

**Die Rolle exogen zugeführter Zucker  
in der Hochlicht-Akklimatisierung von  
*Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Luisa Heinrichs**

aus Burg

**Köln 2015**

Gutachter: 1. Herr Professor Dr. Ulf-Ingo Flügge  
2. Herr Professor Dr. Marcel Bucher

Tag der Disputation: 25. November 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Zusammenfassung / Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Retrograde Signale</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 Komponenten des Tetrapyrrolstoffwechsels .....	5
2.1.2 Redoxstatus des Chloroplasten.....	6
2.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....	6
2.1.4 Plastidäre Genexpression (PGE) .....	7
2.1.5 Abscisinsäure (ABA) .....	8
2.1.6 Plastidengenerierte Metabolitsignale einschließlich Kohlenhydraten .....	8
<b>2.2 Charakterisierung der Hochlicht-induzierten Phänotypen der <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>adg1-1/tpt-2</i>-Doppelmutante</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3 Perzeption und Transduktion von Zuckersignalen</b> .....	<b>11</b>
2.3.1 Zucker: Endprodukte der Photosynthese.....	11
2.3.2 Die Rolle von Zuckern als Signalmoleküle.....	12
2.3.3 Mechanismen der Perzeption und Transduktion .....	12
<b>2.4 Zielstellung der Arbeit</b> .....	<b>14</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Chemikalien und Oligonukleotide</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2 Enzyme und Reagenzien</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3 Geräte</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4 Software und Datenbanken</b> .....	<b>17</b>
<b>3.5 Pflanzenmaterial</b> .....	<b>18</b>
<b>3.6 Nährmedien</b> .....	<b>18</b>
<b>3.7 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>19</b>
3.7.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde .....	19
3.7.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Sterilkultur.....	19
<b>3.8 Anzucht- und Wachstumsbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>20</b>
3.8.1 Anzucht im Gewächshaus .....	20
3.8.2 Anzucht im Klimaschrank.....	20
3.8.3 Anzucht in der Klimakammer .....	21
<b>3.9 Schwachlicht zu Hochlicht-Transferexperimente von <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.10 Zuckerfütterung von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Sterilkultur</b> .....	<b>21</b>
<b>3.11 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.11.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
3.11.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
3.11.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	24
3.11.4 Isolierung von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
3.11.5 Quantitative Bestimmung isolierter RNA.....	25
3.11.6 DNaseI-Behandlung und Einzelstrang-cDNA-Synthese isolierter RNA.....	25
3.11.7 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) .....	26

3.11.8	Sequenzierung .....	27
<b>3.12</b>	<b>Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>-Linien .....</b>	<b>28</b>
<b>3.13</b>	<b>Messungen der PSII-Aktivität <i>in vivo</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>3.14</b>	<b>Genomweite Expressionsanalysen von <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>29</b>
3.14.1	Identifizierung von regulatorischen Elementen (Promotormotive) .....	29
3.14.2	Genomweite Expressionsanalyse zur Beurteilung des Einfluss exogen zugeführter Fructose unter HL-Bedingungen .....	31
<b>3.15</b>	<b>Pigmentanalysen .....</b>	<b>31</b>
3.15.1	Bestimmung des Anthocyangehaltes in Blättern .....	31
<b>3.16</b>	<b>Metabolitanalysen .....</b>	<b>32</b>
3.16.1	Quantitative Bestimmung von Adenylaten.....	32
3.16.2	Quantitative Bestimmung von Ascorbinsäure und Glutathion .....	33
3.16.3	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren.....	33
3.16.4	Quantitative Bestimmung von Primärmetaboliten .....	35
3.16.5	Quantitative Bestimmung löslicher Zucker in Blättern .....	35
3.16.6	Quantitative Bestimmung von Stärke in Blättern.....	36
3.16.7	Qualitative und semiquantitative Bestimmung von Stärke in Blättern .....	37
<b>3.17</b>	<b>Statistische Evaluierung .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Akklimatisierungsantworten der <i>A. thaliana adg1-1/tpt-2</i>-Doppelmutante nach LL-HL-Transferexperimenten .....</b>	<b>38</b>
4.1.1	Anthocyangehalte .....	38
4.1.2	Gehalt an Adenylaten .....	40
4.1.3	Einfluss des LL-HL-Transfers auf den Gehalt von Ascorbinsäure bzw. Glutathion.....	41
4.1.4	Metabolitanalyse .....	42
4.1.5	Identifizierung von Promotormotiven differentiell regulierter Gene.....	47
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle von Zuckern bei der Akklimatisierungsantwort von <i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>48</b>
4.2.1	Generierung und Charakterisierung der <i>adg1-1/tpt-2/gin2-1</i> -Tripelmutante .....	48
4.2.2	Beteiligung der HXK1 an der zuckerabhängige Rettung der HL-induzierten Phänotypen .....	52
4.2.3	Einfluss exogen zugeführter Zucker auf Photosyntheseparameter .....	54
4.2.4	Gehalt an löslichen Zuckern in Abhängigkeit exogen zugeführter Zucker .....	61
4.2.5	Einfluss der Zuckerfütterung auf Stärkebiosynthese .....	63
4.2.6	Korrelation von ETR und Kohlenhydratstatus .....	63
4.2.7	Zuckerabhängige Genexpression.....	65
4.2.8	Einfluss exogen zugeführter Zucker auf den Gehalt proteinogener Aminosäuren .....	67
4.2.9	Einfluss exogen zugeführter Fructose auf die transkriptionelle Regulierung des HL-induzierten HCF-Phänotyps .....	71
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Hochlichtakklimatisierung der <i>adg1-1/tpt-2</i>-Doppelmutante.....</b>	<b>76</b>
5.1.1	Einfluss des LL-HL-Transfers auf den Anthocyangehalt.....	76
5.1.2	Beeinflussung des Energiestatus durch LL-HL-Transferexperimente .....	77
5.1.3	Die Rolle von ROS in LL-HL-Transferexperimenten.....	77
5.1.4	Transkriptionelle Regulation der HL-induzierten Phänotypen.....	78
<b>5.2</b>	<b>Zuckerabhängige Rettung der HL-induzierten Phänotypen von <i>adg1-1/tpt-2</i> .....</b>	<b>80</b>
5.2.1	Zucker – Verschiedene Wege der Wahrnehmung und Signalweiterleitung.....	82
5.2.2	Import und Verstoffwechslung von Kohlenhydraten im plastidären Stroma .....	82
5.2.3	Zuckervermittelte Akklimatisierung vs. Zuckerübermittelndes Retrogrades Signal .....	86

5.2.4	Einfluss exogen zugeführter Zucker auf den Aminosäurenstoffwechsel .....	88
5.2.5	Die Rolle von Fru in der zuckerabhängigen HL-Akklimatisierung .....	89
<b>6</b>	<b><i>Ausblick</i></b> .....	<b>90</b>
	<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b>VII</b>
	<b><i>Abbildungsverzeichnis</i></b> .....	<b>XII</b>
	<b><i>Tabellenverzeichnis</i></b> .....	<b>XIII</b>
	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>XIV</b>
	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>XXIX</b>
	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>XXX</b>
	<b><i>Eidesstattliche Erklärung</i></b> .....	<b>XL</b>



## 1 Zusammenfassung

Die *Arabidopsis thaliana* Doppelmutante *adg1-1/tpt-2* zeigt, bedingt durch den vollständigen Funktionsverlust des Triosephosphat/Phosphat Translokators (TPT; *tpt-2*) und einen Defekt der Stärkebiosynthese in Blättern (AGPase; *adg1-1*), unter Hochlichtbedingungen sowohl einen retardierten Wachstumsphänotyp als auch einen „Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz“-Phänotyp (HCF). Erfolgte die Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit Glucose (Glc) oder Saccharose (Suc) konnten beide Phänotypen gerettet werden. Um eine Beteiligung beider Gene an der zuckerabhängigen Rettung zu prüfen, wurden zusätzlich Tripelmutanten untersucht, die entweder über einen Defekt in der Hexokinase1 (HXK1; *gin2-1*) oder des Glucose-6-phosphat/Phosphat Translokator2 (GPT2, *gpt2-1*) verfügen. Wildtypen, sowie Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten wurden für die Experimente auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten ohne Zucker oder mit Zugabe von jeweils Glc, Suc oder Fructose (Fru) angezogen. Der Wachstumsphänotyp aller Doppel- und Tripelmutanten konnte nur durch Glc und Suc, nicht aber durch Fru gerettet werden. Alle drei Zucker waren hingegen in der Lage, unabhängig von der HXK1, den HCF und auch den Photosynthesephänotyp zu retten. Es ist zu vermuten, dass die direkte Aufnahme von löslichen Zuckern in den Chloroplasten und deren Verstoffwechslung im Stroma zur Rettung der *adg1-1/tpt-2*-Phänotypen beiträgt, obwohl der Tag- sowie der Nachtextport von Photoassimilaten blockiert ist. Desweiteren existiert eine direkte Korrelation zwischen der photosynthetischen Elektronentransportrate und dem Kohlenhydratstatus im Mesophyll der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante. Damit ergibt sich die Frage über die Fähigkeit von Chloroplasten den metabolischen Ist-Zustand der Zelle wahrzunehmen.

## Abstract

An *Arabidopsis thaliana* double mutant with a knock-out in the triose phosphate/phosphate translocator (TPT; *tpt-2*) and a defect in starch biosynthesis in leaves (AGPase; *adg1-1*) exhibits growth retardation and a “high chlorophyll fluorescence” (HCF) phenotype under high light conditions. Both phenotypes could be rescued when the plants were grown on ½ MS agar plates supplemented with glucose (Glc) or sucrose (Suc). Triple mutants additionally defective in the Glc-sensing hexokinase1 (HXK1; *gin2-1*) or the glucose 6-phosphate/ phosphate translocator2 (GPT2; *gpt2-1*) were used to investigate the involvement of both genes in the sugar-dependent rescue. Wild-type plants, single, double and triple mutants were grown on half strength MS agar in the presence or absence of each Suc, Glc, or fructose (Fru). The growth phenotype of all double and triple mutants could be rescued only by Glc and Suc, but not by Fru. However, all three sugars were capable of rescuing the HCF and photosynthesis phenotype, independent of HXK1. It appears likely that the direct up-take of soluble sugars into chloroplasts and their use as alternative source for anabolic processes within the stroma rescues the phenotypes of *adg1-1/tpt-2* when the day- and night-path of photoassimilate export is blocked. In addition, there exists a direct correlation between the photosynthetic electron transport rate and the carbohydrate status in the mesophyll in the *adg1-1/tpt-2* double mutant. This poses the question, whether chloroplasts are capable of sensing the metabolic state in the cytosol.

## 2 Einleitung

Dem Umweltfaktor Licht kann eine besondere Stellung zugeschrieben werden. Licht bestimmt nicht nur die Photosyntheserate oder Biomasseproduktion (**Sharkey, 1985**), sondern kontrolliert auch eine Reihe entwicklungsrelevanter Aspekte (**Fankhauser und Chory, 1997**). Da Pflanzen als sessile Lebewesen nicht in der Lage sind, ihren Standort zu wechseln, sind Wahrnehmung und Interaktion mit der Umwelt daher essentiell für das Leben und Überleben der Pflanzen. Um adäquat auf sich verändernde Umweltreize reagieren zu können, haben sie entsprechende Mechanismen evolviert.

Chloroplasten sind die Orte der Photosynthese und weisen gegenüber hohen Lichtintensitäten eine starke Sensitivität auf. Eine schnelle Reaktion zur Vermeidung einer möglichen irreparablen Schädigung der Chloroplasten und damit der Pflanze ist daher zwingend erforderlich. Bei der Anpassung der Photosynthese an sich verändernde Lichtverhältnisse unterscheidet man Kurzzeit- und Langzeitantworten. Im Fall der Langzeitantwort spricht man auch von Akklimatisierung (**Eberhard et al., 2008**). Kurzfristige sowie andauernde Änderungen der Lichtintensität haben z.B. eine Anpassung der Aktivität sowie der Komposition von Proteinen in den Thylakoiden zur Folge. Dies kann u.a. durch Änderungen der photosynthetischen Elektronentransportrate (ETR) und/oder einer gerichteten Wärmeabgabe aus dem Pigmentbett (nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung) erfolgen (**Horton et al., 1996; Foyer et al., 2012**). Eine weitere Möglichkeit, die Pflanzen entwickelt haben, um sich vor Lichtstress zu schützen, sind posttranslationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Proteinen, die an der Lichtreaktion beteiligt sind (**Aro et al., 2005**). Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung als Mechanismus der Kurzzeitantwort findet während der *state transition* an den Thylakoiden statt (**Kargul und Barber, 2008**). Der Mechanismus der *state transition* wird genutzt, um die ungleiche Anregung der Photosysteme (PS) bei Änderung der Lichtintensität oder -qualität anpassen zu können (**Lemeille und Rochaix, 2010**). Die Assoziierung der Lichtsammelkomplexe (LHCs, *light harvesting complexes*) des PSII an die PSII-Kernkomponenten beschreibt den *state I*. Der Übergang in den *state II* erfolgt durch die Phosphorylierung der LHCIIProteinuntereinheit durch die chloroplastidäre Proteinkinase STN7 (**Bonardi et al., 2005; Bellafiore et al., 2005**), was die Dissoziation der LHCIIs von den PSII-Zentren bewirkt. Anschließend wechseln die phosphorylierten LHCIIs von den Granathylakoiden zu den Stromathylakoide und assoziieren mit dem PSI (*state II*). Die Dephosphorylierung der LHCIIs übernimmt die Phosphatase TAP38 (**Pribil et al., 2010; Rochaix et al., 2012**).

Bei andauernden, veränderten Umweltbedingungen findet eine längerfristige Anpassung, d.h. Akklimatisierung, statt. Hierfür sind Anpassungen der Proteinzusammensetzung in den Chloroplasten aufgrund von Expressionsänderungen im Genom sowie Plastom verantwortlich. Die dafür notwendige erscheinende Kommunikation zwischen Chloroplast und Zellkern wird im Konzept des *Retrograden Signals* zusammengefasst (**Beck, 2005; Kleine et al., 2009**).

### 2.1 Retrograde Signale

Der Endosymbiontentheorie entsprechend handelt es sich bei Chloroplasten um Nachfahren aufgenommener Cyanobakterien in eine eukaryotische Vorläuferzelle (**Bonen und Doolittle, 1975; Bauer et al., 2001**). Die Anpassung an die Wirtszelle hatte sowohl den Verlust als auch den Transfer genetischer Informationen des plastidären Genoms (Plastom) in den Zellkern zur Folge. Mit Evolution der Landpflanzen verloren Chloroplasten somit ihre Autonomie.

Man geht davon aus, dass nur noch ca. 5 % aller plastidären Proteine in den Chloroplasten selbst synthetisiert werden (**Keeling und Palmer, 2008**). Die übrigen Proteine werden aus dem Cytosol importiert. Kerncodierte Genprodukte sind z.B. am Elektronentransport in der Thylakoidmembran oder dem Calvin-Zyklus beteiligt. Gene zur Aufrechterhaltung von Transkription und Translation in den Chloroplasten oder Bestandteile des Photosyntheseapparates, z.B. Kernkomponenten der Photosysteme I und II, sind dagegen plastomcodiert (**Leister, 2003; Tanaka und Hanaoka, 2012**). Da alle Proteinkomplexe in den Chloroplasten sowohl aus kern- als auch plastomcodierten Translationsprodukten zusammengesetzt sind, ist eine Kommunikation zwischen Chloroplast und Kern erforderlich. Die Art und Weise der Kommunikation konnte jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt werden.

Um die Art dieser Kommunikation beschreiben zu können, wurde der Begriff *Retrogrades Signal* eingeführt (**Beck, 2005; Kleine et al., 2009; Koussevitzky et al., 2012**). Dieser beschreibt die Signalrichtung ausgehend von den Chloroplasten zum Zellkern. Die entgegengesetzte Signalrichtung wird als anterograd bezeichnet. Erste Studien zu *Retrograden Signalen* erfolgten an Mutanten, bei denen die Koordination von Plastom und Genom gestört war. Diese sog. *genome uncoupled (gun)*-Mutanten waren mit Ausnahme der *gun1*-Mutante entweder in der Tetrapyrrolbiosynthese oder deren Regulation beeinträchtigt (**Susek et al., 1993**). *GUN1* codiert hingegen für ein plastidäres *pentatricopeptide repeat* (PPR)-Protein (**Cottage et al., 2008**).

Gegenwärtig werden sechs Klassen an *Retrograden Signalen* diskutiert, die in der Lage wären die Expression kerncodierter Gene an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen: (I) Komponenten des Tetrapyrrolstoffwechsels (**Surpin et al., 2002; Beck, 2005; Czarnecki et al., 2012**), (II) Redoxstatus des Chloroplasten (**Pfannschmidt et al., 1999; Pfalz et al., 2012**), (III) Reaktive Sauerstoffspezies (ROS; **Kim et al., 2008; Foyer und Noctor, 2009; Balazadeh et al., 2012**), (IV) plastidäre Genexpression (**Ahlert et al., 2003; Tiller und Bock, 2014**), (V) Abscisinsäure (ABA; **Baier et al., 2004; Baier und Dietz, 2005**) und (VI) plastidengenerierte Metabolitsignale einschließlich Kohlenhydraten (**Smeekens, 1998; Rolland et al., 2002a; Rolland et al., 2006; Bräutigam et al., 2009; Schmitz et al., 2014; Häusler et al., 2014**).

### 2.1.1 Komponenten des Tetrapyrrolstoffwechsels

Zyklische Tetrapyrrole (Porphyrine) bilden das Grundskelett des Chlorophylls sowie des Häms. Beim Chlorophyll ist ein Magnesiumion als Zentralatom im Porphyrinring verankert, im Häm dagegen Eisen. Ein oder mehrere Hämmoleküle treten als prosthetische Gruppe der Cytochrome auf, welche z.B. an der photosynthetischen Lichtreaktion beteiligt sind.

*Northern Blot*-Untersuchungen an *gun*-Mutanten zeigten, dass eine Norflurazonbehandlung in einem Anstieg der Transkriptmenge des kerncodierten *CAB/LHCBI*-Gens resultierte. Norflurazon ist ein Herbizid (**Chamovitz et al., 1991**), das eine hemmende Wirkung auf die Photosynthese hat, indem es die Carotinoidbiosynthese durch die Inhibierung der Phytoen-Desaturase beeinflusst. In Wildtyppflanzen konnten diese oben aufgeführten Expressionsänderungen nach Photoinhibition durch Norflurazon nicht beobachtet werden (**Susek et al., 1993**). Dies wurde als Hinweis gewertet, dass die Kommunikation zwischen Plastid und Zellkern in den *gun*-Mutanten gestört ist. **Strand et al.** postulierten 2003, dass in den *gun*-Mutanten die Akkumulation des Chlorophyllintermediates Magnesium-Protoporphyrin-IX für die veränderte Expression von *LHCBI* und anderer kerncodierter Gene verantwortlich ist. Eine ursprüngliche Korrelation zwischen der Akkumulation von Magnesium-Protoporphyrin-IX und dem *LHCBI*-Transkript wurde jedoch von unabhängigen Arbeitsgruppen falsifiziert (**Moulin et al., 2008; Mochizuki et al., 2008**). Damit wurde die Hypothese, Magnesium-Protoporphyrin-IX als möglichen Kandidaten des *Retrograden Signals* zu betrachten, widerlegt. In Transferexperimenten von **Schmitz et al.** (2014) wurden LL-angezogene Pflanzen unterschiedlich lang hohen Lichtintensitäten ausgesetzt. Auch in diesem experimentellen Ansatz bestand keine Korrelation zwischen dem Magnesium-Protoporphyrin-IX-Gehalt und *LHCBI*-Transkriptlevel.

### 2.1.2 Redoxstatus des Chloroplasten

Redoxprozesse während der Photosynthese sollen ebenfalls *Retrograde Signale* generieren können, die in der Konsequenz Änderungen der nukleären Genexpression zur Folge haben (**Pfannschmidt et al., 1999**). Insbesondere sollen Änderungen des Redoxstatus des Plastochinonpools daran beteiligt sein (**Pfalz et al., 2012**). Als Element der plastidären Elektronentransportkette (ETK) übernimmt Plastochinon den Transport von Elektronen vom Photosystem II zum Cytochrom-*b<sub>6</sub>f*-Komplex. Die durch die Wasserspaltung freigesetzten Elektronen werden über die Elemente der ETK auf den endständigen Akzeptor NAD(P)<sup>+</sup> übertragen. Der Transfer der Elektronen bewirkt gleichzeitig den Transport von Protonen aus dem Chloroplastenstroma in das Lumen der Thylakoide. Diese Protonentranslokation zusammen mit den bei der photolytischen Wasserspaltung freigesetzten Protonen bildet einen Protonengradient, der von der ATP-Synthase genutzt wird, um aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu bilden.

Bisher konnte der Mechanismus jedoch nicht gänzlich aufgeklärt werden, wie Änderungen im Redoxstatus des Plastochinons in ein Signal umgewandelt werden, welches die Chloroplasten verlässt und anschließend zum Zellkern transportiert wird. Es gibt allerdings Hinweise, dass ein alternativer, kerncodierter *splicing*-Faktor durch den Redoxstatus des Plastochinons beeinflusst wird (**Petrillo et al., 2014**).

### 2.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Eine weitere postulierte Signalklasse des *Retrograden Signals* sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und ROS-assoziierte Prozesse. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) sind nur zwei Beispiele schädlicher Sauerstoffspezies, die bei der Photosynthese entstehen (**Krieger-Liszkay, 2005**), wenn Pflanzen hohen Lichtintensitäten ausgesetzt sind. Die vermehrte Bildung von ROS kann dann u.a. zu starken Beschädigungen von Membranen oder zur Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates führen (**Apel und Hirt, 2004; Vass, 2012**). ROS und damit assoziierte Prozesse übernehmen dennoch eine wichtige Rolle als Signalmoleküle in Bakterien bis hin zu Säugetieren (**D'Autréaux und Toledano, 2007**), aber auch in Pflanzen (**Baxter et al., 2014**). Da z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zudem in Peroxisomen während der Photorespiration oder im Apoplasten gebildet werden kann, muss die Pflanzenzelle darüber hinaus zwischen verschiedenen Signalen unterscheiden können (**Shapiguzov et al., 2012**). Obwohl ROS auch als Signalmoleküle fungieren, besitzen sie dennoch eine schädigende Wirkung und müssen dementsprechend detoxifiziert werden. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann bspw. durch die in der Thylakoidmembran lokalisierten

Ascorbinsäureperoxidasen zu Wasser reduziert werden, wobei Ascorbinsäure (Asc) zu Dehydroascorbinsäure (DHA) oxidiert wird. Neue Studien von **Dietz (2014)** zeigen, dass das Ascorbinsäure-Glutathion-System eine Rolle als *Retrogrades Signal* im Zusammenhang mit Licht- und oxidativem Stress spielen könnte. Die ROS-Produktion hat darüber hinaus die Induktion kerncodierter Gene zur Folge, die an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sind, z.B. die Ascorbinsäureperoxidase2 (APX2; **Karpinski et al., 1999**). Es konnte dennoch nicht geklärt werden, ob ROS direkt als (retrograde) Signale fungieren oder ob eher Moleküle, die bei der Schädigung durch ROS entstehen, die Signalwirkung übernehmen. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine höhere Lebensdauer als <sup>1</sup>O<sub>2</sub> besitzt, könnte es in der Lage sein, die Chloroplasten zu verlassen, um dann als *Retrogrades Signal* zu fungieren (**Noctor et al., 2000; Karpinski et al., 2013**). Allerdings konnte bereits eine schnelle Stressantwort, ausgelöst durch <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, in der *fluorescent (flu)*-Mutante gezeigt werden (**op den Camp et al., 2003**).

#### 2.1.4 Plastidäre Genexpression (PGE)

Studien an Pflanzenkeimlingen lassen vermuten, dass chloroplastidäre Transkripte und die entsprechenden Genprodukte Einfluss auf die nukleäre Genexpression nehmen (**Ahlert et al., 2003; Tiller und Bock, 2014**). Jedoch scheint die PGE nur während der Keimlingsentwicklung und der Chloroplastenbiogenese eine entscheidende Rolle in der retrograden Signalübermittlung zu spielen (**Koussevitzky et al., 2007; Pogson et al., 2008**).

Die Behandlung von sog. *photosynthesis-associated nuclear genes* (PhANGs, z.B. *LHCBI*) mit dem Antibiotikum Lincomycin, welches gezielt die plastidäre, aber nicht die nukleäre Genexpression hemmt, führt zu einer Reprimierung der PhANGs (**Rapp und Mullet, 1991**). Bei der Expression des *LHCBI*-Gens besteht in der Regel eine Lichtabhängigkeit. In der Photomorphogenesemutante *cop1-4 (constitutive photomorphogenic1-4)* konnte jedoch auch im Dunkeln nach Lincomycinbehandlung eine verminderte Expression von *LHCBI* festgestellt werden (**Sullivan und Gray, 1999**). Das *Retrograde Signal* ausgehend von PGE scheint daher lichtunabhängig zu sein (**Chi et al., 2013**).

Auch in Senf (*Sinapis alba* L.) konnte die Herunterregulierung von *LHCBI* nach Zugabe von Chloramphenicol, einem Inhibitor der plastidären Proteinsynthese, beobachtet werden. Bereits nach 48 h hatte jedoch die Wirkung des Inhibitors auf die nukleäre Genexpression nachgelassen. Daraus ist zu schließen, dass die Plastiden diese speziellen Signale nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium aussenden bzw. wahrnehmen können (**Oelmüller et al., 1986**).

### 2.1.5 Abscisinsäure (ABA)

Werden Pflanzen spontan sehr hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, reagieren diese darauf u.a. mit Wärmeabgabe. Die Energie des Lichtes, die im Normalfall von den chlorophyllhaltigen Lichtsammelkomplexen aufgenommen und zum Elektronentransport genutzt wird, wird dann in Wärme umgewandelt. Der Xanthophyllzyklus spielt in der Lichtenergieregulierung dabei eine wichtige Rolle. Ein Nebenprodukt dieses Zyklus ist Xanthoxin, ein Ausgangssubstrat der Biosynthese von Abscisinsäure (ABA, *abscisic acid*) im Cytosol. Um auf wechselnde Umweltbedingungen, in diesem Fall hohe Lichtintensitäten, zu reagieren, könnten Pflanzen daher ABA als Signal nutzen, um die Genexpression im Kern zu regulieren.

**Baier und Dietz (2005)** konnten zeigen, dass eine Kopplung zwischen den Signalwegen von ABA sowie ROS und Redoxkomponenten (z.B. Peroxiredoxin) besteht. Darüber hinaus kommt es zu Überschneidungen zwischen ABA- und Zuckerwahrnehmung in Pflanzen (**Dekkers *et al.*, 2008**). Wie auch schon für die PGE erfolgten die meisten Studien, die eine Interaktion von Zuckern und Pflanzenhormonen beschreiben, an Keimlingen in frühen Entwicklungsstadien (**León und Sheen, 2003; Gibson, 2005**).

### 2.1.6 Plastidengenerierte Metabolitsignale einschließlich Kohlenhydraten

Plastidengenerierte Metabolitsignale können ebenso eine Rolle in der Kommunikation zwischen Plastid und Zellkern spielen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Endprodukte der photosynthetischen Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>)-Fixierung, d.h. im Speziellen Kohlenhydrate, mögliche Kandidaten des *Retrograden Signals* sind (**Smeekens 1998, 2000; Rolland *et al.*, 2002a; Rolland *et al.*, 2006; Bräutigam *et al.*, 2009; Heinrichs *et al.*, 2012; Schmitz *et al.*, 2012; Schmitz *et al.*, 2014; Häusler *et al.*, 2014**). Neueste Studien geben Hinweise darauf, dass auch Triosephosphate, die *via* TPT aus den Chloroplasten exportiert werden, cytosolische Signaltransduktionswege auslösen, an denen APETALA2-like-Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (**Vogel *et al.*, 2014**).

## 2.2 Charakterisierung der Hochlicht-induzierten Phänotypen der *Arabidopsis thaliana adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante

Licht ist ein entscheidender Umweltfaktor. Werden Pflanzen jedoch zu intensivem Licht ausgesetzt, kann dies zu Schäden in der Thylakoidstruktur führen. Damit die Anpassung, d.h. die Akklimatisierung, von Chloroplasten an wechselnde Lichtintensitäten erfolgt, müssen plastidär- sowie kerngesteuerte Prozesse koordiniert werden. *Retrograde Signale* beeinflussen möglicherweise die Expression kerncodierter Gene, die z.B. an der Akklimatisierung beteiligt sind. Die Beantwortung der Frage, ob eventuell Kohlenhydrate an der Hochlicht-

akklimatisierung beteiligt sind, erfolgte mit der Untersuchung von *A. thaliana*-Mutanten mit Defekten im Tag- bzw. Nachtexport von Photoassimilaten aus den Chloroplasten.

Triosephosphate (TP), die Exportform der Photoassimilate während des Tages, werden aus dem Stroma der Chloroplasten über den TP/Phosphat Translokator (TPT; **Fliege et al., 1978**) in das Cytosol der Mesophyllzellen transportiert. Dies erfolgt im Austausch mit anorganischem Phosphat ( $P_a$ ). Im Cytosol werden die TP dann für die Synthese von Saccharose verwendet (**Flügge, 1999**). Ein Teil der TP verbleibt jedoch in den Chloroplasten und wird während der Lichtperiode zur Biosynthese von transitorischer Stärke als Kohlenhydratspeicher genutzt.

Studien an *Nicotiana tabacum* (**Häusler et al., 1998**) belegen, dass die durch *antisense*-Konstrukte hervorgerufene verminderte Transportkapazität des TPT durch einen erhöhten Stärkeumsatz im Licht kompensiert werden kann. Dieser Befund wurde mit Isolierung der *tpt-1*-Mutante aus *A. thaliana*, die allelisch zu *ape2* (*acclimation of photosynthesis to the environment2*; **Walters et al., 2003**) ist, bestätigt (**Schneider et al., 2002**; **Walters et al., 2004**). Um die Bedeutung der Stärke als temporären Kohlenhydratspeicher in der *tpt-1*-Mutante zu bestätigen, wurde diese in den Hintergrund der *adg1-1*-Mutante gekreuzt, die einen Defekt in der Stärkebiosynthese aufweist (AGPase; **Lin et al., 1988a**). Die resultierende Doppelmutante ist zwar entwicklungs- als auch wachstumsfähig, zeigt aber gegenüber dem Wildtyp und der Einzelmutanten einen retardierten Wachstumsphänotyp (**Schneider et al., 2002**). Neben der Wachstumsretardierung wies die *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante einen „Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz“-Phänotyp (HCF) sowie eine erhöhte Stapelung der Grana-thylakoide und Zunahme der Plastoglobuli auf (**Häusler et al., 2009**). Da es sich bei der *tpt-1*-Mutante nur um eine *knock down*-Mutante handelt, wurde eine weitere Mutante (*tpt-2*) isoliert, um die Konsequenzen eines vollständigen Funktionsverlusts des TPTs analysieren zu können (**Schmitz et al., 2012**). Anders als bei *tpt-1* (Ws-2-Hintergrund) liegt die durch eine T-DNA verursachte Mutation des TPT hier im Hintergrund von Col-0. Wie schon die *adg1-1/tpt-1*-Mutante zeigte auch die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante einen retardierten Wachstums- sowie HCF-Phänotyp, wenn die Anzucht bei einer Photonenflussdichte (PFD) von über  $50\text{--}70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erfolgte. Wurden die Pflanzen jedoch bei einer niedrigeren PFD angezogen, konnten keine Unterschiede zum Wildtyp und den Einzelmutanten festgestellt werden. Die Beeinträchtigung des Tag- und zusätzlich des Nachtexports von Photoassimilaten in *adg1-1/tpt-2* wirkt sich auch auf die Photosynthese aus, die wiederum abhängig von der Lichtintensität ist. Um die charakteristischen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante

daher untersuchen zu können, wurden die Pflanzen entweder im Schwachlicht (LL,  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) oder im Hochlicht (HL,  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) angezogen (Abb. 2.1).

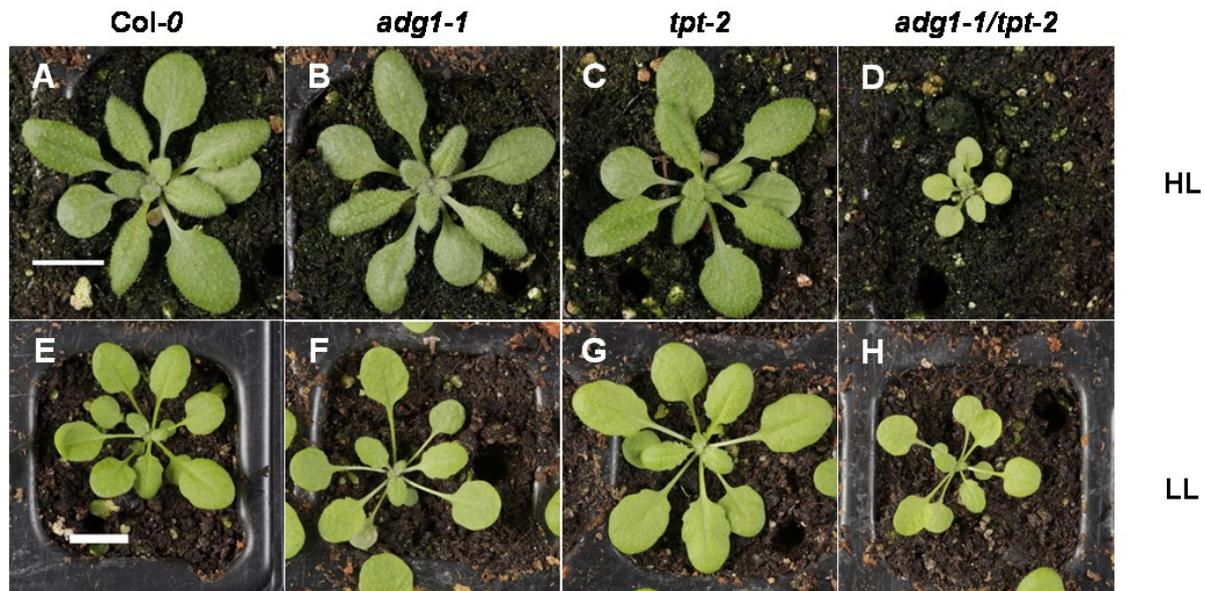


Abb. 2.1: **Wachstumsphänotyp in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten** von Col-0 (A, E), *adg1-1* (B, F), *tpt-2* (C, G) und *adg1-1/tpt-2* (D, H). Die Pflanzen wurden für ca. 3/5 Wochen bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL) bzw.  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (LL) unter Langtagbedingungen (16/8 h) angezogen. Die Größenstandards (A, E) definieren jeweils 1 cm für die entsprechende Lichtintensität.

Ursache für den HCF-Phänotyp ist ein erhöhter Wert der Grundfluoreszenz ( $F_0$ ; Häusler *et al.*, 2009). Es wurde jedoch zunächst vermutet, dass dies auf einen Anstieg der Chlororespiration zurückzuführen ist. Chlorophyll *a*-Fluoreszenzemissionen isolierter Thylakoide bei 77 Kelvin belegten jedoch, dass der Hauptanteil des HCF-Phänotyps durch nicht an die Kernkomponenten des Photosystems II oder I gekoppelte LHCs gekennzeichnet ist (Schmitz *et al.*, 2012). Üblicherweise findet eine Bindung der LHCs an die Reaktionszentren der Photosysteme statt. Ultrastrukturelle Analysen der Chloroplasten zeigten auch, wie schon für die *adg1-1/tpt-1*-Mutante Veränderungen in der Struktur der Granathylakoide sowie einer höheren Anzahl an Plastoglobuli (Häusler *et al.*, 2009). Bei Schmitz *et al.* (2012) wurde ergänzend die Ultrastruktur der Chloroplasten aus Pflanzen analysiert, die unter LL-Bedingungen angezogen wurden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der Anteil löslicher Zucker in der Doppelmutante deutlich minimiert ist, was für einen Kohlenhydratmangel innerhalb der Pflanze spricht. Dies stellt eine Erklärung für den retardierten Wachstumsphänotyp von *adg1-1/tpt-2* dar. Von Schmitz *et al.* (2012) wurde außerdem gezeigt, dass die exogene Zugabe von Saccharose (Suc) unter HL-Bedingungen den

Wachstumsphänotyp von *adg1-1/tpt-2* rettet. Mit Generierung der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante konnte die Rettung durch eine zuckerbedingte Induktion des GPT2 (Glucose-6-phosphat/Phosphat Translokator2) widerlegt werden. Warum die Bereitstellung von Zellbausteinen und Energieträgern in Form von Zuckern außerdem zur Rettung des HCF-Phänotyps führt, ist nicht eindeutig erklärt. Die mögliche direkte Aufnahme der Zucker in den Chloroplasten und deren dortiger Verstoffwechslung liefert dafür einen möglichen Erklärungsansatz (**Heinrichs et al., 2012; Häusler et al., 2014**). Die Verstoffwechslung der aufgenommenen Zucker im Cytosol mit anschließendem Transport von Intermediaten in den Chloroplasten, die wichtig für den plastidären Anabolismus sind, könnte ebenfalls die zuckerabhängige Rettung des HCF-Phänotyps erklären. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass der Kohlenhydratstatus in den Zellen eine Rolle in der Akklimatisierung der Pflanzen an sich verändernde Umweltbedingungen spielt.

## 2.3 Perzeption und Transduktion von Zuckersignalen

### 2.3.1 Zucker: Endprodukte der Photosynthese

Die Hauptprodukte des plastidären Calvinzyklus sind TP, die z.T. über den TPT aus den Chloroplasten transportiert und im Cytosol zu Suc umgewandelt werden, um dann bspw. in der Vakuole gespeichert zu werden (**Wind et al., 2010**). Durch Invertasen, die im Cytosol, in der Vakuole aber auch in der Zellwand lokalisiert sind, kann Suc in Glucose (Glc) und Fructose (Fru) gespalten werden (**Roitsch und González, 2004**).

Zucker sind das wichtigste Endprodukt der Photosynthese und dienen der Pflanze u.a. als Kohlenstoff- und Energiequelle. In Form transitorischer Stärke kann überschüssige Energie zudem während der Lichtphase in den Chloroplasten gespeichert werden. Die Mobilisierung der Stärke durch  $\beta$ -Amylase und DPE1 (DISPROPORTIONATING ENZYME1; **Zeeman et al., 2010**) markiert den Beginn des Photoassimilateexports während der Nacht. Die Endprodukte des Stärkeabbaus sind Maltose und Glucose (Glc). Der Export von Glc aus dem Chloroplasten erfolgt über den plastidären Glc-Transporter (pGlcT; **Weber et al., 2000**), der von Maltose über den MEX-Transporter (MALTOSE EXCESS; **Niittylä et al., 2004**). Im Cytosol findet daraufhin die Umwandlung von Maltose zu Glucose-1-phosphat statt, welches dann als Substrat für weitere Stoffwechselreaktionen zur Verfügung steht (**Fettke et al., 2007**).

### 2.3.2 Die Rolle von Zuckern als Signalmoleküle

Neben der Funktion als temporärer Speicherstoff, Transportform, Grundbaustein oder Energiequelle können Kohlenhydrate auch als Signalmoleküle fungieren, um die Expression kerncodierter, photosyntheserelevanter Gene zu beeinflussen (**Koch, 1996**). Gerade wegen der Signalfunktion, des Vorhandenseins in allen Zellkompartimenten sowie der direkten Proportionalität von Kohlenhydratsynthese und Photosyntheserate, stellen Kohlenhydrate ideale Signale dar, die an der Akklimatisierungsantwort in Blättern beteiligt sein könnten (**Häusler et al., 2014**). Die CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate im Chloroplastenstroma sowie der Verbrauch der Kohlenhydrate durch katabolische Reaktionen bzw. den Transport von Kohlenhydraten über das Phloem sind für den Kohlenhydratstatus in den Zellen relevant (**Paul und Pellny, 2003**).

### 2.3.3 Mechanismen der Perzeption und Transduktion

Die Mechanismen der Perzeption und Transduktion von Zuckersignalen finden sich in einem komplexen regulatorischen Netzwerk wieder, das eine Verbindung zwischen Umweltreizen und metabolischen Signalen schafft. Nicht nur die Regulation durch Pflanzenhormone wie Ethylen, Cytokinin und Auxin steht in Verbindung mit der Wahrnehmung von Zuckersignalen (**Rolland et al., 2006**), auch Überschneidungen zu ABA-Signalwegen konnten gezeigt werden (**Arenas-Huertero et al., 2000**).

Hexokinasen (*AtH XK1* und *AtH XK2*; **Jang et al., 1997**; **Xiao et al., 2000**) sind Glc-Sensoren höherer Pflanzen. Die Perzeption von Zuckern, die die HXK mit einbezieht, wurde zuerst in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*; **Ma et al., 1989**; **Rose et al., 1991**; **Rolland et al., 2001, 2002**), später auch in höheren Pflanzen beschrieben (**Jang und Sheen, 1994**). Pflanzen nutzen die HXK1, um Nährstoff-, Licht- und Hormonsignalwege miteinander zu verknüpfen. Das Zusammenspiel und der Einfluss dieser Netzwerke auf Wachstum und Entwicklung spielen daher bei der Anpassung von Pflanzen an verschiedene Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle. Die HXK1 fungiert in Pflanzen sowohl als Glc-Sensor als auch als Hauptkomponente von Glc-Signalwegen (**Yanagisawa et al., 2003**). Die Untersuchung der *HXK*-Mutante *gin2-1* durch **Moore et al.** (2003) lieferte die entsprechenden Hinweise. Isoliert wurden diese *glucose insensitive*-Mutanten durch ein Screening, bei dem die Anzucht der Pflanzen auf Medium mit hoher Glucosekonzentration (6–7 %) erfolgte. Obwohl die HXK1-Aktivität auf das Cytosol beschränkt ist, konnte eine Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden (**Yanagisawa et al., 2003**). Studien an Spinat belegten die Assoziierung der HXK1 mit der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten (**Wiese et al., 1999**). Aber auch bei der Fraktionierung von

Mitochondrien aus *A. thaliana* konnten zwei Isoformen der HXK identifiziert werden (**Giegé et al., 2003**). **Karve et al.** (2010) lieferten außerdem ein Indiz für eine zusätzliche und funktionale plastidäre HXK (pHXK), die in der plastidären Genexpression involviert sein soll (**Zhang et al., 2010**).

Die Signalwege von Glc und Ethylen kreuzen sich z.B. *downstream* der HXK1 und des Ethylenrezeptor1 (ETR1) in GIN1 (**Zhou et al., 1998**). GIN1 übernimmt u.a. eine Schlüsselrolle in der Glc-abhängigen Keimungshemmung bzw. dem Ergrünen und der Entfaltung von Kotyledonen. GIN1 ist dabei identisch zu ABA2, das an der Biosynthese von ABA beteiligt ist (**Cheng et al., 2002**). Während der Keimung und der Keimlingsentwicklung übernehmen ABA-insensitive (ABI) Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ABI4, entscheidende Funktionen und interagieren außerdem mit Zuckersignalwegen (**Rolland und Sheen, 2005**).

Obwohl es scheint, dass die HXK1 eine zentrale Position in der Wahrnehmung und Weiterleitung zuckerabhängiger Signale übernimmt, gibt es fast genauso viele Veröffentlichungen über HXK1-unabhängige Zuckersensoren und -signalwege (**Price et al., 2004**; **Rolland et al., 2006**). Die FINS1/FBP-Mutante (FRUCTOSE INSENSITIVE1/Fructose-1,6-bisphosphatase; **Cho und Yoo, 2011**) konnte bspw. als Hauptregulator der Fru-Signaltransduktion identifiziert werden. In Pflanzen kommen außerdem verschiedene Fructokinase vor, von denen einige möglicherweise ebenfalls als Zuckersensoren fungieren können (**Pego und Smeekens, 2000**).

Nicht nur hohe Konzentrationen von Glc, Suc oder Fru wirken sich negativ auf das Pflanzenwachstum aus, auch das Disaccharid Trehalose hat einen inhibierenden Effekt (**Schluepmann et al., 2004**). Ein Intermediat der Trehalosebiosynthese ist Trehalose-6-phosphat (Tre6P), was durch die Aktivität der Trehalosephosphatsynthase (TPS) aus UDP-Glc und Glucose-6-phosphat (Glc6P) gewonnen wird. Anschließend wird Tre6P von der Trehalosephosphatphosphatase (TPP) dephosphoryliert, so dass daraus Trehalose entsteht. **Pellny et al.** (2004) konnten zeigen, dass die Überexpression der bakteriellen TPS zu einer verbesserten photosynthetischen Leistung unter verschiedenen CO<sub>2</sub>- und Lichtbedingungen führt. Bestimmt wurde das anhand der CO<sub>2</sub>-Assimilation und der maximalen Quanteneffizienz (ΦPSII) im Licht. Eine erhöhte TPP-Aktivität zeigte hingegen einen gegenteiligen Effekt. Die chloroplastidäre Stärkebiosynthese kann durch die Zugabe von Tre6P ebenfalls beeinflusst werden. Dies geschieht über die Aktivierung der ADP-Glc-Pyrophosphorylase (AGPase) aufgrund posttranslationaler Redoxmodifikationen (**Kolbe et al., 2005**; **Lunn et al., 2006**). Durch diese Modifikationen wird die Rate der Stärkebiosynthese erhöht. Tre6P inhibiert zudem die Proteinkinase SnRK1 (**Zhang et al., 2009**), welche an der Regulation der

Zellantwort auf den endogenen Energie- bzw. Kohlenhydratstatus beteiligt ist. Dies bestätigt eine Beteiligung der TPS an der Zuckerwahrnehmung (**Wingler *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013**).

### 2.4 Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untergliedert sich in zwei Abschnitte.

Im ersten Teil erfolgte die weitere Charakterisierung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante in Bezug auf die Akklimatisierung an veränderte Lichtbedingungen. Dafür wurden Wildtyppflanzen (*Col-0*), *adg1-1*- und *tpt2*-Einzelmutanten sowie die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante unter Schwachlichtbedingungen (LL,  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) angezogen und anschließend ins Hochlicht (HL,  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) transferiert. Die Probennahme erfolgte dann zu definierten Zeitpunkten nach dem LL-HL-Transfer. Metabolom- und Transkriptomanalysen sollte eine exaktere Beurteilung der Akklimatisierungsantwort ermöglichen.

Im zweiten Teil wurde die Frage gestellt, ob an der zuckerabhängigen Rettung des HL-induzierten Wachstums- bzw. des HCF-Phänotyps von *adg1-1/tpt-2* unter HL-Bedingungen die HXK1 beteiligt ist. Dafür wurde die *HXK1*-Mutante *gin2-1* in den Hintergrund der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante gekreuzt. Der Effekt von exogener Zuckerzugabe auf das Wachstum, den HCF-Phänotyp sowie auf die photosynthetische Elektronentransportrate (ETR) wurde mit Hilfe der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante nachfolgend untersucht. Darüber hinaus soll diskutiert werden, ob eventuell die Verstoffwechslung von exogen zugeführten Zuckern innerhalb der Chloroplasten einen Erklärungsansatz für die Rettung der HL-Induzierten Phänotypen darstellt. Desweiteren soll in der vorliegenden Arbeit die Frage erörtert werden, inwieweit die zuckervermittelte Akklimatisierung im Zusammenhang mit dem Konzept des *Retrograden Signals* gebracht werden kann.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Oligonukleotide

Alle zur Durchführung der Experimente verwendeten Laborchemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien folgender Firmen genutzt: AppliChem (Darmstadt), Bionline (Luckenwalde), Biomol (Hamburg), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Hamburg).

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (Hamburg) synthetisiert. In **Tab. 3.1** sind alle in der Arbeit verwendeten Primer angegeben. Primer, deren Name mit dem Kürzel RL versehen sind, wurden spezifisch für die qRT-PCR (**Abschnitt 3.11.7**) entworfen.

Tab. 3.1: **Bezeichnung, AGI Code und Sequenz verwendeter Primer**

<b>Primer</b>	<b>AGI Code</b>	<b>Sequenz in 5'→3'-Orientierung</b>
Actin fwd	At3g18780	TAA CTC TCC CGC TAT GTA TGT CGC
Actin rev	At3g18780	CCA CTG AGC ACA ATG TTA CCG TAC
HXK1_cDNA_fwd	At4g29130	GGT GGC TGT TTT GGT TGT TC
HXK1_cDNA_rev	At4g29130	GCC TGA TCC ATC ATT GGA GT
HXK1 Exon 6 fwd	At4g29130	AGA TGG CTG AAG ATG CTG CT
HXK1 3'-UTR rev	At4g29130	CTT TTG TGT ACC CAT TTG TTG G
RL_Actin2neu_fwd	At3g18780	CTT GCA CCA AGC AGC ATC AA
RL_Actin2neu_rev	At3g18780	CCG ATC CAG ACA CTG TAC TTC CTT
RL_GPT2_fwd	At1g61800	TGC CCT CGG TGC TGC CAT TG
RL_GPT2_rev	At1g61800	CCT CAC TGC TTC GCC TGT GAG T
RL_LhcbI fwd	At1g29920	TTC CCT GGA GAC TAC GGA TG
RL_LhcbI rev	At1g29920	CCC ACC TGC TTG GAT AAC T
RL_NR1 fwd	At1g77760	GAT GGG CTA GTA AGC ATA AGG AGA
RL_NR1 rev	At1g77760	ACA GCT TCA GTT ATA AAC CCG GTA
RL_pHXK fwd	At1g47840	GAA TAT GAA TGC AAG GAG GAG AGT
RL_pHXK rev	At1g47840	CTT CTC CAG AAT TGC CAC TAT ACC
RL_SBP fwd	At3g55800	GTT CTC ACC AGG AAA CTT AAG AGC
RL_SBP rev	At3g55800	GGT GTA TCG CAG TGT GTA TTT CTC
TPT_cDNA_fwd	At5g46110	GGA ATT CCG AAA TTG AGA CG
TPT_cDNA_rev	At5g46110	CTT GCC GTT TCT CTT CTT CG
TPT Allel	At5g46110	GTA ACT TAC GAG TAA ACT GGC TAC
TPT Insert	At5g46110	GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C
TPT both	At5g46110	TGA CTA GCC ATG GAT ACT TGG CGA GGA

### 3.2 Enzyme und Reagenzien

Nachfolgend sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme für die Molekularbiologie und Größenstandards aufgelistet (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Enzyme und Größenstandards

Name	Hersteller / Bezugsquelle
$\alpha$ -Amylase	Roche (Mannheim)
Amyloglukosidase (aus <i>Aspergillus niger</i> )	Sigma-Aldrich (Hamburg)
BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1	Applied Biosystems (Foster City (USA))
DNA-Größenmarker <i>GeneRuler 1kb</i>	Thermo Scientific (Schwerte)
DNA-Größenmarker <i>GeneRuler 100bp</i>	Thermo Scientific (Schwerte)
DNA-free <sup>™</sup> , DNase Treatment & Removal (DNaseI)	Thermo Scientific (Schwerte)
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	Roche (Mannheim)
Hexokinase (aus Hefeüberproduzierer)	Roche (Mannheim)
Invertase (aus Bäckerhefe)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Phosphoglukoisomerase (aus Hefe)	Roche (Mannheim)
Reverse Transkriptase <i>BioScript<sup>™</sup></i>	Bioline (Luckenwalde)
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase	Thermo Scientific (Schwerte)
Power SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Warrington (UK))

### 3.3 Geräte

Im Folgenden sind alle Geräte aufgeführt, die für die Durchführung der Experimente genutzt wurden (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller / Bezugsquelle
Bohrer	RW 16, IKA-Werke, Staufen RZR 50, Heidolph, Vertrieb: Hartenstein, Würzburg
Heizblöcke	Thermomixer 5436, Thermostat 5320, Eppendorf, Wesseling HTM 130L und MHR23, HLC Biotech, Bovenden
HPLC	UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex, Schwerte
Magnetrührer	IKAMAG REO, IKA-Werke, Staufen
PAM	ImagingPAM <i>M-Series</i> , Heinz Walz GmbH, Effeltrich
PCR-Maschinen	PTC 100 <sup>™</sup> und PTC 200, MJ Research, Vertrieb: Biozym, Hess. Oldendorf DNA Engine <sup>®</sup> PTC, BioRAD, München 7300 Real Time PCR System, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt

Gerät	Hersteller / Bezugsquelle
ph-Meter	SevenEasy™ pH-Meter, Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Photometer	Infinite® M200, TECAN Group Ltd., Männedorf (CH) NanoDrop ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten	Typ Research, Eppendorf, Wesseling Typ Pipetman, Gilson, Lewis Center (USA) Typ Labmate, Abimed, Langenfeld
Schüttler	IKA® VIBRAX VXR basic, IKA-Werke, Staufen Infors HT Typ multitron, Infors AG, Bottmingen/Basel (CH)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301, Eppendorf, Wesseling
Vortexer	Vortex Genie®2, Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad	Typ 1003, GFL mbH, Burgwedel
Wärmeschrank	Universalschrank, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Zelldisruptor	TissueLyser, Quiagen, Vertrieb: Retsch®, Haan
Zentrifugen	Centrifuge 5417, 5417 R, 5417 C, 5402 und miniSpin F-45-12-11, Eppendorf, Wesseling

### 3.4 Software und Datenbanken

Alle verwendetet Oligonukleotide (**Abschnitt 3.1**) wurden mit dem mit dem Online-Programm Primer3 (**Koressaar und Remm, 2007**) entworfen.

Sequenzen (**Abschnitt 3.11.8**) wurden mit dem Programm Chromas Lite Version 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, AU) ausgewertet.

Die Datenerfassung sowie Auswertung photosynthetischer Parameter (**Abschnitt 3.13**) erfolgte mit dem Programm ImagingWin v2.32 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich).

*FIRE* (**Elemento et al., 2007**) wurde für die Identifizierung von regulatorischen Elementen (Promotormotive) verwendet (**Abschnitt 3.14.1**).

Expressionsdaten (**Abschnitt 3.14.2**) wurden mit dem Programm RStudio Version 0.98.507 gefiltert.

Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme (**Abschnitt 3.16.1**) wurde mit der Software Chromeleon® (Thermo Scientific - Dionex, Schwerte) durchgeführt.

Die Bestimmung von Blatt- bzw. Rosettenflächen erfolgte mit den Programmen *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda (USA)) sowie *Photoshop CS* (Adobe Systems, San José (USA)).

Folgende Datenbanken wurden verwendet: Aramemnon (**Schwacke et al., 2003**), eFP Browser (**Winter et al., 2007**), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda (USA)) und Tair (**Swarbreck et al., 2008**).

### 3.5 Pflanzenmaterial

Die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente erfolgte an Pflanzenlinien der Spezies *Arabidopsis*, die sich in folgenden genetischen Hintergründen befanden: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. Columbia-0 (Col-0) und cv. *Landsberg erecta* (Ler). In der nachfolgenden Tabelle sind alle verwendeten Mutanten und ihre Charakterisierung aufgeführt (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Pflanzenlinien

Mutante	AGI Code	Ökotyp	Mutagenese	Referenz
<i>adg1-1</i>	At5g48300	Col-0	EMS	Lin et al. (1988b)
<i>gin2-1</i>	At4g29130	Ler	EMS	Moore et al. (2003)
<i>ginWisc</i>	At4g29130	Col-0	T-DNA	(WiscDsLoxHs044_02E)
<i>gpt2-1</i>	At1g61800	Col-0	T-DNA	Niewiadomski et al. (2005)
<i>tpt-2</i>	At5g46110	Col-0	T-DNA	(SALK_03707)

### 3.6 Nährmedien

Für die Anzucht und Kultivierung von *Arabidopsis*-Pflanzen in Sterilkultur wurde halbkonzentriertes MS (Murashige und Skoog)-Medium (Tab. 3.5) verwendet.

Tab. 3.5: Nährmedium für *Arabidopsis thaliana*

Medium	Zusammensetzung
½ MS	0,23 % MS-Medium (Typ <i>basal salt mixture</i> , Duschefa M0221.0050); mit 0,1 M KOH auf pH 5,6; in H <sub>2</sub> O für Platten: 0,7 % Pflanzenagar

Die Sterilisation der Medien erfolgte bei 121 °C und 1,2 bar für 20 min.

### 3.7 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

#### 3.7.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Die Anzucht erfolgte auf einem Substratgemisch aus Einheitserde (Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz (AT)) im Verhältnis 3:1. Die ausgesäten Samen wurden ggf. für 48 h bei 4 °C unter Lichtabschluss stratifiziert. Die Keimung und Anzucht der Pflanzen erfolgte anschließend unter den gewünschten Anzuchtbedingungen (**Abschnitt 3.8**). Nach ca. 7–10 Tagen wurden die Keimlinge je nach Versuchsaufbau in große oder kleine Aussaatschalen, 77er Multiplatten, 6 cm- oder 9 cm-Plastiktöpfe in oben genanntes Substratgemisch pikiert.

#### 3.7.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur ermöglichte die Fütterung bestimmter Substanzen unter kontrollierten Bedingungen. Die Pflanzen wurden hierzu auf ½ MS-Agarplatten (**Tab. 3.5**) angezogen.

Die Samen wurden vor der Aussaat oberflächensterilisiert. Bei der Trockensterilisation erfolgte dies mittels Chlorgas. Hierzu wurden kleine Mengen an zu sterilisieren Samen in Reaktionsgefäße gegeben und offen in einen Exsikkator gestellt. Die Chlorgasentwicklung wurde gestartet, indem zu 100 ml 13 % Natriumhypochloritlösung 3 ml 37 % Salzsäure gegeben wurden. Die Samen verblieben zur Sterilisation für 4–5 Stunden im luftdicht-verschlossenen Exsikkator. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße entnommen und verschlossen, um eine Kontamination der Samen zu verhindern. Bevor die Samen auf Platten ausgelegt werden konnten, ließ man diese noch für 30–60 min unter der Sterilbank (40 Kojair® 2009, Kojair Tech Oy, Vilppula (FI)) offen abdampfen.

Unter Verwendung von Ethanol konnte alternativ eine Feuchtsterilisation durchgeführt werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten hierfür unter der Sterilbank. Die zu sterilisierenden Samen wurden in Reaktionsgefäße gegeben und anschließend für ca. 2–5 min in 1 ml 70 % Ethanol geschüttelt. Nach dem Abziehen des Ethanols wurden die Samen in 1 ml 99 % Ethanol aufgenommen und für maximal 30–60 s wiederum geschüttelt. Nachdem das gesamte Ethanol entfernt wurde, verblieben die Reaktionsgefäße bis zum vollständigen Abtrocknen der Samen offen unter der Sterilbank.

Die sterilen Samen konnten nun auf die entsprechenden Platten ausgelegt werden. Die mit gasdurchlässigem Vliesklebeband verschlossenen Platten wurden ggf. für 48 h bei 4 °C unter Lichtabschluss stratifiziert. Die Keimung und Anzucht erfolgte anschließend unter den gewünschten Bedingungen im Klimaschrank oder der Klimakammer (**Abschnitt 3.8.2, 3.8.3**).

Mussten Pflanzen bis zur Samenreife in Sterilkultur angezogen werden, erfolgte dies in Flüssigmedium, um über einen längeren Zeitraum gleichbleibende Nährstoffbedingungen zu gewährleisten.  $\frac{1}{2}$  MS-Medium (Tab. 3.5) wurde dazu zusätzlich mit 1 % Saccharose versetzt und in regelmäßigen Abständen gewechselt. Die Pflanzen verblieben während des gesamten Reproduktionszyklus in der Klimakammer (Abschnitt 3.8.3).

### 3.8 Anzucht- und Wachstumsbedingungen von *Arabidopsis thaliana*

#### 3.8.1 Anzucht im Gewächshaus

Die Anzucht von Pflanzen zur Samengewinnung, Kreuzung oder zur Agrobakterienvermittelten Transformation erfolgte im Gewächshaus. Die Pflanzen wuchsen bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h, d.h. unter Langtagbedingungen, und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ungefähr 40 %. Die Lichtintensität betrug unter Tagesbedingungen durchschnittlich  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die Temperatur lag während der Tagperiode bei etwa 21 °C und während der Nachtperiode erfolgte eine Absenkung auf ca. 18 °C. Die Bewässerung erfolgte unter der Kontrolle der Gärtnerangestellten alle 1–2 Tage.

Bei einem Befall mit Trauermückenlarven wurden in regelmäßigen Zeitabständen Nematoden (Sautter und Stepper, Ammerbuch) zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt. Blattläuse wurden entweder mit 25 % Confidor-Emulsion (Bayer CropScience, Langenfeld) bekämpft oder es wurden Florfliegenlarven (Sautter und Stepper, Ammerbuch) eingesetzt.

#### 3.8.2 Anzucht im Klimaschrank

Die Anzucht von Arabidopsis-Pflanzen unter kontrollierten Lichtbedingungen fand in Klimaschränken (Percival Scientific, Perry (USA), Modell AR-36L3/HIL) statt. Keimung und Anzucht erfolgten unter Langtagbedingungen, d.h. unter einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei Temperaturen von 22/18 °C. Es herrschte eine Luftfeuchtigkeit von etwa 40–60 %. Die Pflanzen wuchsen je nach Versuchsaufbau bei einer Photonenflussdichte (PFD) von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL, Hochlicht) oder bei  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (LL, Schwachlicht). Als Lichtquellen dienten Neonröhren (Osram L18W/840, Lumilux Cool White, Osram, München). Die Pflanzen wurden je nach Bedarf alle 2–4 Tage mit Leitungswasser angestaut. Dies entfiel bei der Anzucht auf Agarplatten. Bei Befall mit Trauermücken wurden Gelbtafeln aufgehängt.

### 3.8.3 Anzucht in der Klimakammer

Die Pflanzenanzucht unter kontrollierte Bedingungen erfolgte je nach Versuchsaufbau in Langtag-Klimakammern. Die Pflanzen wuchsen unter einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h und bei einer relativen Luftfeuchte von 60 %. Während der Tagperiode lag die Temperatur bei 22 °C und während der Nachtperiode bei 18 °C. Die PFD wurde an die jeweiligen Versuche angepasst und betrug  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (LL) bzw.  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL). Neonröhren (Osram L58W/840, Lumilux Cool White, Osram, München) dienten als Lichtquelle. Die Pflanzen wurden ggf. alle 2–4 Tage mit Leitungswasser gewässert. Bei der Anzucht auf Agarplatten entfiel die Bewässerung.

Trauermücken wurde entweder mit Gelbtafeln oder dem Einsatz von Stechmückenfrei (W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal) entgegengewirkt.

### 3.9 Schwachlicht zu Hochlicht-Transfereperimente von *Arabidopsis thaliana*

Transfereperimente von schwachen ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) zu hohen ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) Lichtintensitäten dienten der Untersuchung physiologischer und biochemischer Kriterien der Akklimatisierung an veränderte Photonenflussdichten.

Arabidopsis-Pflanzen wurden hierfür auf Erde (**Abschnitt 3.7.1**) im Klimaschrank (**Abschnitt 3.8.2**) unter Langtagbedingungen (16/8 h) angezogen. Die PFD betrug während der Anzucht  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nach ca. 30 Tagen erfolgte die Ernte der Blattrosetten. Die Keimblätter und Wurzeln wurden dazu entfernt und das Blattmaterial anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Ernte des Blattmaterial für den Zeitpunkt  $t_0$  (LL,  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) erfolgte 4 Stunden nach Beginn der Tagperiode. Anschließend wurden die übrigen Pflanzen ins HL transferiert. Je nach Versuchsaufbau fanden dann weitere Ernten von Blattrosetten zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Transfer ins Hochlicht statt. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die bis zur Ernte bei einer PDF von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL) während der Tagperiode angezogen wurden. Die Ernte dieser im HL gewachsenen Arabidopsis-Pflanzen wurde ca. 21 Tage nach Keimung durchgeführt. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 3.10 Zuckerfütterung von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur

Um den Effekt von zugefütterten Zuckern in verschiedenen Arabidopsis-Pflanzenlinien auf morphologischer, physiologischer und molekularbiologischer Ebene zu untersuchen, wurden die Pflanzen unter kontrollieren Bedingungen in Sterilkultur angezogen. Oberflächensterilisierte Samen (**Abschnitt 3.7.2**) wurden hierzu auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten ohne

Zucker (Tab. 3.5) respektive jeweils mit 50 mM Glucose (Glc), Fructose (Fru) oder Saccharose (Suc) ausgelegt. Die Keimung und Anzucht der Pflanzen erfolgte unter einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h, d.h. unter Langtagbedingungen und bei Temperaturen von 22/18 °C. Die Photonenflussdichte betrug während der Tagperiode  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Je nachdem ob die Anzucht im Klimaschrank (Abschnitt 3.8.2) oder der Klimakammer (Abschnitt 3.8.3) erfolgt, lag die relative Luftfeuchte bei 40–60 %.

Um die konstante Zufuhr aller Nährstoffe und Zucker zu gewährleisten, wurden die Pflanzen nach ca. 7 Tagen auf frische Platten umgesetzt. An Tag 15 nach Aussaat wurden Messungen mit der ImagingPAM (Abschnitt 3.13) durchgeführt. Zu Analyse Zwecken wurde außerdem Pflanzenmaterial ca. 20 Tage nach Aussaat geerntet. Sowohl Keimblätter als auch Wurzeln wurden von den Blattrosetten entfernt und das Pflanzmaterial dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung lagerten die Proben bei -80 °C.

### 3.11 Molekularbiologische Methoden

#### 3.11.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Genotypisierung verschiedener *Arabidopsis*-Linien erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR; Abschnitt 3.11.2). Dafür musste zunächst genomische DNA (gDNA) aus den entsprechenden Pflanzenlinien isoliert werden. Ein kleines Blattfragment (ca.  $0,5 \text{ cm}^2$ ) wurde hierfür zusammen mit einer Stahlkugel in ein Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Zellaufschluss erfolgte dann in einem Zelldisruptor (TissueLyser, Retsch®, Haan). Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde anschließend in 400  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffers homogenisiert. Nach Zentrifugation (1 min, Raumtemperatur (RT), 13000 rpm) wurden 300  $\mu\text{l}$  des Überstandes mit 100 Volumenteilen Isopropanol versetzt, durch vorsichtiges Invertieren gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Die Fällung der gDNA erfolgte für 5 min bei RT und 13000 rpm in einer Zentrifuge. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Das DNA-haltige Pellet wurde abschließend in 50–100  $\mu\text{l}$  autoklaviertem, bidestilliertem (bidest.) Wasser resuspendiert. Bis zur Verwendung wurde die gDNA bei -20 °C gelagert.

<b>Extraktionspuffer</b>	EDTA (pH 8,0)	25 mM
	NaCl	250 mM
	SDS	0,5 % (v/v)
	TRIS/HCl (pH 7,5)	200 mM

### 3.11.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels PCR (*polymerase chain reaction*, **Mullis und Faloona, 1987**) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Dafür wurden jeweils zum 3'- und 5'-Ende des zu amplifizierenden Fragmentes komplementäre Oligonukleotide (Primer; **Tab. 3.1**) entworfen. Weitere Komponenten wurden in der angegebenen Menge und Konzentration auf Eis dazugegeben und gut vermischt, wobei die Reaktion standardmäßig in einem 20 µl-Ansatz erfolgte.

<b>Reaktionsansatz</b>	bidest. Wasser	15,35 µl
<b>PCR</b>	10-fach Puffer	2,00 µl
	dNTPs (je 10 mM)	0,60 µl
	5'-Primer (10 µM)	0,50 µl
	3'-Primer (10 µM)	0,50 µl
	<i>DreamTaq</i> (5 U/µl)	0,05 µl
	Matrize (DNA)	1,00 µl

Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte dann im Thermozykler (PCR-Maschine). Auf den ersten Denaturierungsschritt (94 °C, 180 s) der PCR-Reaktion folgte für jedes Primerpaar eine spezifische Anzahl von Zyklen (**Tab. Anhang 1**). Ein Zyklus bildet eine Abfolge aus einer Denaturierungsphase (94 °C, 30 s), einer Hybridisierungsphase (Primerpaar-spezifische Temperatur, 30 s) und einer Elongationsphase (72 °C, 60 s/1 kb). Anschließend wurde die Polymerisation bei 72 °C für 600 s fortgesetzt und die Reaktion in einem letzten Schritt auf 10 °C herab gekühlt (**Tab. 3.6**). Bis zum Auftrag auf ein Agrosegel (**Abschnitt 3.11.3**) erfolgte die Lagerung der Amplifikate bei -20 °C).

Da es sich beim dem 10-fach Polymerasepuffer (10x *DreamTaq Green Buffer*, Thermo Scientific, Schwerte) gleichzeitig auch um einen Ladepuffer für die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente handelt, konnte darauf verzichtet werden, die Proben vor der Auftragung auf ein Agarosgel zusätzlich mit einem Ladepuffer zu versetzen.

Tab. 3.6: **Standard-PCR-Programm**; hervorgehobener Bereich zeigt PCR-Abschnitt der Primer-spezifisch zyklisch wiederholt wurde

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94 °C	180 s
Denaturierung	94 °C	30 s
Primerhybridisierung	Primer-abhängig	30 s
Elongation	72 °C	60 s/ 1 kb
Elongation	72 °C	600 s
Ende	10 °C	∞

### ***Actin-PCR***

Ein Abschnitt des Actin2-Gens (At3g18780) wurde als endogene Kontrolle für die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR; Abschnitt 3.11.7) amplifiziert. Die Menge der in die qRT-PCR einzusetzenden cDNA richtete sich nach der Stärke der PCR-Fragmente in der entsprechenden Actin-PCR. Das Angleichen der cDNA-Proben auf äquivalente Mengen erfolgte unter Standardbedingungen (Tab. 3.6). Die ggf. Primer-spezifischen Anforderungen können der Tab. Anhang I entnommen werden. Erst danach wurden die cDNA in die qRT-PCR eingesetzt.

### ***Test auf Qualität und Funktionalität von qRT-PCR-Primern***

Die für die qRT-PCR (Abschnitt 3.11.7) verwendeten Primer (Tab. 3.1) wurden vor dem Einsatz sowohl auf ihre Qualität als auch auf ihre Funktionalität überprüft. Dies erfolgte unter Standardbedingungen für eine PCR, die Primer-spezifisch angepasst wurden (Tab. Anhang I). Erst nach der Überprüfung wurden die Primer ggf. für die qRT-PCR verwendet.

### **3.11.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte in 1 % oder 2 % (w/v) Agarosegelen, die mit 200 ng/ml Ethidiumbromid (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt waren. TAE 1-fach konzentriert diente als Elektrophoresepuffer. Um die Amplifikatgrößen zu bestimmen, wurden 6 µl des DNA-Größenstandards *GeneRuler 1kb* bzw. *GeneRuler 100bp* (Thermo Scientific, Schwerte) verwendet. Die angelegte Spannung lag je nach Gelgröße zwischen 80 V und 120 V. Die Auftrennung der Amplifikate betrug dabei 20–40 min. Die aufgetrennten PCR-Amplifikate wurden am Schluss mit Hilfe eines UV-Transilluminators (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht.

<b>TAE-Puffer</b>	EDTA (pH 8,0)	50 mM
<b>50-fach konzentriert</b>	Essigsäure	1 M
	TRIS	2 M

### **3.11.4 Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana***

Die Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte in modifizierter Form nach **Logemann et al.** (1987). Alle dafür auszuführenden Arbeitsschritte fanden unter einem Abzug statt. Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial (ca. 50–100 mg) wurde unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Bohrers pulverisiert und anschließend mit 600 µl Z6-Puffer versetzt. Das Homogenat wurde nach Zugabe von 500 µl PCI-Lösung (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1)

etwa 20 s mittels Vortexer gründlich durchmischt und dann zur Phasentrennung für 10 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert. Die Zugabe von PCI erfolgte, um pflanzliche Proteine und genomische DNA von der RNA zu trennen. Die farblose, obere, wässrige Phase (500 µl) wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte nacheinander die Zugabe von 0,05 Volumenteile 1 M Essigsäure und 0,7 Volumenteile 100 % Ethanol. Nach jedem Schritt erfolgte eine kräftige Durchmischung der Lösungen mittels Vortexer (ca. 20 s). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 20000 g) nach Fällung der RNA für 60 min auf Eis. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zunächst mit 500 µl 3 M Natriumacetat und anschließend mit 80 % Ethanol gewaschen. Nach jedem Schritt wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 4 °C, 20000 g) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde 5 min im Vakuumkonzentrator getrocknet und zuletzt in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80 °C.

<b>Z6-Puffer</b>	EDTA	20 mM
	Guanidinium-HCl	8 M
	MES	20 mM
	β-Mercaptoethanol	0,7 % (v/v)

### 3.11.5 Quantitative Bestimmung isolierter RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels Photometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei  $OD_{260nm}$ . Der Reinheitsgrad der isolierten RNA wurde zusätzlich über den Extinktionsquotienten 260/280 bestimmt. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, zeigt das Verhältnis der  $OD_{260nm}$  zur  $OD_{280nm}$  an, wie stark eine RNA-Lösung noch durch Proteine und auch Phenole verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 2,0 spricht für reine RNA.

### 3.11.6 DNaseI-Behandlung und Einzelstrang-cDNA-Synthese isolierter RNA

Um eine eventuelle Kontamination der isolierten RNA durch genomische DNA zu entfernen, wurde vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau mit dem Kit *DNA-free*<sup>TM</sup> von Ambion<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Schwerte) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur nachdem der Ansatz mit 2 µl Inaktivierungsreagenz versetzt wurde. Im nächsten Schritt wurde der Reaktionsansatz 1 min bei RT und 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand (14 µl) dann in ein neues, steriles Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand konnte dann in die Einzelstrang-cDNA-Synthese eingesetzt werden.

<b>Reaktionsansatz</b>	RNA	2,0 µg
<b>DNaseI-Verdau</b>	10x Puffer	1,5 µl
	DNaseI (2 U/µl)	1,0 µl
	mit bidest. Wasser auf 15µl auffüllen	

Um relative Transkriptmengen unterschiedlicher mRNAs (*messenger RNAs*) zu bestimmen, müssen diese zuvor in die entsprechenden cDNAs (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Für die reverse Transkription wurde hierfür die RNA-abhängige DNA-Polymerase *BioScript*<sup>TM</sup> von Bioline (Luckenwalde) verwendet. Dafür wurde der Überstand aus dem DNaseI-Verdau zunächst mit 1 µl Oligo-dT-Primer (Sigma-Aldrich, Hamburg) versetzt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte dann auf Eis. Das RNA/Oligo-dT-Primer-Gemisch wurde dann einen weiteren Reaktionsansatz gegeben, der die Einzelstrang-cDNA-Synthese schlussendlich initiierte. Nach 1 h bei 42 °C wurde die reverse Transkription durch Hitzeinaktivierung (10 min, 70 °C) gestoppt. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

<b>Reaktionsansatz</b>	5-fach Puffer	5,0 µl
<b>cDNA-Synthese</b>	dNTPs (10 mM)	1,0 µl
	<i>BioScript</i> <sup>TM</sup> (200 U/µl)	0,5 µl
	bidest. Wasser	3,5 µl
	RNA + Oligo-dT-Primer	15,0µl

### 3.11.7 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Bei der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR, *quantitative Real Time-PCR*) handelt es sich um eine Methode zur Expressionsanalyse. Diese ermöglicht die Amplifizierung von Nukleinsäuren bei gleichzeitiger Quantifizierung. Für die qRT-PCR wurden Primer entworfen, die eine Gen-spezifisches Fragment nahe des 3'-Endes der zu untersuchenden cDNA lieferten (**Tab. 3.1**). Weitere Komponenten wurden in der angegebenen Menge und Konzentration dazugegeben und Luftblasen-frei vermischt, wobei die Reaktion standardmäßig in einem 18 µl-Ansatz erfolgte.

Der verwendete *Power SYBR*<sup>®</sup> *Green PCR Master Mix* der Firma Applied Biosystems (Warrington, UK) enthält den Cyanin-Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I, der zum Nachweis doppelsträngiger DNA genutzt werden kann, in diesem Fall cDNA. Der sich ergebene Komplex aus DNA und Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Licht bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 494 nm und emittiert Licht bei  $\lambda = 521$  nm. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte. Entscheidend für die Auswertung der qRT-PCR ist der Zyklus ( $C_t$ , *threshold cycle*), bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die jeweilige

Hintergrundfluoreszenz steigt. Je nach dem in welchem Zyklus dies erfolgte, konnten im Nachhinein Aussagen über die relativen Transkriptmengen der zu untersuchenden Gene in den ursprünglichen RNA-Proben getroffen werden. Durchführung und Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit dem *7300 Real Time PCR System* von Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt).

<b>Reaktionsansatz</b>	bidest. Wasser	5,50 µl
<b>qRT-PCR</b>	5'-Primer (10 µM)	1,25 µl
	3'-Primer (10 µM)	1,25 µl
	SYBR <sup>®</sup> Green	10,00 µl
	Matrize (cDNA)	1,00 µl

### 3.11.8 Sequenzierung

Punktmutationen in Genen, die zu keinen phänotypische Ausprägungen führen, können nur durch Sequenzierung identifiziert werden. Dafür wurde zunächst eine PCR (**Abschnitt 3.11.2**) durchgeführt, mit der ein Teil des entsprechenden Gens amplifiziert wurde, in dem sich die entsprechende Mutation befindet. Das PCR-Fragment wurde dann auf ein 1 % Agarosegel (**Abschnitt 3.11.3**) aufgetragen und anschließend mittels *Ultra-Sep Gel Extraction Kit* von OMEGA eluiert. Die so gewonnene DNA wurde für die Sequenzierung verwendet.

Die Sequenzierung erfolgte nach der Methode von **Sanger und Coulson** (1975). Die vorbereitende PCR wurde mit dem *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied Biosciences durchgeführt (Foster City (USA)). Die Reaktion erfolgte hierfür in einem 10 µl Ansatz, wobei der eingesetzte Primer so gewählt wurde, dass die Punktmutation in einem Abstand von mehr als 50 bp dazu liegt. Zum PCR-Reaktionsansatz wurden weitere Komponenten in der angegebenen Menge und Konzentration zugegeben. Im Anschluss an die PCR (**Tab. 3.7**) wurde der Ansatz vom Sequenzierservice des Genetischen Instituts der Universität zu Köln (<http://portal.ccg.uni-koeln.de/ccg/service/sequencing/>) analysiert. Die Ergebnisse konnten von der Internetplattform des Instituts heruntergeladen werden. Die Auswertung der Daten erfolgte dann mit der Software Chromas Lite Version 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane (AU)).

<b>Reaktionsansatz</b>	BigDye <sup>®</sup>	0,25 µl
<b>Sequenzierung</b>	5-fach Puffer	2,25 µl
	Primer (10 µM)	0,25 µl
	Matrize (DNA)	2–10 ng pro 100 bp
	mit bidest. Wasser auf 10 µl auffüllen	

Tab. 3.7: PCR-Programm zur Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96 °C	10 s
Primerhybridisierung	55 °C	10 s
Elongation	60 °C	240 s
Ende	10 °C	∞

Die Sequenzierung wurde ebenfalls eingesetzt, um zu testen, ob Plasmide ein gewünschtes Konstrukt enthielten bzw. ob dieses korrekt amplifiziert und kloniert wurde. Dafür wurden 0,4 µl Plasmid-DNA als Matrize in den Reaktionsansatz der Sequenzierung eingesetzt. Die Reaktion erfolgte auch hier in einem 10 µl Ansatz. Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR (Tab. 3.7) wurden die Ansätze ebenfalls vom Sequenzierservice des Genetischen Instituts der Universität zu Köln analysiert. Die Software Chromas Lite Version 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane (AU)) wurde zur Datenauswertung verwendet.

### 3.12 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana*-Linien

Für das Kreuzen wurden 5–6 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet. Es wurde in beide Richtungen gekreuzt, d.h. die zu kreuzenden Pflanzenlinien dienten sowohl als zu befruchtende Pflanze (Mutterpflanze) als auch als pollenspendende Pflanze (Vaterpflanze). Offenen Blüten und bereits entwickelte Schoten wurden vor dem Kreuzen von den Mutterpflanzen entfernt. Der zur Befruchtung ausgewählte Blütenstand sollte lediglich geschlossene Blüten (Knospen) besitzen. Unter dem Binokular wurden von den am weitesten entwickelten Knospen (meist 3–5) Kelch-, Kron- und Staubblätter entfernt, sowie alle übrigen Knospen des Blütenstandes. Von der Vaterpflanze wurden für die Bestäubung vollständig ausgebildete und Blüten ausgewählt, die noch keinen Schotenansatz zeigten. Die Blüten wurden am Blütenboden gegriffen. Dadurch öffnete sich die Blüte, die Staubblätter kamen zum Vorschein und die Pollen konnten besser auf den zuvor freigelegten Fruchtknoten der zu befruchtenden Pflanze übertragen werden. Die verwendeten Blütenstände wurden markiert und nach ca. 2 Wochen konnten die herangereiften Schoten geerntet und getrocknet werden. Anschließend erfolgte die Aussaat der Samen (T<sub>1</sub>, Tochtergeneration 1). Nach Abschluss des Reproduktionszyklus wurden die aus den Samen (T<sub>1</sub>) hervorgegangenen Pflanzen eingetütet. Die Schoten enthielten die Folgegeneration T<sub>2</sub>. Nach Aussaat, Keimung und Wachstum der T<sub>2</sub> konnte mittels molekularbiologischen Methoden der Genotyp bestimmt werden.

### 3.13 Messungen der PSII-Aktivität *in vivo*

Änderungen der Fluoreszenz von Chlorophyll *a* des Photosystems II (PSII) wurden mittels Pulsamplitudenmodulationsfluorometrie (PAM; ImagingPAM *M-Series*, Heinz Walz GmbH, Effeltrich) bestimmt (**Schreiber *et al.*, 1986**).

Die Grundfluoreszenz ( $F_o$ ) sowie die Maximalfluoreszenz ( $F_m$ ) wurden an dunkeladaptierten Pflanzen bestimmt, d.h. die Pflanzen wurden zunächst für ca. 15 min unter Lichtausschluss stehen gelassen und erst dann für die Fluoreszenzmessung verwendet. Aus den gegebenen Werten konnte ebenfalls die maximale Quantenausbeute  $F_v/F_m$  bestimmt werden, wobei  $F_v$  (variable Fluoreszenz) als  $F_m - F_o$  definiert wird.

In einer Induktionskinetik konnten durch das Setzen von definierten Lichtsättigungspulsen die äquivalenten Parameter in Anwesenheit aktinischen Lichts ermittelt werden. Die Photonendichte des Lichtsättigungspulses betrug in etwa  $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und dauerte jeweils ca. 800 ms. Um die PSII-Effizienz und damit die photosynthetische Elektronentransportrate (ETR) in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten zu bestimmen (**Genty *et al.*, 1989**), wurde eine Lichtsättigungskurve erstellt. Die Lichtintensität wurde dabei schrittweise von  $0-700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erhöht.

Die Datenerfassung sowie die Berechnung weiterer Photosyntheseparameter, wie z.B. die der Elektronentransportrate (ETR), erfolgten mit der Software ImagingWin v2.32 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) oder dem ImagingPAM-Benutzerhandbuch.

### 3.14 Genomweite Expressionsanalysen von *Arabidopsis thaliana*

#### 3.14.1 Identifizierung von regulatorischen Elementen (Promotormotive)

Zur Untersuchung der HL-induzierten Ausbildung des HCF-Phänotyps auf transkriptioneller Ebene, wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Proben wurden dazu von Col-0, *adg1-1*, *tpt-2* sowie *adg1-1/tpt-2* in einem LL-HL-Transferexperiment genommen. Die Hybridisierungen der verwendeten Affymetrix *ATH1 Genome Arrays* fand im Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (Regensburg) statt (**Schmitz, 2011; Schmitz *et al.*, 2014**).

Die Identifizierung von Genen, die unter den gegebenen Bedingungen differenziell reguliert werden, ermöglicht im Nachhinein außerdem die Suche nach sich wiederholenden Sequenzmotiven innerhalb der Promotorregionen. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Harberer am Helmholtz Zentrum München mithilfe des Programmes *FIRE (finding regulatory elements)*; **Elemento *et al.*, 2007**).

*FIRE* versucht, auf Basis einer gegebenen diskreten Clusterverteilung, über ein Genom Motive zu bestimmen, so dass die Transinformation (*mutual information*) maximiert ist. Die Transinformation ist ein Maß dafür, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass zwei Ereignisse zusammen auftreten. Im Fall der Motivsuche in Promotorbereichen wäre z.B. eines dieser Ereignisse, dass ein gewisses Motiv an der Hochregulation von Genen beteiligt ist. Das zweite Ereignis wäre, dass eine Gruppe von Genen stark hochreguliert ist. Kommt das Promotermotiv in allen hochregulierten Genen vor, aber in keinem unveränderten oder herunterregulierten Gen, wäre die Transinformation des Motivs sehr hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Motiv dann an der Genregulation beteiligt ist, also für den beobachteten Prozess von hoher Relevanz ist, wäre damit ebenfalls hoch.

*FIRE* führt die Motivsuche schrittweise von einer Startmotivlänge  $n$  durch. Für alle  $4^n$  möglichen Motive wird die Transinformation anschließend für das gegebene Clustering berechnet. Die Zahl 4 ergibt sich aus der Codierung der Erbinformation über die Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Die Motive mit der besten Transinformation wurden dann in die nächste Iteration übernommen. Als fiktive Motivbeispiele sollen hier TTTCG und ATTCG genannt werden. Nun werden die noch vorhandenen Motive mit Hilfe des degenerativen Codes verallgemeinert und für diese Verallgemeinerungen die Transinformation berechnet. Daraus ergibt sich für das oben genannte Beispiel das Motiv [A/T]TTTCG. Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, bis keine Verbesserung der Transinformation mehr möglich ist. *FIRE* bezieht in die Transinformation auch noch die Position und Orientierung der Motive mit ein. Neben der Länge der zu suchenden Motive, ist die *Robustheit* ein weiterer wichtiger Wert für die Analyse mit *FIRE*. Die Robustheit ist ein abstraktes Maß dafür, wie hoch die Transinformation sein muss, um Motive als Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. Wird eine hohe Robustheit gewählt, werden mehr Motive herausgefiltert. Damit sinkt auch die Zahl der *false positives*. Gleichzeitig können so aber auch *true positives* aus der Menge der Motive entfernt werden. Daher wurde die Auswertung mit mehreren Robustheitswerten durchgeführt und anschließend die Ergebnisse verglichen.

*FIRE* ermöglicht außerdem die Auswertung von kontinuierlichen Expressionsdaten. Allerdings verbirgt sich hinter dieser kontinuierlichen Auswertung nur die automatische Einteilung in „Bins“ (ein anderer Begriff für zusammenhängende Cluster ähnlicher Größe) anhand des *log<sub>2</sub>-fold change* (logFC), einer anderen Messgröße oder eines abgeleiteten Wertes. Es wird lediglich eine wesentlich größere Anzahl Cluster für die Auswertung verwendet (i.d.R. > 50) als beim diskreten Verfahren, wo sich die Anzahl der Cluster im

Bereich 2–10 befinden sollte. Ob das Ergebnis dieser pseudo-kontinuierlichen Auswertung aussagekräftig ist, hängt also davon ab, ob die Zerlegung in viele kleine Cluster im Kontext der jeweiligen Messdaten sinnvoll ist.

### 3.14.2 Genomweite Expressionsanalyse zur Beurteilung des Einfluss exogen zugeführter Fructose unter HL-Bedingungen

Für die Expressionsanalyse wurden *A. thaliana*-Linien auf ½ MS-Agarplatten mit entweder 50 mM Fructose oder ohne Fructose (Tab. 3.5, Abschnitt 3.7.2) im Klimaschrank (Abschnitt 3.8.2) angezogen. Keimung und Anzucht der Pflanzen unterlagen einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h und Temperaturen von 22/18 °C. Die PFD betrug während der Tagperiode 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die relative Luftfeuchte lag bei 40–60 %. Nach ca. 7 Tagen wurden die Pflanzen auf neue Platten umgesetzt, um eine gleichbleibende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Nach weiteren 13 Tagen wurden die Pflanzen geerntet. Keimblätter und Wurzeln wurden dafür von den Blattrosetten entfernt und das Pflanzenmaterial anschließend zügig in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Aufarbeitung lagerten die Proben bei -80 °C.

Im Anschluss an die RNA-Isolierung (Abschnitt 3.11.4) wurde die RNA nochmals mit Hilfe des *GeneJET RNA Purification Kit* (Thermo Scientific, Schwerte) aufgereinigt.

Die Hybridisierung der Proben auf *8x60K Agilent Microarrays* wurde von der OakLabs GmbH (Hennigsdorf) durchgeführt. Die Auswertung der Fluoreszenzdaten und deren Normalisierung erfolgte ebenfalls durch OakLabs. Das Filtern der erhaltenen Expressionsdaten wurde mit der Programm RStudio (Version 0.98.507) durchgeführt.

## 3.15 Pigmentanalysen

### 3.15.1 Bestimmung des Anthocyangehaltes in Blättern

Die Bestimmung des Anthocyangehaltes in Blättern von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mit saurem Methanol (modifiziert nach **Giraud et al., 2008**). Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Bohrers pulverisiert und anschließend mit 1 ml saurem Methanol (Methanol:HCl, 99:1) versetzt. Die Proben wurden abgedunkelt 1 h bei RT schütteln gelassen und im Anschluss daran zentrifugiert (5 min, 4 °C, 20000 g). Der Überstand verblieb bis zur photometrischen Bestimmung der optischen Dichte bei 530 nm bzw. 657 nm auf Eis. Die Extrakte wurden vor der Messung noch 1:10 mit saurem Methanol verdünnt.

### 3.16 Metabolitanalysen

#### 3.16.1 Quantitative Bestimmung von Adenylaten

Die Extraktion der Adenylate erfolgte in modifizierter Form nach **Häusler *et al.*** (2000). Dafür wurden etwa 50–100 mg tiefgefrorenes Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend mit 500 µl 1 M Perchlorsäure versetzt. Nachdem das Ganze gründlich homogenisiert wurde, erfolgte die Zugabe von 500 µl 0,1 M Perchlorsäure. Der Ansatz wurde dann zunächst für ca. 15 s gevortext und anschließend zentrifugiert (2 min, 4 °C, 20000 g). Der Überstand (400 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 20,5 µl 5 M Kaliumcarbonat neutralisiert. Um zu verhindern, dass die Proben durch das sich entwickelnde Kohlendioxid zum Platzen gebracht werden, verblieben diese zur vollständigen Entgasung ca. 20 min offen auf Eis stehen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (2 min, 4 °C, 20000 g) wurde der Überstand (Extrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die anschließende Derivatisierung wurden 50 µl Extrakt mit 405 µl Derivatisierungspuffer und 45 µl Chloracetaldehyd (45 % in Wasser, Sigma-Aldrich, Hamburg) versetzt und mittels Vortexer gut vermischt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 40 min bei 80 °C. Die Reaktion wurde dann durch Abkühlen auf Eis gestoppt. Nachdem die Proben nochmals zentrifugiert wurden (2 min, 4 °C, 20000 g), konnte der Überstand direkt für die HPLC-Analyse verwendet werden

<b>Derivatisierungspuffer</b>	Zitronensäure	62 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 4,0)	76 mM

Die Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *high-performance liquid chromatography*) wurde für die Analyse und Detektion der derivatisierten Adenylate verwendet (**Haink und Deussen, 2003**). Die Durchführung erfolgte mit der UltiMate<sup>®</sup> 3000 (Thermo Scientific - Dionex, Schwerte). TBAS (A) und Acetonitril:TBAS (2:1, B) dienten hier als Eluenten. Die Flussrate betrug dabei 1,7 ml·min<sup>-1</sup> und der Gradient wurde wie folgt gewählt: 0–2 min 18 % B, 2–6 min 50 % B, 6–6,6 min 90 % B, 6,6–7 min 90 % B und 7–8 min 0 % B. Die Adenylate wurden für die Messung mit einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und emittierten dann bei 410 nm.

Über die detektierte Fluoreszenz konnten dann die Adenylatgehalt in den jeweiligen Proben ermittelt werden. Dafür wurden zuvor auch noch Adenylatstandards vermessen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte schlussendlich mit der Software Chromeleon<sup>®</sup> (Thermo Scientific - Dionex, Schwerte).

<b>TBAS-Puffer</b>	TBAS	5,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 5,8)	30,5 mM

### 3.16.2 Quantitative Bestimmung von Ascorbinsäure und Glutathion

Die Quantifizierung von Ascorbinsäure und Glutathion erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Karl-Josef Dietz (Universität Bielefeld).

Das zu untersuchende Pflanzenmaterial wurde dafür unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend aliquotiert. Für die Bestimmung des Gehaltes an Ascorbinsäure (Asc) bzw. Dehydroascorbinsäure (DHA) wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial benötigt, für Glutathion (GSH) bzw. Glutathiondisulfid (GSSG) ca. 200 mg. Die Analyse und der Proben erfolgte wie in **Baier et al.** (2000) beschrieben.

### 3.16.3 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren wurde mittels HPLC (**Lindroth und Mopper, 1979**) durchgeführt. Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial (ca. 100–200 mg) wurde zusammen mit einer in Stickstoff vorgekühlten Stahlkugel in ein Reaktionsgefäß gegeben und anschließend bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Aminosäureextraktion erfolgte in modifiziert Form nach **Giavalisco et al.** (2008).

Die Proben wurden zunächst im Zelldisruptor (TissueLyser, Retsch<sup>®</sup>, Haan) pulverisiert (5 min, RT, 20 Hz). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten dann unter dem Abzug. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben mit 1 ml eisgekühltem Extraktionspuffer versetzt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur schütteln (100 rpm) gelassen. Anschließend kamen die Proben für 10 min in ein ebenfalls eisgekühltes Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin). Um die feste von der löslichen Phase und dementsprechend auch die polare von der lipophilen Phase zu trennen wurden 650 µl wässrigen Methanols (Wasser:Methanol, 3:1) auf den Ansatz gegeben und dieser für ca. 1 min gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (1 min, RT, 20000 g). Die obere, lipidhaltige Phase wurde vollständig abgenommen und verworfen. Die untere Phase (aminosäurehaltig) wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Das stärke- und proteinhaltige Pellet wurde ebenfalls verworfen.

<b>Extraktionspuffer</b>	Methanol	25 %
	MTBE	75 %

Für die anschließende HPLC-Analyse mit der UltiMate<sup>®</sup> 3000 (Thermo Scientific - Dionex, Schwerte) wurden 200 µl Probe 1:5 mit HPLC-Wasser verdünnt und in HPLC-kompatible Durchstechfläschchen gefüllt. Die Derivatisierung der Aminosäuren erfolgte mit dem

Fluoreszenzfarbstoff ortho-Phthaldialdehyd (OPA). Mit diesem Farbstoff wurden die Aminosäuren markiert und über die Fluoreszenz später detektiert. Dafür mussten zunächst 5 Volumenteile Probe mit 1 Volumenteil 0,8 M Boratpuffer (pH 10,4) und 6 Volumenteile Derivatisierungsreagenz versetzt werden. Von diesem Ansatz wurden dann 5 µl in die Säule (HyperClone™ 3µm ODS (C18) Phenomenex, Aschaffenburg) injiziert und analysiert.

<b>Derivatisierungsreagenz</b>	50 mg/ml OPA in 100 % Ethanol	1,0 ml
	0,8 M Boratpuffer (pH 10,4)	9,0 ml
	2-Mercaptopropionsäure	0,1 ml

Die Proben wurden dafür zunächst über einen nicht linearen Lösungsmittelgradienten aufgetrennt und anschließend mit einem Fluoreszenzdetektor detektiert.

Laufpuffer A und B dienten als Eluenten. Die Flussrate betrug konstant 0,8 ml·min<sup>-1</sup> und der Gradient wurde wie folgt gewählt: 0–5 min 0 % B, 5–16 min 15 % B, 16–26 min 50 % B, 26–42 min 60 % B, 42–46 min 100 % B, 46–52 min 100 % B, 52–53 min 0 % B und 53–62 min 0 % B.

<b>Laufpuffer A</b>	0,4 M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)	22 ml
	Tetrahydrofuran	2 ml
	mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen	

<b>Laufpuffer B</b>	0,4 M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)	25 ml
	Methanol	175 ml
	Acetonitril	110 ml
	bidest. Wasser	225 ml

Um den Gehalt an Aminosäuren in den Proben bestimmen zu können, wurden zuvor noch Aminosäurestandards angesetzt und gleichzeitig mit den Proben vermessen. Von jeder zu testenden Aminosäure wurde zunächst eine 2 mM Lösung angesetzt (Primärstammlösung). Für die Sekundärstammlösung wurden dann jeweils 10 µl aus den Primärstammlösungen entnommen und ggf. auf 800 µl mit HPLC-Wasser aufgefüllt, so dass jede Aminosäure in der Sekundärstammlösung in einer Konzentration von 25 µM vorlag. Für die eigentliche Messung wurde dann von der Sekundärstammlösung noch eine Verdünnungsreihe hergestellt: 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM je Aminosäure. Von diesen Ansätzen wurden ebenfalls 5 µl in die Säule injiziert und analysiert.

Die Software Chromeleon® (Thermo Scientific - Dionex, Schwerte) wurde verwendet, um die erhaltenen Chromatogramme auszuwerten. Zunächst wurde für jede Aminosäure eine Eichgerade aus den Peakflächen der einzelnen Verdünnungsstufen erstellt. Mit Hilfe der

Eichgeradengleichungen war es dann möglich, die Aminosäurekonzentrationen in den Proben zu bestimmen.

### 3.16.4 Quantitative Bestimmung von Primärmetaboliten

Die Quantifizierung primärer Metabolite erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Alisdair R. Fernie (MPI für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm).

Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde dafür unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend zu je 100–200 mg aliquotiert. Die Identifizierung und Quantifizierung primärer Metabolite erfolgte über die Methode der Gaschromatographie mit gekoppelter Flugzeitmassenspektrometrie (GC-ToF-MS, *gas chromatography-time of flight-mass spectrometry*). Die Extraktion sowie Derivatisierung der Metabolite erfolgte wie in **Lisec *et al.* (2006)** etabliert. Zur abschließende Auswertung wurden die Software TagFinder (**Luedemann *et al.*, 2008, 2012**) und die Plattform GMD (Golm Metabolome Database, **Kopka *et al.*, 2005**) verwendet.

### 3.16.5 Quantitative Bestimmung löslicher Zucker in Blättern

Um den Gehalt an löslichen Zuckern in Blättern von *Arabidopsis thaliana* zu bestimmen, wurde Blattmaterial (ca. 50–100 mg) in 1,5 ml 80 % Ethanol für 1 h bei 80 °C im Wasserbad ausgekocht. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Eindampfen des Extraktes erfolgte über Nacht in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Wesseling). Zum Extraktpellet wurden 500 µl Wasser sowie 2–3 kleine Glaskugeln gegeben, damit sich das Pellet unter starkem Schütteln (5 min, RT, 20 Hz) im Zelldisruptor (TissueLyser, Retsch<sup>®</sup>, Haan) komplett löste. Der quantitative Nachweis der löslichen Zucker (Glucose, Fructose und Saccharose) erfolgte dann über eine enzymatische Bestimmung.

Bei der Oxidation von Glucose-6-phosphat (Glc6P) zu 6-Phosphogluconolacton durch die dem Reaktionsansatz zugesetzten Glc6P-Dehydrogenase (G6PDH) wird NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H reduziert. Durch die Zugabe spezifischer Enzyme (**Stitt *et al.*, 1989**) wurden die im Extrakt enthaltenen Zucker zum Substrat der G6PDH umgesetzt. Die Umwandlung der Zucker ist daher an die Entstehung von NAD(P)H gekoppelt, welches dann photometrisch bestimmt werden konnte. Die absolute Absorptionsänderung bei 340 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite<sup>®</sup> M200, TECAN Group Ltd., Männedorf (CH)) detektiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,02 U Hexokinase gestartet, die in der Lage ist sowohl Glucose zu Glc6P als auch Fructose zu Fructose-6-phosphat (Fru6P) zu phosphorylieren. Nach Erreichen einer konstanten Absorption wurden 0,2 U Phospho-

glukoisomerase dem Ansatz hinzugefügt, was eine Umsetzung von Fru6P zu Glc6P bewirkte. Die Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose wurde anschließend durch die Zugabe von 100 U Invertase initiiert, sobald erneut eine maximale Absorptionsänderung erreicht wurde. Über das Lambert-Beersche Gesetz konnte die Konzentration der löslichen Zucker im Extrakt bestimmt werden. Der hierfür benötigte Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von NAD(P)H beträgt  $6,22 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

<b>Reaktionsansatz</b>	HEPES/KOH (pH 7,5)	100,0 mM
<b>Zuckernachweis</b>	MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
	ATP	2,0 mM
	NAD(P) <sup>+</sup>	0,8 mM
	G6PDH	0,2 U
	Extrakt	5 % (v/v)

### 3.16.6 Quantitative Bestimmung von Stärke in Blättern

Der quantitative Stärkenachweis (**Lin *et al.*, 1988b**) erfolgte in modifizierter Form mit dem ethanolisch extrahierten Blattmaterial aus **Abschnitt 3.16.4**. Dieses wurde dafür nochmals mit 500  $\mu\text{l}$  80 % Ethanol gespült, welches dann nach kurzer Zentrifugation (1 min, RT, 20000 g) vollständig abgenommen und verworfen wurde. Anschließend wurde das Blattmaterial in 400  $\mu\text{l}$  0,2 M Kaliumhydroxid auf-genommen. Nachdem die Proben ca. 15 min bei 80 °C im Wasserbad gekocht wurden, konnte das Blattmaterial im Zelldisruptor (TissueLyser, Retsch®, Haan) mit Hilfe von je 2–3 Glaskugel homogenisiert werden. Die Proben kamen danach für weitere 45 min ins 80 °C Wasserbad. Bevor durch die Zugabe von 80  $\mu\text{l}$  1 M Essigsäure der pH-Wert des Homogenats auf 5,5 eingestellt wurde, erfolgte eine Abkühlung der Proben auf Eis.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für die Bestimmung der löslichen Zucker (**Abschnitt 3.16.4**). Dafür musste die im Homogenat vorhandene Stärke zuvor noch bei 37 °C über Nacht durch die Zugabe von 3,5 U  $\alpha$ -Amylase sowie 2,5 U Amyloglukosidase zu Glucose abgebaut werden. Die Phosphorylierung der Glucose zu Glc6P erfolgte dann durch die Zugabe von 0,02 U Hexokinase zum Reaktionsansatz. Glc6P wiederum wurde durch die im Reaktionsansatz vorhandene G6PDH zu 6PG umgewandelt, was an die Reduktion von NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H gekoppelt ist.

Nach dem enzymatischen Stärkeabbau wurde der Ansatz nochmals zentrifugiert (5 min, RT, 20000 g) und der Überstand (Extrakt) in den Reaktionsansatz zum Stärkenachweis eingesetzt. Über das Lambert-Beersche Gesetz konnte die Stärkekonzentration im Extrakt bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient von NAD(P)H beträgt  $6,22 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  bei 340 nm.

---

<b>Reaktionsansatz</b>	HEPES/KOH (pH 7,5)	100,0 mM
<b>Stärkenachweis</b>	MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
	ATP	2,0 mM
	NAD(P) <sup>+</sup>	0,8 mM
	G6PDH	0,2 U
	Extrakt	5 % (v/v)

### 3.16.7 Qualitative und semiquantitative Bestimmung von Stärke in Blättern

Für den qualitativen Nachweis von Stärke in Arabidopsis-Blättern wurde standardmäßig Lugol'sche Lösung verwendet. Dazu wurden Blätter von den entsprechenden Pflanzen für ca. 15 min in 80 % Ethanol bei 75 °C gekocht. Das Chlorophyll ging dabei in Lösung und konnte zusammen mit dem Ethanol abgenommen werden. Die entfärbten Blätter wurden dann mit 1 % Lugol'scher Lösung versetzt und für 5 min inkubiert. Die Lösung wurde wiederum abgenommen und die Blätter mit Wasser gewaschen. Anschließend konnte der Stärkegehalt bemessen und ggf. photographisch dokumentiert werden.

### 3.17 Statistische Evaluierung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit einer Kombination aus Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Kramer-Test.

## 4 Ergebnisse

Sowohl die durch **Schneider et al.** (2002) beschriebene *adg1-1/tpt-1*-Mutante als auch die *adg1-1/tpt-2*-Mutante (**Schmitz et al., 2012**) zeigten einen retardierten Wachstumsphänotyp sowie einen „Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz“ (HCF)-Phänotyp bei Anzucht mit Photonendichten (PFD) über 50–70  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Bei einer PFD von 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Schwachlicht; LL, *low light*) waren keine Unterschiede zum Wildtyp erkennbar. Nachfolgende Experimente erfolgten daher entweder unter LL-Bedingungen oder bei einer 10-fach höheren PFD von 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Hochlicht, HL), um den Einfluss verschiedener Lichtintensitäten auf das Wachstum der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante zu untersuchen. In **Schmitz et al.** (2012) wurden die Akklimatisierungsprozesse an veränderte Lichtbedingungen eingehend an der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante untersucht, die Defekte im Tag- und Nachlexport von Photoassimilaten aufweist.

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand von LL-HL-Transferexperimenten weitere Aspekte der Akklimatisierung ermittelt. Desweiteren wurde die Rolle von Zuckern in der Akklimatisierungsantwort untersucht. Grundlage hierfür waren Hinweise darauf, dass die Zugabe von Zucker zum Medium eine Rettung der HL-induzierten Phänotypen der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante ermöglicht (**Schmitz, 2011; Schmitz et al., 2012**).

### 4.1 Akklimatisierungsantworten der *A. thaliana adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante nach LL-HL-Transferexperimenten

#### 4.1.1 Anthocyanengehalte

Werden *A. thaliana*-Pflanzen unvermittelt hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, findet eine Akkumulation von Anthocyanen in den Blättern statt (**Page et al., 2012**). Diese sekundären Pflanzenstoffe gehören zu den Flavonoiden und werden aus Phenylalanin und Malonyl-CoA synthetisiert (**Winkel-Shirley, 2002**). Nicht nur Licht injiziert die Anthocyanakkumulation, auch ABA (**Loreti et al., 2008**), niedrige Temperaturen (**Leyva et al., 1995**) sowie Saccharose (**Teng et al., 2005**) führen zu einer höheren Synthese von Anthocyanen. Einen Beleg für die protektive Funktion von Anthocyanen bei HL-Stress erbrachten **Zeng et al.** (2010) in *A. thaliana*-Wildtyppflanzen.

Mit dem nachfolgenden LL-HL-Transferexperiment sollte die Akkumulation von Anthocyanen in Blättern überprüft werden (**Abb. 4.1**). Sowohl der Wildtyp (*Col-0*), also auch die Einzelmutanten (*tpt-2* und *adg1-1*) zeigten erwartungsgemäß eine Erhöhung des Anthocyanengehaltes nach dem Transfer ins HL. Es ist jedoch zu beachten, dass, mit Ausnahme

der *adgl-1*-Mutante (Abb. 4.1 C), erst nach 24 h Anthocyane nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.1 A, B, D). Die *adgl-1/tpt-2*-Doppelmutante zeigte ein ähnliches Verhalten, auch wenn die Akkumulation der Anthocyane über die Zeit hinweg geringer ausfiel (Abb. 4.1 D).

Nach 56 h im HL war nur im Col-0 eine beginnende Stagnation der Anthocyanakkumulation zu erkennen (Abb. 4.1 A). Für die Mutanten hätte der Anthocyangehalt über ein größeres Zeitfenster hin untersucht werden müssen, um Aussagen über die maximale Akkumulation von Anthocyanen treffen zu können (Abb. 4.1 B, C, D).

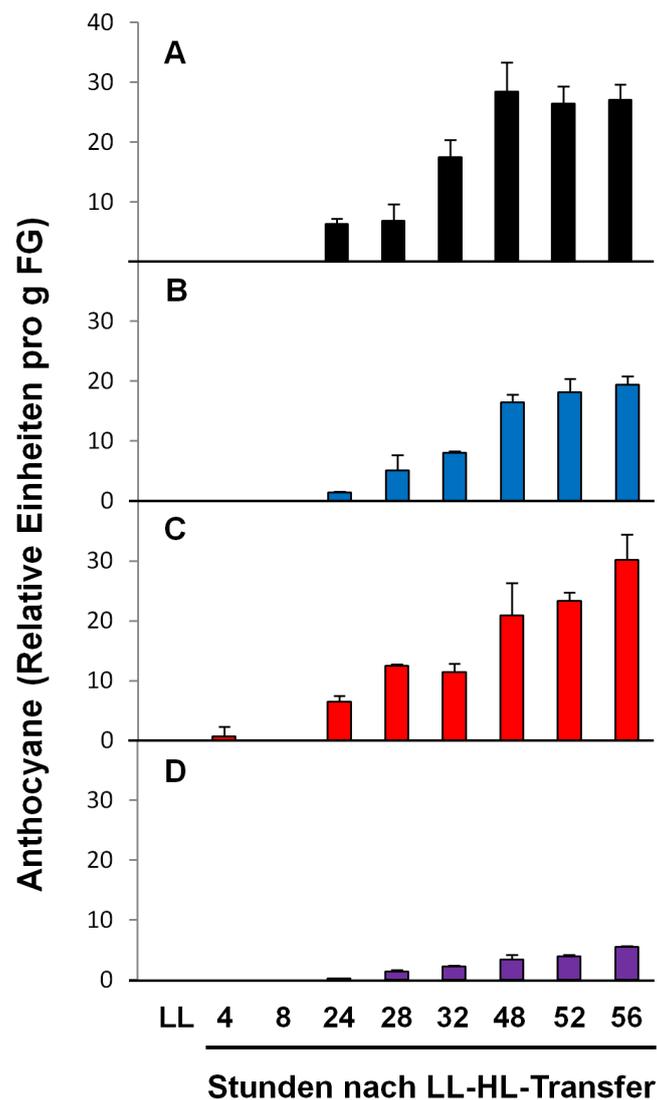


Abb. 4.1: **Bestimmung der Anthocyangehalte** von Col-0 (A), *tpt-2* (B), *adgl-1* (C) und *adgl-1/tpt-2* (D) im LL und nach LL-HL-Transfer. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für ca. 3 Wochen bei einer PFD von  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (LL) unter Langtagbedingungen (16/8 h). Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 3 biologischen Replikaten je Linie und Anzuchtbedingung.

### 4.1.2 Gehalt an Adenylaten

Es gibt Hinweise darauf, dass Änderungen des Redoxstatus von Elementen der plastidären ETK *Retrograde Signale* generieren können (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Pfalz *et al.*, 2012). Der Transfer von Elektronen über die Elemente der ETK bewirkt durch den gleichzeitigen Aufbau eines Protonengradienten die Aktivierung der ATP-Synthase, die aus ADP und anorganischem Phosphat ATP bildet. Wenn nun Hochlicht die Änderung des Redoxstatus von Elementen der ETK beeinflusst, sollten eventuell auch Änderungen des Energiestatus zu beobachten sein.

Um Aussagen über den zellulären Energiestatus nach HL-Exposition treffen zu können, erfolgte daher die quantitative Bestimmung von ATP, ADP und AMP in einem LL-HL-Transferexperiment. Zusätzlich fand eine Quantifizierung von ATP, ADP und AMP in Blattproben statt, die nach einer verlängerten Nacht (20 h) genommen wurden (Tab. 4.1). Außerdem wurde die Energieladung (EL;  $([ATP] + \frac{1}{2} [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ ) berechnet, um Aussagen über das Verhältnis ATP, ADP und AMP treffen zu können.

Die Summe aller Adenylate lag in der Doppelmutante (Tab. 4.1 B) im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 4.1 A) unter LL-Bedingungen und nach der verlängerten Nachtperiode höher. Der LL-HL-Transfer verursacht im Wildtyp einen starken Anstieg der Gesamtadenylatgehalte, wohingegen sich der Transfer in *adg1-1/tpt-2* nur mäßig auf die Gehalte auswirkte. Unabhängig von der Lichtintensität oder der Zeit im Dunkeln blieben die Summen der Adenylate in der Doppelmutante konstant. Die EL von *adg1-1/tpt-2* unterschied sich jedoch nicht sonderlich von der des Wildtyps.

Tab. 4.1: **Quantitative Bestimmung von Adenylaten (ATP, ADP und AMP) und Berechnung der Energieladung (EL)** in *Col-0* (A) und *adg1-1/tpt-2* (B) im LL und nach LL-HL-Transfer bzw. im LL nach einer verlängerten Nacht (v. Nacht: 20 h). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für ca. 5 Wochen bei einer PFD von 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (LL) unter Langtagbedingungen (16/8 h). Die PFD im HL betrug 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 2–4 biologischen Replikaten abhängig von der Linie und dem Messzeitpunkt.

A	LL	0,5 h	4 h	48 h	v. Nacht
nach LL-HL-Transfer					
Adenylatgehalte in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}$					
<b>ATP</b>	108,37 $\pm$ 1,85	98,71 $\pm$ 0,36	120,76 $\pm$ 3,96	167,07 $\pm$ 4,21	107,11 $\pm$ 3,64
<b>ADP</b>	55,24 $\pm$ 4,58	67,85 $\pm$ 2,71	87,93 $\pm$ 9,06	102,18 $\pm$ 0,15	57,31 $\pm$ 2,46
<b>AMP</b>	17,04 $\pm$ 3,72	25,94 $\pm$ 10,65	43,16 $\pm$ 11,09	37,07 $\pm$ 7,30	30,41 $\pm$ 4,31
<b><math>\Sigma</math></b>	180,66 $\pm$ 10,15	192,50 $\pm$ 13,72	251,85 $\pm$ 24,11	306,96 $\pm$ 11,66	194,83 $\pm$ 10,41
<b>EL</b>	0,75 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,00	0,71 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,01

<b>B</b>	<b>LL</b>	<b>0,5 h</b>	<b>4 h</b>	<b>48 h</b>	<b>v. Nacht</b>
<b>nach LL-HL-Transfer</b>					
Adenylatgehalte in nmol · g <sup>-1</sup> FG					
<b>ATP</b>	131,91 ± 4,46	119,08 ± 4,36	114,73 ± 2,23	130,99 ± 10,90	116,76 ± 10,69
<b>ADP</b>	69,55 ± 7,09	73,15 ± 4,89	80,75 ± 6,39	81,35 ± 15,58	72,76 ± 14,23
<b>AMP</b>	34,61 ± 5,56	39,85 ± 8,36	41,83 ± 10,89	35,47 ± 22,63	43,41 ± 16,91
<b>Σ</b>	236,07 ± 17,11	232,08 ± 17,61	237,31 ± 19,58	247,81 ± 49,11	232,93 ± 41,83
<b>EL</b>	0,71 ± 0,02	0,67 ± 00,01	0,65 ± 0,01	0,70 ± 0,02	0,66 ± 0,02

#### 4.1.3 Einfluss des LL-HL-Transfers auf den Gehalt von Ascorbinsäure bzw. Glutathion

Lichtstress, wie durch die Transferexperimente ausgelöst, führt u.a. zur Produktion von ROS. Die Detoxifizierung dieser Moleküle kann z.B. durch das Ascorbinsäure-Glutathion-System erfolgen. Um zu überprüfen, ob ROS an der Akklimatisierungsantwort von *adg1-1/tpt-2* beteiligt sind, wurden die Gehalte von Ascorbinsäure (Asc) bzw. Dehydroascorbinsäure (DHA) und Glutathion (GSH) bzw. Glutathiondisulfid (GSSG) quantitativ bestimmt.

Alle getesteten Linien zeigten einen Anstieg des Gesamtgehaltes beider Redoxkomponenten abhängig davon, wie lange die Pflanzen dem HL ausgesetzt waren:  $t_0$  (LL) <  $t_{4h}$  < HL.

Der LL-HL-Transfer ( $t_{4h}$ ) hatte im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 4.2 A, E**) in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante (**Abb. 4.2 D, H**) keinerlei Auswirkungen, weder auf die Gehalte von Asc bzw. DHA noch auf die von GSH oder GSSG. Lediglich in der *tpt-2*-Mutante konnten signifikante Unterschiede verglichen mit dem Wildtyp (Col-0) im Asc- bzw. DHA-Gehalt gemessen werden (**Abb. 4.2 B,  $t_{4h}$ , HL**). Diese Beobachtung resultierte zusätzlich in einem Abfall des Asc/DHA-Verhältnisses auf einen Wert unter 1. Für die Redoxkomponenten GSH bzw. GSSG konnte dies nicht beobachtet werden (**Abb. 4.2 F**). Obwohl es durch den Transfer der *adg1-1/tpt-2*-Pflanzen aus dem LL ins HL zu einer starken Photoinhibierung kommt, konnten kaum Veränderung im Gehalt von Asc/DHA bzw. GSH/GSSG festgestellt werden, die am Abbau von ROS und damit an der Entgiftung der Zelle beteiligt wären.

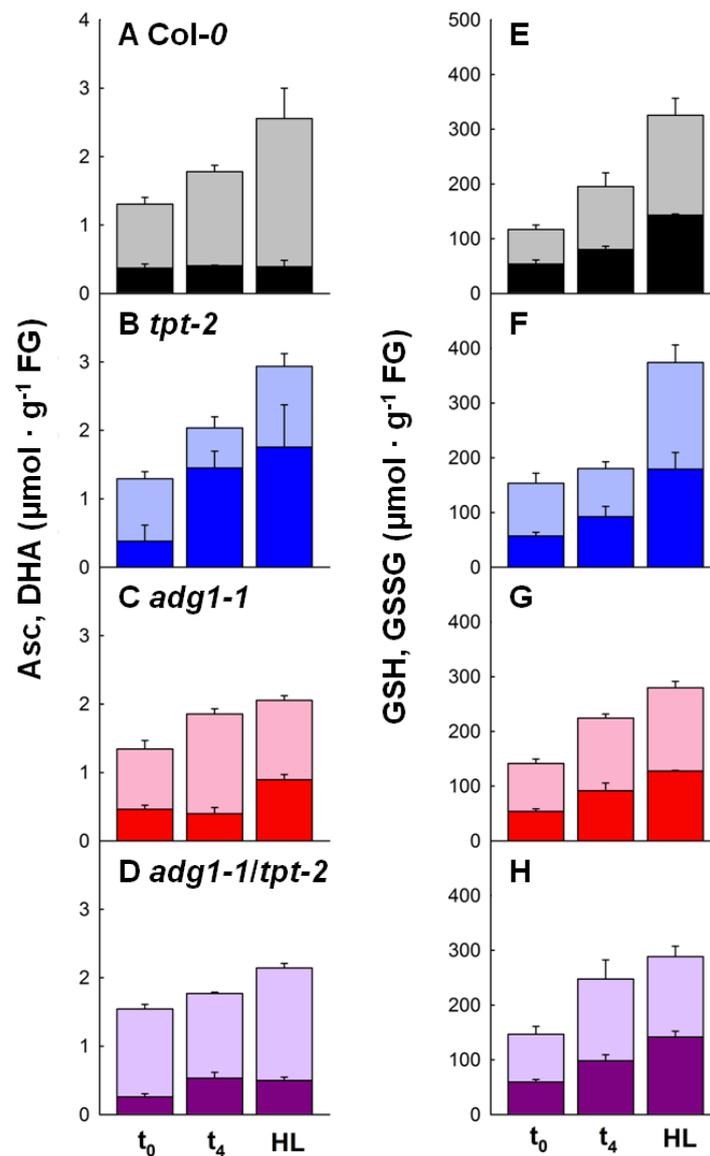


Abb. 4.2: **Quantitative Bestimmung von Ascorbinsäure und Glutathion** in Col-0 (A, E), *tpt-2* (B, F), *adg1-1* (C, G) und *adg1-1/tpt-2* (D, H). Die Pflanzen wurden für die Probennahme ca. 30/21 Tage im Schwachlicht ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $t_0$ ) bzw. Hochlicht ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , HL) auf Erde im Langtag angezogen. Desweiteren wurden Proben 4 h ( $t_{4h}$ ) nach dem Transfer vom LL ins HL genommen. Die reduzierten Formen des Ascorbinsäure (Asc)/Dehydroascorbinsäure (DHA)-Systems (A–D) bzw. des Glutathion (GSH)/Glutathiondisulfid (GSSG)-Systems (E–H) sind im jeweils helleren Farbton des Balkens dargestellt, für die oxidierte Form der Redoxkomponenten wurde der dunklere Farbton gewählt. Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 3–5 biologischen Replikaten je nach Linie und Messzeitpunkt.

#### 4.1.4 Metabolitanalyse

Metabolite spielen ebenfalls eine Rolle in Signaltransduktionsmechanismen. Um etwaige retrograde Signale ausgehend von Metaboliten identifizieren zu können (Caldana *et al.*, 2012), wurde eine Metabolomanalyse durchgeführt. Die Pflanzen wurden zu diesem Zweck zum einen unter LL- bzw. HL-Bedingungen angezogen und nach 5 h im Licht gerntet. Zum

Anderen erfolgte ein LL-HL-Transfer der Pflanzen mit anschließender Probennahme nach 4 h bzw. 48 h im HL. Es wurden anschließend 47 Metabolite quantitativ bestimmt, die sich den Kategorien „Zucker“ (12), „Aminosäuren“ (18), „Organische Säuren“ (10) und „Sonstige“ (7) zuordnen ließen. Eine Auswahl von Metaboliten, die möglicherweise im Zusammenhang mit der HL-Akklimatisierung stehen könnten bzw. die lichtabhängig akkumulierten, zeigt die **Tab. 4.2**. Die Gesamtübersicht aller gemessenen Metabolite findet sich im Anhang (**Tab. Anhang II**). Unter den getesteten Zuckern zeigte lediglich Glc deutliche Unterschiede im Gehalt abhängig von der Zeit im HL. Vergleicht man die Glc-Gehalte zum Zeitpunkt  $t_{48h}$  mit denen von Pflanzen, die durchgängig im HL angezogen wurden, waren diese im Wildtyp und den Einzelmutanten ebenfalls erhöht oder überstiegen sogar noch die Werte von  $t_{4h}$  bzw.  $t_{48h}$ . In der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante dagegen fiel die Glc-Akkumulation in HL-angezogenen Pflanzen weitaus geringer aus (**Tab. 4.2 B**). Die Vermutung liegt nahe, dass ein verminderter Glc-Gehalt Ursache dafür ist, dass die Doppelmutante nicht zur HL-Akklimatisierung fähig ist. Bestärkt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die Zugabe von Glc zum Medium die Rettung der HL-induzierten Phänotypen von *adg1-1/tpt-2* zur Folge hat (**Heinrichs et al., 2012; Schmitz et al., 2012**). Der Transfer ins HL führte im Wildtyp und in den Einzelmutanten zu einer generellen Akkumulation von Glc, Suc und Fru, welche in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante deutlich geringer ausfiel. In der *tpt-2*-Mutante konnte 48 h nach dem LL-HL-Transfer ein starker Anstieg des Maltosegehaltes beobachtet werden (**Tab. 4.2 A**). Im Vergleich dazu konnten in den stärkefreien Mutanten (*adg1-1* bzw. *adg1-1/tpt-2*), wenn überhaupt, nur sehr geringe Mengen Maltose gemessen werden (**Tab. 4.2 B**). Diese Beobachtung stützt den Befund des Stärkeabbaus während der Tagperiode bei Funktionsverlust des TPT, da Maltose nur beim Stärkeabbau entsteht.

Der Aminosäure Prolin konnte bereits eine Funktion in der Stressantwort, z.B. bei der Pathogenabwehr oder in Trockenstressexperimenten, nachgewiesen werden (**Verslues und Sharma, 2010**). Sowohl Prolin selbst, aber auch der Prolinstoffwechsel, sind dabei involviert. Die Messungen zeigen nach dem Transfer der Pflanzen ins HL in allen Linien eine erhebliche Zunahme von Prolin, wobei diese in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante am schwächsten ausfiel. Mit Ausnahme der *tpt-2*-Mutante, war der Prolingehalt in Pflanzen, die im HL angezogen wurden, gegenüber denen, die nur transient HL ausgesetzt waren, geringer.

*Myo*-Inositol ist ebenfalls an Stressantworten beteiligt (**Donahue et al., 2010**) und gilt außerdem als Ausgangssubstrat für Signalmoleküle auf Lipidbasis (**Stevenson et al., 2000**). Licht als stressauslösender Faktor scheint auch die Synthese von *myo*-Inositol zu beeinflussen. Mit andauernder HL-Exposition erhöhten sich die *myo*-Inositol-Gehalte. Die

Anzucht unter kontinuierlichen HL-Bedingungen führte wiederum zu einem geringen Anstieg des Gehaltes von *myo*-Inositol gegenüber dem in Pflanzen, die im LL angezogen wurden. *Col-0* und *tpt-2* zeigten einen ähnlichen Level von *myo*-Inositol. Der *myo*-Inositol-Gehalt in *adg1-1* und *adg1-1/tpt-2* lag ca. 50 % darunter.

Für alle übrigen Metabolite ist ein eindeutiger Trend zu beobachten. Der Wechsel von LL zu HL resultiert in einem Anstieg der jeweiligen Metabolite. In fast allen Pflanzenlinien erhöhte sich der Metabolitgehalt nach 48 h nochmals im Vergleich zum Zeitpunkt  $t_{4h}$ . Ausnahmen bildeten hierbei Glycin, Pyruvat, Glycerin und Putrescin, von denen in einigen Pflanzenlinien zum Zeitpunkt  $t_{48h}$  geringere Mengen detektiert wurden. Die erhobenen Daten zeigen außerdem, dass in den meisten Fällen der jeweilige Metabolitgehalt in den Pflanzen höher lag, deren Anzucht im HL erfolgte, gegenüber denen, die im LL angezogen wurden. Oftmals blieben die HL-Werte jedoch unter denen, die für den Zeitpunkt  $t_{48h}$  erfasst wurde. Eine vollständige Akklimatisierung hatte demnach nach 48 h noch nicht eingesetzt.

Tab. 4.2: **Quantitative Bestimmung ausgewählter Metabolite** in Col-0 und *tpt-2* (A) bzw. *adg1-1* und *adg1-1/tpt-2* (B). Die Daten wurden mittels GC-ToF-MS aus Blattproben erhoben. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für ca. 30/21 Tage im Schwachlicht ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , t<sub>0</sub>, LL) bzw. Hochlicht ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , HL) auf Erde im Langtag (16/8 h). Desweiteren wurden Proben 4 h (t<sub>4h</sub>) bzw. 48 h (t<sub>48h</sub>) nach dem Transfer vom LL ins HL genommen. Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 5 technischen Replikaten. n.d.: nicht detektierbar

A	Col-0 t <sub>0</sub> (LL)	Col-0 t <sub>4h</sub>	Col-0 t <sub>48h</sub>	Col-0 (HL)	<i>tpt-2</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>tpt-2</i> t <sub>4h</sub>	<i>tpt-2</i> t <sub>48h</sub>	<i>tpt-2</i> (HL)
Relative Einheiten pro g FG								
<b>Zucker</b>								
D-Glc	0,53 $\pm$ 0,04	21,35 $\pm$ 0,68	12,21 $\pm$ 1,14	13,71 $\pm$ 1,25	0,67 $\pm$ 0,04	3,19 $\pm$ 0,22	22,97 $\pm$ 0,69	16,01 $\pm$ 0,75
D-Suc	3,26 $\pm$ 0,06	6,08 $\pm$ 0,10	7,33 $\pm$ 0,12	6,78 $\pm$ 0,19	3,39 $\pm$ 0,06	4,18 $\pm$ 0,16	7,15 $\pm$ 0,13	8,13 $\pm$ 0,25
D-Fru	0,74 $\pm$ 0,04	16,80 $\pm$ 0,45	9,68 $\pm$ 1,85	12,78 $\pm$ 0,90	0,91 $\pm$ 0,03	3,38 $\pm$ 0,24	17,42 $\pm$ 0,46	8,61 $\pm$ 0,56
D-Maltose	0,12 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,02	1,87 $\pm$ 0,26	0,52 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,06	10,98 $\pm$ 0,81	6,71 $\pm$ 0,95
$\alpha,\alpha'$ -D-Trehalose	0,25 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,03	4,10 $\pm$ 0,43	2,84 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,03	1,22 $\pm$ 0,13	0,84 $\pm$ 0,08
<b>Aminosäuren</b>								
DL-Glutaminsäure	32,46 $\pm$ 1,86	124,73 $\pm$ 2,57	165,01 $\pm$ 2,40	39,41 $\pm$ 3,02	53,29 $\pm$ 2,59	98,74 $\pm$ 6,50	169,43 $\pm$ 3,91	87,26 $\pm$ 9,74
Glycin	3,52 $\pm$ 0,23	144,51 $\pm$ 2,41	115,60 $\pm$ 1,32	14,48 $\pm$ 0,33	4,41 $\pm$ 0,26	107,48 $\pm$ 1,70	109,62 $\pm$ 2,31	80,02 $\pm$ 3,37
DL-Serin	10,12 $\pm$ 0,36	28,05 $\pm$ 0,75	54,53 $\pm$ 1,41	38,38 $\pm$ 0,84	15,97 $\pm$ 0,71	65,01 $\pm$ 0,91	66,14 $\pm$ 1,24	63,03 $\pm$ 1,45
L-Prolin	7,16 $\pm$ 0,83	35,89 $\pm$ 1,73	60,06 $\pm$ 3,78	14,33 $\pm$ 2,10	6,84 $\pm$ 0,43	70,17 $\pm$ 4,47	42,50 $\pm$ 4,54	70,52 $\pm$ 5,59
<b>Organische Säuren</b>								
Pyruvat	0,61 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,07	0,84 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,06	1,64 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,04	1,61 $\pm$ 0,19
2-Methyl-DL-Äpfelsäure	0,09 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,02	1,21 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,05
Fumarsäure	106,36 $\pm$ 3,90	125,30 $\pm$ 1,85	111,55 $\pm$ 2,94	133,31 $\pm$ 2,25	117,78 $\pm$ 3,67	101,63 $\pm$ 2,49	91,51 $\pm$ 2,35	112,65 $\pm$ 3,50
<b>Sonstige</b>								
Glycerin	1,50 $\pm$ 0,07	2,97 $\pm$ 0,30	2,91 $\pm$ 0,14	3,99 $\pm$ 0,47	1,42 $\pm$ 0,05	2,79 $\pm$ 0,24	2,41 $\pm$ 0,13	3,55 $\pm$ 0,18
<i>myo</i> -Inositol	12,82 $\pm$ 0,58	19,92 $\pm$ 0,40	23,73 $\pm$ 1,37	26,92 $\pm$ 0,37	11,44 $\pm$ 0,72	18,02 $\pm$ 0,44	23,18 $\pm$ 0,54	15,78 $\pm$ 0,56
Erythrit	0,27 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,09	1,06 $\pm$ 0,07	0,82 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,06	1,28 $\pm$ 0,07	1,29 $\pm$ 0,16
Putrescin	1,09 $\pm$ 0,07	7,53 $\pm$ 0,64	10,94 $\pm$ 0,94	3,11 $\pm$ 0,49	1,14 $\pm$ 0,05	3,90 $\pm$ 0,35	16,55 $\pm$ 1,00	14,76 $\pm$ 1,63

<b>B</b>	<i>adg1-1</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adg1-1</i> t <sub>4h</sub>	<i>adg1-1</i> t <sub>48h</sub>	<i>adg1-1</i> (HL)	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>4h</sub>	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>48h</sub>	<i>adg1-1/tpt-2</i> (HL)
<b>Relative Einheiten pro g FG</b>								
<b>Zucker</b>								
D-Glc	6,77 ± 0,53	25,97 ± 0,17	24,41 ± 0,44	26,82 ± 0,37	2,92 ± 0,44	13,41 ± 1,30	10,77 ± 0,74	5,73 ± 0,77
D-Suc	5,66 ± 0,18	6,69 ± 0,06	7,08 ± 0,05	7,90 ± 0,12	3,79 ± 0,15	5,20 ± 0,07	5,93 ± 0,08	4,77 ± 0,19
D-Fru	10,91 ± 0,63	20,17 ± 0,21	19,71 ± 0,37	20,95 ± 0,34	3,92 ± 0,48	5,84 ± 0,47	8,44 ± 0,54	3,76 ± 0,29
D-Maltose	n.d.	0,55 ± 0,03	0,52 ± 0,04	0,14 ± 0,01	n.d.	0,38 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,03
α,α'-D-Trehalose	0,16 ± 0,01	0,44 ± 0,03	3,33 ± 0,23	1,48 ± 0,07	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,76 ± 0,10
<b>Aminosäuren</b>								
DL-Glutaminsäure	29,83 ± 1,81	65,86 ± 5,49	176,49 ± 1,89	37,77 ± 1,71	35,30 ± 1,80	73,15 ± 5,63	70,01 ± 4,78	37,78 ± 4,50
Glycin	4,78 ± 0,24	84,63 ± 3,23	116,06 ± 1,69	22,94 ± 1,59	2,52 ± 0,15	20,29 ± 1,63	7,62 ± 0,38	4,30 ± 0,26
DL-Serin	6,10 ± 0,22	23,16 ± 1,38	49,68 ± 1,48	25,88 ± 1,76	7,70 ± 0,52	19,02 ± 1,19	16,56 ± 0,49	14,93 ± 0,68
L-Prolin	4,01 ± 0,29	30,16 ± 2,26	68,00 ± 7,02	18,81 ± 2,64	6,94 ± 1,31	26,60 ± 1,85	22,41 ± 4,80	9,86 ± 1,32
<b>Organische Säuren</b>								
Pyruvat	0,53 ± 0,04	0,53 ± 0,04	0,87 ± 0,05	1,09 ± 0,06	0,62 ± 0,03	1,10 ± 0,07	1,09 ± 0,12	0,62 ± 0,02
2-Methyl-DL-Äpfelsäure	0,12 ± 0,01	0,36 ± 0,03	1,13 ± 0,06	0,62 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,16 ± 0,02
Fumarsäure	136,96 ± 4,41	115,53 ± 1,70	98,82 ± 3,49	116,77 ± 2,31	96,78 ± 1,61	91,04 ± 1,66	85,79 ± 1,36	82,43 ± 10,17
<b>Sonstige</b>								
Glycerin	1,24 ± 0,02	2,18 ± 0,25	2,55 ± 0,05	4,42 ± 1,15	1,22 ± 0,13	2,27 ± 0,16	2,33 ± 0,19	10,11 ± 3,54
<i>myo</i> -Inositol	6,35 ± 0,35	13,79 ± 0,78	18,83 ± 0,74	16,17 ± 0,54	7,07 ± 0,16	13,69 ± 0,51	16,35 ± 0,44	6,16 ± 0,35
Erythrit	0,53 ± 0,04	1,07 ± 0,13	4,69 ± 0,38	1,44 ± 0,10	0,89 ± 0,02	1,57 ± 0,09	1,80 ± 0,04	1,96 ± 0,21
Putrescin	2,93 ± 0,10	9,60 ± 1,26	36,15 ± 2,69	11,37 ± 1,12	1,92 ± 0,12	6,92 ± 0,98	5,18 ± 0,39	5,95 ± 0,88

#### 4.1.5 Identifizierung von Promotormotiven differentiell regulierter Gene

Um Hinweise auf die transkriptionelle Regulierung der HL-induzierten Phänotypen zu bekommen, wurden die aus dem LL-HL-Transferexperiment erhaltenden *Mikroarray*-Daten (Schmitz, 2011; Schmitz *et al.*, 2012) einer *FIRE*-Analyse unterzogen. Ziel war es, Promotormotive zu finden, die an der Regulation von Genen beteiligt sind, die eine Rolle in der HL-Akklimatisierung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante spielen. Es wurden verschiedene Gruppen von Genen zusammengefasst und einzeln analysiert. Ansatz A enthielt Gene, die zu den entsprechenden Messzeitpunkten in der Mutante gegenläufig reguliert waren. In Ansatz B wurden Gene zusammengefasst, die in der Mutante signifikant hoch oder herunterreguliert wurden, im Wildtyp aber unverändert blieben. Gene, die in der Mutante unverändert waren, dafür aber im Wildtyp hoch oder herunterreguliert wurden, entsprachen Ansatz C. Zusätzlich wurden Gene zusammengefasst, die im Wildtyp und sämtlichen Mutanten gleich reguliert waren. Für die Identifizierung der Motive wurden für jeden Ansatz jeweils zwei Auswertungen durchgeführt.

##### Diskrete Auswertung

Clustering mit *k-means*, Motivsuche mit *FIRE*

Zunächst wurde der logFC der Messung relativ zum Zeitpunkt  $t_0$  bestimmt. Anhand dieses logFC wurden Kandidatengene mithilfe von *k-means* in Cluster unterteilt. Die Anzahl der Cluster, die beim *k-means*-Verfahren vorher angegeben werden muss, wurde nach **Everitt und Hothorn** (2010) bestimmt. Das *k-means*-Clustering wurde jeweils 5-mal durchgeführt und die am plausibelsten scheinende Clusterverteilung anhand eines Streudiagramms ausgewählt. Diese Clusterverteilung wurde dann als Basis für eine Promoter-Motivsuche mit *FIRE* verwendet. Diese Suche wurde mehrfach durchgeführt, jeweils mit unterschiedlichen Parametern für die initiale Motivgröße (5–8 bp) und die minimale Robustheit (3–10), die akzeptierte Motive haben müssen.

Mit der diskreten *FIRE*-Auswertung konnte nur sehr wenige putative Motive identifiziert werden. Auch mit niedrigen Robustheitswerten wurden kaum (neue) Motive gefunden. Für viele Ansätze konnten auch gar keine Motive bestimmt werden.

### Kontinuierliche Auswertung

Clustering mit *FIRE*, Motivsuche mit *FIRE*

Es wurden die gleichen Ausgangsdaten wie für die diskrete Auswertung verwendet. Der Unterschied der kontinuierlichen Auswertung bestand darin, dass die Werte nicht mehr im Vorfeld in Cluster unterteilt wurden, sondern direkt an *FIRE* gegeben werden. Dies hat eine Unterteilung der Gene in eine wesentlich größere Anzahl von Clustern zur Folge. Diese Anzahl wird von *FIRE* selbst anhand der Anzahl der Gene im Genom und in den Expressionsdaten bestimmt.

Durch die oben beschriebenen Auswertungen wurden einige wenige putative Motive gefunden. Allerdings gab es keine Überschneidung der Motive über die Auswertungen hinweg. Wenn überhaupt, wurden in jeder Auswertung komplett andere Motive gefunden. Das Senken der Robustheit hätte z.B. zur Identifizierung gleicher Motive in ein und demselben Experiment führen sollen. Zudem lieferten viele Auswertungen überhaupt keine Motivkandidaten. Desweiteren waren die Ergebnisse in einer erneuten *FIRE*-Analyse nicht reproduzierbar.

### 4.2 Die Rolle von Zuckern bei der Akklimatisierungsantwort von *A. thaliana*

An dieser Stelle sollen Zucker und deren Umsatz in Pflanzenzellen bzw. Chloroplasten in Zusammenhang mit *Retrograden Signalen* gestellt werden. Die zu untersuchenden *Arabidopsis thaliana*-Linien wiesen Defekte in der Stärkebiosynthese (AGPase, *adg1-1*), des Triosephosphat/Phosphat Translokators (TPT, *tpt-2*), des Glucose-6-phosphat/Phosphat Translokators2 (GPT2, *gpt2-1*) und der Hexokinase1 (HXK1, *gin2-1*) in unterschiedlichen Kombinationen auf. Für die Untersuchungen wurden Wildtyppflanzen (Col-0, *Ler*), Einzel- sowie Doppel- und Tripelmutanten entweder auf ½ MS-Agarplatten mit Glucose (Glc), Saccharose (Suc) oder Fructose (Fru) oder gänzlich ohne Zucker (MS) unter Hochlichtbedingungen (HL, 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) im Langtag angezogen. Im HL und ohne Zugabe von Zucker zum Medium zeigten die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante, die *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* sowie die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante sowohl einen retardierten Wachstums- als auch den „Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz“ (HCF)-Phänotyp.

#### 4.2.1 Generierung und Charakterisierung der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante

In einer gezielten Suche nach Glucose unempfindlichen (*glucose insensitive*, *gin*) *HXK1*-Mutanten konnte die *gin2-1* Mutante (Moore *et al.*, 2003) identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um eine rezessive Mutation im *Ler*-Hintergrund von *Arabidopsis thaliana*. Die

durch EMS-Mutagenese hervorgerufene *nonsense*-Mutation im *HXK1*-Gen resultierte in einem Stop-Codon (Q432\*), was einen vollständigen Verlust der Proteinfunktion zur Folge hat.

Die Unempfindlichkeit der *gin2-1*-Mutante gegenüber hohen Glucosekonzentrationen konnte durch Fütterung von 5–7 % Glucose (Glc) bestätigt werden (Abb. 4.3 D, I, N). Um eine mögliche Beteiligung der HXK1 an der zuckerabhängigen Rettung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante zu überprüfen, wurde die *gin2-1*-Mutante mit der Doppelmutante gekreuzt. Keimlinge der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante waren ebenfalls unempfindlich gegenüber hohen Glc-Konzentrationen (Abb. 4.3 E, J, O). Das Wachstum von *Col-0* und *Ler* sowie der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante wurden dagegen deutlich gehemmt (Abb. 4.3 A–C, F–H, K–M). Unter Hochlichtbedingungen (HL,  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) zeigte die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante ebenfalls wie die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante gehemmtes Wachstum und den HCF-Phänotyp (Abb. 4.4, Abb. 4.7 G). Weitere phänotypische Merkmale konnten bei der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante weder bei Anzucht auf Erde noch auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten ohne Zucker beobachtet werden.

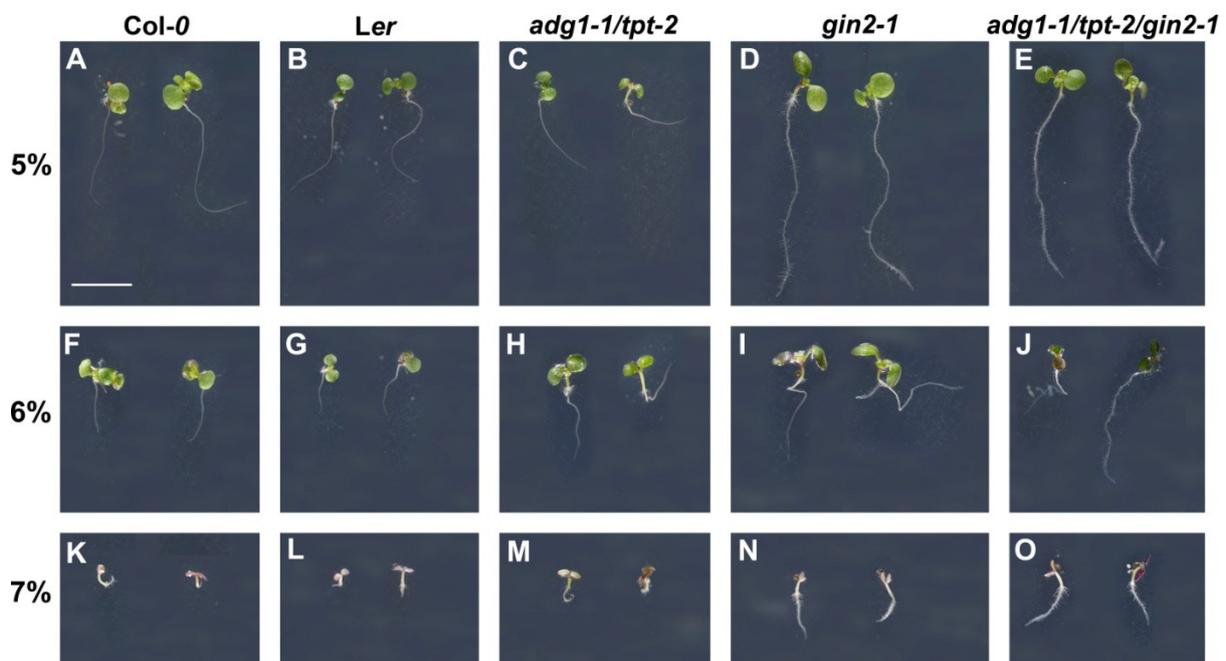


Abb. 4.3: Einfluss von 5–7 % Glucose (Glc) auf Keimung und Wachstum von *Col-0* (A, F, K), *Ler* (B, G, L), *adg1-1/tpt-2* (C, H, M), *gin2-1* (D, I, N) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (E, J, O). Die Pflanzen wurden für ca. 11 Tage auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit 5 % (A–E), 6 % (F–J) bzw. 7 % (K–O) Glc bei einer PFD von  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  unter Langtagbedingungen (16/8 h) angezogen. Der Größenstandard in (A) definiert 0,5 cm.

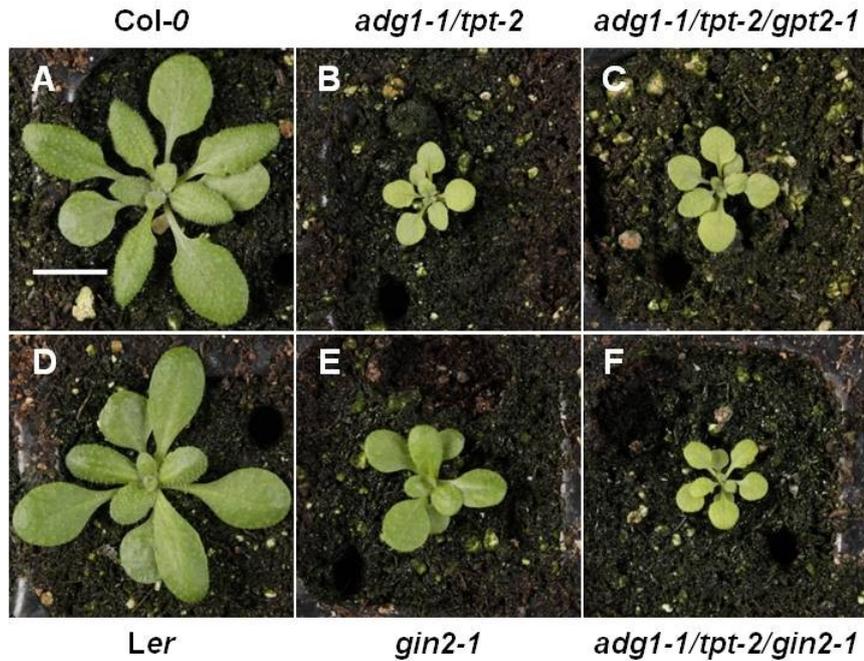


Abb. 4.4: **Wachstumsphänotypen unter Hochlichtbedingungen** von Col-0 (A), *adg1-1/tpt-2* (B), *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* (C), *Ler* (D), *gin2-1* (E) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (F). Die Pflanzen wurden für ca. 3 Wochen bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  unter Langtagbedingungen (16/8 h) angezogen. Der Größenstandard in (A) definiert 1 cm.

Zur Verifizierung des *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Genotyps wurde eine RT-PCR des *TPT*- sowie des *HXK1*-Gens durchgeführt. Die Angleichung der Transkriptmengen erfolgte über das Gen für Actin (Abb. 4.5). Die *TPT*-Transkriptmenge in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante war deutlich gegenüber der *TPT*-Transkriptmenge im Wildtyp (Col-0 und *Ler*) und der *gin2-1*-Einzelmutante reduziert. Die sehr schwach detektierten *TPT*-Banden in der Doppel- bzw. der Tripelmutante sind vermutlich auf Ungenauigkeiten beim Beladen des Gels zurückzuführen. Obwohl es sich bei *gin2-1* um eine EMS-Mutante handelt (Moore *et al.*, 2003), konnte trotzdem eine deutliche Reduzierung des *HXK1*-Transkripts festgestellt werden. Die Punktmutation resultiert in einem Stop-Codon, was zu einem frühzeitigen Translationsstop führt. Da das cDNA-Fragment die Punktmutation mit einschließt, konnte in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Mutante eine geringe Transkriptionsmenge von *HXK1* detektiert werden. Die Unterschiede zur *gin2-1*-Mutante ergaben sich aus der Methode der semiquantitativen RT-PCR, die die Transkriptmenge des zu untersuchenden Gens zum Zeitpunkt der Probennahme widerspiegelt. Sequenzanalysen bestätigten jedoch zweifelsfrei die *gin2-1*-spezifische Punktmutation in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante.

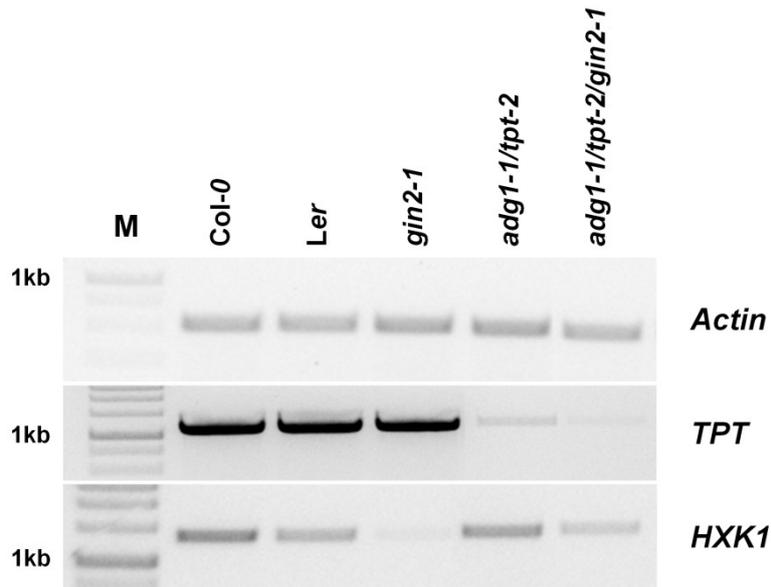


Abb. 4.5: **Semiquantitative RT-PCR zur Verifizierung von *adg1-1/tpt-2/gin2-1***. Die Transkriptmenge von *TPT* und *HXK1* wurden in *Col-0*, *Ler*, *gin2-1*, *adg1-1/tpt-2* sowie *adg1-1/tpt-2/gin2-1* überprüft. Das Angleichen der cDNA-Mengen erfolgte an der Transkriptmenge von *Actin*. Die Größe der zu erwartenden Amplifikate betrug für *Actin* 522 bp, für *TPT* 1177 bp und für *HXK1* 1384 bp. Marker (M): DNA-Größenstandard *GeneRuler 1kb* (Thermo Scientific, Schwerte)

Da der Defekt der Stärkebiosynthese in der AGPase ebenfalls EMS-induziert ist (**Lin et al., 1988a**), erfolgte die Verifizierung der *adg1-1*-Mutation in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante mittels quantitativen Stärkenachweis (**Abb. 4.6**). Die Färbung mit Lugol'scher Lösung bestätigte auch den *adg1-1*-Geno- und Phänotyp der Tripelmutante.

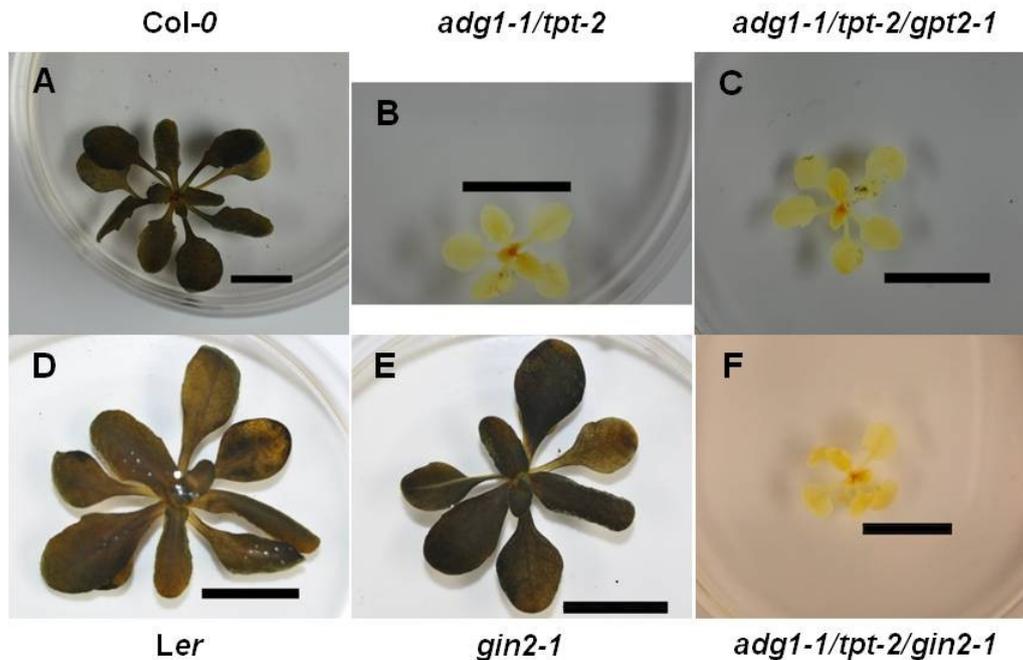


Abb. 4.6: **Qualitativer Stärkenachweis zur Bestätigung von *adg1-1/tpt-2/gin2-1*.** (A) Col-0, (B) *adg1-1/tpt-2*, (C) *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*, (D) *Ler*, (E) *gin2-1* und (F) *adg1-1/tpt-2/gin2-1*. Die Pflanzen wurden ca. 3 Wochen bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  unter Langtagbedingungen (16/8 h) angezogen. Die Färbung mit Lugol'scher Lösung erfolgte zur Hälfte der Tagperiode. Die Größenstandards definieren jeweils 1 cm.

#### 4.2.2 Beteiligung der HXK1 an der zuckerabhängige Rettung der HL-induzierten Phänotypen

Durch **Schmitz *et al.*** (2012) konnte bereits gezeigt werden, dass das gehemmte Wachstum der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante unter HL-Bedingungen durch Anzucht auf 50 mM Glc oder Saccharose (Suc) aufgehoben werden konnte. In der vorliegenden Arbeit sollten weitere biochemische, molekularbiologische und physiologische Untersuchungen Aufschluss über den Effekt von Zuckern bei der Hochlichtakklimatisierung geben. Desweiteren sollte der Effekt von Fructose (Fru) näher untersucht werden. Dafür wurden Arabidopsis-Linien (Col-0, *Ler*, *gin2-1*, *adg1-1/tpt-2* und *adg1-1/tpt-2/gin2-1*) auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten ohne Zucker als Kontrolle bzw. auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit entweder 50 mM Glc, Suc oder Fru unter HL-Bedingungen angezogen. Außerdem wurde eine weitere Tripelmutante (*adg1-1/tpt-2/gpt2-1*) untersucht, die eine zusätzliche Mutation des GPT2 (**Kunz *et al.*, 2010**) aufweist. Diese Mutante wurde ausgewählt, da der GPT2 durch Zucker induzierbar ist. Unter HL-Bedingungen zeigte die *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante ebenfalls den Wachstums- und den HCF-Phänotyp (**Schmitz *et al.*, 2012**).

Die Fütterung von Glc und Suc resultierte in einer Vergrößerung der Blattrosettenfläche von Col-0 um ca. 40 %. Fru hingegen zeigte keinen Effekt (**Abb. 4.7 A**). Im *Ler*-Hintergrund

konnte der wachstumsfördernde Effekt von Glc und Suc nicht beobachtet werden. Die beiden Zucker führten hier zu einer geringen Hemmung des Wachstums (**Abb. 4.7 D**). In der *gin2-1*-Mutante fiel der beschriebene Effekt von Glc bzw. Suc gering aus (**Abb. 4.7 E**). Die Fütterung von Fru führte sowohl in *Ler* als auch in der *gin2-1* sogar zu einer Wachstumshemmung von ca. 40–50 % gegenüber der Anzucht auf ½ MS-Medium ohne Zucker (**Abb. 4.7 D, E**). Im Vergleich zu den Wildtyppflanzen zeigten sowohl die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante als auch die *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*- bzw. die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante ohne Zuckerzugabe eine Verringerung der Blattrosettenfläche um ca. 60–70 % (**Abb. 4.7 B, C, F**). Jedoch konnte nach Fütterung von Glc und Suc eine deutliche Vergrößerung der Blattrosettenfläche dieser Linien und damit eine Rettung des Wachstumsphänotyps festgestellt werden (**Abb. 4.7 B, C, F**). Die positive Wirkung auf das Wachstum durch Fütterung von Fru fiel dagegen eher gering aus (**Abb. 4.7 B, C, F**).

Der HCF-Phänotyp der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante sowie der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*- bzw. *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante konnte, wie schon der Wachstumsphänotyp, teilweise durch die Fütterung von Glc bzw. Suc gerettet werden. Die Zugabe von Fru zum Medium führte ebenfalls zu einer unvollständigen Rettung des HCF-Phänotyps der Doppelmutante sowie beider Tripelmutanten (**Abb. 4.7 G**).

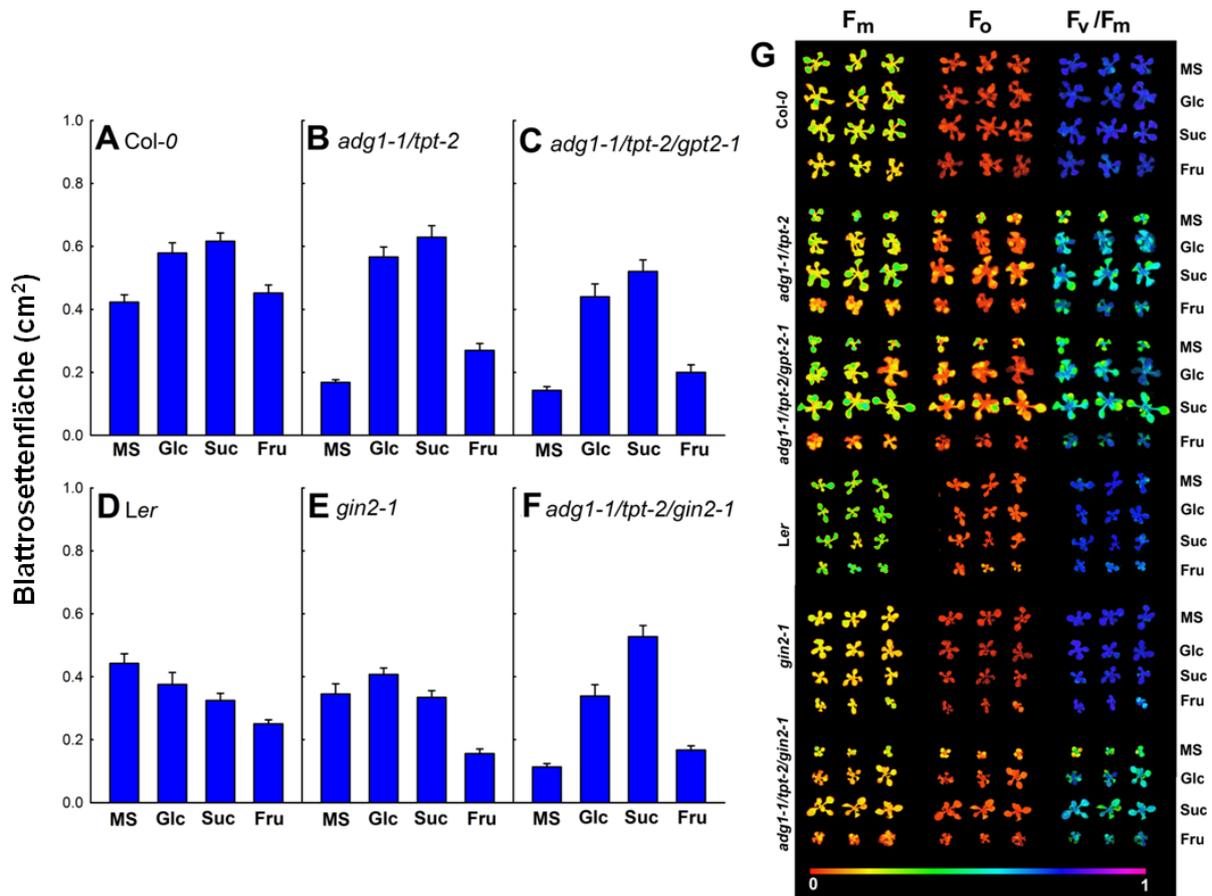


Abb. 4.7: Einfluss exogener Zugabe von Zuckern auf die Blattoberfläche (cm<sup>2</sup>) von Col-0 (A), *adg1-1/tpt-2* (B), *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* (C), *Ler* (D), *gin2-1* (E) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (F). Photosyntheseparameter ( $F_m$ ,  $F_o$  und  $F_v/F_m$ ) wurden mit der Imaging-PAM bestimmt und als Falschfarbenbilder dargestellt (G). Der Farbbalken in (G) codiert die Werte für  $F_v/F_m$  im Falschfarbenbild. Die Pflanzen wurden für ca. 15 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Bestimmung der genannten Parameter erfolgte 5 h nach Beginn der Tagperiode. Die Daten zeigen den MW  $\pm$  SF von 8 Pflanzen pro Linie und Anzuchtbedingung.

#### 4.2.3 Einfluss exogen zugeführter Zucker auf Photosyntheseparameter

In Abb. 4.7 (G) sind  $F_m$  und  $F_o$  des Chlorophyll *a* sowie das  $F_v/F_m$ -Verhältnis in Falschfarben dargestellt. Alle getesteten Linien wurden hierfür auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium ohne Zucker (MS) oder respektive mit 50 mM Glc, Suc oder Fru unter HL-Bedingungen angezogen. Ähnlich wie in Abb. 4.7 (G) dargestellt, wurden weitere Photosyntheseparameter mit Hilfe der ImagingPAM bestimmt.

Die Anzucht auf Glc bzw. Suc hatte keinen wesentlichen Effekt auf die  $F_m$ - und  $F_o$ -Werte von Col-0. Wohingegen es zu einer Herabsetzung beider Werte durch die Zugabe von Fru kam (Abb. 4.8 A). In *Ler* dagegen konnte diese Fru-abhängige Verringerung von  $F_m$  und  $F_o$  nicht beobachtet werden (Abb. 4.8 D). Die  $F_v/F_m$ -Verhältnisse beider Wildtypen nach Zuckerrückführung blieben im Gegensatz dazu unverändert (Abb. 4.8 G, J). Erfolgte die Anzucht auf

$\frac{1}{2}$  MS-Medium ohne Zucker, war ein starker Anstieg der jeweiligen  $F_o$ -Werte sowohl in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante als auch in der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*- sowie der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutanten festzustellen (Abb. 4.8 B, C, F). Dies resultierte wiederum in einem Abfall der jeweiligen  $F_v/F_m$ -Verhältnisse (Abb. 4.8 H, I, L). Wurden die Doppel- und Tripelmutanten jedoch auf Zucker angezogen, verringerten sich die jeweiligen  $F_m$ - bzw.  $F_o$ -Werte, was wiederum eine Erhöhung der  $F_v/F_m$ -Verhältnisse zur Folge hatte. Es ist davon auszugehen, dass die zuckerabhängige Rettung des HCF-Phänotyps unabhängig von der HXK1 ist, da die Werte für  $F_m$ ,  $F_o$  und  $F_v/F_m$  in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante nach Fütterung mit Glc, Suc und Fru weitestgehend denen in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante und der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante entsprachen (Abb. 4.8 B, C, F).

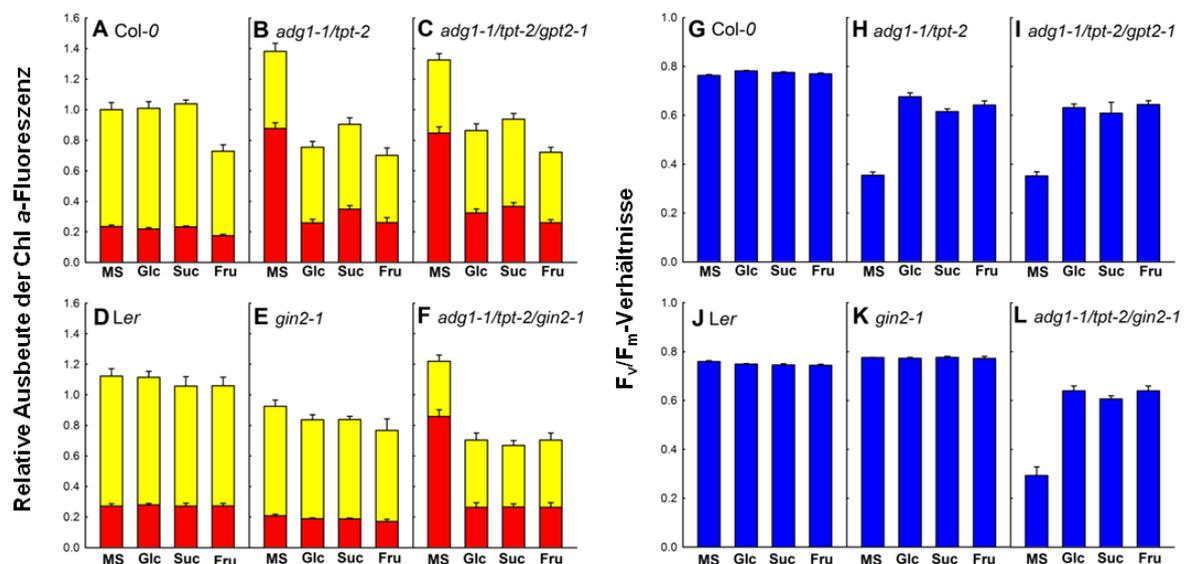


Abb. 4.8: **Abhängigkeit von Photosyntheseparametern ( $F_m$ ,  $F_o$  und  $F_v/F_m$ ) nach exogener Zugabe von Zuckern** in Col-0 (A, G), *adg1-1/tpt-2* (B, H), *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* (C, I), Ler (D, J), *gin2-1* (E, K) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (F, L). Die  $F_v/F_m$ -Verhältnisse (G–L) wurden aus den Werten von  $F_m$  (gelbe Balken) und  $F_o$  (rote Balken) (A–F) bestimmt. Die Pflanzen wurden für ca. 15 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Bestimmung der Photosyntheseparameter erfolgte 5 h nach Beginn der Tagperiode. Die Daten zeigen den  $\text{MW} \pm \text{SF}$  von 10–20 Pflanzen pro Linie und Anzuchtbedingung.

Um eine reine, zuckerabhängige Rettung belegen zu können, wurde eine zusätzliche Fütterung von 50 mM Sorbitol als osmotische Kontrolle durchgeführt. Die  $F_v/F_m$ -Verhältnisse der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante sowie der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante waren deutlich geringer, als die der beiden Wildtypen sowie der *gin2-1*-Mutante (Abb. 4.9).

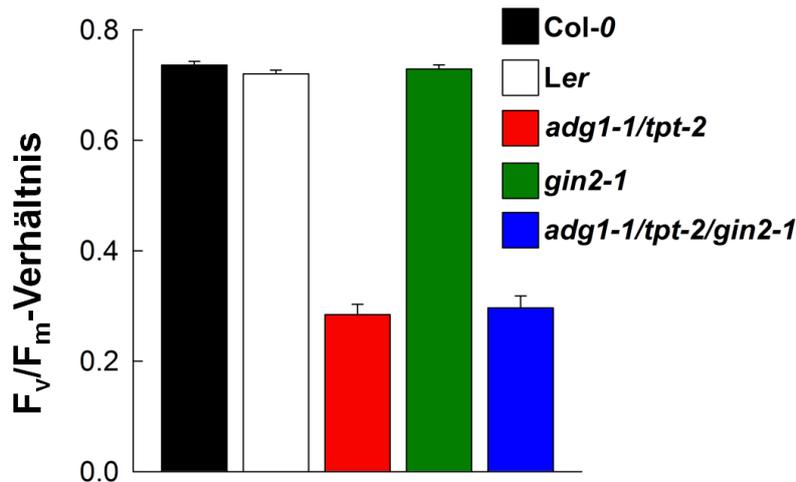


Abb. 4.9: Einfluss von 50 mM Sorbitol auf  $F_v/F_m$ -Verhältnisse von Col-0 (schwarz), Ler (weiß), *adg1-1/tpt-2* (rot), *gin2-1* (grün) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (blau). Die Pflanzen wurden für ca. 15 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit 50 mM Sorbitol angezogen. Die Bestimmung der  $F_v/F_m$ -Verhältnisse erfolgte 5 h nach Beginn der Tagperiode. Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 5–10 Messungen pro Linie.

Mit Hilfe der ImagingPAM wurde als weiterer Aspekt der Photosynthese die ETR als Antwort auf die Zuckerfütterung untersucht. In sog. Induktionskinetiken konnte durch das Setzen von definierten Sättigungspuls-Intervallen die ETR am Photosystem II (PSII) in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt werden (Abb. 4.10). Die Fütterung von Glc, Suc und Fru führte im Col-0-Hintergrund schneller ( $t = 100$  s) zu einer konstanten ETR als in Col-0-Pflanzen, die auf Medium ohne Zucker (MS) angezogen wurden ( $t = 160$  s). Wenn kein Zucker im Medium vorhanden war, lag die maximale ETR von Col-0 bei ca.  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Bei Anzucht auf Glc bzw. Suc stieg die ETR signifikant auf  $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die Fütterung von Fru hatte Erhöhung der ETR auf  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  zur Folge.

Im Ler-Hintergrund sowie in der *gin2-1*-Mutante hatte die Zuckerfütterung dagegen keinerlei Auswirkungen auf die ETR-Induktion. Die Zugabe von Fru zum Medium führte in beiden Linien zu einem Abfall der ETR um ca. 10–15 %.

Die ETR-Induktionskinetiken der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante sowie der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante verhielten sich ähnlich. Ohne Zuckerzugabe lagen die maximalen ETRs deutlich unter dem der Wildtypkontrolle (Col-0). Die Tripelmutante zeigte zusätzlich eine Verzögerung der ETR-Induktion im Vergleich zur Doppelmutante. Die Fütterung von Glc, Suc bzw. Fru führte in beiden Linien zu einer Erhöhung der ETR auf nahezu Wildtypniveau. Nach Suc-Fütterung konnte auch hier eine Verzögerung der ETR-Induktion in der Tripelmutante gegenüber der Doppelmutante beobachtet werden.

Die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante zeigte eine starke Verzögerung der ETR-Induktion, wenn die Anzucht ohne Zugabe von Zucker erfolgte. Außerdem fiel die maximale ETR im Vergleich zur *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante oder auch der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante deutlich geringer aus. Gleichermäßen lag die maximale ETR der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante nach Fütterung von Glc, Suc bzw. Fru unter dem Niveau der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante und dem der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante. Die Zugabe der Zucker zum Medium führte in allen drei Fällen zu einem Anstieg der ETR auf 25–30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

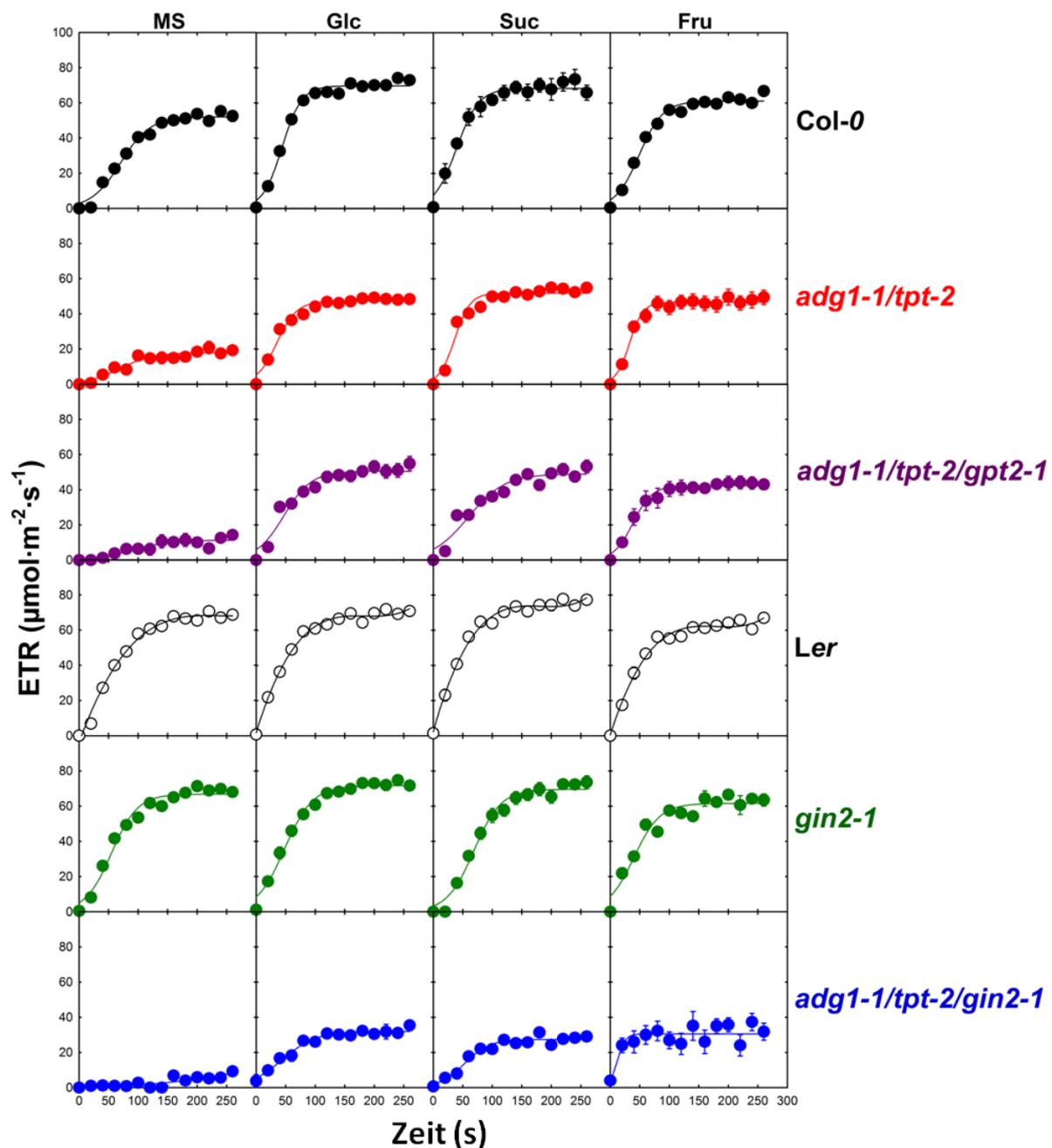


Abb. 4.10: Einfluss des Wachstums auf zuckerhaltigem Medium auf die Induktionskinetiken der ETR von Col-0 (schwarz), *adg1-1/tpt-2* (rot), *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* (violett), Ler (weiß), *gin2-1* (grün) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (blau). Die Pflanzen wurden für ca. 15 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Bestimmung der ETR erfolgte 5 h nach Beginn der Tagperiode. Die Daten zeigen den MW  $\pm$  SF von 10–20 Pflanzen pro Linie und Anzuchtbedingung.

Die ETR in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte (PFD) wurde in sog. Lichtsättigungskurven (Abb. 4.11) ermittelt. Der Kurvenverlauf gibt dabei Aufschluss über den Akklimatisierungszustand der Pflanzen unter den gegebenen Anzuchtbedingungen. Es können z.B. Aussagen darüber getroffen, ab welcher PFD die maximale ETR erreicht ist. Daraus kann abgeleitet werden, an welche Lichtverhältnisse die Pflanzen angepasst sind.

Bei Anzucht auf Glc bzw. Suc war ein signifikanter Anstieg der ETR im *Col-0*-Hintergrund zu verzeichnen. Die höchste ETR (ca.  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) wurde bei der stärksten getesteten Lichtintensität ( $701 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) erreicht, eine Lichtsättigung jedoch nicht. Fru hingegen führte nur zu einem geringen Anstieg der ETR in Abhängigkeit von der Lichtintensität ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) im Vergleich zur ETR bei Anzucht auf Medium ohne Zucker ( $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), jedoch konnte auch hier keine Lichtsättigung beobachtet werden.

Der Lichtsättigungskinetiken von *Ler* und *gin2-1* waren nahezu identisch. Ein steigender Effekt von Glc und Suc auf die ETR des PSII in diesen Linien war nur gering ausgeprägt. Fru hingegen bewirkte einen leichten Abfall der ETR in *Ler* und *gin2-1*.

Sowohl in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante, aber mehr noch in der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante, wurde die ETR in Abwesenheit von extern gefütterten Zuckern deutlich gehemmt. Dies galt im gleichen Maße für die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante. Hohe PFDs verursachten hier sogar eine vollständige Inhibierung der ETR. Bei einer PFD von ca.  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  lag die maximale ETR der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante bei  $18 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Nach Fütterung von Glc bzw. Fru, und mehr noch nach Suc, wurde die ETR der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante fast vollständig gerettet und erreichte damit fast das Niveau des *Col-0*-Wildtyps, wenn dieser auf Medium ohne Zugabe von Zucker angezogen worden war.

Die drei getesteten Zucker erzielten im gleichen Maße einen steigenden Effekt auf die ETR in der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante.

Wie bei den Induktionskinetiken war die Rettung der ETR nach Zuckerrückführung in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante deutlich schwächer ausgeprägt als in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante bzw. der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante. Ähnlich der Doppelmutante hatte Suc gegenüber Glc oder Fru einen stärkeren Effekt auf die Rettung der ETR in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante.

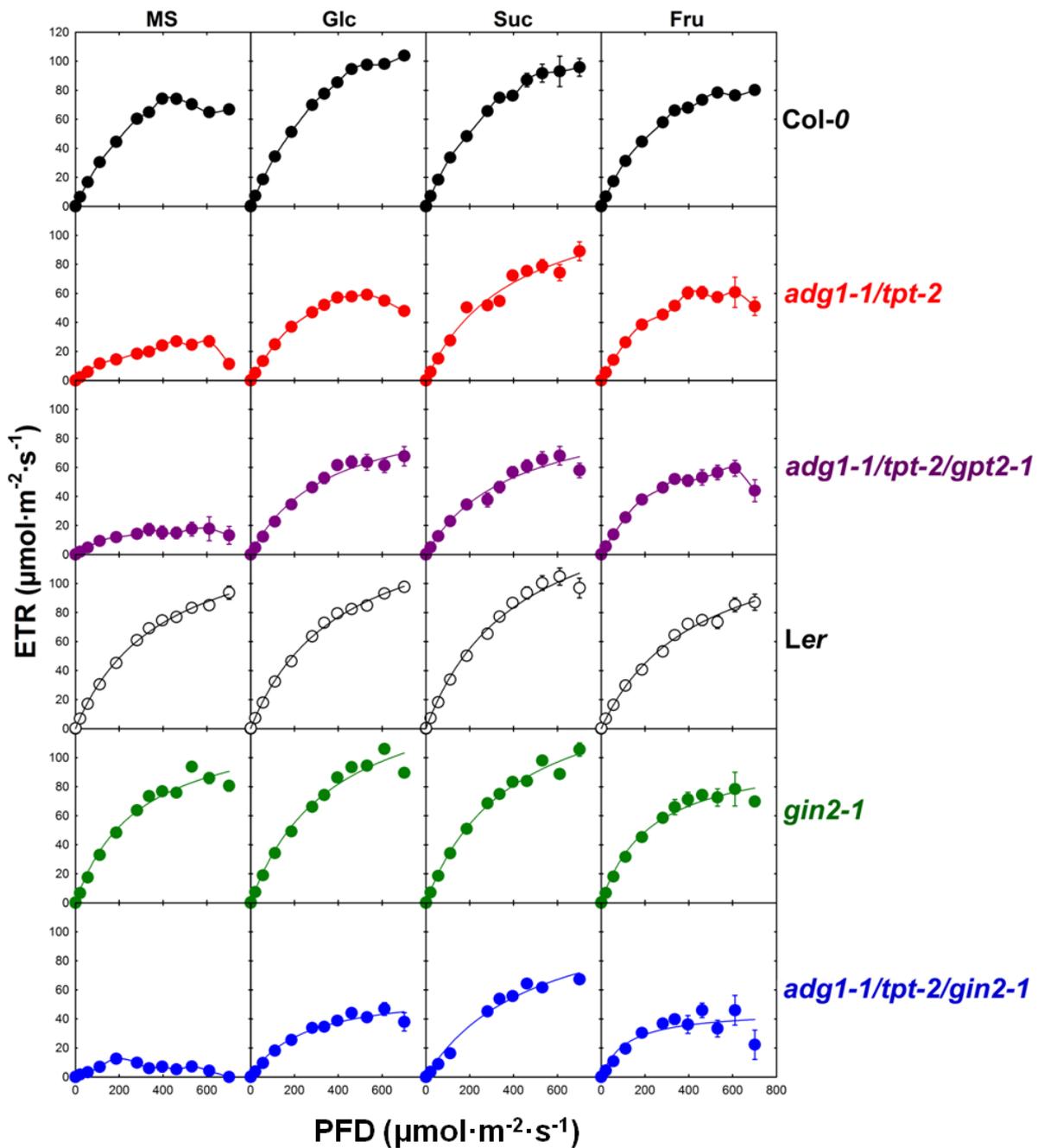


Abb. 4.11: Lichtabhängigkeit der ETR nach exogener Zugabe von Zuckern in Col-0 (schwarz), *adg1-1/tpt-2* (rot), *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* (violett), Ler (weiß), *gin2-1* (grün) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (blau). Die Pflanzen wurden für ca. 15 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Bestimmung der ETR erfolgte 5 h nach Beginn der Tagperiode. Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 10–20 Pflanzen pro Linie und Anzuchtbedingung.

#### 4.2.4 Gehalt an löslichen Zuckern in Abhängigkeit exogen zugeführter Zucker

Um mögliche Unterschiede im Kohlenhydrathaushalt festzustellen, wurden sowohl der Gehalt an löslichen Zuckern (Glc, Suc und Fru) als auch der von Stärke in den Blättern der zu untersuchenden Arabidopsis-Linien bestimmt (Tab. 4.3).

Der Gehalt an Glc, Suc und Fru war in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante sowie der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*- und der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante im Vergleich geringer als in den beiden Wildtypen (*Col-0* und *Ler*), wenn die Anzucht aus ½ MS-Medium ohne Zucker (MS) erfolgte.

In allen getesteten Linien war eine deutliche Erhöhung der jeweiligen Zucker, auf denen die Pflanzen angezogen worden waren, zu erkennen. Das Wachstum auf Glc führte bereits zu einem Anstieg aller getesteten Zucker im Vergleich zur Kontrolle (MS). Einen weitaus größeren Effekt auf den Gehalt an löslichen Zucker hatte jedoch Suc. Dies spricht für die Aktivität von Invertasen, welche die aufgenommene Saccharose in die Monosaccharide Glc und Fru spaltet. Mit Ausnahme des Suc-Gehaltes in der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante konnte in allen übrigen Linien eine Verringerung der Glc- bzw. Suc-Gehalte nach Zugabe von Fru zum Medium gegenüber dem Wachstum auf MS beobachtet werden. Erfolgte die Anzucht auf Glc oder Suc, konnte eine Zunahme des Glc-Gehaltes in der Doppelmutante und auch in den Tripelmutanten beobachtet werden, wobei diese immer noch geringer ausfielen als in den dazugehörigen Wildtypen oder der entsprechenden Einzelmutante.

Wurden vergleichend zu den gemessenen Zuckergehalten andere physiologische Effekte der Zuckerfütterung hinzugezogen, z.B. die Größe der Blattrosettenfläche (Abb. 4.7) oder der Einfluss auf Photosyntheseparameter (Abb. 4.8, Abb. 4.10, Abb. 4.11), ergab sich nicht in allen Fällen ein übereinstimmendes Bild. Die Zugabe von Fru zum Medium förderte bspw. weder das Wachstum der Doppelmutante noch der beiden Tripelmutanten, obwohl der Fru-Gehalt in diesen Linien mindestens doppelt so hoch gegenüber der beiden Wildtypen sowie der *gin2-1*-Mutante lag. Möglicherweise verlief die Verstoffwechslung von Fru in diesen Linien langsamer als die von Glc oder Suc.

Tab. 4.3: **Gehalt an löslichen Zuckern und Stärke in Blättern** von Col-0, *adg1-1/tpt-2*, *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*, *Ler*, *gin2-1* und *adg1-1/tpt-2/gin2-1*. Die Pflanzen wurden für ca. 20 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Proben wurden 5 h nach Beginn der Tagperiode genommen. Hervorgehobene Zahlen weisen zusätzlich auf die jeweiligen Zucker hin, auf den die Pflanzen angezogen worden waren. Die Daten stellen den MW  $\pm$  SF von 3–6 unabhängigen Experimenten dar.

	Medium	Glucose	Fructose in $\mu\text{mol C}_6 \cdot \text{g}^{-1}$ FG	Saccharose	Stärke
<b>Col-0</b>	MS	6,59 $\pm$ 0,82	2,45 $\pm$ 0,25	4,85 $\pm$ 0,45	18,19 $\pm$ 2,37
	Glc	<b>17,64 <math>\pm</math> 1,41</b>	3,44 $\pm$ 0,58	5,82 $\pm$ 0,49	32,69 $\pm$ 9,59
	Fru	3,48 $\pm$ 0,66	<b>8,75 <math>\pm</math> 1,31</b>	2,72 $\pm$ 0,34	60,15 $\pm$ 7,63
	Suc	19,76 $\pm$ 0,95	9,03 $\pm$ 1,04	<b>7,47 <math>\pm</math> 0,93</b>	65,69 $\pm$ 7,20
<b><i>adg1-1/tpt-2</i></b>	MS	4,20 $\pm$ 0,70	1,10 $\pm$ 0,08	3,19 $\pm$ 0,33	0,69 $\pm$ 0,04
	Glc	<b>15,20 <math>\pm</math> 1,59</b>	1,10 $\pm$ 0,21	2,78 $\pm$ 0,62	0,44 $\pm$ 0,05
	Fru	1,79 $\pm$ 0,25	<b>24,02 <math>\pm</math> 1,35</b>	2,09 $\pm$ 0,52	0,54 $\pm$ 0,05
	Suc	12,31 $\pm$ 1,08	6,05 $\pm$ 0,63	<b>5,87 <math>\pm</math> 0,77</b>	0,64 $\pm$ 0,02
<b><i>adg1-1/tpt-2/gpt2-1</i></b>	MS	3,98 $\pm$ 0,67	0,92 $\pm$ 0,08	2,36 $\pm$ 0,32	0,70 $\pm$ 0,05
	Glc	<b>12,22 <math>\pm</math> 0,98</b>	1,28 $\pm$ 0,19	2,79 $\pm$ 0,72	0,60 $\pm$ 0,08
	Fru	1,47 $\pm$ 0,10	<b>21,59 <math>\pm</math> 1,17</b>	3,28 $\pm$ 0,71	0,69 $\pm$ 0,05
	Suc	10,70 $\pm$ 0,66	6,57 $\pm$ 0,70	<b>4,91 <math>\pm</math> 0,16</b>	0,60 $\pm$ 0,02
<b><i>Ler</i></b>	MS	8,33 $\pm$ 0,21	4,65 $\pm$ 0,37	2,63 $\pm$ 0,10	26,14 $\pm$ 3,07
	Glc	<b>13,98 <math>\pm</math> 1,22</b>	7,46 $\pm$ 0,50	4,31 $\pm$ 0,17	55,08 $\pm$ 8,37
	Fru	2,69 $\pm$ 0,98	<b>12,30 <math>\pm</math> 0,01</b>	2,28 $\pm$ 0,10	75,80 $\pm$ 11,21
	Suc	8,55 $\pm$ 3,98	7,35 $\pm$ 0,33	<b>6,90 <math>\pm</math> 3,26</b>	324,96 $\pm$ 9,51
<b><i>gin2-1</i></b>	MS	12,08 $\pm$ 0,14	6,87 $\pm$ 0,11	6,07 $\pm$ 0,52	66,22 $\pm$ 3,20
	Glc	<b>15,89 <math>\pm</math> 0,88</b>	8,67 $\pm$ 1,36	7,12 $\pm$ 0,81	49,78 $\pm$ 7,66
	Fru	5,15 $\pm$ 1,14	<b>9,77 <math>\pm</math> 0,09</b>	4,52 $\pm$ 0,73	109,76 $\pm$ 14,51
	Suc	18,38 $\pm$ 0,56	15,06 $\pm$ 0,65	<b>11,44 <math>\pm</math> 1,39</b>	163,40 $\pm$ 9,94
<b><i>adg1-1/tpt-2/gin2-1</i></b>	MS	2,03 $\pm$ 0,44	0,84 $\pm$ 0,13	2,56 $\pm$ 0,21	0,06 $\pm$ 0,02
	Glc	<b>5,86 <math>\pm</math> 0,86</b>	3,21 $\pm$ 0,40	5,12 $\pm$ 0,39	0,01 $\pm$ 0,00
	Fru	0,88 $\pm$ 0,02	<b>20,31 <math>\pm</math> 1,28</b>	2,14 $\pm$ 0,24	0,03 $\pm$ 0,00
	Suc	4,73 $\pm$ 0,68	5,15 $\pm$ 0,50	<b>4,85 <math>\pm</math> 0,45</b>	0,01 $\pm$ 0,00

#### 4.2.5 Einfluss der Zuckerfütterung auf Stärkebiosynthese

Die Zugabe von Zucker zum Medium hatte in beiden Wildtypen und auch der *gin2-1*-Mutante eine erhöhte Stärkebiosynthese zur Folge (Tab. 4.3). Der stärkste Effekt konnte im *Ler*-Hintergrund nach Fütterung von Suc beobachtet werden. Der Stärkegehalt lag hier 10-fach höher als in *Ler*-Pflanzen, die auf MS angezogen worden waren. Zwar weniger stark ausgeprägt, wurde der Effekt von Suc auf die Stärkebiosynthese auch in *gin2-1* festgestellt. Sowohl Glc, als auch Suc sowie Fru hatten, wenn überhaupt, nur wenig Einfluss auf die Stärkegehalte der ohnehin fast vollständig stärkefreien Mutanten *adg1-1/tpt-2*, *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* und *adg1-1/tpt-2/gin2-1*.

#### 4.2.6 Korrelation von ETR und Kohlenhydratstatus

Wurden die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante sowie die *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*- bzw. die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante auf Zucker (Glc, Suc oder Fru) angezogen, erfolgte sowohl eine Rettung des HCF-Phänotyps als auch der ETR (Abb. 4.8, Abb. 4.10, Abb. 4.11). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Zuckergehalt in den Pflanzen und der ETR belegen zu können, erfolgte eine graphische Auswertung der ETR in Abhängigkeit der löslichen Zucker (Abb. 4.12). Eine Auftragung der ETR gegen Glc, Suc oder Fru (Abb. 4.12 A, B, C) ließ nur eine sehr schwache Korrelation zwischen der ETR und des entsprechenden Zuckers erkennen. ETR und Gesamtzuckergehalt (Abb. 4.12 D) korrelierten dagegen stärker. In Abb. 4.12 (E) wurde dann im nächsten Schritt die ETR gegen den Gesamtkohlenhydratgehalt (lösliche Zucker und Stärke) aufgetragen. Es war deutlich zu erkennen, dass Pflanzenlinien mit normalen Stärkegehalten von denen mit sehr geringen Stärkegehalten bzw. stärkefreien Linien getrennte Cluster bildeten. Beide Wildtypen zusammen mit der *gin2-1*-Mutante bildeten ein Cluster bei einer ETR von ca.  $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Mutanten mit Defekten im Transport von Photoassimilaten hingegen zeigten unterhalb dieses Wertes eine direkte Korrelation ( $r = 0,874$ ) zwischen der ETR und des Gesamtkohlenhydratstatus.

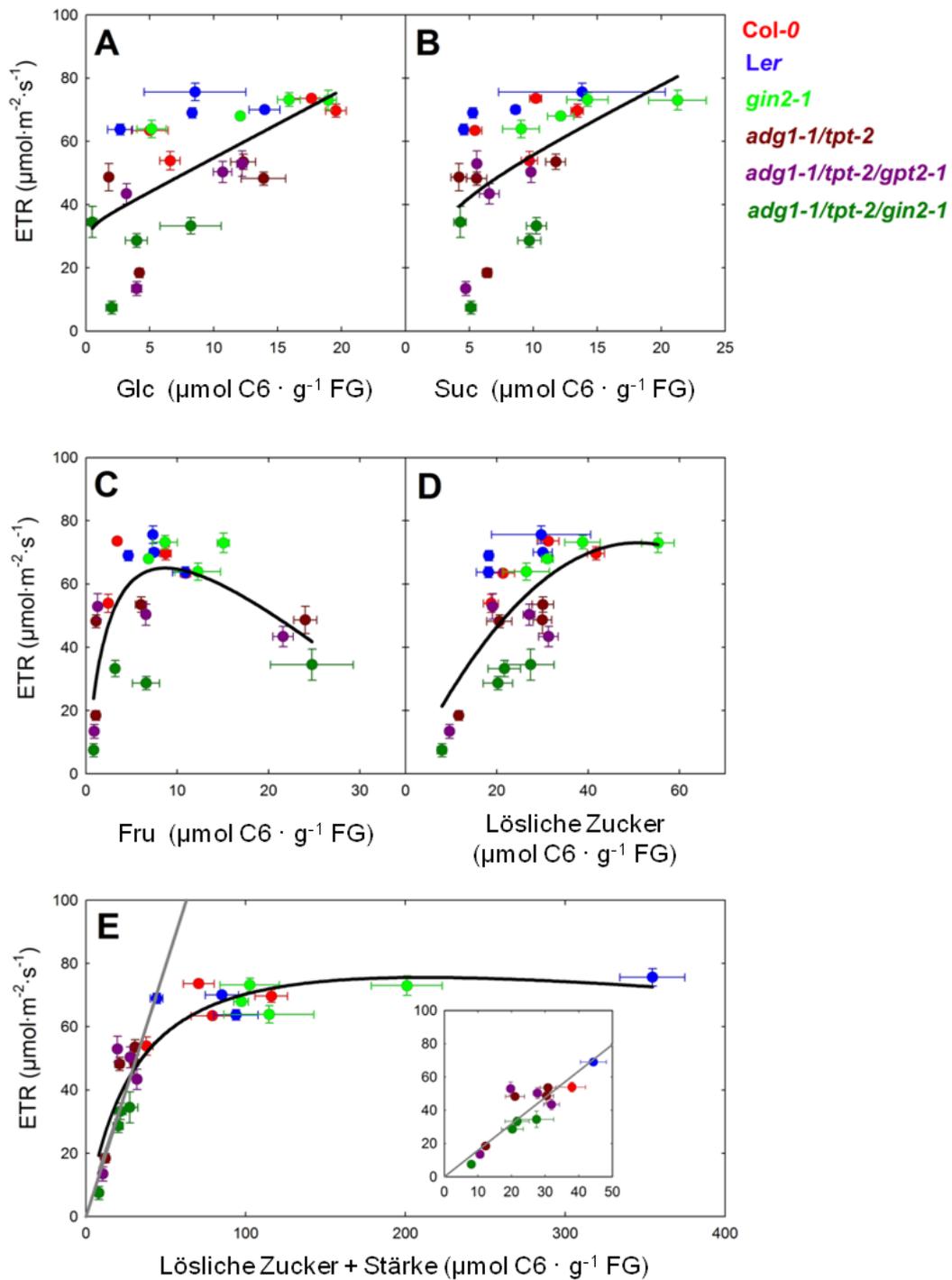


Abb. 4.12: Streudiagramme der ETR in Abhängigkeit von Zuckergehalten von Col-0 (hellrot), Ler (blau), gin2-1 (hellgrün), adg1-1/tpt-2 (dunkelrot), adg1-1/tpt-2/gpt2-1 (violett) und adg1-1/tpt-2/gin2-1 (dunkelgrün). Die Auftragung erfolgte gegen den Durchschnittsgehalt von Glc (A), Suc (B) und Fru (C) sowie den Gesamtgehalt löslicher Zucker (D) und auch dem Gesamtkohlenhydratgehalt (Zucker + Stärke, E).

#### 4.2.7 Zuckerabhängige Genexpression

Die exogene Zugabe von Zuckern hat eine Reprimierung von Genen zur Folge, die im Zusammenhang mit der Photosynthese stehen (Smeekens, 1998; Xiao *et al.*, 2000). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass die meisten Studien dazu an Keimlingen durchgeführt worden sind, die transient (6–48 h) mit hohen Zuckerkonzentrationen (2–6 %) gefüttert wurden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Anzucht dagegen kontinuierlich auf Zucker.

Für die HXK1 konnte z.B. eine Beteiligung an der zuckerabhängigen Herunterregulierung von *LHCBI* gezeigt werden. In der *gin2-1*-Mutante dagegen entfiel die zuckerabhängige Reprimierung Photosynthese-relevanter Gene zu großen Teilen (Moore *et al.*, 2003). In *gin2-1* konnte durch die Zugabe von Zucker zum Medium sogar eine erhöhte Transkription der Nitratreduktase1 (*NRI*; Jang *et al.*, 1997) und des *GPT2* (Bläsing *et al.*, 2005; Kunz *et al.*, 2010; Schmitz *et al.*, 2012) nachgewiesen werden. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die Expression der plastidären Hexokinase (*pHXK*) ebenfalls durch exogen zugeführte Zucker induziert wird (Zhang *et al.*, 2010). *A. thaliana*-Keimlinge wurden hierfür 3 Wochen auf Glc-haltigem Medium (7 %) angezogen.

Um zu überprüfen, ob die zuckerabhängige Transkriptionsinduktion in *gin2-1* auch noch im Hintergrund der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante existiert und ob die erhöhten Expressionen von *GPT2* bzw. *pHXK* daher HXK1-abhängig sind, wurden quantitative Echtzeit-RT-PCRs (qRT-PCR) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Expressionslevel von *LHCBI* (*light harvesting complex protein B1*), *NRI* und *SBP* (Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase) in *Col-0*, *adg1-1/tpt-2*, *Ler*, *gin2-1* und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* bestimmt (Abb. 4.13). Die Pflanzen wurden dafür auf ½ MS ohne Zucker (MS) und respektive mit jeweils 50 mM Glc, Suc oder Fru unter HL-Bedingungen im Langtag angezogen.

Bei Anzucht auf Glc, Suc und Fru wurde der *GPT2* im *Col-0*-Hintergrund stark exprimiert. Im Vergleich dazu fiel in *Ler* und *gin2-1* unter den gleichen Bedingungen die zuckerinduzierte *GPT2*-Expression schwächer aus. Da die zuckerabhängige Hochregulierung von *GPT2* in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante sich nicht stark von der Expression in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante unterschied, ist es fraglich, ob die HXK1 überhaupt eine Rolle an der Regulation von *GPT2* spielt.

Es wird vermutet, dass die Expression von *LHCBI* allgemein durch Zucker herunterreguliert wird. Sowohl der *Ler*-Wildtyp als auch die *gin2-1*-Mutante (*Ler*-Hintergrund) zeigten eine Herunterregulierung von *LHCBI* durch Glc. Eine mögliche Beteiligung der HXK1 an Signalweiterleitung oder auch Signalwahrnehmung wäre damit auszuschließen. Auch in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante wurde *LHCBI* reprimiert. Als einzige Ausnahme zeigte die

*adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante überraschenderweise eine eher unveränderte *LHCBI*-Expression nach Wachstum auf Glc. Die Fütterung von Suc bzw. Fru resultierte in allen Linien in einer erhöhten *LHCBI*-Expression.

Die relative Transkriptmenge der *SBP* variierte unter den gegebenen Anzuchtbedingungen sehr stark. In *Ler* und *gin2-1* kam es durch die Zugabe von Zucker (Glc, Suc oder Fru) zum Medium entweder zu einer Reprimierung des *SBP*-Gens oder die Expression zeigte keinerlei Regulierung durch exogen zugeführte Zucker. Die stärkste Herunterregulierung von *SBP* konnte in *gin2-1* nach Fru-Fütterung beobachtet werden. Desweiteren hatte Fru, mit Ausnahme der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante, die Reprimierung des *SBP*-Gens zur Folge. Die Zugabe von Suc führte in *Ler* und *gin2-1* zur Herunterregulierung von *SBP*, in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante hingegen nicht. Der zusätzliche Funktionsverlust der *HXK1* in der Tripelmutante nahm daher keinen Einfluss auf die Expression von *SBP*. Die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante sowie die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante zeigten erneut gegenteilige Expressionsmuster nach Fütterung mit Glc. In der Doppelmutante konnte eine verminderte *SBP*-Expression festgestellt werden, in der Tripelmutante wurde *SBP* dagegen verstärkt transkribiert. Die entsprechenden Wildtypen zeigten ebenfalls unterschiedliche Expressionsmuster. In *Col-0* kam es durch die Zugabe von Glc zum Medium zu einem leichten Anstieg der Expression von *SBP*, wohingegen in *Ler* keine Änderungen der *SBP*-Expression festgestellt werden konnte.

Eine Erhöhung der *NRI*-Transkription im *gin2-1*-Hintergrund nach Zugabe von Zucker zum Medium, wie in **Jang et al.** (1997) beschrieben, konnte in unserem experimentellen Ansatz nicht beobachtet werden. In allen Linien, auch in *gin2-1*, kam es zu einer Abnahme der Transkriptmenge nach Zugabe von Glc, Fru bzw. Suc. Unterschiede zwischen den Linien bzw. den zugefütterten Zuckern waren nur im Ausmaß der jeweiligen *NRI*-Reprimierung festzustellen. Es war allerdings kein eindeutiges Muster erkennbar, das Rückschlüsse auf die Regulation der *NRI*-Expression zugelassen hätte. Obwohl in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante Zucker zur Herunterregulierung von *NRI* führte, hatte die Zugabe von Zucker zum Medium in der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Expression von *NRI*. Die Reprimierung fiel in der Tripelmutante gegenüber den anderen Linien eher schwach aus.

Die Zugabe von Zuckern zum Medium wirkte sich eher mäßig auf die relative Transkriptmenge der *pHXK* in beiden Wildtypen aus. In *Col-0*, *Ler* und *gin2-1* wirkte Fru am stärksten auf die Regulierung der Expression von *pHXK*. Im Hintergrund von *Col-0* führten die Zucker zu einer Hochregulierung der *pHXK*-Expression. Für *Ler* und *gin2-1* wurden stattdessen

gegenteilige Beobachtungen gemacht. Die Reprimierung der *pHXX*-Expression als Effekt der Anzucht auf Zucker fiel in *gin2-1* zudem im Vergleich zu *Ler* stärker aus. Sowohl Glc als auch Suc sowie Fru führten in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante zu einer verstärkten Transkription der *pHXX*. In der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante dagegen fiel die zuckerabhängige Expressionsinduktion deutlich geringer aus.

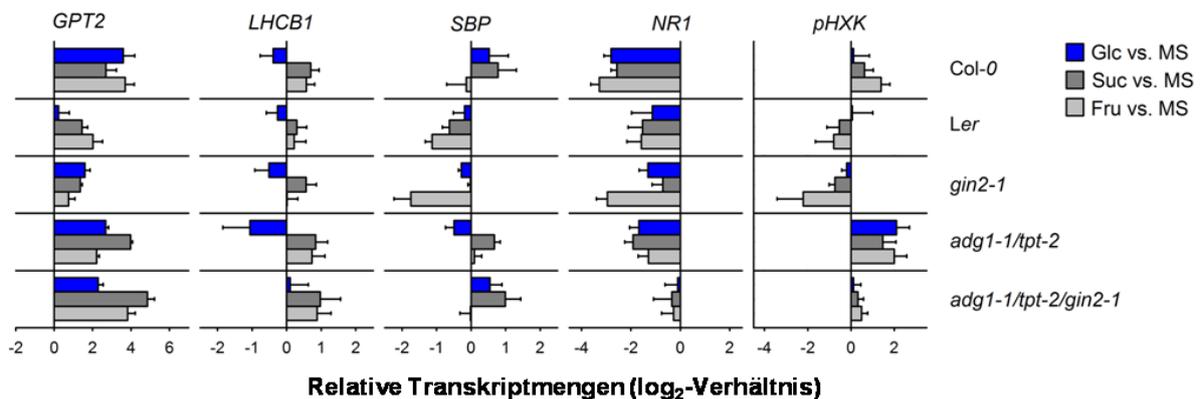


Abb. 4.13: qRT-PCR-Analyse zuckerabhängiger Gene (*GPT2*, *LHCBI*, *SBP*, *NR1* und *pHXX*) in *Col-0*, *Ler*, *gin2-1*, *adg1-1/tpt-2* und *adg1-1/tpt-2/gin2-1*. Zur Bestimmung der relativen Transkriptmengen wurden die Pflanzen für ca. 20 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Proben wurden 5 h nach Beginn der Tagperiode genommen. Die Bestimmung der  $C_t$ -Werte erfolgte für jede Anzuchtbedingung unabhängig. Die zuckerabhängige Genregulation wurde dann über die relativen Transkriptmengen ( $\log_2$ -Verhältnis) ermittelt. Die Änderungen der Transkriptmengen nach Anzucht auf Glc (blau), Suc (grau) bzw. Fru (hellgrau) beziehen sich auf die jeweiligen Transkriptmengen in der entsprechenden Kontrolle (MS). Die Daten repräsentieren den  $\text{MW} \pm \text{SF}$  von 2–3 biologischen und 4–6 technischen Replikaten.

#### 4.2.8 Einfluss exogen zugeführter Zucker auf den Gehalt proteinogener Aminosäuren

Proteinogene Aminosäuren (AS) sind die Proteinbausteine aller Lebewesen. Pflanzen besitzen die Fähigkeit, sämtliche benötigten AS selbst zu synthetisieren. Intermediate der Glykolyse, des Citratzyklus und auch des Pentosephosphatweges sind dabei Substrate der AS-Biosynthese. Gleichmaßen führt der Abbau von AS zu Metaboliten, die im Citratzyklus als Energiequelle genutzt werden können (Pratelli und Pilot, 2014). Die Anzucht der Pflanzen in An- bzw. Abwesenheit von Zucker sollten Unterschiede im AS-Spiegel unter HL-Bedingungen aufzeigen. Desweiteren sollten ggf. Unterschiede der Bindung von Stickstoff aus stickstoffhaltigen Verbindungen (z.B. Ammonium) oder Kohlenstoff identifiziert werden. Da eine Veratmung von Aminosäuren zur Energiegewinnung (Araújo *et al.*, 2011) ebenfalls denkbar ist, war die Quantifizierung der AS ebenso interessant.

Betrachtet man vergleichend die AS-Daten aus der Metabolitanalyse (Abschnitt 4.1.4) fällt auf, dass es z.T. massive Unterschiede zwischen den Messungen gab. Grund hierfür ist die

Probennahme unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Metabolitprofile von Pflanzen, die auf Erde angezogen wurden, weisen gegenüber denen von Pflanzen, die auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten wuchsen, enorme Unterschiede auf (**Benstein et al., 2013; Staehr et al., 2014**). Eine vollständige Tabelle aller gemessenen AS-Gehalte kann dem Anhang entnommen werden (**Tab. Anhang III**). Nachfolgend werden exemplarisch die erhobenen Daten der AS Asparagin und Arginin (**Abb. 4.14**) bzw. Tryptophan und Lysin (**Abb. 4.15**) gezeigt. Diese AS wurden ausgewählt, da sie am deutlichsten Unterschiede zwischen den Linien und/oder Anzuchtbedingungen zeigten.

Sowohl in den Wildtypen (*Col-0* bzw. *Ler*) als auch in der *gin2-1*-Einzelmutante führte die Zugabe von Glc, Suc oder Fru zum Medium zu einer Erhöhung des Asparagingehaltes. Fru zeigte dabei, gefolgt von Suc und Fru, den stärksten Effekt. Mit Ausnahme von *Col-0* bewirkte Suc den höchsten Anstieg des Gehaltes von Asparagin. In der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante und der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante dagegen nahm der Gehalt an Asparagin bei exogener Zugabe der jeweiligen Zucker ab (**Abb. 4.14 B–D**). Die Fütterung von Fru resultierte in der schwächsten Abnahme des Gehaltes von Asparagin. Suc und mehr noch Glc führten zu einer stärkeren Verringerung des Asparagingehaltes.

In allen getesteten Linien hatte die Zugabe von Zuckern zum Medium eine Verringerung des Arginingehaltes zur Folge (**Abb. 4.14 F–G**). Wie auch schon für Asparagin fiel in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante und der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante die Abnahme am stärksten aus. In Fall von Arginin zeigte exogen zugeführte Suc den stärksten Effekt auf den Arginingehalt in den Blattproben der Arabidopsis-Linien (**Abb. 4.14 F**), dann folgten Glc und Fru (**Abb. 4.14 G, H**).

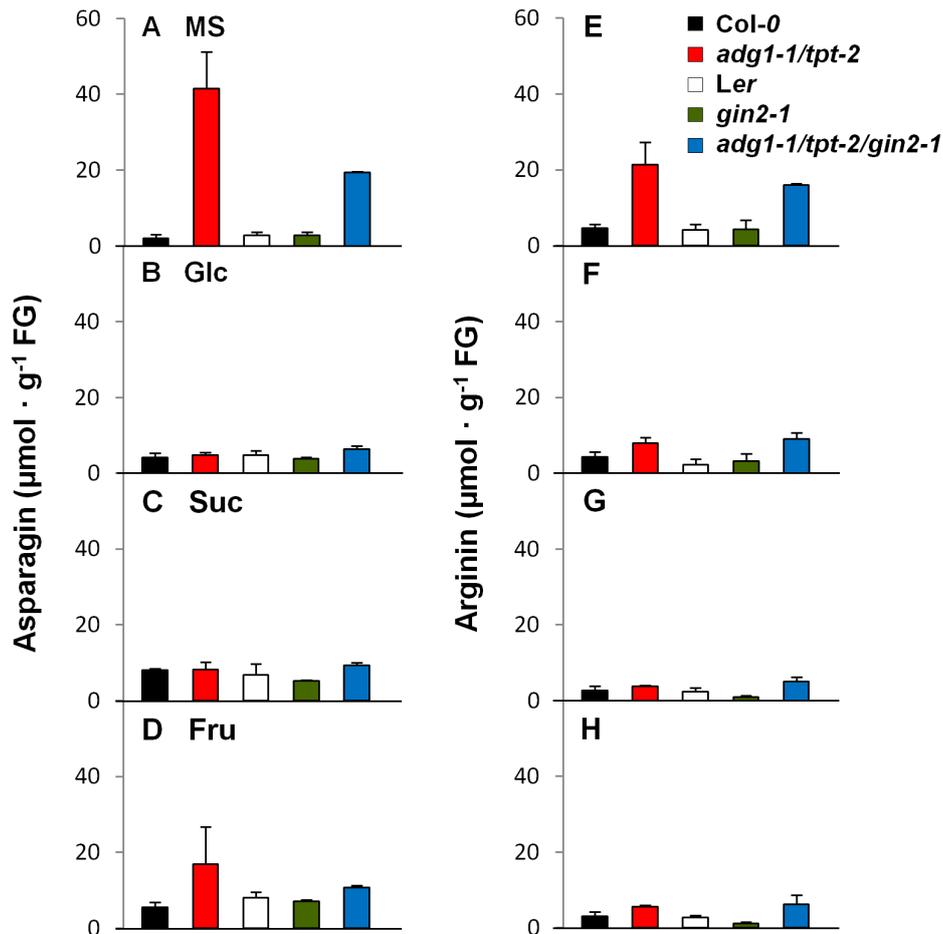


Abb. 4.14: **Quantitative Bestimmung von Asparagin (A–D) und Arginin (E–H) ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}$ )** in Col-0 (schwarz), *adg1-1/tpt-2* (rot), Ler (weiß), *gin2-1* (grün) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (blau). Die Pflanzen wurden für ca. 20 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Probenahme erfolgte 5 h nach Beginn der Tagperiode. Die Daten zeigen den MW  $\pm$  SF von 2 biologischen Replikaten pro Linie und Anzuchtbedingung.

Ähnlich der Aminosäure Arginin verhielten sich auch die Werte der Quantifizierung von Tryptophan (Abb. 4.15). Die Zugabe von Glc, Suc oder Fru zum Medium resultierte in einer enormen Abnahme der Tryptophangehalte in allen getesteten Linien (Abb. 4.15 B–D). Auch hier zeigten Glc und Suc im Vergleich zu Fru einen stärkeren Effekt. Wie bereits zuvor zu beobachten war, lagen in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante und der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante die Gehalte von Tryptophan in Abwesenheit von exogenen Zuckern am höchsten (Abb. 4.15 A).

Die Messungen des Lysingehaltes fielen im Vergleich zu den bereits diskutierten AS etwas anders aus. Exogen zugeführte Zucker haben keinen bzw. nur einen geringfügigen Einfluss auf den Gehalt von Lysin (Abb. 4.15 E–H). Allein die Lysinwerte der *gin2-1*-Einzelmutante lassen vermuten, dass sich die Zuckerfütterung negativ ausübt (Abb. 4.15 F–H).

Die übrigen vermessenen Aminosäuren zeigten korrespondierende Muster, wobei tendenziell eine zuckerabhängige Zunahme zu beobachten war (Tab. Anhang III).

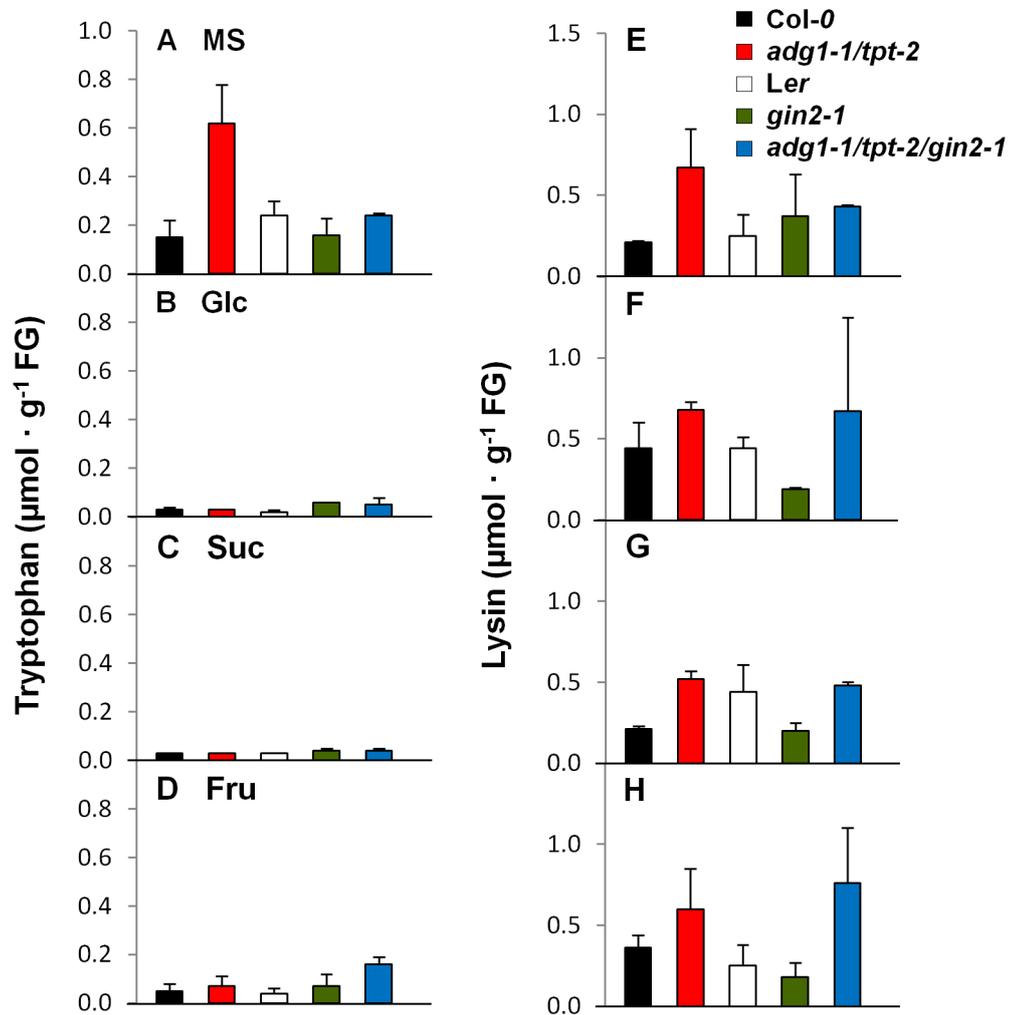


Abb. 4.15: **Quantitative Bestimmung von Tryptophan (A–D) und Lysin (E–H) ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FG}$ )** in *Col-0* (schwarz), *adg1-1/tpt-2* (rot), *Ler* (weiß), *gin2-1* (grün) und *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (blau). Die Pflanzen wurden für ca. 20 Tage unter Langtagbedingungen (16/8 h) bei einer PFD von  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) angezogen. Die Probennahme erfolgte 5 h nach Beginn der Tagperiode. Die Daten zeigen den MW  $\pm$  SF von 2 biologischen Replikaten pro Linie und Anzuchtbedingung.

#### 4.2.9 Einfluss exogen zugeführter Fructose auf die transkriptionelle Regulierung des HL-induzierten HCF-Phänotyps

Fru ist in der Lage, den HCF- jedoch nicht den Wachstumsphänotyp von *adg1-1/tpt-2* zu retten. Desweiteren führt das Wachstum auf Fru zu einer Wachstumsinhibierung in den Wildtypen (*Col-0* bzw. *Ler*) und der *gin2-1*-Einzelmutante.

Aufgrund dieser Unterschiede gegenüber Glc oder Suc wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Es sollte damit der Einfluss exogen zugeführter Fru auf die transkriptionellen Regulierung des HL-induzierten HCF-Phänotyps überprüft werden.

Unter den gegebenen Anzuchtbedingungen wurden im Wildtyp (*Col-0*) und der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante 645 Gene gemeinsam und 142 entgegengesetzt reguliert. Die Anzahl an Genen, die ausschließlich im Wildtyp reguliert wurden, lag bei 629. Es konnten außerdem 588 Gene identifiziert werden, deren Regulation nur in der Doppelmutante erfolgte.

Die Zuordnung in funktionelle Gruppen schafft dabei einen Überblick, welche Gengruppen durch die Anzucht im HL auf Fru im Wildtyp und/oder der Doppelmutante besonders stark reguliert wurden. Der prozentuale Anteil an den jeweiligen funktionalen Gruppen gemeinsam regulierter Gene ist in **Abb. 4.16** dargestellt. In die Gruppen *Transkription*, *Stress*, *Signal*, *Transport*, *Protein* und *Metabolismus* fielen insgesamt 43 % der regulierten Gene und bildeten damit die größte Gruppe. Die Gruppe *Transkription* (5 %) enthielt Gene, die vor allem an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Es konnte hier eine Reihe an Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. 10 % der Gene entfielen auf die Gruppe *Metabolismus*, die größtenteils Gene des Aminosäuren- bzw. des Lipidmetabolismus enthielt. Auf die Gruppen *Stress*, *Signal* und *Transport* entfielen jeweils 5–7 % der Gene, die u.a. abiotischen Stress, Lichtsignaltransduktion und den Transport von Zuckern regulierten. Die Gruppe *Proteine* mit Genen zur posttranslationalen Modifikation, Degradierung oder auch Faltung von Proteinen beinhaltete die übrigen 9 % der Gene dieser großen Gruppe.

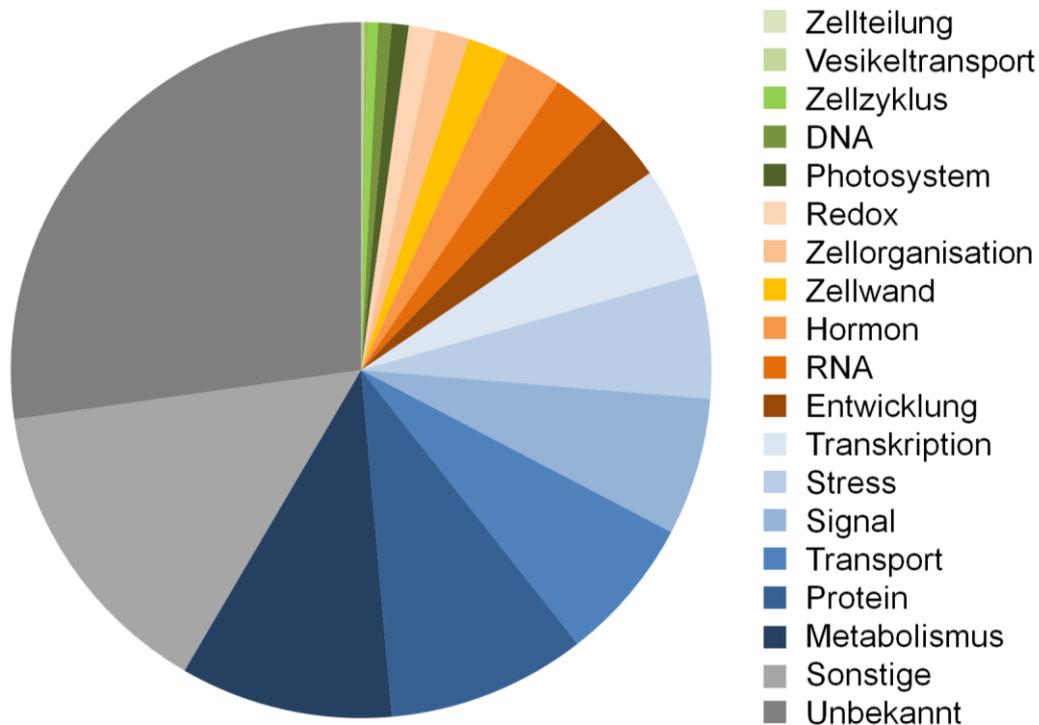


Abb. 4.16: **Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen gemeinsam regulierter Gene** in Col-0 und *adg1-1/tpt-2* nach Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit und ohne Zugabe von Fru zum Medium unter HL-Bedingungen (PFD:  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Von 142 entgegengesetzt regulierten Genen waren 112 in Col-0 hoch- und in *adg1-1/tpt-2* herunterreguliert. Die übrigen Gene wurden dementsprechend in der Doppelmutante hoch- und im Wildtyp herunterreguliert. Die Zuordnung der Gene in funktionale Gruppen (Abb. 4.17) zeigt, dass keine Regulation von Genen der Gruppen *Vesikeltransport*, *Zellzyklus*, *Photosystem*, *Redox* und *Zellorganisation* bestand. Wobei anzumerken ist, dass auch hier wieder ein Großteil der Gene (37 %) keiner bekannten Funktion zugewiesen werden konnte. In die Gruppen *Transkription* und *Stress* entfielen jeweils 9–10 % der Gene. Es konnten erneut mehrere Transkriptionsfaktoren sowie Gene, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind, identifiziert werden. In den meisten Fällen wurden diese Gene im Vergleich zum Wildtyp in der Doppelmutante herunterreguliert.

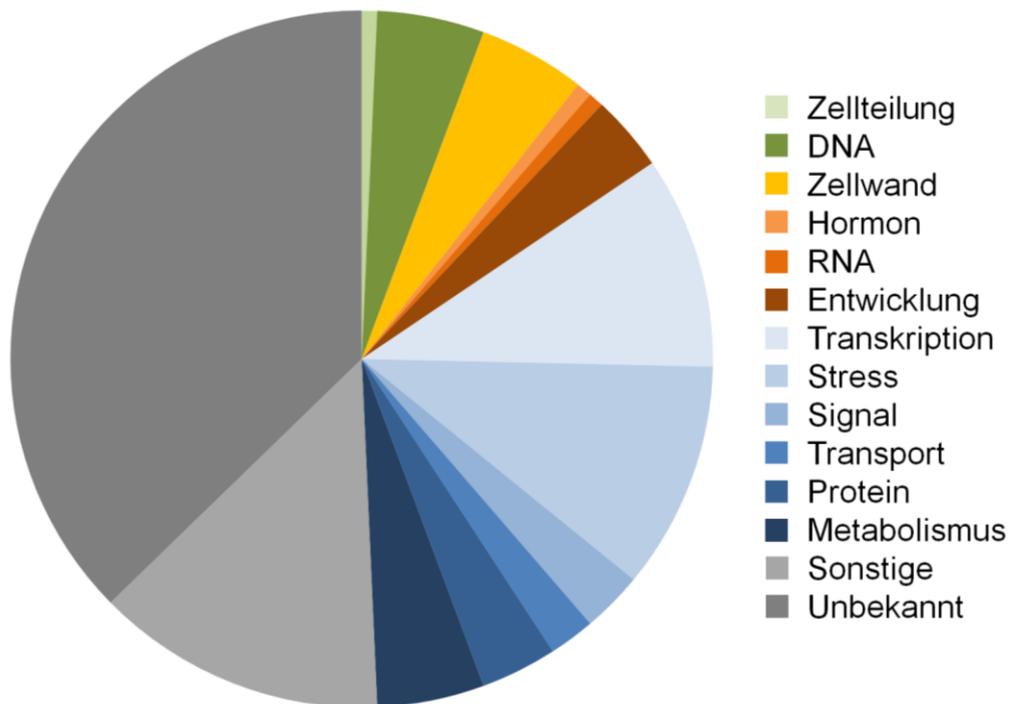


Abb. 4.17: **Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen entgegengesetzt regulierter Gene** in Col-0 und *adg1-1/tpt-2* nach Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit und ohne Zugabe von Fru zum Medium unter HL-Bedingungen (PFD:  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Gene, die ausschließlich im Wildtyp reguliert wurden und deren funktionale Zuordnung zeigt die Abb. 4.18. Für 42 % der 629 Gene war eine Zuordnung nicht möglich. Auf die Gruppen *Transkription*, *Protein* und *Metabolismus* entfielen jeweils 8–10 % der Gene. Die bestätigt die Anpassung von Transkription, Translation und Metabolismus als Folge der Anzucht auf Fru, da z.B. Gene für Transkriptionsregulation, posttranslationale Modifikationen, Proteinsynthese sowie -degradierung in diese Gruppe fielen. Eine erhöhte Regulation von Genen der funktionalen Gruppen *DNA* (4 %), *Hormon* (4 %), *Entwicklung* (3 %), *Stress* (4 %), *Signal* (5 %) und *Transport* (4 %) konnte ebenfalls beobachtet werden.

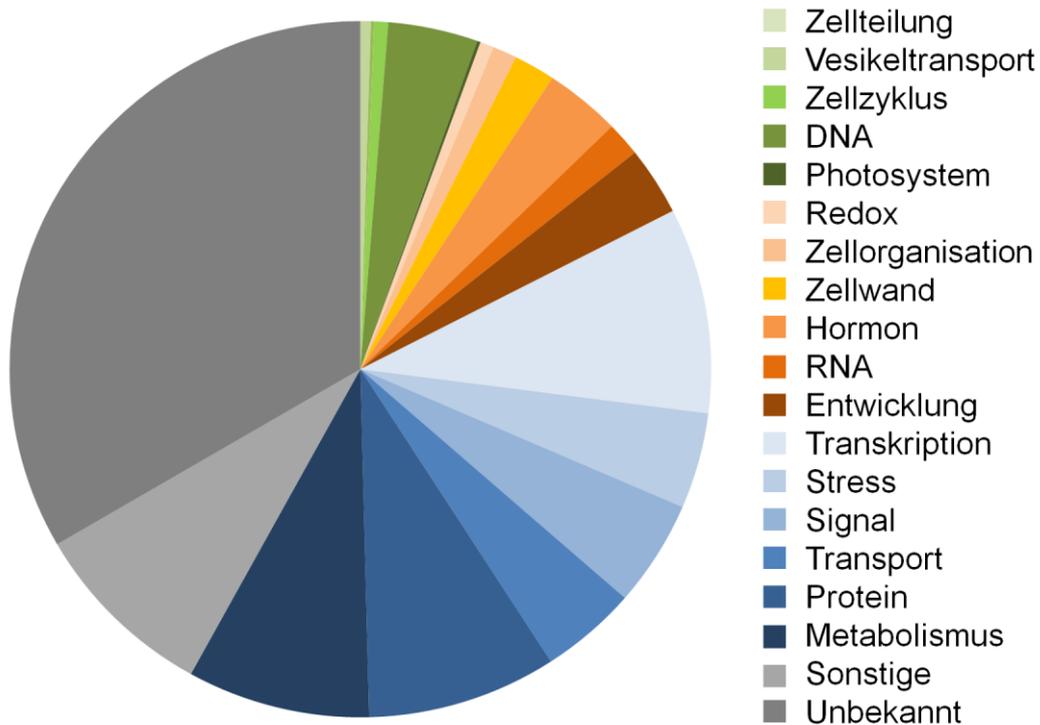


Abb. 4.18: **Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen ausschließlich in Col-0 regulierter Gene** nach Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit und ohne Zugabe von Fru zum Medium unter HL-Bedingungen (PFD:  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Um den Einfluss exogen zugeführter Fructose auf die transkriptionelle Regulierung des HL-induzierten HCF-Phänotyps verstehen zu können, sind die Gene von Bedeutung, die unter der gegebenen Anzuchtbedingung stark reguliert werden. In **Abb. 4.19** fand die Zuordnung von Genen in funktionelle Gruppen statt, deren Regulation nur in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante erfolgte. Von den 588 Genen konnten 24 % den beiden Gruppen *Transkription* und *Protein* zugewiesen werden. Keiner bekannten Funktion wurden 37 % der Gene zugeordnet. Auch Gene der Gruppen *DNA* (4 %), *Hormon* (6 %), *Stress* (6 %), *Signal* (4 %), *Transport* (5 %) und *Metabolismus* (4 %) unterstanden einer erhöhten Regulation.

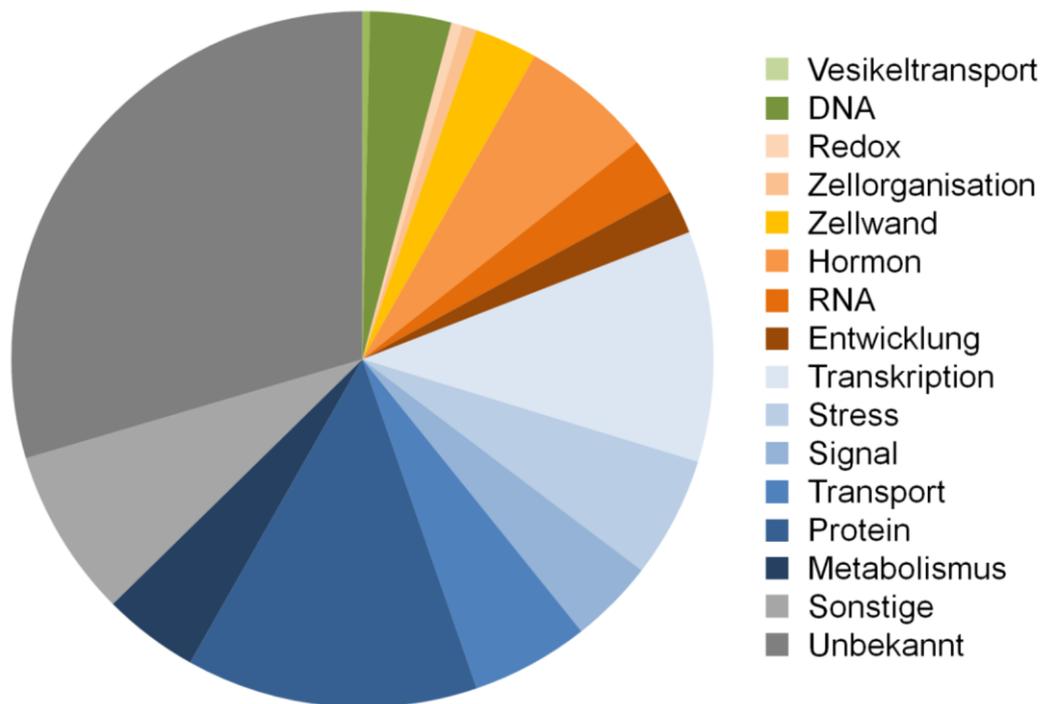


Abb. 4.19: **Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen ausschließlich in *adg1-1/tpt-2* regulierter Gene** nach Anzucht auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit und ohne Zugabe von Fru zum Medium unter HL-Bedingungen (PFD:  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

## 5 Diskussion

Der vollständiger Funktionsverlust des Triosephosphat/Phosphat Translokators (TPT; *tpt-2*) sowie ein Defekt der Stärkebiosynthese in Blättern (AGPase; *adg1-1*) kennzeichnen die *Arabidopsis thaliana* Doppelmutante *adg1-1/tpt-2*. Sowohl der Tag- als auch der Nachtexport von Photoassimilaten sind gestört. Trotzdem ist die resultierende Doppelmutante überlebensfähig. Sie zeigt aber retardiertes Wachstum sowie einen „Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz“-Phänotyp (HCF) (Schmitz *et al.*, 2012). Dem Wachstumsphänotyp liegt wahrscheinlich ein Kohlenhydratmangel zugrunde, da der Anteil löslicher Zucker in der Doppelmutante deutlich verringert ist. Diese Minimierung führt eventuell auch zur Veratmung von Aminosäuren oder Lipiden (Araújo *et al.*, 2011) anstelle von Zuckern. Häusler *et al.* (2009) konnten zeigen, dass eine erhöhte Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) Grund für die Ausprägung des HCF-Phänotyps ist. Dies ist hauptsächlich auf ungekoppelte LHCs der Photosysteme I bzw. II zurückzuführen (Schmitz *et al.*, 2012). Durch die Zugabe von Suc zum Medium konnten der Wachstums- und auch der HCF-Phänotyp gerettet werden. Inwieweit die Bereitstellung von Zellbausteinen und Energieträgern in Form von Zuckern an der Rettung des HCF-Phänotyps beteiligt ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Eventuell spielt bei der Akklimatisierung an unterschiedliche Lichtintensitäten der Kohlenhydratstatus in den Zellen eine signalgebende Rolle (Heinrichs *et al.*, 2012; Schmitz *et al.*, 2014). Daher wird nachfolgend diskutiert, ob eventuell die Verstoffwechslung von exogen zugeführten Zuckern innerhalb der Chloroplasten einen Erklärungsansatz für die Rettung der HL-Induzierten Phänotypen darstellt. In der vorliegenden Arbeit wird weiterhin erörtert, inwieweit die zuckervermittelte Akklimatisierung im Zusammenhang mit dem Konzept des *Retrograden Signals* gebracht werden kann. Außerdem wurden weitere Aspekte zur HL-Akklimatisierung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante mittels biochemischer Untersuchungen bestimmt.

### 5.1 Hochlichtakklimatisierung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante

#### 5.1.1 Einfluss des LL-HL-Transfers auf den Anthocyangehalt

Anthozyane werden als Antwort auf eine Vielzahl Stress auslösender Faktoren gebildet. Anthozyane akkumulieren z.B. in den Blättern, sobald *A. thaliana*-Pflanzen hohen Lichtintensitäten (HL-Stress) ausgesetzt werden (Zeng *et al.*, 2010; Page *et al.*, 2012). Im gleichen Maße wie Licht fördert aber auch Saccharose (Teng *et al.*, 2005) oder niedrige Temperaturen (Leyva *et al.*, 1995) die Synthese von Anthocyanen.

Wie erwartet, führte der Transfer vom Schwachlicht (LL,  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ins HL zu einem

Anstieg des Anthocyangehaltes im Wildtyp (*Col-0*), genauso wie in den Einzelmutanten (*tpt-2* und *adg1-1*), in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante jedoch erst nach 24 h (Abb. 4.1). Zieht man vergleichend die Daten der Metabolitanalyse hinzu (Tab. 4.2), scheint eine direkte Korrelation zwischen dem Anthocyangehalt und dem Gehalt an löslichen Zuckern (D-Glc, D-Suc und D-Fru) zu bestehen. Der Einfluss von Suc auf die Anthocyanbiosynthese wurde bereits im Zusammenhang mit den Transkriptionsfaktoren MYB75/ PAP1 (Teng *et al.*, 2005) und HY5 (Shin *et al.*, 2013) beschrieben. Aber auch die COP1/SPA Ubiquitinligase scheint an der Produktion von Anthocyanen beteiligt zu sein (Maier *et al.*, 2013).

### 5.1.2 Beeinflussung des Energiestatus durch LL-HL-Transferexperimente

Obwohl die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante durch einen geringeren Gehalt an löslichen Zuckern gekennzeichnet ist, muss der Energiestatus nicht zwangsläufig beeinträchtigt sein. Zur Überprüfung des Energiestatus wurden daher in einem LL-HL-Transferexperiment die Gehalte an ATP, ADP und AMP quantitativ bestimmt (Tab. 4.1). Die Gesamtgehalte lagen in der Doppelmutante über denen des Wildtyps bei Anzucht im LL, 0,5 h nach dem LL-HL-Transfer sowie nach einer um 12 Stunden verlängerten Nacht. Erstaunlicherweise hatte der Transfer ins HL keinen deutlichen Effekt auf den Energiestatus der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante. In *Col-0* bewirkte der LL-HL-Transfer jedoch einen starken Anstieg der Gesamtadenylatgehalte.

Durch die Verlängerung der Nacht sollte getestet werden, ob eine Energiedefizienz der Doppelmutante in der Nacht ggf. durch  $\beta$ -Oxidation kompensiert wird. Hinweise, dass durch  $\beta$ -Oxidation während der Nacht die Bereitstellung von Energie in der stärkefreien Mutante *adg1-1* gewährleistet wird, lieferten Kunz *et al.* (2009). In dieser Studie wurde der Effekt einer inhibierten  $\beta$ -Oxidation durch die Deletion eines putativen peroximalen Fettsäuretransporters (PXA1) analysiert. In der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante waren am Ende der Dunkelperiode bzw. nach einer verlängerten Nacht keine Unterschiede in den Gehalten von AMP, ADP und ATP zu beobachten. Entweder wird der Energiestatus trotz der Defekte im Tag- und Nachtexport von Photoassimilaten in der Doppelmutante nicht beeinflusst oder es findet eine Kompensation durch die  $\beta$ -Oxidation statt. Die Generierung einer Tripelmutante (*adg1-1/tpt-2/pxa1*) könnte darüber Aufschluss geben.

### 5.1.3 Die Rolle von ROS in LL-HL-Transferexperimenten

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und damit assoziierte Prozesse sind ebenfalls eine putative Klasse des *Retrograden Signals*. ROS bzw. ROS-assoziierte Prozesse fungieren zwar als Signale, wirken jedoch auch schädigend auf die Zelle. Eine Detoxifizierung von ROS erfolgt

daher z.B. über das Ascorbinsäure-Glutathion-System. Bei einer erhöhten ROS-Produktion nach dem Transfer der Pflanzen ins HL, müsste die Zelle diesen entgegenwirken und Mechanismen zur Detoxifizierung initiieren, was in einer vermehrten Synthese von Ascorbinsäure/Dehydroascorbinsäure (Asc/DHA) bzw. Glutathion/Glutathiondisulfid (GSH/GSSG) resultiert.

Die Daten bestätigen zwar eine Abhängigkeit des Asc- bzw. des GSH-Gehaltes von der Dauer der HL-Exposition der Pflanzen, es konnten jedoch, mit Ausnahme der *tpt-2*-Mutante zum Zeitpunkt  $t_{4h}$  und HL, keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp, den Einzelmutanten und der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante festgestellt werden (**Abb. 4.2**).

Der Transfer der *adg1-1/tpt-2*-Pflanzen vom LL ins HL resultierte wie auch im Wildtyp und in den Einzelmutanten in einer starken Photoinhibierung der ETR. Der Gehalt der an der Detoxifizierung beteiligten Redoxkomponenten blieb jedoch fast unverändert. Grund dafür ist vermutlich, dass die Photoinhibierung selbst die Produktion von ROS an der Thylakoidmembran beschränkt. Ob ROS an der HL-Akklimatisierung beteiligt sind, lässt sich für diesen Fall daher nicht entscheiden. Die Metaanalyse von eigenen Transkriptomdaten sowie öffentlich zugänglichen *Microarray*-Daten in **Schmitz et al. (2014)** deutet jedoch darauf hin, dass ROS an der Expressionsregulierung kerncodierter Gene als Antwort auf HL-Stress in *A. thaliana* eine Rolle spielen.

### 5.1.4 Transkriptionelle Regulation der HL-induzierten Phänotypen

Die Identifizierung von Promotormotiven differenziell regulierter Gene nach LL-HL-Transferexperimenten sollte es ermöglichen, die HL-induzierten Phänotypen auch auf transkriptioneller Ebene besser verstehen zu können. Mit *FIRE* konnten zwar einige Motive gefunden werden, die Wahl der Cluster und der *FIRE*-Parametrisierung erlaubte es jedoch nicht, dass Motive über alle Experimentansätze hinweg gefunden wurden. Für jedes Experiment wurden komplett andere Motive gefunden.

Bei einer Wiederholung der Auswertung kam eine leicht aktualisierte Version der Promotorsequenzen ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) zum Einsatz. Daher wurden nicht exakt die gleichen Sequenzdaten für die nochmalige *FIRE*-Analyse verwendet. Dies stellt eine mögliche Erklärung dar, weshalb die Reproduzierbarkeit der Daten nicht gegeben war. Diese kleineren Unterschiede sollten aber bei einer aussagekräftigen *FIRE*-Auswertung keine substanziell anderen Ergebnisse erzeugen.

Im Folgenden sollen einige Erklärungsansätze für die erfolglose Auswertung aufgeführt werden und Vorschläge für eine erneute Auswertung mittels *FIRE* gegeben werden. Richtiges

Clustering ist essenziell für eine *FIRE*-Auswertung. Um die Anzahl der *false positives* zu untersuchen, nutzten **Elemento et al.** (2007) zunächst zufällige Cluster. Auch für ein rein zufälliges Clustering wird *FIRE* unter gewissen Umständen Motive finden. Dafür muss jedoch die Robustheit gesenkt werden und auch dann werden nur wenige Motive gefunden, oft gar keine. Auch ist unter solchen Umständen zu erwarten, dass die gefundenen Motive von Clustering zu Clustering sehr unterschiedlich und anfällig gegenüber Änderungen der Startparameter sind. Diese Inkonsistenz der Ergebnisse ist identisch mit der, die für die Ergebnisse der durchgeführten *FIRE*-Analyse zu beobachten war. Dies ist ein Beleg dafür, dass das initiale Clustering falsch gewählt wurde. Die Verwertbarkeit der Ergebnisse der kontinuierlichen Auswertung ist ebenfalls fraglich. Auch hier wurden Motive sehr inkonsistent über die verschiedenen Ansätze hinweg identifiziert. Es sind zwar Unterschiede von relevanten Motiven in verschiedenen Linien zu erwarten. Allerdings sind die Ergebnisse auch über die verschiedenen Zeitpunkte innerhalb einer Linie ebenfalls inkonsistent. Größtenteils wurden nur sehr wenige, teilweise gar keine Motive gefunden. Bei anderen Auswertungen von *FIRE*, wie von **Elemento et al.** (2007) angeführt, sind bei der gleichen *FIRE*-Parametrisierung bei einer ähnlichen Auswertung 20–50 Motive zu erwarten. Da die durchgeführte Auswertung auch kaum kurze Motive hervorbrachte, kann das als ein starker Indikator für die Nichtverwertbarkeit des Ergebnisses betrachtet werden.

Ein Hauptproblem der Auswertung ist, dass wichtige Informationen, nämlich der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten, nicht in die *FIRE*-Auswertung eingeflossen sind. Jedes Experiment, sogar jeder Zeitpunkt, wurde individuell, entweder durch *k-means* oder automatisch durch *FIRE* in Cluster unterteilt. Es wurde also, anstatt eine „horizontale“ Auswertung über mehrere oder alle Experimente hinweg, eine „vertikale“ Auswertung von jedem Experiment für sich vorgenommen.

Für robustere, aussagekräftigere und reproduzierbarere Ergebnisse sollte eine erneute *FIRE*-Analyse durchgeführt werden. Eine sinnvolle Motivsuche wäre z.B. die Gene in lediglich zwei Cluster aufzuteilen. Auf der einen Seite jene, die in (Doppel-)Mutante und Wildtyp ähnlich reguliert werden und auf der anderen Seite jene, die stark unterschiedlich reguliert werden. Ein möglicher Ansatz wäre z.B., dass man jedem Gen die Differenz der logFCs zwischen der Expression in der Mutante und im Wildtyp zuordnet und anhand dieser durch einen Schwellenwert in zwei Cluster unterteilt. Aber auch mehrere Cluster sind denkbar. Es könnten gemeinsam stark hochregulierte Gene oder stark hochreguliert Gene des Wildtyps gegen stark herunter regulierte Gene der Mutanten untersucht werden. Eine solche Aufteilung der Gene, gemäß dem Vergleich verschiedener Expressionsdaten, sollte, insbesondere bei

hohem Robustheitswert, Motive ergeben, die tatsächlich aussagekräftig für die noch unbekanntenen Regulationsmechanismen des HCF-Phänotyps wären. Insbesondere sollte auch die Einbeziehungen der Expressionsdaten aller Experimente und ein Clustering im dadurch entstehenden hochdimensionalen Raum in Betracht gezogen werden.

## 5.2 Zuckerabhängige Rettung der HL-induzierten Phänotypen von *adg1-1/tpt-2*

Der unter HL-Bedingungen auftretende retardierte Wachstumsphänotyp bzw. HCF-Phänotyp sowie die verringerte ETR der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante konnten durch die Zugabe von Zuckern zum Medium gerettet werden. Es sollte nun geklärt werden, ob der Zuckersensor HXK1 an der kohlenhydratabhängigen Rettung beteiligt ist. Die *gin2-1*-Mutante, die einen Defekt in der HXK1 aufweist, wurde für diese Untersuchung ausgewählt und damit eine homozygote *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante erzeugt.

*Arabidopsis thaliana* Wildtypen (Col-0 bzw. Ler), Einzel- (*gin2-1*), Doppel- (*adg1-1/tpt-2*) und Tripelmutanten (*adg1-1/tpt-2/gpt2-1* und *adg1-1/tpt-2/gin2-1*) wurden auf ihre Größe, ihre photosynthetische Leistung, Kohlenhydratgehalte sowie auf das Expressionsverhalten zuckerabhängiger Gene vergleichend hin analysiert.

Die Ergebnisse lassen sie folgendermaßen zusammenfassen. (I) Eine Rettung der Wachstumsretardierung der Doppel- und Tripelmutanten war zwar durch Glc und Suc, jedoch nicht durch Fru möglich. Die An- oder Abwesenheit der HXK1 zeigte keinerlei Auswirkungen auf das Ausmaß der Blattrosettenfläche der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante, wenn die Anzucht auf Glc- bzw. Suc-haltigem Medium erfolgte (Abb. 4.7). Die Frage, warum die Zugabe von Fru zum Medium keinen positiven Effekt auf das Wachstum bewirkte, lässt sich nur spekulativ beantworten. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem hohen Gehalt an Fru in den Zellen durch die Fütterung und der inhibierenden Funktion der Fru selbst auf Invertasen (Produktinhibierung; Kingston-Smith *et al.*, 1999). (II) Sowohl Glc, Suc als auch Fru waren im Gegensatz dazu in der Lage den HCF-Phänotyp partiell zu retten. Wiederum konnte der HXK1 keine Beteiligung, in diesem Fall an der HCF-Rettung, zugeschrieben werden. Die *adg1-1/tpt-2/gin2-1*- wie auch die *adg1-1/tpt-2*-Mutante zeigten ähnliche Werte der ermittelten Photosyntheseparameter nach Zuckerfütterung (Abb. 4.8). (III) Die Anzucht auf den jeweiligen Zuckern führte in der *adg1-1/tpt-2* und in der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* zur Regenerierung der ETR fast auf Wildtypniveau. In der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Mutante dagegen fiel der regenerierende Effekt der Zucker auf die ETR schwächer aus (Abb. 4.10, Abb. 4.11). Hier zeigte sich der einzige Einfluss der HXK1 auf die gemessenen Parameter im Vergleich zur Doppelmutante. (IV) Der Gehalt an löslichen Zuckern (Glc, Suc und Fru) bzw. Stärke in

den untersuchten Arabidopsis-Linien wurde stark durch die im Medium vorhandenen Zucker beeinflusst. Die Erhöhung des Glc-Gehaltes in Blättern konnte in allen Linien am stärksten durch die Zugabe von Glc beobachtet werden. Die Fütterung von Suc wirkte sich vergleichsweise stärker auf den Gehalt von Glc und Fru, als auf Suc selbst, aus. Dies spricht für eine erhöhte Aktivität von Invertasen, die die Spaltung von Suc zur Folge hatten, noch bevor eine deutliche Suc-Akkumulation hätte detektierbar sein können. Den *Ler*-Ökotyp kennzeichnet eine geringere Aktivität der  $\beta$ -Amylase (Mita *et al.*, 1997), d.h. *Ler* ist gegenüber der zuckerinduzierten Expression der  $\beta$ -Amylase weniger empfindlich. Die Zugabe von Suc zum Medium führte in *gin2-1* und mehr noch in *Ler* zu einem dramatischen Anstieg des Stärkegehaltes, was auf die geringe  $\beta$ -Amylase-Aktivität in beiden Linien zurückzuführen ist. In den verschiedenen Pflanzenlinien resultierte die Anzucht auf Fru-haltigem Medium zu einer Erhöhung von Fru, gleichzeitig konnte aber eine Verminderungen der Glc- bzw. Suc-Level im Vergleich zur Anzucht auf zuckerfreiem Medium beobachtet werden. Die Daten sprechen für eine direkte Korrelation der Rettung des HCF-Phänotyps bzw. der ETR mit dem Gesamtkohlenhydratgehalt (Abb. 4.12). Die Rettung der HL-induzierten Phänotypen ist jedoch nicht auf die jeweils erhöhten Gehalte der getesteten löslichen Zucker zurückzuführen (Tab. 3.1). (V) Die Expressionsdaten lassen darauf schließen, dass die Ab- bzw. Anwesenheit der HXK1, wenn überhaupt, nur einen geringen Einfluss auf die Expressionsmuster zuckerregulierter Gene hat. Es können jedoch keine Vergleiche zu anderen *gin2-1*-Expressionsstudien gezogen werden, da in diesen Fällen oftmals mit entweder sehr hohen Glc-Konzentrationen gearbeitet worden ist oder Fütterungen nur transient stattfanden (Moore *et al.*, 2003). Die Anzucht der Pflanzen in der vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch kontinuierlich auf Zucker, was vermutlich bereits zu einer Adaptierung an die permanent verfügbaren Zucker zur Folge hatte. Darüber hinaus darf die bereits zuvor beschriebene Tatsache nicht ungeachtet bleiben, dass auch Unterschiede im Expressionsverhalten der verschiedenen Ökotypen (*Col-0* bzw. *Ler*) eine Rolle spielen. Als Beispiel kann die Induktion der *GPT2*-Expression durch alle drei Zucker in *Col-0* herangezogen werden, wohingegen in *Ler* kaum Änderungen der *GPT2*-Transkriptmenge detektierbar waren, da *GPT2* in *Ler* bereits deutlich höher exprimiert ist als in *Col-0* (Daten nicht gezeigt).

In weiten Teilen konnte der HXK1 keine Beteiligung an der Expressionsregulierung zuckerinduzierter Gene nachgewiesen werden. Es scheint jedoch, dass die Aufnahme exogen zugeführter Zucker die Expression der plastidären Isoform (pHXK) abhängig von der HXK1 beeinflusst. Eine zuckerabhängige Induktion der *pHXK*-Expression fiel in *adg1-1/tpt-2* am stärksten aus, fehlte jedoch gänzlich in *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (Abb. 4.13). Dies kann eventuell

auch als Indiz für die direkte Aufnahme von Zuckern in den Chloroplasten gewertet werden. Darüber hinaus konnten über die hier durchgeführte qRT-PCR nur Aussagen zu Relationen der Transkriptmengen zueinander getroffen werden. Mittels *Northern Blot*-Analysen könnten die absoluten Mengen bestimmt werden und damit die transkriptionelle Regulierung zuckerabhängiger Gene exakter bestimmt werden.

### 5.2.1 Zucker – Verschiedene Wege der Wahrnehmung und Signalweiterleitung

Die durchgeführten Experimente sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit der Glc-Sensor HXK1 Einfluss auf die zuckerabhängige Rettung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante ausübt. In den letzten 20 Jahren wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, in denen der HXK1 eine entscheidende Rolle in der Zuckerwahrnehmung bzw. der Weiterleitung zuckerinduzierter Signale zugesprochen wurde (**Jang und Sheen, 1994; Moore et al., 2003; Cho et al., 2006, 2007**). Aber auch eine Vielzahl HXK1-unabhängige Zuckersensoren und -signalwege wurden bereits beschrieben (**Price et al., 2004; Rolland et al., 2006**). Als Hauptregulator der Fru-Signaltransduktion konnte z.B. die FINS1/FBP-Mutante (*FRUCTOSE INSENSITIVE1*/Fructose-1,6-bisphosphatase; **Cho und Yoo, 2011**) identifiziert werden. Einige der in Pflanzen vorhandenen Fructokinasen können möglicherweise ebenfalls als Zuckersensoren fungieren (**Pego und Smeekens, 2000**). Erst in jüngster Vergangenheit konnte ein vakuolärer Fru-Transporter (SWEET17) identifiziert werden (**Chardon et al., 2013**). Die Mutation dieses Transporters führte zu einem geringen Fru-Gehalt im Cytosol und die entsprechenden Pflanzen sind in ihrer Entwicklung gehemmt. Kältestressexperimente belegten die Akkumulation erheblicher Mengen an Fru in der Vakuole.

Daher wäre es für zukünftige Arbeiten von Interesse, im Hintergrund der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante weitere Zuckersensoren bzw. Zuckersignalgeber herunterzuregulieren oder entsprechende Funktionsverlustmutanten mit der Doppelmutante zu kreuzen.

### 5.2.2 Import und Verstoffwechslung von Kohlenhydraten im plastidären Stroma

Auch ohne die Zugabe von Zucker zum Medium ist die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante sowohl wachstums- und entwicklungsfähig. Dies ist möglicherweise auf den alternativen Export von Triosephosphaten (TP) aus den Chloroplasten über den Xylulose-5-phosphat/Phosphate Translokator (XPT; **Eicks et al., 2002**) zurückzuführen. Der GPT2 ist zwar in der Lage neben Glc6P ebenfalls TP zu exportieren, wird aber in der Doppelmutante nicht induziert (**Abb. 4.13**). Es konnte gezeigt werden, dass die Zuckerzugabe zum Medium eine Erhöhung der Blattrosettenfläche der Doppel- und Tripelmutanten (**Abb. 4.7**) zur Folge hatte. Die Pflanzen konnten zum einen die Zucker als Kohlenstoffquelle nutzen und zum anderen Energie durch

deren Veratmung gewinnen. Dies genügt jedoch nicht, um die Blattfläche in dem zu beobachteten Maß zu erhöhen. Die Bereitstellung von Fettsäuren oder Aminosäuren muss ebenfalls gewährleistet sein. Eine Vielzahl anabolischer Stoffwechselwege sind dabei auf das Stroma begrenzt, wie z.B. die *de novo* Fettsäuresynthese (**Ohlrogge et al., 1979; Ohlrogge und Jaworski, 1997**), die Herstellung aromatischer Aminosäuren (**Herrmann, 1995; Schmid und Amrhein, 1995; Herrmann und Weaver, 1999**), aber auch die Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren (**Singh und Shaner, 1995**).

Chloroplasten müssten daher in der Lage sein, Kohlenhydrate zur energiegewinnenden Verstoffwechslung zu importieren. Der GPT2-Transporter schien dafür ein geeigneter Kandidat zu sein, insbesondere, da erhöhte Zuckerlevel im Medium die *GPT2*-Expression induzieren. Die aufgenommene Glc würde hierfür im Cytosol durch HXK zu Glc6P phosphoryliert und anschließend in den Chloroplasten importiert, um dort in energiereiche Verbindungen umgebaut zu werden. Die bereits erwähnte *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante widerspricht jedoch der genannten Vermutung. Durch den GPT2-Funktionsverlust ist weder die zuckerabhängige Rettung der HL-induzierten Phänotypen von *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* gestört oder vermindert.

Ein weiteres Stoffwechselintermediat, das den Plastiden als Kohlenstoffquelle dienen könnte, ist 3-Phosphoglycerinsäure, die bei der cytosolischen Glykolyse entsteht. Der Import kann sowohl über den TPT als auch den GPT2 erfolgen. Beide Transporter sind jedoch in der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1*-Tripelmutante nicht mehr funktionsfähig. Wie auch der TPT und der GPT2 ist der XPT in der Lage TP aus dem Chloroplasten zu transportieren. Im Gegensatz zum TPT und GPT ist 3-Phosphoglycerinsäure jedoch kein Substrat des XPT (**Eicks et al., 2002**). Daher fällt 3-Phosphoglycerinsäure als Kohlenstoffquelle trotz aktivem XPT in *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* weg.

Ein weiteres Molekül, das an der Rettung der HL-induzierten Phänotypen durch die Zugabe von Zucker zum Medium beteiligt sein könnte, ist Phosphoenolpyruvat (PEP). Das Endprodukt der Glykolyse im Cytosol kann über PEP/Phosphat Translokatoren (PPT; **Fischer et al., 1997**) in Chloroplasten transportiert, dort u.a. zu Pyruvat umgebaut, um anschließend z.B. als Substrat für die Fettsäuresynthese verwendet zu werden (**Schwender und Ohlrogge, 2002**).

Es wäre aber auch möglich, dass die löslichen Zucker direkt in das Chloroplastenstroma importiert werden. Die Identifizierung und Lokalisierung einer funktionierenden plastidären HXK (pHXK; **Claeyssen und Rivoal, 2007**) spricht für diese Hypothese. Damit die aufgenommenen Zucker als Ausgangsprodukte diversen Stoffwechselwege zugeführt werden

können, müssten die Zucker zunächst durch die pHXK phosphoryliert werden. Phosphorylierte Hexosen könnten dann in den Calvin-Zyklus oder in der plastidären Glykolyse verstoffwechselt werden. Bestätigt werden konnte diese Annahme durch Expressionsanalysen (Abb. 4.13). Eine Erhöhung der *pHXK*-Expression durch die Zugabe von Zucker zum Medium konnte in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante detektiert werden. In der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Mutante dagegen konnte keine erhöhte Transkriptionsmenge der *pHXK* festgestellt werden. Konkrete Vermutungen über die Hintergründe können z.Z. nicht formuliert werden. Durch die verminderte pHXK-Aktivität in *adg1-1/tpt-2/gin2-1* lassen sich jedoch die Beobachtungen bezüglich der ETR erklären. Eine geringere Aktivität der pHXK resultiert in einer Verringerung der zur Verfügung stehenden Menge an Glc6P. Dies hat eine Inhibierung der ETR zur Folge, da der Verbrauch von Energie und Reduktionsäquivalenten aus der photosynthetischen Lichtreaktion reduziert wird. Bestätigt werden kann diese Vermutung durch die mäßige Erhöhung der ETR in der *adg1-1/tpt-1/gin2-1* bei Wachstum auf Zucker (Abb. 4.10, Abb. 4.11). Auf Suc gewachsene *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Pflanzen zeigen eine weitaus höhere ETR gegenüber Pflanzen, die auf Glc oder Fru angezogen wurden. Denn die Spaltung von Suc durch Invertasen in Glc und Fru erhöht die Menge an zu verwendenden Zuckern auf das Doppelte. Invertasen sind aber nicht nur im Cytosol zu finden, es gibt auch Hinweise auf putative plastidäre Invertasen (pINV; Vargas *et al.*, 2008). Trotzdem wird die ETR in den Doppel- und Tripelmutanten durch die Bereitstellung von Kohlenstoffquellen aus dem Cytosol begrenzt (Abb. 4.10, Abb. 4.11).

Da sowohl Glc als auch Fru dazu fähig waren, den Photosynthesephänotyp der Doppelmutante zu retten, bedeutet das im Umkehrschluss, dass beide Zucker in der Lage sein sollten, über die Membran des Chloroplasten transportiert zu werden. Schäfer *et al.* beschrieben 1977 die Aufnahme löslicher Zucker wie z.B. Glc oder Fru in Spinatchloroplasten. Auch der C4-Zucker Arabinose konnte in isolierte Chloroplasten aufgenommen werden. Für die hier vorliegende Arbeit wurde der Gehalt an löslichen Zuckern jedoch in intakten Blättern bestimmt. Um präzise Aussagen darüber treffen zu können, in welchem Kompartiment der Zelle die Anreicherung der Zucker stattfindet, sollte für zukünftige Experimente die Methode der nichtwässrigen Fraktionierung (Gerhardt und Heldt, 1984) in Betracht gezogen werden. Dabei werden die einzelnen Zellkompartimente ihrer Dichte nach in einem Lösemittelgradienten aufgetrennt und können anschließend z.B. auf den Gehalt an löslichen Zuckern analysiert werden.

Die Identifizierung bzw. Charakterisierung eines plastidären Glc-Transporters erfolgte durch Weber *et al.* (2000). Dieser Transporter akzeptiert jedoch weder Fru als Substrat noch kann

dieser Fru transportieren. Zudem wurde bisher noch kein plastidärer Suc-Transporter gefunden. Der in der Vakuole lokalisierte SUC4 aus *A. thaliana* besitzt zwar eine plastidäre Präsequenz, fluoreszenzmikroskopische Analysen von Protoplasten bestätigten jedoch ungeachtet dessen nur eine Lokalisation im Tonoplast (**Schneider *et al.*, 2012**). Auch die Anzucht von *35S::SUC4::GFP*-Überexpressionslinien auf Glc, Suc oder Fru führte zu keiner SUC4-Lokalisation im Chloroplasten (Daten nicht gezeigt). Auch die Betrachtung von isolierten Chloroplasten aus *GFP*-Fusionslinien könnte die mögliche Lokalisation des SUC4 in der Chloroplastenmembran ggf. verifizieren. Denn dadurch wäre gewährleistet, dass die Fluoreszenz des Fusionsproteins aus dem Tonoplast die der Chloroplastenmembran nicht überstrahlt.

Das hypothetische Modell zur Rettung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante durch exogene Zuckerzugabe ist in der nachfolgenden Abbildung (**Abb. 5.1**) dargestellt. Es ist dabei zu beachten, dass die Aufnahme von Suc bzw. Fru (**Abb. 5.1 D**) rein spekulativ ist und einer experimentellen Überprüfung bedarf. Auch ist fraglich, ob die glykolytische Überführung von Glc6P am Tag überhaupt erfolgen kann oder ob hierzu eine Dunkelperiode erforderlich ist (**Häusler *et al.*, 2014**). Dauerlicht- bzw. Kurztagexperimente wären hilfreich, einer Klärung dieses Sachverhalts näher zu kommen.

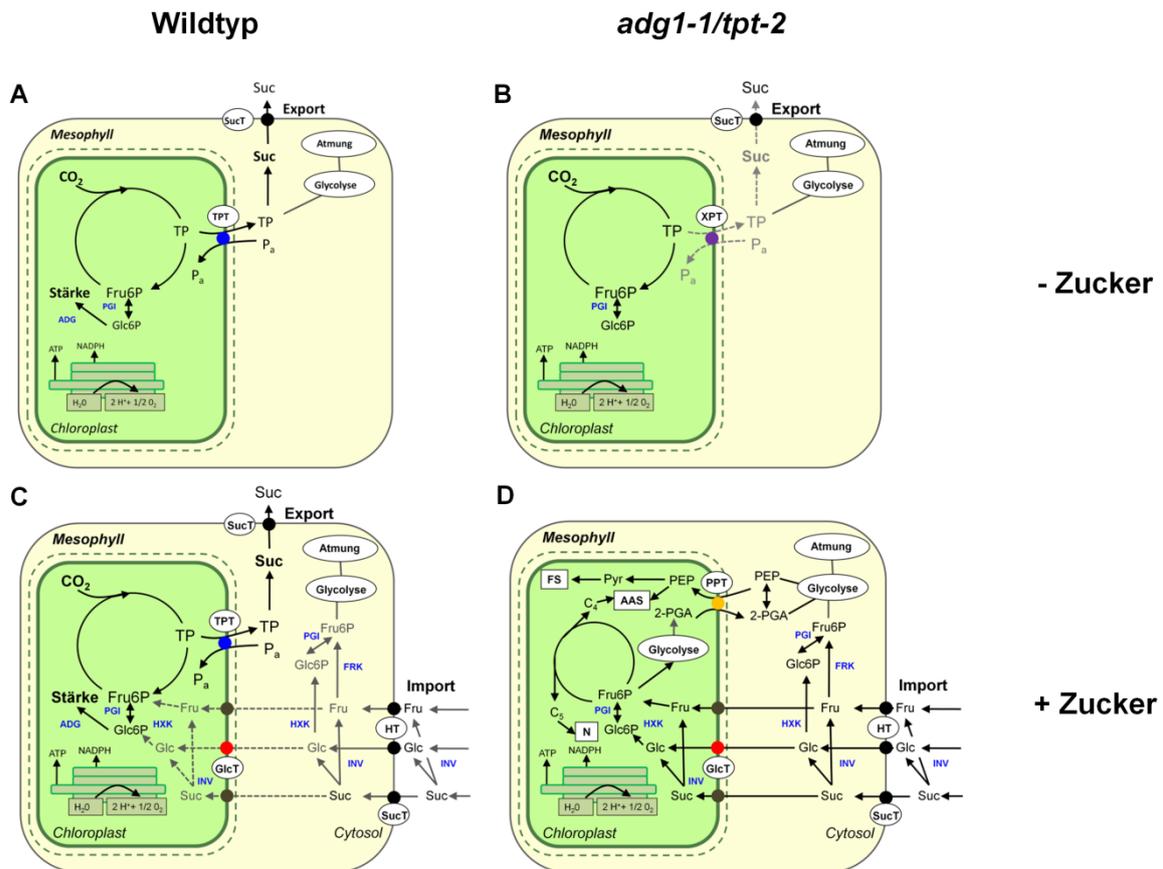


Abb. 5.1: **Modell des Kohlenstoffmetabolismus ohne und mit Zugabe von Zuckern zum Medium** in Col-0 (A, C) und *adg1-1/tpt-2* (B, D) während der Lichtperiode. Die zusätzlich verwendeten Abkürzungen sind wie folgt definiert: AAS (aromatische Aminosäuren), ADG (ADP-Glucosepyrophosphorylase), FS (Fettsäuren), FRK (Fructokinase), GlcT (Glucosetransporter), HT (Hexosetransporter), HKX (Hexokinase), INV (Invertase), N (Nucleotide), PGI (Phosphoglucoseisomerase), PPT (Phosphoenolpyruvat/Phosphat Translokator), SucT (Saccharosetransporter), TPT (Triosephosphat/Phosphat Translokator), XPT (Xylulose-5-phosphat/Phosphat Translokator).

### 5.2.3 Zuckervermittelte Akklimation vs. Zuckerübermittelndes Retrogrades Signal

Der theoretische Weg des *Retrograden Signals* beschreibt die Übertragung plastidengenerierter Signale über das Cytosol in den Zellkern. Dort bedingen diese Signale Änderungen des Expressionsverhaltens kerncodierter Gene, deren Translationsprodukte in den Chloroplasten benötigt werden.

Die Belichtung von im Schwachlicht (LL) angezogener Pflanzen mit hohen Lichtintensitäten (Hochlicht, HL) verursacht die Akkumulation von Kohlenhydraten im Mesophyll. Zwar wurden bis heute diverse Zuckersignalwege beschrieben, es existieren jedoch auch Daten, die Hinweise darauf geben, dass Chloroplasten die Fähigkeit zur Wahrnehmung des Kohlenhydratstatus im Cytosol besitzen. Die plastidäre Geneexpression kann bspw. durch

Chloramphenicol gezielt inhibiert werden. Die Anzucht auf Medium mit 7 % Glc führt z.B. in *A. thaliana*-Wildtyppflanzen zu einer verminderten Expression des kerncodierten *LHCB*-Gens. Bei gleichzeitiger Antibiotikabehandlung genügte bereits 3 % Glc. In pHXK-Mutanten dagegen war die reprimierende Wirkung von Glc und Chloramphenicol gehemmt (**Zhang et al., 2010**). Damit bestätigte sich die Funktion der pHXK als Hexosesensor im Chloroplastenstroma. Möglicherweise arbeitet die pHXK zusammen mit GUN1 und ABA INSENSITIVE 4 (ABI4), einem zuckerabhängigen Transkriptionsfaktor, und vereint so zuckervermittelte Signale bzw. Signale der plastidären Genexpression.

Bei vorausgegangenen *Western Blot*-Analysen stellte sich heraus, dass in HL-angezogenen *adg1-1/tpt-2*-Pflanzen plastomcodierte Kernkomponenten des Photosystems II, wie PsbB (CP47), PsbD (D2), PsbA (D1) und PsbC (CP43), kaum detektierbar waren. Die Menge an kerncodierten Proteinen, wie z.B. Lhcb4 oder PsbO, änderte sich jedoch kaum (**Schmitz et al., 2012**). Angenommen, der Export von Photoassimilaten in *adg1-1/tpt-2* wäre vollständig blockiert, würde die Photoinhibierung auf den verringerten Verbrauch von Reduktionsäquivalenten und Energie, in Form von NADPH bzw. ATP, durch den Calvinzyklus zurückzuführen sein. Die verminderte Menge an löslichen Zuckern in der Doppelmutante würde jedoch in einer gesteigerten Expression von sowohl kerncodierten Genen als auch von zuckergesteuerten Photosynthesegenen resultieren. In **Schmitz et al. (2012)** konnte bereits gezeigt werden, dass es durch die Anzucht auf Suc-haltigem Medium zu einer Rettung des HCF-Phänotyps kommt, sowie zu einem Wiederanstieg der Proteinmenge von z.B. D1 und D2. Die Daten der vorliegenden Arbeit suggerieren ebenfalls, dass die zuckerabhängige Rettung der Photosynthese in *adg1-1/tpt-2* durch die Aufnahme von löslichen Zuckern in den Chloroplasten zurückzuführen ist. Die dortige Verstoffwechslung der Zucker kann so der Hemmung der Photosynthese entgegenwirken. Unter der Voraussetzung, dass membranlokalisierte Transporter den Import von Zuckern in den Chloroplasten ermöglichen, ist zu vermuten, dass Chloroplasten möglicherweise in der Lage sind, den Kohlenhydratstatus im umgebenden Cytosol zu erfassen. Die Aufnahme von cytosolischen Zuckern in den Plastiden konnte immerhin indirekt durch den Anstieg der ETR in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante beobachtet werden (**Abb. 4.11, Abb. 4.12**).

Die *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante stellt daher ein Testsystem dar, mit dem der Einfluss exogen zugeführter Zucker auf den Metabolismus und das eventuelle Vermögen der Chloroplasten zur Wahrnehmung des Kohlenhydratstatus des umgebenden Mediums untersucht werden kann. Ausgehend davon, dass den Kompartimenten (z.B. Chloroplast, Zellkern) der Pflanzenzelle Zuckersensoren zur Verfügung stehen bzw. Zuckersignalwege evolviert und etabliert sind, die

die Expression von plastom- und/oder kerncodierten Photosynthesegenen steuern, sollte die Regulation von Plastom und Genom unabhängig erfolgen. Damit wäre gewährleistet, dass die Zelle situationsbedingt auf sich verändernde Kohlenhydratgehalte im Mesophyll spezifisch reagieren kann. Diese sog. autonome Regulation beider Genome würde auch bedeuten, dass die Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen von Chloroplasten synchronisierbar ist, auch wenn sich die Plastiden in verschiedenen physiologischen Stadien befinden.

### 5.2.4 Einfluss exogen zugeführter Zucker auf den Aminosäurenstoffwechsel

Die Grundbausteine der Proteine sind proteinogene Aminosäuren (AS). Pflanzen sind als einzige Lebewesen in der Lage alle zur Proteinsynthese benötigten Aminosäuren selbst zu synthetisieren. AS werden jedoch nicht nur zum Aufbau von Makromolekülen verwendet, auch ihr Abbau ist von Vorteil für die Zelle. Kommt es zu einem Kohlenhydratmangel können neben Lipiden auch AS zur Energiegewinnung bspw. über den Citratzyklus veratmet werden (**Pratelli und Pilot, 2014**). Da in der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante der Gehalt an löslichen Zuckern minimiert ist, wäre die Veratmung von AS eine alternative Form der Energiebereitstellung, die der Pflanze ein Überleben ermöglicht. Die quantitative Bestimmung der AS-Gehalte sollte Aufschluss darüber geben, ob eventuell AS eine Rolle bei der HL-Akklimatisierung spielen. Die Anzucht auf zuckerhaltigem Medium diene als Kontrolle, ob die externe Zufuhr von Kohlenhydraten eine ggf. erhöhte Synthese von AS zwecks Gewinnung von Energie aufhebt. Insgesamt erfolgte für 17 AS eine quantitative Bestimmung (**Tab. Anhang III**). Repräsentativ wurden die AS-Gehalte von Asparagin, Arginin, Tryptophan und Lysin gezeigt (**Abb. 4.14, Abb. 4.15**). Für die übrigen AS konnten gleiche Tendenzen bezüglich der entsprechenden Mengen innerhalb der Pflanze aufgrund der Anzuchtbedingungen festgestellt werden.

Bis auf wenige Ausnahmen (Histidin, Arginin und Tryptophan) hatte die Zugabe von Glc, Suc oder Fru in allen getesteten Linien eine Zunahme der AS-Gehalte zur Folge. Da dieser Anstieg sowohl in den Wildtypen als auch in den Mutanten zu beobachten war, kann man davon ausgehen, dass diese AS nicht an der HL-Akklimatisierung beteiligt sind. Die Anzucht auf zuckerhaltigem Medium führte bei den oben genannten AS dagegen zu einer Abnahme der jeweiligen Level. Es ist jedoch ebenso denkbar, dass Histidin, Arginin und Tryptophan hauptsächlich in Proteinen gebunden vorlagen und daher nicht als freie AS detektiert werden konnten.

Der Asparagingehalt stieg sowohl in *Col-0* als auch in *Ler* und *gin2-1*, wenn die Pflanzen auf Glc, Suc oder Fru angezogen wurden. Im Gegensatz dazu konnte in der *adg1-1/tpt-2*-

Doppelmutante und der *adg1-1/tpt-2/gin2-1*-Tripelmutante eine Abnahme des Gehaltes an Asparagin nachgewiesen werden. Dies widerspricht in Teilen den Daten von **Xiao *et al.*** (2000). Im Wildtyp und in HXK1-Mutanten hatte die Anzucht auf Zucker eine Reprimierung der Asparaginsynthetase1 (AS1) zur Folge. Die Regulation der AS1 ist daher HXK1-unabhängig. Angenommen, die Reprimierung der AS1 ist gleichzusetzen mit der Abnahme des Asparagingehaltes nach Zuckerzugabe zum Medium, zeigten nur die Doppel- und die Tripelmutante die zu erwartende Beobachtung.

Der Einfluss exogen zugeführter Zucker konnte aber auch bei den übrigen, nicht graphisch ausgewerteten AS beobachtet werden. Während der Photorespiration werden z.B. Glycin und Serin gebildet. Unter den gegebenen Anzuchtbedingungen stiegen die Gehalte beider AS in allen Linien. Glutaminsäure und Glutamin spielen bei der Assimilation bzw. Dissimilation von Ammonium über den GS/GOGAT-Zyklus eine bedeutende Rolle. Auch hier konnte eine zuckerabhängige Akkumulation festgestellt werden.

### 5.2.5 Die Rolle von Fru in der zuckerabhängigen HL-Akklimatisierung

Die exogene Zugabe von Fru zum Medium führte zwar zur Rettung des HCF- jedoch nicht zur Rettung des Wachstumsphänotyps der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante. Eine genomweite Expressionsanalyse sollte Hinweise über transkriptionelle Unterschiede unter den gegebenen Anzuchtbedingungen geben. Dafür wurden Wildtyp- und *adg1-1/tpt-2*-Pflanzen im HL auf Medium mit und ohne Fru-Zugabe angezogen. Von besonderem Interesse waren hierbei die Gene, die in *Col-0* und *adg1-1/tpt-2* entgegengesetzt bzw. diese, die ausschließlich in der Doppelmutante reguliert wurden (**Abb. 4.17**, **Abb. 4.19**). Die Zuordnung der Gene in funktionale Gruppen ergab, dass die Mehrheit der Gene in die Gruppen *Transkription* und *Protein* fielen. Die deregulierten Transkriptionsfaktoren könnten z.B. entscheidende Hinweise zur zuckerabhängigen HL-Akklimatisierung geben. Im nächsten Schritt sollten daher Co-Expressionsstudien zur Identifizierung möglicher Interaktionspartnern der Transkriptionsfaktoren durchgeführt werden.

Um sich ein genaueres Bild über die mögliche Anpassung der Chloroplasten an die Anzuchtbedingungen machen zu können, könnten subzelluläre Lokalisationsstudien darüber Aufschluss geben, inwieweit die Expression kerncodierter Gene, deren Produkte dann aber in den Chloroplasten lokalisiert sind, unter den gegebenen Bedingungen beeinflusst wird.

Es ist außerdem denkbar, dass die Suche nach Promotormotiven in den differenziell regulierten Genen Hinweise zur transkriptionellen Regulierung der zuckerabhängigen HL-Akklimatisierung liefert.

## 6 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnten neue Aspekte zur Akklimatisierung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante an sich verändernde Umweltbedingungen gewonnen werden. Es sollten jedoch weitere Analysemethoden angewendet werden, um die neu erhobenen Daten verifizieren oder ggf. falsifizieren zu können.

Der zusätzliche Funktionsverlust des GPT2 hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante. Der Transport von Photoassimilaten über den XPT ist daher wahrscheinlich. Die Generierung von *adg1-1/tpt-2/xpt-1*- bzw. *adg1-1/tpt-2/gpt2-1/xpt-1*-Mutanten stellt daher eine Möglichkeit zur Überprüfung dar, auf welchem Wege Photoassimilate aus den Chloroplasten transportiert werden. Es wurden bereits konstitutiv aktive bzw. induzierbar amiRNA-Konstrukte für das XPT-Gen hergestellt und Pflanzen damit transformiert. Bisher konnten allerdings noch keine Mutanten isoliert werden, die das jeweilige Konstrukt tragen.

Eine Beteiligung der HXK1 an der zuckerabhängigen Rettung der HL-induzierten Phänotypen der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante konnte in weiten Teilen nicht bestätigt werden. Da der Kohlenhydratstatus in den Zellen jedoch anscheinend eine Rolle in der Akklimatisierung spielt, sollten im Hintergrund der *adg1-1/tpt-2*-Doppelmutante weitere zuckerverbrauchende Enzyme, z.B. die pHXK oder die putative pINV (Vargas *et al.*, 2008) herunterreguliert werde. Auch die Kreuzung mit entsprechenden Funktionsverlustmutanten ist denkbar. Es konnte z.B. bereits eine weitere Tripelmutante generiert werden (*adg1-1/tpt-2/ginWisc*), in der der HXK1-Funktionsverlust, hier hervorgerufen durch eine T-DNA-Insertion, im Col-0-Hintergrund zu finden ist. Damit können in weiteren Experimenten ökotypspezifische Unterschiede vollständig ausgeschlossen werden.

Es konnte auch noch nicht geklärt werden, ob die Aufnahme der exogen zugeführten Zucker ausschließlich ins Cytosol erfolgt oder ob diese weiter in die Chloroplasten oder andere Zellkompartimente transportiert werden, um dann dort die Akklimatisierungsantwort auszulösen. Dafür wurden bereits Mutanten zusätzlich mit amiRNA-Konstrukten gegen den plastidären Glc-Transporter (pGlcT) und den vakuolären Suc-Transporten (SUC4) transformiert. Eine nichtwässrige Fraktionierung mit anschließender HPLC-Analyse könnte Aufschluss darüber geben, in welchen Kompartimenten die zugeführten Zucker aufgenommen werden.

Sollten die Zucker tatsächlich in die Chloroplasten gelangen, könnten diese dort sofort verstoffwechselt werden. Daher gilt es zu überprüfen, wie sich die CO<sub>2</sub>-Aufnahme in Pflanzen verhält, die keine Kohlenstoffquelle in Form von Zuckern erhalten und solchen, die

auf Zuckern angezogen werden.

Im gleichen Zuge könnte auch z.B. mittels  $^{13}\text{C}$ -Markierung überprüft werden, in welche Verbindungen der aufgenommene Kohlenstoff aus dem  $\text{CO}_2$  eventuell vermehrt unter HL-Bedingungen eingebaut wird. Damit könnten Rückschlüsse auf Stoffwechselwege gezogen werden, die der Pflanze das Überleben sichern.

Es wäre ebenso von Interesse, in welchem Zeitfenster Zucker eine Akklimatisierungsantwort auslösen. Transiente Fütterungen müssten dafür durchgeführt werden.

Die Daten zur genomweiten Expressionsanalyse über die Rolle von Fru in der HL-Akklimatisierung bedürfen weiterer Auswertungen, um den Einfluss exogen zugeführter Fru auf die transkriptionellen Regulierung des HL-induzierten HCF-Phänotyps genauer bestimmen zu können.



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	micro
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGI Code	Arabidopsis Genome Initiative Code
AGPase	ADP-Glucosepyrophosphorylase, kleine Untereinheit
AMP	Adenosinmonophosphat
APX	Ascorbinsäureperoxidase
Asc	Ascorbinsäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre (engl. <i>complementary</i> ) DNA
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Col-0	Columbia-0
C <sub>t</sub>	engl. <i>threshold cycle</i>
cv.	Kulturvarietät (lat. <i>cultivarietas</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

---

DHA	Dehydroascorbinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
<i>et al.</i>	und Andere (lat. <i>et alii</i> )
ETK	Elektronentransportkette
ETR	Elektronentransportrate
$F_0$	Grundfluoreszenz
FG	Frischgewicht
$F_m$	Maximalfluoreszenz
Fru	Fructose
Fru6P	Fructose-6-phosphat
$F_v$	variable Fluoreszenz
$F_v/F_m$	maximale Quanteneffizienz
$g$	Erdbeschleunigung
$g$	Gen (engl. <i>gene</i> )
$g$	Gramm
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GC-ToF-MS	Gaschromatographie mit Flugzeitmassenspektrometrie-Kopplung (engl. <i>gas chromatography–time of flight–mass spectrometry</i> )
Glc6P	Glucose-6-phosphat
ggf.	gegebenenfalls
<i>gin</i>	engl. <i>glucose insensitive</i>
Glc	Glucose
GPT2	Glucose-6-phosphat/Phosphat Translokator2
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
<i>gun</i>	engl. <i>genome uncoupled</i>
h	Stunde(n) (lat. <i>hora</i> )
VIII	

---

H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCF	Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz
HCl	Wasserstoffchlorid (allg. Salzsäure bzw. Chlorwasserstoff)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Heynh.	Gustav Heynhold
HL	Hochlicht (engl. <i>high light</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HXK1	Hexokinase 1
Hz	Hertz
i.d.R.	in der Regel
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KZA	Kurzeitantwort
lat.	Latein
l	Liter
L.	Carl von Linné
<i>Ler</i>	<i>Landsberg erecta</i>
LHC	Lichtsammelkomplex (engl. <i>light harvesting complex</i> )
LHCB1	Lichtsammelkomplex B1 (engl. <i>light harvesting complex protein B1</i> )
LL	Schwachlicht (engl. <i>low light</i> )
logFC	engl. <i>log<sub>2</sub>-fold change</i>
LZA	Langzeitantwort
m	Meter
m	milli
M	mol/Liter
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MEX1	Maltoseexporter 1
min	Minute(n)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

## Abkürzungsverzeichnis

---

mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
MS	Murashige und Skoog(-Medium)
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MW	Mittelwert
n	nano
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NR1	Nitratreduktase1
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidin
P <sub>a</sub>	anorganisches Phosphat
PAM	Pulsamplitudenmodulationsfluorometrie
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PFD	Photonenflussdichte
PGE	Plastidäre Genexpression
PGI	Phosphoglucoseisomerase
pGlcT	plastidärer Glucosetransporter
pH	dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität (lat. <i>potentia Hydrogenii</i> )
PhANGs	engl. <i>photosynthesis-associated nuclear genes</i>
pHXK	plastidäre Hexokinase
PS	Photosystem
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl. <i>quantitative Real Time-PCR</i> )
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
X	

---

s	Sekunde(n)
s.	siehe
SBP	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SF	Standardfehler
sog.	sogenannt(e)
Suc	Saccharose (engl. <i>sucrose</i> )
SWEET	engl. <i>sugars will eventually be exported transporters</i>
T	Tochtergeneration
$t_0$	Zeitpunkt 0 (entspricht LL)
$t_{4h}$	Zeitpunkt 4h (entspricht 4 h im HL)
$t_{48h}$	Zeitpunkt 48h (entspricht 48 h im HL)
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBAS	Tetrabutylammoniumbisulfat
T-DNA	Transfer-DNA
TP	Trisosephosphat
TPP	Trehalosephosphatphosphatase
TPS	Trehalosephosphatsynthase
TPT	Triosephosphat/Phosphat Translokator
Tre6P	Trehalose-6-phosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (engl. <i>unit</i> )
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
XPT	Xylulose-5-phosphat/Phosphat Translokator
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Z.	zur Zeit

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Wachstumsphänotyp in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten .....	10
Abb. 4.1: Bestimmung der Anthocyangehalte .....	39
Abb. 4.2: Quantitative Bestimmung von Ascorbinsäure und Glutathion .....	42
Abb. 4.3: Einfluss von 5–7 % Glucose (Glc) auf Keimung und Wachstum.....	49
Abb. 4.4: Wachstumsphänotypen unter Hochlichtbedingungen .....	50
Abb. 4.5: Semiquantitative RT-PCR zur Verifizierung von <i>adg1-1/tpt-2/gin2-1</i> .....	51
Abb. 4.6: Qualitativer Stärkenachweis zur Bestätigung von <i>adg1-1/tpt-2/gin2-1</i> .....	52
Abb. 4.7: Einfluss exogener Zugabe von Zuckern auf die Blattrosettenfläche (cm <sup>2</sup> ).....	54
Abb. 4.8: Abhängigkeit von Photosyntheseparametern (F <sub>m</sub> , F <sub>o</sub> und F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> ) nach exogener Zugabe von Zuckern .....	55
Abb. 4.9: Einfluss von 50 mM Sorbitol auf F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> -Verhältnisse.....	56
Abb. 4.10: Einfluss des Wachstums auf zuckerhaltigem Medium auf die Induktionskinetiken der ETR .....	58
Abb. 4.11: Lichtabhängigkeit der ETR nach exogener Zugabe von Zuckern.....	60
Abb. 4.12: Streudiagramme der ETR in Abhängigkeit von Zuckergehalten .....	64
Abb. 4.13: qRT-PCR-Analyse zuckerabhängiger Gene ( <i>GPT2</i> , <i>LHCBI</i> , <i>SBP</i> , <i>NR1</i> und <i>pHXK</i> ) .....	67
Abb. 4.14: Quantitative Bestimmung von Asparagin (A–D) und Arginin (E–H) (μmol · g <sup>-1</sup> FG).....	69
Abb. 4.15: Quantitative Bestimmung von Tryptophan (A–D) und Lysin (E–H) (μmol · g <sup>-1</sup> FG).....	70
Abb. 4.16: Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen gemeinsam regulierter Gene .....	72
Abb. 4.17: Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen entgegengesetzt regulierter Gene.....	73
Abb. 4.18: Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen ausschließlich in <i>Col-0</i> regulierter Gene.....	74
Abb. 4.19: Prozentuale Anteile der funktionellen Gruppen ausschließlich in <i>adg1-1/tpt-2</i> regulierter Gene.....	75
Abb. 5.1: Modell des Kohlenstoffmetabolismus ohne und mit Zugabe von Zuckern zum Medium .....	86

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 3.1: Bezeichnung, AGI Code und Sequenz verwendeter Primer .....	15
Tab. 3.2: Enzyme und Größenstandards .....	16
Tab. 3.3: Verwendete Geräte.....	16
Tab. 3.4: Pflanzenlinien .....	18
Tab. 3.5: Nährmedium für <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
Tab. 3.6: Standard-PCR-Programm .....	23
Tab. 3.7: PCR-Programm zur Sequenzierung.....	28
Tab. 4.1: Quantitative Bestimmung von Adenylaten (ATP, ADP und AMP) und Berechnung der Energieladung (EL).....	40
Tab. 4.2: Quantitative Bestimmung ausgewählter Metabolite.....	45
Tab. 4.3: Gehalt an löslichen Zuckern und Stärke in Blättern .....	62
Tab. Anhang I: PCR-Programme zur Amplifizierung spezifischer Fragmente .....	XXX
Tab. Anhang II: Quantitative Bestimmung ausgewählter Metabolite.....	XXXI
Tab. Anhang III: Quantitative Bestimmung ausgewählter Aminosäuren .....	XXXVII

## Literaturverzeichnis

- Ahlert, D., Ruf, S. und Bock, R.**, 2003. Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), pp.15730–15735.
- Apel, K. und Hirt, H.**, 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, pp.373–399.
- Araújo, W.L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C.J. und Fernie, A.R.**, 2011. Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science*, 16(9), pp.489–498.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. und Leon, P.**, 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development*, 14(16), pp.2085–2096.
- Aro, E.-M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N. und Rintamäki E.**, 2005. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), pp.347–356.
- Baier, M., Noctor, G., Foyer, C.H. und Dietz, K.-J.**, 2000. Antisense Suppression of 2-Cysteine Peroxiredoxin in *Arabidopsis* Specifically Enhances the Activities and Expression of Enzymes Associated with Ascorbate Metabolism but not Glutathione Metabolism. *Plant Physiology*, 124(2), pp.823–832.
- Baier, M., Ströher, E. und Dietz, K.-J.**, 2004. The Acceptor Availability at Photosystem I and ABA Control Nuclear Expression of 2-Cys Peroxiredoxin-A in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 45(8), pp.997–1006.
- Baier, M. und Dietz, K.-J.**, 2005. Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), pp.1449–1462.
- Balazadeh, S., Jaspert, N., Arif, M., Mueller-Roeber, B. und Maurino, V.G.**, 2012. Expression of ROS-responsive genes and transcription factors after metabolic formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in chloroplasts. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 234, pp.1–30.
- Bauer, J., Hiltbrunner, A. und Kessler, F.**, 2001. Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cellular and Molecular Life Science*, 58, pp.420–433.
- Baxter, A., Mittler, R. und Suzuki, N.**, 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), pp.1229–1240.
- Beck, C.F.**, 2005. Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta*, 222(5), pp.743–756.

- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G. und Rochaix, J.-D.**, 2005. State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433(7028), pp.892–895.
- Benstein, R.M., Ludewig, K., Wulfert, S., Wittek, S., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., Gierth, M., Flügge, U.-I. und Krueger, S.**, 2013. *Arabidopsis* Phosphoglycerate Dehydrogenase1 of the Phosphoserine Pathway Is Essential for Development and Required for Ammonium Assimilation and Tryptophan Biosynthesis. *The Plant Cell*, 25(12), pp.5011–5029.
- Bläsing, O.E., Gibon, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W.-R. und Stitt, M.**, 2005. Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(12), pp.3257–3281.
- Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P. und Leister, D.**, 2005. Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature*, 437, pp.1179–1182.
- Bonen, L. und Doolittle, W.F.**, 1975. On the Prokaryotic Nature of Red Algal Chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6), pp.2310–2314.
- Bräutigam, K., Dietzel, L., Kleine, T., Ströher, E., Wormuth, D., Dietz, K.-J., Radke, D., Wirtz, M., Hell, R., Dörmann, P., Nunes-Nesi, A., Schauer, N., Fernie, A.R., Oliver, S.N., Geigenberger, P., Leister, D. und Pfannschmidt, T.**, 2009. Dynamic Plastid Redox Signals Integrate Gene Expression and Metabolism to Induce Distinct Metabolic States in Photosynthetic Acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(9), pp.2715–2732.
- Caldana, C., Fernie, A.R., Willmitzer, L. und Steinhauser, D.**, 2012. Unraveling retrograde signaling pathways: finding candidate signaling molecules via metabolomics and systems biology driven approaches. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 267, pp.1–6.
- Chamovitz, D., Pecker, I. und Hirschberg, J.**, 1991. The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Molecular Biology*, 16(6), pp.967–974.
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P.A.W., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., Sophie Leran, S., Ferrand, M., Lacombe, B., Loudet, O., Dinant, S., Bellini, C., Neuhaus, H.E., Daniel-Vedele, F. und Krapp, A.**, 2013. Leaf Fructose Content Is Controlled by the Vacuolar Transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 23(8), pp.697–702.
- Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T. und Sheen, J.**, 2002. A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in *Arabidopsis* Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. *The Plant Cell*, 14(11), pp.2723–2743.
- Chi, W., Sun, X. und Zhang, L.**, 2013. Intracellular signaling from plastid to nucleus. *Annual Review of Plant Biology*, 64, pp.559–582.

- Cho, Y.-H., Yoo, S.-D. und Sheen, J.**, 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127(3), pp.579–589.
- Cho, Y., Yoo, S.-D. und Sheen, J.**, 2007. Glucose Signaling Through Nuclear Hexokinase1 Complex in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 2, pp.123–124.
- Cho, Y.-H. und Yoo, S.-D.**, 2011. Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in Arabidopsis thaliana. *PLoS genetics*, 7(1), p.e1001263.
- Claeyssen, E. und Rivoal, J.**, 2007. Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. *Phytochemistry*, 68(6), pp.709–731.
- Cottage, A.J., Mott, E.K., Wang, J.-H., Sullivan, J.A., MacLean, D., Tran, L., Choy, M.-K., Newell, C., Kavanagh, T.A., Aspinall, S. und Gray, J.C.**, 2008. GUN1 (GENOMES UNCOUPLED1) Encodes a Pentatricopeptide Repeat (PPR) Protein Involved in Plastid Protein Synthesis-Responsive Retrograde Signaling to the Nucleus. *Photosynthesis. Energy from the Sun*, pp. 1201–1205.
- Czarnecki, O., Gläßer, C., Chen, J.-G., Mayer, K.F.X. und Grimm, B.**, 2012. Evidence for a contribution of ALA synthesis to plastid-to-nucleus signaling. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 236, pp.1–19.
- D’Autréaux, B. und Toledano, M.B.**, 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 8(10), pp.813–824.
- Dekkers, B.J.W., Schuurmans, J.A.M.J. und Smeekens, S.C.M.**, 2008. Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 67, pp.151–167.
- Dietz, K.-J.**, 2014. Redox Regulation of Transcription Factors in Plant Stress Acclimation and Development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9), pp.1356–1372.
- Donahue, J.L., Alford, S.R., Torabinejad, J., Kerwin, R.E., Nourbakhsh, A., Ray, W.K., Hernick, M., Huang, X., Lyons, B.M., Hein, P.P. und Gillaspay, G.E.**, 2010. The *Arabidopsis thaliana* Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase1 Gene Is Required for Myo-inositol Synthesis and Suppression of Cell Death. *The Plant Cell*, 22(3), pp.888–903.
- Eberhard, S., Finazzi, G. und Wollman, F.-A.**, 2008. The Dynamics of Photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42, pp.463–515.
- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flügge, U.-I. und Fischer, K.**, 2002. The Plastidic Pentose Phosphate Translocator Represents a Link between the Cytosolic and the Plastidic Pentose Phosphate Pathways in Plants. *Plant Physiology*, 128(2), pp.512–522.
- Elemento, O., Slonim, N. und Tavazoie, S.**, 2007. A universal framework for regulatory element discovery across all genomes and data-types. *Molecular Cell*, 28(2), pp.337–350.
- Everitt, B.S. und Hothorn, T.**, 2010. *A Handbook of Statistical Analyses Using R*

- Fankhauser, C. und Chory, J.**, 1997. LIGHT CONTROL OF PLANT DEVELOPMENT. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, pp.203–229.
- Fettke, J., Eckermann, N., Kötting, O., Ritte, G. und Steup, M.**, 2007. NOVEL STARCH-RELATED ENZYMES AND CARBOHYDRATES. *Cellular and Molecular Biology*, 52, pp.883–904.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R.E. und Flügge, U.-I.**, 1997. A New Class of Plastidic Phosphate Translocators: A Putative Link Between Primary and Secondary Metabolism by the Phosphoenolpyruvate/Phosphate Antiporter. *The Plant Cell*, 9, pp.453–462.
- Fliege, R., Flügge, U.-I., Werdan, K. und Heldt, H.W.**, 1978. Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 502, pp.232–247.
- Flügge, U.-I.**, 1999. Phosphate Translocators in Plastids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), pp.27–45.
- Foyer, C.H. und Noctor, G.**, 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(4), pp.861–905.
- Foyer, C.H., Neukermans, J., Quevall, G., Noctor, G. und Harbinson, J.**, 2012. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), pp.1637–1661.
- Genty, B., Briantais, J.-M. und Baker, N.R.**, 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990, pp.87–92.
- Gerhardt, R. und Heldt, H.W.**, 1984. Measurement of Subcellular Metabolite Levels in Leaves by Fractionation of Freeze-Stopped Material in Nonaqueous Media. *Plant Physiology*, 14, pp.542–547.
- Giavalisco, P., Hummel, J., Lisec, J., Inostroza, A.C., Catchpole, G. und Willmitzer, L.**, 2008. High-resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole <sup>13</sup>C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas. *Analytical Chemistry*, 80(24), pp.9417–9425.
- Gibson, S.I.**, 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, pp.93–102.
- Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J., und Sweetlove, L.J.**, 2003. Enzymes of Glycolysis Are Functionally Associated with the Mitochondrion in Arabidopsis Cells. *The Plant Cell*, 15, pp.2140–2151.

- Giraud, E., Ho, L.H.M., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.-F., Howell, K.A., Ivanova, A., Pogson, B.J., Millar, A.H. und Whelan, J., 2008.** The Absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in Arabidopsis Results in Acute Sensitivity to Combined Light and Drought Stress. *Plant Physiology*, 147(2), pp.595–610.
- Haink, G. und Deussen, A., 2003.** Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds. *Journal of Chromatography B*, 784, pp.189–193.
- Häusler, R.E., Schlieben, N.H., Schulz, B. und Flügge, U.-I., 1998.** Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta*, 204, pp.366–376.
- Häusler, R.E., Fischer, K.L. und Flügge, U.-I., 2000.** Determination of low-abundant metabolites in plant extracts by NAD(P)H fluorescence with a microtiter plate reader. *Analytical Biochemistry*, 281, pp.1–8.
- Häusler, R.E., Geimer, S., Kunz, H.H., Schmitz, J., Dörmann, P., Bell, K., Hetfeld, S., Guballa, A. und Flügge, U.-I., 2009.** Chlororespiration and Grana Hyperstacking: How an Arabidopsis Double Mutant Can Survive Despite Defects in Starch Biosynthesis and Daily Carbon Export from Chloroplasts. *Plant Physiology*, 149(1), pp.515–533.
- Häusler, R.E., Heinrichs, L., Schmitz, J. und Flügge, U.-I., 2014.** How Sugars Might Coordinate Chloroplast and Nuclear Gene Expression during Acclimation to High Light Intensities. *Molecular Plant*, 7, pp.1121–1137.
- Heinrichs, L., Schmitz, J., Flügge, U.-I. und Rainer E. Häusler, R.E., 2012.** The Mysterious Rescue of *adg1-1/tpt-2* - an *Arabidopsis thaliana* Double Mutant Impaired in Acclimation to High Light - by Exogenously Supplied Sugars. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 265, pp.1–18.
- Herrmann, K.M., 1995.** The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell*, 7, pp.907–919.
- Herrmann, K.M. und Weaver, L.M., 1999.** The Shikimate Pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, pp.473–503.
- Horton, P., Ruban, A. V. und Walters, R.G., 1996.** Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, pp.655–684.
- Jang, J.C. und Sheen, J., 1994.** Sugar sensing in higher plants. *The Plant cell*, 6(11), pp.1665–1679.
- Jang, J.C., León, P., Zhou, L. und Sheen, J., 1997.** Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell*, 9(1), pp.5–19.
- Kargul, J. und Barber, J., 2008.** Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna - role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins. *The FEBS Journal*, 275(6), pp.1056–1068.

- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. und Mullineaux, P. et al.**, 1999. Systemic Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in *Arabidopsis*. *Science*, 284, pp.654–657.
- Karpinski, S., Szechynska-Hebda, M., Wituszynska, W. und Burdiak, P.**, 2013. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant, Cell & Environment*, 36(4), pp.736–744.
- Karve, R., Lauria, M., Virnig, A., Xia, X., Rauh, B.L. und Moore, B.**, 2010. Evolutionary Lineages and Functional Diversification of Plant Hexokinases. *Molecular Plant*, 3(2), pp.334–346.
- Keeling, P.J. und Palmer, J.D.**, 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9, pp.605–618.
- Kim, C., Meskauskiene, R., Apel, K. und Laloi, C.**, 2008. No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO Reports*, 9(5), pp.435–439.
- Kingston-Smith, A.H., Walker, R.P. und Pollock, C.J.**, 1999. Invertase in leaves: Conundrum or control point? *Journal of Experimental Botany*, 50(335), pp.735–743.
- Kleine, T., Voigt, C. und Leister, D.**, 2009. Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? *Trends in Genetics*, 25(4), pp.185–192.
- Koch, K.E.**, 1996. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, pp.509–540.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S. und Geigenberger, P.**, 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), pp.11118–11123.
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., Dörmann, P., Wolfram Weckwerth, W., Gibon, Y., Stitt, M., Willmitzer, L., Fernie, A.R. und Steinhauser, D.**, 2005. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics*, 21(8), pp.1635–1638.
- Koressaar, T. und Remm, M.**, 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), pp.1289–1291.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J. und Chory, J.**, 2007. Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression. *Science*, 316, pp.715–719.
- Krieger-Liszkay, A.**, 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), pp.337–346.
- Kunz, H.-H., Scharnewski, M., Feussner, K., Feussner, I., Flügge, U.-I., Fulda, M. und Gierth, M.**, 2009. The ABC Transporter PXA1 and Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation Are Vital for Metabolism in Mature Leaves of *Arabidopsis* during Extended Darkness. *The Plant Cell*, 21, pp.2733–2749.

- Kunz, H.H., Häusler, R.E., Fettke, J., Herbst, K., Niewiadomski, P., Gierth, M., Bell, K., M. Steup, M., Flügge, U.-I. und Schneider, A., 2010.** The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biology*, 12, pp.115–128.
- Leister, D., 2003.** Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics*, 19(1), pp.47–56.
- Lemeille, S. und Rochaix, J.-D., 2010.** State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways. *Photosynthesis Research*, 106, pp.33–46.
- León, P. und Sheen, J., 2003.** Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science*, 8(3), pp.110–116.
- Leyva, A., Jarillo, J.A., Salinas, J. und Martinez-Zapater, J.M., 1995.** Low Temperature Induces the Accumulation of *Phenylalanine Ammonia-Lyase* and *Chalcone Synthase* mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a Light-Dependent Manner. *Plant Physiology*, 108(1), pp.39–46.
- Lin, T.-P., Caspar, T. und Somerville, C.R., 1988a.** A Starch Deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme. *Plant Physiology*, 88(4), pp.1175–1181.
- Lin, T.-P., Caspar, T. und Somerville, C.R., 1988b.** Isolation and Characterization of a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Lacking ADPglucose Pyrophosphorylase Activity. *Plant Physiology*, 86(4), pp.1131–1135.
- Lindroth, P. und Mopper, K., 1979.** High Performance Liquid Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with o-Phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, 51(11), pp.1667–1674.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. und Fernie, A.R., 2006.** Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1(1), pp.387–396.
- Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L., 1987.** Improved Method for the Isolation of RNA from Plant Tissues. *Analytical Biochemistry*, 163(1), pp.16–20.
- Loreti, E., Povero, G., Novi, G., Solfanelli, C., Alpi, A. Perata, P., 2008.** Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *The New Phytologist*, 179(4), pp.1004–1016.
- Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A. und Kopka, J., 2008.** TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, 24(5), pp.732–737.
- Luedemann, A., von Malotky, L., Erban, A. und Kopka, J., 2012.** TagFinder: Preprocessing Software for the Fingerprinting and the Profiling of Gas Chromatography–Mass Spectrometry Based Metabolome Analyses. *Methods in Molecular Biology*, 860, pp.255–286.

- Lunn, J.E., Feil, R., Hendriks, J.H.M., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W.-R., Carillo, P., Hajirezaei, M.-R. und Stitt, M., 2006.** Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical Journal*, 397, pp.139–148.
- Ma, H., Bloom, L.M., Walsh, C.T. und Botstein, D., 1989.** The Residual Enzymatic Phosphorylation Activity of Hexokinase II Mutants Is Correlated with Glucose Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(12), pp.5643–5649.
- Maier, A., Schrader, A., Kokkelink, L., Falke, C., Welter, B., Iniesto, E., Rubio, V., Uhrig, J.F., Hülkamp, M. und Hoecker, U., 2013.** Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 74(4), pp.638–651.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. und Nakamura, K., 1997.** Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for  $\beta$ -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal*, 11(4), pp.841–851.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. und Nagatani, A., 2008.** The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), pp.15184–15189.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Hwang, I., Jones, T. und Sheen, J., 2003.** Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300, pp.332–336.
- Moulin, M., McCormac, A.C., Terry, M.J. und Smith, A.G., 2008.** Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), pp.15178–15183.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A., 1987.** Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, 155, pp.335–350.
- Niewiadomski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte, U.S., Rosso, M.G., Ache, P., Flügge, U.-I. und Schneider, A., 2005.** The Arabidopsis Plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate Translocator GPT1 Is Essential for Pollen Maturation and Embryo Sac Development. *The Plant Cell*, 17, pp.760–775.
- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M. und Zeeman, S.C., 2004.** A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science*, 303, pp.87–89.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. und Foyer, C.H., 2000.** Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.*, 355(1402), pp.1465–1475.

- Nunes, C., O'Hara, L.E., Primavesi, L.F., Delatte, T.L., Schluempmann, H., Somsen, G.W., Silva, A.B., Fevereiro, P.S., Wingler, A. und Paul, M.J.**, 2013. The Trehalose 6-Phosphate/SnRK1 Signaling Pathway Primes Growth Recovery following Relief of Sink Limitation. *Plant Physiology*, 162(3), pp.1720–1732.
- Oelmüller, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V.K. und Mohr, H.**, 1986. Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta*, 168, pp.482–492.
- Ohlrogge, J.B., Kuhn, D.N. und Stumpf, P.K.**, 1979. Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), pp.1194–1198.
- Ohlrogge, J.B. und Jaworski, J.G.**, 1997. Regulation of Fatty Acid Synthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, pp.109–136.
- op den Camp, R.G.L., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M. und Apel, K.**, 2003. Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(October), pp.2320–2332.
- Page, M., Sultana, N., Paszkiewicz, K., Florance, H. und Smirnoff, N.**, 2012. The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), pp.388–404.
- Paul, M.J. und Pellny, T.K.**, 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), pp.539–547.
- Pego, J. V und Smeekens, S.C.**, 2000. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends in Plant Science*, 5(12), pp.531–536.
- Pellny, T.K., Ghannoum, O., Conroy, J.P., Schluempmann, H., Smeekens, S., Andralojc, J., Krause, K.P., Goddijn, O. und Paul, M.J.**, 2004. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal*, 2, pp.71–82.
- Petrillo, E., Herz, M.A.G., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M.J., Simpson, C., Brown, J.W.S., Barta, A., Kalyna, M. und Kornblihtt, A.R.**, 2014. A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing. *Science*, 344, pp.427–432.
- Pfalz, J., Libers, M., Hirth, M., Grübler, B., Holtzegel, U., Schröter, Y., Dietzel, L. und Pfannschmidt, T.**, 2012. Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 257, pp.1–9
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A. und Allen, J.F.**, 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, 397, pp.625–628.
- Pogson, B.J., Woo, N.S., Förster, B. und Small, I.D.**, 2008. Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends in Plant Science*, 13(11), pp.602–609.

- Pratelli, R. und Pilot, G.**, 2014. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, pp.1–22.
- Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R. und Leister, D.**, 2010. Role of Plastid Protein Phosphatase TAP38 in LHCII Dephosphorylation and Thylakoid Electron Flow. *PLoS Biology*, 8(1), p.e1000288.
- Price, J., Laxmi, A. und Jang, J.**, 2004. Global Transcription Profiling Reveals Multiple Sugar Signal Transduction Mechanisms in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16, pp.2128–2150.
- Rapp, J.C. und Mullet, J.E.**, 1991. Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. *Plant Molecular Biology*, 17, pp.813–823.
- Rochaix, J.-D., Lemeille, S., Shapiguzov, A., Samol, I., Fucile, G., Willig, A. und Goldschmidt-Clermon, M.**, 2012. Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, pp.3466–3474.
- Roitsch, T. und González, M.-C.**, 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*, 9(12), pp.606–613.
- Rolland, F., Winderickx, J. und Thevelein, J.M.**, 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(5), pp.310–317.
- Rolland, F., Moore, B. und Sheen, J.**, 2002a. Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell*, (14), pp.185–206.
- Rolland, F., Winderickx, J. und Thevelein, J.M.**, 2002b. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2, pp.183–201.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. und Sheen, J.**, 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, pp.675–709.
- Rose, M., Albig, W. und Entian, K.-D.**, 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *European Journal of Biochemistry*, 518, pp.511–518.
- Sanger, F. und Coulson, A.R.**, 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), pp.441–448.
- Schäfer, G., Heber, U. und Heldt, H.W.**, 1977. Glucose Transport into Spinach Chloroplasts. *Plant Physiology*, 60, pp.286–289.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. und Smeekens, S.**, 2004. Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. *Plant Physiology*, 135, pp.879–890.

- Schmid, J. und Amrhein, N.**, 1995. MOLECULAR ORGANIZATION OF THE SHIKIMATE PATHWAY IN HIGHER PLANTS. *Phytochemistry*, 39(4), pp.737–749.
- Schmitz, J.**, 2011. *Untersuchungen zur Hochlicht-Akklimatisierung von Arabidopsis thaliana Mutanten mit Defekten im Kohlenhydratstoffwechsel.*
- Schmitz, J., Schöttler, A.A., Krueger, S., Geimer, S., Schneider, A., Kleine, T., Leister, D., Bell, K., Flügge, U.-I. und Häusler, R.E.**, 2012. Defects in leaf carbohydrate metabolism compromise acclimation to high light and lead to a high chlorophyll fluorescence phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 12(1), pp.1–25.
- Schmitz, J., Heinrichs, L., Scossa, F., Fernie, A.R., Oelze, M.-L., Dietz, K.-J., Rothbart, M., Grimm, B., Flügge, U.-I. und Häusler, R.E.**, 2014. The essential role of sugar metabolism in the acclimation response of *Arabidopsis thaliana* to high light intensities. *Journal of Experimental Botany*, 65(6), pp.1619–1636.
- Schneider, A., Häusler, R.R., Kolukisaoglu, Ü., Kunze, R., van der Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M. und Flügge, U.I.**, 2002. An *Arabidopsis thaliana* knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis , but not starch mobilisation is abolished. *The Plant Journal*, 32, pp.685–699.
- Schneider, S., Hulpke, S., Schulz, A., Yaron, I., Höll, J., Imlau, A., Schmitt, B, Batz, S., Wolf, S., Hedrich, R. und Sauer, N.**, 2012. Vacuoles release sucrose *via* tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology*, 14(2), pp.325–336.
- Schreiber, U., Schliwa, U. und Bilger, W.**, 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10, pp.51–62.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flügge, U.-I. und Kunze, R.**, 2003. ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiology*, 131, pp.16–26.
- Schwender, J. und Ohlrogge, J.B.**, 2002. Probing in vivo metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiology*, 130(1), pp.347–361.
- Shapiguzov, A., Vainonen, J.P., Wrzaczek, M. und Kangasjärvi, J.**, 2012. ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 292, pp.1–9
- Sharkey, T.D.**, 1985. Photosynthesis in Intact Leaves of C3 Plants: Physics, Physiology and Rate Limitations. *The Botanical Review*, 51(1), pp.53–105.
- Shin, D.H., Choi, M.G., Kim, K., Bang, G., Cho, M., Choi, S.-B., Choi, G. und Park, Y.-I.**, 2013. HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 587(10), pp.1543–1547.

- Singh, B.K. und Shaner, D.L.**, 1995. Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. *The Plant Cell*, 7(7), pp.935–944.
- Smeekens, S.**, 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), pp.230–234.
- Smeekens, S.**, 2000. SUGAR-INDUCED SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, pp.49–81.
- Staehr, P., Löttgert, T., Christmann, A., Krueger, S., Rosar, C., Rolcik, J., Novak, O., Strnad, M., Bell, K., Weber, A.P.M., Flügge, U.-I. und Häusler, R.E.**, 2014. Reticulate leaves and stunted roots are independent phenotypes pointing at opposite roles of the phosphoenolpyruvate/phosphate translocator defective in *cuel* in the plastids of both organs. *Frontiers in Plant Science*, 5(April), Article 126, pp.1–22.
- Stevenson, J.M., Perera, I.Y., Heilmann, I., Persson, S. und Boss, W.F.**, 2000. Inositol Signaling and Plant Growth. *Trends in Plant Science*, 5(8), pp.252–258.
- Stitt, M., McC. Lilley, R., Gerhardt, R. und Heldt, H.W.**, 1989. Metabolite Levels in Specific Cells and Subcellular Compartments of Plant Leaves. *Methods in Enzymology*, 174, pp.518–552.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J.R. und Chory, J.**, 2003. Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature*, 5, pp.79–83.
- Sullivan, J.A. und Gray, J.C.**, 1999. Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. *The Plant Cell*, 11(5), pp.901–910.
- Surpin, M., Larkin, R.M. und Chory, J.**, 2002. Signal Transduction between the Chloroplast and the Nucleus. *The Plant Cell*, 14, pp.327–338.
- Susek, R.E., Ausubel, F.M. und Chory, J.**, 1993. Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*, 74, pp.787–799.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T.Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P. und Huala, E.**, 2008. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*, 36, pp.D1009–D1014.
- Tanaka, K. und Hanaoka, M.**, 2012. The early days of plastid retrograde signaling with respect to replication and transcription. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 301, pp.1–5.
- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koorneef, M. und Smeekens, S.**, 2005. Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene. *Plant Physiology*, 139, pp.1840–1852.

- Tiller, N. und Bock, R.**, 2014. The Translational Apparatus of Plastids and Its Role in Plant Development. *Molecular Plant*, 7(7), pp.1105–1120.
- Vargas, W.A., Pontis, H.G. und Salerno, G.L.**, 2008. New insights on sucrose metabolism: evidence for an active A/N-Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the intracellular carbon trafficking. *Planta*, 227(4), pp.795–807.
- Vass, I.**, 2012. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812, pp.209–217.
- Verslues, P.E. und Sharma, S.**, 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book*, 8, pp.1–23.
- Vogel, M.O., Moore, M., König, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J. und Dietz, K.-J.**, 2014. Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(3), pp.1151–1165.
- Walters, R.G., Shephard, F., Rogers, J.J.M., Rolfe, S.A. und Horton, P.**, 2003. Identification of Mutants of Arabidopsis Defective in Acclimation of Photosynthesis to the Light Environment. *Plant Physiology*, 131(2), pp.472–481.
- Walters, R.G., Ibrahim, D.G., Horton, P. und Kruger, N.J.**, 2004. A Mutant of Arabidopsis Lacking the Triose-Phosphate/ Phosphate Translocator Reveals Metabolic Regulation of Starch Breakdown in the Light. *Plant Physiology*, 135, pp.891–906.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.R., Kofler, H., Hille, D., Gröner, F., Hebbeker, U. und Flüge, U.-I.**, 2000. Identification, Purification, and Molecular Cloning of a Putative Plastidic Glucose Translocator. *The Plant Cell*, 12(5), pp.787–802.
- Wiese, A., Gröner, F., Sonnewald, U., Deppner, H., Lerchl, J., Hebbeker, U., Flüge, U.-I. und Weber, A.**, 1999. Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Letters*, 461, pp.13–18.
- Wind, J., Smeekens, S. und Hanson, J.**, 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71, pp.1610–1614.
- Wingler, A., Delatte, T.L., O’Hara, L.E., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Paul, M.J. und Schlupepmann, H.**, 2012. Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiology*, 158(3), pp.1241–1251.
- Winkel-Shirley, B.**, 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), pp.218–223.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. und Provart, N.J.**, 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PloS one*, 2(8), p.e718.
- Xiao, W., Sheen, J. und Jang, J.-C.**, 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, 44, pp.451–461.

- Yanagisawa, S., Yoo, S. und Sheen, J.**, 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 425, pp.521–525.
- Zeeman, S.C., Kossmann, J. und Smith, A.M.**, 2010. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, pp.209–234.
- Zeng, X.-Q., Chow, W.S., Su, L.-J., Peng, X.-X. und Peng, C.-L.**, 2010. Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light. *Physiologia Plantarum*, 138(2), pp.215–225.
- Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchel, R.A.C., Powers, S.J., Schluempmann, H., Delatte, T., Wingler, A. und Paul, M.J.**, 2009. Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiology*, 149(4), pp.1860–1871.
- Zhang, Z.-W. et al.**, 2010. The plastid hexokinase pHXK: a node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 584(16), pp.3573–3579.
- Zhou, L., Jang, J.-C., Jones, T.L. und Sheen, J.**, 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), pp.10294–10299.



## Danksagung

Diese Seite möchte ich den Menschen widmen, die mir es ermöglicht haben, hier und heute meine Zeit der Promotion mit dieser Arbeit erfolgreich abschließen zu können.

Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge danke ich für die Möglichkeit, dass ich Teil der Forschungsgruppe *RU804 - Retrograde Signalling in Plants* werden durfte, um an der Aufklärung von Kommunikationswegen zwischen Chloroplast und Zellkern mitwirken zu können.

Prof. Dr. Marcel Bucher gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Karin Schnetz für den Vorsitz des Disputation-Prüfungskomitees.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Rainer Häusler für die Betreuung der Arbeit, der hilfreichen Anregungen zur Projektweiterführung und für die Weitergabe seines umfangreichen Wissens zur Photosynthese und darüber hinaus.

Frau Dr. Jessica Schmitz möchte ich ebenfalls außerordentlich danken, da sie mir im ersten Jahr mit Rat und Tat zur Seite stand und mir damit den Einstieg in ein mir unbekanntes Thema um ein Vielfaches erleichterte.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre möchte ich allen Mitgliedern der AG Flügge danken. Sie standen stets für Fragen und Anregungen zur Verfügung und haben dazu beigetragen, dass ich mich während meiner Doktorarbeit aufgehoben gefühlt habe. Ich hoffe, ich stoße nicht auf Unmut, wenn ich an dieser Stelle Einige persönlich erwähne.

Ich danke Kirsten Bell, Diana Vogelmann und Dr. Katja Ludewig für die Hilfe und die Beantwortung aller Fragen in Labor. Elke Hilgers für das Versüßen der Büroarbeit und die schöne Zusammenarbeit. Dr. Stephan Krüger und Dr. Annemarie Reichel für das Nichtvergessen ostdeutscher Sprachkultur. Raphael Wemhöner dafür, dass das Arbeiten an der Sterilbank nicht langweilig wurde. Dem stets sauberen und ordentlichen (Mädels)Labor II (Dr. Nicole Wöstefeld, Sabine Wulfert, Dr. Katja Ludewig, Diana Vogelmann, Kirsten Bell, Dr. Annemarie Reichel und Dr. Veronika Schneck) – es war sehr schön mit euch.

Aber auch die Auseinandersetzung mit nichtwissenschaftlichen Themen wie Backen, Handarbeiten, Grillen, Tanzfiguren, Pubquiz-Besuche, Mädelsabende, Serienkritiken und dem Dr.-Hüte-Basteln haben die letzten Jahre rund gemacht. Danke dafür.

Meinen Eltern Kerstin und Michael Heinrichs danke ich für jegliche Unterstützung außerhalb des Labors. Sie haben den Glauben an mich und meine Fähigkeiten nie verloren und dafür danke ich ihnen von ganzem Herzen.

Zuletzt möchte ich mich bei dem für mich wichtigsten Menschen bedanken: Christoph Henkelmann. Danke fürs Zuhören, unbequemen Fragen stellen, Aufmuntern, Mitfreuen, Computersachen beibringen ;), Tanzen gehen und noch für Vieles mehr - aber vor allem dafür, dass du in Neuseeland nicht locker gelassen hast.

## Anhang

## PCR-Programme

Tab. Anhang I: PCR-Programme zur Amplifizierung spezifischer Fragmente

amplifiziertes Fragment	Hybridisierungstemperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Fragmentlänge
<b>Actin-PCR für cDNA-Angleich</b>				
Actin	60 °C	60 s	24	522 bp
<b>Genotypisierung</b>				
GPT2	54 °C	70 s	32	822 bp
<i>gpt2-1</i>	54 °C	70 s	32	ca. 530 bp
HXK1	58 °C	60 s	32	960 bp
<i>gin2Wisc</i>	58 °C	60 s	32	ca. 600 bp
TPT	57 °C	70 s	32	1114 bp
<i>tpt-2</i>	57 °C	60 s	32	ca. 470 bp
<b>Test auf Qualität und Funktionalität von qRT-PCR-Primern</b>				
Actin2neu	60 °C	30 s	27	68 bp
GPT2	60 °C	30 s	27	63 bp
LHCB1	60 °C	30 s	27	96 bp
NR1	60 °C	30 s	27	100 bp
pHXK	60 °C	30 s	27	100 bp
SBP	60 °C	30 s	27	97 bp
<b>Überprüfung der Transkriptmenge</b>				
HXK1	58° C	120 s	24	1384 bp
TPT	58° C	120 s	24	1177 bp

## Metabolitanalyse

Tab. Anhang II: **Quantitative Bestimmung ausgewählter Metabolite** in Col-0 und *tpt-2* (A) bzw. *adgl-1* und *adgl-1/tpt-2* (B). Die Daten wurden mittels GC-ToF-MS aus Blattproben erhoben. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für ca. 30/21 Tage im Schwachlicht ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $t_0$ , LL) bzw. Hochlicht ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , HL) auf Erde im Langtag (16/8 h). Desweiteren wurden Proben 4 h ( $t_{4h}$ ) bzw. 48 h ( $t_{48h}$ ) nach dem Transfer vom LL ins HL genommen. Hervorgehobene Zahlen weisen auf die Metabolite hin, die im Ergebnisteil näher diskutiert wurden. Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 5 technischen Replikaten. n.d.: nicht detektierbar

A	Col-0 $t_0$ (LL)	Col-0 $t_{4h}$	Col-0 $t_{48h}$	Col-0 (HL)	<i>tpt-2</i> $t_0$ (LL)	<i>tpt-2</i> $t_{4h}$	<i>tpt-2</i> $t_{48h}$	<i>tpt-2</i> (HL)
Relative Einheiten pro g FG								
<b>Zucker</b>								
D-Glc	<b>0,53 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>21,35 <math>\pm</math> 0,68</b>	<b>12,21 <math>\pm</math> 1,14</b>	<b>13,71 <math>\pm</math> 1,25</b>	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>3,19 <math>\pm</math> 0,22</b>	<b>22,97 <math>\pm</math> 0,69</b>	<b>16,01 <math>\pm</math> 0,75</b>
D-Suc	<b>3,26 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>6,08 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>7,33 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>6,78 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>3,39 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>4,18 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>7,15 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>8,13 <math>\pm</math> 0,25</b>
D-Fru	<b>0,74 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>16,80 <math>\pm</math> 0,45</b>	<b>9,68 <math>\pm</math> 1,85</b>	<b>12,78 <math>\pm</math> 0,90</b>	<b>0,91 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>3,38 <math>\pm</math> 0,24</b>	<b>17,42 <math>\pm</math> 0,46</b>	<b>8,61 <math>\pm</math> 0,56</b>
D-Maltose	<b>0,12 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>1,87 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>0,52 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>0,89 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>0,51 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>10,98 <math>\pm</math> 0,81</b>	<b>6,71 <math>\pm</math> 0,95</b>
$\alpha,\alpha'$ -D-Trehalose	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>0,48 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>4,10 <math>\pm</math> 0,43</b>	<b>2,84 <math>\pm</math> 0,17</b>	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>0,31 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>1,22 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>0,84 <math>\pm</math> 0,08</b>
D-Mannose	0,15 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,57	1,22 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,06
Raffinose	0,07 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,03	2,12 $\pm$ 0,53	0,10 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02
1,6-Anhydro- $\beta$ -D-Glc	6,10 $\pm$ 0,94	8,12 $\pm$ 1,13	14,67 $\pm$ 1,62	10,77 $\pm$ 1,49	3,59 $\pm$ 0,49	9,48 $\pm$ 1,40	10,55 $\pm$ 0,45	14,38 $\pm$ 2,02
DL-Fucose	0,82 $\pm$ 0,03	2,28 $\pm$ 0,20	3,36 $\pm$ 0,31	3,46 $\pm$ 0,18	0,92 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,13	3,66 $\pm$ 0,17	2,43 $\pm$ 0,34
D-Arabinose	0,85 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,07	1,50 $\pm$ 0,11	0,82 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,09	2,58 $\pm$ 0,25
Glucoheptose	0,11 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,02
Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid	3,53 $\pm$ 0,16	3,64 $\pm$ 0,38	9,50 $\pm$ 0,49	6,67 $\pm$ 0,31	6,53 $\pm$ 0,22	7,66 $\pm$ 0,51	2,20 $\pm$ 0,16	5,78 $\pm$ 0,81
<b>Aminosäuren</b>								
DL-Glutaminsäure	<b>32,46 <math>\pm</math> 1,86</b>	<b>124,73 <math>\pm</math> 2,57</b>	<b>165,01 <math>\pm</math> 2,40</b>	<b>39,41 <math>\pm</math> 3,02</b>	<b>53,29 <math>\pm</math> 2,59</b>	<b>98,74 <math>\pm</math> 6,50</b>	<b>169,43 <math>\pm</math> 3,91</b>	<b>87,26 <math>\pm</math> 9,74</b>
Glycin	<b>3,52 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>144,51 <math>\pm</math> 2,41</b>	<b>115,60 <math>\pm</math> 1,32</b>	<b>14,48 <math>\pm</math> 0,33</b>	<b>4,41 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>107,48 <math>\pm</math> 1,70</b>	<b>109,62 <math>\pm</math> 2,31</b>	<b>80,02 <math>\pm</math> 3,37</b>
DL-Serin	<b>10,12 <math>\pm</math> 0,36</b>	<b>28,05 <math>\pm</math> 0,75</b>	<b>54,53 <math>\pm</math> 1,41</b>	<b>38,38 <math>\pm</math> 0,84</b>	<b>15,97 <math>\pm</math> 0,71</b>	<b>65,01 <math>\pm</math> 0,91</b>	<b>66,14 <math>\pm</math> 1,24</b>	<b>63,03 <math>\pm</math> 1,45</b>
L-Prolin	<b>7,16 <math>\pm</math> 0,83</b>	<b>35,89 <math>\pm</math> 1,73</b>	<b>60,06 <math>\pm</math> 3,78</b>	<b>14,33 <math>\pm</math> 2,10</b>	<b>6,84 <math>\pm</math> 0,43</b>	<b>70,17 <math>\pm</math> 4,47</b>	<b>42,50 <math>\pm</math> 4,54</b>	<b>70,52 <math>\pm</math> 5,59</b>
L-Asparaginsäure	9,68 $\pm$ 0,16	9,14 $\pm$ 0,41	18,60 $\pm$ 1,70	6,24 $\pm$ 0,74	12,94 $\pm$ 0,68	18,30 $\pm$ 1,22	19,16 $\pm$ 1,58	13,65 $\pm$ 1,87

<b>A</b>	<b>Col-0 t<sub>0</sub> (LL)</b>	<b>Col-0 t<sub>4h</sub></b>	<b>Col-0 t<sub>48h</sub></b>	<b>Col-0 (HL)</b>	<b>tpt-2 t<sub>0</sub> (LL)</b>	<b>tpt-2 t<sub>4h</sub></b>	<b>tpt-2 t<sub>48h</sub></b>	<b>tpt-2 (HL)</b>
<b>Relative Einheiten pro g FG</b>								
DL-Asparagin	n.d.	0,44 ± 0,17	3,46 ± 1,80	0,06 ± 0,01	n.d.	0,05 ± 0,01	2,85 ± 0,38	0,82 ± 0,38
DL-Alanin	1,70 ± 0,08	3,27 ± 0,62	5,08 ± 1,16	0,29 ± 0,04	2,36 ± 0,06	3,53 ± 0,26	10,51 ± 0,60	3,28 ± 0,23
DL-Threonin	12,51 ± 0,55	19,47 ± 0,77	31,47 ± 0,88	10,61 ± 0,53	15,83 ± 0,97	42,28 ± 1,35	39,31 ± 1,21	44,86 ± 1,73
DL-Cystein	0,61 ± 0,04	1,02 ± 0,14	2,31 ± 0,51	1,79 ± 0,21	0,59 ± 0,06	1,23 ± 0,16	2,02 ± 0,12	2,01 ± 0,32
DL-Methionin	0,17 ± 0,01	0,85 ± 0,08	0,82 ± 0,17	0,07 ± 0,01	0,24 ± 0,02	1,07 ± 0,06	0,78 ± 0,12	0,33 ± 0,06
L-Isoleucin	0,80 ± 0,01	3,15 ± 0,19	3,81 ± 0,26	3,34 ± 0,08	1,04 ± 0,04	3,65 ± 0,38	4,45 ± 0,15	3,85 ± 0,33
DL-Valin	3,20 ± 0,10	14,80 ± 0,46	16,16 ± 0,97	10,19 ± 0,46	4,62 ± 0,16	15,56 ± 1,43	24,08 ± 1,06	17,12 ± 1,61
L-Lysin	0,20 ± 0,01	0,51 ± 0,04	0,65 ± 0,08	0,36 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,49 ± 0,07	0,62 ± 0,03	0,64 ± 0,06
DL-Arginin, -NH <sub>3</sub>	0,08 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,83 ± 0,39	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,26 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,29 ± 0,06
DL-Phenylalanin	0,72 ± 0,04	9,61 ± 0,63	5,68 ± 1,75	2,01 ± 0,10	0,91 ± 0,04	3,59 ± 0,33	5,82 ± 0,29	3,49 ± 0,49
DL-Tyrosin	n.d.	0,43 ± 0,04	0,44 ± 0,12	0,15 ± 0,02	n.d.	0,10 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,23 ± 0,03
L-Tryptophan	0,44 ± 0,02	0,66 ± 0,05	0,78 ± 0,04	0,72 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,73 ± 0,03	0,55 ± 0,03
β-Alanin	0,16 ± 0,01	0,79 ± 0,07	1,38 ± 0,12	0,70 ± 0,05	0,19 ± 0,01	0,86 ± 0,08	1,80 ± 0,09	1,36 ± 0,13
<b>Organische Säuren</b>								
Pyruvat	<b>0,61 ± 0,03</b>	<b>0,67 ± 0,06</b>	<b>0,97 ± 0,07</b>	<b>0,84 ± 0,05</b>	<b>0,79 ± 0,06</b>	<b>1,64 ± 0,18</b>	<b>1,07 ± 0,04</b>	<b>1,61 ± 0,19</b>
2-Methyl-DL-Äpfelsäure	<b>0,09 ± 0,01</b>	<b>0,34 ± 0,03</b>	<b>1,02 ± 0,03</b>	<b>0,51 ± 0,03</b>	<b>0,17 ± 0,01</b>	<b>0,42 ± 0,02</b>	<b>1,21 ± 0,04</b>	<b>0,56 ± 0,05</b>
Fumarsäure	<b>106,36 ± 3,90</b>	<b>125,30 ± 1,85</b>	<b>111,55 ± 2,94</b>	<b>133,31 ± 2,25</b>	<b>117,78 ± 3,67</b>	<b>101,63 ± 2,49</b>	<b>91,51 ± 2,35</b>	<b>112,65 ± 3,50</b>
Glutarsäure	0,85 ± 0,06	1,61 ± 0,24	5,96 ± 0,40	4,39 ± 0,10	0,95 ± 0,05	1,63 ± 0,13	5,02 ± 0,27	2,77 ± 0,35
Bernsteinsäure	0,67 ± 0,03	1,35 ± 0,11	6,43 ± 0,98	3,80 ± 0,26	1,45 ± 0,06	3,82 ± 0,27	10,51 ± 0,44	8,22 ± 0,92
Malonsäure	n.d.	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,12 ± 0,02	n.d.	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,25 ± 0,15
DL-Glycerinsäure	0,58 ± 0,02	2,97 ± 0,36	3,60 ± 0,10	6,24 ± 0,21	0,80 ± 0,04	7,92 ± 0,49	8,88 ± 0,39	7,28 ± 0,70
3-Hydroxybutansäure	0,30 ± 0,02	0,40 ± 0,05	0,73 ± 0,07	0,44 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,79 ± 0,04	0,52 ± 0,07
Benzoessäure	5,34 ± 0,15	6,96 ± 0,71	7,48 ± 0,39	6,59 ± 0,15	5,74 ± 0,14	7,49 ± 0,18	7,35 ± 0,30	8,71 ± 0,89
D-Gluconsäure oder D-Galactonsäure	7,23 ± 0,49	11,11 ± 1,20	15,17 ± 1,93	20,53 ± 0,51	7,16 ± 0,46	11,98 ± 1,32	14,06 ± 1,26	25,59 ± 3,28

<b>A</b>	<b>Col-0 t<sub>0</sub> (LL)</b>	<b>Col-0 t<sub>4h</sub></b>	<b>Col-0 t<sub>48h</sub></b>	<b>Col-0 (HL)</b>	<b>tpt-2 t<sub>0</sub> (LL)</b>	<b>tpt-2 t<sub>4h</sub></b>	<b>tpt-2 t<sub>48h</sub></b>	<b>tpt-2 (HL)</b>
<b>Relative Einheiten pro g FG</b>								
<b>Sonstige</b>								
Glycerin	1,50 ± 0,07	2,97 ± 0,30	2,91 ± 0,14	3,99 ± 0,47	1,42 ± 0,05	2,79 ± 0,24	2,41 ± 0,13	3,55 ± 0,18
myo-Inositol	12,82 ± 0,58	19,92 ± 0,40	23,73 ± 1,37	26,92 ± 0,37	11,44 ± 0,72	18,02 ± 0,44	23,18 ± 0,54	15,78 ± 0,56
Erythrit	0,27 ± 0,01	0,73 ± 0,09	1,06 ± 0,07	0,82 ± 0,05	0,35 ± 0,03	0,78 ± 0,06	1,28 ± 0,07	1,29 ± 0,16
Putrescin	1,09 ± 0,07	7,53 ± 0,64	10,94 ± 0,94	3,11 ± 0,49	1,14 ± 0,05	3,90 ± 0,35	16,55 ± 1,00	14,76 ± 1,63
Galactinol	0,09 ± 0,01	0,57 ± 0,06	0,97 ± 0,17	4,88 ± 0,91	0,13 ± 0,01	1,55 ± 0,20	1,31 ± 0,12	0,41 ± 0,05
Tyramin	0,41 ± 0,01	0,80 ± 0,07	0,99 ± 0,15	1,45 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,68 ± 0,05	0,85 ± 0,09	1,12 ± 0,13
DL-Ornithin	0,60 ± 0,02	2,98 ± 0,13	5,02 ± 1,61	0,57 ± 0,10	0,71 ± 0,05	1,84 ± 0,30	4,19 ± 0,35	1,75 ± 0,22

<b>B</b>	<i>adgl-1</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adgl-1</i> t <sub>4h</sub>	<i>adgl-1</i> t <sub>48h</sub>	<i>adgl-1</i> (HL)	<i>adgl-1/tpt-2</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adgl-1/tpt-2</i> t <sub>4h</sub>	<i>adgl-1/tpt-2</i> t <sub>48h</sub>	<i>adgl-1/tpt-2</i> (HL)
<b>Relative Einheiten pro g FG</b>								
<b>Zucker</b>								
D-Glc	6,77 ± 0,53	25,97 ± 0,17	24,41 ± 0,44	26,82 ± 0,37	2,92 ± 0,44	13,41 ± 1,30	10,77 ± 0,74	5,73 ± 0,77
D-Suc	5,66 ± 0,18	6,69 ± 0,06	7,08 ± 0,05	7,90 ± 0,12	3,79 ± 0,15	5,20 ± 0,07	5,93 ± 0,08	4,77 ± 0,19
D-Fru	10,91 ± 0,63	20,17 ± 0,21	19,71 ± 0,37	20,95 ± 0,34	3,92 ± 0,48	5,84 ± 0,47	8,44 ± 0,54	3,76 ± 0,29
D-Maltose	n.d.	0,55 ± 0,03	0,52 ± 0,04	0,14 ± 0,01	n.d.	0,38 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,03
α,α'-D-Trehalose	0,16 ± 0,01	0,44 ± 0,03	3,33 ± 0,23	1,48 ± 0,07	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,76 ± 0,10
D-Mannose	0,49 ± 0,02	1,12 ± 0,12	3,84 ± 0,18	1,86 ± 0,13	0,30 ± 0,02	0,74 ± 0,09	0,58 ± 0,01	0,35 ± 0,02
Raffinose	n.d.	0,17 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02	n.d.	0,14 ± 0,02	0,03 ± 0,00	n.d.
1,6-Anhydro-β-D-Glc	7,35 ± 0,73	16,06 ± 0,62	18,47 ± 1,74	22,62 ± 3,39	5,29 ± 1,06	14,69 ± 1,14	16,99 ± 1,03	6,85 ± 1,48
DL-Fucose	1,30 ± 0,03	2,94 ± 0,29	4,93 ± 0,20	4,25 ± 0,28	1,15 ± 0,04	2,50 ± 0,33	1,62 ± 0,04	1,15 ± 0,10
D-Arabinose	1,07 ± 0,03	0,65 ± 0,04	2,08 ± 0,21	2,80 ± 2,27	1,28 ± 0,08	0,89 ± 0,10	1,87 ± 0,10	1,40 ± 0,11
Glucoheptose	0,17 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,53 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,31 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,14 ± 0,01
Methyl-α-D-Mannopyranosid	3,55 ± 0,33	1,72 ± 0,14	1,46 ± 0,03	2,07 ± 0,22	4,75 ± 0,19	4,07 ± 0,26	5,78 ± 0,32	3,76 ± 0,36
<b>Aminosäuren</b>								
DL-Glutaminsäure	29,83 ± 1,81	65,86 ± 5,49	176,49 ± 1,89	37,77 ± 1,71	35,30 ± 1,80	73,15 ± 5,63	70,01 ± 4,78	37,78 ± 4,50
Glycin	4,78 ± 0,24	84,63 ± 3,23	116,06 ± 1,69	22,94 ± 1,59	2,52 ± 0,15	20,29 ± 1,63	7,62 ± 0,38	4,30 ± 0,26
DL-Serin	6,10 ± 0,22	23,16 ± 1,38	49,68 ± 1,48	25,88 ± 1,76	7,70 ± 0,52	19,02 ± 1,19	16,56 ± 0,49	14,93 ± 0,68
L-Prolin	4,01 ± 0,29	30,16 ± 2,26	68,00 ± 7,02	18,81 ± 2,64	6,94 ± 1,31	26,60 ± 1,85	22,41 ± 4,80	9,86 ± 1,32
L-Asparaginsäure	7,34 ± 0,28	8,41 ± 0,43	13,49 ± 0,95	5,03 ± 0,40	10,99 ± 0,89	13,56 ± 0,59	15,07 ± 1,22	11,32 ± 1,38
DL-Asparagin	0,19 ± 0,06	0,06 ± 0,01	12,02 ± 1,15	0,27 ± 0,07	n.d.	0,03 ± 0,00	0,13 ± 0,03	0,51 ± 0,17
DL-Alanin	1,78 ± 0,10	2,74 ± 0,45	10,57 ± 1,41	1,27 ± 0,16	2,15 ± 0,19	5,95 ± 0,50	6,39 ± 0,61	0,95 ± 0,08
DL-Threonin	16,88 ± 0,64	21,59 ± 1,05	33,18 ± 1,80	20,37 ± 1,93	49,85 ± 0,91	68,31 ± 4,33	51,72 ± 2,37	72,89 ± 4,96
DL-Cystein	0,94 ± 0,04	1,37 ± 0,14	4,58 ± 0,42	3,20 ± 0,25	0,79 ± 0,11	1,36 ± 0,18	2,69 ± 0,21	1,06 ± 0,16
DL-Methionin	0,14 ± 0,02	0,49 ± 0,06	0,53 ± 0,07	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,39 ± 0,07	0,27 ± 0,04	0,12 ± 0,02

<b>B</b>	<i>adg1-1</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adg1-1</i> t <sub>4h</sub>	<i>adg1-1</i> t <sub>48h</sub>	<i>adg1-1</i> (HL)	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>4h</sub>	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>48h</sub>	<i>adg1-1/tpt-2</i> (HL)
<b>Relative Einheiten pro g FG</b>								
L-Isoleucin	0,93 ± 0,03	2,98 ± 0,34	3,55 ± 0,20	2,96 ± 0,26	1,23 ± 0,05	3,35 ± 0,23	3,07 ± 0,18	2,17 ± 0,11
DL-Valin	3,31 ± 0,09	12,35 ± 0,90	19,39 ± 1,09	12,17 ± 0,95	4,87 ± 0,30	13,86 ± 0,90	12,72 ± 0,61	6,81 ± 0,45
L-Lysin	0,28 ± 0,01	0,64 ± 0,04	0,96 ± 0,08	0,53 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,60 ± 0,09	0,66 ± 0,03	0,52 ± 0,05
DL-Arginin, -NH <sub>3</sub>	0,07 ± 0,01	0,34 ± 0,04	2,84 ± 0,32	0,22 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,01
DL-Phenylalanin	1,87 ± 0,04	12,42 ± 1,04	14,33 ± 0,92	3,10 ± 0,17	1,34 ± 0,12	3,05 ± 0,26	2,35 ± 0,11	1,10 ± 0,10
DL-Tyrosin	0,06 ± 0,00	0,43 ± 0,03	1,00 ± 0,09	0,25 ± 0,04	n.d.	0,09 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,12 ± 0,02
L-Tryptophan	0,33 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,64 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,63 ± 0,01	0,51 ± 0,04
β-Alanin	0,35 ± 0,02	0,59 ± 0,08	2,12 ± 0,11	0,86 ± 0,06	0,44 ± 0,02	0,61 ± 0,05	1,48 ± 0,05	1,00 ± 0,07
<b>Organische Säuren</b>								
Pyruvat	<b>0,53 ± 0,04</b>	<b>0,53 ± 0,04</b>	<b>0,87 ± 0,05</b>	<b>1,09 ± 0,06</b>	<b>0,62 ± 0,03</b>	<b>1,10 ± 0,07</b>	<b>1,09 ± 0,12</b>	<b>0,62 ± 0,02</b>
2-Methyl-DL-Äpfelsäure	<b>0,12 ± 0,01</b>	<b>0,36 ± 0,03</b>	<b>1,13 ± 0,06</b>	<b>0,62 ± 0,02</b>	<b>0,16 ± 0,02</b>	<b>0,38 ± 0,01</b>	<b>0,62 ± 0,02</b>	<b>0,16 ± 0,02</b>
Fumarsäure	<b>136,96 ± 4,41</b>	<b>115,53 ± 1,70</b>	<b>98,82 ± 3,49</b>	<b>116,77 ± 2,31</b>	<b>96,78 ± 1,61</b>	<b>91,04 ± 1,66</b>	<b>85,79 ± 1,36</b>	<b>82,43 ± 10,17</b>
Glutarsäure	1,08 ± 0,03	1,83 ± 0,18	5,08 ± 0,33	3,03 ± 0,14	1,09 ± 0,04	1,52 ± 0,18	2,08 ± 0,05	1,11 ± 0,05
Bernsteinsäure	1,05 ± 0,04	3,75 ± 0,43	13,66 ± 0,55	4,39 ± 0,16	1,06 ± 0,07	3,55 ± 0,18	2,54 ± 0,08	0,71 ± 0,05
Malonsäure	n.d.	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,07 ± 0,01	n.d.	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01
DL-Glycerinsäure	0,40 ± 0,01	2,99 ± 0,36	4,66 ± 0,26	3,98 ± 0,22	0,40 ± 0,01	0,96 ± 0,10	0,90 ± 0,04	0,78 ± 0,06
3-Hydroxybutansäure	0,21 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,59 ± 0,07	0,33 ± 0,05	0,38 ± 0,02	0,50 ± 0,06	0,51 ± 0,02	0,31 ± 0,04
Benzoessäure	4,21 ± 0,34	6,77 ± 0,69	6,52 ± 0,31	7,03 ± 0,27	5,68 ± 0,22	5,33 ± 0,29	5,03 ± 0,07	5,94 ± 0,28
D-Gluconsäure oder D-Galactonsäure	10,03 ± 0,47	12,48 ± 1,32	14,14 ± 2,16	14,51 ± 1,64	9,22 ± 0,68	15,22 ± 1,82	17,17 ± 0,75	11,41 ± 1,48
<b>Sonstige</b>								
Glycerin	<b>1,24 ± 0,02</b>	<b>2,18 ± 0,25</b>	<b>2,55 ± 0,05</b>	<b>4,42 ± 1,15</b>	<b>1,22 ± 0,13</b>	<b>2,27 ± 0,16</b>	<b>2,33 ± 0,19</b>	<b>10,11 ± 3,54</b>
myo-Inositol	<b>6,35 ± 0,35</b>	<b>13,79 ± 0,78</b>	<b>18,83 ± 0,74</b>	<b>16,17 ± 0,54</b>	<b>7,07 ± 0,16</b>	<b>13,69 ± 0,51</b>	<b>16,35 ± 0,44</b>	<b>6,16 ± 0,35</b>
Erythrit	<b>0,53 ± 0,04</b>	<b>1,07 ± 0,13</b>	<b>4,69 ± 0,38</b>	<b>1,44 ± 0,10</b>	<b>0,89 ± 0,02</b>	<b>1,57 ± 0,09</b>	<b>1,80 ± 0,04</b>	<b>1,96 ± 0,21</b>
Putrescin	<b>2,93 ± 0,10</b>	<b>9,60 ± 1,26</b>	<b>36,15 ± 2,69</b>	<b>11,37 ± 1,12</b>	<b>1,92 ± 0,12</b>	<b>6,92 ± 0,98</b>	<b>5,18 ± 0,39</b>	<b>5,95 ± 0,88</b>

<b>B</b>	<i>adg1-1</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adg1-1</i> t <sub>4h</sub>	<i>adg1-1</i> t <sub>48h</sub>	<i>adg1-1</i> (HL)	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>0</sub> (LL)	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>4h</sub>	<i>adg1-1/tpt-2</i> t <sub>48h</sub>	<i>adg1-1/tpt-2</i> (HL)
	<b>Relative Einheiten pro g FG</b>							
Galactinol	n.d.	0,31 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,47 ± 0,08	0,13 ± 0,03	0,46 ± 0,06	0,17 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Tyramin	0,44 ± 0,02	0,94 ± 0,08	0,64 ± 0,11	0,88 ± 0,09	0,53 ± 0,01	0,81 ± 0,12	0,69 ± 0,02	0,59 ± 0,03
DL-Ornithin	1,06 ± 0,05	2,07 ± 0,24	11,81 ± 1,38	1,25 ± 0,14	0,71 ± 0,06	0,95 ± 0,11	1,31 ± 0,09	1,25 ± 0,12

## Aminosäuregehalte

Tab. Anhang III: **Quantitative Bestimmung ausgewählter Aminosäuren** in Col-0 und *adg1-1/tpt-2* (A), *Ler* und *gin2-1* (B) bzw. *adg1-1/tpt-2/gin2-1* (C). Die Daten wurden mit Hilfe der HPLC aus Blattproben erhoben. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für ca. 20 Tage im Hochlicht ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , HL) auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit (Glc, Suc oder Fru) und ohne Zucker (MS) unter Langtagbedingungen (16/8 h). Die Proben wurden 5 h nach Beginn der Tagperiode genommen. Hervorgehobene Zahlen weisen auf die Aminosäuren hin, die im Ergebnisteil näher betrachtet wurden. Die Daten repräsentieren den MW  $\pm$  SF von 2 biologischen Replikaten.

A	Col-0				<i>adg1-1/tpt-2</i>			
	MS	Glc	Suc	Fru	MS	Glc	Suc	Fru
	<b>Aminosäuregehalte in <math>\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}</math> FG</b>							
Asparaginsäure	1,16 $\pm$ 0,04	2,27 $\pm$ 0,42	3,09 $\pm$ 0,45	1,05 $\pm$ 0,07	1,95 $\pm$ 0,19	1,65 $\pm$ 0,66	3,20 $\pm$ 0,22	3,14 $\pm$ 1,39
Glutaminsäure	4,47 $\pm$ 0,10	6,84 $\pm$ 0,75	10,18 $\pm$ 1,14	4,63 $\pm$ 0,22	4,49 $\pm$ 0,37	6,81 $\pm$ 2,44	14,26 $\pm$ 1,04	11,00 $\pm$ 4,37
Asparagin	<b>2,04 <math>\pm</math> 0,49</b>	<b>4,21 <math>\pm</math> 1,19</b>	<b>7,99 <math>\pm</math> 0,52</b>	<b>5,54 <math>\pm</math> 1,29</b>	<b>41,57 <math>\pm</math> 9,59</b>	<b>4,83 <math>\pm</math> 0,69</b>	<b>8,18 <math>\pm</math> 1,95</b>	<b>16,86 <math>\pm</math> 9,84</b>
Serin	4,39 $\pm$ 0,16	8,10 $\pm$ 2,11	10,09 $\pm$ 0,31	9,49 $\pm$ 1,60	4,24 $\pm$ 0,38	9,31 $\pm$ 0,36	10,82 $\pm$ 1,64	9,17 $\pm$ 0,83
Glutamin	8,18 $\pm$ 1,62	21,81 $\pm$ 6,85	40,25 $\pm$ 3,87	26,51 $\pm$ 5,39	32,57 $\pm$ 6,94	20,72 $\pm$ 2,98	35,80 $\pm$ 3,20	48,45 $\pm$ 21,94
Glycin	5,43 $\pm$ 1,69	8,09 $\pm$ 3,23	4,01 $\pm$ 0,64	10,48 $\pm$ 2,30	0,70 $\pm$ 0,28	7,61 $\pm$ 3,01	3,99 $\pm$ 1,00	5,12 $\pm$ 3,11
Histidin	0,25 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,09	0,65 $\pm$ 0,19	0,31 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01
Threonin	0,74 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,19	1,45 $\pm$ 0,11	0,86 $\pm$ 0,10	0,50 $\pm$ 0,14	1,20 $\pm$ 0,35	2,28 $\pm$ 0,02	1,87 $\pm$ 0,45
Alanin	1,96 $\pm$ 0,23	2,13 $\pm$ 0,59	4,17 $\pm$ 0,57	3,08 $\pm$ 0,71	2,33 $\pm$ 0,02	2,70 $\pm$ 0,66	5,69 $\pm$ 0,65	6,61 $\pm$ 2,04
Arginin	<b>4,59 <math>\pm</math> 1,09</b>	<b>3,15 <math>\pm</math> 1,18</b>	<b>2,70 <math>\pm</math> 1,15</b>	<b>4,37 <math>\pm</math> 1,30</b>	<b>21,42 <math>\pm</math> 5,82</b>	<b>5,53 <math>\pm</math> 0,44</b>	<b>3,80 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>7,99 <math>\pm</math> 1,50</b>
Tyrosin	0,04 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,03
Valin	0,23 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,14	0,68 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,08
Tryptophan	<b>0,15 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>0,03 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>0,03 <math>\pm</math> 0,00</b>	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>0,62 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>0,03 <math>\pm</math> 0,00</b>	<b>0,03 <math>\pm</math> 0,00</b>	<b>0,07 <math>\pm</math> 0,04</b>
Phenylalanin	0,13 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,09	0,16 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,03
Isoleucin	0,12 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,02
Leucin	0,06 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,07	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,06
Lysin	<b>0,21 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>0,44 <math>\pm</math> 0,16</b>	<b>0,21 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>0,36 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,24</b>	<b>0,68 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>0,52 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>0,60 <math>\pm</math> 0,25</b>

<b>B</b>	<i>Ler</i>				<i>gin2-1</i>			
	MS	Glc	Suc	Fru	MS	Glc	Suc	Fru
	Aminosäuregehalte in $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ FG							
Asparaginsäure	0,95 ± 0,04	1,09 ± 0,36	3,26 ± 0,13	1,83 ± 0,33	0,97 ± 0,15	2,15 ± 0,19	2,82 ± 0,14	1,44 ± 0,14
Glutaminsäure	3,62 ± 1,13	4,96 ± 1,31	11,88 ± 0,03	8,02 ± 1,17	3,82 ± 0,76	6,55 ± 10,2	8,98 ± 0,81	6,26 ± 0,21
Asparagin	<b>2,83 ± 0,88</b>	<b>4,79 ± 1,17</b>	<b>6,72 ± 3,04</b>	<b>8,06 ± 1,50</b>	<b>2,74 ± 0,99</b>	<b>3,89 ± 0,39</b>	<b>5,14 ± 0,38</b>	<b>7,07 ± 0,37</b>
Serin	4,17 ± 0,06	13,17 ± 0,54	13,98 ± 2,70	12,94 ± 2,47	3,35 ± 0,06	6,93 ± 0,79	9,26 ± 0,16	15,29 ± 4,17
Glutamin	8,60 ± 1,24	24,53 ± 4,06	32,21 ± 12,15	30,51 ± 8,66	9,30 ± 0,54	21,32 ± 0,83	28,81 ± 0,82	39,42 ± 1,95
Glycin	7,40 ± 3,12	22,43 ± 0,46	12,28 ± 0,91	19,55 ± 0,93	5,34 ± 2,10	6,85 ± 2,51	8,17 ± 1,02	12,91 ± 4,26
Histidin	0,18 ± 0,10	0,08 ± 0,02	0,19 ± 0,07	0,10 ± 0,06	0,18 ± 0,16	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,09
Threonin	0,43 ± 0,02	0,84 ± 0,25	1,94 ± 0,11	0,90 ± 0,07	0,26 ± 0,02	0,76 ± 0,08	1,15 ± 0,05	0,92 ± 0,03
Alanin	1,30 ± 0,46	4,00 ± 0,21	3,18 ± 0,64	5,40 ± 0,53	1,50 ± 0,61	1,98 ± 0,49	2,13 ± 0,33	4,45 ± 0,20
Arginin	<b>4,19 ± 1,38</b>	<b>2,80 ± 0,45</b>	<b>2,34 ± 1,08</b>	<b>2,29 ± 1,52</b>	<b>4,25 ± 2,56</b>	<b>1,20 ± 0,32</b>	<b>0,98 ± 0,36</b>	<b>3,22 ± 1,96</b>
Tyrosin	0,03 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,24 ± 0,12	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,01
Valin	0,20 ± 0,00	0,23 ± 0,05	0,54 ± 0,14	0,33 ± 0,03	0,19 ± 0,00	0,23 ± 0,03	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,02
Tryptophan	<b>0,24 ± 0,06</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,03 ± 0,00</b>	<b>0,04 ± 0,02</b>	<b>0,16 ± 0,07</b>	<b>0,06 ± 0,00</b>	<b>0,04 ± 0,01</b>	<b>0,07 ± 0,05</b>
Phenylalanin	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,13 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,23 ± 0,18	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02
Isoleucin	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,28 ± 0,07	0,12 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Leucin	0,04 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,21 ± 0,08	0,09 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Lysin	<b>0,25 ± 0,13</b>	<b>0,44 ± 0,07</b>	<b>0,44 ± 0,17</b>	<b>0,25 ± 0,13</b>	<b>0,37 ± 0,26</b>	<b>0,19 ± 0,01</b>	<b>0,20 ± 0,05</b>	<b>0,18 ± 0,09</b>

C	<i>adg1-1/tpt-2/gin2-1</i>			
	MS	Glc	Suc	Fru
	Aminosäuregehalte in $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ FG			
Asparaginsäure	1,83 ± 0,21	1,52 ± 0,60	3,45 ± 0,11	1,56 ± 0,58
Glutaminsäure	5,36 ± 0,29	6,00 ± 2,36	12,30 ± 0,01	6,72 ± 1,66
Asparagin	<b>19,34 ± 0,33</b>	<b>6,44 ± 0,86</b>	<b>9,38 ± 0,57</b>	<b>10,68 ± 0,55</b>
Serin	4,86 ± 0,13	7,61 ± 5,10	11,30 ± 0,58	16,05 ± 0,29
Glutamin	22,31 ± 0,45	19,89 ± 6,62	35,27 ± 3,93	50,59 ± 12,43
Glycin	1,20 ± 0,11	4,85 ± 3,21	5,49 ± 0,43	13,44 ± 0,01
Histidin	0,48 ± 0,02	0,31 ± 0,21	0,31 ± 0,05	0,49 ± 0,24
Threonin	0,64 ± 0,05	1,19 ± 0,76	2,11 ± 0,21	1,21 ± 0,35
Alanin	3,31 ± 0,22	3,89 ± 1,62	4,61 ± 0,66	4,91 ± 0,36
Arginin	<b>16,01 ± 0,31</b>	<b>6,24 ± 2,44</b>	<b>5,14 ± 1,08</b>	<b>9,13 ± 1,58</b>
Tyrosin	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,04	0,15 ± 0,05	0,05 ± 0,01
Valin	0,30 ± 0,01	0,37 ± 0,22	0,44 ± 0,03	0,45 ± 0,04
Tryptophan	<b>0,24 ± 0,01</b>	<b>0,05 ± 0,03</b>	<b>0,04 ± 0,01</b>	<b>0,16 ± 0,03</b>
Phenylalanin	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,08	0,19 ± 0,02	0,16 ± 0,00
Isoleucin	0,06 ± 0,00	0,16 ± 0,12	0,19 ± 0,02	0,14 ± 0,04
Leucin	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,09	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,01
Lysin	<b>0,43 ± 0,01</b>	<b>0,67 ± 0,58</b>	<b>0,48 ± 0,02</b>	<b>0,76 ± 0,34</b>

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Luisa Heinrichs, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig angefertigt wurde und alle von mir genutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben wurden. Ich versichere, dass die wörtlichen oder dem Sinne nach anderen Veröffentlichungen entnommenen Stellen von mir kenntlich gemacht wurden und dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat. Desweiteren bestätige ich, dass diese Dissertation, abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht worden ist.

Köln, den \_\_\_\_\_ Unterschrift \_\_\_\_\_  
(Luisa Heinrichs)

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Heinrichs, L. et al.**, 2012. The Mysterious Rescue of *adgl-1/tpt-2* - an *Arabidopsis thaliana* Double Mutant Impaired in Acclimation to High Light - by Exogenously Supplied Sugars. *Frontiers in Plant Science*, 3, Article 265, pp.1-18.

**Schmitz, J. et al.**, 2014. The essential role of sugar metabolism in the acclimation response of *Arabidopsis thaliana* to high light intensities. *Journal of Experimental Botany*, 65(6), pp.1619–1636.

**Häusler, R.E. et al.**, 2014. How Sugars Might Coordinate Chloroplast and Nuclear Gene Expression during Acclimation to High Light Intensities. *Molecular Plant*, 7, pp.1121–1137.