzyklus beteiligten Organischen Säuren (OS) unter HL mittels LC-MS/MS-Analysen untersucht (Abb. 21).

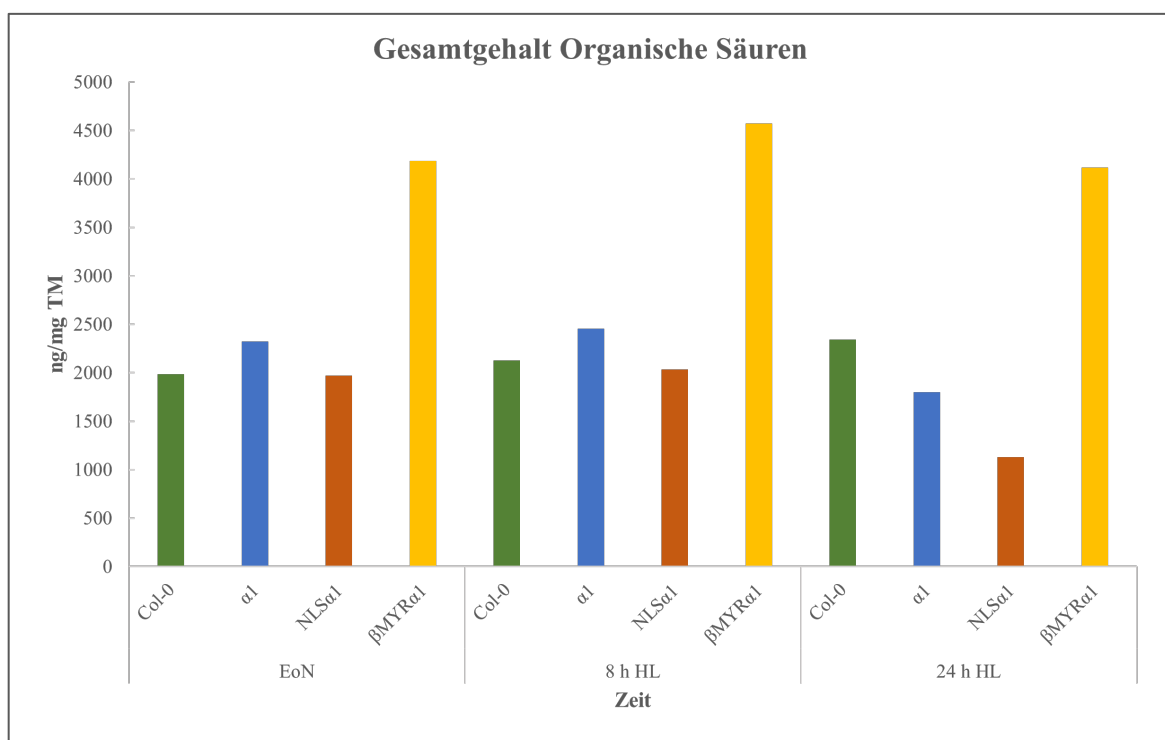


Abbildung 21: Gesamtgehalt ausgewählter OS des Citratzyklus der verschiedenen Genotypen im Zuge der HL-Akklimatisierung

Dargestellt ist der Gehalt ausgewählter OS aus dem Citratzyklus der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 8 h und 24 h HL. Die Daten wurden mittels LC-MS/MS erhoben. Der Gesamtgehalt OS umfasst: Fumarat, Succinat, Lactat, (Iso)Citrat, Malat, 2-Ketoglutarat, 4-Aminobuttersäure.

Zum Ende der Nacht sowie nach 8 h und 24 h HL zeigte $\beta MYR\alpha 1$ einen deutlich höheren, teilweise doppelt so großen Gesamtgehalt an OS im Vergleich zu Col-0, $\alpha 1$ und $NLS\alpha 1$. Die Mutante $NLS\alpha 1$ besaß einen Wildtyp und $\alpha 1$ ähnlichen Gesamtgehalt an OS. Die Ergebnisse der AS und OS zeigten, dass sich die Werte der $NLS\alpha 1$ reziprok zu denen der $\beta MYR\alpha 1$ verhielten. Einen beispielhaften Überblick der prozentualen Zusammensetzung der OS der verschiedenen Genotypen nach 8 h HL liefert die Abbildung 22.

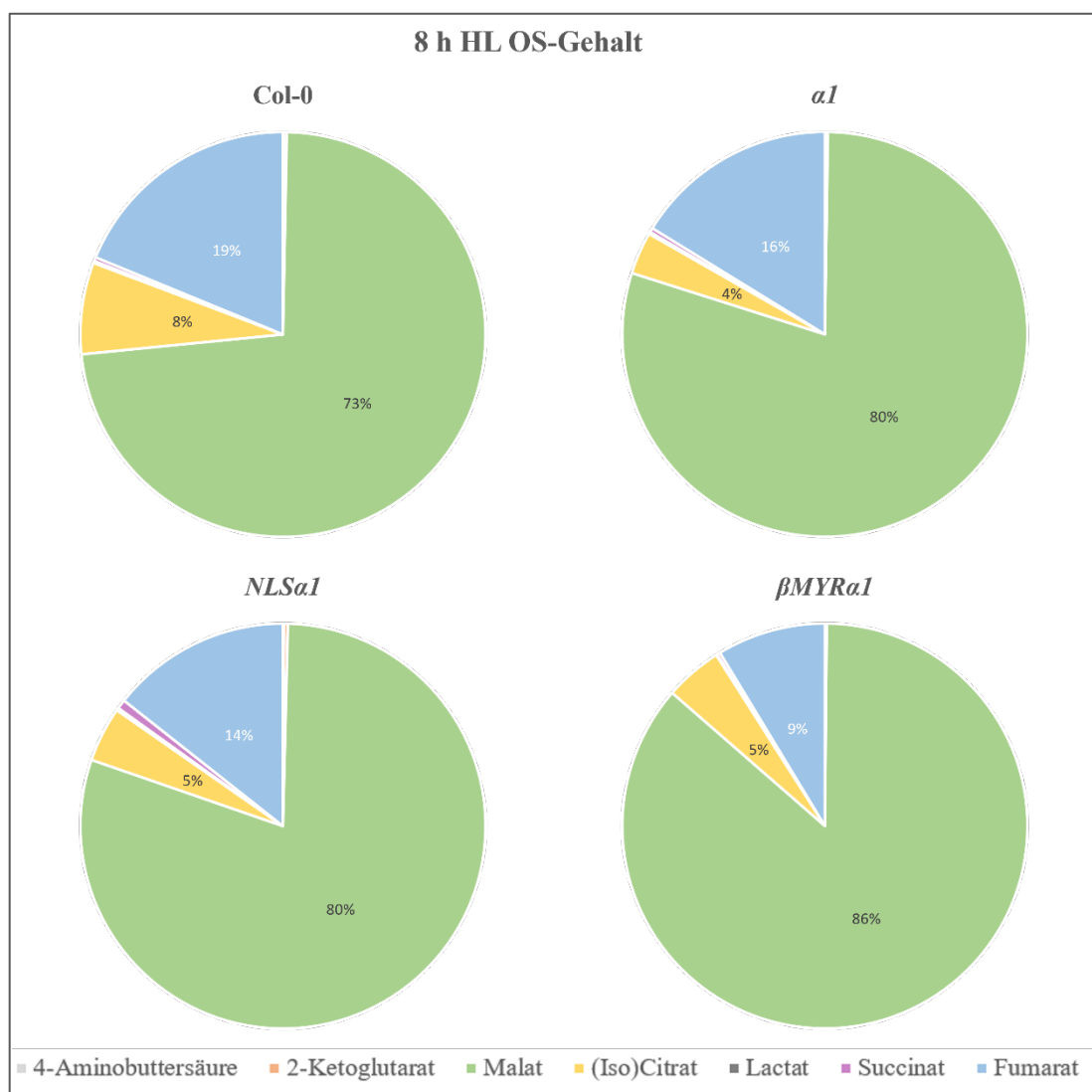


Abbildung 22: Prozentuale Verteilung ausgewählter OS des Citratzyklus nach 8 h HL

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung ausgewählter OS des Citratzyklus nach 8 h HL. Die Daten wurden mittels LC-MS/MS erhoben.

Mit um die 80 % war Malat bei allen untersuchten Genotypen mit Abstand die OS mit dem größten Gehalt. Anschließend folgten Fumarat und (Iso)Citrat. Demnach kam es bei $\beta MYR\alpha 1$ zu keiner Anreicherung einer OS, die nicht auch bei den anderen Genotypen angereichert wurde. Es zeigte sich jedoch eine tendenzielle, relative Abnahme von Fumarat und eine relative Zunahme von Malat in $\beta MYR\alpha 1$ im Vergleich zum Wildtyp Col-0.

Zusammenfassend konnten wesentliche Unterschiede im AS-Gehalt sowie im Gehalt an dem Citratzyklus beteiligter OS festgestellt werden, insbesondere durch die stark erhöhten Werte bei $\beta MYR\alpha 1$, die auf eine entscheidende Rolle der Lokalisierung der α -Untereinheit von SnRK1 im Kohlenhydratstoffwechsel hinweisen.

3.2.5 Auswirkungen auf die Photosynthese

In den vorherigen Untersuchungen konnten unterschiedliche Auswirkungen, beispielsweise durch den erhöhten Zuckergehalt bei *NLSa1* unter HL oder dem erhöhten AS- und OS-Gehalt bei $\beta MYR\alpha 1$, aufgrund der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit der SnRK1 festgestellt werden. Wie wirkten sich diese auf die Photosynthese bzw. lichtabhängige Parameter aus? Die Photosynthese findet in den Chloroplasten der Pflanzenzellen statt, die den lichtabsorbierenden Farbstoff Chlorophyll enthalten. Folglich wurde zuerst der Gehalt an Chlorophyll a und -b sowie einer weiteren pflanzlichen Farbstoffgruppe, der Carotinoide, bestimmt (Abb. 23).

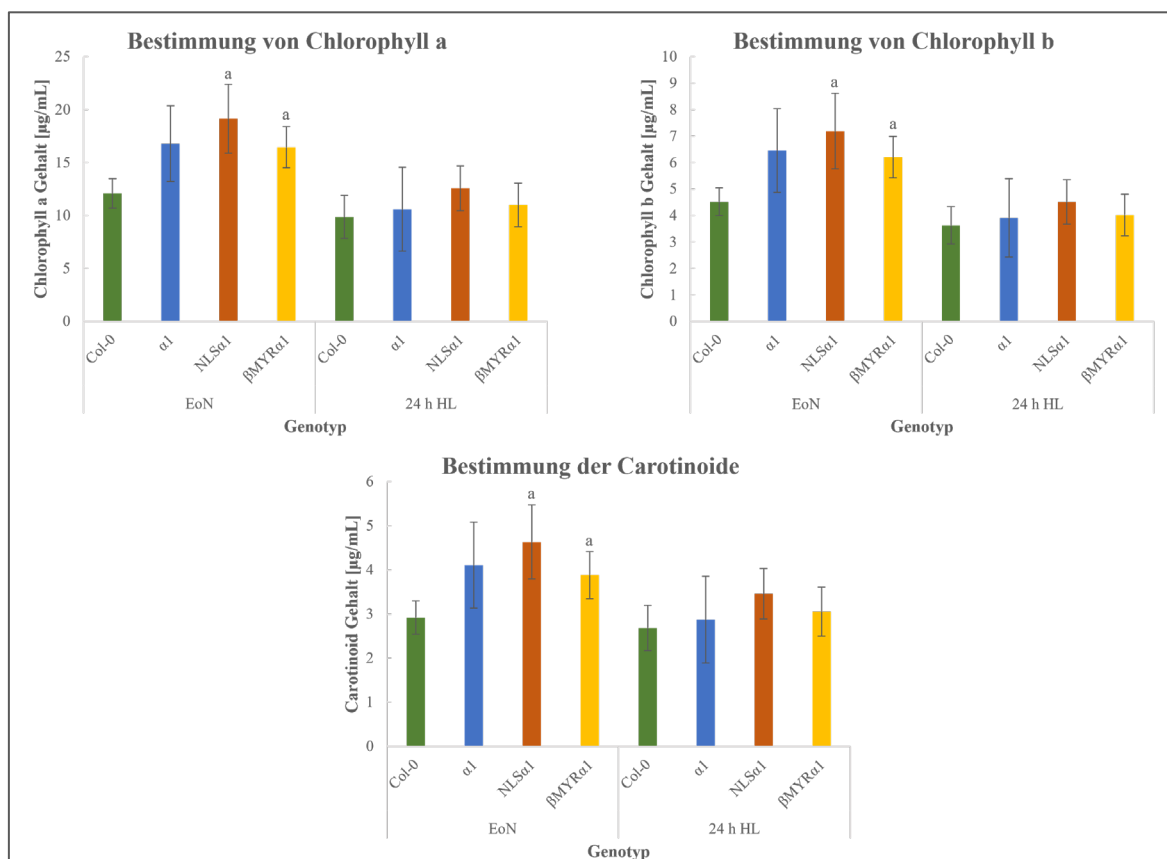


Abbildung 23: Bestimmung des Gehalts von Chlorophyll a, - b und der Carotinoide zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL

In der Abbildung ist der Chlorophyll a, Chlorophyll b und der Carotinoid-Gehalt der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *al* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Die Ergebnisse der Bestimmung von Chlorophyll a, -b sowie der Carotinoide zeigte ein ähnliches Verhältnis der Genotypen zueinander. Zum Ende der Nacht war der Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt bei *NLS α 1* am höchsten, gefolgt von *α 1*, *β MYR α 1* sowie Col-0. Nach 24 h HL nahm der Gehalt bei allen Genotypen ab. Es konnten bis auf den Zeitpunkt zum Ende der Nacht keine signifikanten Unterschiede der Mutanten zum Wildtyp Col-0 bzw. zur Kontrollmutante *α 1* aufgezeigt werden. Folglich hat die Lokalisation der α -Untereinheit der SnRK1 keine signifikanten Auswirkungen auf den Gehalt von Chlorophyll a, -b sowie der Carotinoide im Zuge der HL-Akklimatisierung.

Für die weitere Untersuchung der Photosynthese wurden Fluoreszenz-Messungen mittels PAM durchgeführt (Abschnitt 2.8.2). Mit Hilfe der Messung der Chlorophyllfluoreszenz ist es möglich, den Einfluss von natürlichen Stressoren, wie z. B. Licht, auf die Funktionalität des Photosystems II nachzuweisen. Die Lichtenergie, die von den Chlorophyllmolekülen absorbiert wird, wird unter anderem zum Betreiben der Photosynthese verwendet. Überschüssige Lichtenergie wird zu einem geringen Anteil als Fluoreszenzlicht abgestrahlt oder in Form von Wärme durch „Nicht-photochemisches Quenching“ (NPQ) abgegeben. Das NPQ dient der Pflanze als Schutz vor oxidativen Schäden durch Sauerstoffradikale. PAM-Messungen werden mit Hilfe von aktinischem Licht und sogenannten „saturierenden Pulsen“ durchgeführt, die essenziell für die Messung der maximalen Fluoreszenz aller Chlorophyllmoleküle sind. Neben der Messung des NPQ wurden auch die Parameter F_v/F_m und qP gemessen und berechnet. qP steht für das photochemische Quenching und ist ein Maß für die Aktivität des Photosystems II im Licht. F_m bezeichnet das maximale Fluoreszenzlevel, während die variable Fluoreszenz F_v sich aus der Differenz zwischen der maximalen und minimalen Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand ergibt. Das Verhältnis F_v/F_m stellt die maximale Quantenausbeute und ein Maß für mögliche Störungen der photochemischen Lichtnutzung dar. In Abbildung 24 sind die gemessenen Parameter mittels PAM-Messungen dargestellt.

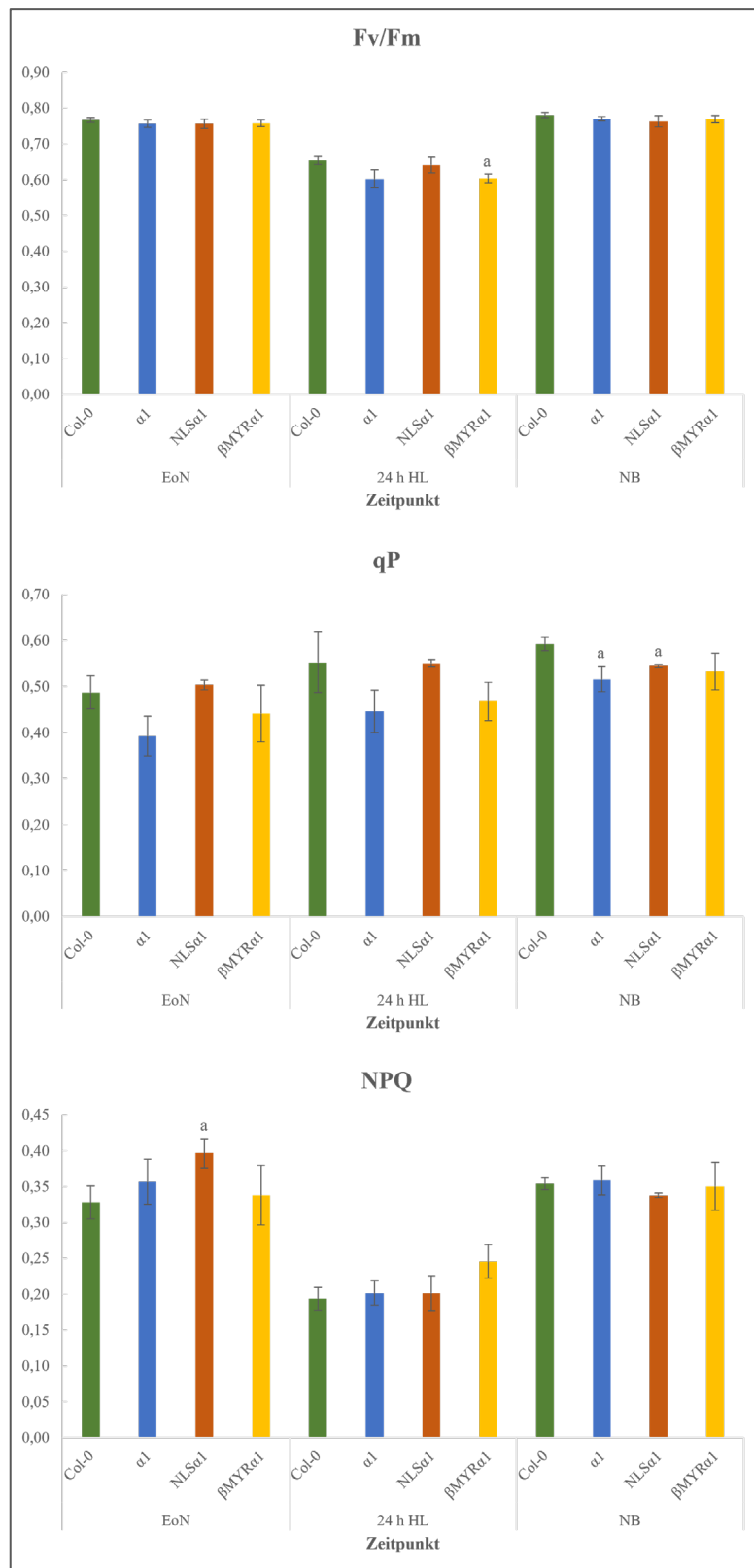


Abbildung 24: Bestimmung verschiedener Photosyntheseparameter mittels PAM-Messungen zum Ende der Nacht, nach 24 h HL sowie unter Normalbedingungen

In der Abbildung sind die Photosyntheseparameter Fv/Fm (variable/maximale Fluoreszenz), qP (Photochemisches Quenching), und NPQ (Nicht-Photochemisches Quenching) der verschiedenen Genotypen zum Ende der Nacht, 24 h HL sowie unter Normalbedingungen (Messung zur Mittagszeit) dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *al* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Die Auswertung der PAM-Messungen zeigte für die Parameter F_v/F_m , qP und NPQ keine Auffälligkeiten zwischen den Mutanten und Col-0, bzw. verhielten sie sich zum Ende der Nacht sowie nach 24 h HL und unter Normalbedingungen wildtypartig. Des Weiteren konnten nur wenige signifikante Unterschiede, beispielsweise beim NPQ von *NLSa1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 zum Ende der Nacht, festgestellt werden. Die Werte zum Ende der Nacht wichen kaum von denen unter Normalbedingungen ab. Zusammenfassend hatte die differentielle Lokalisierung der α -Untereinheit der SnRK1 keine Auswirkungen auf die Photosynthese bzw. auf lichtabhängige Parameter.

3.3 Auswirkungen unterschiedlicher Zucker- und AS-Gehalte auf phänotypische Parameter

Für *NLSa1*, der Mutante, deren α -Untereinheit der SnRK1 im Zellkern lokalisiert ist, konnte in den vorherigen Untersuchungen ein erhöhter Zuckergehalt sowie ein knapp halb so hoher Gehalt an AS im Vergleich zum Wildtyp Col-0 festgestellt werden (Abschnitt 3.2.3 & 3.2.4). Im Gegensatz dazu wies *β MYRa1*, deren α -Untereinheit der SnRK1 im Cytosol lokalisiert ist, einen niedrigen Zuckergehalt und einen unter HL hohen AS- und OS-Gehalt auf. Wie wirkt sich dieses metabolische Ungleichgewicht auf phänotypische Parameter, wie die Größe, die Frisch- und Trockenmasse (FM, TM) sowie den Blühzeitpunkt und die Bildung von Samen, aus?

Für die Untersuchung von Unterschieden bezüglich der Masse wurden 36 Tage alte Pflanzen gewogen und die Frischmasse bestimmt. Anschließend wurden die Pflanzen getrocknet, gewogen und somit ihre Trockenmasse bestimmt (Tab. A3). Des Weiteren wurde die Größe der Pflanzen durch die Vermessung des Rosettendurchmessers bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

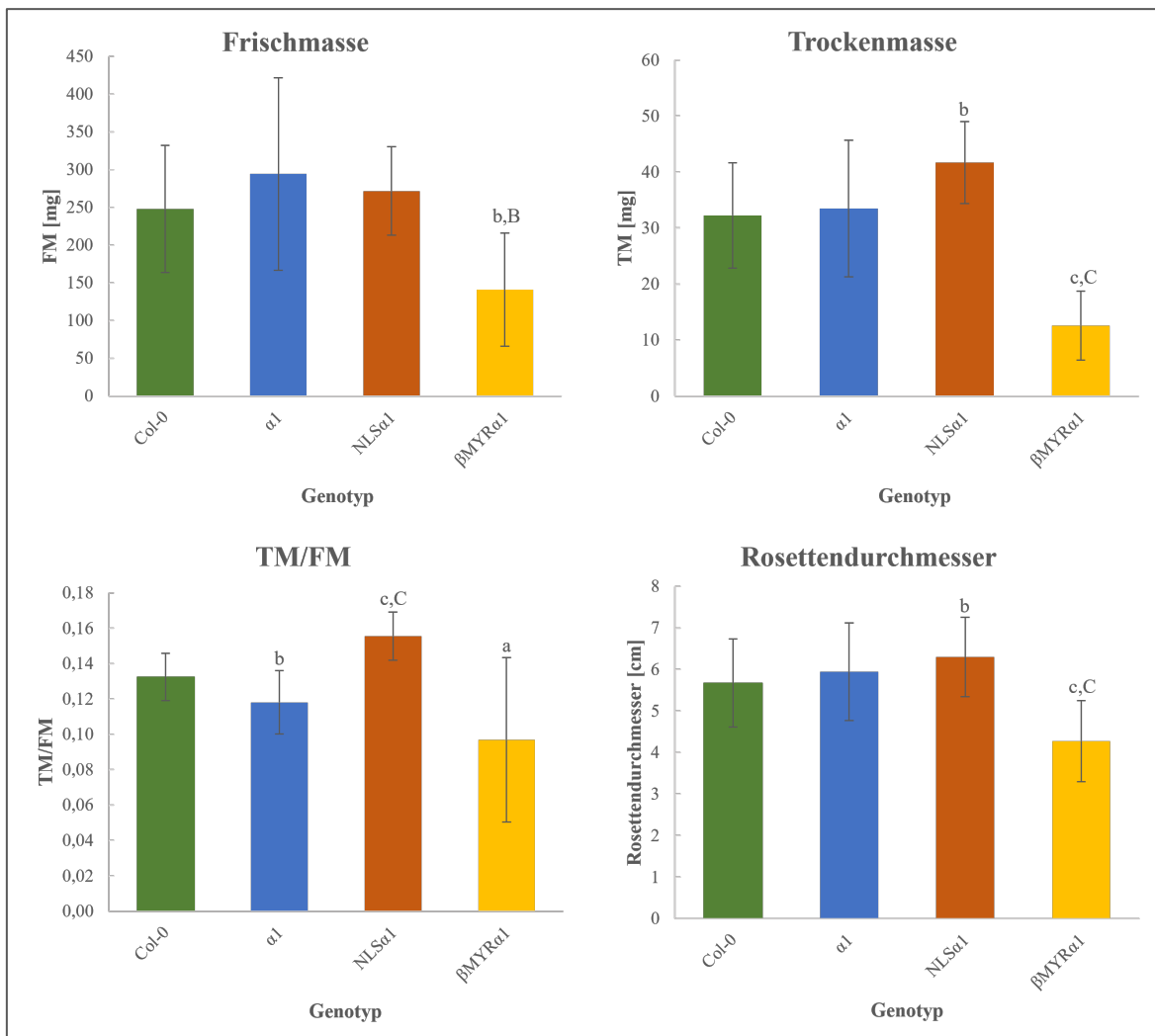


Abbildung 25: Gegenüberstellung der Trockenmasse, Frischmasse sowie deren Verhältnis und dem Rosettendurchmesser

Dargestellt sind die Frischmasse, die Trockenmasse, das Verhältnis Trockenmasse zu Frischmasse (TM/FM) sowie der Durchmesser der Rosetten der verschiedenen Genotypen. Die untersuchten Pflanzen waren 36 Tage alt. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col-0 sowie zur Kontrollmutante *al* (Großbuchstaben) wurden mit dem statistischen T-Test ermittelt (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Die Mutante *NLSa1* besaß eine ähnliche Frischmasse wie Col-0 und *al*. Allerdings wies sie eine signifikant höhere Trockenmasse auf. Besonders deutlich konnte dies im Verhältnis Trockenmasse zu Frischmasse gezeigt werden (Abb. 25). *βMYRa1* hingegen zeigte sowohl bei der Frischmasse als auch bei der Trockenmasse deutlich geringere Werte im Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen. Beispielsweise betrug die Trockenmasse von *βMYRa1* nur gut ein Drittel des Wildtyps Col-0. Die geringere Frisch- und Trockenmasse spiegelte sich auch in der Untersuchung der Größe bzw. des Rosettendurchmessers wider. Hier war *βMYRa1* mit im Schnitt 4,5 cm Rosettendurchmesser die kleinste der untersuchten Genotypen und lag damit 1 cm unter Col-0. Ein signifikanter Unterschied des Rosettendurchmessers konnte bei *NLSa1* festgestellt werden. Die Mutante war mit im Schnitt 6,5 cm

ca. 1 cm größer als der Wildtyp Col-0. Die Auswertung der Masse sowie des Rosettendurchmessers zeigte, dass die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 einen Einfluss auf phänotypische Parameter, wie beispielsweise das Gewicht oder die Größe, hatte.

Des Weiteren wurden phänotypische, die Reproduktion betreffende Parameter untersucht. Hierfür wurden die Blütenstände von 62 Tage alten Pflanzen sowie der Zeitpunkt der Blüte (Blüte 1 cm über Rosette) dokumentiert und verglichen. Abbildung 26 & 27 zeigen eine Gegenüberstellung der Blütenstände sowie den Zeitpunkt der Blüte der unterschiedlichen Genotypen.



Abbildung 26: Vergleich der Blütenstände der Genotypen

Die Abbildung zeigt je zwei Pflanzen von Col-0, $\alpha 1$, $NLS\alpha 1$ und $\beta MYR\alpha 1$, die 62 Tage unter Normalbedingungen in der Klimakammer wuchsen.

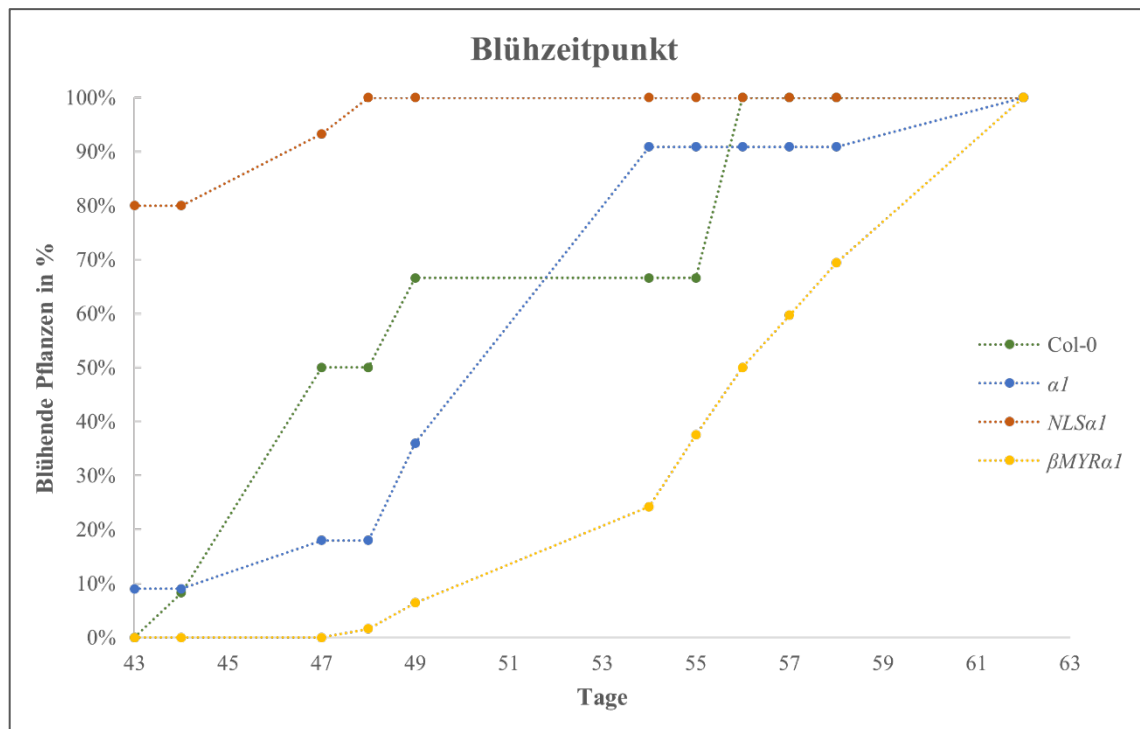


Abbildung 27: Blühzeitpunkt der unterschiedlichen Genotypen

Dargestellt ist der Blühzeitpunkt (Blüte 1 cm über Rosette) der verschiedenen Genotypen. Die Untersuchung begann an Tag 43 der Anzucht, an dem bereits erste Pflanzen von $\alpha 1$ sowie ein Großteil der Pflanzen von *NLSa1* blühten. Nach 62 Tagen blühten alle Pflanzen und das Experiment wurde beendet.

Die Gegenüberstellung der Blütenstände zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen *NLSa1* und dem Wildtyp Col-0 sowie der Kontrollmutante $\alpha 1$. Lediglich die Blütenstände von $\beta MYRa1$ waren im Vergleich zu den Kontroll-Linien deutlich kleiner. Einen Zusammenhang bzw. eine Erklärung für den kleineren Blütenstand liefert womöglich der Blühzeitpunkt (Abb. 27).

Der Blühzeitpunkt von *NLSa1* war deutlich früher als der der anderen untersuchten Genotypen. Bereits nach 43 Tagen Anzucht blühten 80 % der Pflanzen von *NLSa1* und nach 48 Tagen waren es 100 %. Im Gegensatz dazu blühten die ersten Pflanzen der $\beta MYRa1$ -Linie erst nach ca. 48 Tagen, einem Zeitpunkt, an dem bereits 50 % der Wildtyp-Pflanzen in der Blüte standen. Die im Schnitt fünf Tage spätere Blüte und das langsamere Wachstum von $\beta MYRa1$ können als Gründe angesehen werden, dass der Blütenstand nach 62 Tagen Anzucht noch deutlich kleiner im Vergleich zu den anderen Genotypen war.

Von einigen Pflanzen wurden im Anschluss die ausgereiften Samen aufgefangen und gewogen (Tab. A4). Die Masseverteilungen der Samen von jeweils zehn Pflanzen pro Genotyp sind in Abbildung 28 dargestellt.

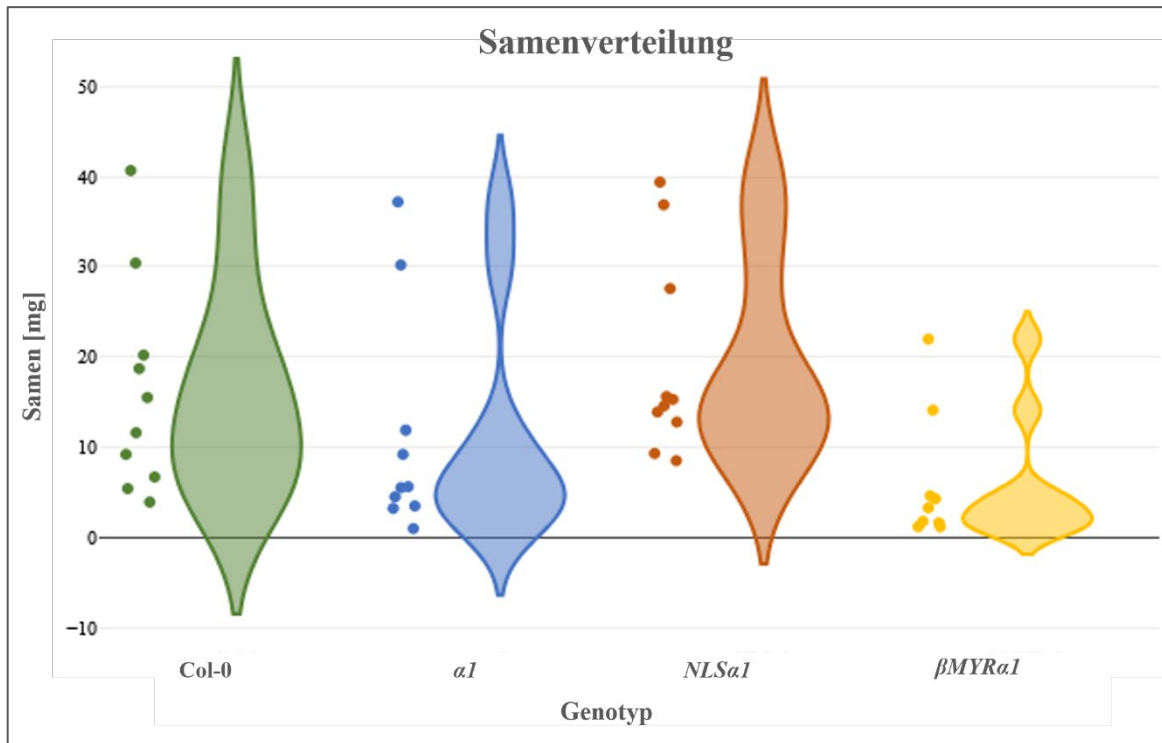


Abbildung 28: Violin-Plot der Samenverteilung der verschiedenen Genotypen

Dargestellt ist die Verteilung der Massen an Samen pro Pflanze der verschiedenen Genotypen. Es wurde jeweils eine Stichprobenanzahl von 10 Pflanzen untersucht.

Die Ergebnisse des Blühzeitpunkts sowie des Blütenstandes spiegeln sich auch in der Masseverteilung der Samen wider. Col-0 und *NLSa1* besaßen im Schnitt zwischen 10 bis 20 mg Samen pro Pflanze. Bei $\beta MYRa1$ hingegen gab es pro Pflanze zum Großteil nur 5 mg Samen.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der untersuchten Mutanten

Die von der Arbeitsgruppe Ramon *et al.* (2019) beschriebenen, auffälligen Blattphänotypen konnten bestätigt werden (Abb. 5). Neben der phänotypischen Gegenüberstellung der Mutanten erfolgte außerdem die Bestätigung der transgenen *SnRK1 α /KIN10*-Konstrukte durch den FLAG-Tag, der Aktivität der SnRK1 sowie der Überexpression von *KIN10* und des Knockouts von *KIN11*.

Die Immunodetektion mit Anti-pAMPK konnte die phosphorylierte α -Untereinheit der SnRK1 durch eine sichtbare Bande in allen Linien nachweisen, wobei es einen auffälligen Größenunterschied der Bande von Col-0 im Vergleich zu den Mutanten, die etwas kleiner als die der transgenen Linien war, gab (Abb. 8). Dies hängt mit dem FLAG-Tag und den Lokalisierungssequenzen zusammen, die das Molekulargewicht von SnRK1 leicht erhöhen, wie die Arbeitsgruppe von Ramon *et al.* (2019) feststellte, und weist auf eine erfolgreiche Insertion des *SnRK1 α /KIN10*-Konstrukts hin. Außerdem fällt bei dem Western Blot mit Anti-pAMPK auf, dass die Banden der Mutanten eine ähnliche Intensität aufweisen, die sogar höher als die der Col-0 Bande erscheint. Dies kann nicht mit einer unterschiedlichen Beladung des Gels zusammenhängen, da das Coomassie-Gel als Ladungskontrolle keine wesentlichen Intensitätsunterschiede der Banden zwischen den einzelnen Proben zeigte. Die ähnlich intensiven Banden der Mutanten sprechen für einen vergleichbaren Phosphorylierungsgrad sowie, durch die im Vergleich zu Col-0 stärkere Intensität der Banden, eine Überexpression von *KIN10*. Bei der Immunodetektion mit Anti-FLAG konnten nur bei den Mutanten, nicht aber bei Col-0, Banden nachgewiesen werden. Dies hängt mit dem inserierten *SnRK1 α /KIN10*-Konstrukt und dem darin enthaltenen doppelten FLAG-Tag zusammen, der auf natürliche Weise nicht im Wildtyp Col-0 vorkommt. Die Überexpression der Transgene konnte auch auf Ebene der mRNA-Gehalte nachgewiesen werden (Abb. 7). Folglich sind alle transgenen Linien als Überexpressionslinien von *KIN10* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 zu betrachten und die beobachteten Unterschiede teilweise auch durch die Überexpression zu erklären. Daher diente die *a1*-Linie, die das Wildtyp-Gen *KIN10* überexprimierte, als zusätzliche Kontrolle.

Durch die Analyse phänotypischer Parameter konnte gezeigt werden, dass die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 Auswirkungen auf Wachstums- und Reproduktionsparameter hatte. Die *NLS α 1* besaß den vom Rosettendurchmesser her größten

Phänotyp mit der schwersten Biomasse (TM), einer sehr frühen Blüte und einer mindestens wildtypartigen Ausbeute an Samen pro Pflanze. Im Gegensatz dazu zeigte die *βMYRa1* den kleinsten (Rosettendurchmesser) Phänotyp mit der folglich leichtesten Biomasse (FM, TM), mit einer späten Blüte und wenigen Samen pro Pflanze. Das veränderte Wachstum könnte außerdem im Zusammenhang mit dem veränderten Zuckergehalt sowie AS- und OS-Gehalt stehen. Allerdings konnte eine Kausalität im Zuge dieser Arbeit nicht bewiesen werden und das veränderte Wachstum könnte unabhängig von dem veränderten Metabolit-Gehalt, beispielsweise durch veränderte transkriptionelle Aktivitäten, zustande kommen.

4.2 Flavonoidbiosynthese durch differentielle, subzelluläre Lokalisation der SnRK1 unter HL nicht beeinflusst

Für die Untersuchung der Auswirkungen der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 im Zuge der HL-Akklimatisierung wurde der Anthocyangehalt sowie die relative Genexpression von an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Genen und TFs untersucht (Abb. 11 & 12). Der phänotypische Vergleich sowie die Bestimmung der Anthocyangehalte wiesen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Die Mutante *al* zeigte einen reduzierten sowie *NLSa1* und *βMYRa1* einen deutlich geringeren Gehalt an Anthocyanen im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 10). Bei allen Genotypen wurde der Anthocyangehalt im Zuge der HL-Akklimatisierung mindestens verdoppelt, wobei das Verhältnis der Genotypen zueinander im Vergleich zum Ende der Nacht gleich blieb. Daraus resultierend hatte die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit, unabhängig ob im Zellkern oder im Cytosol lokalisiert, einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von Anthocyanen. Auch die Überexpression von *KIN10* in der *al*-Mutante führte zu einer verringerten, wenngleich nicht signifikanten Abnahme des Anthocyangehalts im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch bei der Untersuchung der relativen Genexpression von an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Genen und TFs wider (Abb. 11 & 12). Gleichzeitig war die relative Genexpression der Flavonoidbiosynthese-Gene und TFs zum Ende der Nacht sowie im HL bei *NLSa1* und *βMYRa1* geringer als beim Wildtyp Col-0 und der Kontrollmutante *al*, jedoch verhielten sie sich im Verhältnis mit Bezug zur Aktivierung der Anthocyanbiosynthese unter HL-Bedingungen gleich. Daraus schlussfolgernd spielt die Lokalisierung der α -Untereinheit von SnRK1 keine Rolle bei der Antwort bzw. Steigerung der Genexpression von Flavonoidbiosynthese-Genen und TFs unter HL-Bedingungen. Vielmehr wurde die Anreicherung von Anthocyanen unter HL durch

die Überexpression von *KIN10* gehemmt, wie bereits auch bei anderen Überexpressionsmutanten von *KIN10* festgestellt werden konnte (Zirngibl *et al.*, 2023). Der Knockout der katalytischen Untereinheit *KIN11* schien sich außerdem positiv auf die Akkumulation von Anthocyanen unter HL auszuwirken, da eine Unterdrückung der SnRK1 zu einer verstärkten Aktivierung von Flavonoidbiosynthese-Genen führt (Zirngibl *et al.*, 2023).

Durch die Untersuchung der relativen Genexpression von *DIN6* und *SENI* - als direktes Ziel und physiologisch relevante Messgröße für die SnRK1-Aktivität (Baena-González *et al.*, 2007) - konnte gezeigt werden, dass die SnRK1 trotz der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit noch responsiv war. *SENI* wird durch einen Phosphatmangel induziert. *DIN6* kodiert für eine Glutamin-abhängige Asparagin-Synthetase und die Expression wird innerhalb von 3 h Dunkelheit induziert sowie von hohen Zuckergehalten inhibiert (Baena-González *et al.*, 2007). Besonders auffällig war die enorme Überexpression von *DIN6* und *SENI* zum Ende der Nacht bei *NLSa1* (Abb. 13). Unter metabolischen Stressbedingungen, die zur Energieverarmung führen, wie z. B. Dunkelheit, wird die SnRK1 aktiviert, um energieaufwändige Prozesse zu inhibieren und die Genexpression kataboler Reaktionen, wie z. B. Stärke- und AS-Abbau, zu aktivieren. *DIN6* und *SENI* spielen eine entscheidende Rolle bei der Anpassung der Pflanze an Nährstoffmangel, bzw. wenn die Stärke- und Kohlenhydratreserven erschöpft sind, und werden durch die SnRK1 aktiviert. Die Überexpression von *DIN6* bei der Mutante *NLSa1* wurde bereits von der Arbeitsgruppe Ramon *et al.* (2019) festgestellt. Sie konnten zeigen, dass metabolischer Stress die nukleare Translokation der α -Untereinheit auslöst und mittels qPCR- und Immunoblot-Analysen einen signifikanten Anstieg der Expression von *DIN6* und eine Anreicherung der α -Untereinheit im Zellkern, nicht jedoch in der Cytoplasmafraktion, verzeichnen (Ramon *et al.*, 2019). Die Ergebnisse der relativen Genexpression von *DIN6* und *SENI* zeigen außerdem, dass die Lokalisierung der katalytischen α -Untereinheit im Zellkern zu einer stärkeren bzw. schnelleren Aktivierung dieser Gene führt.

4.3 Einfluss der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 auf Zucker- und AS-Stoffwechsel im Zuge der HL-Akklimatisierung

4.3.1 *NLSa1* zeigt erhöhten Zuckergehalt im HL

Die Untersuchungen des Zuckergehalts mittels GC zeigten bei der Mutante *NLSa1* einen mindestens doppelt so hohen Fructose-, Glucose- und Saccharose-Gehalt nach 8 h HL im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 15). Folglich schien sich die Lokalisierung der α -Untereinheit der SnRK1 im Zellkern positiv auf die Zuckerbiosynthese auszuwirken. Allerdings konnte durch die Untersuchung der relativen Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten Genen gezeigt werden, dass die Expression im Zuge der HL-Akklimatisierung bei den untersuchten Mutanten keine Veränderungen im Vergleich zu Col-0 zeigten (Abb. 16 & 17). Die Ergebnisse der Untersuchungen der Genexpression von an der Zuckerbiosynthese beteiligten Genen brachte eine wichtige Erkenntnis: Die *al*-Linie, bei der es zu einer Überexpression von *KIN10* kommt, sowie die Lokalisation der α -Untereinheit im Zellkern (*NLSa1*) oder im Cytosol (*β MYRa1*) hatten keinen globalen Einfluss auf die Genexpression bei der Zuckerbiosynthese. Aus diesem Grund stellt sich die Frage: Wie kommt der angereicherte Zuckergehalt bei *NLSa1* unter HL zustande?

Eine mögliche Erklärung liefern die Ergebnisse der LC-MS/MS, im speziellen der AS-Gehalt. Hier wies die Mutante *NLSa1* einen deutlich geringeren AS-Gehalt unter HL im Vergleich zum Wildtyp Col-0 auf (Abb. 19). Möglicherweise spielt allein die Limitation der AS-Biosynthese eine Rolle bei der Anreicherung von Zucker, sodass der nicht genutzte Kohlenstoff der AS-Biosynthese für die Zuckerbiosynthese verwendet wird.

Eine weitere Hypothese bezieht sich auf die stomatäre Leitfähigkeit bzw. den Gaswechsel oder allgemein den Gasaustausch mit der Umwelt. Dieser kann aufgrund der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 verändert, wie z. B. durch eine größere Öffnungsweite der Stomata verbessert, sein. Beispielsweise könnte bei *NLSa1* mehr Photosynthese stattfinden und folglich mehr CO₂ fixiert werden, sodass mehr Kohlenstoff für die Zuckerbiosynthese zur Verfügung steht. Dagegen spricht, dass die Untersuchungen von lichtabhängigen Parametern mittels PAM-Messungen unverändert erschienen (Abb. 24). Dennoch kann die CO₂-Fixierung durch beispielsweise einen veränderten Aktivierungszustand oder einen beschleunigten Turnover der RuBisCO verändert sein. Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen, sollten Gaswechsellmessungen durchgeführt werden, um

Veränderungen der Photosyntheseleistung sowie der stomatären Leitfähigkeit zu untersuchen und aufzudecken (Abschnitt 4.5). Des Weiteren sollte der Zuckergehalt der *NLS α 1* unter Normalbedingungen untersucht werden, um unabhängig von der HL-Akklimatisierung Aussagen über die Anreicherung von Zucker und die Lokalisierung der α -Untereinheit der SnRK1 treffen zu können.

4.3.2 *β MYR α 1* weist hohen AS- und OS-Gehalt auf

Die Untersuchungen von Metaboliten mittels LC-MS/MS-Analysen zeigten einen erhöhten AS-Gehalt unter HL sowie einen erhöhten OS-Gehalt bei *β MYR α 1* - der Mutante, bei der die α -Untereinheit der SnRK1 im Cytosol lokalisiert ist - im Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen. Daraus resultierend spielt die Lokalisierung der α -Untereinheit von SnRK1 eine Rolle bei der Anreicherung von AS im HL sowie beim Citratzyklus bereits zum Ende der Nacht (Abb. 19 & 21).

Eine mögliche Ursache des erhöhten AS-Gehalts in *β MYR α 1* kann eine reduzierte Expression der AS-abbauenden Gene/Proteine sein. Dieser Hypothese kann durch qPCR-Analysen und Untersuchungen der relativen Genexpression von AS-abbauenden Genen auf den Grund gegangen werden. Eine weitere Hypothese erschließt sich aus dem bereits zum Ende der Nacht erhöhten OS-Gehalt der *β MYR α 1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 21). Wenn der Gehalt von OS, die am Citratzyklus beteiligt sind, erhöht ist, könnte dementsprechend mehr Kohlenstoff für die Synthese von AS zur Verfügung stehen, da *β MYR α 1* außerdem ein vermindertes Wachstum mit folglich einer reduzierten Zellwandbiosynthese aufweist. Zusätzlich könnte ein verminderter Export von Zucker zu einem erhöhten Zuckergehalt in den Zellen und resultierend mehr Glykolyse bzw. mehr Kohlenstoff für die Synthese der AS führen. Für einen verminderten Export von Zucker spricht das eingeschränkte Wurzelwachstum und die Verringerung der Wurzelhaare bei der *β MYR α 1*-Linie, da durch einen geringeren Export von Zucker weniger Energie und Bausteine für das Wurzelwachstum zur Verfügung stehen (Ramon *et al.*, 2019). Tiefere Einblicke wird die Auswertung des RNA-Seq-Experiments bringen, um globale Unterschiede auf transkriptioneller Ebene aufzudecken. Da sich die *NLS α 1* Mutante reziprok zur *β MYR α 1* bezüglich der Metabolit-Gehalte verhielt, ist ein Überexpressionseffekt von *KIN10* als Ursache auszuschließen.

4.4 Globale Betrachtung von Wachstumsparametern

Die Allgemeine Charakterisierung der Mutanten zeigte wesentliche Unterschiede von wachstums- und reproduktionsspezifischen Parametern im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Neben den auffälligen Blattphänotypen konnte ein erhöhtes Wachstum sowie eine größere TM bei der *NLSa1* festgestellt werden (Abb. 25). Die *βMYRa1* wies hingegen ein im Vergleich zu Col-0 langsames Wachstum auf sowie eine geringere TM und eine späte Blüte (Abb. 27). Das verstärkte Wachstum von *NLSa1* und die Auswirkungen auf den Blattphänotyp konnten bereits von der Arbeitsgruppe Ramon *et al.* (2019) beobachtet werden. Sie untersuchten als stellvertretenden Wachstumsparameter das Wurzelwachstum und stellten längere Wurzeln sowie ausgeprägtere Wurzelhaare bei *NLSa1* fest. Die Identifizierung der genauen Mechanismen, die an der SnRK1-vermittelten Regulierung von Pflanzenwachstum und -entwicklung beteiligt sind, steht zum aktuellen Zeitpunkt noch aus. Dennoch lassen sich bereits einige das Wachstum betreffende Zusammenhänge darstellen.

Die Photosynthese der Mutanten mit differentieller Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 erschien durch die Untersuchung lichtabhängiger Parameter im Vergleich zu Col-0 unverändert (Abb. 24). Unter HL könnte durch eine erhöhte CO₂-Fixierung mehr Kohlenstoff zur Verfügung gestellt werden, der mutmaßlich in der *NLSa1* Mutante vermehrt für die Synthese von Zucker und in der *βMYRa1* Mutante vermehrt für die AS-Synthese sowie für den Citratzyklus verwendet wurde. Die *NLSa1* Mutante wies außerdem ein schnelleres Wachstum mit früher Blüte sowie eine höhere TM im Vergleich zum Wildtyp Col-0 auf (Abb. 25). Die im Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen frühere Blüte lässt sich auf den erhöhten Zuckergehalt der *NLSa1* zurückführen, da aus vorherigen Untersuchungen bekannt ist, dass ein erhöhter Zuckergehalt die frühzeitige Blüte induziert (Cho *et al.*, 2018).

Warum waren die Pflanzen von *NLSa1* schwerer als die von Col-0? Dass *NLSa1* mehr Protein als Col-0 besitzt, erscheint unwahrscheinlich, da durch die LC-MS/MS-Analysen ein niedriger AS-Gehalt bei *NLSa1* festgestellt werden konnte und Proteine aus AS synthetisiert werden. Am wahrscheinlichsten ist es, dass die erhöhte TM durch mehr Zellwandmasse zustande kommt, da diese ca. 90 % der TM ausmacht. Auf Grund des verstärkten Wachstums der *NLSa1* ist es denkbar, dass durch die Lokalisierung der α -Untereinheit im Zellkern der Stoffwechsel so verändert ist, dass mehr Energie sowie Kohlenstoffe und der erhöhte Zuckergehalt in das Wachstum, wie z. B. die Zellwandsynthese, geleitet werden. Diese Hypothese wirft aber auch die Frage auf, inwiefern eine Mutante (*NLSa1*), deren AS-Gehalt nur etwa halb so groß ist wie der des Wildtyps Col-0, größer als dieser werden kann.

4.5 Ausblick

Die SnRK1 ist ein essenzieller Schlüsselsensor und -regulator der pflanzlichen Energiehomöostase (Baena-González *et al.*, 2007). Dennoch sind die genauen Mechanismen, die an der SnRK1-vermittelten Regulierung von Pflanzenwachstum und -entwicklung beteiligt sind, sowie die Aktivierung der SnRK1 durch Stress bzw. niedrige Energielevel, auch in Bezug auf Akklimatisierungsreaktionen, bislang noch unbekannt. Wie verändert sich die Aktivität und die Lokalisation der SnRK1 in der Natur bzw. im Wildtyp? Um diese Frage zu adressieren, gibt es unterschiedliche genetische Modelle. Beispielsweise kann im Zuge des indirekten Nachweises der Aktivität der SnRK1 die Lokalisation der α -Untereinheit, im speziellen der Stress bzw. HL-abhängige Wechsel der katalytischen α -Untereinheit zwischen Zellkern und Cytosol, mittels GFP-Tag und anschließender Fluoreszenzbestimmung überprüft und untersucht werden (Ramon *et al.*, 2019). Gleichzeitig kann durch Immunoblot-Analysen ein indirekter Nachweis der Aktivität der SnRK1 durch die Phosphorylierung von Proteinen, die ausschließlich von der SnRK1 phosphoryliert werden, erfolgen und in Zellkern-Extrakten bestimmt werden.

Durch Gaswechsellmessungen sollten Veränderungen in der photosynthetischen Leistung sowie der stomatären Leitfähigkeit untersucht werden. Hierbei kann herausgefunden werden, ob der erhöhte Zuckergehalt und die größere Trockenmasse auf eine veränderte Photosyntheseleistung zurückzuführen sind. Des Weiteren kann untersucht werden, ob die Photosynthese im Vergleich zu Col-0 trotz der differentiellen Lokalisierung der α -Untereinheit der SnRK1 uneingeschränkt ist oder sie vom Wildtyp abweicht.

Da bei den Mutanten *NLSa1* und *β MYRa1* nur jeweils eine α -Untereinheit/KIN10 aktiv ist, könnten Kreuzungen der Mutanten mit dem Wildtyp Col-0 dominante Effekte aufzeigen. Durch das Einbringen einer wechselnden Wildtyp α -Untereinheit neben der α -Untereinheit im Zellkern oder im Cytosol könnten die Experimente wiederholt und verglichen werden. Je nachdem, ob die Ergebnisse gleichbleibend oder abweichend von den hier gezeigten Resultaten sind, können Aussagen über dominante Effekte getroffen werden. Zeigt die resultierende Nachkommenschaft ein Merkmal der Mutanten, das vom Wildtyp Col-0 abweicht, so handelt es sich um einen dominanten Effekt, dessen Kausalität auf die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit der SnRK1 zurückzuführen ist.

Die Mutante *NLSa1* kann möglicherweise eine ökonomisch wichtige Rolle spielen. Durch ihren erhöhten Zuckergehalt bei einer uneingeschränkten Photosynthese (bisher nur durch lichtabhängige Parameter/PAM-Messungen bestätigt) sowie der erhöhten Wachstumsrate

mit einer frühzeitigen Blüte im Vergleich zum Wildtyp Col-0, hat sie durch das Einbringen in landwirtschaftlich bedeutende Anbaupflanzen, wie der Zuckerrübe oder der Gerste, das Potenzial, eine deutlich gesteigerte Ertragsausbeute sowie Reproduktionsrate bewirken und somit der Nahrungsmittelknappheit einer stetig steigenden Bevölkerungszahl entgegenwirken zu können.

4.6 Fazit

Die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit von SnRK1 hat einen Einfluss auf eine Reihe von stoffwechsel- und wachstumsspezifischen Parametern. Während bei der Untersuchung der Anthocyanbildung keine Aussagen bezüglich der Auswirkungen der starren Lokalisation der α -Untereinheit getroffen werden konnten, zeigte die differentielle Lokalisation Auswirkungen auf die Zuckerbiosynthese sowie die AS- und OS-Synthese unter HL. *NLSa1*, deren α -Untereinheit im Zellkern lokalisiert ist, wies einen erhöhten Zuckergehalt und einen niedrigen AS-Gehalt unter HL auf. Des Weiteren zeigten die Pflanzen der *NLSa1* einen auffälligen Blattphänotypen sowie ein ausgeprägtes Wachstum, was in einem größeren Gehalt an TM, einem größeren Rosettendurchmesser sowie einer früheren Blüte resultierte. Die *β MYRa1* Mutante, deren α -Untereinheit im Cytosol lokalisiert ist, verhielt sich reziprok zur *NLSa1* Mutante. Sie wies einen niedrigen Zuckergehalt sowie einen erhöhten AS-Gehalt unter HL und OS-Gehalt bereits zum Ende der Nacht auf. Ihre Pflanzen zeigten auch einen auffälligen Blattphänotypen, jedoch erschien das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp Col-0 eingeschränkt durch kleine Pflanzen, eine geringe TM und eine verspätete Blüte. Lichtabhängige Photosyntheseparameter wurden weder unter Normalbedingungen noch im Zuge der HL-Akklimatisierung von der differentiellen Lokalisation der α -Untereinheit der SnRK1 beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Masterarbeit weisen auf die essenzielle Rolle der SnRK1 bei der Regulation der pflanzlichen Energiehomöostase sowie im Zuge der Anpassung an Stressbedingungen hin. Es konnte erstmalig der starke Einfluss der Lokalisierung der katalytischen α -Untereinheit der SnRK1 auf die Regulation des Primär- und Sekundärstoffwechsels unter Akklimatisierungs-relevanten Bedingungen gezeigt werden. Weiterhin bleiben viele Fragen bezüglich der genauen Identifizierung der Mechanismen hinter der Aktivierung und Funktion der SnRK1 in der Natur unbeantwortet. Dennoch liefert diese Arbeit einen möglichen ersten Anhaltspunkt für einen ertragsfördernden Fortschritt landwirtschaftlich genutzter Pflanzen durch die differentielle Lokalisation der α -Untereinheit der SnRK1 im Zellkern.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an alle, die an meiner Masterarbeit beteiligt waren, ausdrücken. Als Erstes möchte ich Jun.-Prof. Dr. Andreas S. Richter für die Betreuung meiner Masterarbeit danken sowie für seine Unterstützung bei fachlichen Fragen und Problemen.

Ein großer Dank gilt auch den beiden Arbeitsgruppen für Pflanzenphysiologie und für Pflanzliche Stoffwechselphysiologie der Universität Rostock, die mich von Anfang an herzlich in die Gruppe aufgenommen und als vollwertiges Mitglied behandelt haben. Meine anfänglichen Unsicherheiten wurden dadurch sehr schnell überwunden.

Insbesondere möchte ich Kathrin Jahnke, Nils Schmidt, Josephine Dieckmann, Inken Thiemann und Nadja-Magdalena Discher danken. Danke für den lustigen Laboralltag und die unzähligen tollen Gespräche sowie euer stets offenes Ohr, wenn ich einen Rat brauchte. In meiner Zeit im Labor konnte ich sehr viele wertvolle Erfahrungen sammeln, die mich menschlich vorangebracht haben und die ich auch in Zukunft in meinem beruflichen und privaten Lebensweg mit einfließen lassen werde.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich während meines Studiums und für ihren Rückhalt bei all meinen getroffenen Entscheidungen und Herausforderungen.

Literaturverzeichnis

- Araguirang, G.E. & Richter, A.S. (2022): “Activation of anthocyanin biosynthesis in high light – what is the initial signal?”, *New Phytologist*, John Wiley and Sons Inc, Vol. 236 No. 6, pp. 2037–2043, doi: 10.1111/nph.18488.
- Baena-González, E.; Rolland, F.; Thevelein, J.M. & Sheen, J. (2007): “A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling”, *Nature*, Nature Publishing Group, Vol. 448 No. 7156, pp. 938–942, doi: 10.1038/nature06069.
- Borevitz, J.O.; Xia, Y.; Blount, J.; Dixon, R.A. & Lamb, C. (2000): Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis, *The Plant Cell*, Vol. 12.
- Broeckx, T.; Hulsmans, S. & Rolland, F. (2016): “The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function”, *Journal of Experimental Botany*, Oxford University Press, 1 December, doi: 10.1093/jxb/erw416.
- Broucke, E.; Dang, T.T.V.; Li, Y.; Hulsmans, S.; Van Leene, J.; De Jaeger, G.; Hwang, I., *et al.* (2023): “SnRK1 inhibits anthocyanin biosynthesis through both transcriptional regulation and direct phosphorylation and dissociation of the MYB/bHLH/TTG1 MBW complex”, *Plant Journal*, John Wiley and Sons Inc, Vol. 115 No. 5, pp. 1193–1213, doi: 10.1111/tpj.16312.
- Chan, K.X.; Phua, S.Y.; Crisp, P.; McQuinn, R. & Pogson, B.J. (2016): “Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and beyond”, *Annual Review of Plant Biology*, Annual Reviews Inc., 29 April, doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111854.
- Cho, L.H.; Pasriga, R.; Yoon, J.; Jeon, J.S. & An, G. (2018): “Roles of Sugars in Controlling Flowering Time”, *Journal of Plant Biology*, Springer New York LLC, 1 June, doi: 10.1007/s12374-018-0081-z.
- Dieckmann, J.; Stracke, R. & Richter, A.S. (2024): “SnRK1 acts upstream of PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1, contributing to fine-tuning flavonoid biosynthesis during acclimation. 2”, doi: 10.1101/2024.06.13.598896.

- Dubos, C.; Le Gourrierec, J.; Baudry, A.; Huep, G.; Lanet, E.; Debeaujon, I.; Routaboul, J.M.; *et al.* (2008): “MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Journal*, Vol. 55 No. 6, pp. 940–953, doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03564.x.
- Emanuelle, S.; Hossain, M.I.; Moller, I.E.; Pedersen, H.L.; Van De Meene, A.M.L.; Doblin, M.S.; Koay, A., *et al.* (2015): “SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK”, *Plant Journal*, Vol. 82 No. 2, pp. 183–192, doi: 10.1111/tpj.12813.
- Estruch, F.; Treitel, M.A.; Yang, X. & Carlson, M. (1992): *N-Terminal Mutations Modulate Yeast SNF1 Protein Kinase Function*.
- Garcia-Molina, A.; Kleine, T.; Schneider, K.; Mühlhaus, T.; Lehmann, M. & Leister, D. (2020): “Translational Components Contribute to Acclimation Responses to High Light, Heat, and Cold in *Arabidopsis*”, *IScience*, Elsevier Inc., Vol. 23 No. 7, doi: 10.1016/j.isci.2020.101331.
- Ghillebert, R.; Swinnen, E.; Wen, J.; Vandesteene, L.; Ramon, M.; Norga, K.; Rolland, F.; *et al.* (2011): “The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: Structure, function and regulation”, *FEBS Journal*, November, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08315.x.
- Gissot, L.; Polge, C.; Jossier, M.; Girin, T.; Bouly, J.P.; Kreis, M. & Thomas, M. (2006): “AKIN β contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence”, *Plant Physiology*, American Society of Plant Biologists, Vol. 142 No. 3, pp. 931–944, doi: 10.1104/pp.106.087718.
- Hardie, D.G.; Ross, F.A. & Hawley, S.A. (2012): “AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, April, doi: 10.1038/nrm3311.
- Hawley, S.A.; Davison, M.; Woods, A.; Davies, S.P.; Beri, R.K.; Carling, D. & Grahame Hardie, D. (1995): “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”, *J. Biol. Chem.*, Vol. 270.
- Hedbacker, K. & Carlson, M. (2008): “SNF1/AMPK Pathways in Yeast”, *Frontiers in Bioscience*, Vol. 13.

- Huang, J.; Zhao, X. & Chory, J. (2019): “The Arabidopsis Transcriptome Responds Specifically and Dynamically to High Light Stress”, *Cell Reports*, Elsevier B.V., Vol. 29 No. 12, pp. 4186-4199.e3, doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.051.
- Kadereit, J.W.; Körner, C.; Nick, P. & Sonnewald, U. (2021): „Strasburger-Lehrbuch Der Pflanzen-Wissenschaften“ 38. Auflage, doi: 10.1007/978-3-662-61943-8.
- Kemp, B.E. (2004): “Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract”, *Journal of Clinical Investigation*, American Society for Clinical Investigation, Vol. 113 No. 2, pp. 182–184, doi: 10.1172/jci20846.
- LaFountain, A.M. & Yuan, Y.W. (2021): “Repressors of anthocyanin biosynthesis”, *New Phytologist*, Blackwell Publishing Ltd, 1 August, doi: 10.1111/nph.17397.
- Li, L.; Liu, K.-H. & Sheen, J. (2021): “Dynamic Nutrient Signaling Networks in Plants”, doi: 10.1146/annurev-cellbio-010521.
- Li, S. (2014): “Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: Fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex”, *Plant Signaling and Behavior*, Landes Bioscience, 6 January, doi: 10.4161/psb.27522.
- Liu, W.; Feng, Y.; Yu, S.; Fan, Z.; Li, X.; Li, J. & Yin, H. (2021): “The flavonoid biosynthesis network in plants”, *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, 1 December, doi: 10.3390/ijms222312824.
- Lotkowska, M.E.; Tohge, T.; Fernie, A.R.; Xue, G.P.; Balazadeh, S. & Mueller-Roeber, B. (2015): “The arabidopsis transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress”, *Plant Physiology*, American Society of Plant Biologists, Vol. 169 No. 3, pp. 1862–1880, doi: 10.1104/pp.15.00605.
- Lumbreras, V.; Albà, M.M.; Kleinow, T.; Koncz, C. & Pagès, M. (2001): “Domain Fusion between SNF1-Related Kinase Subunits during Plant Evolution”, *EMBO Reports*, Vol. 2.
- Matsui, K.; Umemura, Y. & Ohme-Takagi, M. (2008): “AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis”, *Plant Journal*, Vol. 55 No. 6, pp. 954–967, doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03565.x.
- Nakabayashi, R.; Yonekura-Sakakibara, K.; Urano, K.; Suzuki, M.; Yamada, Y.; Nishizawa, T.; Matsuda, F.; *et al.* (2014): “Enhancement of oxidative and drought tolerance in

- Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids”, *Plant Journal*, Vol. 77 No. 3, pp. 367–379, doi: 10.1111/tpj.12388.
- Nunes, C.; Primavesi, L.F.; Patel, M.K.; Martinez-Barajas, E.; Powers, S.J.; Sagar, R.; Fevreiro, P.S.; *et al.* (2013): “Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate”, *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 63, pp. 89–98, doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.011.
- Polge, C. & Thomas, M. (2007): “SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?”, *Trends in Plant Science*, January, doi: 10.1016/j.tplants.2006.11.005.
- Ramon, M.; Dang, T.V.T.; Broeckx, T.; Hulsmans, S.; Crepin, N.; Sheen, J. & Rolland, F. (2019): “Default activation and nuclear translocation of the plant cellular energy sensor SnRK1 regulate metabolic stress responses and development”, *Plant Cell*, American Society of Plant Biologists, Vol. 31 No. 7, pp. 1614–1632, doi: 10.1105/tpc.18.00500.
- Ramon, M.; Ruelens, P.; Li, Y.; Sheen, J.; Geuten, K. & Rolland, F. (2013): “The hybrid Four-CBS-Domain KIN $\beta\gamma$ subunit functions as the canonical γ subunit of the plant energy sensor SnRK1”, *Plant Journal*, Vol. 75 No. 1, pp. 11–25, doi: 10.1111/tpj.12192.
- Saito, K.; Yonekura-Sakakibara, K.; Nakabayashi, R.; Higashi, Y.; Yamazaki, M.; Tohge, T. & Fernie, A.R. (2013): “The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity”, *Plant Physiology and Biochemistry*, November, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.001.
- Scott, J.W.; Ross, F.A.; Liu, J.K.D. & Hardie, D.G. (2007): “Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the γ subunit”, *EMBO Journal*, Vol. 26 No. 3, pp. 806–815, doi: 10.1038/sj.emboj.7601542.
- Tohge, T.; Nishiyama, Y.; Hirai, M.Y.; Yano, M.; Nakajima, J.I.; Awazuhara, M.; Inoue, E.; *et al.* (2005): “Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor”, *Plant Journal*, Vol. 42 No. 2, pp. 218–235, doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02371.x.
- Toroser, D.; Plaut, Z. & Huber, S.C. (2000): “Regulation of a Plant SNF1-Related Protein Kinase by Glucose-6-Phosphate 1”, *Plant Physiology*, Vol. 123.

- Wang, Y.; Wang, Y.; Song, Z. & Zhang, H. (2016): “Repression of MYBL2 by Both microRNA858a and HY5 Leads to the Activation of Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis”, *Molecular Plant*, Cell Press, Vol. 9 No. 10, pp. 1395–1405, doi: 10.1016/j.molp.2016.07.003.
- Xiao, B.; Sanders, M.J.; Underwood, E.; Heath, R.; Mayer, F. V.; Carmena, D.; Jing, C.; *et al.* (2011): “Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP”, *Nature*, Vol. 472 No. 7342, pp. 230–233, doi: 10.1038/nature09932.
- Zhang, Y.; Primavesi, L.F.; Jhurrea, D.; Andralojc, P.J.; Mitchell, R.A.C.; Powers, S.J.; Schluepmann, H.; *et al.* (2009): “Inhibition of SNF1-related protein kinase activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate1”, *Plant Physiology*, American Society of Plant Biologists, Vol. 149 No. 4, pp. 1860–1871, doi: 10.1104/pp.108.133934.
- Zheng, T.; Tan, W.; Yang, H.; Zhang, L.; Li, T.; Liu, B.; Zhang, D.; *et al.* (2019): “Regulation of anthocyanin accumulation via MYB75/HAT1/TPL-mediated transcriptional repression”, *PLoS Genetics*, Public Library of Science, Vol. 15 No. 3, doi: 10.1371/journal.pgen.1007993.
- Zirngibl, M.E.; Araguirang, G.E.; Kitashova, A.; Jahnke, K.; Rolka, T.; Kühn, C.; Nägele, T.; *et al.* (2023): “Triose phosphate export from chloroplasts and cellular sugar content regulate anthocyanin biosynthesis during high light acclimation”, *Plant Communications*, Cell Press, Vol. 4 No. 1, doi: 10.1016/j.xplc.2022.100423.

Anhang

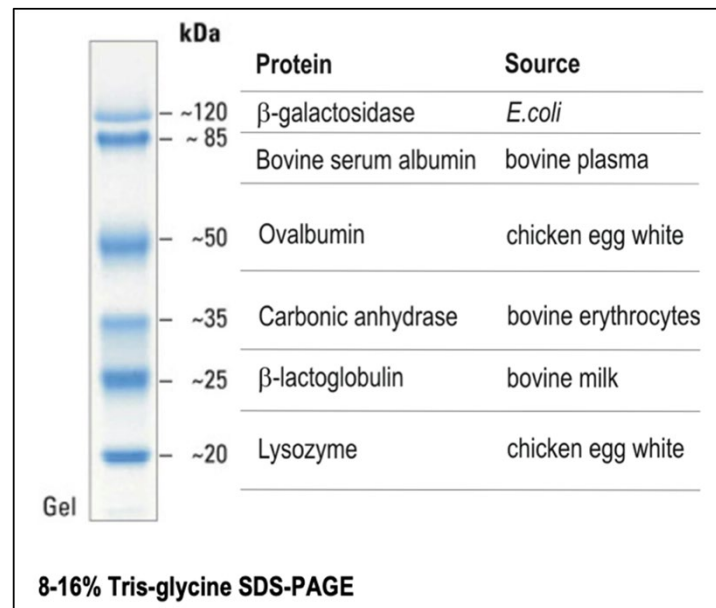
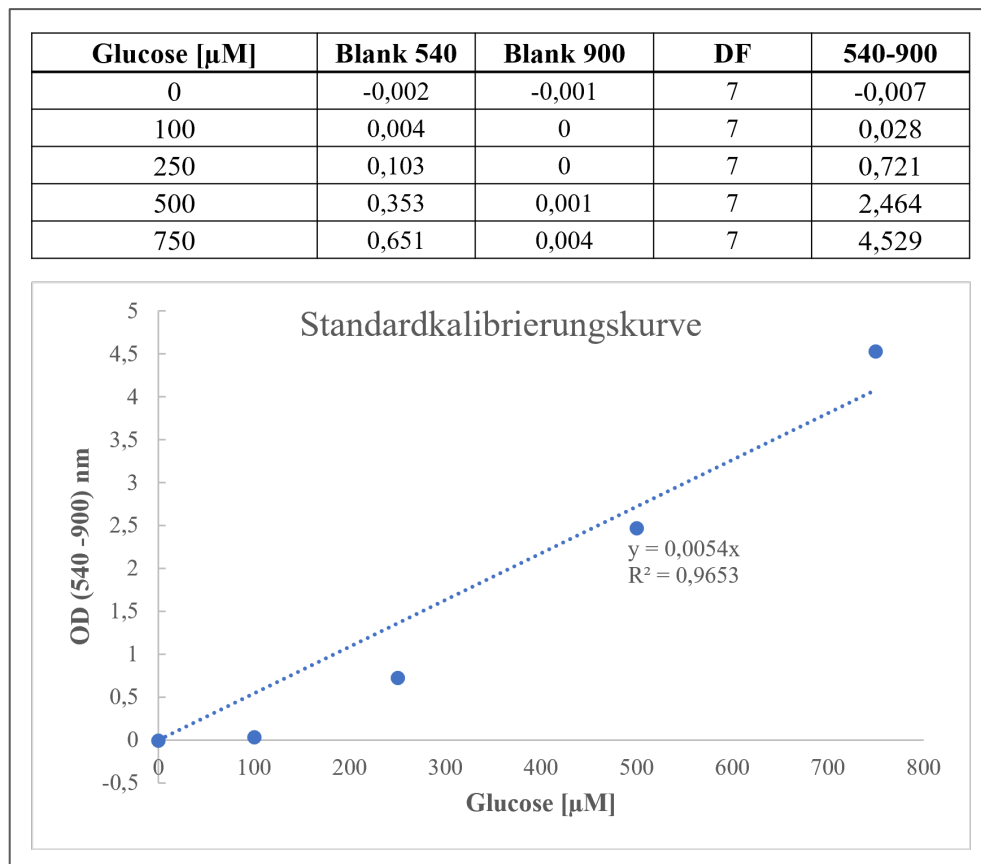


Abbildung A1: Prestained Protein Molecular Weight Marker

Abbildung A2: Standardkalibrierungskurve der Glucosekonzentrationen [μ M]

Ermittelte Standardkalibrierungskurve der verschiedenen Glucosekonzentrationen zur Quantifizierung des Stärkegehalts.

Tabelle A3: Bestimmung von Frisch- (FM) und Trockenmasse (TM) sowie TM/FM

Angegeben sind die FM, TM sowie TM/FM der untersuchten Genotypen (N = 13). Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messung 36 Tage alt.

Nr.	Col-0			<i>α1</i>			<i>NLSα1</i>			<i>βMYRα1</i>		
	FM [mg]	TM [mg]	TM/FM	FM [mg]	TM [mg]	TM/FM	FM [mg]	TM [mg]	TM/FM	FM [mg]	TM [mg]	TM/FM
1	200,900	27,100	0,135	371,600	42,800	0,115	289,800	46,100	0,159	212,900	19,200	0,090
2	282,300	33,900	0,120	335,600	35,000	0,104	266,000	42,400	0,159	78,800	6,400	0,081
3	237,700	34,900	0,147	453,300	53,700	0,118	266,200	41,200	0,155	249,100	20,400	0,082
4	147,100	23,200	0,158	229,900	27,500	0,120	318,100	46,200	0,145	71,700	6,400	0,089
5	233,100	32,900	0,141	527,700	50,800	0,096	236,900	37,800	0,160	187,000	14,700	0,079
6	288,800	42,500	0,147	132,800	13,900	0,105	377,900	56,400	0,149	54,100	14,600	0,270
7	173,300	24,900	0,144	181,200	29,200	0,161	160,500	30,400	0,189	61,700	4,900	0,079
8	220,700	26,700	0,121	157,400	23,800	0,151	336,400	48,900	0,145	63,600	5,400	0,085
9	306,300	38,900	0,127	433,700	46,300	0,107	259,000	36,200	0,140	290,200	26,100	0,090
10	204,100	28,300	0,139	182,600	22,200	0,122	299,500	44,700	0,149	110,000	10,200	0,093
11	408,500	46,700	0,114	404,900	42,800	0,106	320,100	48,200	0,151	244,600	19,400	0,079
12	111,300	14,200	0,128	165,300	19,600	0,119	227,700	39,400	0,173	86,600	7,200	0,083
13	414,600	49,900	0,120	246,700	27,500	0,111	165,700	27,700	0,167	127,800	10,800	0,085

Tabelle A4: Bestimmung des Gewichts der Samen

Angegeben ist das Gewicht der Samen pro Pflanze der untersuchten Genotypen (N = 10).

Nr.	Samen [mg]			
	Col-0	<i>α1</i>	<i>NLSα1</i>	<i>βMYRα1</i>
1	30,40	37,20	27,60	22,00
2	40,70	9,20	36,90	14,10
3	11,60	30,20	39,40	4,60
4	15,50	1,00	14,60	1,20
5	5,40	3,20	9,30	1,60
6	6,70	5,60	13,90	1,20
7	18,70	4,50	15,30	4,30
8	3,90	11,90	8,50	1,80
9	20,20	5,50	12,80	3,30
10	9,20	3,50	15,60	-

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle den angegebenen Quellen entnommenen wörtlichen oder sinngemäßen Inhalte wurden von mir entsprechend kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift