

Malat Metabolismus und die Rolle der
NADP-Malat Enzym Isoformen in der
C3-Modellpflanze *A. thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martina B. Zell

aus Gummersbach

April 2012

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Juli 2007 bis April 2012 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt und in Teilen publiziert.

Zell, M. B., Voll, L. and Maurino V. G. (2012). "Loss of cytosolic NADP-malic enzyme2 is associated with enhanced susceptibility to infection by *Colletotrichum higginsianum*" New Phytologist. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04129.x

Maier, A., M. B. Zell and V. G. Maurino (2011). "Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C4 and C3 photosynthesis." Journal of Experimental Botany 62(9): 3061-3069.

Elgass, K., Zell, M., Maurino, V. M., Schleifenbaum, F (2010). "Determination of the PSI/PSII ratio in living plant cells at room temperature by spectrally resolved fluorescence spectroscopy." Proc SPIE 2010, 7902 . DOI: 10.1117/12.873752

Zell, M. B., H. Fahnenstich, A. Maier, M. Saigo, E. V. Voznesenskaya, G. E. Edwards, C. Andreo, F. Schleifenbaum, C. Zell, M. F. Drincovich and V. G. Maurino (2010). "Analysis of Arabidopsis with Highly Reduced Levels of Malate and Fumarate Sheds Light on the Role of These Organic Acids as Storage Carbon Molecules." Plant Physiology 152(3): 1251-1262.

Prüfungsvorsitzende:

Prof. Dr. Karin Schnetz

Berichterstatter:

Dr. Verónica G. Maurino

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung:

20.06.2012

*"In einem Zeitalter, wo man Früchte oft vor der Blüte erwartet
und vieles darum zu verachten scheint, weil es nicht unmittelbar Wunden heilt,
den Acker düngt, oder Mühlräder treibt, [...] vergisst man,
dass Wissenschaften einen inneren Zweck haben und verliert das eigentlich
literarische Interesse, das Streben nach Erkenntnis, als Erkenntnis, aus dem Auge."*

Alexander von Humboldt
(1769-1859)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Kohlenstoffspeicherung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
1.1.1	Stärkefrei Mutanten in <i>A. thaliana</i>	9
1.2	Strukturelle Veränderungen der Chloroplasten durch C- Quellenmangel.....	11
1.2.1	<i>In vivo</i> Bestimmung der PSI/PSII-Ratio bei Raumtemperatur mit spektralauflösender Fluoreszenzspektroskopie.....	13
1.3	Die Bedeutung der organischen Säuren Malat und Fumarat als Kohlenstoffspeicher.....	15
1.3.1	Die Schlüsselrolle von Malat im Metabolismus von Pflanzen	15
1.3.2	Die Funktionen von Fumarat im Metabolismus von Pflanzen	18
1.3.3	Die Translokation zwischen den Zellkompartimenten und Metabolisierung von Malat	19
1.4	Malat-Enzyme in höheren Pflanzen	21
1.4.1	Enzyme der Synthese und des Abbaus von Malat	21
1.4.2	Isoformen des NADP-Malat-Enzyms	22
1.4.3	NADP-ME-Isoformen in C ₄ -Pflanzen	22
1.4.4	NADP-ME-Isoformen in C ₃ -Pflanzen	24
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	28
2.1.2	Geräte.....	29
2.1.3	Gen-Coexpression Netzwerk-Analyse.....	29
2.1.4	Statistische Analyse	29
2.2	Pflanzenanzucht	30
2.2.1	Pflanzenmaterial	30
2.2.2	Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Erde	30
2.2.3	Gewächshaus	30
2.2.4	Klimakammern	31
2.2.5	Selektion auf Erde.....	31
2.2.6	Oberflächensterilisation von <i>A.-thaliana</i> -Samen.....	32

2.2.7	Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Agar-Platten.....	32
2.2.8	Transformation von <i>A. thaliana</i> durch Vakuuminfiltration.....	32
2.2.9	Probennahme	33
2.3	Mikrobiologische Methoden	34
2.3.1	Escherichia-coli-Anzucht.....	34
2.3.2	Herstellung TSS-kompetenter <i>E. coli</i>	34
2.3.3	Transformation TSS-kompetenter <i>E. coli</i>	35
2.3.4	<i>Agrobacterium-tumefaciens</i> -Anzucht.....	35
2.3.5	<i>C. higginsianum</i> Infektions-Assay.....	36
2.4	Molekularbiologische Methoden	37
2.4.1	Extraktion und Präparation von DNA und RNA	37
2.4.2	Quantifizierung von DNA und RNA	41
2.4.3	Enzymatische Modifikation von DNA	42
2.4.4	Herstellung und Klonierung artifizieller MikroRNAs.....	43
2.4.5	Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierungen	46
2.5	Transgene Pflanzenlinien	54
2.5.1	Screening homozygoter transgener <i>A. thaliana</i>	54
2.5.2	Verwendete transgene Pflanzen.....	55
2.6	Physiologische Methoden	56
2.6.1	Bestimmung des Verhältnisses von Frischgewicht zu Trockengewicht	56
2.6.2	Bestimmung des Verhältnisses von Frischgewicht zu Fläche	57
2.6.3	Infiltration mit Elicitoren	57
2.7	Elektronenmikroskopie	58
2.7.1	Spurr-Einbettung von Blattgewebe.....	58
2.7.2	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie.....	60
2.8	Biochemische Methoden	60
2.8.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	60
2.8.2	Native PAGE	61
2.8.3	Messung der NADP-ME-Aktivität	62
2.8.4	Färbung der NADP-ME-Aktivität in nativen Gelen und Pflanzengeweben	64
2.8.5	Isolierung von Thylakoidmembranen.....	64
2.8.6	Blue-Native- PAGE	66

2.8.7	Determination der PR Gen-Transkript-Akkumulation	67
2.8.8	Bestimmung der freien Salicylsäure und Camalexin.....	68
2.8.9	Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mittels Luminometer.....	68
2.9	Messung der Metaboliten.....	69
2.9.1	Chlorophylle und Carotinoide	69
2.9.2	Bestimmung der Pyridin-Nucleotide in <i>A. thaliana</i>	70
2.9.3	Metaboliten-Analyse mittels GC-MS	72
2.9.4	Stärkefärbung.....	73
2.9.5	Bestimmung löslicher Zucker und Stärke.....	73
2.9.6	Bestimmung von Malat und Fumarat	75
2.10	Bestimmung der Assimilation und Respiration	77
2.10.1	Bestimmung der CO ₂ -Assimilation mittels IRGA.....	77
2.10.2	Bestimmung des respiratorischen Quotienten	78
3	Ergebnisse.....	82
3.1	Auswirkungen eines stark reduzierten Malat- und Fumarat-Gehalts in <i>A. thaliana</i>	82
3.1.1	Die Abhängigkeit des Phänotyp von Licht und Photoperiode.....	82
3.1.2	Photosynthetische Aktivität der MEm-Pflanzen.....	89
3.1.3	Metabolische Analyse der ME-Pflanzen	92
3.1.4	Bestimmung der Größe des Pyridin-Nukleotid-Pools	97
3.1.5	Die Substratnutzung in der Respiration der MEm-Pflanzen	100
3.2	Auswirkungen der NADP-ME-Überexpression in Stärkefreimutanten	101
3.3	Die biologische Funktion von NADP-ME2 in <i>A. thaliana</i>	107
3.3.1	Pflanzen mit modifizierter Expression von NADP-ME2	108
3.3.2	Der metabolisch Phänotyp der NADP-ME2-Mutanten	109
3.3.3	Analyse der transkriptionalen Coexpressions-Muster, die zusammen mit NADP-ME2 in die pflanzliche Immunantwort involviert sind	111
3.3.4	Die NADP-ME-Aktivität nach ausgelöster Abwehrreaktion in den Blättern.....	112
3.3.5	Die Infektion mit <i>C. higginsianum</i> in <i>nadp-me2</i>	116
3.3.6	PR-Gene-Expression und Salicylsäure- und Camalexin- Akkumulation	119
3.3.7	Das metabolische Profil nach Infektion mit <i>C. higginsianum</i>	121

3.3.8	Bestimmung der ROS-Produktion nach Inkubation mit flg22	125
3.4	Die Funktion von NADP-ME3 in <i>A. thaliana</i>	126
3.4.1	Isolierung und Untersuchung homozygoter T-DNA-Insertionslinien	126
3.4.2	Pollen-Tetraden in der <i>nadp-me3.2</i> -Linie.....	129
4	Diskussion	133
4.1	Die essenzielle Bedeutung organischer Säuren als Kohlenstoffquelle	133
4.1.1	Wachstum und morphologische Modifikation in KT-MEM-Pflanzen	133
4.1.2	Der Einfluss der MEM-Überexpression auf die Effizienz der Photosynthese und den NADP- und NAD-Spiegel während der Nacht.....	134
4.1.3	Die Veränderung der Akkumulation und Degradierung von Speicherkohlenstoffen in Abhängigkeit der Länge der Lichtperiode	135
4.1.4	Die Auswirkungen von Karbohydramangel kombiniert mit geringer Malat- und Fumarat-Konzentration	137
4.2	Die Funktion von NADP-ME2 in der Pathogenantwort von <i>A. thaliana</i>	139
4.3	Die Funktion von NADP-ME3 bei der Bildung von Pollen-Tetraden.....	142
4.4	Schlussfolgerung	145
5	Literaturverzeichnis	147
6	Anhang.....	158
7	Kurzzusammenfassung und Abstract.....	169
7.1	Kurzzusammenfassung	169
7.2	Abstract	169
8	Danksagung	171

1 Einleitung

1.1 Kohlenstoffspeicherung in *Arabidopsis thaliana*

In Pflanzen wird mehr als die Hälfte der Photoassimilate in Stärke umgewandelt und gespeichert (Sun et al., 1999; Zeeman und Rees, 1999). Die transitorische Stärke akkumuliert hierbei während der Lichtperiode im Stroma der Chloroplasten, um während der Dunkelperiode wieder mobilisiert zu werden (Taiz und Zeiger, 2008). Die dabei gewonnenen Abbauprodukte, hauptsächlich Glukose und Maltose, werden genutzt, um den Metabolismus und das Pflanzenwachstum auch während der Nacht mit Energie zu versorgen (Gibon et al., 2004; Lu et al., 2005; Gibon et al., 2009).

Unter Kurztagbedingungen (KT) werden in *Arabidopsis thaliana* mehr Assimilate in Stärke umgewandelt als unter Langtagbedingungen (LT) (Stitt et al., 1978; Gibon et al., 2004). Je länger demnach die Nacht, desto höher ist der Anteil an Photoassimilaten, die als Stärke gespeichert werden, um eine Versorgung während einer verlängerten Nachtperiode zu gewährleisten (Stitt et al., 1978; Gibon et al., 2004). Es werden während einer verlängerten Nachtperiode nie alle Kohlenstoffquellen abgebaut, einen kleinen Teil der Stärke und des Zuckers (Glukose, Fruktose und Saccharose) behält die Pflanze bis zum Ende der Nacht, sodass die Konzentration nicht auf null sinkt (Gibon et al., 2004).

In den Blättern wird die Stärkesynthese durch die Modulation der ADP-Glukose Pyrophosphorylase (AGPase) kontrolliert (Zeeman et al., 2007). AGPase katalysiert die ADP-abhängige Umwandlung von Glukose-1-Phosphat (Glc-1-P) zu ADP-Glukose (ADPG), wobei die Aktivität der AGPase durch den Gehalt an P_i als Inhibitor und 3-Phosphoglycerat (3-PGA) als Aktivator allosterisch kontrolliert wird (Preiss, 1988). Es konnte ebenso bestätigt werden, dass die AGPase-Aktivität Redox-

reguliert ist (Abb. 1.1) (Fu et al., 1998; Tiessen et al., 2002; Hendriks et al., 2003; Jin et al., 2005; Zeeman et al., 2007). In den Chloroplasten findet die Aktivierung der AGPase während des Tages statt, wohingegen sie während der Nacht inaktiviert wird (Hendriks et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus dafür sorgt, dass Intermediate, die während der Nacht dringend für den Erhalt des Stoffwechsels benötigt werden, nicht in die Stärkesynthese fließen (Zeeman et al., 2007).

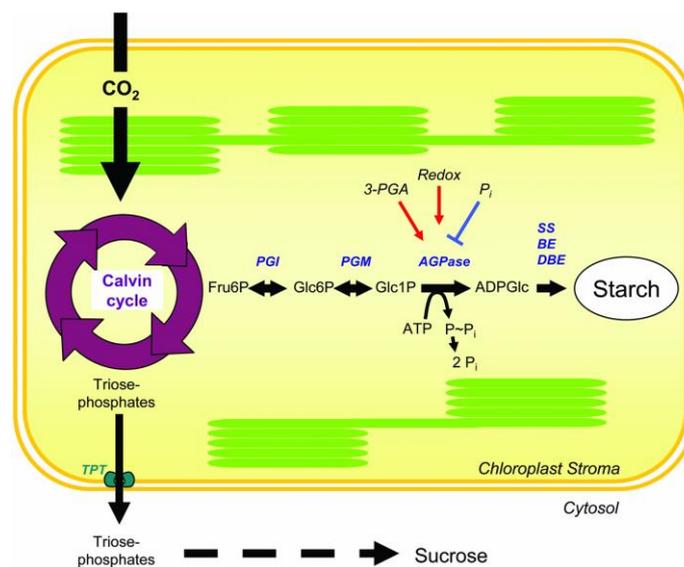


Abbildung 1.1: Der durch den Calvin-Benson-Zyklus assimilierte Kohlenstoff wird zu einem Teil in das Zytosol exportiert und dort für die Saccharosesynthese genutzt. Der andere Teil verbleibt im Chloroplasten und wird zu Stärke synthetisiert. Redox-Aktivierung und allosterische Regulation der AGPase kontrollieren den Flux der Synthese von Kohlenstoff in Stärke. Fru6P: Fructose-6-Phosphat; Glc1P: Glucose-1-Phosphat; Glc6P: Glucose-6-Phosphat; TPT: Triosephosphat/Phosphat-Translokator; PGI: Phosphoglucose-Isomerase; PGM: Phosphoglucose-6-Phosphat; AGPase: ADP-Glucose-1-Phosphatase; SS: Stärkesynthase; BE: „Branching“-Enzyme; DBE: „Debranching“-Enzyme (Zeeman et al., 2007).

1.1.1 Stärkefrei Mutanten in *A. thaliana*

Ein Ungleichgewicht zwischen Akkumulation und Degradierung von Stärke entsteht, wenn nicht genügend Kohlenstoffquellen zur Verfügung stehen und/oder die Nachtperiode stark verlängert ist (Fahnenstich et al., 2007). In *A. thaliana* ist eine Reduktion oder gar ein Fehlen von transitorischer Stärke keinesfalls letal für die Pflanze. Aber die Bedeutung der Bereitstellung von Kohlenstoffquellen wird bei der Betrachtung von Mutanten mit einem Defekt in der Synthese oder bei Degradierung

von Stärke deutlich. Es sind einige Mutanten mit einem sehr geringen Stärkegehalt bekannt und bereits gut charakterisiert worden. *Adg*-Mutanten besitzen keine Stroma-lokalisierte AGPase-Aktivität, woraus ein Defizit in der Stärkeakkumulation resultiert. Die Mutante *adg1* besitzt eine Missense-Mutation in der kleinen Untereinheit des heterotetramerschen Enzyms, die zu einem Austausch der Aminosäure 92 zu Arginin anstelle von Glycin führt (Wang et al., 1997; Wang et al., 1998). *Sft1*- und *pgm1*-Mutanten sind nicht in der Lage, die von der plastidär lokalisierten Phosphoglucose-Mutase (PGM) katalysierte Konvertierung von Glukose-6-Phosphat (Glc-6-P) zu Glukose-1-Phosphat durchzuführen (Abb. 1.1) (Caspar et al., 1985; Kofler et al., 2000). Die Auswirkung ist für beide Mutanten ein Fehlen von Stärke in den Blättern unter jeglichen Wachstumsbedingungen. *Sft1* und *pgm1* haben eine Mutation im selben Gen-Lokus, der Unterschied zwischen den beiden Mutanten besteht in der abweichenden Art der Mutation. *Pgm1* hat eine Punktmutation im sechsten Exon, was ein vorzeitiges Stoppsignal zur Folge hat (TGG => TGA Stopp-Codon). *Sft1* hat eine 55 Basenpaar große Deletion am Translationsbeginn (Caspar et al., 1985; Kofler et al., 2000). In Stärkefrei-Mutanten akkumulieren Zucker zu hohen Konzentrationen während der Lichtperiode, die dann rapide in den ersten Stunden der Nacht wieder abgebaut werden (Caspar et al., 1985). Da die freien Zucker nun verbraucht sind und keine Kohlenhydrate aus Stärke verfügbar sind, muss die Pflanze nun auf andere Kohlenstoffquellen zurückgreifen. Bei einer verlängerten Nachtperiode verstärkt sich dieser Versorgungsengpass und die Pflanze reagiert auf diese nur ungenügende Versorgung mit C-Quellen mit einem retardierten Wachstum (Wang et al., 1998; Gibon et al., 2004; Stitt et al., 2007). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Transport von Glukose-6-Phosphat mithilfe eines plastidären Glc-6-P/Phosphat-Translokator (GPT) in das Stroma und die

anschließende Konvertierung in Glc-1-P mittels der plastidären Phosphoglucose-Isomerase (PGI) an dieser Kompensierung beteiligt sind (Kunz et al., 2010).

Nicht nur das Rosettenwachstum hat sich im Vergleich zum Wildtyp in den Stärkefreimutanten verändert, auch das 24-Stunden-Wachstum der Blätter (diel leaf growth) zeigt deutliche Unterschiede (Wiese et al., 2007). Untersuchungen an der *sft1*-Mutante zeigen im Vergleich zum Wildtyp ein verstärktes Wachstum am Nachmittag, das auf die Verfügbarkeit von freien Hexosen zurückzuführen ist. Hingegen ist das Blattwachstum in der *sft1*-Mutante gegen Ende der Nacht stark reduziert, da die Kohlenhydrate benutzt werden, um die Grundfunktionen des Metabolismus aufrechtzuerhalten (Wiese et al., 2007).

1.2 Strukturelle Veränderungen der Chloroplasten durch C-Quellenmangel

Im Inneren besitzen Chloroplasten, entsprechend dem Zytosol der Cyanobakterien, eine plasmatische Matrix, das sogenannte Stroma. Durchzogen wird diese Stroma von den Thylakoiden, photosynthetischen Membranen, die eine heterogene Morphologie von gestauchten und nicht-gestauchten Membrandomainen, den Grana- und den Stroma-Lamellen, aufweisen (Andersson und Anderson, 1980; Anderson et al., 2008). Granastapel sind für die Photosynthese nicht notwendig, dennoch sind sie in allen höheren Pflanzen, die Chlorophyll b besitzen, vorhanden (Anderson et al., 2008). Eingebettet in die Thylakoidmembran sind die Photosysteme, das sind Proteinkomplexe, in denen Lichtreaktion der Photosynthese stattfindet (Spencer, 1962). Es gibt zwei Typen von Photosystemen: Photosystem I (PSI) nutzt blaues, rotes und dunkelrotes Licht, während Photosystem II (PSII) mehr blaues als rotes und kein dunkelrotes Licht absorbiert (Allen und Forsberg, 2001). Die Verteilung der

Photosysteme in der Thylakoidmembran ist ebenfalls unterschiedlich. Während mehr PSII in der Grana zu finden sind, sind die Stromalamellen reich an PSI (Abb. 1.2) (Anderson und Andersson, 1988). Diese Verteilung ist jedoch nicht rigide, da PSII innerhalb der Thylakoidmembran beweglich ist (Allen und Forsberg, 2001). Landpflanzen besitzen normalerweise mehr PSII als PSI. Jedoch führen morphologische Adaptionen der Chloroplasten an Schwachlicht oder Schatten, wie zum Beispiel die Verringerung der PSII-Komplexen, die jedoch größere Lichtharvesting-Antennen ausbilden, dazu, dass im Vergleich mit Pflanzen, die im Hochlicht oder Sonnenlicht gewachsen sind, eine erhöhte PSI/PSII-Ratio festgestellt werden kann. Es konnte außerdem mehrfach beobachtet werden, dass einige Schatten-, Schwachlicht- und Kohlenstoffdefizit-Pflanzen mehr Thylakoidmembranen pro Grana aufweisen als Pflanzen, die unter Sonnenlicht oder Hochlicht gewachsen sind (Lichtenthaler et al., 1981; Anderson, 1986; Anderson et al., 1988). So zeigen die beiden Mutanten *pgm1* und *adg1*, die beide einen Defekt in der Stärkebiosynthese und somit einen Engpass in der Kohlenstoffversorgung während der Nacht haben, eine Veränderung der Chloroplasten, die eine Adaption an Schwachlicht nachahmt (Hausler et al., 2009). Die Chloroplasten zeigen eine erhöhte Dichte von Thylakoidmembranen, welche unregelmäßig und nicht planar angeordnet sind. Diese Veränderungen der Ultrastruktur der Chloroplasten ist typisch für Schattenpflanzen und ist bei diesen auf eine Effizienzerhöhung der Lichtabsorption bei Schwachlicht zurückzuführen (Boardman, 1977; Anderson, 1999).

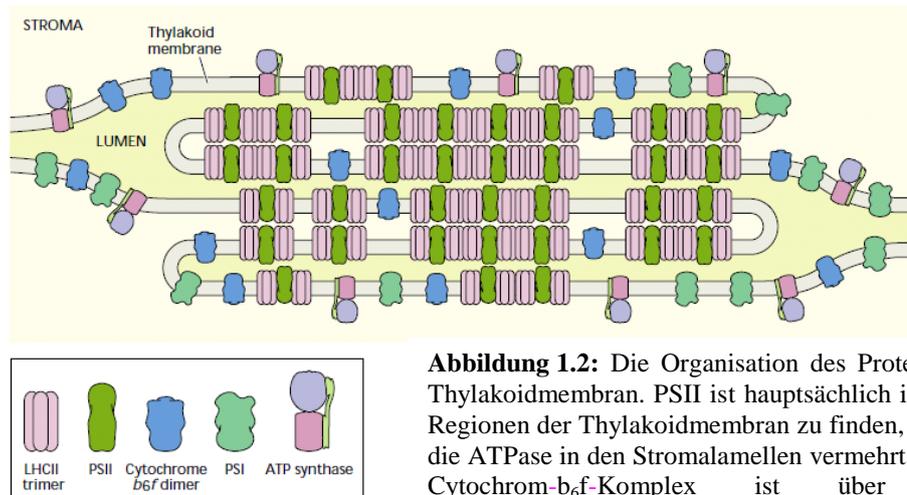


Abbildung 1.2: Die Organisation des Proteinkomplexes der Thylakoidmembran. PSII ist hauptsächlich in den gestapelten Regionen der Thylakoidmembran zu finden, während PSI und die ATPase in den Stromalamellen vermehrt vorkommen. Der Cytochrom- b_6/f -Komplex ist über die ganze Thylakoidmembran verteilt (Allen und Forsberg, 2001).

1.2.1 *In vivo* Bestimmung der PSI/PSII-Ratio bei Raumtemperatur mit spektralauflösender Fluoreszenzspektroskopie

Um mehr über die Kompensation von *A. thaliana* bei einem Licht- und/oder Kohlenstoffdefizit und der damit zusammenhängenden Erhöhung der Thylakoiddichte in den Chloroplasten zu erfahren, wurde eine nicht-invasive *In-vivo*-Methode zur Bestimmung der PSI/PSII-Ratio („spectra recorded *in vivo* at room temperature“; SART Spektroskopie) in Zusammenarbeit mit der AG Schleifenbaum, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, entwickelt (Elgass et al., 2011). Änderungen in der Struktur und Zusammensetzung der Chloroplastenmembran werden hauptsächlich durch die Lichtbedingungen, die Photoperiode und die Kohlenstoffversorgung der Pflanzen beeinflusst (Anderson, 1999). Und es kann angenommen werden, dass mit der strukturellen Veränderung oft auch eine veränderte PSI/PSII-Ratio korreliert, da die Photosysteme in der Thylakoidmembran nicht gleichmäßig verteilt sind. Grana ist reich an PSI, während PSII vermehrt in den Stromalamellen anzutreffen ist (Allen und Forsberg, 2001). Mithilfe des Fluoreszenzspektrums des Chlorophylls der Chloroplasten ist es möglich, das Verhältnis der Photosysteme zu bestimmen. Das Fluoreszenzspektrum der

Photosysteme besteht im Wesentlichen aus der Emission des Antennenmoleküls Chl a, das durch Bindung in den Proteinkomplex ein verändertes Absorptionsspektrum zu extrahiertem Chl a aufweist (Krause und Weis, 1991). Das Fluoreszenzspektrum der Photosysteme wird durch den Hauptpeak des PSII bei 683 nm und den langen Schulterpeak des PSI von 700 bis 750 nm charakterisiert (Abb. 3.3.1) (Krause und Weis, 1991). Das Fluoreszenzspektrum von PSI und PSII ist bei Raumtemperatur kaum voneinander zu unterscheiden, da der Energietransfer zu der Komponente mit der größeren Rotlichtverschiebung verläuft. Aus diesem Grund wird hauptsächlich die Fluoreszenz des PSII detektiert (Krause und Weis, 1991). Um die Spektren besser voneinander unterscheiden zu können und die PSI/PSII-Ratio zu bestimmen, wurden die spektroskopischen Messungen bisher immer bei sehr niedrigen Temperaturen (77 K) in isolierten Chloroplasten durchgeführt. Diese Messmethode birgt aber einige Probleme in sich, da die Aktivität in isolierten Chloroplasten stark abnimmt und durch die Prozedur der Isolation beeinflusst werden kann (Andersen et al., 1972). Daher wurde eine Methode entwickelt, mit der bei Raumtemperatur und *in vivo* mittels eines konfokalen Laserrastermikroskops mit einer multiplen Anregungsquelle, einem Spektrometer und einer FLIM-Option („Fluorescence-lifetime Imaging Microscopy“) das Verhältnis der beiden PS bestimmt werden kann (Elgass et al., 2011).

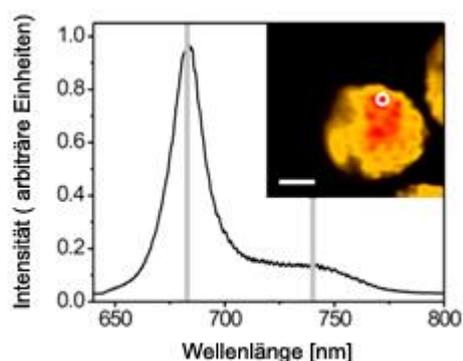


Abbildung 3.3.1:

Frequenzauflösendes Fluoreszenzspektrum der MEM-Pflanzen-Chloroplasten. Das konfokale Bild zeigt die zugehörige 2-D-Fluoreszenzintensitätsabbildung des Chloroplasten und den Bereich, in dem das Spektrum aufgezeichnet wurde (weißer Kreis). Die weiße Skalierungslinie repräsentiert 2 µm.

1.3 Die Bedeutung der organischen Säuren Malat und Fumarat als Kohlenstoffspeicher

1.3.1 Die Schlüsselrolle von Malat im Metabolismus von Pflanzen

Äpfelsäure ist eine Dicarbonsäure, die zwei stereometrische Isoformen besitzen kann (D- und L-Enantiomer), wobei nur die L-Form in der Natur vorkommt. Unter einem physiologischen pH-Wert (pH 8 im Stroma) liegt Äpfelsäure in ihrer dianionischen Form als Salz (Malat) vor (Martinoia und Rentsch, 1994). Malat ist in nahezu allen pflanzlichen Geweben vertreten und besitzt Schlüsselrollen in ihrem Metabolismus. Es ist an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen, wie beispielsweise der Bereitstellung von NADH für die Nitratreduktion im Zytosol, der Regulation der Stomatabewegung (Hedrich et al., 1994; Lee et al., 2008), der Photorespiration, der Kontrolle des zellulären pH-Wertes (Mathieu et al., 1986), der Redox-Homöostase und dem Transport von Reduktionsäquivalenten zwischen den Zellkompartimenten, beteiligt (Lance und Rustin, 1984). Außerdem ist Malat eine wichtige Quelle für Kohlenstoffgerüste und NADPH bei der Fettsäurebiosynthese (Martinoia und Rentsch, 1994). In allen Pflanzen ist Malat ein Intermediat des Zitratzyklus in den Mitochondrien, des Glyoxylatzyklus in den Glyoxysomen und in C₄- und CAM-Pflanzen zudem ein wichtiger Metabolit, das der CO₂-Fixierung dient (Beevers, 1961; Jiao und Chollet, 1991). Malat wird von Pflanzen als Trägermolekül von Reduktionsäquivalenten zwischen den Organellen und dem Zytoplasma genutzt, da reduzierte Pyridinnukleotide für Membranen impermeabel sind (Scheibe, 2004). In den Chloroplasten reguliert das sogenannte Malat-Ventil, ein Mechanismus, an dem die plastidäre NADP-Malat-Dehydrogenase (NADP-MDH) und ein Malat-Oxalacetat-Translokator beteiligt sind, die Balance des ATP/NADP-Verhältnisses (Scheibe, 2004). Überschüssiges NADPH wird von der NADP-MDH genutzt, um aus Oxalacetat (OAA) Malat zu konvertieren. Das hierbei entstandene NADP

inhibiert seinerseits wiederum die NADP-MDH (Scheibe, 1991). So wird NADP als Elektronenakzeptor für die photosynthetische Elektronentransportkette regeneriert, damit die ATP-Synthese weiterläuft, hierbei werden Elektronen zum Malat transferiert. Demzufolge spielt Malat eine Schlüsselrolle in seiner Funktion als Elektronenakzeptor und trägt dabei zur Erhaltung der Redox-Homöostase über das sogenannte Malat-Ventil bei (Scheibe, 1991, 2004; Scheibe et al., 2005).

In C₃-Pflanzen wird Malat während des Tages bis zu einem Schwellenwert akkumuliert und dann in die Vakuole transportiert (Emmerlich et al., 2003; Hurth et al., 2005). Die Aufnahmen von Malat in die Vakuole erlaubt es den Pflanzen, Malat in sehr hohen Konzentrationen (≤ 300 mM) zu akkumulieren und trotzdem die Konzentration im Zytoplasma konstant zu halten (Winter et al., 1994). Aus diesem Grund steigt die zytosolische Malat-Konzentration in Pflanzen während der Lichtperiode nur leicht an (2–5 mM) und sinkt in der Dunkelheit gleichermaßen nur leicht ab (1–3 mM) (Gerhardt et al., 1987; Chang und Roberts, 1991). Aktuelle Studien zeigen, dass die Malat-Konzentration einem zirkadianen Rhythmus unterliegt (Fahnenstich et al., 2007). Wobei der Transport von Malat in die Vakuole während der Dunkelperiode stoppt und bereits akkumuliertes Malat wieder freigesetzt wird, sodass ihre Konzentration bis zum Ende der Nacht dramatisch absinkt (Martinoia und Rentsch, 1994; Fahnenstich et al., 2007; Araujo et al., 2011). Die interne Malat-Konzentration kann durch tageszeitabhängige Schwankungen, aber auch durch äußere Einflüsse längerfristig verändert werden. So wurde eine Erhöhung der Malat-Konzentration unter anoxischen Bedingungen durch Überflutung der Pflanzen, Gewebeverletzung, SO₂-Belastung, Fraßschäden und einen hohen Salzgehalt im Boden beobachtet (Lance und Rustin, 1984). Kürzlich veröffentlichte transgene Linien von *A. thaliana*, die eine Überexpression des C4-plastidären Mais (*Zea mays*) NADP-Malat Enzym unter der Kontrolle eines CaMV-

35S-Promoters besitzen (MEM-Pflanzen), zeigen eine reduzierte Konzentration an Malat und Fumarat (Fahnenstich et al., 2007). Dieses Enzym katalisiert die oxidative Decarboxylierung von Malat unter Abgabe von Pyruvat, CO₂ und NADPH (Maurino et al., 1996). Die MEM-Pflanzen zeigen eine verfrühte dunkel-induzierte Seneszenz, die durch Zugabe von Glukose, Saccharose oder Malat aufgehoben werden kann. Dies deutet darauf hin, dass ein Mangel an schnell umsetzbaren Kohlenstoffquellen für die verfrühte Seneszenz verantwortlich ist. Dementsprechend sind Malat und Fumarat die einzigen beiden Metabolite, deren Konzentrationen in den MEM-Pflanzen signifikant reduziert sind, die sich aber nach Zugabe von Glucose wieder auf Wildtyp-Niveau einpendeln (Fahnenstich et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass der niedrige Malat- und Fumarat-Gehalt der Pflanzen, die unter LT-Bedingungen gewachsen sind, in ihre Morphologie, der photosynthetischen Aktivität und den Wachstumsparametern nicht beeinflusst (Fahnenstich et al., 2007).

Malat hat außerdem eine extrazelluläre Rolle. Es wird postuliert, dass Malat in die Pathogenantwort involviert ist, da es nach Elizitation verstärkt im Apoplasten von *A. thaliana* nachgewiesen werden kann (Bolwell, 1999; Bolwell et al., 2002; Rio et al., 2009). Des Weiteren wird Malat von Pflanzenwurzeln exkretiert. Zum einen geschieht dies, um nützliche Rhizobakterien (*Bacillus subtilis*) anzulocken, welche in der Lage sind, pathogene Mikroorganismen (*Pseudomonas syringae* pv *tomato* [Pst DC3000]) abzuwehren (Rudrappa et al., 2008). Zum anderen konnte beobachtet werden, dass die Aluminiumtoleranz in *A. thaliana* mit dem Ausscheiden von organischen Säuren wie dem Malat korreliert. An dem Transport aus den Wurzeln sind scheinbar zwei Transporter der ALMT-Familie (*AtALMT1*) und der „Multi-drug“ und „toxic compound extrusion“-Familie (*AtMATE*) beteiligt, jedoch ist bisher unklar, wie und woher das ausgeschiedene Malat im Malat-Pool in den Wurzeln ersetzt wird (Hoekenga et al., 2006; Liu et al., 2009; Ryan und A Delhaize, 2010).

1.3.2 Die Funktionen von Fumarat im Metabolismus von Pflanzen

Die Dicarbonsäure Fumarat ist ein Intermediat des Zitratzyklus und in eine Vielzahl metabolischer Prozesse und Funktionen involviert (Ferne et al., 2004). Sie entsteht durch die Oxidation von Succinat und der gleichzeitigen Reduktion von Ubiquinon zu Ubiquinol durch die Succinat-Dehydrogenase (SDH) (Figueroa et al., 2001). Fumarat wird durch die Fumarase subsequent in Malat umgewandelt (Hägerhäll, 1997; Nunes-Nesi et al., 2005; Pracharoenwattana et al., 2007). In *A. thaliana* wurden zwei Fumarasen identifiziert, die mitochondriale FUM1 und die zytosolische FUM2 (Heazlewood und Millar, 2005; Pracharoenwattana et al., 2007).

Bedingt durch ihre chemische Ähnlichkeit ist es oft nicht möglich, die biologischen Funktionen von Fumarat und Malat voneinander zu trennen und klar zu unterscheiden (Araujo et al., 2011). Ebenso wie für Malat wird auch für Fumarat eine Rolle als alternative Kohlenstoffquelle für Photosynthate angenommen, da Fumarat gleichfalls während des Tages akkumuliert und während der Nacht wieder abgebaut wird (Chia et al., 2000; Fahnenstich et al., 2007; Pracharoenwattana et al., 2007; Tschöep et al., 2009). Die Menge an akkumuliertem Kohlenstoff in Form von Fumarat kann weit über 10 μmol pro mg Frischgewicht Blattgewebe erreichen und ist in photosynthetisch aktiven Pflanzengeweben während des Tages in weit höherer Konzentration vorhanden als Stärke und Zucker (Chia et al., 2000; Fahnenstich et al., 2007; Pracharoenwattana et al., 2007). Interessanterweise wird in stärkefreien *pgm1*-Mutanten mehr Fumarat während des Tages akkumuliert als in *wt*, was wiederum auf eine Rolle des Fumarat als Kohlenstoffspeicher, ähnlich der Stärke, schließen lässt (Chia et al., 2000; Araujo et al., 2011).

Neben der Rolle als Kohlenstoffquelle wird sowohl Malat als auch Fumarat eine regulatorische Funktion des pH-Wertes während der Nitrat-Atmung zugeschrieben

(Scheible et al., 2000; Tschoep et al., 2009). So konnte gezeigt werden, dass in *A. thaliana*-Blättern geringe Mengen an Fumarat oder Malat akkumulieren, wenn die Pflanzen auf niedrigem Nitratgehalt und/oder Ammoniumgehalt wachsen (Tschoep et al., 2009). Jedoch ist die genaue Beziehung zwischen dem organischen Säure-Metabolismus, der Nitrat-Atmung und der Aufteilung der Photosynthate noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt worden.

1.3.3 Die Translokation zwischen den Zellkompartimenten und Metabolisierung von Malat

Malat ist in allen Kompartimenten der Zelle vorhanden. Es wird abhängig von unterschiedlichen, spezifischen Membrantransportern, die den Transport zwischen den Zellkompartimenten bewerkstelligen, durch verschiedene Enzyme der Synthese oder der Degradierung entsprechend konvertiert. Der essenzielle Charakter von Malat zeigt sich auch durch die hohe Anzahl von Transportsystemen, die am Austausch von Malat zwischen den Organellen beteiligt sind (Taniguchi et al., 2002; Emmerlich et al., 2003; Renné et al., 2003; Scheibe, 2004). So wird die Aufnahme von zytosolisch akkumuliertem Malat von einem Dicarboxylat/Zitrat-Transporter übernommen (Emmerlich et al., 2003). Über einen Malat-OAA-Translokator kann Malat aus dem Chloroplasten in das Zytosol transportiert werden (Taniguchi et al., 2002). Von dort aus kann es wiederum zurück zu OAA konvertiert werden, um NADH für die Nitratreduktion zu gewinnen (Ferne und Martinoia, 2009). Erst kürzlich entdeckte mitochondriale und plastidäre NAD^+ -Transporter zeigen, dass neben dem Transport durch Carboxylsäuren auch andere Transportwegen für Nukleotide offenstehen. Jedoch hat die Bedeutung des Malat-Ventils weiterhin Bestand, da gegenwärtig noch keine NADP^+ -Transporter identifiziert werden konnten und die beiden charakterisierten NAD^+ -Transporter kein NADP(H)

transportieren (Palmieri et al., 2010). Vom Zytosol aus kann Malat über verschiedene Transportmechanismen in die Mitochondrien gelangen, es kann aber auch in die Wurzeln transportiert oder in der Vakuole gespeichert werden (Martinoia und Rentsch, 1994).

Der bereits charakterisierte Dicarboxylat/Zitrat-Transporter bleibt aber nicht der einzige Weg, um Malat in die Vakuole zu transferieren (Emmerlich et al., 2003; Hurth et al., 2005). Mutanten mit einem defekten Dicarboxylat/Zitrat-Transporter (*AtDT*-Mutanten) zeigen eine reduzierte Konzentration an vakuolärem und zytosolischem Malat und Fumarat gegenüber *wt*-Pflanzen, ansonsten aber keinen morphologischen Phänotypen (Emmerlich et al., 2003; Hurth et al., 2005). Da bereits ein weiterer Kanal für den Transport von Malat, der zur Familie der Aluminium-aktivierten Malat-Transporter (ALMT) gehört, im Tonoplasten identifiziert und charakterisiert wurde, liegt die Vermutung nahe, das Kanal und Transporter sich bei Verlust zumindest teilweise kompensieren können (Kovermann et al., 2007).

Neben den vakuolären Malat-Transportern gibt es eine Vielzahl weiterer Transportwege für Malat in *A. thaliana*. Das bereits sehr gut charakterisierte Malat-OAA-Shuttle zwischen Zytosol und Mitochondrien, an dem die zytosolische und die mitochondriale MDH beteiligt sind, ist nicht der einzige metabolische Transportweg, in den Malat involviert ist (Martinoia und Rentsch, 1994; Pastore et al., 2003). Daneben wurden bis jetzt drei Dicarboxylat- und ein Dicarboxylat/Tricarboxylat-Carrier der mitochondrialen Carrierfamilie gefunden (Picault et al., 2002; Palmieri et al., 2010).

Des Weiteren wurden gegenwärtig zwei neue Transporter der ALMT-Familie in Schließzellen von *A. thaliana* charakterisiert (Meyer et al., 2010; Meyer et al., 2011; Roelfsema et al., 2012). ALMT6 und ALMT12 werden beide in Schließzellen exprimiert, ALMT12 in der Plasmamembran und ALMT6 im Tonoplast (Meyer et

al., 2010; Meyer et al., 2011). Für ALMT12 konnte außerdem gezeigt werden, dass es ein Malat-sensitiver R-Typ-Anionenkanal ist (Meyer et al., 2010). ALMT6 hat anscheinend eine Funktion als Malat-Influx- oder -Efflux-Kanal, der vom Membranpotenzial im Tonoplasten abhängig ist (Meyer et al., 2011).

1.4 Malat-Enzyme in höheren Pflanzen

1.4.1 Enzyme der Synthese und des Abbaus von Malat

Bekannte Enzyme, die an der Synthese von Malat beteiligt sind, sind die Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (MDH), die Fumarase (EC 4.2.1.2) und die Malat-Synthase (EC 4.1.3.2). Am Abbau von Malat sind die MDH-Enzyme, das NAD-Malat-Enzym (EC 1.1.1.39) und das NADP-Malat-Enzym (EC 1.1.1.40) beteiligt.

Alle diese Enzyme, die an der Synthese und dem Abbau von Malat beteiligt sind, existieren als Isoenzyme und sind in allen Hauptbestandteilen der Zelle vorhanden. Die MDH katalysiert die Reaktion von L-Malat zu Oxalacetat und ist in Mitochondrien ein wichtiges Enzym des Zitratzyklus. Eine Isoform der MDH ist in den Glyoxisomen lokalisiert, wo sie am Glyoxylatzyklus beteiligt ist. Ebenfalls ein essenzielles Enzym, das sowohl zytosolisch als auch mitochondrial lokalisiert ist und dort Teil des Zitratzyklus ist, ist die Fumarase (Chia et al., 2000; Araujo et al., 2011). Sie katalysiert die Addition von H₂O an Fumarat unter Gewinnung von Malat bzw. die entsprechende Rückreaktion. Die Malat-Synthase katalysiert aus Glyoxylat und Acetyl-CoA unter Hydrolyse des CoA-Thioesters im Glyoxylatzyklus-Malat. Malat-Enzyme (MEs) katalysieren die oxidative Decarboxylierung von L-Malat, bei der Pyruvat, CO₂ und NAD(P)H produziert wird, wobei das (NAD-ME) für seine enzymatische Aktivität stets zweiwertige Kationen wie zum Beispiel Mg²⁺ oder Mn²⁺ benötigt (Tronconi et al., 2008). In *A. thaliana* wurden zwei Isoformen des NAD-

ME, *AtNAD-ME1* (At2g13560) und *AtNAD-ME2* (At4g00570) in Mitochondrien lokalisiert, wo sie an der Respiration von Malat beteiligt sind (Tronconi et al., 2008). Das dabei entstandene Pyruvat wird anschließend vom Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHC) zu Acetyl-CoA umgewandelt und dann über die Citrat-Synthase mit Oxalacetat (OAA) kondensiert, um Zitrat zu bilden. Angesichts dessen wird angenommen, dass das NAD-ME zusammen mit der MDH eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle des Durchflusses der Intermediate innerhalb des Zitratzyklus einnimmt (Grover et al., 1981). Darüber hinaus bekamen NAD- und NADP-ME im Zuge der Evolution der C₄-Photosynthese spezifische Funktionen bei der Freisetzung von CO₂ von Malat in den Bündelscheidenzellen der Mitochondrien und Chloroplasten. Abgesehen von dieser spezialisierten Rolle in der C₄-Photosynthese ist die Funktion der anderen NADP-ME-Isoformen weitgehend unklar.

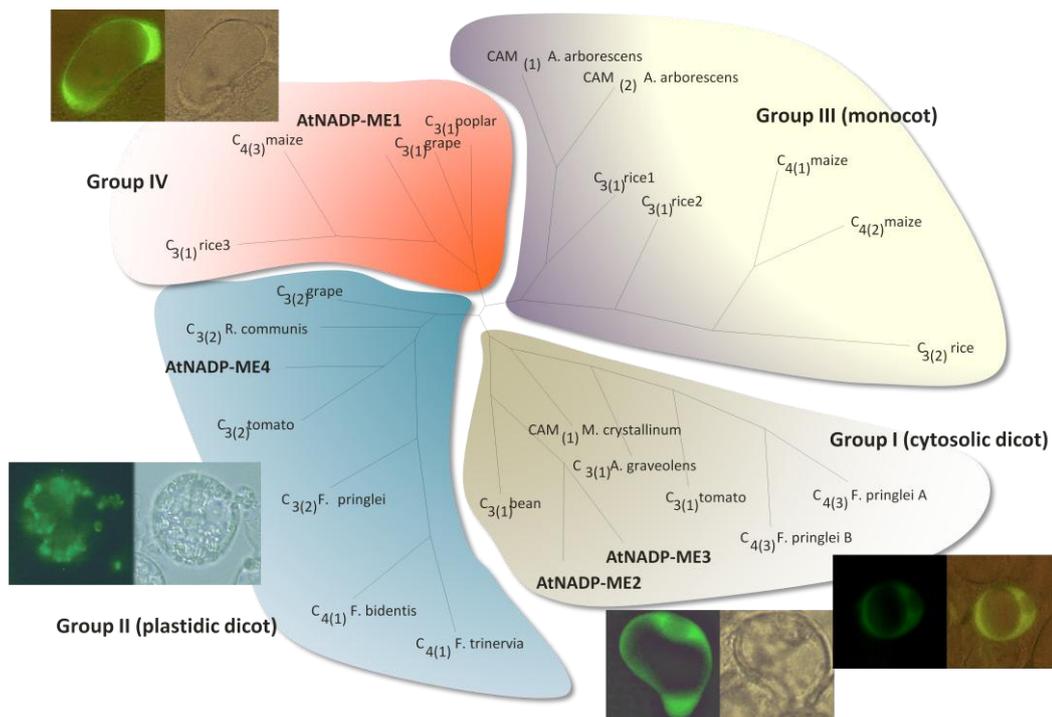
1.4.2 Isoformen des NADP-Malat-Enzyms

Die NADP-MEs der Pflanzen können in vier phylogenetische Gruppen eingeteilt werden: die zytosolische dikotyledonen Gruppe (Gruppe I), die plastidäre dikotyledonen Gruppe (Gruppe II), die monokotyledonen Gruppe (Gruppe III) und die erst kürzlich gefundene Gruppe IV, in der sowohl Enzyme von Monokotyledonen als auch von Dikotyledonen sind (Abb. 1.3) (Drincovich et al., 2001; Gerrard Wheeler et al., 2005; Gerrard Wheeler et al., 2009).

1.4.3 NADP-ME-Isoformen in C₄-Pflanzen

In Pflanzen ist NADP-ME vor allem für seine Rolle in der Photosynthese von C₄- und CAM-Pflanzen (Crassulacean acid metabolism) bekannt, bei der von ME freigesetztes CO₂ von Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) fixiert wird (Rothermel und Nelson, 1989; Taiz und Zeiger, 2008). Die beiden

Isoformen in C₄- und CAM-Pflanzen sind, obwohl sie analoge Rollen in der Photosynthese besitzen, unterschiedlich in ihrer subzellulären Lokalisation. Das C₄-NADP-ME ist in Chloroplasten der Bündelscheidezellen, das CAM-NADP-ME zytosolisch präsent (Saitou et al., 1994; Maurino et al., 1996; Honda et al., 1997; Maurino et al., 1997; Honda et al., 2000). Zusätzlich zu dem in den Chloroplasten der Bündelscheidezellen vorhandenen NADP-ME besitzen C₄-Pflanzen weitere NADP-ME-Isoformen (Maurino et al., 1996; Maurino et al., 1997; Maurino et al., 2001; Tausta et al., 2002; Saigo et al., 2004; Lara et al., 2005). In den monokotyledonen Maispflanzen und in den dikotyledonen *Flaveria bidentis* (beides C₄-Pflanzen) konnte, unabhängig voneinander, eine nicht-photosynthetische plastidäre Isoform des NADP-ME identifiziert und charakterisiert werden (Marshall et al., 1996; Maurino et al., 1996; Maurino et al., 1997; Maurino et al., 2001). Diesen sowohl in etiolierten Blättern als auch in Wurzeln gefundenen Enzymen wird eine „Housekeeping“-Funktion zugeschrieben (Maurino et al., 1996; Maurino et al., 1997; Maurino et al., 2001; Saigo et al., 2004; Maurino et al., 2009). Des Weiteren scheint die Isoform aus Mais aufgrund ihrer transkriptionalen oder auch posttranskriptionalen Induzierbarkeit durch Elicitoren in die pflanzliche Abwehr-Antwort involviert zu sein. Das zweite nicht-photosynthetische C₄-NADP-ME ist zytosolisch lokalisiert (Maurino et al., 2001; Detarsio et al., 2008). Für dieses Enzym konnte eine Expression in der Rhizodermis von Maisembryonen belegt werden (Drincovich et al., 2001; Detarsio et al., 2008). Dieses nicht photosynthetische C₄-NADP-ME ist wahrscheinlich in die Kontrolle des zytosolischen Malat-Gehaltes unter Stressbedingungen wie Hypoxie involviert (Detarsio et al., 2008).



Gerrard-Wheeler et al., (2005) Plant Physiol. 139, 39; Maurino et al., (2009) Plant Sci. 176, 715

Abbildung 1.3. Phylogenetischer Baum der pflanzlichen NADP-ME-Familie und subzelluläre Lokalisation der vier *AtNADP-ME*s mittels Fluoreszenzdetektion über 35S-NADP-ME₁₋₄-GFP-Fusionsproteine (Gerrard Wheeler et al., 2005; Maurino et al., 2009).

1.4.4 NADP-ME-Isoformen in C3-Pflanzen

C₃-Pflanzen wie *A. thaliana* und *Oryza sativa* besitzen vier NADP-ME-Isoformen, von denen drei im Zytosol (NADP-ME1 bis -3) und eine in Plastiden (NADP-ME4) lokalisiert sind (Gerrard Wheeler et al., 2005; Chi, 2006; Gerrard Wheeler et al., 2008; Gerrard Wheeler et al., 2009; Maurino et al., 2009). Obwohl diese Isozyme einen hohen Grad an Identität besitzen, zeigen die Arabidopsis-Isoformen sehr unterschiedliche biologische Eigenschaften und Expressionsmuster. Dies deutet darauf hin, dass jede Isoform eine spezifische biologische Funktion innerhalb der Pflanze besitzen würde (Gerrard Wheeler et al., 2005; Gerrard Wheeler et al., 2008; Maurino et al., 2009). Die vier *AtNADP-ME*s wurden aufgrund ihrer Sequenzhomologien und ihrer vorhergesagten Lokalisation folgenden phylogenetischen NADP-ME Gruppen zugeordnet: *AtNADP-ME2* und -3 zur

Gruppe I, *At*NADP-ME4 zur Gruppe II und *At*NADP-ME1 zur Gruppe IV (Abb. 1.3) (Gerrard Wheeler et al., 2005).

Aktivitätsassays zeigten auch, dass die plastidäre Form (NADP-ME4) aktiv sowohl als Tetramer als auch als Dimer mit einer Größe von ca. 260 kD und ca. 130 kD vorliegt. Die drei zytosolischen Formen liegen aktiv alle als Oligomere mit einer Größe über 400 kD vor (Gerrard Wheeler et al., 2008). Die NADP-ME-Isoformen besitzen unterschiedliche pH-Optima (NADP-ME1 und -2 pH 6.8 und NADP-ME3 und -4 pH 7.7) und werden in ihrer Aktivität unterschiedlich reguliert (Gerrard Wheeler et al., 2008).

NADP-ME2 und -4 werden konstitutiv exprimiert, wohingegen die Expression bei den Enzymen NADP-ME1 und -3 anscheinend durch entwicklungs- und zellspezifische Signale gesteuert wird (Gerrard Wheeler et al., 2005).

Die Semiquantitative RT-PCR gab Aufschluss über die Expression der unterschiedlichen NADP-ME-Gene in den unterschiedlichen Geweben von *A. thaliana*. Während *NADP-ME2* und -4 in allen pflanzlichen Organen exprimiert werden, konnte von *NADP-ME1* Transkript lediglich in der Wurzel gefunden werden (Abb. 1.4A) (Gerrard Wheeler et al., 2005). NADP-ME3 scheint hauptsächlich in Blüten exprimiert zu werden, in Wurzel konnte nur wenig mRNA dieser Isoform detektiert werden (Gerrard Wheeler et al., 2005). Expressionsanalysen mit Promoter-GUS-Konstrukten zeigen ebenfalls große Unterschiede in der Lokalisation der Aktivität der einzelnen Isoformen (Abb. 1.4) (Gerrard Wheeler et al., 2005). Diese Analyse der Promoter-GUS-Aktivität zeigte für die Isoform NADP-ME1 vor allem eine GUS-Expression in den Sekundärwurzeln. Die NADP-ME2-GUS-Pflanzen zeigten eine Reporterogenaktivität in allen vegetativen Organen. GUS-Färbung konnte für NADP-ME3-GUS-Linien hauptsächlich in Blütenpollen und in Wurzelspitzen nachgewiesen werden. NADP-ME4-Linien zeigen eine GUS-Färbung im Endosperm

und dem Embryo während der gesamten Embryogenese (Gerrard Wheeler et al., 2005).

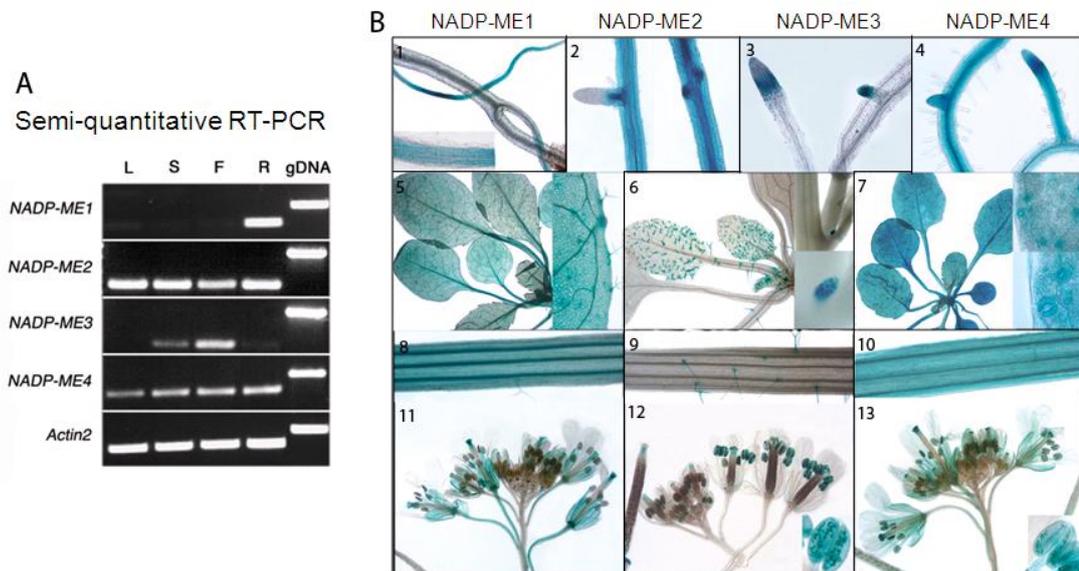


Abbildung 1.4. Expressionsanalyse von NADP-ME. **A:** Semiquantitative RT-PCR. RNA aus unterschiedlichen Geweben (L: Blatt; S: Sprossachse; F: Blüte; R: Wurzel) von *A. thaliana* wurde in cDNA überschrieben. **B:** Analyse von NADP-ME-GUS-Expression in vegetativen und reproduktiven Organen drei Wochen alter Keimlinge. (1–4) GUS-Expression in Wurzeln, (5) NADP-ME2-gesteuerte Expression in Rosetten, (6) NADP-ME3-gesteuerte Expression in Trichomen, (7) NADP-ME4-Expression in Blättern, (8–10) Longitudinale Schnitte durch die Blattachse zeigt Expression von NADP-ME2-4, (11–13) Expression von NADP-ME2-4 in Blüten (Gerrard Wheeler et al., 2005).

T-DNA-Insertionsmutanten der *At*NADP-ME-Gene aus der SALK- und SAIL-Kollektion zeigen keinen offensichtlichen Phänotypen unter normalen Wachstumsbedingungen. Doppel- und Trippelmutanten dieser Knock-out-Linien zeigen ebenfalls keinen Phänotypen unter normalen Wachstumsbedingungen (Gerrard Wheeler et al., 2005; Maurino et al., 2009). Andererseits könnten die verschiedenen Isoformen in *A. thaliana* auch spezialisierte Funktionen in einzelnen Entwicklungsstadien und/oder unter speziellen Wachstumsbedingungen übernehmen, weshalb die Single-, Doppel- und Tripel-Knock-out-Linien keinen Phänotyp unter normalen Wachstumsbedingungen aufweisen (Maurino et al., 2009). Obwohl für keine der NADP-ME-Isoformen eine Rolle nachgewiesen wurde, ist eine mögliche biologische Funktion des NADP-ME4 die Bereitstellung von Pyruvat und NADPH

für die plastidäre Lipid- oder Proteinbiosynthese (Maurino et al., 2009). Für NADP-ME1 wird spekuliert, dass dieses Enzym an der Kontrolle des Malat-Gehaltes während Hypoxie beteiligt ist. So wie für NADP-ME2 eine Funktion als zytosolischer Lieferant von reduktiver Energie für anabolische Prozesse, vielleicht auch für den Pentose-Phosphat-Weg vermutet wird (Maurino et al., 2009). NADP-ME3 könnte aufgrund seiner Expression in Trichomen dort für die Bereitstellung von NADPH während der Detoxifikation von Zytotoxinen und Xenobiotinen durch die Glutathion-Konjugation verantwortlich sein (Gerrard Wheeler et al., 2005). Für das Reis-NADP-ME2 konnte gezeigt werden, dass seine Expression durch unterschiedlichen, umweltbedingten Stress induziert werden konnte und die Überexpression zu einer hohen Salz- und osmotischen Stresstoleranz führt (Liu et al., 2007). Die Funktionen der *A. thaliana*-NADP-ME-Isoformen bleiben jedoch noch zu klären.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Durch die Forschung der letzten Jahre ist die Bedeutung von Malat und Fumarat als Schlüsselmetabolite im Stoffwechsel von *A. thaliana* immer deutlicher geworden. Malat ist in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert und Fumarat ist nach Saccharose das am höchsten akkumulierte Metabolit während des Tages. Des Weiteren weisen neuste Ergebnisse auf eine direkte regulatorische Bedeutung dieser beiden Dicarbonsäuren im Kohlenstoffwechsel hin.

Aus der Charakterisierung der von Fahnenstich et al., 2007, veröffentlichten MEM-Pflanzen unter LT-Bedingungen ergibt sich die Frage, inwieweit Malat und Fumarat eine Funktion als Kohlenstoffspeicher in C_3 -Pflanzen, wie Arabidopsis, haben (Kap. 1.31). Diese Fragen mittels der Analyse der unter KT gewachsenen MEM-

Pflanzen und stärkefreien MEM-Überexpressionsmutanten zu beantworten, ist Teil der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren zeigt die Entdeckung zytosolischer und plästidärer Isoformen des NADP-ME, die nicht in die Photosynthese involviert sind, dass – neben der Spezialisierung in der C₄-Photosynthese – NADP-ME weitere metabolische Funktionen besitzt. Die NADP-ME-Isoformen in *A. thaliana* sind nicht als evolutionäre Artefakte zu sehen, ihre Differenzierung weist auf unterschiedlich Funktionen dieser Enzyme im Metabolismus hin. Die Rolle der NADP-ME-Isoformen und der von ihnen katalysierten Carbonsäuren im Metabolismus von *A. thaliana* ist nicht geklärt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher eine differenzierte Charakterisierung der physiologischen Funktionen der Isozyme NADP-ME₂ und NADP-ME₃ in der Modellpflanze *A. thaliana*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien folgender Firmen verwendet:

Biomol (Hamburg), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), CS GmbH (Langerwehe) und Serva (Heidelberg).

Enzyme und Kits einschließlich der dazugehörigen Puffer wurden von folgenden Firmen bezogen:

MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden) und New England Biolabs (Frankfurt/Main).

Allgemeines Verbrauchsmaterial wurde über die Firma KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar) bezogen.

2.1.2 Geräte

Die für das jeweilige Experiment verwendeten Geräte sind, soweit diese für die Durchführung von Bedeutung waren, mit Typenbezeichnungen und Hersteller im jeweiligen Versuchsteil aufgeführt.

2.1.3 Gen-Coexpression Netzwerk-Analyse

Gene die mit *NADP-ME2* coexprimiert sind wurden mit der ATTED-II Datenbank (<http://atted.jp>) identifiziert und in der Tabelle S3 zusammengefasst. Diese Datenbank erlaubt eine Evaluierung der Coexpressionsdaten unter fünf Experimentellen Gesichtspunkten (Gewebe, abiotischer Stress, biotischer Stress, Hormone und Lichtverhältnisse) (Obayashi et al., 2009). Die gegenseitige Beziehung ("Mutual Rank"; MR), welche nach dem Pearson's Korrelations Coeffizienten gewichtet wird, wird benutzt um die Anzahl der coexprimierten Gene abzuschätzen. Der MR wird aus den geometrischen Durchschnitt des Korrelationsranges von Gen A zu Gen B und Gen B zu Gen A berechnet.

2.1.4 Statistische Analyse

Die Signifikanz wurde mit dem Student's *t*-test der Excel Software (Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Germany) bestimmt und der Term "signifikant" wird genutzt wenn die Abweichung der Vergleichenen Daten $p < 0.05$ beträgt. Die Hauptkomponenten-Analyse der logarithmustransformierten Metaboliten-Daten

wurde mit der MarkerView Software (Version 1.1.0.7, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt, die nach der Datennormalisierung den Pareto Algorithmus benutzt um die Eigenvektoren zu berechnen.

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde mit *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Cv. Columbia (Col-0), Cv. Landsberg erecta (Ler) und Cv. Wassilewskija (WS) gearbeitet.

2.2.2 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

A.-thaliana-Samen wurden in 9-cm-Plastiktöpfe (Pöppelmann, Lohne) auf einem Substrat, bestehend aus drei Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) ausgesät und jeweils für zwei Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert. Nach etwa zwei Wochen Anzucht unter den gewünschten Bedingungen wurden die Pflanzen in 77er-Multiplatten (Nitsch & Sohn, Kreuztal) oder Einzeltöpfe mit demselben Substratgemisch pikiert.

2.2.3 Gewächshaus

Die im Gewächshaus herrschenden Wachstumsbedingungen sind natürlichen Schwankungen unterworfen. Jedoch wurden durch technische Maßnahmen (automatische Beleuchtung/Verdunkelung) annähernd konstante Lichtverhältnisse bei Langtag-Bedingungen, also ein Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden und eine relative Luftfeuchtigkeit von etwa 40 % geschaffen. In der Lichtperiode betrug die Temperatur 21 °C, während der Dunkelperiode 18 °C.

2.2.4 Klimakammern

Für Experimente, die reproduzierbare phänotypische Eigenschaften verlangten, wurden die Pflanzen unter genau kontrollierbaren Bedingungen in Klimakammern angezogen. Hierfür wurden begehbare Pflanzenkammern (Fa. Weiss, Reiskirchen) und Pflanzenanzuchtschränke (Fa. Percival, Perry, USA) genutzt. Die Klimakammern wurden bei einer Temperatur von 22 °C während der Lichtperiode und 18 °C während der Nachtperiode und einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 50 % betrieben. Die Pflanzen wurden in den Klimakammern entweder unter Lang-Tag-Bedingungen (LT, 16/8-Stunden-Fotoperiode) bei einer Photonenflussdichte (PFD) von 75 oder 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oder unter Kurz-Tag-Bedingungen (KT, 8/16-Stunden-Fotoperiode) bei einer PFD von 30, 75 oder 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen.

2.2.5 Selektion auf Erde

Transgene Pflanzen, deren Transformation das BASTA-Resistenzgen beinhaltet, konnten auf Erde selektioniert werden. Dazu wurden die zu selektionierenden Pflanzen zwei Wochen nach Aussaat, wenn das autotrophe Wachstum eingesetzt hatte, einmal täglich für drei Tage mit einer BASTA-Lösung besprüht. BASTA-resistente Pflanzen überlebten diese Prozedur und wurden eine Woche später in neue Töpfe oder 77er-Multiplatten pikiert.

BASTA-Lösung:

0,001 % (w/v) Glufosinat

0,1 % (v/v) Tween 20

2.2.6 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen

A.-thaliana-Samen, die zur Aussaat auf Agar-Platten verwendet wurden, mussten durch eine mindestens sechsstündige Begasung mit Chlorgas in einem Exsikkator vorab sterilisiert werden. Die Chlorgasentwicklung wurde durch Zugabe von 3 ml konzentrierter HCl zu 100 ml 12%iger Na-Hypochlorit- Lösung erreicht.

Alternativ wurde eine zweite Variante der Samensterilisation verwendet. Hierbei wurden ca. 0,05 g Samen in einem 15-ml-Falcon zwei bis drei Mal mit 70 % EtOH und 0,05 % Triton X gewaschen. Anschließend wurde die Waschlösung durch 100 % EtOH ersetzt, womit die Samen mehrmals gespült wurden. Die Samen wurden auf einem Whatmanfilter getrocknet, bevor sie zur Aussaat auf Agar-Platten verwendet wurden.

2.2.7 Anzucht von *A. thaliana* auf Agar-Platten

Auf MS Agar-Platten wurden nur sterilisierte Samen ausgelegt und angezogen. Die ausgelegten Samen wurden zunächst für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend in einem Klimaschrank bei 22 °C und LT-Bedingungen angezogen.

MS Agar:

1 % (w/v) Saccharose (optional je Experiment)

0,44 % (w/v) Murashige&Skoog (MS) Salze (Duchefa, Haarlem, NL)

0,8 % (w/v) Agar

2.2.8 Transformation von *A. thaliana* durch Vakuuminfiltration

Die Transformation von Pflanzen wurde nach Bechtold et al. (1993) durchgeführt (Bechtold et al., 1993). Agrobakterien, die den binären Vektor pGreenII-nosBAR mit einem 35S-ZmME_{C4}-Konstrukt enthielten, wurden bei 28 °C in einer Flüssigkultur (2.3.2) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Die Bakterienkultur

wurde bei 2500 x g abzentrifugiert und das resultierende Bakterienpellet in einem Infiltrationsmedium resuspendiert.

Infiltrationsmedium:

5 % (w/v) Saccharose

0,22 % (w/v) MS-Salze mit Vitaminen

Ein Tropfen Tween 20

pH 5,6/KOH

Ungefähr vier Wochen alte *A.-thaliana*-Pflanzen, die bereits offene Blüten entwickelt hatten und deren Schoten vorab entfernt wurden, wurden mit den Blüten in einem Exsikkator in die Agrobaktériensuspension getaucht. Nach zweimaligem Anlegen eines Vakuums für 15 Minuten wurden die Pflanzen aus dem Exsikkator genommen und die Blüten für die nächsten drei Tage unter einer Anzuchtshaube feucht gehalten.

2.2.9 Probennahme

Sofern keine expliziten Angaben im jeweiligen Versuchsteil gemacht wurden, wurden die Probennahme wie folgt durchgeführt: Es wurden alle Blätter von mindestens fünf Einzelpflanzen abgeschnitten, in Alufolietütchen gesammelt und in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren. Für den jeweiligen Versuch wurden die bei –80 °C gelagerten Proben in flüssigem N₂ gemörsert, in gewogene Reaktionsgefäße portioniert und das Gewicht der Probe bestimmt. Durch die ständige Verwendung von flüssigem N₂ wurde gewährleistet, dass die Pflanzenproben nicht antauten. Bis zur Verwendung in den Experimenten konnten die Proben für einen gewissen Zeitraum bei –80 °C gelagert werden.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Escherichia-coli-Anzucht

Escherichia coli (*E. coli*, Stamm Dh5 α) wurden bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C auf LB-Medium angezogen. LB-Platten oder LB-Flüssigmedium wurde bei Bedarf mit den erforderlichen Antibiotika zur Selektion transgener Organismen versetzt. Zur Aufbewahrung von Stammkulturen wurden 500 μ l der Bakterienkultur in 500 μ l 60%igem Glycerin bei –20 °C gelagert.

LB-Medium und -Platten:

1 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

[1,5 % (w/v) Bacto-Agar für Platten]

Antibiotikakonzentrationen:

25 μ g/ml Kanamycin

2.3.2 Herstellung TSS-kompetenter *E. coli*

In 5 ml LB-Medium wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (New Brunswick G25, Edison, USA) Bakterien des Dh5 α -Stammes angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ > 0,8 angezogen. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Übernachtskultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml frischem LB-Medium überimpft und 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis das Wachstum der Bakterien den Anfang der exponentiellen Phase erreicht hatten, was bei einer OD₆₀₀ von 0,3–0,4 gegeben war. Die Kultur wurde nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurden nach Entfernen des Überstandes in 10 ml eisgekühltem TSS-Medium (Chung und Miller, 1993) aufgenommen, 15 min auf Eis

gestellt, zu 50 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

TSS-Medium:

10 % (w/v) Polyethylenglykol 8000

5 % (w/v) Dimethylsulfoxid

20–50 mM MgCl₂

20–50 mM MgSO₄

pH 6,5/NaOH

2.3.3 Transformation TSS-kompetenter *E. coli*

Kompetente *E.-coli*-Zellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Zu den 50 µl Aliquots kompetenter Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz oder 50–200 ng Plasmid-DNA gegeben. und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s bei 42 °C im Wasserbad hitzegeschockt, im Eisbad wieder abgekühlt und umgehend mit 1 ml LB-Medium versetzt. Die transformierten Zellen wurden für 1 Std. auf dem Schüttler bei 37 °C regeneriert, bevor 200–1000 µl des Ansatz auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht (ÜN) inkubiert wurden.

2.3.4 *Agrobacterium-tumefaciens*-Anzucht

A. tumefaciens des Stamms GV3101 mit dem Helferplasmid pSoup (Klee und Harry, 2000) wurden auf YEB-Medium mit dem jeweils erforderlichen Antibiotikum zur Selektion transgener Organismen bei einer Wachstumstemperatur von 28 °C angezogen. Stammkulturen konnten ebenfalls in 500 µl 60%igem Glycerin bei –20 °C gelagert werden.

YEB-Medium und -Platten:

0,5 % (w/v) Bacto-Pepton

0,5 % (w/v) Rindfleischextrakt

1 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) Saccharose

0,05 % (w/v) MgSO₄

[1,5 % (w/v) Bacto-Agar für Platten]

Antibiotikakonzentrationen:

25 µg/ml Gentamycin

100 µg/ml Kanamycin

150 µg/ml Rifampicin

12 µg/ml Tetracyclin

2.3.5 *C. higginsianum* Infektions-Assay

C. higginsianum Isolate MAFF 305635 (zur Verfügung gestellt vom Ministerium für Fischerei und Forstwirtschaft, Japan) wuchsen auf Hafermehl Agar Platten (OMA: 5% (w/v) gemahlene Hafermehl, 1.2% (w/v) Agar) für 7 Tage bei 22°C unter Belichtung um die Konidienbildung zu unterstützen. *C. higginsianum* Infektion wurde nach der von O'Connell et al., 2004 beschriebenen Methode durchgeführt (O'Connell et al., 2004). Für die Spray-Inokulation wurden $2 \cdot 10^6$ Konidien / ml benutzt und 5 Wochen alte, auf Erde angezogene Pflanzen benutzt. Die Infektion wurde jeweils 30 min vor Ende der Lichtphase durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Extraktion und Präparation von DNA und RNA

2.4.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München) verwendet. Das Protokoll wurde leicht abgewandelt, da für DNA-Bindung eine selbst hergestellte Bindematrix in wiederverwendbaren Säulchen benutzt wurde.

Bindematrix:

5,2 M Guanidin-HCl

20 mM Tris-HCl

0,15 g/ml Diatomeenerden

2.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Extraktion von DNA aus Pflanzenmaterial wurde nach dem Protokoll von Liu (Liu et al., 1995) für Blütenmaterial durchgeführt. Pro Pflanze wurden zwei bis vier Blütenstände geerntet, in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem N₂ eingefroren. Das Pflanzenmaterial wurde mit einem in flüssigem N₂ gekühlten Bohr-Homogenisator (RW 16, IKA-Werke, Staufen) unter Zugabe von 250 µl Extraktionspuffer zu einem homogenen Gemisch bis zum Auftauen der Probe zerkleinert. Anschließend wurden weitere 250 µl Extraktionspuffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde nun mit 400 µl PCI versetzt, kräftig geschüttelt und 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol 10 min lang gefällt und im Anschluss bei 3500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol zweimal gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde

schließlich in 50 µl TE/RNaseA (10 µg/ml) oder H₂O_{dd} aufgenommen und in ca. 30 min auf dem Schüttler in Lösung gebracht.

PCI:

25 : 24 : 1 (v/v/v) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

2x Puffer:

0,6 M NaCl

100 mM Tris / HCl pH 7,5

40 mM EDTA

4 % (w/v) Sarkosyl

1 % (w/v) SDS

Extraktionspuffer:

25 ml 2x Puffer

20 ml 12 M Harnstoff

2,5 ml Phenol

2,5 ml H₂O_{dd}

2.4.1.3 Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe

Für die RNA-Extraktion mit Z6 Puffer wurden ca. 50–100 mg gemörstertes Pflanzenmaterial mit dem Bohr-Homogenisator (RW 16, IKA-Werke, Staufen) unter Zugabe von 1 ml Z6 Puffer homogenisiert. Anschließend wurden 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25/24/1 dazugegeben und geschüttelt. Die Proben wurden nun mit 12000 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erwirken. Die wässrige Phase (~ 700µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden 1/20V 1M Essigsäure (z. B. für 700 µl Probevolumen wurden 35 µl 1M Essigsäure hinzugefügt) und 0,7 V 100% Ethanol (z. B. für 700 µl Probevolumen wurden 490µl EtOH hinzugegeben) zu der

wässrigen Phase hinzugegeben und zentrifugiert (4 °C, 7500 x g, 5 min). Der Überstand wurde nun entfernt und das RNA-Pellet zunächst mit 500 µl 3M DEPC-Wasser-haltiger Natriumacetatlösung (pH 5,0) und im Anschluss mit DEPC-Wasser-haltigem 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nun für 30 min an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde schließlich in 50–100 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Z6 Puffer (im Dunkeln aufbewahren):

8M Guanidiniumhydrochlorid

20 mM MES

20 mM EDTA pH 7,0

Vor Benutzung 0,7 % (v/v) beta-Mercaptoethanol frisch hinzugeben DEPC-H₂O:

0,2 % (v/v) DEPC

Kräftig rühren lassen, autoklavieren

2.4.1.4 Elektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine klassische Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bezüglich ihrer Länge für analytische und präparative Zwecke (Maniatis et al., 1989). Die Agarose wurde in 50–250 ml 1x TAE-Puffer im Mikrowellenherd gelöst. Die hierbei eingesetzte Menge an Agarose richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Für DNA-Fragmente von 1–10 kb wurde ein 1%iges Agarosegel eingesetzt und für Fragmente mit einer Länge von einigen Hundert bp wurde ein 1,5%iges Gel gewählt. Zur Detektion der DNA unter UV-Licht wurde die handwarme Agaroselösung mit 1/25000 Volumen Ethidiumbromidlösung versetzt und dann gut vermischt in eine Flachbett-Gelkammer gegossen, in der sich ein aufgehängter Kamm befand. Nach Erstarren

des Gels wurde es in eine Laufkammer gelegt, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt wurde, bis das Gel gut bedeckt war. Nach Entfernen des Kamms konnten die Geltaschen mit den Proben, zu denen vorher 1/9 Volumen 10x Ladepuffer gegeben wurde, beladen werden. Zur Größenbestimmung der aufgetragenen DNA-Fragmente wurde eine Tasche 2–15µl 1 kb-Größenmarker beladen. An die Gelkammer wurde nun eine regelbare Spannungsquelle (LKB GPS 200/400, Pharmacia, Karlsruhe) angeschlossen und die DNA-Fragmente wurden bei 1–1,5 mA pro cm² elektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufrichtung der DNA-Fragmente ist dabei vom Minus- zum Pluspol der angelegten Gleichspannung. Die DNA-Banden im Gel wurden anschließend auf einer UV-Durchlichtapparatur ($\lambda=254$ nm) sichtbar gemacht. Über ein angeschlossenes Geldokumentationssystem (Fa. Intas, Göttingen) konnten die Bandenmuster als Foto sowie als Bilddateien (TIFF-Format) archiviert werden.

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer):

2 M Tris / HAc pH 1,5

50 mM EDTA

1 kb-Ladder:

100 µl 10x Auftragepuffer

100 µl 1 kb-Ladder (1 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe)

800 µl H₂O

10x Auftragepuffer:

20 % (w/v) Ficoll 400

1 % (w/v) SDS

0,05 % (w/v) Bromphenolblau

0,05 % (w/v) Tris / HAc pH 7,5

100 mM EDTA

Ethidiumbromid-Lösung:

1 % (w/v) Ethidiumbromid

2.4.2 Quantifizierung von DNA und RNA

2.4.2.1 Fotometrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen

RNA absorbiert ebenso wie DNA UV-Strahlung maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Eine Extinktionsdifferenz $\Delta A_{260}=0,025$ entspricht einer RNA-Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$. Aus der Absorption A von Lösungen bei dieser Wellenlänge kann also die Konzentration der RNA bestimmt werden. Aus der parallelen Bestimmung der Absorptionen bei $\lambda=280$ nm und $\lambda=320$ nm können eventuelle Verunreinigungen durch Proteine, Kohlenhydrate und Phenolderivate abgeschätzt werden. Bei reinen RNA-Präparationen sollte die Absorption bei $\lambda=320$ nm gegen null tendieren und der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,6 und 1,7 liegen. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden $3 \mu\text{l}$ der RNA-Präparation mit $597 \mu\text{l}$ DEPC-H₂O (s. 2.4.1.3) verdünnt und die Absorptionen im Fotometer (Ultraspex III, Pharmacia, Karlsruhe) bestimmt. Vorher wurde als Nullwert die Absorption von $600 \mu\text{l}$ DEPC-H₂O für alle drei Wellenlängen eingestellt.

2.4.2.2 Abschätzung von DNA-Konzentrationen in Agarosegelen

Die DNA-Menge einer Probe kann mittels Gelelektrophorese grob abgeschätzt werden, indem man die Leuchtstärke der DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht mit der des DNA-Größenmarkers einer definierten Menge vergleicht. Dabei gilt bei der 1kb-Ladder bezüglich der angegebenen Konzentration, dass die Banden des Markers (aufgetragene μl -Marker $\times 10$) ng DNA enthalten, wobei die 1,6-kb-Bande genau doppelt so viel DNA enthält. Wurden zwei unterschiedliche Mengen

Marker (beispielsweise 2 und 5 μl) aufgetragen, lässt sich die DNA-Konzentration in den Proben relativ gut abschätzen. Für eine genauere Bestimmung von DNA-Mengen kann das Foto des Gels als TIFF-Bild im Computer gespeichert werden und mit dem Programm NIH Image Quant 1.60/ppc ausgewertet werden. Hierbei erfolgt die Auswertung ebenfalls als Vergleich der Leuchtintensitäten der einzelnen Banden, ist aber durch die computergestützte Berechnung genauer.

2.4.3 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA innerhalb spezifischer palindromischer Sequenzen schneiden. Die Spaltung von DNA wurde mit den vom Hersteller (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot oder Fa. Promega, Mannheim) mitgelieferten Puffern durchgeführt, wobei zwischen 0,4 und 1 U Enzym pro μg DNA eingesetzt wurde (1 U Enzym spaltet 1 μg dsDNA pro Stunde). Die Inkubation während der Reaktion wurde nach den Temperaturempfehlungen der Hersteller durchgeführt.

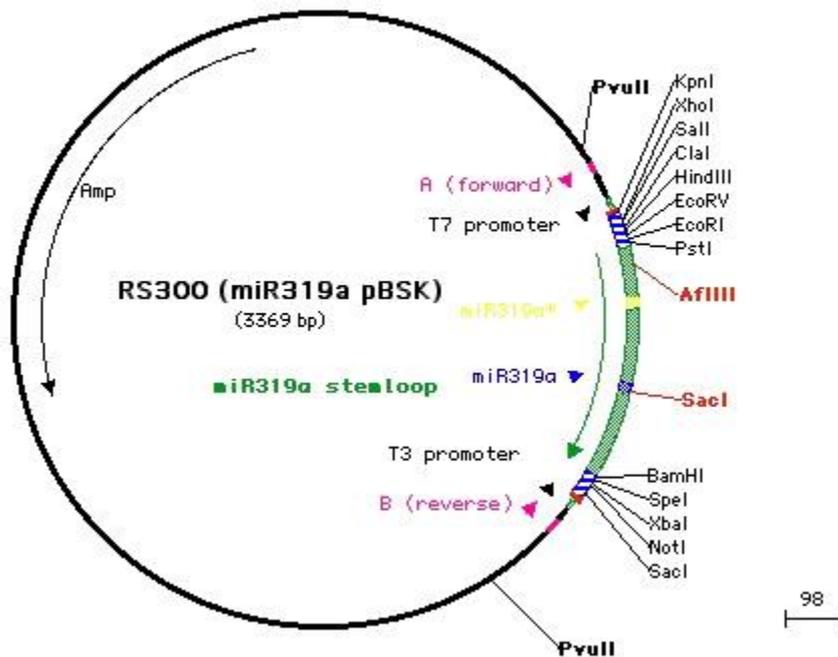
2.4.3.2 Ligation von DNA Fragmenten

Die T_4 -DNA-Ligase verbindet DNA-Fragmente, die endständige 3'-OH-Gruppen tragen, mit solchen, die 5'-Phosphatgruppen besitzen. Die Reaktion findet unter ATP-Hydrolyse statt. Hierbei können sowohl zueinander komplementäre als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. DNA-Fragment und Vektor wurden im molaren Verhältnis 5:1 gemischt und für einen 20 μl -Ansatz weiterhin 2 μl 10x Ligase-Puffer und 1–2 U T_4 -DNA-Ligase (Promega) zugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht in einem auf 12 °C temperierten Wasserbad. Anschließend

wurde der Ansatz direkt für die Transformation kompetenter Bakterienzellen verwendet.

2.4.4 Herstellung und Klonierung artifizieller MikroRNAs

MikroRNA (miRNA) ist eine besondere Variante der RNA. Es sind kurze, hoch konservierte, nicht codierende RNAs, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression und damit an der zellulären Proteinbiosynthese beteiligt sind. MikroRNAs regulieren die Genexpression hochspezifisch auf der post-transkriptionalen Ebene, sie unterdrücken gezielt die Transkription einzelner Gene (Gen-Silencing) und üben damit quasi eine entgegengesetzte Funktion aus wie die mRNA. Die Größe von miRNAs liegt in der Regel zwischen 21 bis 23 nt. (He und Hannon, 2004). Die artifizielle MikroRNA wurde nach dem Protokoll von Rebecca Schwab und mithilfe der „WMD3 – Web MicroRNA Designer“-Online-Plattform hergestellt. Diese Online-Programme liefern u. a. vier Oligonucleotidsequenzen (I bis IV), welche benutzt werden, um durch ortsspezifische Mutagenese den endogenen miR319 Precursor für die artifizielle MikroRNA herzustellen. Als Template für die PCRs wird das Plasmid pRS300 von Detlef Weigel genutzt. Dieses Plasmid besitzt den miR319a Precursor in pBSK. Die erforderlichen PCRs zur Herstellung der miRNA wurden ebenfalls nach Protokollanweisung von Rebecca Schwab, welche auf der Online-Plattform WMD3 – Web MicroRNA Designer erhältlich ist, durchgeführt.



CTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT
 GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGA
 TAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCcaaacacacgctcggacgcatattacacatgttcatacac
 ttaatactcgcgtgttttgaattgatgttttaggaatataatgtagagGCACGATCCACGTAACAATA
 Ttcacaggctcgtgatatgattcaattagcttccgactcattcatccaaataccgagtcgccccaaattc
 aaactagactcgttaaataatgaatgaatgatgcggtagacaaaattggatcattgattctctttgaTTAT
 GTAACGTGGATCGCGCtctctcttttgattccaattttcttgattaatctttcctgcacaaaaacat
 gcttgatccactaagtgacatatatgctgccttcgatatatatagttctggtaaaattaacatcttggg
 tttatctttatattaaggcatcgccatgGGGGGATCCACTAGTTCCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGA
 GCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTCCGAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT
 CCTGTGTGAAATTGTTATCCGC

Abbildung 2.4.1: Karte des RS300 Vektors und Sequenz, der die miR319 Precursor in pBSK beinhaltet und als Template für die miRNA PCRs durchzuführen. **T7 SP6 amp resistance oligo A oligo B miRNA miRNA***. <http://wmd3.weigelworld.org>.

2.4.4.1 Klonierungsstrategie für die NADP-ME3-MikroRNA

Der amiRNA beinhaltende Precursor wird durch mehrere, sich überlappende PCRs hergestellt. Zunächst werden die PCR-Fragmente (a)–(c) hergestellt. Die dafür benötigten Primerkombinationen sind der Tabelle zu entnehmen. Die verwendeten Primer A und B sind Plasmidspezifisch. Sie binden außerhalb der Multiple Cloning Side von pBSK.

Sequenz der Primer A und B:

A 5' CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C 3'

B 5' GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G 3'

Tab.2.4.1: PCR Strategie zur Herstellung des miRNA Fragmentes.

	Vorwärts Oligo	Reverses Oligo	Template
(a)	A	IV	pRS300
(b)	III	II	pRS300
(c)	I	B	pRS300
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)

Die Primer I–IV sind genspezifische Primer für NADP-ME3 und wurden mithilfe der Online-Plattform WMD3 – Web MicroRNA Designer generiert. Die PCR-Fragmente aus den PCRs (a)–(c) werden nun als Template für die PCR (d) benutzt. Das Fragment (d) wird für die Klonierung des miRNA-Konstrukt verwendet.

Tab.2.4.2: Spezifische NADP-ME3-Primer zur Herstellung des miRNA-Konstruktes

I miR-s mea3	gaTTATTGTAACGTGGATCGCGCtctctcttttgattcc
II miR-a mea3	gaGCGCGATCCACGTTACAATAAtcaaagagaatcaatga
III miR*s mea3	gaGCACGATCCACGTAACAATATtcacaggtcgtgatg
IV miR*a mea3	gaATATTGTTACGTGGATCGTGCtctacatatattcct

Für die Herstellung des NADP-ME3[mea3]-Promotor-spezifischen miRNA-Konstruktes wurde ein pGreenII-nosBAR-Vektor verwendet. Zunächst wurde der mea3-Promoter mit den eingefügten Restriktionsschnittstellen BstXI und EcoRV amplifiziert. Der Vektor pGreen und der Promoter wurden mit den Restriktionsenzymen BstXI und EcoRV geschnitten und ligiert. Das Fragment PCR (d) wurde aufgereinigt und mit EcoRV und BamHI verdaut. Anschließend wurde das geschnittene Fragment PCR (d) über die Schnittstellen EcoRV und BamHI in das mea3-Promoter-pGreen-Konstrukt eingefügt.

Tab.2.4.3: *Nadp-me3*-Promoter-spezifische Primer. Der Vorwärts-Primer besitzt eine EcoRV, der reverse Primer eine BamHI-Schnittstelle.

>mea3 prom forw<	GAATTCATCTAGAGATTACCAAGTATCTCCTCCA
>mea3 prom rev<	GGATCCTTATTACAATTTTGATCAGAAGAGAAA

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierungen

2.4.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988) ist eine klassische Methode, um eine Vielzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz herzustellen. Die Reaktion der PCR beruht auf einem sich 25–35 Mal wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Bindung von spezifischen reziproken Oligonukleotiden, an die eingesetzte Matrizen-DNA und anschließender Neusynthese der DNA-Stränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (\Rightarrow Taq-Polymerase, Qiagen, Hilden). Die Anzahl des gewünschten DNA-Fragmentes verdoppelt sich in jedem Zyklus, sodass die Konzentration der DNA im PCR-Ansatz exponentiell zunimmt. Um den Erfolg der PCR-Reaktion zu prüfen, wurde ein kleiner Teil des Reaktionsansatzes auf ein Agarose-Gel geladen und die Größe des PCR-Produktes mit der Größe der Template-DNA verglichen.

Standard-PCR-Ansatz:

0,2–1 μg Template-DNA

0,25 pmol Vorwärts-Primer

0,25 pmol Rückwärts-Primer

0,1 μl Taq-Polymerase

1 μl 10x Puffer mit MgCl_2

0,2 μl dNTPs (je 10mM)

bis 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ hinzufügen

Standard-PCR-Programm:

- | | | | |
|----|------------------------------------|----------------|------------------------------------|
| 1. | 94 °C | 4 min | Denaturierung |
| 2. | 94 °C | 30 sek | Denaturierung |
| 3. | 55 °C* | 30 sek | Anlagerung der spezifischen Primer |
| 4. | 72 °C | ~60 sek pro kb | DNA-Synthese |
| 5. | Schritte 2–4 25–35 Mal wiederholen | | |
| 6. | 72 °C | 5 min | finale DNA-Synthese |
| 7. | 16 °C | ∞ | Ende |

* Die Anlagerungstemperatur der Primer hängt von ihrer Basensequenz ab. Diese Temperatur lässt sich wie folgt berechnen:

$$T_M = 69,3^\circ\text{C} + [0,41 \times (\text{GC}\text{-}\%) - (650/\text{Primerlänge in bp})]$$

2.4.5.2 Kolonien-PCR

Um schnell eine Vielzahl von Bakterienkolonien auf einer Agarplatte auf das Vorhandensein eines Transgens zu testen, wird die Methode der Kolonien-PCR angewendet. Dabei wurde von den zu testenden Kolonien jeweils mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze ein wenig Material abgenommen und direkt zu einem PCR-Ansatz gegeben. Durch die hohen Temperaturen während einer PCR-Reaktion ist ein vorheriger Hitzaufschluss der Bakterien nicht notwendig. Diese Methode sollte jedoch nur bei Gram negativen Bakterien, z. B. *E. coli* Anwendung finden.

2.4.5.3 Sequenzierung eines DNA-Abschnitts

Die Probenvorbereitung und die Sequenzierungsreaktion wurden mit dem Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach einem modifizierten Protokoll der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977)

durchgeführt. Die Sequenzierungen erfolgte im Institut für Genetik der Universität zu Köln mit dem ABI 3730 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems GmbH).

Sequenzierungsreaktion (10µl-Ansatz):

10–100 ng DNA

0,5 µl Primer (10 µmol/µl)

1 µl Puffer

2 µl Big Dye 3.1

bis 10 µl mit HPLC-H₂O auffüllen

Die Sequenzierreaktion fand im Thermocycler (Biozym PTC 100/200) unter folgenden

Bedingungen statt:

96 °C 20 s

96 °C 10 s

55 °C 10 s

60 °C 4 min

4 °C ∞

Anschließend wurde jeder Ansatz 1:1 mit HPLC-H₂O verdünnt und im Institut für Genetik analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Programme Chromas LITE Version 2.0 oder EditView Version 1.0.

2.4.5.4 Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription

Bei einer reversen Transkription (RT) wird einzelsträngige RNA von einem retroviralen Enzym als Matrize für die Neusynthese von doppelsträngiger DNA

(cDNA) genutzt. Von einer vorhandenen RNA-Matrize werden also DNA-Kopien erstellt. Für eine RT mit einem Endvolumen von 20 µl wurde 2 µg RNA eingesetzt. Dafür wurde die RNA-Konzentration in der Ausgangsprobe bestimmt und das Volumen der RNA-Lösung, das 2 µg RNA enthält, für die Reaktion eingesetzt. Zu diesem Volumen wurde 1 µl Oligo-dT (0,5 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) gegeben. Mit H₂O_{dd} wurde auf ein Volumen von 13 µl aufgefüllt, die Mischung für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5x First-Strand-Buffer und 2 µl DTT (0,1 M) wurde die Lösung bei 42 °C für 2 min kurz erwärmt und dann mit 1 µl reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen) die Reaktion gestartet, die für 50 min auf 42 °C lief. Abgestoppt wurde diese Reaktion durch den Transfer auf 70 °C und Inkubation auf dieser Temperatur für 15 min. Die erhaltene cDNA konnte bei -20 °C gelagert oder direkt für PCR verwendet werden.

2.4.5.5 Reverse Transkriptions-PCR

Durch die RT-PCR ist ein semi-quantitativer Vergleich der Transkriptmenge (mRNA) ausgesuchter Gene zum Zeitpunkt der Probenahme in einer Pflanze möglich. Dafür wird aus der RNA mittels RT cDNA (s. 2.4.7.1) hergestellt und diese in zwei getrennten PCR-Reaktionen, die im linearen Amplifikationsbereich ablaufen (≤30-Zyklen) eingesetzt. Pro cDNA werden zwei *Primerpaare* (Oligonukleotide) benutzt, das eine Paar ist spezifisch für die cDNA von Interesse, das andere ist spezifisch für die cDNA eines „housekeeping“-Gens mit hoher konstitutiver Expression als Referenz. In dieser Arbeit wurde als Referenzgen nur Aktin (Aktin 2: At3g18780) genutzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und anhand der Leuchtstärke der resultierenden Banden konnte auf die relative Häufigkeit der cDNAs (und damit der ursprünglichen mRNAs) geschlossen

werden. Die für die semi-quantitative RT-PCR benutzten Primer sind der unten stehenden Tabelle 2.4.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.4.4: Auflistung der spezifischen Primer zur Detektion des Transkriptes mittels semi-quantitativer RT-PCR.

Name	Nummer	Sequenz 5' -> 3'
Xhocit3	356	CTCGAGTTAACGGAAGTTTCTGTAGCA
MEA3 379 fow	357	AATGTGGAGGAGTTGCTTCCGGTT
MEA3 946 fow	358	ATTGCGGCTCAGAAAGTACTTGGT
MEA3 1166 rev	359	TGGCTGCTTGAAATGTTGAAGCGA
25880 atg fow	362	ATGGGCACCAATCAGACTCAGAT
Aktine tg fow	760	TAACTCTCCCGCTATGTATGTTCGC
Aktine tg rev	761	CCACTGAGCACAATGTTACCGTAC
>QRT1fow<	825	ATGAAAGTCGAAGCTTTTATTCCCG
>QRT1rev<	826	TTAGAGTCTCAGCCATTGATCTCCAT
>QRT2fow<	827	ATGTATGAAAAGATCATAATCTTATCAG
>QRT2rev<	828	TCAAGTGCAAAGAGGAGAAACATTTCC
>QRT3fow<	829	ATGGAGCTAAGGAAATCTCAAGTGG
>QRT3rev<	830	TTAAACTCCTTGATTCACCTGTTACATA

RT-PCR-Programm der qrt-Gene:

QRT1-Primer

1. 94 °C 2 min
2. 94 °C 30 s
3. 60 °C 30 s 32 Zyklen
4. 72 °C 1:20 s
5. 16 °C forever

QRT2-Primer

1. 94 °C 2 min
2. 94 °C 30 s
3. 50 °C 30 s 35 Zyklen
4. 72 °C 1:30 s
5. 16 °C forever

QRT3-Primer

- | | | | |
|----|-------|---------|-----------|
| 1. | 94 °C | 2 min | |
| 2. | 94 °C | 30 s | |
| 3. | 55 °C | 30 s | 34 Zyklen |
| 4. | 72 °C | 1:30 s | |
| 5. | 16 °C | forever | |

2.4.5.6 Quantitative Real-Time-PCR

Die qRT-PCR wurde nach dem Protokoll von Xiaowei Wang and Brian Seed (2003) durchgeführt. Das dafür genutzte Gerät war ein 7300 Realtime PCR System von Applied Biosystem (Carlsbad, USA). PCR-Programmeinstellungen, Datenspeicherung und Datenausgabe wurden mithilfe der 7300 Sytem SDS Software durchgeführt. Die eingesetzte cDNA wurde durch reverse Transkriptase aus vorher präparierter RNA hergestellt. Vor der eigentlichen qRT-PCR wurde eine Aktin-Kontrolle durchgeführt, um die Menge der einzusetzenden cDNA abzuschätzen.

Aktin-Kontrolle:

0,5 µl cDNA

0,5 µl PrimerI

0,5 µl PrimerII

2 µl Puffer (10x DreamTaq-Puffer, Fermentas)

0,1 µl dNTPs

0,05 µl DreamTaq (Fermentas)

16,3 µl H₂O

PCR-Programm für die Aktin-Kontrolle ist das Standard-PCR-Programm. Nach der Aktin-Kontrolle wurde jede cDNA entsprechend verdünnt, normalerweise 10 µl

cDNA auf 70 µl H₂O, sodass in allen Proben ungefähr gleiche Mengen an cDNA eingesetzt wurden.

qRT-PCR-Programm:

1. 95 °C 2 min 1 Zyklus
2. 95 °C 10 min 1 Zyklus
3. 95 °C 15 s -> 60 °C 30 s -> 72 °C 30 s, 40 Zyklen
4. 72 °C 10 min 1 Zyklus

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem 20-µl-Gesamtansatz mit 10 µl AbsoluteTMQPCR SYBR Green Mix (ABgene House, Surrey, UK), 2 µl verdünnte cDNA und 10 pmol Primer (5 pmol/µl je Primer). Der SYBR Green Mix enthält neben einem Puffer eine Thermo-Start-DNA-Polymerase und Fluorescein. Der Farbstoff Fluorescein dient zur internen Kalibrierung des jeweiligen PCR-Ansatzes. Das PCR-Produkt wird durch SYBR Green, das spezifisch an doppelsträngige DNA bindet und dann zur Fluoreszenz (Anregungsbereich 475–495 nm, Emissionsbereich 515–545nm) angeregt werden kann, nachgewiesen.

Die verwendeten Primer sind der Tabelle zu entnehmen. Die Datenauswertung wurde in EXCEL mit der Kalkulationsmethode der Mean Normalized Expressions durchgeführt (Simon, 2003).

Tabelle 2.4.5: Auflistung der spezifischen Primer zur Bestimmung der Expression mittels qRT-PCR. F, Forward Primer; R, Reverse Primer.

Primer Name		Primer Sequenz
<i>NADP-ME1-RT</i>	F	5'-GCGTATGAACTAGGATTGGCAG-3'
	R	5'-TAGAGACGGTATGTGGGGCTG-3'
<i>NADP-ME2-RT</i>	F	5'-CTGAAGCATTGGCCGCAC-3'
	R	5'-GTTTGAGAATGGCGGGTAGA-3'
<i>NADP-ME3-RT</i>	F	5'-AGATCTCCGATGAATATGTTACCG-3'
	R	5'-AAGTTGATCCAACGTGGCACTAT-3'
<i>ACTIN2-RT</i>	F	5'-ATGGAAGCTGCTGGAATCCAC-3'
	R	5'-TTGCTCATACGGTCAGCGATG-3'
<i>TrpC</i>	F	5'-AGGTTCAGACTGCCGAAGAG-3'
	R	5'-TCAGCCTGCTTGTGTGTTC-3'
<i>RbcS</i>	F	5'-TGATGGACGGTACTGGACAA-3'
	R	5'-GAAGCTTGGTGGCTTGTAGG-3'

2.4.5.7 Quantifizierung der *C. higginsianum*-Ausbreitung in planta mittels

qPCR

Für eine quantitative Aussage über die Pathogenausbreitung und die Anfälligkeit des Wirtes wurde der Gehalt der genomischen *C. higginsianum* DNA in infizierten Blättern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt. Die dazu verwendete Methode wurde Horst et al. (2012) beschrieben (Horst et al., 2012). Modifizierend wurde ein gesamt Blattmaterial von 2 cm², von jeweils drei voll entwickelten Blättern gepoolt eingesetzt und mit flüssigem Stickstoff im Mörser homogenisiert. Gesamte genomische DNA wurde mit dem Qiagen DNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) extrahiert. Die pilzliche DNA Quantität wurde subsequent mit dem Stratagene Mx3000P qPCR System mit Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix bestimmt. Die verwendeten Primer für das *C. higginsianum* TrpC Gen und das *A. thaliana* RbcS Gen sind der Tabelle 2.4.5 zu

entnehmen. Die relative Quantität der pilzlichen DNA wurde nach Rieu & Powers, 2009, bestimmt (Rieu und Powers, 2009).

2.5 Transgene Pflanzenlinien

Verwendete Vektoren zur Herstellung transgener Linien

Für *blunt-end*-TA-Klonierungen von PCR-Fragmenten in *E. coli* wurde der Vektor TOPO-Blunt (Invitrogen) eingesetzt. Für die Transformation von Agrobakterien und damit auch für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von Pflanzen wurde ein modifizierter pGreenII nosBAR (Klee und Harry, 2000) eingesetzt.

2.5.1 Screening homozygoter transgener *A. thaliana*

Die erste Generation der transgenen Pflanzen wurde durch BASTA selektioniert, wobei in der Regel die Zahl der positiv transformierten Pflanzen zwischen drei bis sechs Stück liegt. Diese Pflanzen, von denen jede eine eigene Transformationslinie ist, wuchsen im Gewächshaus bis zur Ernte ihrer Samen. Einige dieser Samen wurden nun wiederum in 9er-Töpfen ausgebracht und zwei Tage stratifiziert. Danach wurden die Pflanzen sieben bis zehn Tage im Gewächshaus angezogen. Alle Pflanzen der zweiten Generation sollten heterozygot für die eingebrachte Transformation und somit auch BASTA-resistent oder wt sein. Von der zweiten Generation wurden 15 Pflanzen je Linie pikiert und schließlich Samen jeder Pflanze geerntet. In der darauf folgenden dritten Generation traten homozygote, heterozygote und wt-Pflanzen auf. Die homozygoten Pflanzen überlebten die BASTA-Selektion. Dazu wurden einige Samen in 6er-Töpfen ausgebracht und angezogen. Nach circa einer Woche wurden die Pflanzen drei Tage lang einmal täglich mit BASTA

besprüht. Wenn alle jungen Pflanzen im Topf die BASTA-Behandlung überleben, sind diese homozygot, genau wie ihre Mutterpflanze.

2.5.2 Verwendete transgene Pflanzen

Die für die Experimente benutzten transgenen Pflanzenlinien waren T-DNA-Insertionsmutantenlinien der SALK- (<http://signal.salk.edu>) bzw. SAIL-Institute und Versailles-T-DNA-Linien (<http://www-ijpb.versailles.inra.fr>). Des Weiteren wurden von der AG Maurino hergestellte Überexpressions-, Komplementations-Linien der AtNADP-ME2-Isoform und *A.-thaliana*-Überexpressions-Linien des Maises NADP-Malat-Enzym (J05130.1) (ME-Pflanzen) verwendet (Gerrard Wheeler et al., 2005; Fahnenstich et al., 2007).

Tabelle 2.5.1: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Insertionsmutantenlinien.

At5g11670	NADP-ME2	SALK_073818
		SALK_020607
		SAIL_752_C09
At5g25880	NADP-ME3	SALK_139336
		FLAG_178A05
At5g55590	QRT1	SALK_017414
At3g07970	QRT2	SALK_034763
At4g20050	QRT3	SALK_142316

Die QRT-Mutanten zeigen alle einen Tetraden-Phänotyp der Pollen. Diese Mutanten wurden für einen Phänotypenvergleich mit den *nadp-me3*-Linien genutzt. Qrt1 codiert für eine Pectin-Methylesterase (At5g55590), *qrt2* (At3g07970) und *qrt3*

(At4g20050) für zwei unterschiedliche Endo-Polygalakturonasen. Alle qrt-codierten Enzyme sind für die Trennung der Mikrosporen untereinander verantwortlich.

Außerdem wurden für diese Arbeit Doppelmutanten hergestellt, in denen das Mais-C₄-NADP-Malat-Enzym (NADP-ME) unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promoters in Chloroplasten von Stärkefreimutanten, *adg1* (ADP-Glucose Pyrophosphorylase1 null Mutante) and *pgm1* and *stf1* (Phosphoglucomutase1 null Mutante) überexprimiert wurden. Weitere Informationen sind den Tabellen 2.5.2 zu entnehmen.

Tabelle 2.5.2: Auflistung der mit dem MEm-Konstrukt transformierten Mutanten mit Beschreibung des pflanzlichen Zielorganismus.

<i>Mutanten</i>	<i>Hintergrund</i>
Ler MEm	<i>Landsberg erecta (Ler)</i>
<i>sft1</i> MEm	<i>Deletionsmutante Phosphoglucomutase</i>
Col-0 MEm	<i>Columbia (Col)</i>
<i>adg1</i> MEm	<i>Deletionsmutante ADP-Glucose Pyrophosphorylase</i>
<i>pgm1</i> MEm	<i>Deletionsmutante Phosphoglucomutase</i>

2.6 Physiologische Methoden

2.6.1 Bestimmung des Verhältnisses von Frischgewicht zu Trockengewicht

Es wurden jeweils vier Pflanzenrosetten der unter den jeweiligen Bedingungen gewachsenen transgenen Linien geerntet und in gewogene Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Probenentnahme für die Bestimmung fand zu gleichbleibenden Zeitpunkten statt. Das Frischgewicht des geernteten Materials wurde durch genaues

Wiegen bestimmt. Die Proben wurden über Nacht bei 60 °C inkubiert. Das Gewicht der nun getrockneten Proben wurde ein weiteres Mal bestimmt und das Verhältnis zu den Werten des vorherigen Tages errechnet. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Sigma Plot (V. 9,0) ausgewertet und visualisiert.

2.6.2 Bestimmung des Verhältnisses von Frischgewicht zu Fläche

Die Rosette der zu untersuchenden Pflanzen wurde geerntet und gewogen. Die betreffende Pflanze wurde eingescannt und mit Adobe Photoshop (Version 5.5, Adobe) bearbeitet, sodass mithilfe des Programms Image J (Version 1.37h) die Fläche der Blätter bestimmt werden konnte. Die Ergebnisse wurden mit dem Gewicht der ausgewerteten Blätter verrechnet und mit Sigma Plot (V.9,0) dargestellt.

2.6.3 Infiltration mit Elicitoren

A.-thaliana-wt und NADP-ME2-Knock-out-Linien wurden vier Wochen lang bei KT-Bedingungen in 9er-Töpfen angezogen. Mehrere Blätter dieser Pflanzen wurden entweder mit 1 µM Flagellin (flg22), Harpin (hrpZ) oder mit H₂O (Mock) mit einer 2-ml-Einmalspritze (Sarstedt) infiltriert. Mindestens drei Blätter pro Infiltrat wurden nach 1, 4, 8, 16 und 24 Stunden geerntet und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt.



Abbildung 2.6.1:
Infiltration von
A. thaliana. Arabidopsis
eFP Browser at
bar.utoroto.ca

2.7 Elektronenmikroskopie

Die Ultrastruktur der Chloroplasten – im Besonderen die der Thylakoiden – und die Anzahl der Grana-Stapel sollten in den transgenen mME- und Stärkefrei-mME-Linien unter KT- und LT-Bedingungen elektronenmikroskopisch untersucht werden. Dazu wurden Ultradünnschnitte des in Spurr eingebetteten Blattmaterials der Pflanzen angefertigt und die Anzahl der Thylakoidmembranen bestimmt.

2.7.1 Spurr-Einbettung von Blattgewebe

Die Fixierung benötigt zwei Arbeitstage. Am ersten Tag wurden ca. 1 mm² kleine Blattstücke in einem 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäß mit 2 % Glutaraldehyd in einem Exsikkator vacuumfiltriert, bis das Blattmaterial in dem Fixiermedium absank. Ist das Blattmaterial nicht abgesunken, wurde 0,01 % Triton X hinzugegeben. Sank die Probe nicht in der Fixierlösung ab, wurde sie verworfen. Die Blattstücke wurden für vier bis fünf Stunden in dem Fixiermedium inkubiert und anschließend bei 4 °C über Nacht gelagert. Am zweiten Tag der Fixierungsprozedur wurde das Blattmaterial drei Mal mit 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer gewaschen. Die Blattstücke wurden anschließend in 1% Osmiumtetroxide transferiert und für vier Stunden bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Material weitere drei Mal mit 50 mM NaPi-Puffer gewaschen. Um das Blattmaterial zu entwässern, wurde das Material in einer Serie aufsteigenden Acetonkonzentrationen von 10, 20, 30, 40 % jeweils 15–20 min inkubiert. Um danach den Überstand zu entfernen, wurde die Blattstücke in 50 % Aceton/1 % Uranylacetate in Wasser für 90 bis 120 min (25 ml 100 % Aceton + 25 ml 2 % Uranylacetate in Wasser) inkubiert. Nach weiteren Inkubationen von je 15–20 min in 70 %, 96 % und dann drei Mal in 100 % Aceton konnte das Blattmaterial in Spurr eingebettet werden. Hierzu wurde das Material für

2 Material und Methoden

eine Stunde in 10 % Spurr in Aceton inkubiert und anschließend ÜN in einer 25-%-Spurr-/75-%-Aceton-Lösung gelagert. Am darauf folgenden Tag wurde das Blattmaterial in je 50 %, 70 %, 90 %, 100 % Spurr in Aceton für je zwei Stunden inkubiert. Frisches 100-%-Spurr wurde nun in Einbettungsformen (PELCO® Flat Embedding Molds) gegeben, bis diese zur Hälfte befüllt waren. Je ein Blattstück pro Einbettungsmulde wurde nun an die Spitze der Form gelegt und die Form dann mit Spurr aufgefüllt. Das eingebettete Blattmaterial wurde in der Einbettungsform zwei bis drei Tage bei 60 °C gebacken, bis das Spurr polymerisiert war.

Für die Spurr-Einbettung werden folgende Chemikalien benötigt:

2 % Glutaraldehyde (in 50 mM NaPi-Puffer, pH 7.2)

2 % Osmiumtetroxide OsO₄ (in Wasser)

2 % Uranylacetate (in Wasser)

1 M NaPi-Puffer: 2,8 ml 1M NaH₂PO₄ + 7,2 ml Na₂HPO₄ (pH 7,2), verdünnt zu 50 mM konz.

Spurr-medium (NSA, ERL, DER, Dimethylaminoethanol) für ~10 ml

26 g Nonenylsuccinic anhydride pure (NSA)----- 6,5 g

10 g ERL-4221D----- 2,5 g

6 g DER 736 pract ----- 1,5 g

0,4 g Dimethylaminoethanol -----0,1 g

2.7.2 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Ultradünnschnitte und Elektronen-Mikroskopie wurden im ZMBP (Universität Tübingen, Mikroskopie) durchgeführt. Für die Ultradünnschnitte wurde ein Ultramikrotom Leica UCT, Reichert Ultracut E, LKB Ultratome III verwendet. Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden mit einem Transmission Electron Microscope LEO 906 gemacht und im ZMBP von der AG Stierhof entwickelt.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurde die klassische Methode nach Bradford (1976) benutzt. Das Prinzip, das dieser Methode zugrunde liegt, ist eine Farbreaktion des in der Rotiquant-Lösung enthaltenen Coomassie Brilliant Blue G250 bei der Bindung an vorwiegend basische Aminosäuren. Die Farbreaktion der Coomassie-Lösung wird durch den Übergang von dem kationischen in den anionischen Zustand bewirkt. Im kationischen Zustand absorbiert es Licht maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda=470$ nm und im anionischen bei $\lambda=595$ nm.

Reaktionsansatz für Eichgerade:

10–200 μ l 0,1 mg/ml BSA (bovine serum albumine)

5 μ l Extraktionspuffer der zu messenden Proteinprobe

200 μ l Rotiquant

ad 1000 μ l mit H₂O

Reaktionsansatz für Proben:

5 μ l Proteinprobe

200 μ l Rotiquant

ad 1000 μ l mit H₂O

Die Absorptionen der Reaktionsansätze wurde bei A_{450} und A_{590} nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min bis maximal 15 min bei Raumtemperatur in einem Fotometer (Novospec II, Pharmacia, Karlsruhe) gemessen. Als Referenz diente die Absorption einer leeren Küvette bei $\lambda=590$ nm. Aus der BSA-Eichgraden und dem Quotient A_{590}/A_{450} wurde anschließend die Proteinkonzentration berechnet.

2.8.2 Native PAGE

Der qualitative Nachweis von Enzymaktivitäten in Proteinextrakten wurde in nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen (native PAGE) durchgeführt (Gerrard Wheeler et al., 2005). Die Acrylamid-Gele wurden mithilfe der Minigel Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) hergestellt. Die Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED gestartet. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzten und der Molekulargewichtsmarker (SM0441 Prestained Marker, MBI Fermentas) wurden aufgetragen und 10 min bei 10 mA einlaufen gelassen, 2 min bei 40 mA fokussiert. Nach Erreichen des Trenngels wird die Proteinfront bei 25 mA aufgetrennt.

Sammelgelpuffer:

500 mM Tris/HCl pH 6,8

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgel:

25 % (v/v) Sammelgelpuffer

15 % (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1)

0,06 % (w/v) APS

0,3 % (v/v) TEMED

Trenngel (12,5%ig):

25 % (v/v) Trenngelpuffer

42 % (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1)

0,05 % (w/v) APS

0,05 % (v/v) TEMED

Elektrodenpuffer:

250 mM Tris

192 mM Glycin

2x Probenpuffer:

125 mM Tris/HCl pH 6,8

20 % (w/v) Glycerin

5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

0,0025 % (w/v) Bromphenolblau

2.8.3 Messung der NADP-ME-Aktivität

Die Messung der NADP-ME-Aktivität macht sich die enzymatische Reaktion dieses Enzyms zunutze, bei der das NADP-Malat-Enzym die Decarboxylierung von 1 mol Malat, wobei 1 mol CO_2 freigesetzt und der gleichzeitiger Oxidation zu 1 mol Pyruvat unter Reduktion von 1 mol NADP^+ zu 1 mol NADPH katalysiert. Die Reduktion von NADP zu NADPH bewirkt eine Änderung der Absorption bei $\lambda=340$ nm. Diese Absorptionsänderung, die 1:1 die Enzymaktivität widerspiegelt, wurde mit einem Multiplatten-Fotometer (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim)

in Multiplatten (Elisa-Platte Microlon, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit einem jeweiligen Volumen von 200 μl gemessen. Die Ansteuerung des Geräts wie auch die nachfolgende Auswertung wurde mit der Software EasyWinKinetics 32bit (Fa. TEKAN, Crailsheim) durchgeführt. Das frische Blattmaterial wurde bis zur Extraktion in flüssigem N_2 gehalten. Mit einem N_2 gekühlten Bohrer wurden die Blätter unter Zugabe von 250 μl Extraktionspuffer gemörsert und homogenisiert. Anschließend wurden weiter 250 μl Extraktionspuffer hinzugegeben, die Probe bei 14000 rpm und 4 $^\circ\text{C}$ fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Proben auf Eis gelagert. Für die Reaktion wurde je 10 μl Extrakt eingesetzt. Durch die Zugabe von Malat wurde die Reaktion gestartet und im Platten-Fotometer gemessen.

ME-Extraktionspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8

5 mM MgCl_2

2 mM EDTA

10 % (v/v) Glyzerin

0,1 % (v/v) Triton X-100

10 mM β -Mercaptoethanol

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 μl):

50 mM Tris/HCl pH 8

20 mM MgCl_2

0,8 mM NADP

5 mM L-Malat (\rightarrow Start der Reaktion)

2.8.4 Färbung der NADP-ME-Aktivität in nativen Gelen und Pflanzengeweben

Die Enzym-Aktivität von NADP-ME wurde sowohl in nativen Gelen als auch *in vivo* in Blättern nachgewiesen. Für den Versuch in nativen Gelen wird zunächst Protein extrahiert, bei der Färbung in Blättern fällt dieser Schritt weg. Nach der Auftrennung der Proteine im nativen Gel wurde das Gel in der Färbelösung bei 30 °C inkubiert. Die Färbung im Blattmaterial erfolgt durch Vakuuminfiltration im Exsikkator und anschließender Inkubation bei 30 °C. Die vorhandene Enzymaktivität setzt dabei das Malat in Pyruvat unter Reduktion von NADP zu NADPH um. Das in der Lösung enthaltene Phenazinmethosulfat oxidiert wiederum das NADPH und gibt die Elektronen an Nitroblau-Tetrazolium weiter, das dann gut sichtbar als blaues Präzipitat ausfällt.

Färbelösung für NADP-ME:

50 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM L-Malat

10 mM MgCl₂

0,5 mM NADP

35 mg/ml Nitroblau-Tetrazolium

0,85 mg/ml Phenazinmethosulfat

2.8.5 Isolierung von Thylakoidmembranen

Die Rosetten von vier Wochen alten Pflanzen (ca. ½ Pflanzenschale) wurden geerntet und das Frischgewicht bestimmt. Das Blattmaterial wurde nun mit eiskaltem T1-Puffer (4 °C) in einem Mixer mit kurzen Mix-Impulsen homogenisiert. Nach Aufschluss des Blattmaterials wurde es durch eine Nylongaze (50 µm) filtriert und in

einen 50 ml Zentrifugenbecher überführt. Das Filtrat wurde bei 4500 UpM (1400 xg) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig dekantiert. Der verbleibende Niederschlag wurde in eiskaltem T2-Puffer vollständig resuspendiert und erneut bei 10000 UpM (10000 xg) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand vorsichtig dekantiert und der Niederschlag in ca. 1 ml eiskaltem T3-Puffer vollständig resuspendiert. Die Aliquots konnten nun bei –80 °C für einige Zeit gelagert werden.

T1-Puffer:

0,4 M Sorbitol

0,1 M Tricin pH 7,8 (mit KOH eingestellt)

T2-Puffer:

25 mM HEPES pH 7,5 (mit KOH eingestellt)

10 mM EDTA

T3-Puffer (Aufbewahrungspuffer):

50 % Glycerin

10 mM HEPES pH 7,5 (mit KOH eingestellt)

1 mM EDTA

Zu den Puffern T1 und T2 wurden vor der Thylakoidextraktion frische Proteaseinhibitoren hinzugegeben. Die Stammlösungen der Proteaseinhibitoren kann bei 4 °C aufbewahrt werden jedoch sollte der Aufbewahrungszeitraum von einem Monat nicht überschritten werden.

Proteaseinhibitoren:

PMSF-Stocklösung:

100 mM in Isopropanol (= 0,17g/10 ml Isopropanol)

200 µl der Stocklösung pro 100 ml T1 od. T2-Puffer

Benzamidine-Stock:

100 mM in 20 mM HEPES pH 7,5 (= 0,16g/10 ml)

1 ml der Stocklösung pro 100 ml T1 od. T2-Puffer

ε-Aminocapronsäure-Stock:

500 mM in Wasser (= 0,65g/10 ml H₂O)

1 ml der Stocklösung pro 100 ml T1 od. T2-Puffer

Für die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration der isolierten Thylakoidmembranen wurden 10 µl des Extraktes mit 990 µl 80%igem Aceton versetzt und für 10 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Chlorophyllgehalt fotometrisch bestimmt.

2.8.6 Blue-Native- PAGE

Das ursprünglich von Schagger und Jagow (1991) für die Analyse von Komplexen aus der mitochondrialen Atmungskette entwickelte Verfahren des Blue-Native-Gelsystems wurde benutzt, um Membranproteinkomplexe in ihrer nativen Form trennen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode genutzt, um Proteine der Thylakoidmembran aufzutrennen. Coomassie G250 dient dabei als Ladungsträger und bindet durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Oberfläche von Proteinen, wobei diese negativ geladen werden und im elektrischen Feld zur

Anode wandern. Da ein natives Puffersystem verwendet wird, können intakte Proteinkomplexe ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Für die Blue-Native-Gelelektrophorese wurde das Novex® NativePAGE™ Bis-Tris Gel System (Invitrogen), das NativePAGE™ Novex® 4–16 % Bis-Tris Gele und die dazugehörigen Puffer beinhaltet und als Elektrophoresesystem die XCell *SureLock*™ Mini-Cell (Invitrogen) benutzt. Die Gelelektrophorese wurde nach Herstellerprotokoll, jedoch wurde die Probearbeitung nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt.

Probearbeitung für Blue-Native-Gele:

Isolierte Membranen, gewonnen aus 1 L Kultur (Kapitel 3.2.1.3), wurden abzentrifugiert (Tisch-UZ, 15 min, 60000 rpm, 4 °C) und in 900 µl BN-Probenpuffer (750 mM Aminocapronsäure (ACA), 50 mM Bis-Tris pH 7.0, 0.5 mM EDTA) resuspendiert. Die Proben wurden mit 1 % bzw. 0.5 % Dodecyl-Maltosid (DDM) gelöst, für 40 min auf Eis inkubiert und anschließend wurden in der Tisch-Ultrazentrifuge die nicht gelösten Bestandteile abzentrifugiert (Tisch-UZ, 1 h, 60000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und aliquotiert (je Gelspur 60–80 µl Probe). Ab diesem Schritt wurde nach Herstellerprotokoll und mit dem Novex® NativePAGE™ Bis-Tris Gel System (Invitrogen) weitergearbeitet.

2.8.7 Determination der PR Gen-Transkript-Akkumulation

Transkripte der PR Gene PR-1 (At2g19990), PR-2 (At3g57260), PDF1.2a (At5g44420) und PR-3 (At3g12500) wurden mittels RNA-Gel-Blot-Analyse von 8 µg gesamt RNA pro Bahn bestimmt, während für die Bestimmung von FMO1

(At1g19250) und RBOH-D (At5g47910) Transkripten, 40µg gesamt RNA pro Bahn geladen wurde.

2.8.8 Bestimmung der freien Salicylsäure und Camalexin

Freie Salicylsäure (SA) und Camalexin wurden wie in Nawrath & Métraux (1999) beschrieben extrahiert und analysiert (Nawrath und Metraux, 1999). Die HPLC auftrennung von SA wurde nach der in Voll et al. (2003) und Abbasi et al. (2009), beschriebenen Methode und HPLC durchgeführt (Voll et al., 2003; Abbasi et al., 2009).

2.8.9 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mittels Luminometer

Mit einem Korkbohrer Nr. 1 (3,8 mm Durchmesser) wurden Blattstücke von vier Wochen alten *A.-thaliana*-Pflanzen ausgestanzt. Dabei wurde je eine Probe pro Blatt von den zwei jüngsten voll entwickelten Blättern einer Pflanze genommen. Pro Kondition wurden 16 Proben gemessen. Die Blattproben wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte (LuminNunc F96 MicroWell Platte, VWR) mit je 150 µl Wasser über Nacht inkubiert, am nächsten Tag das Wasser gegen 50 µl Wasser ausgetauscht und die Blattproben nochmals eine Stunde inkubiert.

Endkonzentration des Reaktionsansatz:

17 µg*ml⁻¹ Luminol

10 µg*ml⁻¹ HRP

oder 100 nM Flg22

Reaktionsansatz mit den Stammlösungen:

6 µl 17 mg*ml⁻¹ in DMSO

6 μl 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in Wasser

6 μl 100 μM in Wasser

oder 1 ml 100 nM Flg22 in Wasser

Gesamtvolumen 3 ml

Die Messungen wurden an einem Berthold-Luminometer durchgeführt, für die Ansteuerung des Gerätes wurde das Programm MikroWin 200 genutzt.

2.9 Messung der Metaboliten

2.9.1 Chlorophylle und Carotinoide

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Blättern wurde nach einem modifizierten Protokoll von Graan und Ort (1984) durchgeführt. Dabei wurde das gefrorenes Material (50–100 mg) mit 1 ml Extraktionsmedium versetzt. Anschließend wurden die Proben 10 min im Dunkeln auf Eis inkubiert, um Chlorophyllverlust durch Fotooxidation vorzubeugen. Nachdem die Proben mit 14000 rpm 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert wurden, konnte der Überstand der Proben 1:3 mit Extraktionsmedium verdünnt und jeweils 1 ml in Plastikkuvetten (Fa. Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag) überführt werden. Im Fotometer (Novospec II, Pharmacia, Karlsruhe) wurden nun die Absorptionen bei den Wellenlängen 480, 645, 647, 652, 663 und 664 nm bestimmt. Als Referenzwert diente eine Küvette mit Extraktionsmedium.

Die Berechnung des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts erfolgte mit folgenden

Formeln:

$$\text{Chlorophyll a [g/mg FG]} = 13,19 A_{664} - 2,57 A_{647}$$

Chlorophyll b [g/mg FG] = $22,1 A_{647} - 5,26 A_{664}$

Chlorophyll a+b [g/mg FG] = $7,93 A_{664} + 19,53 A_{647}$

Carotinoide [g/mg FG] = $0,08 (A_{480} + 0,144 A_{663} - 0,638 A_{645})$

2.9.2 Bestimmung der Pyridin-Nucleotide in *A. thaliana*

Die Nukleotid-Konzentration in Blättern wurde mittels der enzymatisch-zyklisierenden Methode (Lowry et al., 1961), nach Beschreibung von Matsumura und Miyachi (1980) durchgeführt. Gefrorenes Blattmaterial wurde entweder in 150 μ l 0,1 N NaOH (für NAD[P]H) oder in 0,1 N HCl (für NAD[P]) extrahiert. Dabei wurden die Proben für 2 min gekocht und nach Abkühlung auf Eis mit 50 μ l 1 M Bicine-NaOH (pH 7,6) und entweder 12 μ l 1 N HCl (für NAD[P]H) oder 15 μ l 1 N NaOH (für NAD[P]) neutralisiert. Die oxidierte und reduzierte Form der Pyridin-Nukleotide hat eine unterschiedliche Stabilität in alkalischen oder sauren Lösungen, jedoch war es möglich, die neutralisierten Extrakte für einige Tage bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern (Lowry et al., 1961).

Reaktionsansatz für die Messung von NADP/NADPH:

50 mM Bicine-NaOH (pH 7,6)

3 mM Glukose-6-Phosphat

2 mM EDTA

0,1 mM DCPIP

0,6 mM PMS

3 U NADP-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Roche)

Reaktionsansatz für die Messung von NAD/NADH:

50 mM Bicine-NaOH (pH 7,6)

5 % Ethanol

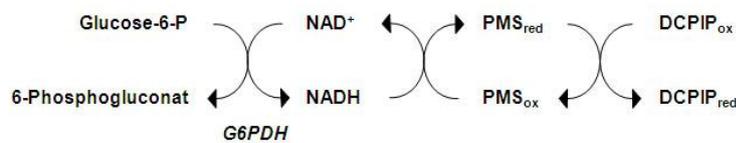
0,1 mM DCPIP

0,6 mM PMS

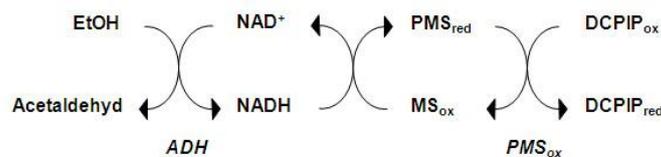
3 U Alkohol-Dehydrogenase

Das Endvolumen pro Ansatz betrug 300 μ l.

NAD (H):



NADP(H):



Sensitivität: 0,01 μ M Nicotinamid Adenin Dinucleotid

Abbildung 2.9.1: Schematische Darstellung der zyklischen, enzymatischen Methode zur Bestimmung von Pyridin-Nukleotiden nach Lowry et al., 1961.

Die optische Messung wurde mit einem Multiplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) in Multiplatten (Elisa-Platte Microlon, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. Da DCPIP durch Licht schnell ausbleicht, war es wichtig, die Mikrotiterplatte schnell und möglichst ohne Lichtkontakt mit den Reaktionsansätzen zu befüllen und DCPIP dem Ansatz als letzten Bestandteil hinzuzugeben. Zur Auswertung wurde für jedes einzelne Nukleotid eine Eichgrade von 0–40 pmol NAD(H) oder NADP(H) erstellt.

2.9.3 Metaboliten-Analyse mittels GC-MS

Die Metaboliten-Analyse wurde nach einer Veröffentlichung von Fiehn (2007) durchgeführt. Das für die GC-MS-Analyse vorgesehene gemörserte Blattmaterial wurde bis zur Extraktion bei -80 °C gelagert. Für die Analyse wurden $\sim 50\text{ mg}$ pulverisiertes Blattmaterial eingesetzt. Für die Extraktion wurde $1,5\text{ ml}$ gekühlter (-20 °C) Extraktionspuffer ($\text{H}_2\text{O}:\text{Methanol}:\text{CHCl}_3$ im Verhältnis 1:2,5:1), dem $15\text{ }\mu\text{l}$ 60 mM Ribitol pro 45 ml Puffer als Standard frisch zugesetzt wurden, eingesetzt. Jede Probe wurde schnell für $10\text{--}20\text{ s}$ gevortext und dann sofort bis zur Weiterverarbeitung auf NaCl versetztem Eis bei 0 °C für maximal 10 min gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 6 min geschüttelt und für 2 min bei $20,000\text{ xg}$ bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse wurden die Proben für 10 s gevortext und $200\text{ }\mu\text{l}$ in eine GC-MS-Ampullen überführt. $5\text{ }\mu\text{l}$ eines Phenylalanine-d5 + Valine-d8 Mix ($500\text{ }\mu\text{M}$) wurden den Proben zugesetzt und die Proben in einer Speedvac subsequent getrocknet. Die Proben konnten nun bei -20 °C bis zur Probenanalyse gelagert werden. Alle folgenden Schritte wurden automatisch durch einen Autosampler durchgeführt. 10 ml Methoxyamin-Hydrochlorid (20 mg/ml) wurden den getrockneten Fraktionen hinzugefügt und die Proben für 90 min bei 30 °C unter andauerndem Schütteln inkubiert. Danach wurden $90\text{ }\mu\text{l}$ MSTFA hinzugegeben gefolgt von einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln. $100\text{ }\mu\text{l}$ des Ansatzes wurden in eine GC-MS-Ampulle mit Glaseinsatz transferiert und nach 120 min bei RT im GC-MS-Gerät analysiert. Die Daten wurden mittels des ChemStation-Programmes evaluiert und bei der Analyse der Metaboliten auf eine

Datenbank der Retentionszeiten und ausgewählten interessanter Ionen zurückgegriffen.

2.9.4 Stärkefärbung

Je Pflanze wurden zwei bis drei Blätter zum Ende der Lichtperiode geerntet und in 80 % Ethanol bei 60 °C gebleicht. Der Überstand mit den in EtOH gelösten Blattpigmenten wurde entfernt und die gebleichten Blätter in einer Jod-Kaliumjodidlösung (modifiziert nach Caspar et al., 1985) gefärbt.

Jod-Kaliumjodidlösung:

5,7 mM doppelt sublimiertes Jod

43,4 mM Kaliumjodid

Das Kaliumjodid wurde in bidest. Wasser gelöst, bevor das Jod zugegeben wurde.

2.9.5 Bestimmung löslicher Zucker und Stärke

Für die Bestimmung der Konzentration löslicher Zucker und Stärke in Blattextrakten wurden 50–100 mg pulverisiertes gefrorenes Blattmaterial eingesetzt. Für die Extraktion löslicher Zucker wurden die Proben mit 750 µl 80 % Ethanol versetzt, gevortext und 15 min auf 70 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde anschließend für die Bestimmung der Stärke genutzt. Der Überstand der Extraktion wurde in einem Vakuumkonzentrator (Speedvac, Eppendorf) getrocknet.

Das Pellet wurde für die Stärkebestimmung mit 200 µl 0,2 N KOH versetzt und 45 min bei 95 °C erhitzt, um die in der Probe enthaltene Stärke in Lösung zu bringen. Zum Abkühlen wurden die Proben auf Eis gestellt und hinterher mit 1 M Essigsäure

2 Material und Methoden

auf pH 5–6 gebracht. Mit 3,5 U α -Amylase und 2,5 U Amyloglukosidase in 40 μ l 0,1 M NaAc pH 4,6 wurden die Proben nun enzymatisch über Nacht bei RT verdaut.

Die eingeeengten ethanolischen Extrakte der Zuckerbestimmung wurden in 500 μ l H_2O_{dd} mit einem Rührspatel resuspendiert und anschließend bei 14000 rpm für 5 min abzentrifugiert.

Die Enzyme, die den Extrakten zur Stärkehydrolyse hinzugegeben wurden, wurden für 10 min bei 95 °C deaktiviert und danach bei 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Die enzymatische Bestimmung der Zucker- und Stärkekonzentrationen wurde mittels optische Messung mit einem Multiplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) in Multiplatten (Elisa-Platte Microlon, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. Von den Stärkeextrakten wurden 5 μ l und von den Zuckerextrakten 50 μ l bei einem Endvolumen von 200 μ l zur Messung eingesetzt. Durch einen gekoppelt-enzymatischen Test (Bergmeyer, 1962; Stitt et al., 1989), bei dem verschiedene Enzyme dazu verwendet wurden, nach und nach die vorhandenen Zucker zu Glucose-6-Phosphat umzusetzen, welches schließlich von der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase unter Reduktion von NAD^+ zu NADH (was bei $\lambda=340$ nm verfolgt wurde) oxidiert wurde, wurden die Konzentrationen bestimmt (Abb. 2.9.1).

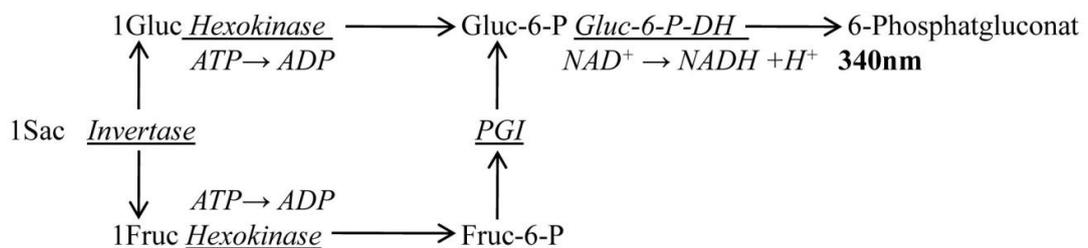


Abbildung 2.9.1: Schema der enzymatischen Reaktionen beim Nachweis von Saccharose, Fructose und Glucose.

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 200 μ l):

60 μ l 166 mM HEPES NaOH pH 7,5

10 μ l 16 mM NAD⁺

10 μ l 40 mM ATP

10 μ l 200 mM MgCl₂

0,1 μ l 100 U/ ml Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Der Messansatz inklusive der Proben wurde in die Mikrotiterplatte pipettiert und zur Bestimmung des Anfangswertes in das Fotometer gegeben. Nach fünf Messungen wurde die Platte vom Gerät ausgegeben. Mithilfe eines metallenen Stempels mit 96 Nadeln (Werkstatt des Bot. Inst.), die zuvor jeweils mit 1 μ l einer 750 U/ml Hexokinaselösung beschickt worden waren, wurde die Reaktion simultan in allen Kavitäten gestartet und das Messprogramm im Fotometer weitergeführt. Nach 15 Messungen, als die Absorption nicht weiter anstieg, stoppte das Programm erneut und das nächste Enzym (je 1 μ l einer 350 U/ml Phosphoglucoisomeraselösung) konnte mittels Stempel dem Reaktionsansatz zugegeben werden und es wurde weitergemessen. Ebenso wurde mit dem letzten Enzym (je 1 μ l Invertaselösung (eine Spatelspitze Enzym [750000 U/mg] pro ml) verfahren. Da in den Stärkeextrakten nach der enzymatischen Hydrolyse mittels α -Amylase und Amyloglukosidase nur noch Glucose im Ansatz vorhanden war, wurde für die Stärkebestimmung nur Hexokinase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase benötigt (Abb. 2.9.1).

2.9.6 Bestimmung von Malat und Fumarat

Für die Quantifizierung des Malat- und Fumaratgehaltes wurde ein kombinierter Enzymansatz nach einem modifizierten Protokoll von Passoneau & Lowry (1993) genutzt. In diesem Protokoll wurde die Zunahme Extinktion bei 340 nm als

Messgröße fotometrisch bestimmt. Die Veränderung der Extinktion kommt durch die Reduktion von NAD^+ zu NADH zustande. Da die Extinktionszunahme aufgrund der Stöchiometrie den Gehalt von Malat und Fumarat direkt widerspiegelt, dient die gemessene Extinktion als Basis für die Berechnung der Konzentrationen. Die Quantifizierung wurde mit einem Multiplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan, Crailsheim) in Multiplatten (Elisa-Platte Microlon, 96 W, Fa. Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. Die Berechnung des Malat- und Fumarat-Gehaltes wurde anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes und dem molaren Extinktionskoeffizienten $6,2 \text{ [cm}^2/\mu\text{mol}]$ für NADH durchgeführt.

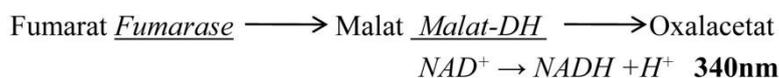
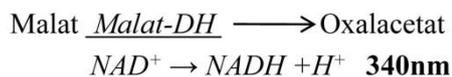


Abbildung 2.9.2: Schema der enzymatischen Reaktionen beim Nachweis von Malat und Fumarat.

Versuchsansatz (200 μl):

100 mM Glycylglycin

100 mM Glutamat pH 9,9 (mit KOH eingestellt)

2 mM NAD^+

10 μl Probe

3,5 U L-Malat-Dehydrogenase

1 U Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Der Malatgehalt wurde nach 15 min Inkubationszeit bestimmt. Anschließend wurden 10 U Fumarase zu jedem Versuchsansatz hinzugegeben und nach einer einstündigen Inkubation der Fumaratgehalt bestimmt.

2.10 Bestimmung der Assimilation und Respiration

2.10.1 Bestimmung der CO₂-Assimilation mittels IRGA

Mithilfe einer IRGA (engl. IRGA, infra-red-gas-analyser) kann der Gasaustausch, also die Aufnahme von CO₂ im Licht, die Abgabe von O₂ im Rahmen der Dunkelatmung sowie die Freisetzung von Wasserdampf bei der Transpiration an *In-vivo*-Blattmaterial gemessen werden (Wolf et al., 1969). Die Messung der CO₂-Assimilation mit einer variablen mesophyll-internen CO₂-Konzentration (C_i) wurde mit einem IRGA-System LI-6400 (Li-Cor, LICOR Inc., Lincoln, USA) durchgeführt. Für Messeinstellungen und Durchführung wurde die von der Firma Li-Cor bereitgestellte Software verwendet.

Messbedingungen:

PFD von 100, 150 oder 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

Temperatur der Messkammer 24 °C,

Durchflussrate 100 $\mu\text{mol s}^{-1}$,

Relative Luftfeuchtigkeit 60–70 %.

Für die Messung wurden zwei Gasströme benutzt: (i) ein CO₂-freies Referenzgas mit definierter Fließgeschwindigkeit, das direkt in eine Infrarotmesszelle geleitet wurde und (ii) ein Analysegas, das erst über einen definierten Ausschnitt einer intakten Blattspreite geleitet wurde. Beide Gase wurden gleichzeitig einer bestimmten Intensität Infrarotstrahlung ausgesetzt. Je nach Konzentration der Gase wurde unterschiedlich viel IR absorbiert. Die nicht absorbierten Rest-IR-Strahlungen gelangten in einen Detektor. Die Unterschiede der CO₂-Konzentrationen in Referenz- und Analysegas werden zur Berechnung der „Response“-Kurve benutzt. Die „Response“-Kurve beschreibt die Reaktion der CO₂-Assimilation auf die CO₂-

Konzentration der Atmosphäre. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis des molaren Gasstroms pro Zeiteinheit, der Transpiration (w_e und w_o wurden von der IRGA gemessen), sowie der eingespannten Blattfläche.

Die Transpirationsrate (E) beträgt:

$$E = u(w_o - w_e) / (1 - w_o)$$

Dabei entspricht w_e dem Wasserdampfpartialdruck der zur Blattkammer führenden Luft und w_o dem Wasserdampfpartialdruck der aus der Blattkammer ausströmenden Luft und u dem molaren Gasstrom. Letzterer berechnet sich wie folgt:

$$u = (P \cdot f) / (R \cdot T \cdot A)$$

In dieser Gleichung bezeichnet P den Luftdruck, f die Flussrate, R die universelle Gaskonstante, T die absolute Temperatur und A die Blattfläche.

Die Assimilationsrate (A) beträgt:

$$A = u(c_e - c_o) / (1 - w_o)$$

c_e und c_o bezeichnen die CO_2 -Konzentrationen des Referenz- bzw. Analyse-gases.

2.10.2 Bestimmung des respiratorischen Quotienten

Der respiratorische Quotient (RQ: CO_2 -Verbrauch/ O_2 -Konsum) wurde mit einem Warburg Manometer (Braun-GmbH, Melsungen, Germany) bestimmt. Der Nobelpreisträger Otto Warburg hat die Methode und die nach ihm benannte Warburg-Apparatur 1923 erfunden. Im Prinzip handelt es sich bei einer Warburg-Apparatur um ein temperiertes Wasserbad mit Thermostat, Beleuchtung und einer Schüttelvorrichtung für Manometer. Mithilfe dieser Apparatur können alle Reaktionen gemessen werden, bei denen Gase gebildet oder verbraucht werden. Die Manometer sind mit einer wässrigen Lösung (BRODIE-Lösung) als Sperrflüssigkeit gefüllt.

Brodie-Lösung (Endvolumen 500 ml):

11,5g NaCl in 200 ml H₂O

2,5g Cholsäure in 100 ml H₂O in NaOH gelöst

5–7 Tropfen konz. alkoholische Methylenblaulösung

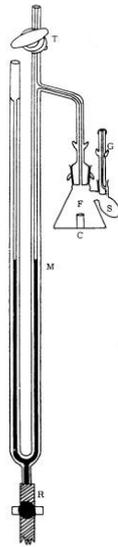


Abbildung 2.10.1: Schematische Darstellung eines Monometers. M Manometer mit Sperrflüssigkeit (Brodie-Lösung), T Manometerhahn zum Druckausgleich, R Ablasshahn für die Sperrflüssigkeit, F Hauptraum des Reaktionsgefäßes, C Zentralgefäß, S Seitenarm des Reaktionsgefäßes.

Die Dichte der Lösung beträgt 1,033, sodass 10.000 mm Brodie-Lsg. (Säulenhöhe) = 760 mm Hg = 1 physikalischen Atmosphäre entsprechen. Mithilfe der messbaren Druckänderungen (mm) kann die Gasmenge ΔV (μl) bestimmt werden.

Für die Bestimmung des RQ wurden geeichte Manometer und Reaktionsgefäße benutzt, deren Volumenangabe auf dem Ventilstopfen und auf den Manometern zu finden ist. Die Summe der einzelnen Volumen ist das Gesamtvolumen (V_{ges}) des Reaktionssystems bis zur Marke „15“ im rechten Schenkel des Manometers. Das Reaktionsgefäß besteht aus einem Hauptraum und einem daran angeschmolzenen Seitenarm. Der Hauptraum enthält außerdem einen Glaseinsatz (Zentralgefäß). Pro zu messender Pflanzen-Linie wurden zwei Manometer mit Reaktionsgefäß benutzt, in eines der beiden wurde in den Einsatz ein mit 200 ml 1 M KOH-Lösung getränktes Filterpapier gelegt, das andere blieb ohne Filterpapier. Das Respirometer mit KOH registrierte also nur den O₂-Verbrauch, während das Respirometer ohne

KOH sowohl die CO₂-Aufnahme als auch den O₂-Verbrauch maß. Aus der Druckänderung in beiden Manometern wurde der RQ berechnet.

Für den Versuch wurden 30 min vor Ende der Nacht und Ende des Tages Blattmaterial verschiedener Mutanten, die unter LT- und KT-Bedingungen gewachsen sind, geerntet. Definierte Blattstücke (je 6 cm²) wurden präpariert und mit 500 ml bidest. H₂O in das Reaktionsgefäß eingebracht. Vor Beginn der Messung wurde die Reaktionsmischung auf die Temperatur des Wasserbads gebracht, indem die befüllten Manometer mit den Reaktionsgefäßen ca. 10–15 min. bei geöffnetem Manometerhahn im Wasserbad geschüttelt wurden. Das Reaktionsgefäß und das Manometer bildeten während des Versuchs bei geschlossenem Manometerhahn ein abgeschlossenes System. Um einen raschen und vollständigen Gasaustausch im Reaktionsgefäß zu gewährleisten, wurden sie während des Versuchs kontinuierlich geschüttelt. Damit Temperaturschwankungen während der Messung keinen Einfluss auf das Messergebnis hatten, wurde ein Referenzmanometer (Thermobarometer), in dem alle Versuchskomponenten enthalten waren, die keinen Beitrag an der Volumenänderung hatten, zur Kontrolle mitgemessen. Die Volumenänderungen im Referenzgefäß wurden bei der Berechnung der Änderungen in den anderen Reaktionsgefäßen berücksichtigt. Die Berechnung des RQ wurde mithilfe des Gasgesetzes, der Gefäßkonstante, der Warburggleichung und der Differenz der Druckänderung in den Respirometern mit und ohne KOH durchgeführt.

Gasgesetz: $P * V = n * R * T$

Gefäßkonstante: $(V_g * T_0 / (T + V_f) * \alpha) / P_0 = k$

Warburggleichung: $h * (V_g * T_0 / (T + V_f) * \alpha) / P_0 = x$

Respiratorischer Quotient: $X_{CO_2} / X_{O_2} = RQ$

h: Manometrische Differenz

x: entwickelte oder verbrauchte Gasmenge

V_g : Gasvolumen im Reaktionsgefäß

V_f : Volumen der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß

P : Partialdruck des Gases

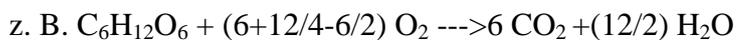
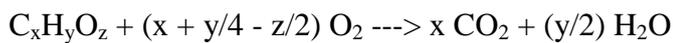
R : Dampfdruck der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß

P_0 : Normaldruck

T : Temperatur im Reaktionssystem

α : Bunsen'scher Absorptionskoeffizient

Aus dem respiratorischen Quotienten lassen sich Rückschlüsse über das „veratmete“ Substrat treffen. Ein vollständiger Abbau der Kohlenhydrate erfolgt nach folgender Gleichung:



Der Metabolismus dieses Bestandteils hat demnach einen RQ von $x/(x + y/4 - z/2) = 1$ für Glukose. Die den verschiedenen Substraten der Atmung zugeordneten RQs sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle: Liste der respiratorischen Substrate und ihrer zugehörigen Respiratorischen Quotienten (RQs).

<u>Name of the substance</u>	<u>Respiratory Quotient</u>
Carbohydrates	1
Triolein (Fat)	0.7
Oleic Acid (Fat)	0.71
Tripalmitin (Fat)	0.7
Proteins	0.8 - 0.9
Malic acid	1.33
Tartaric acid	1.6
Oxalic Acid	4.0

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen eines stark reduzierten Malat- und Fumarat-Gehalts in *A. thaliana*

3.1.1 Die Abhängigkeit des Phänotyp von Licht und Photoperiode

Die von Fahnenstich et al., 2007 beschriebenen Überexpressionslinien des plastidären Mais[*Zea mays*] C4-NADP-Malat-Enzyms in *A. thaliana* (MEM-Pflanzen) besitzen eine sechsfach höhere Aktivität als wt und – im Vergleich zu MEM4 und MEM5 mit 24- und 33-fach höherer Aktivität – weniger ausgeprägte Veränderungen des Phänotypes (Fahnenstich et al., 2007). MEM2-Pflanzen zeigen eine reduzierte Konzentration an Malat und Fumarat (Fahnenstich et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass Malat und Fumarat in diesen Pflanzen die einzigen beiden Metabolite sind, deren Konzentrationen signifikant reduziert sind, die sich aber nach Zugabe von Glukose wieder auf wt-Niveau einpendeln (Fahnenstich et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der niedrige Malat- und Fumaratgehalt die Pflanzen, die unter LT-Bedingungen gewachsen sind, in ihrer Morphologie, der photosynthetischen Aktivität und den Wachstumsparametern nicht beeinflusst (Fahnenstich et al., 2007).

Da jedoch längere Phasen ohne Licht Einfluss auf den Phänotypen der MEM-Pflanzen zu aben scheinen, wurden die transgenen MEM-Pflanzen unter KT-Bedingungen untersucht und es zeigte sich das die Pflanzen unter diesen Bedingungen wesentlich kleinere Rosetten als der wt entwickelten (Abb. 3.1.1A). Außerdem waren sowohl das Frischgewicht (FG) als auch das Trockengewicht (TG) der MEM-Pflanzen reduziert und sie wiesen eine signifikant höhere Frischgewicht-zu Trockengewicht-Ratio (FG/TG) und eine höhere spezifische Blattfläche („specific leaf area“, SLA) als der wt auf (Abb. 3.1.1 B; Tab. 3.1.1). Diese Ergebnisse weisen auf eine Reduktion der Biomasse in den MEM-Pflanzen hin, was der hohe Wassergehalt pro Blattfläche und das niedrige Trockengewicht bestätigen. Eine Reduzierung der Lichtintensität (Photonenflussdichte, PFD) im KT hatte stärkere Veränderungen der Morphologie der MEM-Pflanzen zur Folge. Die Ausprägung der morphologischen Veränderungen in den MEM-Linien korrelierte außerdem mit der Stärke der NADP-ME-Aktivität in den Pflanzen (Fahnenstich et al., 2007).

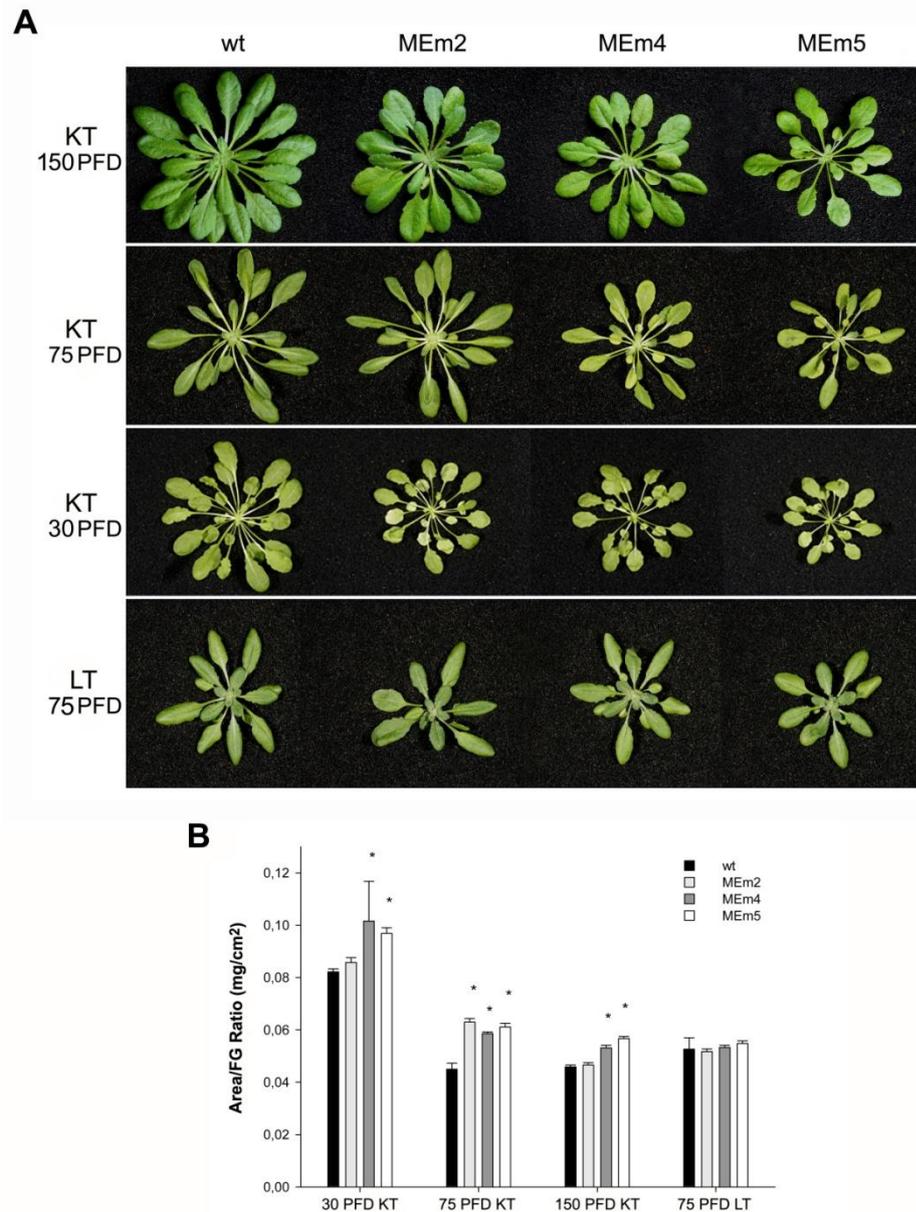


Abbildung 3.1.1: Phänotypen und photosynthetische Kapazität. **A:** Sechs Wochen alten KT-wt- und MEm-Pflanzen und vier Wochen alten LD-Pflanzen, gewachsen unter verschiedenen Lichtintensitäten (PFD; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B:** Spezifische Blattfläche von sechs Wochen alten KT-wt- und MEm-Pflanzen und vier Wochen alten LD-Pflanzen, gewachsen unter verschiedenen Lichtintensitäten (PFD; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von zwölf unabhängigen Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit Stern markiert.

Tabelle 3.1.1: Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG). FG/TG-Ratio von sechs Wochen alten KT-wt- und -Mem-Pflanzen und vier Wochen alten LD-Pflanzen, gewachsen unter verschiedenen Lichtintensitäten (PFD; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen mit zwölf Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden fett markiert.

	FG [mg]	TG [mg]	FG/TG
KT-150 PFD			
wt	789,45 \pm 57,33	70,07 \pm 5,02	11,30 \pm 0,24
ME _m 2	792,40 \pm 60,87	69,94 \pm 6,02	11,48 \pm 0,41
ME _m 4	540,23 \pm 45,55	41,85 \pm 3,65	12,97 \pm 0,17
ME _m 5	477,24 \pm 29,69	35,63 \pm 2,45	13,52 \pm 0,24
KT-75 PFD			
wt	337,05 \pm 27,94	24,36 \pm 2,31	13,94 \pm 0,52
ME _m 2	289,27 \pm 21,76	22,14 \pm 2,21	13,14 \pm 0,41
ME _m 4	232,26 \pm 16,89	14,54 \pm 1,16	17,88 \pm 0,64
ME _m 5	225,49 \pm 12,66	14,71 \pm 1,07	16,42 \pm 0,62
KT-30 PFD			
wt	251,62 \pm 16,84	17,88 \pm 1,25	14,13 \pm 0,20
ME _m 2	173,18 \pm 14,08	11,93 \pm 1,41	15,16 \pm 0,70
ME _m 4	115,43 \pm 11,76	7,59 \pm 1,17	17,34 \pm 1,48
ME _m 5	94,61 \pm 4,39	4,86 \pm 0,37	20,27 \pm 0,84
LT-150 PFD			
wt	494,02 \pm 27,31	36,58 \pm 2,25	13,51 \pm 0,40
ME _m 2	442,20 \pm 30,62	34,14 \pm 4,22	14,00 \pm 1,16
ME _m 4	450,58 \pm 32,02	33,26 \pm 2,66	13,70 \pm 0,42
ME _m 5	457,87 \pm 42,16	36,02 \pm 3,34	12,89 \pm 0,78
LT-75 PFD			
wt	435,15 \pm 21,73	29,70 \pm 1,55	14,70 \pm 0,38
ME _m 2	359,53 \pm 17,73	22,83 \pm 1,07	15,77 \pm 0,30
ME _m 4	354,02 \pm 52,21	23,69 \pm 3,76	15,33 \pm 0,39
ME _m 5	420,06 \pm 45,96	28,36 \pm 3,48	15,09 \pm 0,33

Neben diesen Veränderungen wurden weitere Unterschiede zwischen den in KT gewachsenen ME_m-Pflanzen und wt festgestellt. So erschienen die Rosetten der ME_m-Pflanzen blassgrün gegenüber wt (Abb. 3.1.1 A). Untersuchungen des Chlorophylls ergaben ein niedrigeres Gesamt-Chlorophyll und einen niedrigeren Chlorophyll-a- und -b-Gehalt in ME_m gegenüber wt am Ende des Tages und am Ende der Nacht (Tab. 3.1.2). Jedoch war das Chlorophyll-a/b-Verhältnis in ME_m und wt ähnlich und unter den in LT gewachsenen Pflanzen konnte kein Unterschied im Chlorophyll-Gehalt festgestellt werden (Tab. 3.1.2).

Tabelle 3.1.2: Chlorophyllgehalt am Ende der Nacht und am Ende des Tages von sechs Wochen alten KT-wt- und MEm-Pflanzen und vier Wochen alten LD-Pflanzen, gewachsen unter verschiedenen Lichtintensitäten (PFD; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von vier unabhängigen Messungen mit acht Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden fett markiert.

Ende Nacht		Chl a [$\mu\text{g}/\text{Area}$]	Chl b [$\mu\text{g}/\text{Area}$]	Chl a+b [$\mu\text{g}/\text{Area}$]
KT				
150 PFD	wt	238,27 \pm 13,81	83,09 \pm 6,67	340,49 \pm 22,10
	MEm2	186,48 \pm 20,88	63,02 \pm 6,97	264,29 \pm 29,04
	MEm4	169,66 \pm 28,35	54,08 \pm 9,45	236,58 \pm 38,96
	MEm5	143,30 \pm 25,44	45,54 \pm 7,77	199,55 \pm 35,35
70 PFD	wt	167,21 \pm 14,82	60,33 \pm 4,83	484,86 \pm 40,93
	MEm2	166,69 \pm 4,39	55,94 \pm 1,28	475,80 \pm 4,00
	MEm4	145,02 \pm 10,00	47,17 \pm 3,83	403,35 \pm 31,89
	MEm5	162,00 \pm 6,20	53,88 \pm 4,70	446,92 \pm 28,69
30 PFD	wt	112,63 \pm 4,95	47,26 \pm 8,23	173,07 \pm 13,79
	MEm2	112,53 \pm 9,78	40,12 \pm 3,85	163,25 \pm 14,09
	MEm4	110,50 \pm 4,22	37,04 \pm 1,34	156,97 \pm 2,18
	MEm5	95,19 \pm 9,62	32,16 \pm 3,56	135,54 \pm 14,05
LT				
75 PFD	wt	231,81 \pm 9,27	76,54 \pm 1,78	336,65 \pm 12,43
	MEm2	243,10 \pm 4,59	77,08 \pm 0,84	356,32 \pm 4,14
	MEm4	241,67 \pm 7,30	76,09 \pm 0,57	364,05 \pm 8,49
	MEm5	221,69 \pm 13,44	72,09 \pm 3,59	345,56 \pm 20,16

Ende Tag		Chl a [$\mu\text{g}/\text{Area}$]	Chl b [$\mu\text{g}/\text{Area}$]	Chl a+b [$\mu\text{g}/\text{Area}$]
KT				
150 PFD	Col-0	236,12 \pm 25,18	83,41 \pm 10,12	339,75 \pm 37,43
	MEm2	186,19 \pm 22,55	62,83 \pm 7,89	264,00 \pm 31,92
	MEm4	175,56 \pm 27,41	57,94 \pm 8,77	246,69 \pm 38,16
	MEm5	165,27 \pm 24,63	56,68 \pm 7,74	234,38 \pm 34,81
70 PFD	Col-0	172,62 \pm 11,41	61,39 \pm 4,12	249,32 \pm 16,58
	MEm2	165,37 \pm 3,78	56,06 \pm 1,70	235,49 \pm 6,05
	MEm4	113,37 \pm 0,76	50,59 \pm 1,25	214,70 \pm 0,71
	MEm5	166,86 \pm 23,01	55,10 \pm 7,36	236,09 \pm 32,71
30 PFD	Col-0	123,50 \pm 6,31	46,20 \pm 3,55	181,01 \pm 11,61
	MEm2	119,62 \pm 4,54	41,38 \pm 0,82	171,05 \pm 3,90
	MEm4	118,15 \pm 6,87	40,23 \pm 5,07	168,35 \pm 12,76
	MEm5	106,08 \pm 5,08	35,16 \pm 1,90	149,27 \pm 7,51
LT				
75 PFD	Col-0	253,31 \pm 14,37	86,02 \pm 5,69	371,00 \pm 21,33
	MEm2	242,16 \pm 3,63	81,18 \pm 1,19	359,76 \pm 5,48
	MEm4	238,52 \pm 6,09	78,26 \pm 2,53	364,30 \pm 9,85
	MEm5	238,35 \pm 4,03	78,63 \pm 1,83	375,55 \pm 5,57

Lichtmikroskopische Untersuchungen offenbarten einen weiteren signifikanten Unterschied zwischen MEm- und wt-Pflanzen, der wiederum nur im KT zu beobachten war. Es zeigte sich, dass die Blätter der MEm-Pflanzen wesentlich dünner

waren und die gesamte Mesophyllanatomie Unterschiede zum wt aufwies (Abb. 3.1.2 A und B). Wt *A. thaliana* besitzen ein homogenes Pallisadenparenchym mit sehr rundlichen Zellen auf der adaxialen Seite und einem typischen Schwammparenchym auf der abaxialen Seite. Insgesamt besteht das Mesophyll aus ca. acht Zellschichten (Abb. 3.1.2 B). Die Mesophyllzellen der MEm-Pflanzen sind kleiner und gedrungenener und das Schwammparenchym besitzt einen losen Zusammenhalt mit großen Interzellularräumen. Des Weiteren besitzen die Blätter der MEm-Pflanzen ein Mesophyllparenchym, das nur aus fünf bis sechs Zellschichten besteht. Eine Analyse der Ultrastruktur der Chloroplasten zeigte, dass die Chloroplasten unter LT-Bedingungen keine strukturellen Veränderungen aufwiesen (Abb. 3.1.2 C), wohingegen die KT-MEm-Pflanzen mehr Thylakoidmembranen besitzen als der wt (Abb. 3.1.2 D).

Um mehr über die Veränderungen der Ultrastruktur der Chloroplasten in KT-MEm-Pflanzen zu erfahren, wurde mittels der neu entwickelten SART-Spektroskopie das PSI/PSII-Verhältnis aus den in den Chloroplasten lebender Pflanzen gemessenen Fluoreszenzspektren berechnet (Abb. 3.1.2 E). Die Ergebnisse zeigen, dass das Verhältnis zwischen PSI/PSII trotz der dichter gepackten Thylakoidmembranen in den Chloroplasten zwischen MEm und wt vergleichbar ist, ebenso wie die Auftrennung der Photosysteme mittels Blue-Nativ-Gel, zeigte dass die Komponenten der PS in wt und MEm Pflanzen identisch und die Intensität der Protein-Banden im Gel gleich war (Abb. 3.1.2 F). Des weiteren belegte die relative Verteilung der Thylakoidstapel in den Chloroplasten ein ähnliches Verteilungsmuster der Grana in wt- und MEm-Pflanze in beiden Photoperioden (Tab. 3.1.3).

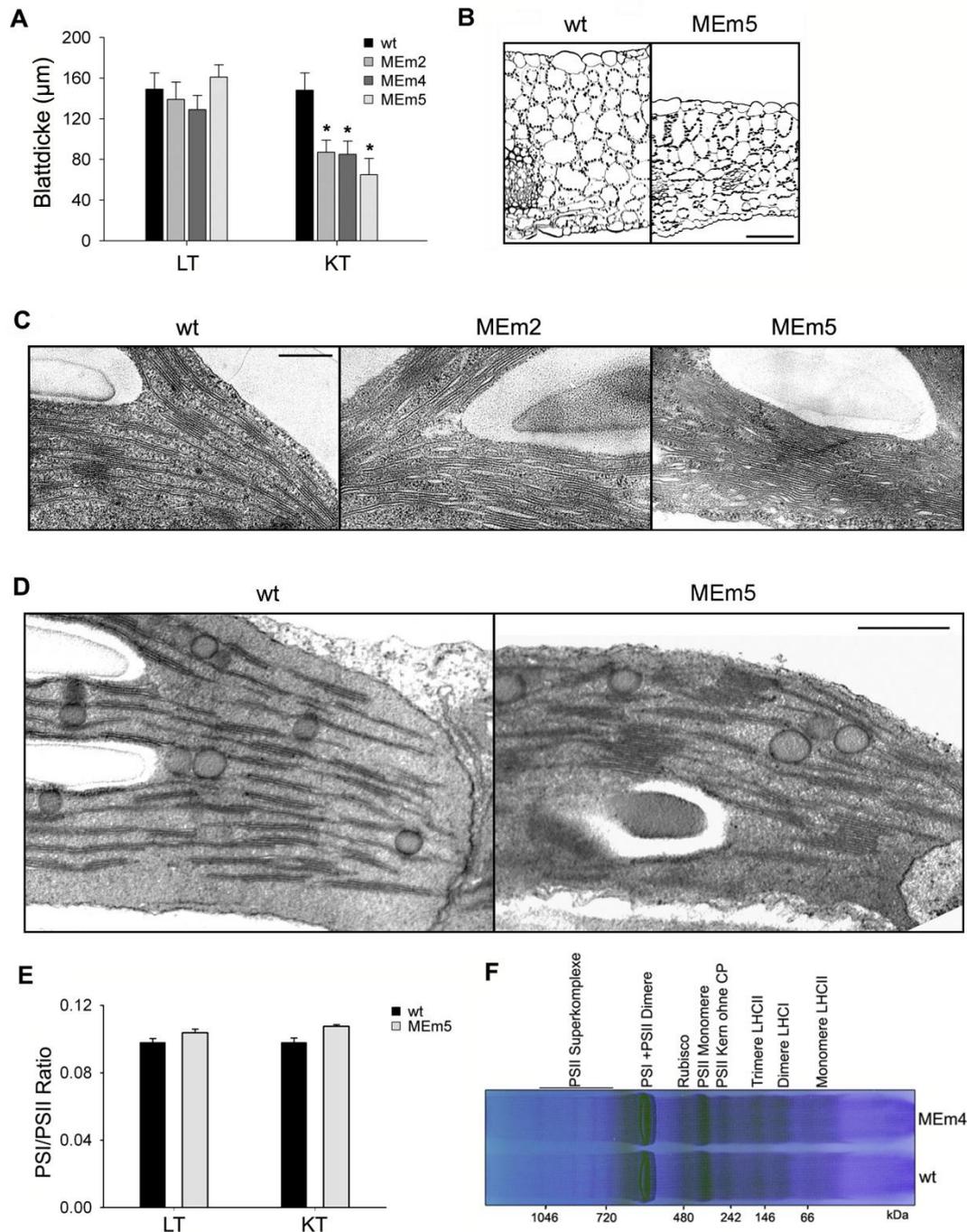


Abbildung 3.1.2: Blattdicke, Chloroplasten-Ultrastruktur und Spezifische Blattfläche. **A:** Die Blattdicke wurde in transversen Blattschnitten von unter 75 PFD gewachsenen LT- und KT-Pflanzen gemessen. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von 80 Schnitten von zehn Pflanzen. **B:** Lichtmikroskopie von Blattquerschnitten. Die Schnitte wurden für Polysaccharide gefärbt. **C:** Transmissions-Elektronenmikroskopie von Chloroplasten von LT-Pflanzen. Skalierungslinie repräsentiert 0,5 μ m. **D:** Transmissions-Elektronenmikroskopie von Chloroplasten von KT-Pflanzen. **E:** PSI-zu-PSII-Verhältnis, berechnet aus den dazugehörigen Fluoreszenzspektren der Chloroplasten vier Wochen alter Pflanzen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SE von 40 unabhängigen Messungen aus vier biologischen Replikaten. **F:** Analyse der Thylakoidmembran-Proteine mittels Blue Native-Page.

Tabelle 3.1.3: Relative Verteilung der Thylakoiden pro Granum (%) in den Chloroplasten von w- und MEm5-Pflanzen. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von 7–11 unabhängigen Messungen. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden fett markiert.

	Thylakoiden pro Granum (% Verteilung)				Maximale # von Thylakoiden pro Granum
	2	3-4	5-8	9 and >	
Wild-typ	36.1 \pm 1.73	39.5 \pm 2.65	20.2 \pm 1.50	4.2 \pm 0.43	12
KT(8/ 16)					
MEm 5	34.8 \pm 3.60	34.9 \pm 4.10	23.5 \pm 2.82	6.9 \pm 1.49	21
KT(8/ 16)					
Wild-typ	36.6 \pm 3.57	35.0 \pm 3.27	22.6 \pm 2.0	5.8 \pm 0.52	17
LT(16/8)					
MEm5	34.6 \pm 2.59	38.8 \pm 1.51	20.3 \pm 2.72	6.3 \pm 0.69	23
LT(16/8)					

3.1.2 Photosynthetische Aktivität der MEM-Pflanzen

Um mehr über das unterschiedliche Verhalten von MEM-Pflanzen unter KT- und LT-Bedingungen zu erfahren, wurden die photosynthetische Kapazität und die Chlorophyll-Fluoreszenz-Emission gemessen (Abb. 3.1.3). Die photosynthetische Kapazität wurde anhand der CO₂-„Response“-Kurve gemessen, welche durch Bestimmung der CO₂-Assimilation verglichen mit der CO₂-Konzentration in der Atmosphäre den physiologischen Zustand der Photosynthese im Blatt beschreibt (Schulze et al., 2002). In LT-Pflanzen ist die Photosyntheserate pro Blattfläche in wt- und MEM-Pflanze ähnlich. Im KT hingegen verlaufen die „Response“-Kurven von wt, MEM2 und MEM5 unterschiedlich und es zeigte sich, dass MEM2- und MEM5-Pflanzen eine reduzierte photosynthetische Kapazität aufwiesen (Abb. 3.1.3 A). Diese geringere CO₂-Fixierungsrate pro Blattfläche steht in Zusammenhang mit dem dünneren Blattquerschnitt und der massiven Reduktion der Biomasse in den KT-MEM-Pflanzen. MEM4- und MEM5-Linien zeigen ein äquivalentes Verhalten unter KT-Bedingungen, daher wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit oft nur die Ergebnisse einer der beiden Pflanzenlinien gezeigt.

Die Analyse der Chlorophyll-Fluoreszenz von PSII, gemessen mittels photosynthetischer PFD, ergab keine Unterschiede zwischen wt- und MEm-Pflanzen unter LT-Bedingungen (Abb. 3.1.3 B). Anders bei den KT-Pflanzen, hier zeigte sich, dass der Photonenfluss von PSII in den MEm-Linien geringer war als im wt (Abb. 3.1.3 B). Dies belegt, dass neben der geringeren CO₂-Fixierung auch der Energietransfer zum PSII, gemessen pro Flächeneinheit, in den MEm-Pflanzen unter KT-Bedingungen geringer ist, verglichen mit wt. Um dieser Beobachtung weiter nachzugehen, wurde die Inaktivierung von PSII unter Hochlicht als Indikator von Photoinhibition der Photosynthese in den unterschiedlichen Genotypen untersucht. Gemessen wurden das F_v/F_m -Verhältnis dunkeladaptierter Pflanzen. Die F_v/F_m -Ratio spiegelt die maximale potenzielle Quanteneffizienz von PSII wieder und ist damit ein Index für die Messung von Pflanzenstress (Maxwell und Johnson, 2000). Alle Pflanzenlinien, die unter moderater PFD wuchsen, zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer F_v/F_m -Ratio. Wurden die Pflanzen jedoch Hochlicht ($700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ausgesetzt, zeigten die MEm-Pflanzen, die sowohl in KT als auch in LT gewachsen waren, eine drastische Absenkung des F_v/F_m -Verhältnisses, gefolgt von einer Erholungsphase. Gleichwohl war die Erholungsphase in KT-MEm-Pflanzen langsamer und es folgte darauf ein erneutes Absinken der F_v/F_m -Ratio (Abb 3.1.3 C). In wt-Pflanzen konnte hingegen nur ein leichtes Abfallen des F_v/F_m -Verhältnisses nach fünf Stunden Behandlung mit Hochlicht beobachtet werden, gefolgt von einer zweitägigen Erholungsphase (Abb. 3.1.3 C). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass MEm-Pflanzen besonders unter KT-Bedingungen eine geringere photochemische Kapazität für die Verwendung hoher PFD besitzen und/oder eine reduzierte Photoprotektion des PSII aufweisen.

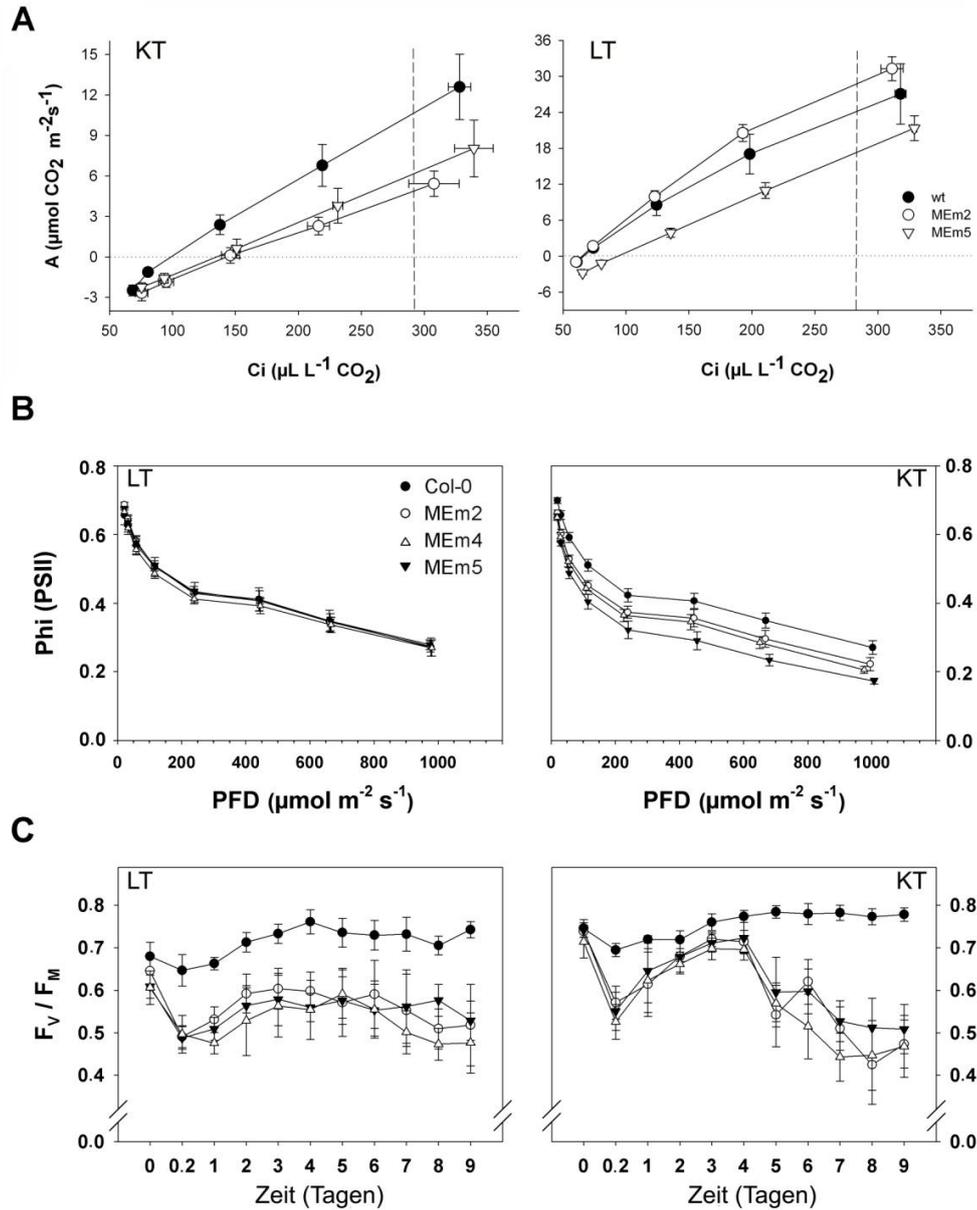


Abbildung 3.1.3: **A:** Rate der CO₂-Assimilation (A) als eine Funktion des intrazellulären Partikedrucks von CO₂ (C_i). Die Pflanzen wuchsen bei einer PFD von 150 $\mu\text{mol Quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und die Messung wurde bei einer PFD von 200 $\mu\text{mol Quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durchgeführt. Die gepunktete Linie zeigt die C_i bei atmosphärischer CO₂ Konzentration an (297 und 292 $\mu\text{L L}^{-1} \text{ CO}_2$, in LT und KT). Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von sechs unabhängigen Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit Stern markiert. **B:** Effizienz der PSII-Photochemie: Die effektive Quantenausbeute (Φ_{PSII}) als Funktion der PFD. **C:** Zeitverlauf der PSII-Inaktivierung (F_v/F_m) durch Hochlicht. Die in LT oder KT unter moderater PFD gewachsenen Pflanzen (t=0 Tage) wurden einer Lichtintensität von 700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ während der Lichtperiode für neun Tage ausgesetzt. Die F_v/F_m -Werte wurden fünf Stunden (t=0.2 Tage) nach Einsetzen der Behandlung und danach täglich mittags genommen. Jeder Punkt ist ein Durchschnittswert \pm SE von acht unabhängigen Pflanzen.

3.1.3 Metabolische Analyse der ME-Pflanzen

Des Weiteren wurde der Gehalt der löslichen Zucker, von Stärke und Malat photometrisch gemessen und ein metabolischer Fingerprint mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) erstellt. Wie auch zuvor bei anderen Parametern zeigten die Überexpressionsmutanten MEm4 und MEm5 gegenüber wt und der MEm2-Linie deutliche Veränderungen im metabolischen Profil. Da die MEm4- und MEm5-Linien ein äquivalentes Verhalten unter KT-Bedingungen haben, wurden jeweils nur die Ergebnisse der MEm5-Pflanzenlinien gezeigt.

3.1.3.1 Karbohydrate und Derivate

Unter verschiedenen Lichtintensitäten konnten in den wt-Pflanzen im KT unterschiedliche Verteilungen akkumulierter löslicher Zucker beobachtet werden. Bei einer moderaten PFD ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) steigt der Gehalt an Zuckern während des Tages an und sinkt während der Nacht wieder ab (Abb. 3.1.4). Im Gegensatz dazu bleibt der Zuckergehalt bei wt-Pflanzen, die unter Schwachlicht ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)¹⁾ gewachsen sind, während des gesamten Tag-Nacht-Zyklus niedrig (Abb. 3.1.4). Die Verteilung der Stärke-Akkumulation im KT-Tag-Nacht-Zyklus bei moderater Lichtintensität war im wt und MEm recht ähnlich und besaß dieselben maximalen Level, jedoch war das Maximum der Stärke-Akkumulation in den MEm-Pflanzen um eine Stunde in die Dunkelphase verschoben und nicht am Ende des Tages wie in den wt Pflanzen (Abb. 3.1.4). Unter diesen Lichtverhältnissen waren die Stärkesynthese und der Stärkeabbau in allen Genotypen vergleichbar (Tab. 3.1.4). MEm-Pflanzen im KT zeigen signifikant höhere Stärke-Akkumulation während des Tages und eine höhere Rate der Stärkedegradierung während der Nacht, bleiben jedoch am Ende der Nacht auf demselben Stärkegehalt wie der wt (Abb. 3.1.4; Tab. 3.1.4).

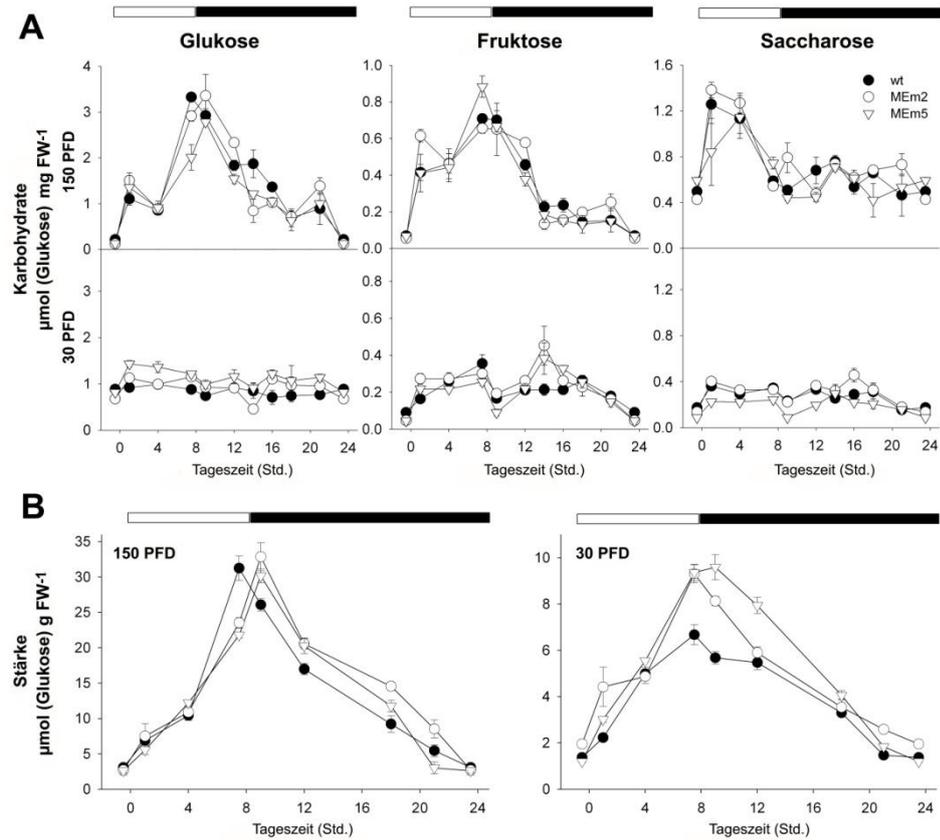


Abbildung 3.1.4: Photometrische Bestimmung der tageszeitlichen Änderungen des Karbohydrat-Gehaltes in den Rosetten von KT-Pflanzen bei 30 PFD und 150 PFD. **A:** Tageszeitabhängige Änderungen der löslichen Zucker. **B:** Tageszeitabhängige Änderungen des Stärkegehaltes. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SE von vier technischen und acht biologischen Replikaten. In jeder Grafik ist das Einsetzen der Lichtperiode $t = 0$ Std. gesetzt. Die Licht- und Dunkelperiode sind durch den Weiß-schwarz-Balken markiert. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's T Test ($p < 0.05$), werden mit einem Stern markiert.

Tabelle 3.1.4: Synthese und Abbauraten von Stärke. Berechnet durch die Differenz der minimalen und maximalen Stärkekonzentration, geteilt durch die Länge der Periode in Stunden. Die Pflanzen wuchsen für vier Wochen im KT bei 30 PFD oder 150 PFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von vier unabhängigen Replikaten von acht Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden fett markiert.

Genotyp	Syntheserate		Degradierungsrate	
	30 PFD	150 PFD	30 PFD	150 PFD
	$\mu \text{ mol Glc g Frischgewicht}^{-1} \text{ h}^{-1}$			
wt	0.663 \pm 0.058	3.176 \pm 0.379	0.331 \pm 0.029	1.588 \pm 0.189
ME _m 2	0.919 \pm 0.059	3.349 \pm 0.261	0.460 \pm 0.029	1.884 \pm 0.147
ME _m 5	1.050 \pm 0.063	3.061 \pm 0.096	0.525 \pm 0.031	1.722 \pm 0.054

3.1.3.2 Glykolytische Intermediate und Derivate

Das Produkt der NADP-ME-Reaktion, das Pyruvat, war in den MEM-Linien unter KT-Bedingungen besonders während des Tages in höherer Konzentration vorhanden als im wt (Abb. 3.1.5). Die aus Pyruvat gebildeten Aminosäuren Alanin, Valin und Leucin waren in den KT-MEM-Pflanzen ebenso signifikant erhöht akkumuliert, besonders in den Überexpressionslinien mit höherer NADP-ME-Aktivität (Abb. 3.1.5; Sup. Tab. S1 und S2). Die Akkumulationen von Glycerat und 3-Phosphoglycerat (3-PGA) waren in wt- und MEM-Pflanzen vergleichbar, jedoch mit einem Trend zu höherer Glycerat-Konzentration in den MEM-Linien während der Tagesperiode. Serin, das aus 3-PGA gebildet wird, zeigt eine deutlich erhöhte Konzentration in den MEM-Pflanzen, besonders unter moderaten Lichtbedingungen (Abb. 3.1.5). Es ist vorstellbar, dass die erhöhte Akkumulation von Pyruvat in den MEM-Linien zu einem reduzierten Flux von 3-PGA zu Pyruvat führt, was folglich zu einer Steigerung des PGA-Metabolismus und der Synthese von Glycerat und Serin führen würde.

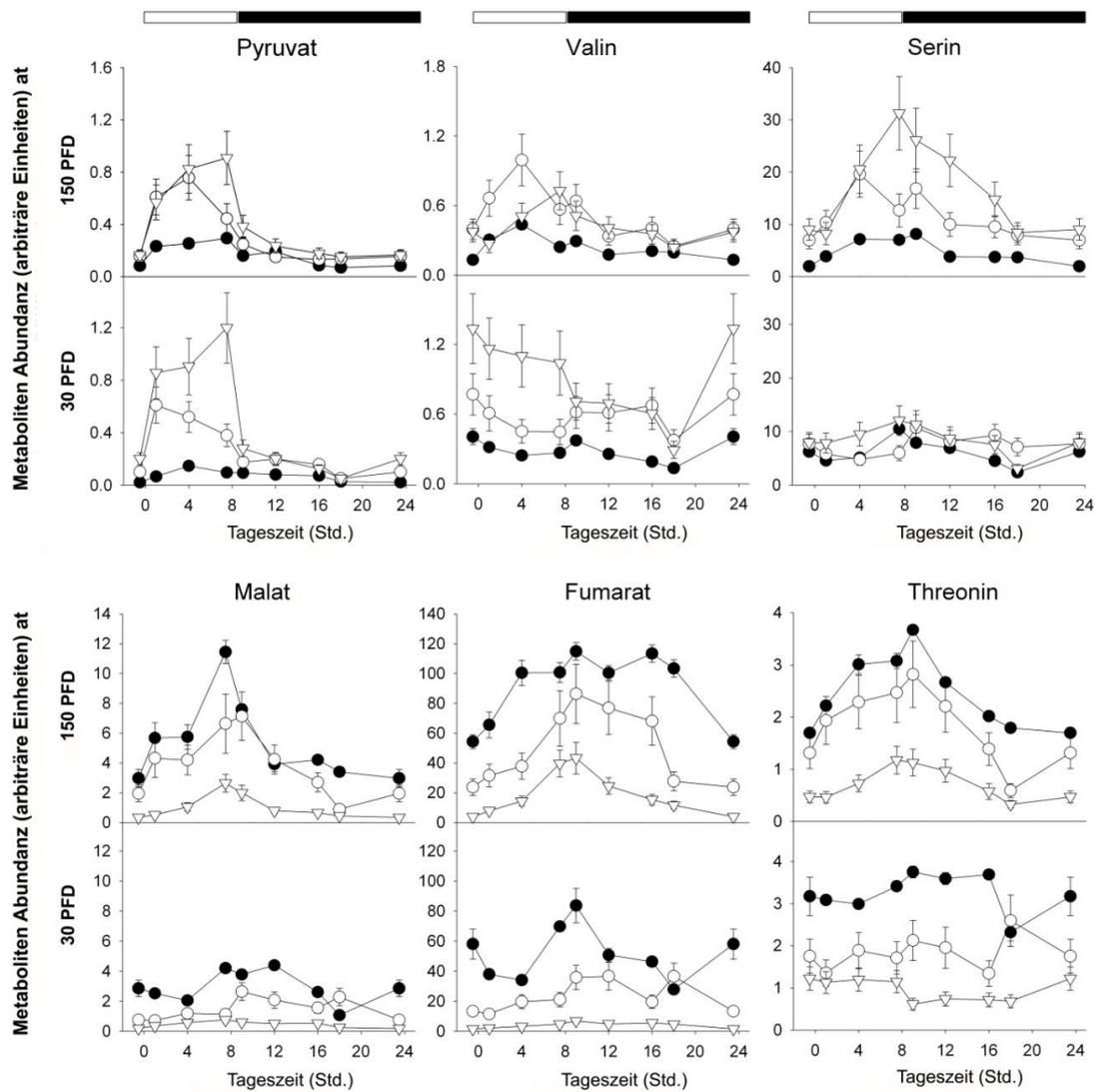


Abbildung 3.1.5: Diurnale Änderung einzelner Metabolite durch GC-MS bestimmt. Die analysierten Pflanzen wuchsen bei 30 PFD und 150 PFD im KT. Die metabolische Abundanz wird relativ zum internen Standard (Ribitol) gezeigt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SE von vier technischen und acht biologischen Replikaten. In jeder Grafik ist das Einsetzen der Lichtperiode $t = 0$ Std. gesetzt. Die Licht- und Dunkelperiode sind durch den Weiß-schwarz-Balken markiert. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's T Test ($p < 0.05$), werden mit einem Stern markiert. Die vollständigen Daten der metabolischen Analyse sind im Anhang zu finden.

3.1.3.3 Trikarbonsäure-Zyklus-Intermediate und -Derivate

Die interessantesten Veränderungen des metabolischen Profils der MEM-Pflanzen waren bei den organischen Säuren des Zitratzyklus zu beobachten. Der Gehalt von Zitrat war unter Schwachlicht-Bedingungen in allen Genotypen gleich, jedoch war bei moderaten Lichtbedingungen eine signifikante Akkumulation in den MEM-Pflanzen am Ende des Tages zu beobachten (Sup. Tab. S1 und S2). Die Akkumulation von 2-Oxoglutarat war in den MEM-Linien unter beiden Wachstumsbedingungen höher als im wt (Sup. Tab. S1 und S2). Jedoch waren keine signifikanten Änderungen im Konzentrationsspiegel von Glutamat und Glutamat-Derivaten, Glutamin und GABA in allen Genotypen zu beobachten (Sup. Tab. S1 und S2). Hingegen zeigte der Succinat-Gehalt in der MEM5-Linie unter beiden Lichtintensitäten (30 PFD und 150 PFD) auffallende Veränderungen gegenüber wt. Bei einer niedrigen PFD war die Konzentration während der Nacht in den MEM5-Pflanzen deutlich geringer, wohingegen die Akkumulation bei moderater PFD am Ende des Tages deutlich höher war als in wt (Sup. Tab. S1 und S2). Sowohl die Malat- als auch die Fumarat-Konzentration war in den MEM-Pflanzen drastisch reduziert (Abb. 3.1.5). Dies galt für den gesamten Tag-Nacht-Zyklus unter beiden Lichtkonditionen. Besonders betroffen waren die beiden MEM-Linien mit der höheren NADP-ME-Aktivität, MEM4 und MEM5 (Abb. 3.1.5). Die gleichen Ergebnisse erbrachte auch eine photometrische Bestimmung der Malat- und Fumarat-Konzentration in den Genotypen (Tab. 3.1.5). Die aus Oxalacetat (OAA) gebildeten Aminosäuren Asparagin und Threonin wiesen während des gesamten Tag-Nacht-Zyklus besonders unter Schwachlicht eine geringere Akkumulation in den MEM-Pflanzen auf als wt. Dies wurde wahrscheinlich durch die geringere Konzentration an OAA hervorgerufen, was wiederum auf die geringe Konzentration von Malat und Fumarat in den MEM-Linien zurückzuführen ist.

Tabelle 3.1.5: Photometrisch bestimmte Konzentration von Malat am Ende des Tages und am Ende der Nacht. Die Pflanzen wuchsen für vier Wochen im KT bei 30 PFD oder 150 PFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von vier unabhängigen Replikaten von acht Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden fett markiert.

Wachstumsbedingungen und Genotypen	Malat	
	Ende Tag	Ende Nacht
	<i>$\mu\text{mol mg Frischgewicht}^{-1}$</i>	
150 PFD		
wt	6,4543 \pm 1,0266	3,3954 \pm 0,7728
MEEm2	4,1234 \pm 0,6314	2,0691 \pm 1,0434
MEEm5	2,5543 \pm 0,4659	0,2420 \pm0,0927
30 PFD		
wt	4,3655 \pm 1,0802	3,4747 \pm 1,3676
MEEm2	1,6942 \pm0,3958	1,3510 \pm0,1620
MEEm5	0,6159 \pm0,3575	0,1491 \pm0,1648

3.1.4 Bestimmung der Größe des Pyridin-Nukleotid-Pools

Da die enzymatische Reaktion von NADP-ME eine Reduktion von NADP zu NADPH beinhaltet, wurde in den MEm-Linien der Gehalt der Pyridin-Nukleotide näher untersucht. Am Ende der Tagesperiode war das Verhältnis von NADP zu NADPH in allen untersuchten Genotypen vergleichbar (Abb. 3.1.6A). Im Gegensatz dazu zeigten sich Unterschiede zwischen den Überexpressionslinien und wt am Ende der Nacht. Bei den Pflanzen, die unter LT gewachsen waren, war zu beobachten, dass die MEm5-Linie ein deutlich höheres NADP/NADPH-Verhältnis aufwies als die anderen Linien (Abb. 3.1.6B). Die niedrige NADP/NADPH-Ratio in MEm5 war auf einen deutlich reduzierten NADPH-Spiegel zurückzuführen. Die unter KT 150 PFD ($\mu\text{mol s}^{-2}\text{m}^{-1}$) gewachsenen transgenen Linien zeigten alle eine deutlich niedrigere NADP/NADPH-Ratio als der wt, wohingegen unter 75 PFD und 30 PFD nur die MEm-Pflanzen mit hoher NADP-ME-Aktivität (MEm4 und MEm5) ein niedriges NADP/NADPH-Verhältnis aufweisen und wt und MEm2 dasselbe Niveau besaßen

(Abb. 3.1.6B). In allen Fällen wurde das niedrige NADP/NADPH-Verhältnis durch einen reduzierten NADP-Spiegel hervorgerufen.

Die Konzentration von NAD und NADH wurde nur unter moderaten Lichtverhältnissen untersucht. Die Genotypen unter LT zeigten keine großen Abweichungen, obgleich MEm2 durch eine erhöhte NADH-Konzentration eine leicht erhöhte NAD/NADH-Ratio aufwies und in der Mutantenlinie MEm5 eine geringe Konzentration sowohl an NAD als auch an NADH gemessen wurde. Hingegen zeigten alle unter KT-Bedingungen gewachsenen MEm-Pflanzen am Ende der Nacht – verglichen mit wt – ein signifikant niedriges NAD/NADH-Verhältnis, das aus einem deutlich reduziertem NAD-Gehalt in den Pflanzen resultiert (Abb. 3.1.6C). Am Ende des Tages wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt (Abb. 3.1.6C). Die NAD(P)/NAD(P)H-Verhältnisse war in den Überexpressionslinien MEm4 und MEm5 identisch daher werden jeweils nur die Ergebnisse von MEm5 gezeigt.

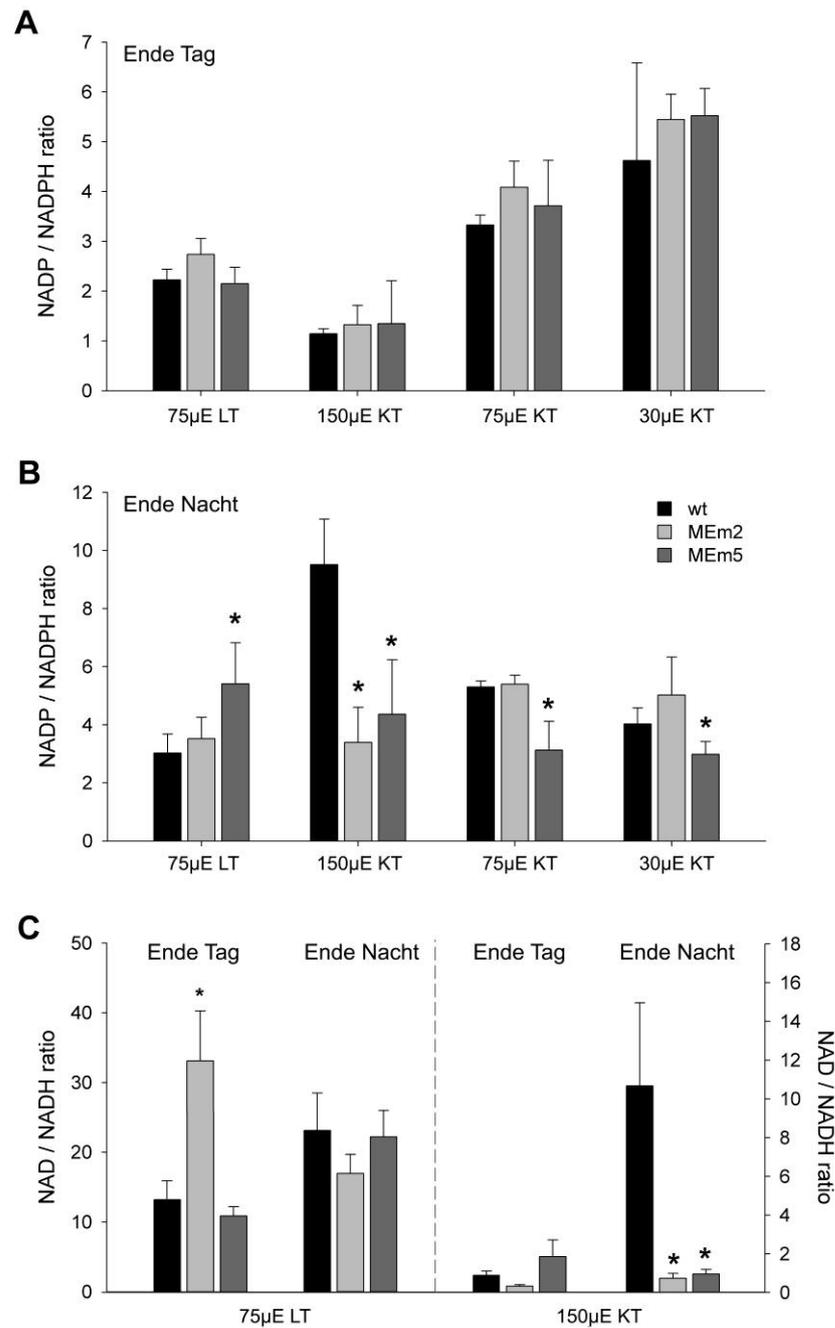


Abbildung 3.1.6: Verhältnis des Pyridin-Nukleotid-Pools. **A:** NADP- zu NADPH-Ratio am Ende des Tages. **B:** NADP- zu NADPH-Ratio am Ende der Nacht. Die Pflanzen wuchsen für vier Wochen im KT bei 30 PFD, 75 PFD und 150 PFD und im LT bei 75 PFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **C:** NAD- zu NADH-Ratio am Ende des Tages und am Ende der Nacht. Die Pflanzen wuchsen für vier Wochen im KT bei 150 PFD und im LT bei 75 PFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von vier unabhängigen Replikaten von acht Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden fett markiert.

3.1.5 Die Substratnutzung in der Respiration der MEm-Pflanzen

Es scheint, dass der extrem niedrige Gehalt von Malat und Fumarat den energetischen Metabolismus in den MEm-Pflanzen beeinflusst. Um dies näher zu untersuchen, wurde der Respiratorische Quotient (RQ) in den MEm-Linien und im wt am Ende des Tages und am Ende der Nacht unter KT- und LT-Bedingungen bestimmt. Der RQ ist sehr aufschlussreich, da das Volumen von CO₂-Abgabe und O₂-Aufnahme in die Blätter durch die organische Verbindung, die als Brennstoff für die Respiration metabolisiert wird, verändert wird (Hurth et al., 2005). Am Ende des Tages wurde in allen Genotypen sowohl im KT als auch im LT ein RQ von ca. 1,0 (0,93±0,08 bis 1,14±0,13) gemessen, was eine Nutzung von Kohlenhydraten als Substrat der Respiration anzeigt. Unter KT-Bedingungen wurde am Ende der Nacht in wt ein RQ von 1,86±0,14 gemessen, was bedeutet, dass die Respiration auf organische Säuren als Quelle gewechselt hat. Auch in den MEm-Linien hat sich die Substratquelle am Ende der Nacht verändert, was ein gemessener RQ von 0,34±0,09 und 0,41±0,07 deutlich zeigt. Als Brennstoffquelle der MEm-Linien unter KT werden am Ende der Nacht anscheinend Lipide und Proteine genutzt. Unter LT-Bedingungen wurde am Ende der Nacht ein RQ zwischen 0,80±0,10 und 1,10±0,06 in allen untersuchten Genotypen gemessen, was wiederum auf eine Nutzung von Kohlenhydraten als Substrat der Respiration hinweist.

3.2 Auswirkungen der NADP-ME-Überexpression in Stärkefreimutanten

Aufgrund der Ergebnisse der Überexpressionsmutante MEm wurde vermutet, das Stärkefreimutanten im Vergleich zu wt-Pflanzen verstärkt auf den Abbau von Dicarboxylsäuren im nächtlichen energetischen Metabolismus angewiesen zu sein scheinen. Um diese Annahme zu belegen, wurden die Stärkefreimutanten *adg1*, *pgm1* und *sft1* als Hintergrund für die Modulation des Malat- und Fumarat-Gehaltes mithilfe der Überexpression des Mais C4-NADP-ME genutzt. Stärkefreimutanten und *Landsberg-erecta*-wt-Pflanzen (als Referenz für die *sft1*-Mutanten) wurden transformiert, um einen Volllängen-Mais C4-NADP-ME zu exprimieren (Tab. 3.2.1), so wie dies bereits erfolgreich im *Colombia*-Hintergrund mit den MEm-Pflanzen als Resultat durchgeführt wurde (Fahnenstich et al., 2007).

Tabelle 3.2.1: Auflistung der mit dem MEm-Konstrukt transformierten Mutanten.

Ökotypen:		
<i>Columbia (Col)</i>	<i>Landsberg erecta (Ler)</i>	
Name der Pflanzenlinie		Modifikation
MEm4	Ler/ME7 Ler/ME11	Überexpressionsmutante Mais C4-NADP-ME
pgm1	sft1	Deletionsmutante Phosphoglucomutase
pgm/ME2 pgm/ME14	sft/ME4 sft/ME5	Überexpression C4-NADP-ME und Deletion Phosphoglucomutase
adg1		Deletionsmutante ADP-Glucose Pyrophosphorylase
adg/ME4 adg/ME2		Überexpression C4-NADP-ME und Deletion ADP-Glucose Pyrophosphorylase

Alle Genotypen wurden auf ihre relative NADP-ME-Aktivität untersucht (Abb. 3.2.1 A). Als Referenz dienten die jeweiligen wt-Ökotypen der Mutantenlinien, diese wurden als NADP-ME-Aktivität von 1,0 normiert. Interessanterweise wiesen alle

Stärkefreimutanten eine leicht reduzierte NADP-ME-Aktivität auf. Alle NADP-ME-Überexpressionslinien und Stärkefreimutanten wiesen eine deutlich höhere NADP-ME-Aktivität auf als die wt-Pflanzen. Die nicht gezeigten Linien besaßen ebenfalls eine erhöhte Aktivität (Ler/MEM7 1,78; pgm/MEM4 2,06; adg/MEM2 1,67; sft/MEM5 1,94). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Intensität des Phänotyps und der Stärke der NADP-ME-Aktivität in den Doppeltransformanten festgestellt werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde oft nur eine unabhängige Linie der jeweiligen Mutation gezeigt, es wurden jedoch immer mehrere Linien gemessen, die gleichfalls äquivalent waren.

Die Pflanzen wurden hauptsächlich unter Wachstumsbedingungen analysiert, bei denen auch schon die MEM-Überexpressionsmutante unter Kohlenstoffmangel litt. Daher wurden das Wachstum, das metabolische Profil und der RQ der Pflanzen unter 75 PFD und KT-Bedingungen untersucht. Bei der Beobachtung des Wachstums zeigte sich, dass alle stärkefreien MEM-Linie ein extrem retardiertes Wachstum aufwiesen und augenscheinlich die Phänotypen der Stärkefrei- und der MEM-Mutanten in sich vereinten (Abb. 3.2.1 B und C). Während die Stärkefreimutanten nur kleinere Rosetten aufwiesen, waren die Doppelmutanten außerdem blassgrün, so wie die MEM-Pflanzen. Die Biomasse aller stärkefreien MEM-Pflanzen war extrem reduziert und die Pflanzen schienen nach vier Wochen jegliches Rosettenwachstum einzustellen. Jedoch zeigte keine der Doppelmutanten eine retardierte Entwicklung der Blüten und Sprossachse.

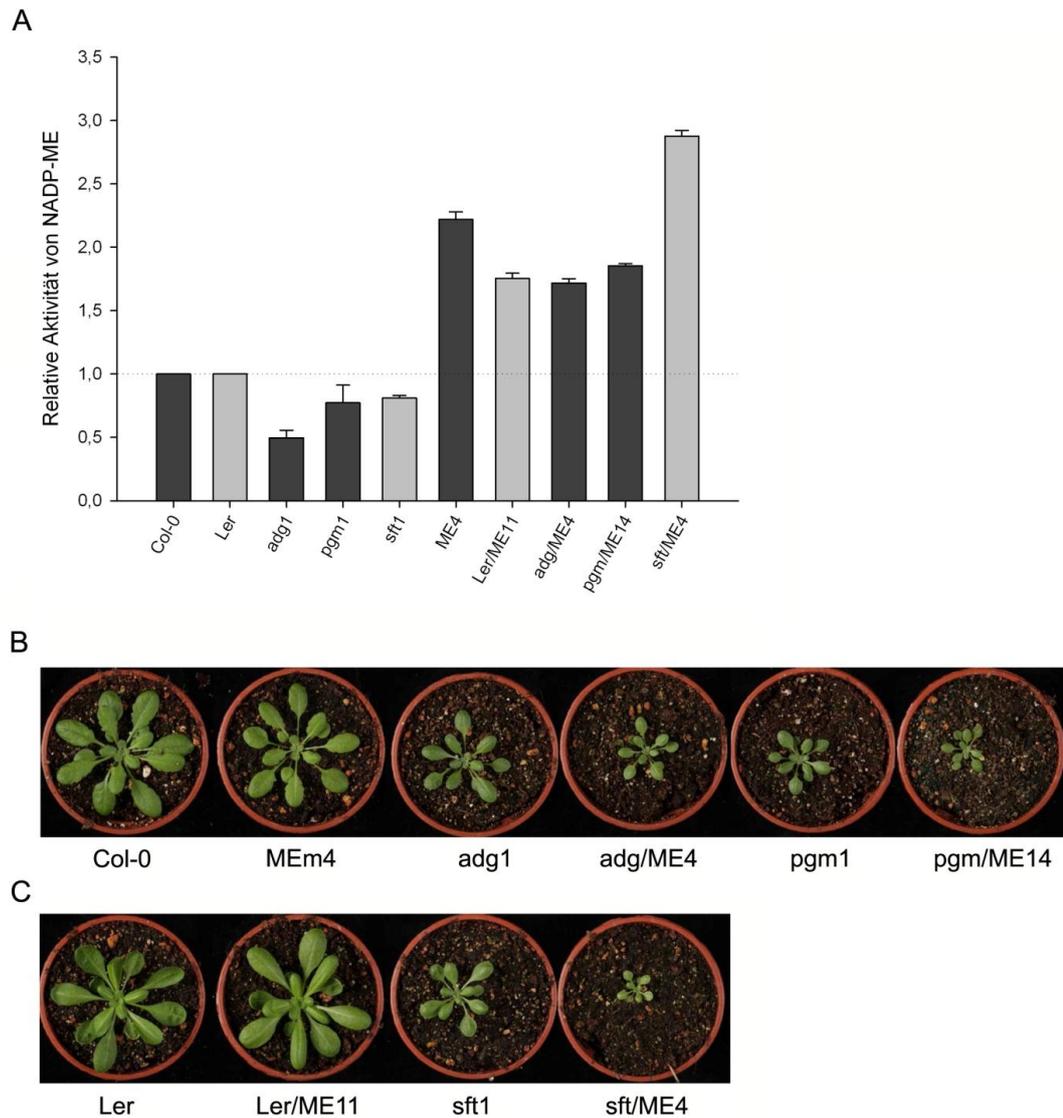


Abbildung 3.2.1: **A:** Photometrische Bestimmung der NADP-ME-Aktivität in den Rosettenblättern vier Wochen alter Pflanzen. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von acht unabhängigen Pflanzen pro Messung. Die Werte wurden relativ zum Wild-Typ berechnet (jedes Metabolite = 1). Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit Stern markiert. **B:** Wachstum der Genotypen mit Col-0-Ökotyp. **C:** Wachstum der Genotypen mit Ler-Ökotyp. Die Pflanzen wuchsen für vier Wochen im KT bei 75 PFD.

Des Weiteren wurde der Gehalt der löslichen Zucker, von Stärke und Malat photometrisch gemessen. Der Stärkegehalt war in allen MEm-Überexpressionslinien – sowohl mit Col-0 als auch mit Ler Hintergrund – und in wt am Ende des Tages und am Ende der Nacht tendenziell vergleichbar (Abb. 3.2.2). Darüber hinaus zeigten die MEm-Pflanze in Col-0 Hintergrund eine signifikante Erhöhung der

Stärkekonzentration am Ende des Tages, was die Ergebnisse der Stärkekonzentration der MEm-Pflanzen unter 150 PFD und 30 PFD bestätigt (Abb. 3.1.4 B), nicht jedoch die Ler/MEm-Linien. In allen stärkefreien Genotypen konnte sowohl am Ende des Tages als auch am Ende der Nacht erwartungsgemäß kaum Stärke gemessen werden (Abb. 3.2.2).

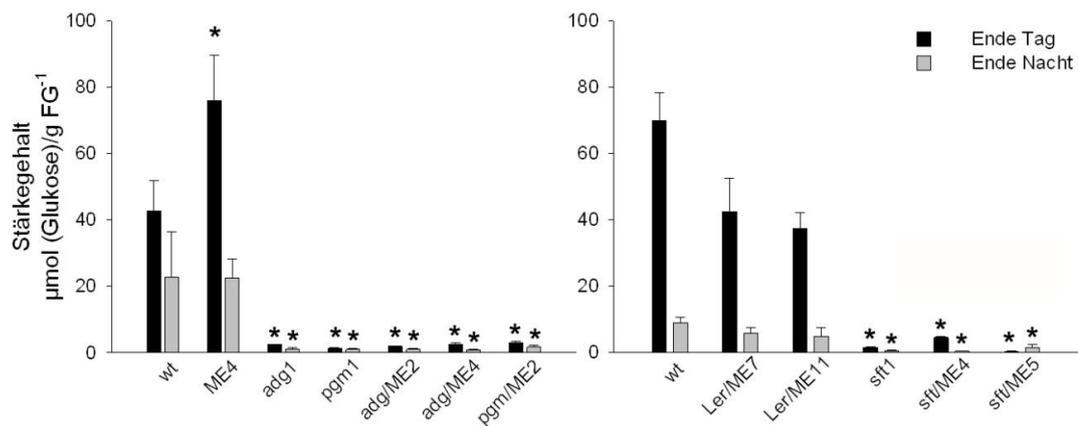


Abbildung 3.2.2: Photometrische Bestimmung des Stärkegehaltes am Ende des Tages und am Ende der Nacht bei 75 PFD KT Bedingungen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SE von zwei technischen und acht biologischen Replikaten. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit einem Stern markiert.

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der löslichen Zucker-Messung deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen. Der Gehalt an löslichen Zuckern war in den MEm- und Ler/MEm-Linien zwar mitunter signifikant verändert, jedoch vergleichsweise milde und tendenziell auf dem gleichen Niveau wie die wt-Pflanzen. Glukose und Fruktose waren in MEm4 am Ende des Tages höher und am Ende der Nacht niedriger als der in wt. In allen Stärkefreimutanten (Einzel- und Doppelmutanten) war eine hohe Glukose- und Fruktose-Akkumulation am Ende des Tages zu beobachten, während am Ende der Nacht beide Zucker gegenüber wt deutlich reduziert waren (Abb. 3.2.3). Saccharose war nur in den Doppelmutanten am Ende des Tages deutlich erhöht und in den Linien adg/MEm2, adg/MEm4 und

pgm/MEM2 am Ende der Nacht deutlich reduziert. Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem die stärkefreien Linien, unabhängig von der Expression von NADP-ME einen deutlichen Mangel an löslichen Zuckern am Ende der Nacht aufweisen, wohingegen die Akkumulation an löslichen Zuckern in diesen Pflanzen während des Tages erhöht zu sein scheint.

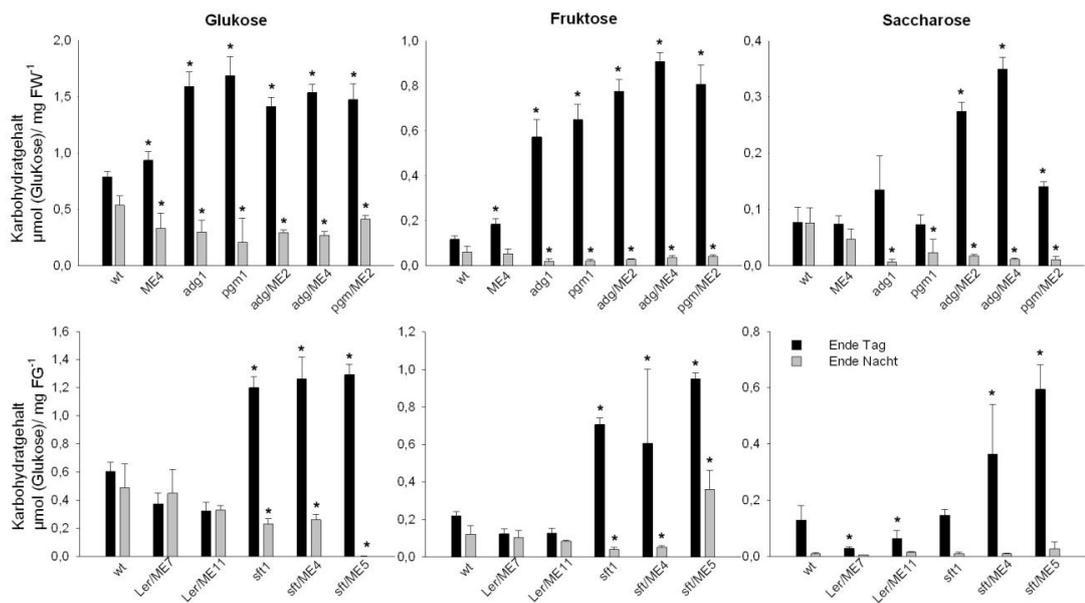


Abbildung 3.2.3: Photometrische Bestimmung des Gehaltes löslichen Zuckers am Ende des Tages und am Ende der Nacht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SE von zwei technischen und acht biologischen Replikaten. Werte, die signifikant von Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit einem Stern markiert.

Obwohl der Malat-Gehalt in den Überexpressionslinien MEM 2, MEM4 und MEM5 und auch in den Ler/MEM-Pflanzen drastisch reduziert ist (Abb. 3.2.4 und Abb. 3.1.5), zeigte der Konzentrationsspiegel von Malat dennoch den ähnliche Tag-Nacht-Rhythmus wie die wt-Pflanzen. Auch die Stärkefreimutanten (sft1, adg1 und pgm1) zeigten eine deutliche Reduktion des Malat-Gehaltes, wiesen jedoch das gleiche tageszeitliche Akkumulationsmuster wie der wt auf (Abb. 3.2.4). In den stärkefreien MEM-Pflanzen war sowohl am Ende des Tages als auch während der Nacht der Malat-gehalt gleichbleibend an der Detektionsgrenze (Abb. 3.2.4).

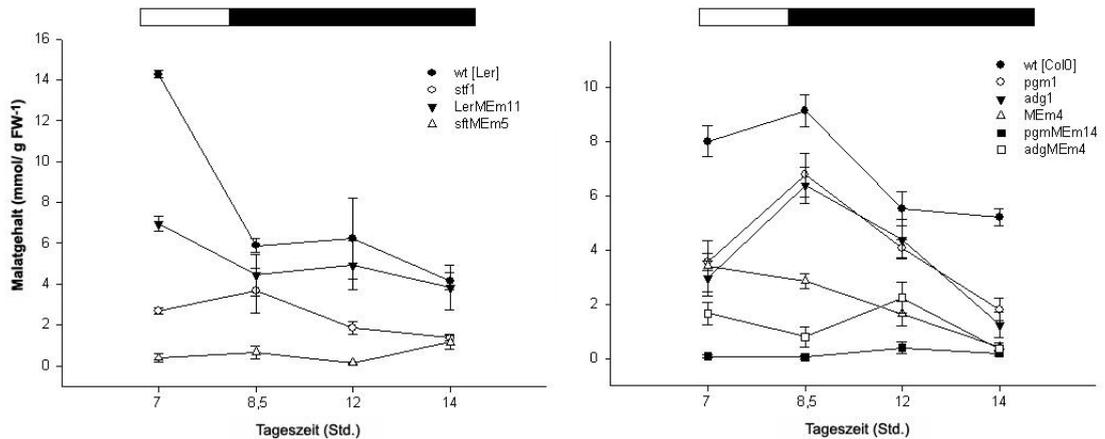


Abbildung 3.2.4: Malatgehalt in den Rosettenblätter verschiedener Genotypen. Der Malatgehalt wurde photometrisch in wt (Col-0 und Ler), Stärkefreimutanten (*stf1*, *pgm1* und *adg1*) und NADP-ME-Überexpressionslinien in wt (MEM4, LerMEM5) und stärkefreiem (*stfMEM5*; *pgmMEM14*, *adgMEM4*) Hintergrund bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SE von zwei technischen und acht biologischen Replikaten.

Um die Substratnutzung der Respiration zu bestimmen wurden die RQs der verschiedenen Genotypen zu zwei unterschiedlichen Tageszeitpunkten im KT bestimmt. Am Ende des Tages wurde in allen Genotypen ein RQ von ca. 1,0 ($0,99 \pm 0,12$ bis $1,05 \pm 0,08$) gemessen, was auf eine Nutzung von Kohhydraten als Substrat der Respiration hinweist (Tab. 3.2.2). Der wt besaß am Ende der Nacht ein RQ von $1,86 \pm 0,14$, was anzeigt, dass organische Säuren als Brennstoffquelle der Respiration genutzt werden. Wohingegen alle Mutanten, die einen Kohlenstoffmangel besitzen, am Ende der Nacht einen RQ zwischen $0,82 \pm 0,10$ und $0,38 \pm 0,24$ hatten, was bedeutet, dass diese Pflanzen Fettsäuren und/oder Proteine abbauen, um die Respiration aufrechtzuerhalten (Tab. 3.2.2). Diese Ergebnisse zeigen, dass Pflanzen, die nicht im Stande sind, Kohhydrate und organische Säuren bei einem akuten Mangel wie z. B. einer verlängerten Nachtphase zu nutzen, stattdessen hoch reduzierte Substrate wie Fettsäuren und Proteine nutzen.

Tabelle 3.2.2: Bestimmung des Respiratorischen Quotienten am Ende des Tages und am Ende der Nacht.

	RQ Ende Tag		RQ Ende Nacht	
WT	1,03	±0,16	1,43	±0,01
ME4	1,02	±0,22	0,82	±0,10
adg1	1,05	±0,08	0,71	±0,04
pgm1	1,03	±0,09	0,73	±0,06
adgME4	1,03	±0,23	0,43	±0,03
pgmME2	0,99	±0,12	0,38	±0,24

3.3 Die biologische Funktion von NADP-ME2 in *A. thaliana*

Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigen *A.-thaliana*-Single-, -Doppel- und -Trippel-Funktionsverlust-Mutanten des NADP-ME keinen Phänotypen (Gerrard Wheeler et al., 2005), daher liegt die Vermutung nahe, dass die NADP-ME-Isoformen spezifische Rollen unter Stressbedingungen oder in bestimmten Entwicklungsstadien spielen könnten (Maurino et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass die Transkription eines NADP-ME-Gens aus der Zellkultur von *Phaseolus vulgaris* (Bohne) schnell und kurzfristig durch die Behandlung mit pilzlichen Elicitoren aktiviert werden konnte (Walter et al., 1988). Des Weiteren zeigten Versuche eines β -Glucuronidase-reportergenmarkierten NADP-ME-Promoters eine gesteigerte Promotoraktivität nach Verletzung der Bohnenblätter (Schaaf et al., 1995). Die NADP-ME-Promoteraktivität konnte durch Behandlung mit pathogen zugehörigen Stimulanzen wie z. B. reduziertem Glutathion, pilzlichen Elicitoren, Zellulase und NADPH beeinflusst werden (Schaaf et al., 1995). Neben Bohnen konnte ebenso für Mais und Weizen eine Reaktion von NADP-ME auf Elicitoren der Pathogenabwehr nachgewiesen werden (Casati et al., 1997; Maurino et al., 2001). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass NADP-ME-Aktivität nach Infektion mit *Magnaporthe grisea* in Ökotypen von *Brachypodium distachyon*, die resistent gegen diese pilzliche Infektion sind, wesentlich schneller und zu einem höheren Grad anstiegen als in

Ökotypen, die für die Infektion empfänglich waren (Parker et al., 2009). Dies weist auf einen, wie auch immer gearteten Zusammenhang zwischen NADP-ME und Pathogenabwehr hin.

3.3.1 Pflanzen mit modifizierter Expression von NADP-ME2

In vorangegangenen Arbeiten wurden mehrere unabhängige T-DNA-Insertionslinien von NADP-ME2 isoliert (*nadp-me2.1*, *nadp-me2.2* und *nadp-me2.3*) (Gerrard Wheeler et al., 2005) Diese Linien wurden auf ihre gesamte NADP-Aktivität in Blättern untersucht, welche in allen unabhängigen T-DNA-Insertionslinien des AtNADP-ME2-Gens kaum detektierbar sind und zwischen 1,9 bis 4,4 % der gemessenen NADP-ME2-Aktivität in wt-Blättern beträgt (Abb. 3.3.1). Für weitere Untersuchungen wurden die beiden Linien *nadp-me2.1* und *nadp-me2.2* verwendet. Um weitere Erkenntnisse über die Funktion von NADP-ME2 zu bekommen, wurde eine genetische Komplementation der *nadp-me2* mit der NADP-ME2-VolllängencDNA, gesteuert durch einen CaMV-35S-Promoter durchgeführt (*nadp-me2.1/ME2-1*, *nadp-me2.1/ME2-2*, *nadp-me2.2/ME2-1*, *nadp-me2.1/ME2-2*) (V. G. Maurino). Darüber hinaus wurden Überexpressionsmutanten mittels Transformation von wt-Pflanzen mit demselben NADP-ME2-CaMV-35S-Konstrukt hergestellt (ME2-1, ME2-2) (V. G. Maurino). Blattextrakte der Komplementationslinien wiesen eine 1,3- bis 4,2-fach höhere NADP-ME-Aktivität als wt auf, während die Überexpressionsmutanten eine Aktivität zeigten, die um 2,6- bis 5,6-fach höher war als wt (Abb. 3.3.1). Ebenso wie bei den Funktionsverlustmutanten konnte auch bei den Überexpressionsmutanten unter normalen Wachstumsbedingungen keine Veränderung zum wt, weder morphologisch noch im Wachstum, beobachtet werden.

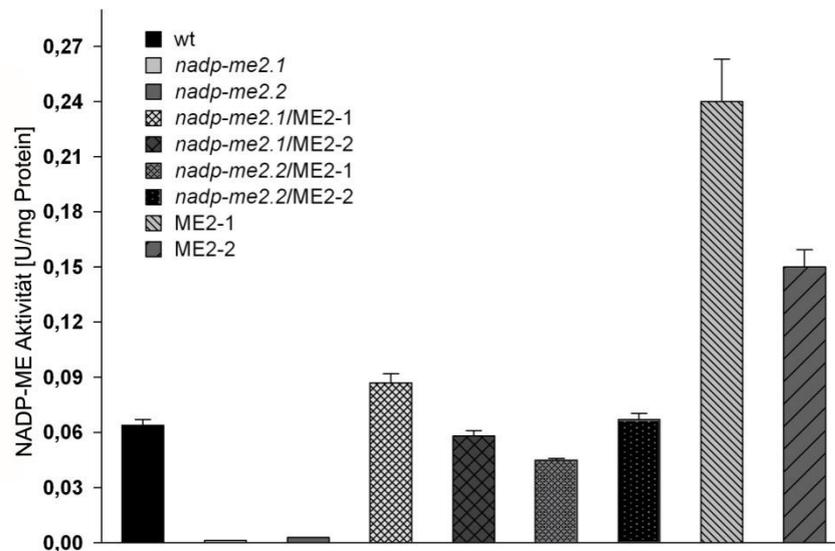


Abbildung 3.3.1: Relative, gesamte NADP-ME-Aktivität in Relation zum Wildtyp (=1). Gesamtaktivität von *nadp-me2*-, *nadp-me2/ME2*- und ME2-Pflanzen in Units pro mg. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen.

3.3.2 Der metabolisch Phänotyp der NADP-ME2-Mutanten

Obwohl sich die T-Insertionslinien *nadp-me2.1* und *nadp-me2.2* äußerlich nicht vom wt unterscheiden lassen, weisen diese Pflanzen ein eigenes metabolisches Profil auf, das sich von dem des wt unterscheidet. Die für diese Analyse genutzten Pflanzen wurden in der Mitte der Lichtperiode geerntet und extrahiert. Die GC/MS-Analyse zeigte eine Akkumulation von Glycerat, Glycerol, Citrat, Succinat, Fumarat und Malat in den *nadp-me2*-Pflanzen, während der Gehalt an Pyruvat, Glutamat, Glutamin, Ornithin und Isoleucin in diesen Pflanzen reduziert war. Neben den *nadp-me2*-Pflanzen wurden auch die Komplementations- und die Überexpressionsmutanten untersucht, um sicherzustellen, dass das veränderte, metabolische Profil auf den Funktionsverlust von NADP-ME2 zurückzuführen war (Tab. 3.3.1). Die Komplementation des Funktionsverlustes des NADP-ME2 bewirkte eine Aufhebung der durch den Knock-out hervorgerufenen Akkumulation mehrerer Metabolite. Die Metabolite, die in *nadp-me2* reduziert waren, blieben auch in den Komplementationslinien *nadp-me2.1/ME2-1* und *nadp-me2.1/ME2-2* im Vergleich

zum wt reduziert. Ein ähnlicher Trend war auch in den Überexpressionsmutanten ME2-1 und ME2-2 zu beobachten, der dort jedoch noch stärker hervortrat. Besonders die Level an Malat und Fumarat waren in *nadp-me2.1/ME2-1*, *nadp-me2.1/ME2-2*, ME2-1 und ME2-2 signifikant reduziert. Lediglich Ornithin erreicht in der Komplementation wieder wt-Niveau. Die Überexpressionslinien ME2-1 und ME2-2 zeigten außerdem eine Reduzierung des Saccharose-, Fruktose-, Glukose-, Glycerat-, Glycerol-, GABA-, Serin-, Valin-, Shikimat-, Tyrosin-, Asparagin- und Histidin-Gehaltes (Tab. 3.3.1). Die metabolischen Veränderungen sowohl in *A. thaliana* ohne NADP-ME2-Aktivität als auch mit erhöhter Aktivität haben unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Effekt auf die Morphologie oder das Wachstum dieser Pflanzen.

Tabelle 3.3.1: Der metabolische Gehalt von Rosetten bestimmt mit GC/MS. Die Pflanzen wuchsen bei $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ und wurden vier Stunden nach Einschalten der Lichtperiode geerntet. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen mit acht Pflanzen pro Messung. Die Werte wurden relativ zum Wild-Typ berechnet (jedes Metabolite = 1). Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden fett markiert.

	<i>nadp-me2.1</i>	<i>nadp-me2.2</i>	<i>nadp-me2.1/</i> <i>ME2-1</i>	<i>nadp-me2.1/</i> <i>ME2-2</i>	<i>ME2-1</i>	<i>ME2-2</i>
2-Oxoglutarat	0.52	0.52	0.38	0.86	0.24	0.24
Alanin	0.82	0.81	0.47	0.86	0.45	0.23
Ascorbat	1.09	1.19	0.59	0.77	1.62	0.75
Asparagin	0.70	0.90	0.80	0.80	0.60	0.40
Aspartat	0.98	0.80	0.44	0.35	0.23	0.22
(Iso-)Citrat	4.91	3.27	0.41	0.56	0.16	0.18
Fructos	0.99	1.13	1.10	1.05	0.75	0.56
Fumarat	2.52	2.12	0.61	0.83	0.40	0.36
GABA	1.11	1.01	0.60	0.66	0.36	0.28
Gluconat	1.09	1.13	0.94	0.91	0.57	0.48
Glukose	0.96	1.09	1.21	1.11	0.69	0.54
Glutamat	0.82	0.54	0.53	0.78	0.55	0.18
Glutamin	0.76	0.69	0.62	0.67	0.52	0.48
Glycerat	1.17	1.27	0.89	0.86	0.55	0.39
Glycerol	2.49	1.75	1.56	1.31	0.60	0.44
Glycin	0.75	0.59	0.80	0.94	0.70	0.65

Glykolat	0.96	0.88	0.58	0.71	0.50	0.33
Histidin	1.08	1.12	1.27	1.27	0.73	0.69
Isoleucin	0.80	0.83	1.11	0.96	0.84	0.53
Leucin	0.83	0.90	1.41	1.00	1.17	0.52
Malat	1.76	1.40	0.52	0.60	0.39	0.24
Maleat	1.27	1.23	0.58	0.69	0.38	0.19
Methionin	1.00	1.00	0.92	1.50	0.92	0.42
Inositol	0.83	0.92	0.98	1.09	0.87	0.68
Nikotinsäure	1.13	1.36	0.87	0.87	0.52	0.33
Ornithin	0.50	0.35	0.80	1.05	0.80	0.50
Phenylalanin	1.13	1.05	0.69	0.53	0.42	0.30
Pyruvat	0.61	0.56	0.73	1.27	0.36	0.35
Serin	0.61	0.63	0.87	0.85	0.84	0.48
Shikimat	1.10	1.10	0.86	0.94	0.58	0.42
Succinat	1.32	1.09	0.72	1.12	0.44	0.37
Saccharose	0.87	0.96	0.95	0.95	0.71	0.48
Threonin	1.34	1.00	0.79	1.39	0.81	0.33
Tyrosin	1.13	1.09	0.94	1.16	0.94	0.31
Valin	0.86	0.95	1.02	0.98	0.77	0.42

3.3.3 Analyse der transkriptionalen Coexpressions-Muster, die zusammen mit NADP-ME2 in die pflanzliche Immunantwort involviert sind

Um weitere Hinweise auf die biologische Funktion der Isoformen zu erlangen, wurden die transkriptionalen Coexpressions-Muster der Isoformen mithilfe der ATTED-II-Datenbank (Obayashi et al., 2009) analysiert. Die Analyse der zytosolischen Isoform NADP-ME2 (At5g11670) zeigte einen starken Zusammenhang zu vielen Genen, die in die Pflanzenabwehrantwort involviert sind (http://atted.jp/cgi-bin/coex_Ath.cgi?gene=At5g11670). Zu diesen Genen gehören mehrere Glutathion-Transferasen, MAP-Kinasen, Avirulent-Responsive-Proteine, Hydrolasen, PEN2 und PEN3 (beides Komponenten der präinvasiven Abwehr), BAK1 (BRI1-assoziierte Rezeptor-Kinase), Peroxidasen, MLO („powdery mildew resistance locus“), Pathogenese-zugehörige Proteine, Disease-Resistance-Proteine, Chitinasen, CERK1 (Chitin-Elicitor-Rezeptor-Kinase 1), CYP83B1 und CAD1

(induziert während der Abwehrantwort durch Kalloседepositionierung in der Zellwand) und weitere sind in Tabelle S3 im Anhang gelistet.

3.3.4 Die NADP-ME-Aktivität nach ausgelöster Abwehrreaktion in den Blättern

A. thaliana-Pflanzen mit wt und modifizierter Expression von NADP-ME2 wurden nach Elizitation mit Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs) und nach Interaktion mit dem hemibiotrophen pilzlichen Pathogen *Colletotrichum higginsianum* analysiert. Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Aktivität des gesamten NADP-ME nach Infiltration von wt-Pflanzen mit Elicitoren gemessen. Elicitoren sind Substanzen, die Abwehrmechanismen gegen Fraßfeinde und Krankheitserreger induzieren, z. B. flg22 und hrpZ. Als PAMPs wurden in dieser Arbeit Chitin, ein Polymer des *N*-Acetyl-D-Glucosamin, welches ein wesentlicher Bestandteil der pilzlichen Zellwand ist, Harpin (hrpZ), ein Zellwand-assoziiertes Protein, das von den Bakterien *Erwinia amylovora* oder *Pseudomonas syringae* produziert werden kann, und Flagellin (flg22), eine 22 Aminosäuren lange Sequenz des konservierten N-terminalen, elicitoraktiven Teils von Flagellin eingesetzt (Preston et al., 1998; Felix et al., 1999).

Nach Auslösen einer Pathogenantwort mittels flg22 und hrpZ in vier Wochen alten *A.*-on geerntet und die NADP-ME-Aktivität bestimmt. Es zeigte sich, dass in beiden Versuchen eine Erhöhung der Gesamtaktivität von NADP-ME nach Behandlung mit den Elicitoren stattfand (Abb. 3.3.2 A). Die Enzymaktivität der mit flg22 und hrpZ infiltrierten wt-Pflanzen nahm stetig zu und erreichte sein Maximum 24 Stunden nach Auslösen der Pathogenantwort.

Ebenso war zu klären, ob die Induzierung der NADP-ME-Aktivität ursächlich durch Infektionen *in planta* hervorgerufen werden kann. Dafür wurden wt-Pflanzen mit

dem hemibiotrophen Pilz *C. higginsianum* infiziert. *C. higginsianum* ist ein hemibiotropher Ascomycet, der aus *Brassica rapa* isoliert wurde (O'Connell et al., 2004). Da die meisten *A.-thaliana*-Ökotypen anfällig gegenüber Infektionen mit *C. higginsianum* sind, kann dieser als *A.-thaliana*-adaptierter, pathogener Pilz betrachtet werden (Shimada et al., 2006). Nach Infektion in wt stieg die gesamte Aktivität der NADP-ME an und war nach drei Tagen 3,4-fach höher als die Mock-behandelten Pflanzen (Abb. 3.3.3 A). In *nadp-me2*-Mutanten konnte hingegen weder in den Kontrollpflanzen noch in den infizierten Pflanzen eine erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.4.3). Anhand dieses Versuchs konnte jedoch noch keine Aussage getroffen werden, welche der Isoformen für die beobachtete Erhöhung der Aktivität verantwortlich war.

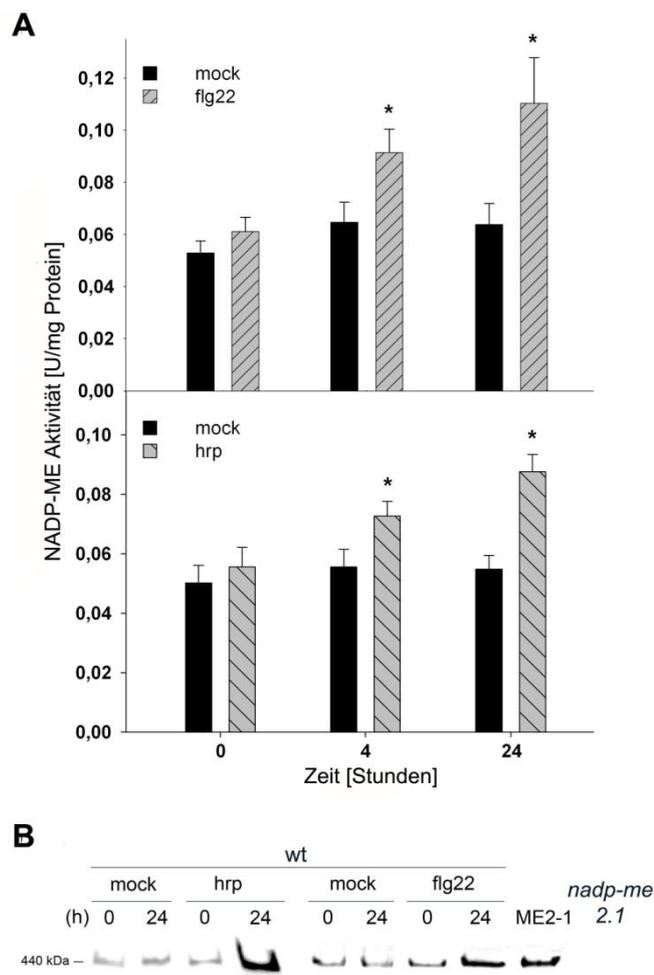


Abbildung 3.3.2: A: Gesamte NADP-ME-Aktivität in Wildtyp-Blättern nach Infiltration mit den Elicitoren hrpZ and flg22 photometrisch gemessen. **B:** Nativ PAGE-NADP-ME-Aktivitätsassay mit Proteinextrakten von Blättern, die zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Infiltration geerntet wurden. Als Positivkontrolle diente nadp-me2.1/ME2-1, als Negativkontrolle *nadp-me2.1*. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen mit wenigstens sechs Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit Stern markiert.

Mittels nativer Gelelektrophorese und anschließend in Gel-Aktivitätsassay der Proteinextrakte Elicitor-infiltrierter und auch *C.-higginsianum*-infizierter wt-Pflanzen, *nadp-me2*- und Komplementationslinien (bzw. Überexpressionsmutanten) wurde die Quelle der induzierten NADP-ME-Aktivität weiter untersucht (Abb. 3.3.2 B und Abb. 3.3.3 B).

Nur zwei der vier NADP-ME-Isoformen in *A. thaliana* sind in den Blättern exprimiert, das zytosolische NADP-ME2 und das plastidäre NADP-ME4. Bedingt durch die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität beider Enzyme war es möglich, NADP-ME2 und NADP-ME4 mittels nativer Gelelektrophorese mit anschließendem NADP-ME-Aktivitätsassay zu unterscheiden. Während NADP-ME2 in dem Aktivitätsassay als Bande von ca. 400 kDa sichtbar gemacht werden konnte, wurde NADP-ME4 in Form von zwei Proteinbanden von ca. 230 kDa und 140 kDa detektiert. Um festzustellen, welche Isoform für die erhöhte Aktivität nach Induktion der Pathogenantwort in *A. thaliana* verantwortlich ist, wurden die Proteinextrakte der verschiedenen Pflanzen mittels nativer PAGE- und Aktivitätsfärbung untersucht (Abb. 3.3.3 B). Es zeigte sich, dass die erhöhte Aktivität von einer Isoform stammt, die eine Größe von 400 kDa aufweist. Wohingegen die *nadp-me2*-NADP-ME-Aktivitätsassay-Negativkontrolle keine Aktivitätsbande zeigt, die Positivkontrollen nadp-me2/ME2 bzw. ME2-1 und ME2-2 hingegen schon (Abb. 3.3.3 B).

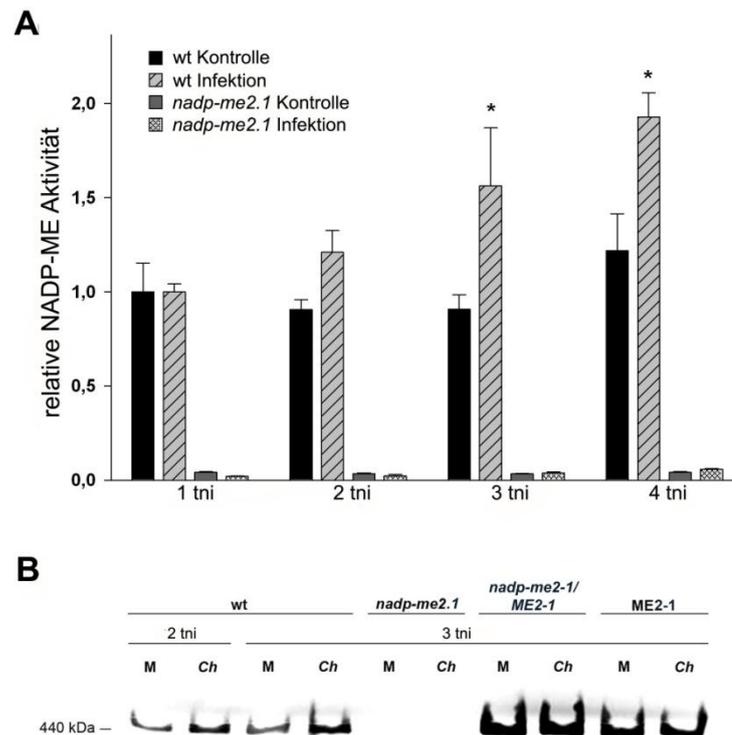


Abbildung 3.3.3: **A:** Gesamte NADP-ME-Aktivität in Wildtyp-Blättern nach Infektion mit *C. higginsianum* photometrisch gemessen. **B:** Nativ PAGE-NADP-ME-Aktivitätsassay mit Proteinextrakten von Blättern, die zu den Zeitpunkten 2tni (Tage nach Infektion) und 3tni geerntet wurden. Als Positivkontrolle dienten die Komplementations- und Überexpressionsmutanten, als Negativkontrolle *nadp-me2-1*. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen mit wenigstens sechs Pflanzen pro Messung. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit Stern markiert.

Um eindeutig zu determinieren, dass die durch Pathogenantwort induzierte NADP-ME-Aktivität von der Isoform NADP-ME2 und nicht von den Isoenzymen NADP-ME1 oder NADP-ME3 stammt, die ebenfalls in oligomerer Form vorliegen und theoretisch durch Pathogeninfektion induziert worden sein könnten, wurde eine qRT-PCR-Analyse mit *C.-higginsianum*-infiziertem Pflanzenmaterial von wt und *nadp-me2* mit spezifischen Primern für alle zytosolischen NADP-MEs durchgeführt. Während die Transkripte für NADP-ME1 und -ME3 mit und ohne Infektion mit *C. higginsianum* an der Detektionsgrenze lagen, wurde deutlich, dass lediglich NADP-ME2 vier Tage nach Infektion von wt mit *C. higginsianum* eine signifikant

erhöhte Expression aufweist (Tab. 3.3.2). Die erhöhte Expression des NADP-ME2-Genes konnte nur in wt, jedoch nicht in den *nadp-me2*-Linien detektiert werden.

Tabelle 3.3.2.: qRT-PCR-Analyse mit *Colletotrichum-higginsianum*-infiziertem Pflanzenmaterial, null und vier Tage nach Infektion (tni), für alle zytosolischen NADP-MEs mit spezifischen Primern. Die Daten sind normalisierte Durchschnittswerte (Mean normalized expression, MNE) \pm SE von zwei unabhängigen Messungen mit wenigstens drei Pflanzen pro Messung.

	wt		<i>nadp-me2.1</i>	
	0 tni	4 tni	0 tni	4 tni
<i>NADP-ME1</i>	nd	8.0 \pm 0.8	2.0 \pm 0.3	4.0 \pm 1.1
<i>NADP-ME2</i>	2054 \pm 210	16088 \pm 250	97 \pm 17	51 \pm 14
<i>NADP-ME3</i>	55 \pm 0.8	nd	40 \pm 6.3	nd

3.3.5 Die Infektion mit *C. higginsianum* in *nadp-me2*

Die Erkenntnis, dass *NADP-ME2* für den Anstieg an NADP-ME-Aktivität nach PAMP- oder Pathogenbehandlung verantwortlich ist, führte uns zu der Frage, ob *NADP-ME2* an der Pathogenabwehr gegen mikrobielle Pathogene beteiligt ist. Daher wurden an den *nadp-me2.1*-Mutanten, den Komplementationsmutanten (*nadp-me2.1/ME2-1*) und Überexpressionslinien (*ME2-1*) genauso wie an Col-0-wt getestet, ob unterschiedliche *NADP-ME2*-Aktivität einen Effekt auf die Infektion mit dem biotrophen *C. higginsianum* besitzen. Vier Tagen nach der Infektion sind die meisten älteren Blätter aller Genotypen abgestorben. Lediglich die voll entwickelten Blätter von *nadp-me2* sind noch nicht abgestorben, diese Blätter weisen jedoch große nekrotische Gebiete auf (Abb. 3.3.4 A). Um diese Beobachtung quantitativ verifizieren zu können, wurde die Akkumulation pilzlicher genomischer DNA im

Blattgewebe der Wirtspflanzen mittels qPCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion gemessen (Abb. 3.3.4 B). Während der frühen biotrophen Infektionsphase war der pilzliche DNA-Anteil nicht signifikant von dem pilzlichen DNA-Gehalt in den Blättern unmittelbar nach Inokulation zu unterscheiden. Diese Werte wurden daher verwendet, um die gemessenen qPCR-Daten zu normalisieren. Mit dem Einsetzen der nekrotrophen Kolonisationsphase von *C. higginsianum* – drei Tage nach Infektion – konnte eine umfangreiche Ausbreitung des Pilzes beobachtet werden. In dieser Phase besaßen die *nadp-me2*-Pflanzen eine 4-fach höhere Konzentration an pilzlicher DNA als der wt. Die *nadp-me2.1/ME2-1*- und die ME2-1-transgenen Linien verhielten sich wie der wt (Abb. 3.3.4 B).

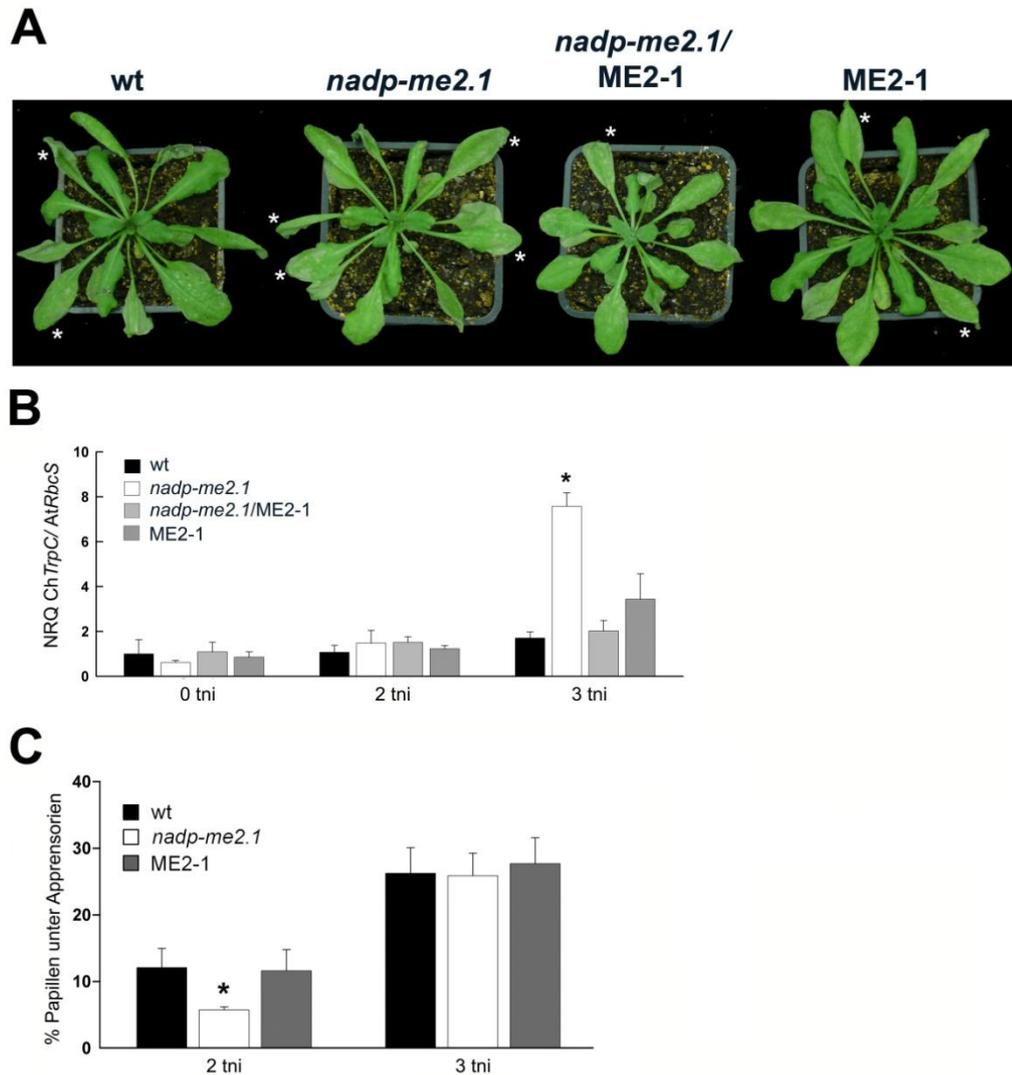


Abbildung 3.3.4: Infektion von wt-*A.-thaliana* mit $2 \cdot 10^6$ *C.-higginsianum*-Konidiosporen/ml. **A:** Optischer Phänotyp der Pflanzen nach vier Tagen nach Infektion. Die weißen Sterne bezeichnen voll ausgewachsene Blätter mit weitreichenden nekrotischen Läsionen. **B:** Bestimmung der pilzlichen genomischen DNA nach Infektion von ausgewachsenen wt-*A.-thaliana*-Blättern mit *C. higginsianum*. Eines von vier repräsentativen Experimenten wird dargestellt und die Daten wurden mit den Werten der 0-tni-Kontrolle normalisiert. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen mit drei Pflanzen pro Messung. **C:** Bestimmung der Kallose-Produktion unter den Appressorien, induziert durch pathogene Infektion von *C. higginsianum*. Vier Blätter pro Genotyp wurden mit Anelin-Blau gefärbt und von jedem Blatt wenigstens 140 Appressorien auf Kallosepapillen untersucht. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von je vier unterschiedlichen Pflanzen pro Genotyp. Werte, die signifikant vom Wild-Typ abweichen, berechnet durch den Student's *T* Test ($p < 0.05$), werden mit schwarzem Stern markiert.

Als Antwort auf eine mikrobielle Infektion wird von Pflanzen schon unmittelbar nach Erkennen des Pathogens Kallose als physische Barriere (Papillen) hergestellt.

Sie sollen ein Eindringen des Pathogens in die unteren apoplastischen Blattbereiche verhindern.

Als zusätzlicher Indikator für die Stärke der Pathogenantwort wurde die Kallose-Produktion nach Infektion mit *C. higginsianum* gemessen. Die Kallose wurde mit Anilin-Blau angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie die Anzahl der Papillen unterhalb der pilzlichen Appressorien bestimmt. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen wt- und Überexpressionsmutante, jedoch war die Kallose-Produktion in *nadp-me2.1*-Pflanzen zwei Tage nach Infektion deutlich niedriger (Abb. 3.3.4 C). Die verzögerte Produktion in der *nadp-me2.1*-Mutante wurde drei Tage nach Infektion aufgeholt, sodass der Kallose-Gehalt auf wt-Niveau anstieg.

3.3.6 PR-Gene-Expression und Salicylsäure- und Camalexin-Akkumulation

Es wurde bereits gezeigt, dass die Stärke der basalen pflanzlichen Immunantwort von der Menge an produzierter Salicylsäure, die als Signalmoleküle der pflanzlichen Abwehr dient, abhängt (Durrant und Dong, 2004). Da die *nadp-me2*-Mutanten eine abgeschwächte Immunantwort aufwiesen, wurden sie auf eine reduzierte Salicylsäureproduktion und Pathogen-assoziierte (PA) Gen-Induktion untersucht. Drei Tage nach Infektion (3 tni) mit *C. higginsianum* war in allen untersuchten Genotypen die pilzliche Ausbreitung weitgehend gleich und auch der Gehalt an freier Salicylsäure war in allen getesteten Genotypen ähnlich (Abb. 3.3.5 A). Des Weiteren blieben auch die in diesen Proben mittels Northern Blot untersuchten Expressionen der Salicylsäure-abhängigen Pathogen-assoziierten Gene PR-1 (PR; „pathogen related“) und PR-2 und ebenso die der Jasmonsäure-abhängigen PA-Gene PDF1.2 („plant defensin-like protein“) und PR-3 unverändert (Abb. 3.3.5 B). Um die durch *C. higginsianum* ausgelöste Abwehrreaktion abschätzen zu können, wurden die Induktion von FMO1 („Flavin-containing Monooxygenase 1“) und die

Akkumulation des Phytoalexin Camalexin untersucht. Die Induktion von FMO1 ist unabhängig vom Salicylsäuresignal sowie auch weitgehend die Camalexin-Akkumulation (Nawrath und Metraux, 1999; Mishina et al., 2006). Beides war in allen untersuchten Genotypen unverändert. Zusammengenommen weist dies darauf hin, dass sowohl die Salicylsäure-abhängigen, als auch die -unabhängigen Immunantworten von *A. thaliana* nicht durch den Funktionsverlust von NADP-ME2 beeinträchtigt werden.

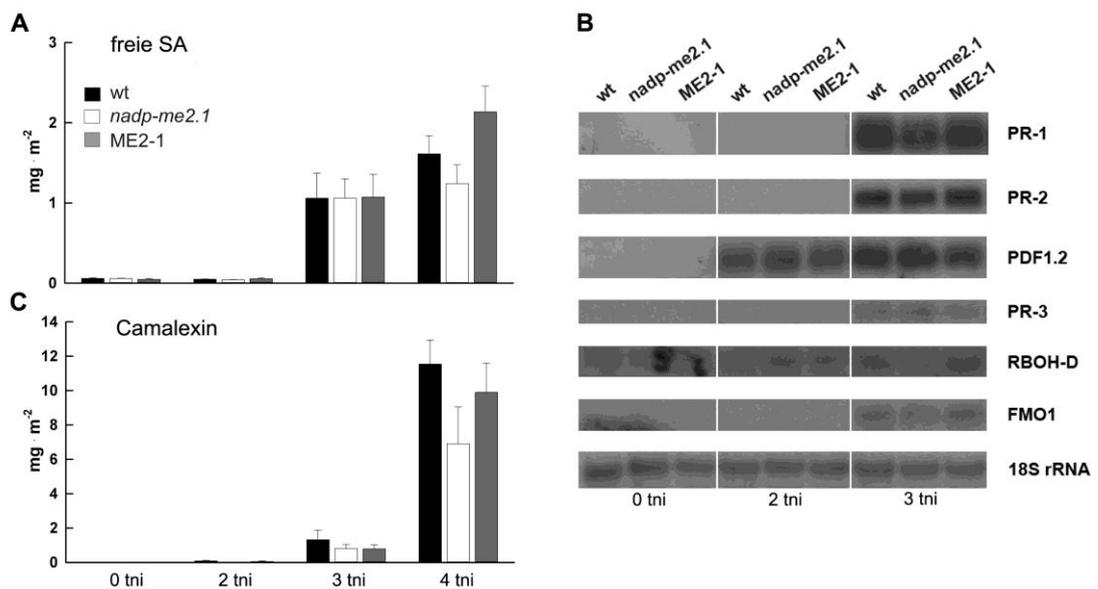


Abbildung 3.3.5: Freie SA, PR-Gen-Transkript Akkumulation und Camalexin Akkumulation in Antwort auf *C. higginsianum*-Infektion. Die Pflanzen wurden mit $2 \cdot 10^6$ *C. higginsianum*-Konidiosporen/ml besprüht. Für die Untersuchungen wurden voll ausgewachsene Blätter zu den Zeitpunkten 0 tni (Kontrolle), 2 tni, 3 tni und 4 tni geerntet. **A:** Bestimmung der freien SA aus vier biologischen Replikaten \pm SE. **B:** PR-Gen-Transkripte wurden mittels RNA Blot (Northern Blot) analysiert. Entweder 8 μ g Gesamt-RNA (PR-1, PR-2, PR-3, PDF1.2) oder 40 μ g Gesamt-RNA (FMO1, RBOH-D) wurden geladen und hybridisiert.

3.3.7 Das metabolische Profil nach Infektion mit *C. higginsianum*

Da die *nadp-me2*-Pflanzen eine höhere Anfälligkeit gegenüber *C. higginsianum*-Infektionen aufweisen, wurden die Änderungen im metabolischen Profil nach Infektion mit *C. higginsianum* in verschiedenen Genotypen (wt, *nadp-me2*, ME2) untersucht. Die Infizierten und die Kontrollpflanzen, die für das metabolische Profil analysiert wurden, wurden zwei Tage (initiale biotrophe Phase; 2 tni), 2,5 Tage (biotrophe Phase; 2,5 tni) und drei Tage (nekrotische Phase; 3 tni) nach Infektion geerntet. Für die Auswertung der GC/MS-Daten wurde die Hauptkomponentenanalyse („Principal Component Analysis“; PCA) genutzt. Dieses mathematische Analyseverfahren stellt eine wichtige Technik zur Identifizierung von Mustern in komplexen Datensätzen da (Smith, 2002). Die Analyse der Hauptkomponenten für alle Proben zeigte, dass die erste Hauptkomponente (PC1) den Datensatz in der Entwicklung der Infektion clustert (Abb. 3.3.6). Dies erklärt auch die sehr hohe Streuung der Daten und die Varianz von über 40 %, da eine fortlaufende pilzliche Infektion naturgemäß keinen linearen Verlauf haben kann und die Abweichung in den Einzeldaten erwartungsgemäß recht hoch ist. Die zweite Hauptkomponente (PC2) unterscheidet die verschiedenen Kontrollproben zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion von den Proben der infizierten Pflanzen. Interessanterweise kann durch die Hauptkomponenten-Analyse in den 2-tni-Proben keine Trennung der Infizierten von den Kontrollpflanzen erreicht werden. Dies ist erst mit den Daten der Pflanzen, die dem weiteren Verlauf der Infektion ausgesetzt waren, möglich (Abb. 3.3.6).

Eine PCA-Darstellung der GC/M-Daten alleine von Zeitpunkt 2 tni zeigt einerseits, dass durch den größten Eigenvektor (PC1) die Proben von den Kontrollpflanzen und infizierten Pflanzen trennbar sind. Andererseits ist die Varianz für diese

Determinante mit über 30 % recht niedrig (Abb. 3.3.7 A). Aber die Ergebnisse belegen außerdem, dass bereits während der initialen biotrophen Phase der Infektion erste Veränderungen im metabolischen Profil der Pflanzen auftreten. Des Weiteren kann durch die Darstellung der 2-tni-Daten auf den zweitgrößten Eigenvektor (PC2) eine Unterscheidung von *nadp-me2* und wt getroffen werden. Jedoch besitzt die ME2-15-Mutante eine so hohe Streuung in den Daten, dass keine Trennung zu den anderen Genotypen möglich war (Abb. 3.3.7 A).

In der späteren fortlaufenden Infektion (2,5 tni und 3 tni) war zwischen den Daten bezüglich der Genotypen keine Unterscheidung möglich (Abb. 3.4.7 B). Dies zeigt, dass die Infektion mit *C. higginsianum* einen viel größeren Einfluss auf das metabolische Profil von *A. thaliana* hat als der Genotyp. Dementsprechend konnten die beiden Erntezeitpunkte – einer in der biotrophen, einer in der nekrotischen Infektionsphase – eindeutig durch PC1 (40 % Varianz) statistisch voneinander getrennt werden (Abb. 3.3.7 B).

Bei der Betrachtung einzelner Metabolite während der nekrotischen Phase zeigt sich, dass sich Karboxylsäuren wie Malat, Fumarat, Succinat und 2-Oxoglutarat sowie lösliche Zucker und die meisten freien Aminosäuren inklusive die nicht-proteinogene Aminosäure GABA in infizierten wt-Pflanzen auf über 2-fach höhere Konzentrationen akkumulieren (Sub Tab. S4). Währenddessen blieb der Malat-Gehalt in *nadp-me2*-Mutanten weitgehend unverändert. Lösliche Zucker und Aminosäuren akkumulierten sich, verglichen mit dem nicht infizierten wt, genauso in infizierten *nadp-me2*-Pflanzen wie in den nicht infizierten *nadp-me2*-Kontrollpflanzen. Demnach wurde eine Steigerung dieser Metabolite nach *C. higginsianum*-Infektion gedämpft, was zu einer Beeinträchtigung der Änderung von

Kohlenstoff- und Stickstoff-Stoffwechsel als Reaktion auf *C.-higginsianum*-Kolonisierung, in den *nadp-me2*-Mutanten führt.

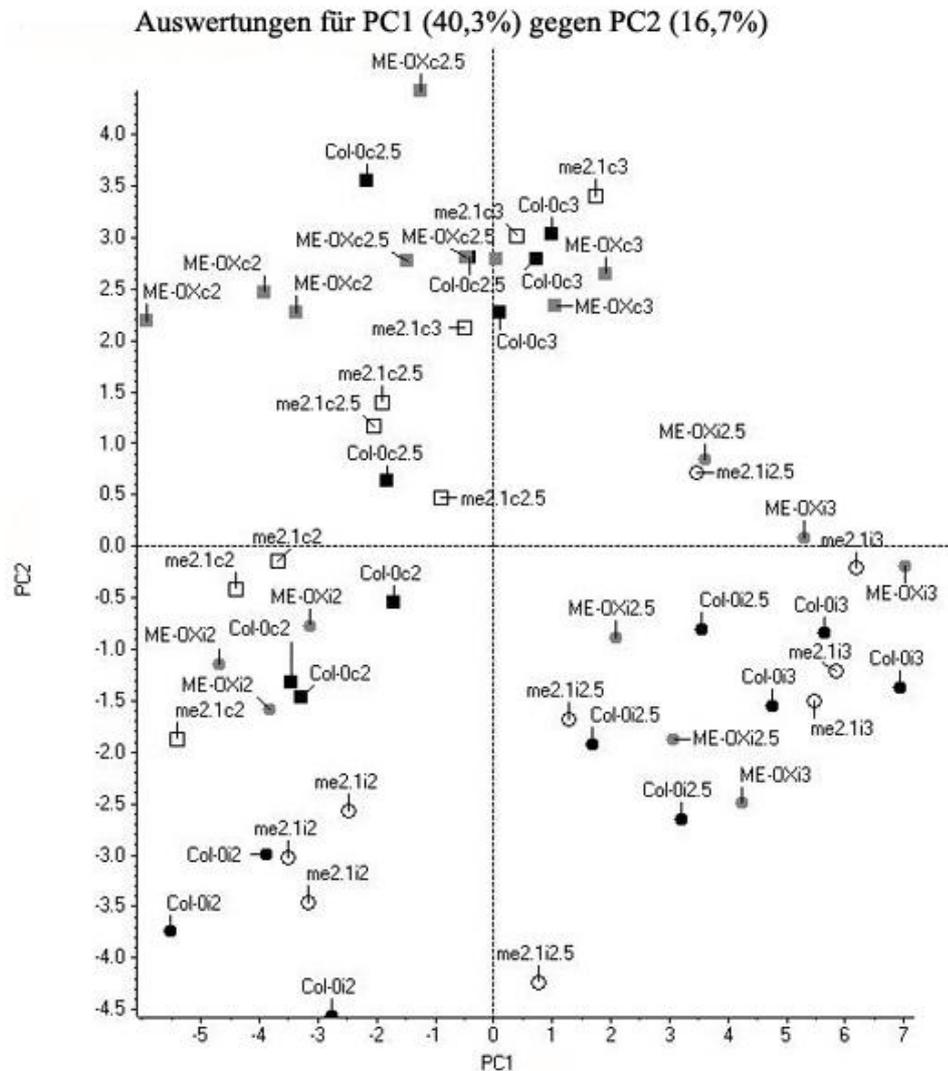


Abbildung 3.3.6: Hauptkomponenten-Analyse mit allen Daten des metabolischen Profils nach pilzlicher Infektion, dargestellt auf die beiden größten Eigenvektoren (PC1 gegen PC2). Die Pflanzen wuchsen bei $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ und wurden zwei, 2,5 und drei Tage nach Infektion geerntet. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von zwei unabhängigen Messungen mit vier Pflanzen pro Messung. Die Werte wurden relativ zum Wild-Typ berechnet (jedes Metabolite = 1). Kreise – Kontrolle; Quadrate – Infiziert. Schwarze Symbole – Col-0, weiße Symbole – *nadp-me2.1* (*me2.1*), graue Symbole – ME2-1 (ME-OX), c – Kontrolle, i – Infiziert, 2 – 2 tni, 2.5 – 2.5 tni, 3 – 3 tni.

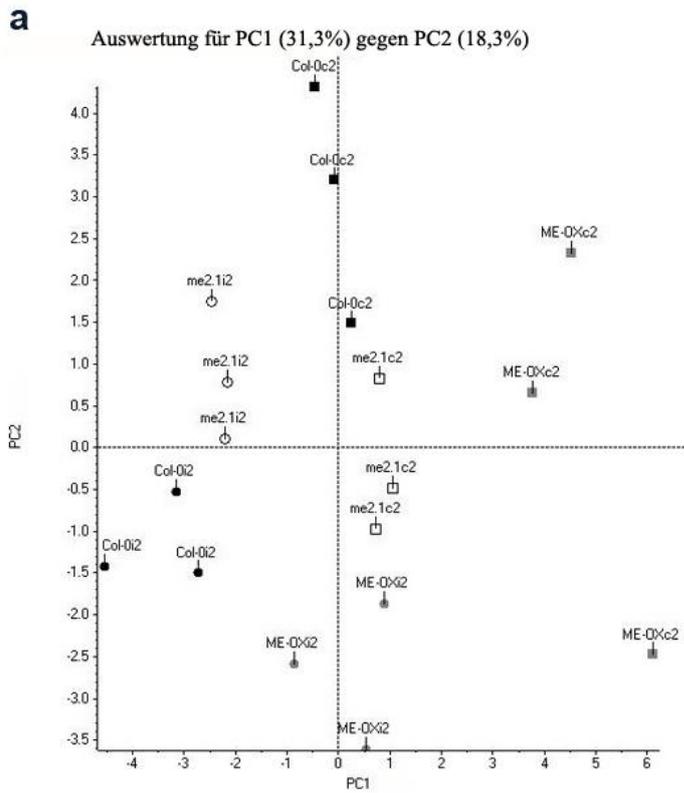
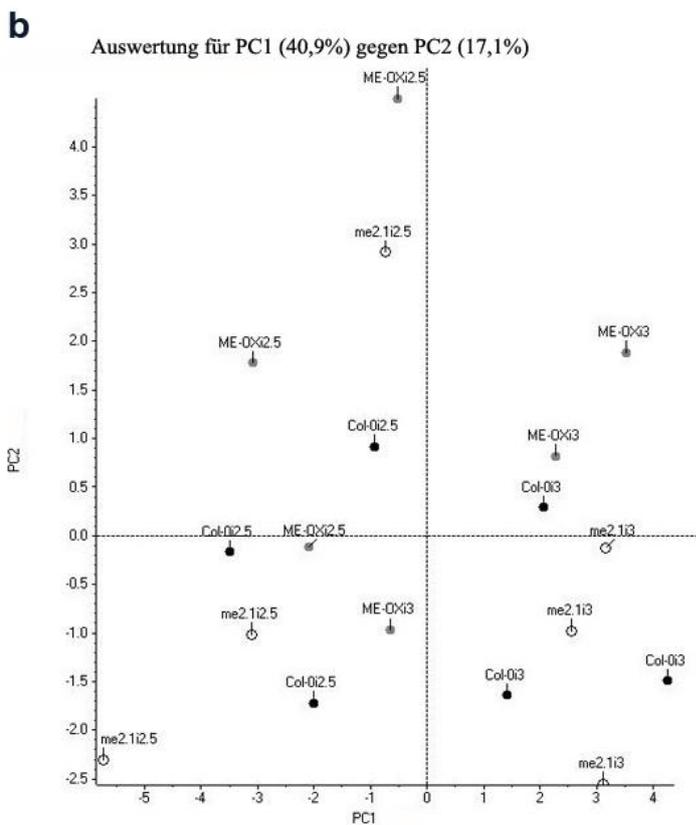


Abbildung 3.3.7: Hauptkomponenten-Analyse mit den Daten des metabolischen Profils. Der metabolische Gehalt wurde von Rosetten von infizierten und Kontrollpflanzen der Genotypen Wild-Typ (wt), *nadp-me2* und Überexpressionsmutante (ME2) mittels GC/MS bestimmt. **a:** PC1 gegen PC2 mit den Daten der Proben 2 tni. **b:** PC1 gegen PC2 mit infizierten Pflanzen, die 2,5 tni und 3 tni geerntet wurden. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von zwei unabhängigen Messungen mit vier Pflanzen pro Messung. Die Werte wurden relativ zum Wild-Typ berechnet (jedes Metabolite = 1). Kreise – Kontrolle; Quadrate – Infiziert. Schwarze Symbole – Col-0, weiße Symbole – *nadp-me2.1* (*me2.1*), graue Symbole – ME2-1 (ME-OX), c – Kontrolle, i – Infiziert, 2 – 2 tni, 2.5 – 2.5 tni, 3 – 3 tni.



3.3.8 Bestimmung der ROS-Produktion nach Inkubation mit flg22

Während der basalen Immunantwort der Pflanzen werden reaktive Sauerstoffspezies als Signalmoleküle an der pilzlichen Penetrationsstelle von den Pflanzen gebildet. Um die Rolle von NADP-ME2 in dieser frühen Phase der Abwehrreaktion zu analysieren, wurde in *wt*, *fls2* (Flaggelin-Sensitive 2), in der durch *flg22* keine Pathogenantwort induziert werden kann, *nadp-me2*-, ME2- und *nadp-me2/ME2*-Pflanzen nach Inkubation mit dem bakteriellen Elicitor *flg22* oder dem pilzlichen PAMP Chitin die Radikalproduktion mittels Lumineszenz quantitativ bestimmt. Als Negativkontrolle dienten H₂O-inkubierte Kontrollpflanzen, in denen erwartungsgemäß keine ROS-Produktion nachweisbar war. In den *wt*-, *nadp-me2*-, ME2- und *nadp-me2/ME2*-Linien hingegen war eine Radikalproduktion nach *flg22*- und Chitin-Induktion deutlich detektierbar. Die Komplementations- und Überexpressionslinien zeigten keine signifikant veränderte Radikalproduktion nach *flg22*-Behandlung verglichen mit *wt* (Abb. 3.4.8 A). Nach Chitin-Inkubation zeigten beide Linien (ME2 und *nadp-me2/ME2*) eine wesentlich höhere ROS-Produktion als der *wt* (Abb. 3.4.8 B). Die *nadp-me2*-Mutante hingegen zeigte eine signifikant niedrigere Radikalproduktion gegenüber *wt* sowohl nach *flg22*- als auch nach Chitin-Inkubation. Wie erwartet wies die *fls2*-Mutante nach Elicitor-Behandlung keine Radikalproduktion auf. Generell weisen die Ergebnisse auf einen engen Zusammenhang zwischen PAMP-induzierter ROS-Produktion und NADP-ME2 hin.

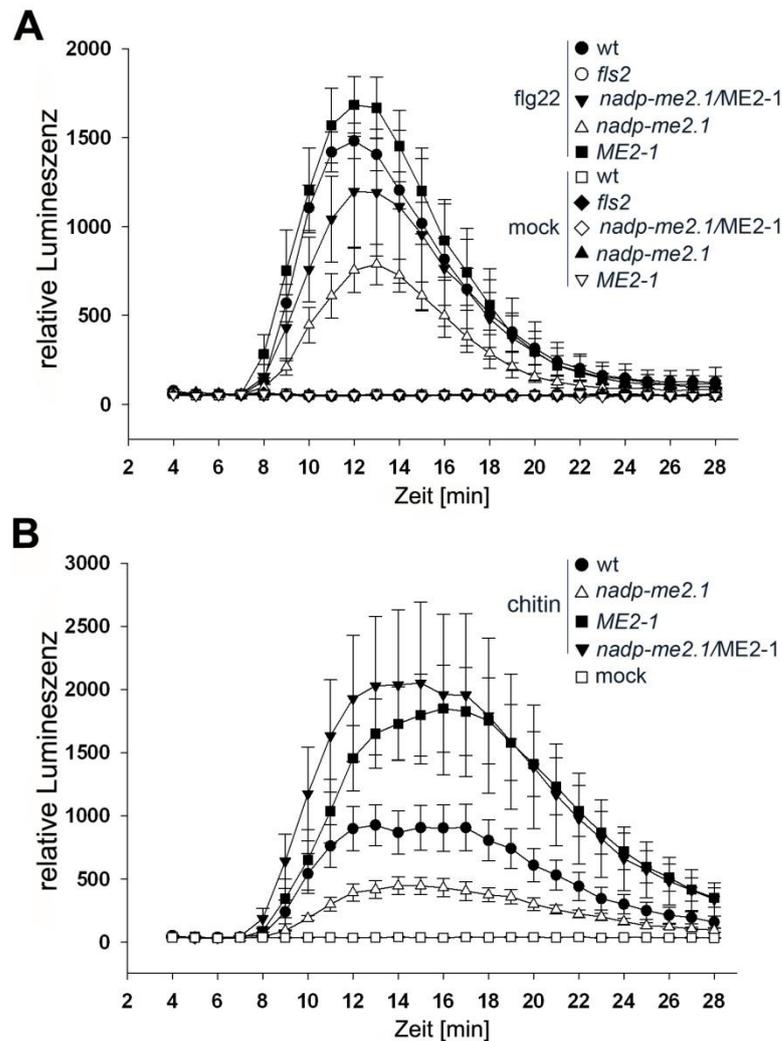


Abbildung 3.3.8: Die Bestimmung der Radikalproduktion nach Inkubation mit **A:** Flagellin (flg22) oder **B:** Chitin. Die Pflanzen wurden für drei Wochen im Gewächshaus angezogen. Fett markiert sind die Linien, deren ROS-Produktion nach Behandlung signifikant ($p < 0,05$) von der Kurve des wt abweicht. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen mit wenigstens acht Doppelreplikaten je Pflanzenlinie pro Messung.

3.4 Die Funktion von NADP-ME3 in *A. thaliana*

3.4.1 Isolierung und Untersuchung homozygoter T-DNA-Insertionslinien

Die Analyse der Expression von NADP-ME3 zeigt eine Lokalisation in den Pollen von *A. thaliana* an, daher wurde für das Enzym NADP-ME3 eine Funktion während der späten Pollenentwicklung postuliert (Maurino et al., 2009). Um NADP-ME3 eine

Funktion zuordnen zu können, wurde zunächst nach Phänotypen in T-DNA-Insertionslinien, die einen Funktionsverlust von NADP-ME3 aufweisen, gesucht. Es wurden drei unabhängige Arabidopsis-Linien mit unterschiedlichem ökologischen Hintergrund untersucht, *nadp-me3.1* (Col-0), *nadp-me3.2* (Col-0) und *nadp-me3.3* (Wsj.). Die genomische Sequenz von NADP-ME3 ist 6160bp lang und besitzt 19 Exons (http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/seq_sub.ep?GeneID=68282). Die T-DNA-Insertionen in NADP-ME3 der drei Linien befinden sich auf dem 1. Intron (*nadp-me3.2*, Salk_131270), dem 9. Exon (*nadp-me3.3*, Flag_178A05) und dem 15. Intron (*nadp-me3.1*, Salk_139336) (Abb. 3.5.1). Aus diesen drei unabhängigen Insertionslinien wurden homozygote Linien isoliert. Die Mutanten von NADP-ME3 zeigten keinen offenkundigen Phänotypen unter vegetativen Bedingungen. Die Entwicklung und Morphologie der Trichome sowie die Fertilität der Linien waren normal.

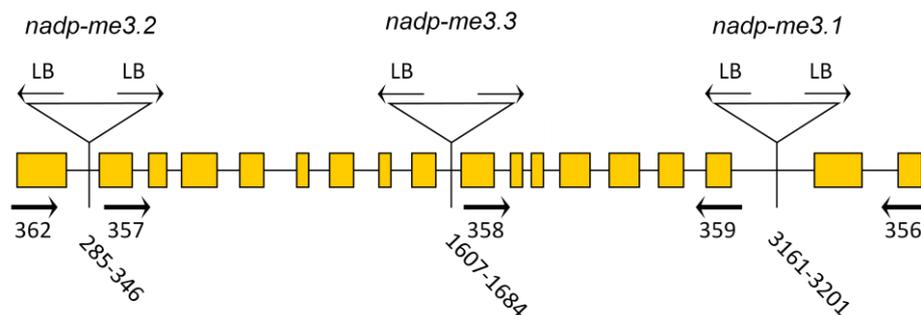


Abbildung 3.4.1: Schematische Übersicht über die Lokalisation der T-DNA-Insertionen, der Exons (gelb) und der spezifischen Primer.

Mittels semi-quantitativer RT-PCR wurde nachgewiesen, dass *nadp-me3.1* nach wie vor ein Vollängen-Transkript von NADP-ME3 besitzt, während *nadp-me3.2* und *nadp-me3.3* echte Knock-out-Linien sind (Abb. 3.4.2).

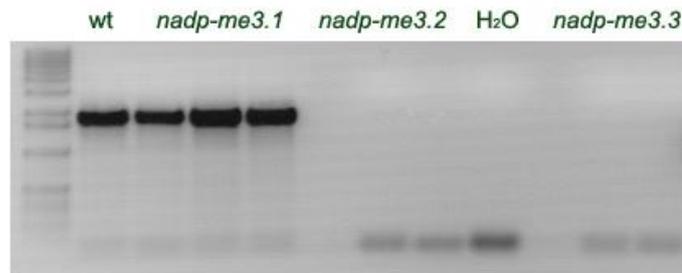


Abbildung 3.4.2: Semi-quantitative RT-PCR mit der Primerkombination 362/356 (Vollängen-cDNA), untersucht wurden *nadp-me3.1*, *nadp-me3.2* und *nadp-me3.3*, als Positivkontrolle diente wt.

Die *nadp-me3*-Linien (*nadp-me3.1*, *nadp-me3.2*, *nadp-me3.3*) wurden auf ihre gesamte NADP-ME-Aktivität in Blüten untersucht (Abb. 3.4.3). In den Linien *nadp-me3.2* und *nadp-me3.3* wurde eine signifikant niedrigere NADP-ME-Aktivität detektiert (Abb. 3.4.3). Der Hauptanteil an gemessener ME-Aktivität in den Blüten stammen von NADP-ME2 und NADP-ME4, die ebenfalls in Teilen der Blüte lokalisiert sind (Gerrard Wheeler et al., 2005).

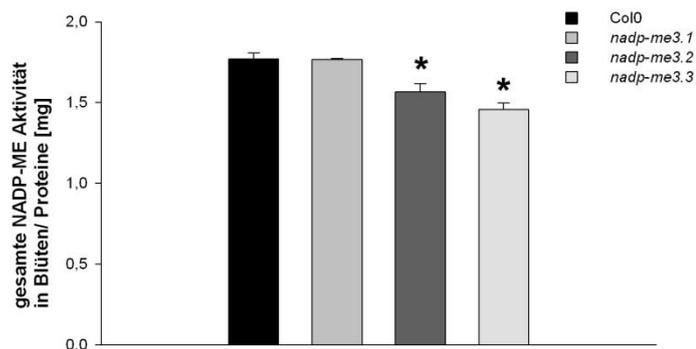
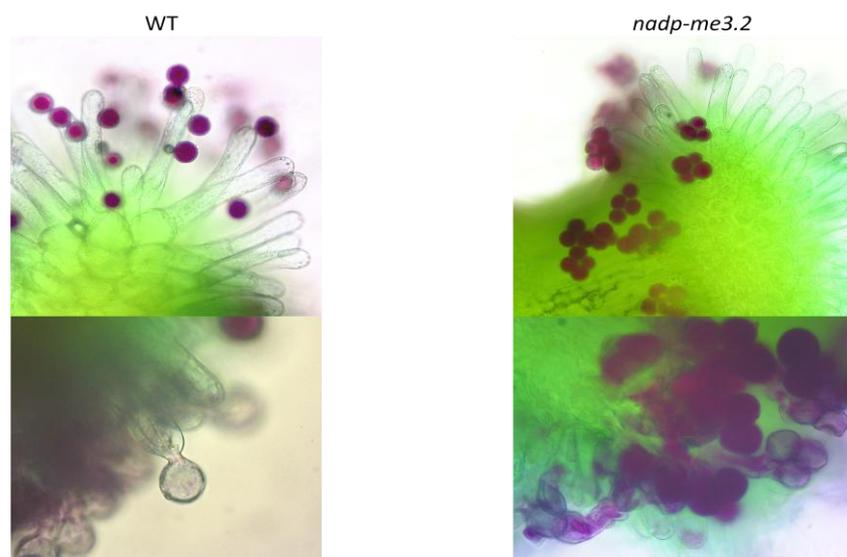


Abbildung 3.4.3: Gesamte NADP-ME-Aktivität in Blüten von wt, *nadp-me3.1*, *nadp-me3.2* und *nadp-me3.3* fotometrisch gemessen. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm SE von drei unabhängigen Messungen mit wenigstens sechs Pflanzen pro Messung.

3.4.2 Pollen-Tetraden in der *nadp-me3.2*-Linie

Da NADP-ME3 vorwiegend in Blüten und Pollen während der Pollenentwicklung lokalisiert ist, wurden die Pollen der *nadp-me3*-Linien näher untersucht. Nach Färbung mit Alexander-Lösung wurden die Blütenstände unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Alexander-Färbung ist eine etablierte Methode, um die Wände fertiler Pollen violett zu färben, Antheren und das Karpell werden mit dieser Methode nicht angefärbt (Peterson et al., 2010). Es zeigte sich, dass die Pollen von *nadp-me3.2* vorwiegend als Tetraden zu finden waren (Abb. 3.4.4), diese Pollen-Tetraden aber nach wie vor fertil und lebensfähig waren. Nähere Untersuchungen an allen Insertionslinien und dem *wt* zeigten, dass ausschließlich *nadp-me3.2* Pollen-Tetraden bildete. Die zweite Funktionsverlust-Linie *nadp-me3.3* bildete Monaden, genau wie *wt* und *nadp-me3.1*. Jedoch waren zwischen den Tetraden von *nadp-me3.2* und den Monaden von *nadp-me3.3* Kallose-„Patches“ zu finden, was auf einen unzureichenden Kallose-Abbau in diesen Mutanten schließen lässt. Keine Kallose war hingegen an den Pollen von *wt* und *nadp-me3.1* zu finden (Abb. 3.4.4).



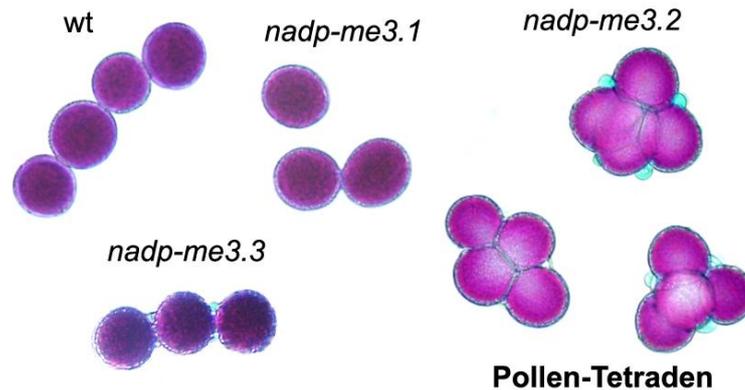


Abbildung 3.4.4: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Pollen, gefärbt mit Alexander-Lösung. Oben: Pistill mit Pollen und auskeimenden Pollenschläuchen (Vergrößerung) in wt und *nadp-me3.2*. Unten: unterschiedliche Pollenmorphologie in wt und Funktionsverlust-Linien von NADP-ME3; dunkel-violette Pollen, hellblaue Kallose-„Patches“.

Die Pollen-Tetraden der *nadp-me3.2*-Mutante wiesen starke Ähnlichkeit zu den Quartett-Mutanten (*qrt*) auf. In den Quartett-Mutanten werden die Pollenkörner als Tetraden aus den Antheren entlassen und zwischen der fusionierten Pollenwand sind bei einer der *qrt*-Mutante (QRT2) Kallose-„Patches“ zu finden (Preuss et al., 1994; Rhee und Somerville, 1998). Bisher wurden drei *qrt*-Gene charakterisiert: QRT1 (At5g55590) codiert für eine Pectin-Methylesterase und QRT2 (At3g07970) und QRT3 (At4g20050) für Endo-Polygalakturonasen, welche für die Pectin-Degradierung benötigt werden (Rhee und Somerville, 1998). Interessanterweise waren nicht nur die Pollen-Tetraden von QRTs und *nadp-me3.2* fast identisch, auch die Expressionsmuster der QRTs und NADP-ME3 sind sehr ähnlich (Arabidopsis-eFP-Browser (Winter et al., 2007)). Vor allem QRT3 und NADP-ME3 waren beide in der zwölften Entwicklungsstufe der Blüte in den Stamen am höchsten exprimiert (Abb. 3.4.5).

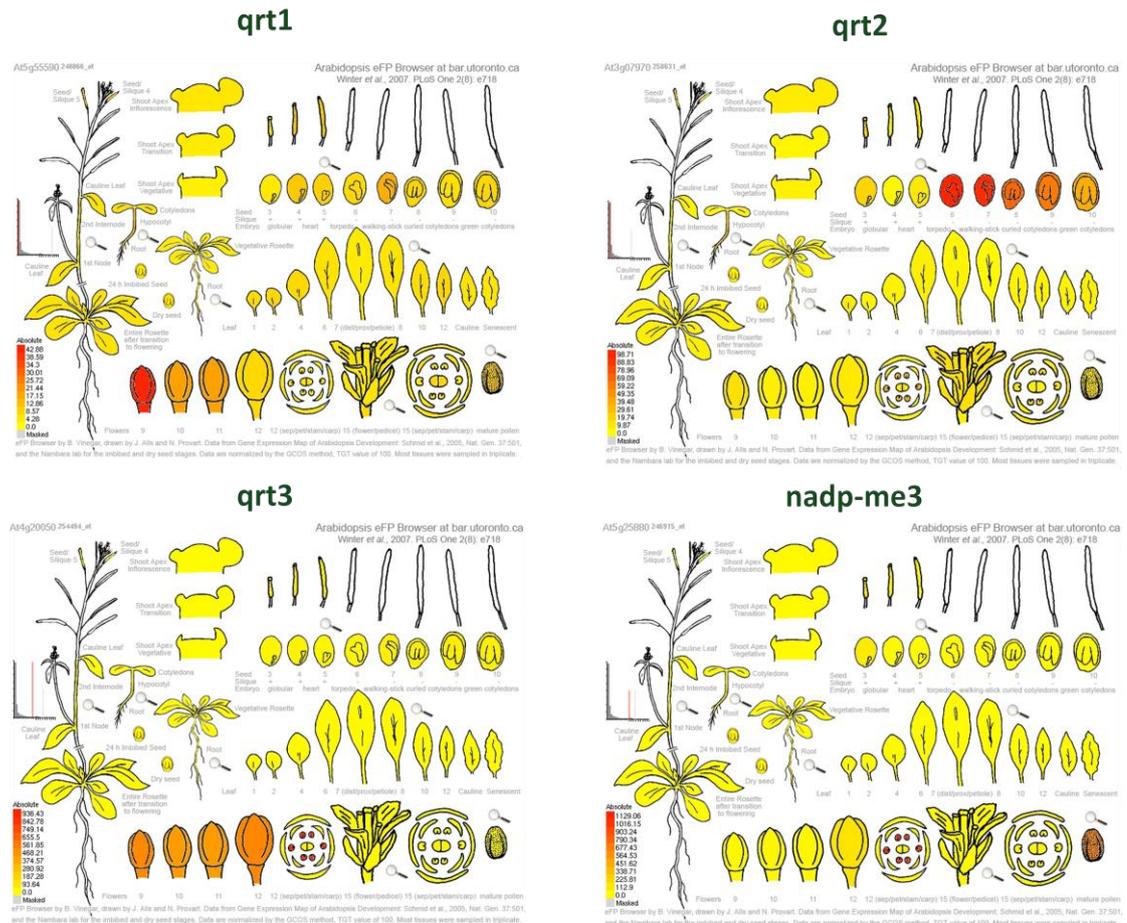


Abbildung 3.4.5: Gen-Expressions-Karte von *qrt1-3* und *nadp-me3* erstellt mit dem Arabidopsis-eFP-Browser (Winter et al., 2007).

Um nun zu klären, warum nur eine der beiden Funktionsverlust-Mutanten von NADP-ME3, *nadp-me3.2*, Pollen-Tetraden bildet und eine zweite Insertion in eines der bekannten QRT-Gene auszuschließen, wurde die Präsenz der Vollängen-mRNAs der drei *qrts* in der *nadp-me3.2*-Mutante mittels semi-quantitativer RT-PCR überprüft. Die Transkripte aller drei QRTs konnten nachgewiesen werden, daher kann eine T-DNA-Insertion in einem der *Quartet*-Gene nicht für die Pollen-Tetraden in *nadp-me3.2* verantwortlich sein (Abb. 3.4.6).

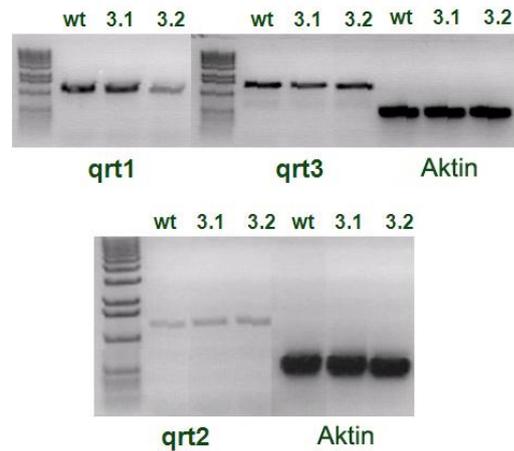


Abbildung 3.4.6: Semi-quantitative RT-PCR der *Quartet*-mRNA in *nadp-me3.2*. Als Referenzgen für die Ladungsmenge wurde Aktin (Aktin 2: At3g18780) genutzt.

Um weiteren Aufschluss über den *nadp-me3.2*-Phänotyp zu gewinnen, werden zunächst zwei Strategien verfolgt. Zum einen das Silencen von NADP-ME3 in *wt* mittels MikroRNA mit spezifischem ME3-Promoter. Hierfür wird ein NADP-ME3-promotorspezifisches miRNA-Konstrukt in einen binären Vektor (Fahnenstich et al., 2007) eingebaut und in *A. thaliana*-*wt* transformiert. Das miRNA-Konstrukt bewirkt ein gezieltes Ausschalten der NADP-ME3-Aktivität. Durch die Verwendung des NADP-ME3-spezifischen Promotors wird sichergestellt, dass gezielt nur diese Isoform des NADP-ME-Enzyms unterliegt. Außerdem ist es wichtig, einen blütenspezifischen Promotor zu verwenden, damit negative Effekte auf die Blütenentwicklung vermieden werden. Sollte durch das Silencen von NADP-ME3 der Tetraden-Phänotyp reproduzierbar sein, wäre der Beweis erbracht, dass *nadp-me3.2* Pollen-Tetraden aufgrund des Funktionsverlustes von NADP-ME3 bildet. Die zweite Strategie ist die Komplementation der *nadp-me3.2*-Mutante durch ein Promotor-NADP-ME3-Konstrukt in einem pGreenII-nosBAR-Expressionsvektor. Auch bei diesem Konstrukt wird der NADP-ME3-spezifische Promotor benutzt. Die Komplementation sollte keine Pollen-Tetraden besitzen, womit bewiesen wäre, dass

der Funktionsverlust von NADP-ME3 für das Auftreten der Pollen-Tetraden verantwortlich ist. An beiden Strategien wird derzeit gearbeitet.

4 Diskussion

4.1 Die essenzielle Bedeutung organischer Säuren als Kohlenstoffquelle

4.1.1 Wachstum und morphologische Modifikation in KT-MEM-Pflanzen

Die Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression des Mais NADP-ME in *A. thaliana* unter KT-Bedingungen starke Veränderungen in Wachstum und Morphologie zur Folge haben. Der MEM-Phänotyp zeichnet sich vor allem durch die blassgrüne Farbe der Blätter und die reduzierte Biomasse aus (Abb. 3.1.1). Viele morphologische Eigenschaften der MEM-Pflanzen sind auf die reduzierte Blattdicke zurückzuführen, wodurch die höhere spezifische Blattfläche, der blassgrüne Phänotyp und die reduzierte Biomasse zu beobachten sind.

Die Chloroplasten der MEM-Pflanzen besitzen überaus viele Thylakoide, zeigen jedoch kein erhöhtes Granastacking und demzufolge auch keine veränderte PSI/PSII-Ratio. Dies steht einigen Veröffentlichungen gegenüber, die aufzeigen, dass Chloroplasten mit weniger Chlorophyllgehalt auch weniger Thylakoidmembranen haben (Hugly et al., 1989; Takeuchi et al., 2000; Reiser et al., 2004). Jedoch ist es wahrscheinlich, dass durch die wesentlich geringere Blattdicke der MEM-Linien unter KT-Bedingungen auch der Chlorophyllgehalt pro Fläche sowie die photosynthetische Performance reduziert sind (Abb. 3.1.2 und Tab. 3.1.2). Als Resultat daraus wären Strukturveränderungen der Chloroplasten der MEM-Pflanzen als eine Form der Kompensation und Steigerung der Effizienz der Lichtabsorption zu sehen. Interessanterweise scheint *Oryza sativa* mit einer Überexpression des Mais

C4-NADP-ME agranale Chloroplasten auszubilden (Takeuchi et al., 2000). Die Ergebnisse der MEM-Pflanzen belegen jedoch eindeutig, dass die Chloroplasten in *A. thaliana* Grana besitzen. Es scheint, dass agranale Chloroplasten eine Besonderheit in *O. sativa* sind und eine Überexpression des NADP-ME in anderen Spezies dies nicht zur Folge hat.

4.1.2 Der Einfluss der MEM-Überexpression auf die Effizienz der Photosynthese und den NADP- und NAD-Spiegel während der Nacht

Die Ergebnisse der reduzierten Kohlenstoff-Assimilationsrate und Effizienz der PSII-Photochemie im KT-MEM-Pflanzen zeigen, dass die Kapazität der Photosynthese in diesen Pflanzen geringer ist als im wt. Jedoch weist die unveränderten NADP/NADPH-Ratio während der Nacht darauf hin, dass die Überexpression von NADP-ME keine Überreduktion von NADP in den Pflanzen zur Folge hat. Demnach liegt in den MEM-Pflanzen auch keine Überreduktion der Elektronentransporter der Photochemie vor. Und es konnte aufgezeigt werden, dass in KT *A. thaliana*-wt-Pflanzen ein Überschuss an Elektronen durch eine Erhöhung der MDH-Aktivität und des Glutathiongehaltes kompensiert wird (Becker et al., 2006). Darüber hinaus weist *A. thaliana* mit einem Funktionsverlust der mitochondrialen MDH selbst unter Hochlichtbedingungen keinen sichtbaren Unterschied zu wt vor (Hebbelmann et al., 2012). Dies belegt, dass die Pflanzen weitere Regulierungsmechanismen der Redox-Homöostase besitzen. Diese Fähigkeit der metabolischen Flexibilität besitzen MEM-Pflanzen der Spezies *A. thaliana*, jedoch anscheinend nicht *O. sativa*. Diese Pflanzen zeigen Charakteristika der Photoinhibition und es wurde spekuliert, dass diese durch eine Akkumulation von NADPH unter normalen Wachstumsbedingungen ausgelöst wird (Takeuchi et al., 2000).

Die Bestimmung des Pyridin-Nukleotid-Spiegels weist auf einen Einfluss von Lichtperiode und Lichtintensität auf die Reduktion des NADP- und NAD-Gehaltes der MEM-Pflanzen während der Nacht hin. Diese Veränderung könnte durch die Wiederherstellung der Redox-Homöostase oder die Reduzierung der Synthese des Nukleotidspiegels entstanden sein, da belegt werden konnte, dass Fumarat indirekt an der Biosynthese von NAD beteiligt ist (Noctor et al., 2006). Denn für den ersten Schritt der Biosynthese wird FAD benötigt, welches durch molekularen Sauerstoff, aber auch durch Fumarat regeneriert wird (Noctor et al., 2006). Da der Fumarat-Gehalt besonders während der Nacht in den MEM-Pflanzen sehr niedrig ist, ist es möglich, dass dadurch auch die Synthese von NAD und NADP reduziert ist.

4.1.3 Die Veränderung der Akkumulation und Degradierung von Speicher-Kohlenstoffen in Abhängigkeit der Länge der Lichtperiode

Der Metabolismus von *A. thaliana* wird durch den Tag-Nacht-Zyklus stark beeinflusst. Während der Lichtperiode wird transitorische Stärke akkumuliert und während der Dunkelperiode wieder abgebaut (Abb. 3.1.4). Die so wieder mobilisierten löslichen Zucker werden genutzt, um den Metabolismus und das Pflanzenwachstum auch während der Nacht mit Energie zu versorgen (Gibon et al., 2004; Lu et al., 2005; Gibon et al., 2009). Die Energieversorgung hängt aber nicht nur von der Verfügbarkeit von Stärke, sondern auch von einer Vielzahl weiterer Faktoren ab. Neben Stärke und Hexosen sind auch organische Säuren eine wichtige Quelle für Kohlenstoffgerüste (Martinoia und Rentsch, 1994). Des Weiteren deutet vieles darauf hin, dass vor allem Malat und Fumarat wichtige Kohlenstoffquellen sind, deren Metabolisierung Energie und Kohlenstoffgerüste während der Nacht liefern. Fumarat ist nach Saccharose das in den Blättern von *A. thaliana* während der Lichtperiode am höchsten konzentrierte Metabolit (Abb. 3.1.5) (Chia et al., 2000;

Fahnenstich et al., 2007). Aber auch Malat akkumuliert sich zu einer Konzentration von bis zu 350 mM am Ende des Tages (Martinoia und Rentsch, 1994). Das in *A. thaliana* am Ende der Nacht beobachtete geringe Level an Malat und Fumarat lässt auf eine Respiration dieser beiden organischen Säuren während der Nacht schließen (Abb. 3.1.5). (Fahnenstich et al., 2007; Gibon et al., 2009). KT-Bedingungen, also eine verlängerte Dunkelperiode, senken das Level von Malat und Fumarat am Ende der Nacht gegen null, was auf eine Verknüpfung zwischen dem Versorgungsengpass von Kohlehydraten aus dem Stärkeabbau am Ende der Dunkelperiode und den beiden organischen Säuren hindeutet (Gibon et al., 2009).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der AGPase in direktem Zusammenhang mit Malat steht (Centeno et al., 2011). Untersuchungen an Tomaten zeigen, dass Mutantenlinien mit einem niedrigen Malat-Gehalt eine gesteigerte Akkumulation an Stärke aufweisen, wohingegen Linien mit einem hohen Level an Malat einen gegenteiligen Effekt zeigen. Hervorgerufen wird dieses Phänomen durch eine Veränderung der AGPase-Aktivität, die ihrerseits aus einer sie regulierenden Veränderung des Redox-Status resultiert (Centeno et al., 2011). Der Malat-Gehalt in den Mitochondrien hat demnach direkte Auswirkungen auf die Stärkebiosynthese in den Plastiden. Es wurde auch gezeigt, dass wt-Pflanzen, die unter sukzessiv verkürzten Lichtperioden wuchsen, proportional mehr Stärke während der Lichtperiode synthetisierten und während der Nacht diese langsamer wieder abbauten. Des Weiteren wiesen diese Pflanzen eine zunehmende Reduktion des Malat- und Fumarat-Gehaltes am Ende der Nacht auf, bei stetiger Verkürzung der Lichtperiode (Gibon et al., 2004; Gibon et al., 2009). MEm-Pflanzen zeigen im KT bei moderater PFD gegenüber wt keine Unterschiede in der Höhe der Stärke-Akkumulation, besitzen jedoch wesentlich niedrigere Malat- und Fumarat-

Konzentrationen. Unter niedrigen Lichtbedingungen im KT, wenn der MEm-Phänotyp am stärksten ausgeprägt ist und der Gehalt von Malat und Fumarat extrem niedrig ist, zeigen die MEm-Linien im Vergleich zu wt eine höhere Stärke-Akkumulation (Abb. 3.1.5).

RQ Bestimmungen aller Genotypen in KT zeigen, dass während des Tages Karbohydrate die bevorzugten Substratquellen der Respiration sind. Am Ende der Nacht wechseln wt-Pflanzen von Karbohydraten zu organischen Säuren als Brennstoffquelle der Respiration, um die durch reduzierte Reserven der Karbohydrate verursachten Einschränkungen in der Kohlenstoffversorgung auszugleichen. Derweil nutzen MEm-Pflanzen Fettsäuren und/oder Proteine als Quelle. Zusammen betrachtet belegen alle Ergebnisse, dass – auch wenn Stärke am Ende der Nacht nicht komplett aufgebraucht ist – die organischen Säuren Malat und Fumarat als alternative Energiequelle genutzt werden, um den Stärkeverbrauch zu puffern.

4.1.4 Die Auswirkungen von Karbohydratmangel kombiniert mit geringer Malat- und Fumarat-Konzentration

Die Ergebnisse der Untersuchung der MEm-Überexpressionspflanzen lassen den Schluss zu, dass Pflanzen mit einer mangelnden Versorgung an Karbohydraten während einer langen Nachtperiode (Hungerphase) einen erhöhten Bedarf an hochreduzierten Substraten wie z. B. Fettsäuren und Proteinen haben, da auch die Versorgung mit organischen Säuren nicht ausreichend ist. Weiterführende Untersuchungen der Stärkefreimutanten und MEm-Überexpressionslinien mit stärkefreiem Hintergrund bestätigen die Wichtigkeit der organischen Säuren Malat und Fumarat als Kohlenstoffquelle. So zeigen alle untersuchten Genotypen mit einem Versorgungsengpass einer C-Quelle ein reduziertes Wachstum und eine

reduzierte Biomasse (Abb. 3.2.1B und C). Dass Stärkefreimutanten einen Engpass in der Versorgung trotzdem recht gut kompensieren können und keinen dramatischen Phänotypen zeigen, liegt an der Bereitstellung von Kohlenstoffquellen aus Zuckern und organischen Säuren (Abb. 3.2.2, Abb. 3.2.3 und Abb. 3.2.4) (Stitt et al., 2007; Gibon et al., 2009). Alle Ergebnisse der Überexpressionslinien mit Col-0-Hintergrund (MEM2, MEM4 und MEM5) belegen, dass diese Linien – je geringer die Lichtintensität im KT ist – dem Kohlenstoffmangel mit einer erhöhten Stärke-Akkumulation entgegenwirken (Abb. 3.1.4 und Abb. 3.2.2). Da die MEM-Überexpressionslinien mit stärkefreiem Hintergrund in einer längeren Nachtperiode weder auf Stärke noch auf Malat und Fumarat als Energiequelle zurückgreifen können, zeigen diese Pflanzen ein extrem reduziertes Rosettenwachstum und reduzierte Biomasse (Abb. 3.2.1A und Abb. 3.2.4).

Die Bestimmung des RQ untermauert die Annahme, das Malat und Fumarat am Ende der Nacht als Substrate der Respiration genutzt werden, wenn der Gehalt von Kohlenhydraten limitiert ist. Können keine organischen Säuren als Brennstoff genutzt werden, so wie das in den MEM-Überexpressionslinien der Fall ist, werden Fettsäuren und Proteine für die Respiration abgebaut (Tab. 3.2.2). Die Ergebnisse der stärkefreien MEM-Linien (adg/MEM, pgm/MEM und sft/MEM) belegen, dass diese Veränderungen am Ende der Nacht die Ausbildung eines blass-grünen Phänotypes und einer drastisch reduzierten Biomasse auslösen.

4.2 Die Funktion von NADP-ME2 in der Pathogenantwort von *A. thaliana*

NADP-ME2 wird konstitutiv exprimiert und ist verantwortlich für den Hauptanteil an detektierbarer NADP-ME-Aktivität in *A. thaliana* (Gerrard Wheeler et al., 2005; Gerrard Wheeler et al., 2008; Maurino et al., 2009). Für die Aufklärung einer spezifischen Funktion in *A. thaliana* fehlten bislang Anhaltspunkte, da Funktionsverlustlinien von NADP-ME2 keinen morphologischen Phänotypen zeigten (Gerrard Wheeler et al., 2005; Gerrard Wheeler et al., 2008; Maurino et al., 2009). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit gelang es nun erstmalig, dem NADP-ME2-Enzym eine Rolle während der Pathogenabwehr nachzuweisen. Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass NADP-ME durch eine Vielzahl abiotischer Stressfaktoren, Elicitor-Einwirkung und Pflanzenpathogen-Interaktionen induziert werden kann (Walter et al., 1988; Schaaf et al., 1995; Casati et al., 1997; Casati et al., 1999; Maurino et al., 2001; Liu et al., 2007; Parker et al., 2009). Und erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die NADP-ME-Induktion in *Brachypodium distachyon*, das resistent gegenüber Pilzinfektionen ist, wesentlich schneller erfolgt als in empfindlichen Pflanzen (Parker et al., 2009). Daraus lässt sich folgern, dass die NADP-ME-Induktion und die ROS-Produktion während der frühen Phase der Infektion koinzidieren (Parker et al., 2009).

In *A. thaliana* induziert hrpZ die Aktivierung einer 48 KD großen Salicylsäure-reaktiven MAPK und somit eine Pathogenantwort in Form von ROS (Preston et al., 1998; Dong et al., 1999). Flg22 wird von *A. thaliana* mittels einer Leucin-reichen-Repeat[LRR]-Rezeptor-Gleichen-Kinase FLS2 (Flagellin-Sensitive 2) erkannt (Chinchilla et al., 2006). An der durch flg22 aktivierten Signalkaskade der Pathogenantwort sind mehrere Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) beteiligt. Es scheint jedoch, dass die durch flg22 induzierte Resistenz unabhängig von

Salicylsäure-, Jasmonatsäure- und Ethylensignal stattfindet (Gomez-Gomez und Boller, 2002). Neuere Studien belegen, dass neben FLS2 auch BAK1, eine weitere LRR-Rezeptor-Gleichen-Kinase, welche strukturell ähnlich zu FLS2 ist, in die Signalkaskade der flg22 induzierten Pathogenantwort involviert ist. Pflanzen mit einer BAK1-Mutation zeigen eine veränderte flg22-induzierte Antwort und sind sensitiv für Brassinolide, was darauf schließen lässt, dass BAK1 als positiver Regulator in der PAMP-Signalgebung agiert und in das Brassinosteroid-Signaling involviert ist (Chinchilla et al., 2007). Interessanterweise belegt eine Proteomics-Studie, dass NADP-ME2 durch Brassinosteroid-Behandlung in *A. thaliana* induziert werden kann (Deng et al., 2007) und in dieser Arbeit durchgeführte Analysen mit der ATTED-II-Datenbank (Obayashi et al., 2009) zeigen, dass NADP-ME2 zusammen mit BAK1 exprimiert wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass NADP-ME2 vielleicht eine funktionale Rolle in der PAMP-Signalgebung ausüben könnte.

Im Gegensatz zur basalen Abwehr nach *C. higginsianum*-Infektion bleiben die Akkumulation der freien SA und die Induktion der PR-Gene in wt und *nadp-me2* weitgehend gleich. Die späte Phase der Pathogenabwehr in der Wirtspflanze wird also nicht durch ein inaktives NADP-ME2 beeinträchtigt. Die Ergebnisse legen nahe, dass NADP-ME2 eine Funktion in der PAMP-getriggerten Immunantwort besitzt, jedoch kein essenzieller Bestandteil der Pathogenabwehr ist. Dennoch wurde in *A. thaliana*, die kein funktionelles NADP-ME2 besitzt, eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit *C. higginsianum* beobachtet. Außerdem war in diesen Pflanzen während der frühen Phase der Infektion die Kalloseproduktion retardiert. Dies kann ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit gegen pathogene Pilze oder Bakterien zur Folge haben, da Kallose von Pflanzen als physiologische Barriere gegen Pathogene genutzt wird, um die Invasion zu verlangsamen. Der Bedarf an NADPH dürfte in infizierten Zellen wesentlich höher sein, da NADPH für anabolische Prozesse wie etwa die

Biosynthese von Lipiden, der Abbau von Proteinen und die Biosynthese von Pflanzenverteidigungssubstanzen wie das Phytoalexin oder während der Ablagerung von Lignin benötigt wird (Casati et al., 1999). NADP-ME2 könnte bei dieser erhöhten Nachfrage an reduktiver Energie eine wesentliche Rolle in der Bereitstellung spielen.

Ein weiterer Bedarf an NADPH entsteht in der frühen Phase des Pathogenbefalls, während ROS von den Pflanzen produziert wird, um das einfallende Bakterium oder den Pilz abzuwehren und zu töten (Torres et al., 2006). Mehrere Studien zeigen, dass biotischer und abiotischer Stress mit einer Radikalproduktion, die von einer NADPH-Oxidase (NOX) katalysiert wird, einhergeht (Cazale' et al., 1998; Hae et al., 1998). Das pflanzliche NOX-Homolog RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homolog) ist außerdem in die durch Pathogene verursachte ROS-Produktion involviert (Torres et al., 2002; Sagi und Fluhr, 2006). Die Radikalproduktion durch RBOH braucht eine adäquate Versorgung mit Reduktionsäquivalenten. Da RBOH-NADPH spezifisch ist und kein NADH nutzt, findet ein stetiger Anstieg der NADPH-Synthese während der Pathogeninfektion statt (Harding et al., 1997; Van Gestelen et al., 1997). Es wird postuliert, dass ein Teil der NADPH-Synthese für die ROS-Bildung aus der Reduktion von NADP⁺ durch eine NAD-Kinase oder direkt durch eine NADH-Kinase gebildet wird (Sagi und Fluhr, 2006). Zytoplasmatisches NADPH wird offenbar durch mehrere Enzyme produziert, darunter die Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase, die Proline-Dehydrogenase, die Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase und die zytoplasmatische NADP-Isocitrat-Dehydrogenase (Noctor et al., 2006; Cecchini et al., 2010). Die Vermutung liegt nahe, dass neben diesen Enzymen auch NADP-ME eine wesentliche Rolle bei der Versorgung der NADPH-Oxidase mit NADPH für die Produktion von H₂O₂ und Superoxide spielen

könnte (Parker et al., 2009). Da das NADP-ME2 für das ROS-Signal nicht essenziell ist, die Signalgebung aber zu beschleunigen scheint, liegt die Vermutung nahe, dass weitere NADPH-Quellen, möglicherweise in Form von NAD(H)-Kinasen, involviert sind. Dennoch bestätigen die Resultate von Parker et al., 2009, die Ergebnisse dieser Arbeit, die deutlich zeigen, dass die zytosolische NADP-ME2 an der ROS Produktion während der basalen Pathogenabwehr von *A. thaliana* beteiligt ist.

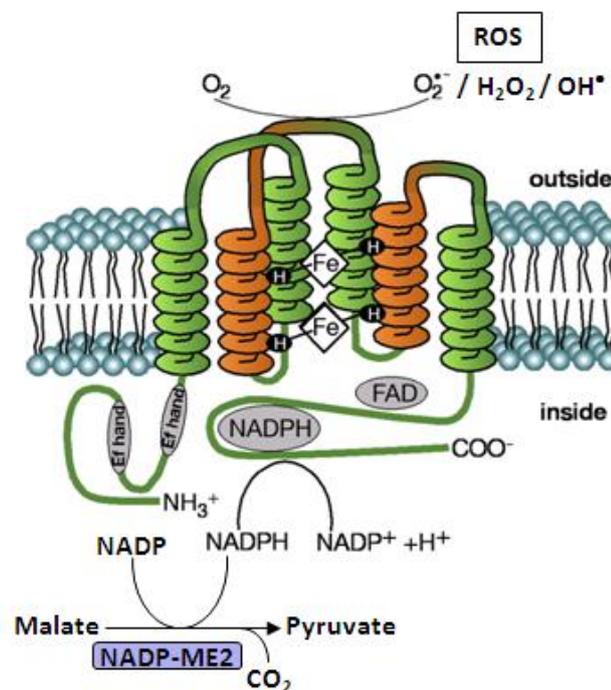


Abbildung 4.2.1: Modifiziertes Schema der vorhergesagten RBOH-Struktur in der Plasmamembran zeigt die Synthese von Radikalen mittels NADPH. Die NADPH-Versorgung wird hierbei durch NADP-ME2 unter Verbrauch von Malat reguliert. Modifiziert von (Sagi und Fluhr, 2006; Parker et al., 2009)

4.3 Die Funktion von NADP-ME3 bei der Bildung von Pollen-Tetraden

Während der Pollenentwicklung unterläuft die Pollenmutterzelle (PMC) meiotische Teilungen, bei der vier Zellen entstehen (Abb. 4.3.1). Diese Tetrade ist von einer dicken Callosewand (Sekundärwand) umgeben (Bedinger, 1992; Owen und

Makaroff, 1995; Brett und Waldron, 1996; McCormick, 2004; Ma, 2005). Die PMC ist ihrerseits von einer primären Zellwand aus Zellulose, Hemizellulose und Pektin umgeben (Carpita und Gibeaut, 1993; Brett und Waldron, 1996). Bei der Entwicklung von Pollen-Monaden werden sowohl Primärwand als auch Sekundärwand nach Bildung der Tetradenzellen von den Tapetumzellen ausgehend abgebaut und die Mikrosporen dadurch getrennt, während in den Mikrosporen aus Primexine und Intine eine Pollenwand entsteht (McCormick, 2004). In der Entwicklung natürlich vorkommender Tetraden wird zwar die Primärwand, nicht aber die Sekundärwand abgebaut, sodass die vier fertilen und lebensfähigen Mikrosporen zusammen verbleiben (McCormick, 2004; Copenhaver, 2005). So häufig Pollen-Tetraden in der Natur verbreitet sind, so selten sind Mutanten mit einem Pollen-Tetraden-Phänotypen zu finden. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen *nadp-me3.2*-Pollen-Tetraden sind in *Arabidopsis* nur drei weitere Mutanten bekannt, die Tetraden besitzen. In den Quartettmutanten wird die primäre Zellwand der PMC nur teilweise abgebaut und es entwickelt sich eine durchgehende Exine um die Pollen-Tetraden, die eine Trennung verhindert (Abb. 4.3.1) (Francis et al., 2006). Ob dies auch in den *nadp-me3.2*-Pollen der Fall ist, bleibt zu klären. Der Phänotyp könnte ebenfalls durch einen unvollständigen Abbau der Sekundärwand bedingt sein, wofür die beobachteten unverdaulichen Kallose-„Patches“ um die Pollen von *nadp-me3.2* und *nadp-me3.3* sprechen würde. NADP-ME ist dafür bekannt, pH-regulatorische Funktion zu besitzen (Martinoia und Rentsch, 1994). Interessanterweise sind sowohl die Kallase, die für den Abbau der Sekundärwand verantwortlich ist (Scott et al., 1991) als auch die QRTs pH-reguliert (Francis et al., 2006). NADP-ME3 könnte eine mögliche Rolle im Abbau der primären oder sekundären PCM-Wand spielen und durch die Steuerung des pH-Wertes an der Regulation der verantwortlichen Enzyme beteiligt sein.

Im Pflanzenreich sind Pollen-Tetraden nicht ungewöhnlich und durchaus keine Seltenheit. In der Literatur sind bisher 52 Familien mit 581 Spezies verzeichnet, die Pollen-Tetraden produzieren. Erstaunlicherweise existieren eine Reihe von Spezies, von denen eine Pollen-Tetraden und die genetisch eng verwandte Schwesterspezies Pollen-Monaden produziert (Copenhaver, 2005). Über den Dimorphismus in dicht verwandten Spezies und die dafür verantwortlichen Gene ist bis heute wenig bekannt. Jedoch ist in diesem Zusammenhang möglicherweise die Beobachtung zu sehen, dass *nadp-me3.2* Pollen-Tetraden und *nadp-me3.3* Pollen-Monaden besitzen. Der Grund dafür könnten die unterschiedlichen Ökotypen sein, die den beiden Mutantenlinien zugrunde liegen (*nadp-me3.2*, Col-0; *nadp-me3.3*, Wsj.). Da offensichtlich kleinste genetische und/oder metabolische Abweichungen in eng verwandten, phylogenetischen Schwestergruppen über das Entstehen von Tetraden oder Monaden entscheiden, könnte dies auch durch genetische Variation in den unterschiedlichen Ökotypen der Fall sein.

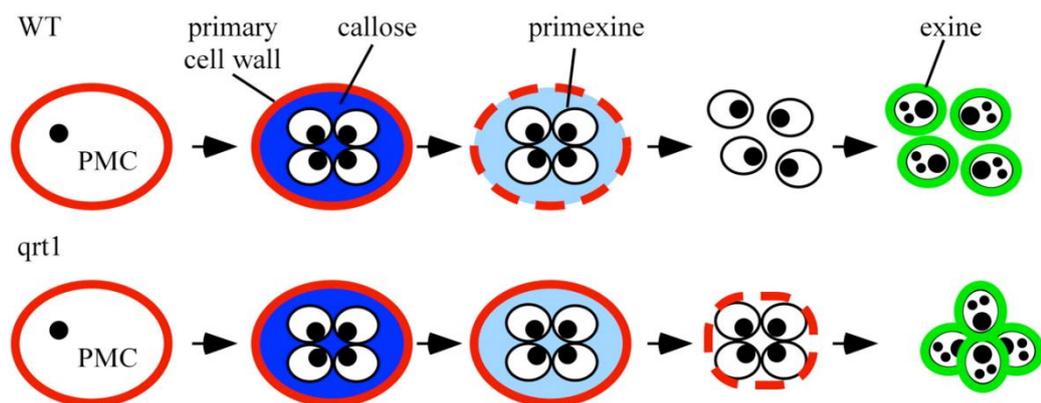


Abbildung 4.3.1: *Arabidopsis*-Pollen-Entwicklung. In der *wt*-Pollen-Entwicklung teilt sich die PMC meiotisch und bildet vier Mikrosporen, die von einer sekundären Zellwand aus Kallose umgeben sind. Die PMC-Zellwand (Primärwand) und die Sekundärwand werden degradiert und der unreife Pollen wird in die Sammenkammern entlassen. Von den Tapetumzellen aus wird die Exine gebildet. In der *qrt1*-Pollen-Entwicklung wird die Primärwand der PMC nicht vollständig abgebaut. Die vier Pollen bleiben zusammen, während die Exine um sie herum gebildet wird. Es entstehen fertile, lebensfähige Pollen-Tetraden.

4.4 Schlussfolgerung

1- Unsere Daten zeigen, dass obgleich MEm-Pflanzen sowohl unter KT, als auch unter LT-Bedingungen einige wesentliche metabolische Unterschiede zu wt-Pflanzen aufweisen, sie dennoch nur unter KT-Bedingungen einen phänotypischen Unterschied zu wt zeigen. Die Tatsache, dass wt-Pflanzen am Ende der Nacht organische Säuren als bevorzugtes Substrat der Respiration und MEm-Pflanzen stattdessen Fettsäuren und Proteine nutzen, führt uns zu der Annahme, dass der KT-MEm-Phänotyp durch die lange Dunkelphase in Verbindung mit dem extrem geringen Malat- und Fumarat-Gehalt dieser Pflanzen verursacht wurde. Die Vermutung liegt nahe, dass der geringe Gehalt dieser Dicarboxylsäuren in den MEm-Linien nicht durch die Kohlenhydratreserven aufgefangen werden kann und dadurch der normale Metabolismus nach Abbau der anderen Kohlenstoffquellen nicht mehr unterstützt werden kann (Abb. 4.4.1). Dieser Kohlenstoff-Mangel-Phänotyp der KT-Transformanten fundiert die vermutete physiologische Rolle von Malat und Fumarat als essenzielle, transiente Kohlenstoffspeicher in C3-Pflanzen wie *A. thaliana*. Wir postulieren, dass das niedrige Level von organischen Säuren, das einem Kohlenhydrat-Mangel am Ende der Nacht folgt, als initiales Signal dient und eine Kaskade von Abläufen verursacht, die letztlich zur veränderten Substratnutzung in der Respiration und im chloroplastidären Metabolismus in den MEm-Pflanzen führt (Abb. 4.4.1).

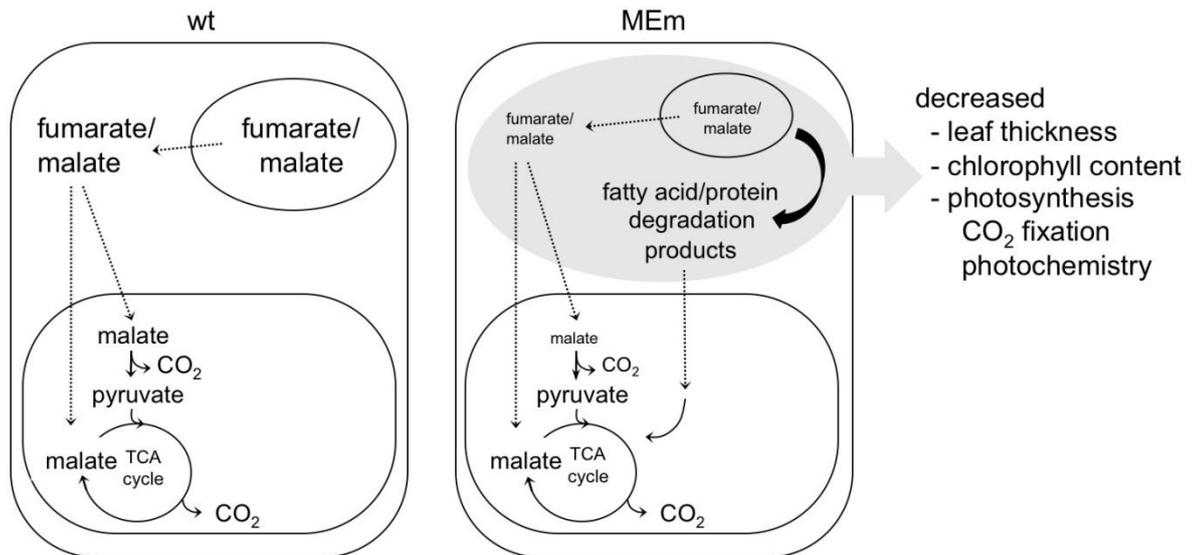


Abbildung 4.4.1: Schematische Darstellung der Veränderungen in MEM-Pflanzen unter KT-Bedingungen. Am Ende einer langen Nacht benutzt der wt organische Säuren an Stelle von Stärke um die Respiration anzutreiben. Das niedrige Level von Malat und Fumarat in den MEM-Pflanzen, das einem Kohlenhydrat-Mangel (Dargestellt durch grauen Pfeil) am Ende der Nacht folgt, könnte als initiales Signal dienen (dicker, schwarzer Pfeil) und eine Kaskade von Abläufen verursachen, die zur veränderten Substratnutzung in der Respiration führen und letztlich auch die morphologischen, biochemischen und physiologischen Veränderungen in den MEM-Pflanzen bewirken. Gestrichelte Pfeile stellen Transportprozesse dar.

2- Durch die Ergebnisse dieser Arbeit gelang es nun erstmalig dem NADP-ME2-Enzym eine Rolle während der Pathogenabwehr nachzuweisen. Obwohl der Mechanismus nicht im Detail geklärt ist, spricht vieles dafür, dass die zytosolische NADP-ME2 an der ROS Produktion während der basalen Pathogenabwehr von *A. thaliana* beteiligt ist.

3- NADP-ME3 könnte eine mögliche Rolle im Abbau der primären oder sekundären PCM-Wand während Pollen Entwicklung. Jedoch sind hierzu noch weiterführende Untersuchungen notwendig.

5 Literaturverzeichnis

- Abbasi A-R, Saur A, Hennig P, Tschiersch H, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald UWE, Voll LM** (2009) Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. *Plant, Cell & Environment* **32**: 144-157
- Allen JF, Forsberg J** (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science* **6**: 317-326
- Andersen KS, Bain JM, Bishop DG, Smillie RM** (1972) Photosystem II Activity in Agranal Bundle Sheath Chloroplasts from *Zea mays*. *Plant Physiology* **49**: 461-466
- Anderson J, Chow W, De Las Rivas J** (2008) Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma. *Photosynthesis Research* **98**: 575-587
- Anderson J, Chow W, Goodchild D** (1988) Thylakoid Membrane Organisation in Sun/Shade Acclimation. *Functional Plant Biology* **15**: 11-26
- Anderson JM** (1986) Photoregulation of the Composition, Function, and Structure of Thylakoid Membranes. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 93-136
- Anderson JM** (1999) Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Functional Plant Biology* **26**: 625-639
- Anderson JM, Andersson B** (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences* **13**: 351-355
- Andersson B, Anderson JM** (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **593**: 427-440
- Araujo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. *Phytochemistry* **72**: 838-843
- Bechtold, N, Ellis, J, Pelletier, G** (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, Vol 316. Elsevier, Paris, France
- Becker B, Holtgreffe S, Jung S, Wunrau C, Kandlbinder A, Baier M, Dietz K-J, Backhausen J, Scheibe R** (2006) Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) plants under long- and short-day conditions. *Planta* **224**: 380-393
- Bedinger P** (1992) The Remarkable Biology of Pollen. *The Plant Cell Online* **4**: 879-887
- Beevers H** (1961) *Respiratory metabolism in plants* New York : Harper & Row
- Bergmeyer HU** (1962) *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim
- Boardman NK** (1977) Comparative Photosynthesis of Sun and Shade Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 355-377
- Bolwell GP** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 287-294

- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1367-1376
- Brett CT, Waldron K** (1996) *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Chapman & Hall, London
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3**: 1-30
- Casati P, Drincovich MF, Edwards GE, Andreo CS** (1999) Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynthesis Research* **61**: 99-105
- Casati P, Spampinato CP, Andreo CS** (1997) Characteristics and Physiological Function of NADP-Malic Enzyme from Wheat. *Plant and Cell Physiology* **38**: 928-934
- Caspar T, Huber SC, Somerville C** (1985) Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucosyltransferase Activity. *Plant Physiology* **79**: 11-17
- Cazale´ A-C, Rouet-Mayer M-A, Barbier-Brygoo Hln, Mathieu Y, Lauriere C** (1998) Oxidative Burst and Hypoosmotic Stress in Tobacco Cell Suspensions. *Plant Physiology* **116**: 659-669
- Cecchini NM, Monteoliva MI, Alvarez ME** (2010) Proline Dehydrogenase Contributes to Pathogen Defense in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**: 1947-1959
- Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo ALF, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhäuser M-C, Michalska J, Rohrmann J, Geigenberger P, Oliver SN, Stitt M, Carrari F, Rose JKC, Fernie AR** (2011) Malate Plays a Crucial Role in Starch Metabolism, Ripening, and Soluble Solid Content of Tomato Fruit and Affects Postharvest Softening. *The Plant Cell Online* **23**: 162-184
- Chang K, Roberts JKM** (1991) Cytoplasmic malate levels in maize root tips during K⁺ ion uptake determined by ¹³C-NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1092**: 29-34
- Chi W** (2006) Enhancement of NADP-malic enzyme in transgenic rice induced the accumulation of reactive oxygen species. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 325-331
- Chia DW, Yoder TJ, Reiter W-D, Gibson SI** (2000) Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. *Planta* **211**: 743-751
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G** (2006) The *Arabidopsis* Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *The Plant Cell Online* **18**: 465-476
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500
- Copenhaver GP** (2005) A Compendium of Plant Species Producing Pollen Tetrads. *Journal of the North Carolina Academy of Science* **121**: 17-35
- Deng Z, Zhang X, Tang W, Osés-Prieto JA, Suzuki N, Gendron JM, Chen H, Guan S, Chalkley RJ, Peterman TK, Burlingame AL, Wang Z-Y** (2007) A Proteomics Study of Brassinosteroid Response in *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 2058-2071

- Detarsio E, Maurino V, Alvarez C, Müller G, Andreo C, Drincovich M** (2008) Maize cytosolic NADP-malic enzyme (ZmCytNADP-ME): a phylogenetically distant isoform specifically expressed in embryo and emerging roots. *Plant Molecular Biology* **68**: 355-367
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV** (1999) Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *The Plant Journal* **20**: 207-215
- Drincovich MF, Casati P, Andreo CS** (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* **490**: 1-6
- Durrant WE, Dong X** (2004) Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209
- Elgass, Kirstin, Zell, Martina, Maurino, Veronica G, Schleifenbaum, Frank** (2011) Determination of the PSI/PSII ratio in living plant cells at room temperature by spectrally resolved fluorescence spectroscopy. *Proc. Spie* **12**: 7902, 79021R
- Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE** (2003) The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 11122-11126
- Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Zanon MI, Andreo CS, Fernie AR, Drincovich MF, Flugge U-I, Maurino VG** (2007) Alteration of Organic Acid Metabolism in Arabidopsis Overexpressing the Maize C4 NADP-Malic Enzyme Causes Accelerated Senescence during Extended Darkness. *Plant Physiology* **145**: 640-652
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* **18**: 265-276
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ** (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 254-261
- Fernie AR, Martinoia E** (2009) Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry* **70**: 828-832
- Figueroa P, León G, Elorza A, Holuigue L, Jordana X** (2001) Three different genes encode the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **46**: 241-250
- Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP** (2006) Separation of Arabidopsis Pollen Tetrads Is Regulated by QUARTET1, a Pectin Methyltransferase Gene. *Plant Physiology* **142**: 1004-1013
- Fu Y, Ballicora MA, Leykam JF, Preiss J** (1998) Mechanism of Reductive Activation of Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 25045-25052
- Gerhardt R, Stitt M, Heldt HW** (1987) Subcellular Metabolite Levels in Spinach Leaves : Regulation of Sucrose Synthesis during Diurnal Alterations in Photosynthetic Partitioning. *Plant Physiology* **83**: 399-407
- Gerrard Wheeler M, Arias C, Tronconi M, Maurino V, Andreo C, Drincovich M** (2008) Arabidopsis thaliana NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Molecular Biology* **67**: 231-242

- Gerrard Wheeler MC, Arias CL, Maurino VG, Andreo CS, Drincovich MF** (2009) Identification of domains involved in the allosteric regulation of cytosolic *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzymes. *FEBS Journal* **276**: 5665-5677
- Gerrard Wheeler MC, Tronconi MA, Drincovich MF, Andreo CS, Flügge U-I, Maurino VnG** (2005) A Comprehensive Analysis of the NADP-Malic Enzyme Gene Family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**: 39-51
- Gibon Y, Bläsing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JHM, Fisahn J, Höhne M, Günther M, Stitt M** (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant Journal* **39**: 847-862
- Gibon Y, Pyl E-T, Sulpice R, Lunn JE, Höhne M, Günther M, Stitt M** (2009) Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell & Environment* **32**: 859-874
- Gomez-Gomez L, Boller T** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* **7**: 251-256
- Grover SD, Canellas PF, Wedding RT** (1981) Purification of NAD malic enzyme from potato and investigation of some physical and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **209**: 396-407
- Hae J, Park, Miura Y, Kawakita K, Yoshioka H, Doke N** (1998) Physiological Mechanisms of a Sub-Systemic Oxidative Burst Triggered by Elicitor-Induced Local Oxidative Burst in Potato Tuber Slices. *Plant and Cell Physiology* **39**: 1218-1225
- Hägerhäll C** (1997) Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1320**: 107-141
- Harding SA, Oh S-H, Roberts DM** (1997) Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO Journal* **16**: 1137-1144
- Hausler RE, Geimer S, Kunz HH, Schmitz J, Dormann P, Bell K, Hetfeld S, Guballa A, Flugge 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**: 515-533
- He L, Hannon G** (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* **5**: 522-531
- Heazlewood JL, Millar AH** (2005) AMPDB: the *Arabidopsis* Mitochondrial Protein Database. *Nucleic Acids Research* **33**: D605-D610
- Hebbelmann I, Selinski J, Wehmeyer C, Goss T, Voss I, Mulo P, Kangasjärvi S, Aro E-M, Oelze M-L, Dietz K-J, Nunes-Nesi A, Do PT, Fernie AR, Talla SK, Raghavendra AS, Linke V, Scheibe R** (2012) Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1445-1459
- Hedrich R, Marten I, Lohse G, Dietrich P, Winter H, Lohaus G, Heldt H-W** (1994) Malate-sensitive anion channels enable guard cells to sense changes in the ambient CO₂ concentration. *The Plant Journal* **6**: 741-748

- Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P** (2003) ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of Arabidopsis and Other Plant Species. *Plant Physiology* **133**: 838-849
- Hoekenga OA, Maron LG, Pieros MA, Canado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV** (2006) AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 9738-9743
- Honda H, Akagi H, Shimada H** (2000) An isozyme of the NADP-malic enzyme of a CAM plant, *Aloe arborescens*, with variation on conservative amino acid residues. *Gene* **243**: 85-92
- Honda H, Shimada H, Akagi H** (1997) Isolation of cDNA for an NADP-malic Enzyme from *Aloe arborescens*. *DNA Research* **4**: 397-400
- Horst RJ, Zeh C, Saur A, Sonnewald S, Sonnewald U, Voll LM** (2012) The *Ustilago maydis* Nit2 Homolog Regulates Nitrogen Utilization and Is Required for Efficient Induction of Filamentous Growth. *Eukaryotic Cell* **11**: 368-380
- Hugly S, Kunst L, Browse J, Somerville C** (1989) Enhanced Thermal Tolerance of Photosynthesis and Altered Chloroplast Ultrastructure in a Mutant of Arabidopsis Deficient in Lipid Desaturation. *Plant Physiology* **90**: 1134-1142
- Hurth MA, Suh SJ, Kretzschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, Martinoia E, Neuhaus HE** (2005) Impaired pH Homeostasis in Arabidopsis Lacking the Vacuolar Dicarboxylate Transporter and Analysis of Carboxylic Acid Transport across the Tonoplast. *Plant Physiology* **137**: 901-910
- Jiao J-a, Chollet R** (1991) Posttranslational Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C4 and Crassulacean Acid Metabolism Plants. *Plant Physiology* **95**: 981-985
- Jin X, Ballicora MA, Preiss J, Geiger JH** (2005) Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *EMBO J* **24**: 694-704
- Klee, Harry** (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors, Vol 5. Elsevier, Kidlington, ROYAUME-UNI
- Kofler H, Häusler RE, Schulz B, Gröner F, Flügge UI, Weber A** (2000) Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis* and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Molecular and General Genetics MGG* **263**: 978-986
- Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E** (2007) The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *The Plant Journal* **52**: 1169-1180
- Krause GH, Weis E** (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 313-349
- Kunz HH, Häusler RE, Fettke J, Herbst K, Niewiadomski P, Gierth M, Bell K, Steup M, Flügge UI, 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**: 115-128
- Lance C, Rustin P** (1984) The central role of malate in plant metabolism, Vol 22. Gauthier-Villars, Paris, France

- Lara MV, Drincovich MF, Müller GL, Maurino VG, Andreo CS** (2005) NADP-malic Enzyme and Hsp70: Co-purification of Both Proteins and Modification of NADP-malic Enzyme Properties by Association with Hsp70. *Plant and Cell Physiology* **46**: 997-1006
- Lee M, Choi Y, Burla B, Kim Y-Y, Jeon B, Maeshima M, Yoo J-Y, Martinoia E, Lee Y** (2008) The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat Cell Biol* **10**: 1217-1223
- Lichtenthaler H, Buschmann C, Döll M, Fietz HJ, Bach T, Kozel U, Meier D, Rahmsdorf U** (1981) Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research* **2**: 115-141
- Liu J, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV** (2009) Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *The Plant Journal* **57**: 389-399
- Liu S, Cheng Y, Zhang X, Guan Q, Nishiuchi S, Hase K, Takano T** (2007) Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice *Oryza sativa* is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology* **64**: 49-58
- Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF** (1995) Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* **8**: 457-463
- Lowry OH, Passonneau JV, Rock MK** (1961) The stability of pyridine nucleotides. *The Journal of biological chemistry* **236**: 2756-2759
- Lowry OH, Passonneau JV, Schulz DW, Rock MK** (1961) The Measurement of Pyridine Nucleotides by Enzymatic Cycling. *Journal of Biological Chemistry* **236**: 2746-2755
- Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD** (2005) Daylength and Circadian Effects on Starch Degradation and Maltose Metabolism. *Plant Physiology* **138**: 2280-2291
- Ma H** (2005) Molecular Genetic Analyses of Microsporogenesis and Microgametogenesis in Flowering Plants. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 393-434
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J** (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual* New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Marshall JS, Stubbs JD, Taylor WC** (1996) Two Genes Encode Highly Similar Chloroplastic NADP-Malic Enzymes in Flaveria (Implications for the Evolution of C₄ Photosynthesis). *Plant Physiology* **111**: 1251-1261
- Martinoia E, Rentsch D** (1994) Malate Compartmentation-Responses to a Complex Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 447-467
- Mathieu Y, Guern J, Pean M, Pasquier C, Beloeil J-C, Lallemand J-Y** (1986) Cytoplasmic pH Regulation in *Acer pseudoplatanus* Cells: II. Possible Mechanisms Involved in pH Regulation during Acid-Load. *Plant Physiology* **82**: 846-852
- Maurino, V G, Drincovich, M F, Andreo, C S** (1996) NADP-Malic Enzyme Isoforms in Maize Leaves. *Biochemistry and molecular biology international* **38**: 12
- Maurino, V G, Drincovich, M F, Casati, P, Andreo, C S, Edwards, G E, Ku, M. S B, Gupta, S K, Franceschi, V R** (1997) NADP-malic enzyme: immunolocalization in different tissues of the C[4] plant maize and the C[3] plant wheat. *Journal of Experimental Botany* **48**: Pp. 799-811

- Maurino VG, Gerrard Wheeler MC, Andreo CS, Drincovich MF** (2009) Redundancy is sometimes seen only by the uncritical: Does Arabidopsis need six malic enzyme isoforms? *Plant Science* **176**: 715-721
- Maurino VG, Saigo M, Andreo CS, Drincovich MF** (2001) Non-photosynthetic 'malic enzyme' from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant Molecular Biology* **45**: 409-420-420
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668
- McCormick S** (2004) Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell Online* **16**: S142-S153
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R** (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal* **63**: 1054-1062
- Meyer S, Scholz-Starke J, De Angeli A, Kovermann P, Burla B, Gambale F, Martinoia E** (2011) Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *The Plant Journal* **67**: 247-257
- Mishina, Tatiana E, Zeier, Jurgen** (2006) The arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant Physiology* **141**: 10
- Nawrath C, Metraux JP** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell Online*
- Noctor G, Queval G, Gakiere B** (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1603-1620
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AMO, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *In,*
- O'Connell R, Herbert C, Sreenivasaprasad S, Khatib M, Esquerre-Tugaye MT, Dumas B** (2004) A novel Arabidopsis-Colletotrichum pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* **17**: 272-282
- Obayashi T, Hayashi S, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K** (2009) ATTED-II provides coexpressed gene networks for Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **37**: D987-D991
- Owen HA, Makaroff CA** (1995) Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* **185**: 7-21
- Palmieri, Luigi, Picault, Nathalie, Arrigoni, Roberto, Besin, Evelyne, Palmieri, Ferdinando, Hodges, Michael** (2010) Molecular identification of three Arabidopsis thaliana mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms : organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization, Vol 410. Portland Press, Colchester, Royaume-Uni
- Parker D, Beckmann M, Zubair H, Enot DP, Caracuel-Rios Z, Overy DP, Snowdon S, Talbot NJ, Draper J** (2009) Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by Magnaporthe grisea. *The Plant Journal* **59**: 723-737

- Pastore D, Di Pede S, Passarella S** (2003) Isolated Durum Wheat and Potato Cell Mitochondria Oxidize Externally Added NADH Mostly via the Malate/Oxaloacetate Shuttle with a Rate That Depends on the Carrier-Mediated Transport. *Plant Physiology* **133**: 2029-2039
- Peterson R, Slovin JP, Chen C** (2010) A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*; Vol 1, No 2 (2010)
- Picault N, Palmieri L, Pisano I, Hodges M, Palmieri F** (2002) Identification of a Novel Transporter for Dicarboxylates and Tricarboxylates in Plant Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 24204-24211
- Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM** (2007) Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in β -oxidation but not in the glyoxylate cycle. *The Plant Journal* **50**: 381-390
- Preiss J** (1988) Biosynthesis of starch and its regulation. *The Biochemistry of Plants* **14**: 181-254
- Preston G, Deng W-L, Huang H-C, Collmer A** (1998) Negative Regulation of hrp Genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *The Journal of Bacteriology* **180**: 4532-4537
- Preuss D, Rhee SY, Davis RW** (1994) Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science* **264**: 1458-1460
- Reiser J, Linka N, Lemke L, Jeblick W, Neuhaus HE** (2004) Molecular Physiological Analysis of the Two Plastidic ATP/ADP Transporters from Arabidopsis. *Plant Physiology* **136**: 3524-3536
- Renné P, Dreßen U, Hebbeker U, Hille D, Flügge U-I, Westhoff P, Weber APM** (2003) The Arabidopsis mutant dct is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. *The Plant Journal* **35**: 316-331
- Rhee SY, Somerville CR** (1998) Tetrad pollen formation in quartet mutants of Arabidopsis thaliana is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *The Plant Journal* **15**: 79-88
- Rieu I, Powers SJ** (2009) Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. *The Plant Cell Online* **21**: 1031-1033
- Rio LA, Puppo A, Bolwell GP, Daudi A** (2009) Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen Interactions. *In* *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*. Springer Berlin Heidelberg, pp 113-133
- Roelfsema MRG, Hedrich R, Geiger D** (2012) Anion channels: master switches of stress responses. *Trends in Plant Science* **17**: 221-229
- Rothermel BA, Nelson T** (1989) Primary structure of the maize NADP-dependent malic enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 19587-19592
- Rudrappa T, Czymbek KJ, Pare´ PW, Bais HP** (2008) Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology* **148**: 1547-1556
- Ryan PR, A Delhaize E** (2010) The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. *Functional Plant Biology* **37**: 275-284
- Sagi M, Fluhr R** (2006) Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *Plant Physiology* **141**: 336-340
- Saigo M, Bologna FP, Maurino VG, Detarsio E, Andreo CS, Drincovich MF** (2004) Maize recombinant non-C₄ NADP-malic enzyme: A novel dimeric malic enzyme with high specific activity. *Plant Molecular Biology* **55**: 97-107-107
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Saitou K, Agata W, Masui Y, Asakura M, Kubota F** (1994) Isoforms of NADP-Malic Enzyme from *Mesembryanthemum crystallinum* L. That are Involved in C3 Photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism. *Plant and Cell Physiology* **35**: 1165-1171
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467
- Schaaf J, Walter MH, Hess D** (1995) Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues). *In*,
- Scheibe R** (1991) Redox-Modulation of Chloroplast Enzymes : A Common Principle for Individual Control. *Plant Physiology* **96**: 1-3
- Scheibe R** (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum* **120**: 21-26
- Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S** (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1481-1489
- Scheible WR, Krapp A, Stitt M** (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell & Environment* **23**: 1155-1167
- Schulze E-D, Beck E, Müller-Hohenstein K** (2002) *Pflanzenökologie*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg; Berlin
- Scott R, Hodge R, Paul W, Draper J** (1991) The molecular biology of anther differentiation. *Plant Science* **80**: 167-191
- Shimada C, Lipka V, O'Connell R, Okuno T, Schulze-Lefert P, Takano Y** (2006) Nonhost Resistance in *Arabidopsis-Colletotrichum* Interactions Acts at the Cell Periphery and Requires Actin Filament Function. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 270-279
- Simon P** (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* **19**: 1439-1440
- Smith L** (2002) A Tutorial on Principal Components Analysis. www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf
- Spencer D, Wildman SG.** (1962) Observations on the structure of grana-containing chloroplasts and a proposed model of chloroplast structure. *Austr. J. biol. Sci.* **15**: 599-610
- Stitt M, Bulpin PV, Ap Rees T** (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **544**: 200-214
- Stitt M, Gibon Y, Lunn JE, Piques M** (2007) Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. *Functional Plant Biology* **34**: 526-549
- Stitt M, Lilley RM, Gerhardt R, Heldt HW, Sidney Fleischer BF** (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *In* *Methods in Enzymology*, Vol Volume 174. Academic Press, pp 518-552

- Sun J, Okita TW, Edwards GE** (1999) Modification of Carbon Partitioning, Photosynthetic Capacity, and O₂ Sensitivity in Arabidopsis Plants with Low ADP-Glucose Pyrophosphorylase Activity. *Plant Physiology* **119**: 267-276
- Taiz L, Zeiger E** (2008) *Plant physiology das Original mit Übersetzungshilfen*. Spektrum, Akad. Verl., Berlin
- Takeuchi Y, Akagi H, Kamasawa N, Osumi M, Honda H** (2000) Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme. *Planta* **211**: 265-274
- Taniguchi M, Taniguchi Y, Kawasaki M, Takeda S, Kato T, Sato S, Tabata S, Miyake H, Sugiyama T** (2002) Identifying and Characterizing Plastidic 2-Oxoglutarate/Malate and Dicarboxylate Transporters in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **43**: 706-717
- Tausta SL, Miller Coyle H, Rothermel B, Stiefel V, Nelson T** (2002) Maize C₄ and non-C₄ NADP-dependent malic enzymes are encoded by distinct genes derived from a plastid-localized ancestor. *Plant Molecular Biology* **50**: 635-652-652
- Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre´ EM, Geigenberger P** (2002) Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply. *The Plant Cell Online* **14**: 2191-2213
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 517-522
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* **141**: 373-378
- Tronconi MA, Fahnenstich H, Gerrard Weehler MC, Andreo CS, Flügge U-I, Drincovich MF, Maurino VG** (2008) Arabidopsis NAD-Malic Enzyme Functions As a Homodimer and Heterodimer and Has a Major Impact on Nocturnal Metabolism. *Plant Physiology* **146**: 1540-1552
- Tschoep H, Gibon Y, Carillo P, Armengaud P, Szecowka M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Koehl K, Stitt M** (2009) Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment* **32**: 300-318
- Van Gestelen P, Asard H, Caubergs RJ** (1997) Solubilization and Separation of a Plant Plasma Membrane NADPH-O₂- Synthase from Other NAD(P)H Oxidoreductases. *Plant Physiology* **115**: 543-550
- Voll L, Häusler RE, Hecker R, Weber A, Weissenböck G, Fiene G, Waffenschmidt S, Flügge U-I** (2003) The phenotype of the Arabidopsis cue1 mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *The Plant Journal* **36**: 301-317
- Walter MH, Grima-Pettenati J, Grand C, Boudet AM, Lamb CJ** (1988) Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**: 5546-5550
- Wang S-M, Chu B, Lue W-L, Yu T-S, Eimert K, Chen J** (1997) adg2-1 represents a missense mutation in the ADPG pyrophosphorylase large subunit gene of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **11**: 1121-1126

- Wang S-m, Lue W-l, Yu T-s, Long J-h, Wang C-n, Eimert K, Chen J** (1998) Characterization of ADG1, an Arabidopsis locus encoding for ADPG pyrophosphorylase small subunit, demonstrates that the presence of the small subunit is required for large subunit stability. *The Plant Journal* **13**: 63-70
- Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A** (2007) Spatio-temporal leaf growth patterns of Arabidopsis thaliana and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytologist* **174**: 752-761
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An Electronic Fluorescent Pictograph Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* **2**: e718
- Winter H, Robinson D, Heldt H** (1994) Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* **193**: 530-535-535
- Wolf DD, Pearce RB, Carlson GE, Lee DR** (1969) Measuring Photosynthesis of Attached Leaves with Air Sealed Chambers. *Crop Sci.* **9**: 24-27
- Zeeman SC, Rees TA** (1999) Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment* **22**: 1445-1453
- Zeeman SC, Smith SM, Smith AM** (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* **401**: 13-28

6 Anhang

Supplementäre Tabelle S1

Complete data set of metabolites obtained by GC-MS over a day-night cycle of whole rosettes from plants grown in SD at 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. The onset of the light period was set to t = 0 h. All values are presented as the mean \pm SE of replicates of 8 plants each. Those that are significantly different from the respective wild-type as determined by the Student's t test ($p < 0.05$) are set into bold type.

Substance	time of day (h) light on 0-8 h	WT		MEEm2		MEEm4		MEEm5	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
3-PGA	1	0,029 \pm 0,004		0,023 \pm 0,006		0,022 \pm 0,006		0,023 \pm 0,006	
	4	0,036 \pm 0,003		0,040 \pm 0,009		0,019 \pm 0,005		0,025 \pm 0,007	
	7,5	0,036 \pm 0,003		0,056 \pm 0,013		0,029 \pm 0,007		0,037 \pm 0,009	
	9	0,041 \pm 0,010		0,050 \pm 0,013		0,041 \pm 0,010		0,047 \pm 0,010	
	12	0,037 \pm 0,005		0,053 \pm 0,014		0,038 \pm 0,009		0,041 \pm 0,009	
	14	0,051 \pm 0,002		0,035 \pm 0,008		0,036 \pm 0,008		0,034 \pm 0,008	
	16	0,056 \pm 0,003		0,040 \pm 0,009		0,041 \pm 0,009		0,028 \pm 0,009	
	18	0,037 \pm 0,006		0,027 \pm 0,007		0,026 \pm 0,007		0,017 \pm 0,004	
	21	0,023 \pm 0,002		0,028 \pm 0,007		0,024 \pm 0,006		0,024 \pm 0,006	
	23,5	0,019 \pm 0,003		0,022 \pm 0,007		0,017 \pm 0,005		0,021 \pm 0,005	
Alanine	1	0,061 \pm 0,018		0,649 \pm 0,193		0,639 \pm 0,148		0,956 \pm 0,214	
	4	0,110 \pm 0,004		0,451 \pm 0,115		3,622 \pm 0,832		1,488 \pm 0,536	
	7,5	0,024 \pm 0,004		0,245 \pm 0,055		1,245 \pm 0,359		1,089 \pm 0,259	
	9	0,101 \pm 0,031		0,633 \pm 0,183		0,877 \pm 0,349		0,420 \pm 0,111	
	12	0,024 \pm 0,004		0,330 \pm 0,086		0,834 \pm 0,195		1,042 \pm 0,237	
	14	0,027 \pm 0,007		0,090 \pm 0,026		0,370 \pm 0,101		0,641 \pm 0,146	
	16	0,116 \pm 0,014		0,729 \pm 0,166		0,882 \pm 0,210		0,698 \pm 0,162	
	18	0,096 \pm 0,021		0,146 \pm 0,043		0,181 \pm 0,063		0,102 \pm 0,025	
	21	0,020 \pm 0,007		0,559 \pm 0,132		0,669 \pm 0,166		1,573 \pm 0,399	
	23,5	0,040 \pm 0,008		0,223 \pm 0,055		0,776 \pm 0,281		1,307 \pm 0,337	
Ascorbate	1	0,247 \pm 0,087		0,409 \pm 0,114		0,068 \pm 0,016		0,070 \pm 0,017	
	4	0,281 \pm 0,048		0,167 \pm 0,052		0,039 \pm 0,009		0,019 \pm 0,006	
	7,5	0,297 \pm 0,017		0,095 \pm 0,028		0,029 \pm 0,008		0,085 \pm 0,025	
	9	0,152 \pm 0,034		0,129 \pm 0,035		0,109 \pm 0,036		0,031 \pm 0,009	
	12	0,114 \pm 0,020		0,043 \pm 0,014		0,085 \pm 0,033		0,070 \pm 0,017	
	14	0,363 \pm 0,072		0,028 \pm 0,006		0,038 \pm 0,009		0,027 \pm 0,008	
	16	0,134 \pm 0,026		0,118 \pm 0,028		0,071 \pm 0,022		0,028 \pm 0,010	
	18	0,022 \pm 0,007		0,021 \pm 0,007		0,027 \pm 0,007		0,011 \pm 0,003	
	21	0,058 \pm 0,014		0,073 \pm 0,018		0,017 \pm 0,006		0,026 \pm 0,006	
	23,5	0,259 \pm 0,064		0,202 \pm 0,050		0,026 \pm 0,008		0,014 \pm 0,004	
Aspartate	1	6,506 \pm 0,390		1,676 \pm 0,492		1,154 \pm 0,269		0,823 \pm 0,225	
	4	5,488 \pm 0,603		3,369 \pm 0,810		1,079 \pm 0,250		1,061 \pm 0,266	
	7,5	4,311 \pm 0,123		1,842 \pm 0,495		0,646 \pm 0,171		0,856 \pm 0,243	
	9	3,946 \pm 0,227		3,568 \pm 0,804		1,712 \pm 0,392		1,147 \pm 0,300	
	12	8,095 \pm 0,515		4,792 \pm 1,230		2,636 \pm 0,612		1,987 \pm 0,520	
	14	6,290 \pm 0,369		3,906 \pm 1,002		2,729 \pm 0,688		2,020 \pm 0,515	
	16	8,347 \pm 0,875		3,328 \pm 0,774		2,174 \pm 0,532		1,528 \pm 0,382	
	18	3,835 \pm 0,445		3,873 \pm 1,040		1,173 \pm 0,355		1,007 \pm 0,254	
	21	4,863 \pm 0,360		2,364 \pm 0,638		2,934 \pm 0,658		0,753 \pm 0,178	
	23,5	6,540 \pm 1,173		2,199 \pm 0,557		0,992 \pm 0,260		0,858 \pm 0,219	
Citrate	1	7,844 \pm 0,619		9,954 \pm 2,766		12,047 \pm 2,902		11,878 \pm 3,188	
	4	6,097 \pm 0,759		7,215 \pm 1,645		10,650 \pm 2,591		9,731 \pm 2,608	
	7,5	7,650 \pm 0,201		6,239 \pm 2,296		8,234 \pm 2,144		11,142 \pm 3,014	
	9	4,327 \pm 0,096		12,203 \pm 2,770		11,858 \pm 2,654		8,462 \pm 2,314	
	12	7,273 \pm 0,506		11,532 \pm 2,959		11,551 \pm 2,988		10,574 \pm 2,744	
	14	5,486 \pm 0,404		10,324 \pm 2,626		10,218 \pm 2,751		9,484 \pm 2,494	
	16	7,192 \pm 1,245		14,334 \pm 3,599		11,068 \pm 3,075		7,863 \pm 2,082	
	18	3,684 \pm 0,110		6,599 \pm 1,924		4,618 \pm 1,409		2,650 \pm 0,715	
	21	4,329 \pm 0,673		8,009 \pm 2,304		8,077 \pm 2,030		6,667 \pm 1,704	
	23,5	10,868 \pm 1,538		10,527 \pm 2,685		8,654 \pm 2,536		8,148 \pm 2,162	
Fructose	1	3,565 \pm 0,132		3,617 \pm 0,829		2,824 \pm 0,635		3,282 \pm 0,749	
	4	3,287 \pm 0,047		2,015 \pm 0,455		2,649 \pm 0,593		2,133 \pm 0,508	
	7,5	5,225 \pm 0,116		1,919 \pm 0,432		2,792 \pm 0,639		4,739 \pm 1,161	
	9	8,900 \pm 0,295		4,392 \pm 0,983		3,063 \pm 0,686		2,894 \pm 0,669	
	12	4,727 \pm 0,210		3,217 \pm 0,806		2,214 \pm 0,515		2,696 \pm 0,605	
	14	6,072 \pm 0,214		6,220 \pm 1,421		2,973 \pm 0,673		2,110 \pm 0,477	
	16	2,140 \pm 0,076		4,230 \pm 0,949		3,090 \pm 0,692		3,192 \pm 0,715	
	18	1,487 \pm 0,224		5,334 \pm 1,261		1,982 \pm 0,457		1,602 \pm 0,364	
	21	3,395 \pm 0,136		1,393 \pm 0,317		3,022 \pm 0,682		2,269 \pm 0,521	
	23,5	5,657 \pm 0,127		2,797 \pm 0,646		2,351 \pm 0,549		1,560 \pm 0,367	
Fumarate	1	37,964 \pm 2,451		11,474 \pm 2,649		2,708 \pm 0,625		2,068 \pm 0,475	
	4	34,036 \pm 1,488		19,686 \pm 4,594		2,675 \pm 0,628		3,235 \pm 0,737	
	7,5	69,789 \pm 1,666		21,083 \pm 4,790		3,599 \pm 0,828		4,779 \pm 1,110	
	9	83,707 \pm 11,396		35,803 \pm 8,052		8,830 \pm 1,992		6,849 \pm 1,626	
	12	50,744 \pm 4,467		36,686 \pm 9,297		5,296 \pm 1,203		4,866 \pm 1,113	
	14	124,976 \pm 4,706		42,315 \pm 9,948		11,848 \pm 2,683		3,959 \pm 0,909	
	16	46,301 \pm 2,156		19,603 \pm 4,420		4,583 \pm 1,052		5,605 \pm 1,255	
	18	27,805 \pm 2,615		36,551 \pm 8,842		2,545 \pm 0,626		4,677 \pm 1,064	
	21	34,851 \pm 2,252		11,619 \pm 2,727		20,087 \pm 4,519		2,104 \pm 0,477	
	23,5	58,050 \pm 9,984		13,283 \pm 3,232		2,082 \pm 0,495		1,519 \pm 0,351	
GABA	1	0,315 \pm 0,017		0,313 \pm 0,073		0,479 \pm 0,128		0,469 \pm 0,107	
	4	0,296 \pm 0,016		0,252 \pm 0,057		0,627 \pm 0,141		0,507 \pm 0,120	
	7,5	0,353 \pm 0,010		0,411 \pm 0,092		0,423 \pm 0,098		0,463 \pm 0,104	
	9	0,288 \pm 0,016		0,325 \pm 0,076		0,363 \pm 0,085		0,387 \pm 0,087	
	12	0,274 \pm 0,022		0,403 \pm 0,101		0,402 \pm 0,094		0,379 \pm 0,086	
	14	0,322 \pm 0,018		0,452 \pm 0,111		0,372 \pm 0,083		0,342 \pm 0,077	
	16	0,325 \pm 0,017		0,455 \pm 0,102		0,399 \pm 0,090		0,353 \pm 0,080	
	18	0,288 \pm 0,037		0,699 \pm 0,173		0,258 \pm 0,062		0,218 \pm 0,058	
	21	0,357 \pm 0,026		0,471 \pm 0,108		0,456 \pm 0,107		0,392 \pm 0,091	
	23,5	0,515 \pm 0,095		0,479 \pm 0,108		0,555 \pm 0,125		0,561 \pm 0,128	
Galactose	1	0,413 \pm 0,015		0,237 \pm 0,054		0,191 \pm 0,044		0,162 \pm 0,037	
	4	0,254 \pm 0,004		0,218 \pm 0,050		0,18			

Glucose	1	13,484	± 1,320	6,264	± 1,433	5,585	± 1,252	6,194	± 1,392
	4	7,767	± 0,147	5,963	± 1,347	4,869	± 1,091	4,887	± 1,215
	7.5	15,069	± 0,291	5,898	± 1,331	7,263	± 1,655	8,779	± 2,091
	9	37,144	± 0,784	12,993	± 2,932	6,376	± 1,441	7,722	± 1,734
	12	21,055	± 1,294	8,127	± 2,039	4,394	± 1,043	5,085	± 1,140
	14	20,727	± 0,435	19,199	± 4,323	5,560	± 1,280	4,917	± 1,119
	16	6,510	± 0,308	16,187	± 3,638	6,023	± 1,358	6,917	± 1,551
	18	4,705	± 0,615	15,575	± 3,712	4,004	± 0,982	5,434	± 1,234
	21	7,773	± 0,217	3,385	± 0,789	6,063	± 1,420	6,126	± 1,378
	23.5	22,174	± 0,602	10,412	± 2,389	7,962	± 1,935	7,085	± 1,663
Glutamate	1	8,360	± 0,272	7,367	± 2,090	10,688	± 2,483	7,960	± 1,876
	4	5,122	± 0,361	6,431	± 1,478	8,104	± 1,857	6,927	± 1,606
	7.5	7,438	± 0,130	8,179	± 1,964	7,788	± 1,925	10,677	± 2,642
	9	5,770	± 0,354	9,158	± 2,056	10,621	± 2,618	9,533	± 2,264
	12	7,617	± 0,310	10,304	± 2,585	9,928	± 2,245	9,082	± 2,171
	14	7,656	± 0,401	8,337	± 2,085	8,078	± 1,878	7,437	± 1,715
	16	6,627	± 0,402	9,282	± 2,104	7,472	± 1,711	6,477	± 1,612
	18	3,297	± 0,225	5,085	± 1,268	4,910	± 1,362	3,557	± 0,861
	21	6,669	± 0,388	6,884	± 1,651	9,238	± 2,075	6,027	± 1,368
	23.5	8,967	± 1,453	9,559	± 2,301	8,369	± 1,982	7,078	± 1,716
Glutamine	1	0,318	± 0,028	0,298	± 0,071	0,335	± 0,076	0,255	± 0,057
	4	0,174	± 0,057	0,249	± 0,064	0,425	± 0,097	0,310	± 0,070
	7.5	0,375	± 0,003	0,006	± 0,096	0,335	± 0,085	0,336	± 0,087
	9	0,434	± 0,069	0,345	± 0,080	0,355	± 0,088	0,362	± 0,083
	12	0,311	± 0,004	0,385	± 0,098	0,304	± 0,070	0,291	± 0,069
	14	0,481	± 0,036	0,450	± 0,129	0,305	± 0,069	0,301	± 0,069
	16	0,336	± 0,026	0,312	± 0,072	0,229	± 0,064	0,346	± 0,079
	18	0,242	± 0,016	0,308	± 0,088	0,224	± 0,053	0,238	± 0,054
	21	0,366	± 0,019	0,324	± 0,073	0,369	± 0,085	0,291	± 0,073
	23.5	0,042	± 0,029	0,144	± 0,052	0,255	± 0,059	0,216	± 0,049
Glycerate	1	0,218	± 0,010	0,294	± 0,068	0,317	± 0,072	0,298	± 0,068
	4	0,304	± 0,009	0,357	± 0,080	0,506	± 0,114	0,482	± 0,116
	7.5	0,379	± 0,004	0,590	± 0,132	0,609	± 0,138	0,635	± 0,142
	9	0,303	± 0,009	0,288	± 0,065	0,337	± 0,076	0,353	± 0,079
	12	0,154	± 0,009	0,183	± 0,046	0,178	± 0,040	0,222	± 0,050
	14	0,170	± 0,009	0,162	± 0,038	0,156	± 0,035	0,137	± 0,031
	16	0,114	± 0,004	0,157	± 0,035	0,146	± 0,033	0,142	± 0,033
	18	0,072	± 0,006	0,132	± 0,031	0,077	± 0,018	0,066	± 0,015
	21	0,143	± 0,008	0,115	± 0,026	0,175	± 0,039	0,137	± 0,031
	23.5	0,156	± 0,023	0,142	± 0,032	0,151	± 0,034	0,121	± 0,028
Isoleucine	1	0,565	± 0,021	0,608	± 0,169	1,970	± 0,448	1,235	± 0,283
	4	0,461	± 0,020	0,540	± 0,122	2,478	± 0,555	1,193	± 0,300
	7.5	0,470	± 0,013	0,436	± 0,110	0,952	± 0,267	0,833	± 0,231
	9	0,645	± 0,007	0,660	± 0,150	0,516	± 0,117	0,591	± 0,134
	12	0,375	± 0,006	0,511	± 0,129	0,476	± 0,109	0,529	± 0,135
	14	0,269	± 0,010	0,490	± 0,111	0,294	± 0,069	0,388	± 0,090
	16	0,273	± 0,010	0,588	± 0,132	0,390	± 0,088	0,465	± 0,108
	18	0,218	± 0,025	0,529	± 0,130	0,240	± 0,058	0,264	± 0,067
	21	0,821	± 0,084	1,119	± 0,251	1,367	± 0,306	1,618	± 0,365
	23.5	0,946	± 0,171	1,040	± 0,236	1,977	± 0,451	1,453	± 0,326
Leucine	1	0,412	± 0,027	0,529	± 0,154	1,835	± 0,420	1,294	± 0,301
	4	0,279	± 0,020	0,493	± 0,112	3,050	± 0,684	1,267	± 0,326
	7.5	0,313	± 0,016	0,416	± 0,106	1,257	± 0,368	1,059	± 0,312
	9	0,591	± 0,014	0,666	± 0,153	0,648	± 0,146	0,716	± 0,163
	12	0,305	± 0,008	0,546	± 0,139	0,511	± 0,116	0,548	± 0,137
	14	0,233	± 0,010	0,364	± 0,082	0,318	± 0,079	0,368	± 0,088
	16	0,200	± 0,011	0,563	± 0,130	0,420	± 0,097	0,391	± 0,091
	18	0,146	± 0,019	0,442	± 0,107	0,242	± 0,056	0,230	± 0,060
	21	0,686	± 0,069	1,163	± 0,261	1,304	± 0,292	1,447	± 0,328
	23.5	0,717	± 0,108	0,873	± 0,200	1,635	± 0,372	1,269	± 0,287
Malate	1	2,520	± 0,123	0,715	± 0,183	0,440	± 0,102	0,351	± 0,094
	4	2,053	± 0,235	1,188	± 0,280	0,526	± 0,124	0,575	± 0,146
	7.5	4,198	± 0,085	1,135	± 0,297	0,567	± 0,139	0,758	± 0,209
	9	3,779	± 0,180	2,636	± 0,594	0,905	± 0,204	0,600	± 0,166
	12	4,389	± 0,230	2,072	± 0,543	0,609	± 0,140	0,516	± 0,133
	14	3,867	± 0,193	2,677	± 0,669	0,885	± 0,217	0,440	± 0,118
	16	2,608	± 0,330	1,558	± 0,370	0,525	± 0,130	0,536	± 0,127
	18	1,069	± 0,127	2,280	± 0,583	0,229	± 0,068	0,258	± 0,061
	21	1,411	± 0,131	0,515	± 0,141	0,951	± 0,214	0,231	± 0,055
	23.5	2,855	± 0,553	0,757	± 0,205	0,282	± 0,083	0,186	± 0,047
Methionine	1	0,055	± 0,003	0,029	± 0,010	0,083	± 0,022	0,075	± 0,019
	4	0,056	± 0,002	0,043	± 0,011	0,089	± 0,021	0,055	± 0,016
	7.5	0,068	± 0,001	0,033	± 0,009	0,034	± 0,011	0,053	± 0,013
	9	0,060	± 0,004	0,060	± 0,016	0,050	± 0,012	0,041	± 0,011
	12	0,044	± 0,007	0,048	± 0,012	0,035	± 0,011	0,053	± 0,013
	14	0,043	± 0,008	0,044	± 0,017	0,024	± 0,009	0,026	± 0,008
	16	0,023	± 0,006	0,052	± 0,012	0,048	± 0,012	0,036	± 0,009
	18	0,015	± 0,003	0,033	± 0,008	0,031	± 0,009	0,017	± 0,005
	21	0,039	± 0,003	0,034	± 0,010	0,060	± 0,014	0,058	± 0,017
	23.5	0,064	± 0,008	0,039	± 0,011	0,061	± 0,015	0,022	± 0,006
Phenylalanine	1	0,843	± 0,025	0,871	± 0,219	1,968	± 0,453	1,359	± 0,312
	4	0,538	± 0,027	0,750	± 0,173	2,691	± 0,604	1,425	± 0,324
	7.5	0,701	± 0,010	0,735	± 0,176	1,341	± 0,318	1,314	± 0,314
	9	0,769	± 0,030	0,929	± 0,209	0,948	± 0,224	0,969	± 0,225
	12	0,647	± 0,016	0,910	± 0,229	0,904	± 0,204	0,935	± 0,220
	14	0,583	± 0,024	0,765	± 0,180	0,675	± 0,154	0,745	± 0,172
	16	0,550	± 0,028	0,983	± 0,221	0,765	± 0,173	0,795	± 0,186
	18	0,307	± 0,060	0,649	± 0,155	0,530	± 0,139	0,429	± 0,116
	21	0,750	± 0,042	1,085	± 0,250	1,372	± 0,308	1,441	± 0,327
	23.5	1,054	± 0,162	1,105	± 0,258	1,800	± 0,412	1,432	± 0,326
Pyruvate	1	0,067	± 0,015	0,610	± 0,137	0,817	± 0,185	0,858	± 0,197
	4	0,147	± 0,001	0,520	± 0,117	2,232	± 0,503	0,905	± 0,215
	7.5	0,096	± 0,003	0,380	± 0,086	1,020	± 0,229	1,199	± 0,269
	9	0,094	± 0,014	0,176	± 0,040	0,308	± 0,070	0,282	± 0,063
	12	0,081	± 0,006	0,200	± 0,050	0,180	± 0,041	0,203	± 0,046
	14	0,066	± 0,019	0,073	± 0,017	0,093	± 0,021	0,107	± 0,024
	16	0,073	± 0,003	0,158	± 0,036	0,136	± 0,031	0,126	± 0,030
	18	0,028	± 0,008	0,051	± 0,012	0,103	± 0,025	0,052	± 0,013
	21	0,039	± 0,010	0,272	± 0,061	0,192	± 0,044	0,185	± 0,042
	23.5	0,022	± 0,006	0,102	± 0,024	0,175	± 0,041	0,202	± 0,046

Serine	1	4,595 ± 0,157	5,826 ± 1,419	11,356 ± 2,607	7,854 ± 1,845
	4	5,114 ± 0,259	4,765 ± 1,086	10,732 ± 2,408	9,530 ± 2,213
	7.5	10,490 ± 0,116	5,978 ± 1,385	8,393 ± 2,328	12,028 ± 2,779
	9	7,893 ± 0,360	10,717 ± 2,403	11,379 ± 2,624	11,331 ± 2,549
	12	6,912 ± 0,216	8,181 ± 2,049	8,896 ± 2,006	8,702 ± 2,189
	14	4,975 ± 0,208	8,906 ± 2,130	6,519 ± 1,525	6,957 ± 1,579
	16	4,506 ± 0,111	9,290 ± 2,081	6,345 ± 1,422	7,537 ± 1,719
	18	2,361 ± 0,143	7,121 ± 1,680	3,810 ± 0,908	3,076 ± 0,789
	21	4,870 ± 0,341	4,676 ± 1,050	7,441 ± 1,665	8,977 ± 2,041
	23.5	6,248 ± 1,008	7,689 ± 1,809	10,174 ± 2,309	7,982 ± 1,796
Shikimate	1	0,247 ± 0,008	0,214 ± 0,050	0,188 ± 0,043	0,187 ± 0,042
	4	0,300 ± 0,006	0,337 ± 0,078	0,245 ± 0,055	0,241 ± 0,057
	7.5	0,327 ± 0,008	0,417 ± 0,093	0,281 ± 0,063	0,314 ± 0,070
	9	0,416 ± 0,008	0,441 ± 0,099	0,399 ± 0,090	0,379 ± 0,086
	12	0,357 ± 0,012	0,386 ± 0,097	0,338 ± 0,076	0,354 ± 0,080
	14	0,417 ± 0,012	0,306 ± 0,071	0,312 ± 0,070	0,325 ± 0,073
	16	0,428 ± 0,009	0,351 ± 0,079	0,327 ± 0,074	0,289 ± 0,065
	18	0,295 ± 0,032	0,245 ± 0,058	0,264 ± 0,062	0,163 ± 0,041
	21	0,195 ± 0,009	0,215 ± 0,049	0,191 ± 0,043	0,175 ± 0,040
	23.5	0,230 ± 0,011	0,186 ± 0,042	0,179 ± 0,041	0,173 ± 0,039
Succinate	1	0,125 ± 0,012	0,118 ± 0,027	0,121 ± 0,028	0,101 ± 0,023
	4	0,077 ± 0,011	0,098 ± 0,023	0,153 ± 0,034	0,159 ± 0,036
	7.5	0,128 ± 0,002	0,098 ± 0,022	0,171 ± 0,040	0,191 ± 0,043
	9	0,312 ± 0,033	0,275 ± 0,062	0,216 ± 0,049	0,271 ± 0,064
	12	0,332 ± 0,022	0,342 ± 0,086	0,148 ± 0,034	0,146 ± 0,033
	14	0,457 ± 0,021	0,307 ± 0,073	0,196 ± 0,044	0,141 ± 0,032
	16	0,272 ± 0,011	0,326 ± 0,073	0,160 ± 0,037	0,170 ± 0,039
	18	0,190 ± 0,012	0,210 ± 0,052	0,091 ± 0,023	0,099 ± 0,023
	21	0,130 ± 0,006	0,086 ± 0,020	0,127 ± 0,029	0,062 ± 0,018
	23.5	0,226 ± 0,039	0,088 ± 0,021	0,075 ± 0,019	0,062 ± 0,014
Sucrose	1	96,611 ± 1,803	96,438 ± 21,926	90,347 ± 20,712	74,042 ± 17,026
	4	68,529 ± 0,944	68,565 ± 15,405	97,574 ± 21,983	78,891 ± 20,173
	7.5	121,349 ± 1,484	99,256 ± 22,335	87,558 ± 19,724	105,977 ± 23,714
	9	126,297 ± 3,307	65,490 ± 14,724	42,158 ± 9,490	37,657 ± 8,426
	12	91,185 ± 1,642	63,557 ± 16,031	42,174 ± 9,761	50,977 ± 11,883
	14	122,179 ± 6,874	112,147 ± 25,309	81,193 ± 20,590	74,220 ± 18,656
	16	81,339 ± 4,033	106,788 ± 23,886	91,078 ± 21,094	72,739 ± 16,418
	18	45,930 ± 6,684	85,906 ± 20,919	50,688 ± 12,233	40,629 ± 10,292
	21	65,843 ± 4,066	50,481 ± 11,469	69,086 ± 15,506	46,203 ± 10,516
	23.5	83,810 ± 3,905	64,123 ± 14,682	49,577 ± 11,251	42,265 ± 9,479
Threonine	1	3,082 ± 0,101	1,353 ± 0,310	1,577 ± 0,360	1,129 ± 0,255
	4	2,988 ± 0,074	1,886 ± 0,428	1,820 ± 0,409	1,197 ± 0,275
	7.5	3,411 ± 0,035	1,710 ± 0,384	0,914 ± 0,220	1,147 ± 0,260
	9	3,750 ± 0,139	2,123 ± 0,477	0,625 ± 0,142	0,615 ± 0,138
	12	3,592 ± 0,143	1,952 ± 0,489	0,683 ± 0,154	0,739 ± 0,172
	14	3,163 ± 0,111	1,893 ± 0,437	0,946 ± 0,213	0,618 ± 0,140
	16	3,686 ± 0,100	1,343 ± 0,301	0,612 ± 0,137	0,717 ± 0,163
	18	2,317 ± 0,209	2,594 ± 0,612	0,402 ± 0,096	0,682 ± 0,155
	21	3,231 ± 0,190	1,740 ± 0,390	2,301 ± 0,515	1,376 ± 0,311
	23.5	3,171 ± 0,456	1,752 ± 0,401	1,710 ± 0,386	1,221 ± 0,275
Valine	1	0,314 ± 0,008	0,607 ± 0,151	1,578 ± 0,358	1,162 ± 0,263
	4	0,244 ± 0,023	0,452 ± 0,102	2,317 ± 0,521	1,100 ± 0,266
	7.5	0,267 ± 0,011	0,446 ± 0,109	1,085 ± 0,288	1,039 ± 0,276
	9	0,372 ± 0,007	0,615 ± 0,138	0,677 ± 0,152	0,708 ± 0,160
	12	0,257 ± 0,001	0,611 ± 0,157	0,650 ± 0,146	0,692 ± 0,170
	14	0,172 ± 0,014	0,466 ± 0,106	0,401 ± 0,094	0,529 ± 0,121
	16	0,191 ± 0,008	0,673 ± 0,151	0,556 ± 0,125	0,604 ± 0,138
	18	0,135 ± 0,016	0,375 ± 0,090	0,372 ± 0,088	0,291 ± 0,074
	21	0,462 ± 0,048	0,968 ± 0,218	1,121 ± 0,252	1,421 ± 0,323
	23.5	0,405 ± 0,068	0,770 ± 0,178	1,679 ± 0,377	1,335 ± 0,300

Supplementäre Tabelle S2

Complete data set of metabolites obtained by GC-MS over a day-night cycle of whole rosettes from plants grown in SD at 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. The onset of the light period was set to $t = 0 \text{ h}$. All values are presented as the mean \pm SE of replicates of 8 plants each. Those that are significantly different from the respective wild-type as determined by the Student's t test ($p < 0.05$) are set into bold type.

Substance	time of day (h) light on 0-8 h	WT		MEEm2		MEEm4		MEEm5	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
3-PGA	1	0,057 \pm 0,004		0,061 \pm 0,014		0,069 \pm 0,016		0,063 \pm 0,014	
	4	0,078 \pm 0,003		0,098 \pm 0,022		0,084 \pm 0,019		0,081 \pm 0,018	
	7.5	0,084 \pm 0,003		0,085 \pm 0,020		0,081 \pm 0,018		0,107 \pm 0,028	
	9	0,099 \pm 0,002		0,112 \pm 0,025		0,098 \pm 0,025		0,101 \pm 0,023	
	12	0,080 \pm 0,005		0,076 \pm 0,017		0,085 \pm 0,020		0,076 \pm 0,017	
	14	0,074 \pm 0,003		0,068 \pm 0,017		0,076 \pm 0,017		0,079 \pm 0,020	
	16	0,064 \pm 0,009		0,059 \pm 0,013		0,082 \pm 0,018		0,076 \pm 0,018	
	18	0,053 \pm 0,003		0,057 \pm 0,013		0,056 \pm 0,013		0,054 \pm 0,012	
	21	0,064 \pm 0,006		0,062 \pm 0,014		0,077 \pm 0,018		0,056 \pm 0,019	
	23.5	0,053 \pm 0,003		0,043 \pm 0,015		0,058 \pm 0,013		0,062 \pm 0,014	
Alanine	1	0,027 \pm 0,009		0,178 \pm 0,063		0,344 \pm 0,122		0,350 \pm 0,356	
	4	0,033 \pm 0,006		0,357 \pm 0,127		0,095 \pm 0,028		0,273 \pm 0,073	
	7.5	0,027 \pm 0,008		0,084 \pm 0,026		0,118 \pm 0,042		0,276 \pm 0,081	
	9	0,015 \pm 0,006		0,091 \pm 0,026		0,408 \pm 0,121		0,409 \pm 0,118	
	12	0,042 \pm 0,000		0,006 \pm 0,002		0,223 \pm 0,079		0,449 \pm 0,105	
	14	0,035 \pm 0,000		0,124 \pm 0,044		0,329 \pm 0,093		0,623 \pm 0,282	
	16	0,025 \pm 0,005		0,097 \pm 0,034		0,499 \pm 0,177		0,931 \pm 0,272	
	18	0,034 \pm 0,000		0,255 \pm 0,065		0,523 \pm 0,185		0,433 \pm 0,137	
	21	0,079 \pm 0,009		0,406 \pm 0,144		0,579 \pm 0,169		0,987 \pm 0,255	
	23.5	0,079 \pm 0,009		0,406 \pm 0,144		0,579 \pm 0,169		0,987 \pm 0,255	
Ascorbate	1	0,534 \pm 0,018		0,683 \pm 0,163		1,215 \pm 0,279		0,754 \pm 0,209	
	4	0,501 \pm 0,101		0,201 \pm 0,055		1,531 \pm 0,382		0,848 \pm 0,236	
	7.5	1,770 \pm 0,106		1,610 \pm 0,446		1,544 \pm 0,394		0,556 \pm 0,160	
	9	0,124 \pm 0,019		0,176 \pm 0,054		0,102 \pm 0,023		0,065 \pm 0,017	
	12	0,571 \pm 0,128		0,603 \pm 0,146		0,171 \pm 0,046		0,042 \pm 0,012	
	14	0,182 \pm 0,067		0,546 \pm 0,146		0,436 \pm 0,125		0,104 \pm 0,027	
	16	0,935 \pm 0,096		0,543 \pm 0,149		0,339 \pm 0,080		0,163 \pm 0,043	
	18	0,901 \pm 0,058		0,393 \pm 0,099		0,185 \pm 0,046		0,485 \pm 0,122	
	21	1,097 \pm 0,169		0,557 \pm 0,170		0,279 \pm 0,083		0,856 \pm 0,214	
	23.5	1,487 \pm 0,224		0,881 \pm 0,208		0,654 \pm 0,162		0,351 \pm 0,099	
Aspartate	1	2,640 \pm 0,507		1,185 \pm 0,345		0,742 \pm 0,186		0,660 \pm 0,178	
	4	3,224 \pm 0,384		2,807 \pm 0,658		1,267 \pm 0,295		1,248 \pm 0,326	
	7.5	2,260 \pm 0,285		2,245 \pm 0,732		1,376 \pm 0,364		2,282 \pm 0,516	
	9	4,442 \pm 0,213		5,743 \pm 1,295		3,630 \pm 0,820		3,532 \pm 0,926	
	12	5,132 \pm 0,705		3,994 \pm 0,901		4,172 \pm 1,123		3,002 \pm 0,724	
	14	4,201 \pm 0,603		3,365 \pm 0,763		2,559 \pm 0,610		3,808 \pm 1,017	
	16	6,803 \pm 0,258		2,368 \pm 0,549		2,871 \pm 0,692		2,895 \pm 0,733	
	18	4,873 \pm 0,110		1,809 \pm 0,440		1,855 \pm 0,488		1,617 \pm 0,369	
	21	7,500 \pm 0,427		2,718 \pm 0,637		1,846 \pm 0,416		2,283 \pm 0,539	
	23.5	6,018 \pm 1,136		2,448 \pm 0,727		1,164 \pm 0,416		1,482 \pm 0,355	
Citrate	1	7,257 \pm 0,567		8,618 \pm 2,906		13,101 \pm 4,632		12,144 \pm 3,259	
	4	5,379 \pm 0,492		9,050 \pm 3,055		13,750 \pm 4,030		17,251 \pm 4,691	
	7.5	2,826 \pm 0,469		9,505 \pm 3,226		14,707 \pm 4,288		21,334 \pm 6,211	
	9	3,840 \pm 0,424		13,458 \pm 3,090		22,652 \pm 5,700		10,812 \pm 2,970	
	12	6,058 \pm 1,636		8,764 \pm 2,566		12,317 \pm 3,916		7,322 \pm 1,841	
	14	1,884 \pm 1,080		9,011 \pm 3,186		12,159 \pm 4,299		13,296 \pm 4,008	
	16	7,396 \pm 0,943		7,893 \pm 1,983		11,973 \pm 3,115		12,199 \pm 3,392	
	18	5,420 \pm 0,121		10,751 \pm 3,287		11,848 \pm 3,591		8,615 \pm 2,622	
	21	8,226 \pm 0,023		11,490 \pm 2,744		14,904 \pm 3,507		17,292 \pm 4,753	
	23.5	15,007 \pm 3,260		18,705 \pm 6,112		9,114 \pm 4,134		11,438 \pm 2,914	
Fructose	1	2,300 \pm 0,036		2,171 \pm 0,531		1,192 \pm 0,267		0,759 \pm 0,171	
	4	6,719 \pm 0,159		3,405 \pm 0,763		3,693 \pm 0,838		1,441 \pm 0,331	
	7.5	2,675 \pm 0,034		3,903 \pm 0,880		1,936 \pm 0,449		1,455 \pm 0,330	
	9	1,743 \pm 0,043		2,093 \pm 0,472		2,037 \pm 0,461		1,429 \pm 0,321	
	12	1,021 \pm 0,052		1,513 \pm 0,349		0,972 \pm 0,219		0,873 \pm 0,195	
	14	1,990 \pm 0,083		0,830 \pm 0,190		1,464 \pm 0,328		0,625 \pm 0,169	
	16	1,387 \pm 0,074		1,446 \pm 0,327		0,893 \pm 0,209		0,785 \pm 0,195	
	18	1,296 \pm 0,035		0,656 \pm 0,153		0,885 \pm 0,200		0,350 \pm 0,082	
	21	2,891 \pm 0,533		4,762 \pm 1,081		1,498 \pm 0,337		0,840 \pm 0,204	
	23.5	0,359 \pm 0,021		0,440 \pm 0,099		0,430 \pm 0,105		0,514 \pm 0,119	
Fumarate	1	65,501 \pm 8,690		31,577 \pm 7,646		18,969 \pm 4,304		7,884 \pm 1,806	
	4	100,418 \pm 8,518		37,808 \pm 8,731		30,909 \pm 6,956		14,397 \pm 3,332	
	7.5	100,678 \pm 6,679		69,882 \pm 18,546		30,905 \pm 7,475		39,641 \pm 8,932	
	9	114,871 \pm 5,872		86,335 \pm 19,894		54,754 \pm 12,639		43,237 \pm 10,561	
	12	100,399 \pm 4,854		76,882 \pm 17,857		33,849 \pm 8,334		24,549 \pm 5,556	
	14	87,017 \pm 8,384		61,382 \pm 14,588		48,447 \pm 11,051		19,184 \pm 4,904	
	16	113,336 \pm 5,801		68,056 \pm 16,300		25,374 \pm 5,930		15,386 \pm 3,530	
	18	103,341 \pm 5,831		27,754 \pm 6,351		13,095 \pm 2,994		11,643 \pm 2,669	
	21	199,314 \pm 14,558		114,873 \pm 26,756		58,231 \pm 13,157		44,375 \pm 10,286	
	23.5	54,280 \pm 4,716		23,704 \pm 5,556		8,338 \pm 2,005		3,886 \pm 0,881	
GABA	1	0,708 \pm 0,037		0,772 \pm 0,199		0,626 \pm 0,141		0,423 \pm 0,105	
	4	0,879 \pm 0,053		0,938 \pm 0,216		0,736 \pm 0,177		0,507 \pm 0,132	
	7.5	0,425 \pm 0,006		0,801 \pm 0,182		0,751 \pm 0,205		1,079 \pm 0,251	
	9	0,485 \pm 0,012		0,564 \pm 0,127		0,667 \pm 0,179		0,435 \pm 0,101	
	12	0,622 \pm 0,097		1,040 \pm 0,368		0,616 \pm 0,180		0,484 \pm 0,111	
	14	0,751 \pm 0,020		0,508 \pm 0,120		0,552 \pm 0,136		0,735 \pm 0,353	
	16	1,310 \pm 0,708		0,909 \pm 0,208		0,414 \pm 0,098		0,811 \pm 0,486	
	18	0,512 \pm 0,041		0,402 \pm 0,097		0,339 \pm 0,088		0,362 \pm 0,093	
	21	1,085 \pm 0,113		1,833 \pm 0,488		1,310 \pm 0,476		0,530 \pm 0,136	
	23.5	0,715 \pm 0,164		0,652 \pm 0,154		0,376 \pm 0,085		0,662 \pm 0,222	
Galactose	1	0,697 \pm 0,058		0,467 \pm 0,140		0,371 \pm 0,097		0,211 \pm 0,052	
	4	1,369 \pm 0,088		0,409 \pm 0,092		0,518 \pm 0,121		0,275 \pm 0,066	
	7.5	0,103 \pm 0,047		0,844 \pm 0,199		0,407 \pm 0,107		0,249 \pm 0,089	
	9	0,875 \pm 0,086		0,628 \pm 0,150		0,312 \pm 0,071		0,286 \pm 0,069	
	12	0,584 \pm 0,098		0,673 \pm 0,156		0,169 \pm 0,045		0,152 \pm 0,053	
	14	0,364 \pm 0,057		0,386 \pm 0,099		0,246 \pm 0,060		0,176 \pm 0,046	
	16	0,693 \pm 0,011		0,597 \pm 0,142					

Glucose	1	39,609 ± 0,705	43,489 ± 10,799	26,415 ± 5,964	5,081 ± 1,204
	4	90,078 ± 0,321	24,629 ± 5,515	39,129 ± 8,867	12,116 ± 3,118
	7.5	74,553 ± 0,182	70,551 ± 15,886	21,298 ± 4,850	12,615 ± 2,840
	9	45,645 ± 0,974	37,444 ± 8,400	14,658 ± 3,331	14,918 ± 3,358
	12	28,075 ± 1,424	61,461 ± 13,841	7,994 ± 1,915	5,772 ± 1,296
	14	31,418 ± 2,844	22,437 ± 5,096	12,477 ± 2,838	3,606 ± 0,979
	16	29,696 ± 1,565	58,770 ± 13,218	6,921 ± 1,570	3,734 ± 1,036
	18	37,408 ± 1,619	11,697 ± 2,680	4,653 ± 1,049	3,364 ± 0,778
	21	57,175 ± 12,773	92,901 ± 21,168	18,749 ± 4,238	13,573 ± 3,397
	23.5	8,851 ± 1,311	15,244 ± 3,581	4,217 ± 1,180	3,982 ± 1,005
Glutamate	1	7,838 ± 1,197	8,228 ± 2,072	7,473 ± 1,719	5,869 ± 1,419
	4	9,466 ± 1,320	14,420 ± 3,284	11,348 ± 2,617	9,386 ± 2,186
	7.5	5,494 ± 0,624	9,082 ± 2,793	10,846 ± 2,624	16,139 ± 3,638
	9	6,274 ± 0,368	12,542 ± 2,821	13,643 ± 3,065	10,107 ± 2,514
	12	7,274 ± 1,018	10,241 ± 2,299	11,204 ± 2,690	9,530 ± 2,202
	14	6,555 ± 0,531	8,122 ± 1,872	9,410 ± 2,442	8,975 ± 2,402
	16	8,706 ± 0,449	8,672 ± 1,953	9,454 ± 2,179	7,727 ± 1,853
	18	7,428 ± 0,105	6,675 ± 1,650	5,365 ± 1,291	5,757 ± 1,306
	21	11,978 ± 0,485	12,897 ± 2,929	16,226 ± 3,634	15,562 ± 3,639
	23.5	7,195 ± 0,827	8,407 ± 2,230	5,695 ± 1,659	7,852 ± 1,799
Glutamine	1	0,238 ± 0,002	0,171 ± 0,048	0,190 ± 0,067	0,169 ± 0,038
	4	0,273 ± 0,009	0,063 ± 0,017	0,176 ± 0,051	0,181 ± 0,052
	7.5	0,069 ± 0,016	0,219 ± 0,074	0,020 ± 0,006	0,420 ± 0,148
	12	0,294 ± 0,021	0,284 ± 0,102	0,300 ± 0,106	0,344 ± 0,099
	14	0,403 ± 0,082	0,343 ± 0,090	0,243 ± 0,087	0,295 ± 0,079
	16	0,324 ± 0,011	0,318 ± 0,112	0,354 ± 0,083	0,231 ± 0,082
	18	0,255 ± 0,084	0,321 ± 0,077	0,144 ± 0,051	0,202 ± 0,055
	21	0,445 ± 0,058	0,375 ± 0,136	0,379 ± 0,109	0,381 ± 0,086
	23.5	0,170 ± 0,009	0,179 ± 0,052	0,180 ± 0,052	0,161 ± 0,058
	Glycerate	1	0,376 ± 0,016	0,530 ± 0,120	0,684 ± 0,155
4		0,671 ± 0,030	1,321 ± 0,296	1,130 ± 0,255	1,170 ± 0,266
7.5		0,775 ± 0,017	1,197 ± 0,282	1,281 ± 0,296	1,846 ± 0,414
9		0,430 ± 0,011	0,612 ± 0,137	1,077 ± 0,242	0,937 ± 0,213
12		0,150 ± 0,013	0,300 ± 0,068	0,350 ± 0,079	0,357 ± 0,082
14		0,120 ± 0,014	0,160 ± 0,037	0,352 ± 0,079	0,243 ± 0,064
16		0,118 ± 0,005	0,236 ± 0,054	0,185 ± 0,042	0,188 ± 0,043
18		0,086 ± 0,006	0,110 ± 0,025	0,091 ± 0,024	0,111 ± 0,026
21		0,117 ± 0,017	0,232 ± 0,052	0,376 ± 0,084	0,295 ± 0,067
23.5		0,100 ± 0,004	0,124 ± 0,030	0,105 ± 0,024	0,150 ± 0,035
Isoleucine	1	0,703 ± 0,013	0,941 ± 0,223	0,433 ± 0,098	0,179 ± 0,054
	4	1,091 ± 0,032	1,101 ± 0,250	0,552 ± 0,124	0,345 ± 0,078
	7.5	0,550 ± 0,029	0,808 ± 0,190	0,547 ± 0,140	0,525 ± 0,118
	9	0,738 ± 0,031	0,885 ± 0,201	0,388 ± 0,091	0,327 ± 0,076
	12	0,236 ± 0,019	0,487 ± 0,112	0,215 ± 0,048	0,221 ± 0,050
	14	0,215 ± 0,018	0,195 ± 0,052	0,183 ± 0,044	0,156 ± 0,041
	16	0,268 ± 0,029	0,434 ± 0,101	0,135 ± 0,030	0,109 ± 0,026
	18	0,229 ± 0,012	0,143 ± 0,032	0,117 ± 0,027	0,083 ± 0,020
	21	0,487 ± 0,013	0,513 ± 0,131	0,356 ± 0,084	0,260 ± 0,061
	23.5	0,135 ± 0,020	0,453 ± 0,103	0,141 ± 0,037	0,183 ± 0,044
Leucine	1	0,178 ± 0,004	0,545 ± 0,129	0,426 ± 0,096	0,217 ± 0,075
	4	0,274 ± 0,021	0,719 ± 0,161	0,487 ± 0,109	0,471 ± 0,106
	7.5	0,166 ± 0,010	0,335 ± 0,079	0,613 ± 0,141	0,697 ± 0,158
	9	0,307 ± 0,023	0,363 ± 0,083	0,363 ± 0,083	0,318 ± 0,080
	12	0,144 ± 0,017	0,185 ± 0,043	0,185 ± 0,042	0,197 ± 0,046
	14	0,147 ± 0,011	0,142 ± 0,032	0,194 ± 0,046	0,172 ± 0,045
	16	0,190 ± 0,023	0,186 ± 0,042	0,143 ± 0,032	0,143 ± 0,035
	18	0,139 ± 0,017	0,133 ± 0,031	0,120 ± 0,028	0,115 ± 0,027
	21	0,511 ± 0,027	0,432 ± 0,111	0,398 ± 0,092	0,310 ± 0,072
	23.5	0,090 ± 0,019	0,237 ± 0,054	0,129 ± 0,036	0,207 ± 0,048
Malate	1	5,680 ± 1,024	4,319 ± 1,299	1,127 ± 0,282	0,514 ± 0,136
	4	11,444 ± 0,826	4,196 ± 0,981	1,887 ± 0,439	1,058 ± 0,287
	7.5	5,745 ± 0,783	6,631 ± 1,982	1,641 ± 0,439	2,641 ± 0,593
	9	7,579 ± 0,389	7,131 ± 1,635	2,546 ± 0,608	1,997 ± 0,520
	12	3,925 ± 0,499	4,242 ± 0,971	1,214 ± 0,340	0,793 ± 0,186
	14	2,506 ± 0,422	2,437 ± 0,546	1,325 ± 0,302	0,915 ± 0,237
	16	4,209 ± 0,241	2,708 ± 0,642	0,831 ± 0,201	0,661 ± 0,163
	18	3,402 ± 0,113	0,900 ± 0,205	0,487 ± 0,121	0,447 ± 0,101
	21	4,349 ± 0,326	2,654 ± 0,617	1,461 ± 0,351	1,109 ± 0,258
	23.5	2,975 ± 0,586	1,956 ± 0,547	0,345 ± 0,118	0,344 ± 0,081
Methionine	1	0,058 ± 0,001	0,052 ± 0,014	0,044 ± 0,016	0,035 ± 0,008
	4	0,118 ± 0,013	0,107 ± 0,024	0,054 ± 0,019	0,058 ± 0,014
	7.5	0,102 ± 0,004	0,100 ± 0,023	0,071 ± 0,017	0,072 ± 0,025
	9	0,079 ± 0,003	0,081 ± 0,020	0,010 ± 0,003	0,046 ± 0,015
	12	0,032 ± 0,008	0,041 ± 0,011	0,043 ± 0,012	0,048 ± 0,014
	14	0,032 ± 0,009	0,040 ± 0,014	0,042 ± 0,010	0,024 ± 0,011
	16	0,041 ± 0,005	0,036 ± 0,009	0,036 ± 0,010	0,027 ± 0,010
	18	0,027 ± 0,008	0,025 ± 0,008	0,023 ± 0,007	0,027 ± 0,008
	21	0,053 ± 0,006	0,055 ± 0,014	0,052 ± 0,013	0,030 ± 0,012
	23.5	0,036 ± 0,005	0,044 ± 0,011	0,035 ± 0,008	0,034 ± 0,011
Phenylalanine	1	0,792 ± 0,044	0,913 ± 0,225	0,691 ± 0,159	0,532 ± 0,125
	4	0,960 ± 0,055	1,316 ± 0,298	0,880 ± 0,201	0,745 ± 0,172
	7.5	0,655 ± 0,036	0,916 ± 0,230	0,896 ± 0,212	1,218 ± 0,275
	9	0,637 ± 0,022	1,080 ± 0,242	0,977 ± 0,219	0,768 ± 0,178
	12	0,487 ± 0,048	0,714 ± 0,160	0,763 ± 0,181	0,703 ± 0,159
	14	0,535 ± 0,026	0,660 ± 0,152	0,803 ± 0,198	0,742 ± 0,198
	16	0,729 ± 0,028	0,739 ± 0,166	0,871 ± 0,200	0,773 ± 0,179
	18	0,581 ± 0,019	0,596 ± 0,141	0,549 ± 0,129	0,551 ± 0,124
	21	0,944 ± 0,045	1,098 ± 0,267	1,310 ± 0,296	1,245 ± 0,295
	23.5	0,447 ± 0,051	0,611 ± 0,158	0,405 ± 0,113	0,545 ± 0,125
Pyruvate	1	0,232 ± 0,009	0,610 ± 0,137	0,663 ± 0,149	0,569 ± 0,133
	4	0,254 ± 0,014	0,757 ± 0,170	0,616 ± 0,139	0,825 ± 0,187
	7.5	0,294 ± 0,006	0,444 ± 0,116	0,551 ± 0,130	0,909 ± 0,204
	9	0,160 ± 0,002	0,247 ± 0,056	0,409 ± 0,092	0,384 ± 0,086
	12	0,192 ± 0,049	0,150 ± 0,035	0,259 ± 0,059	0,234 ± 0,053
	14	0,090 ± 0,014	0,156 ± 0,035	0,251 ± 0,057	0,311 ± 0,102
	16	0,086 ± 0,003	0,131 ± 0,030	0,206 ± 0,047	0,177 ± 0,041
	18	0,069 ± 0,009	0,136 ± 0,036	0,127 ± 0,029	0,153 ± 0,034
	21	0,054 ± 0,015	0,125 ± 0,028	0,203 ± 0,046	0,209 ± 0,048
	23.5	0,083 ± 0,017	0,155 ± 0,035	0,131 ± 0,034	0,166 ± 0,038

Serine	1	3,847 ± 0,352	10,353 ± 2,317	9,721 ± 2,187	8,231 ± 2,136
	4	7,122 ± 0,690	19,614 ± 4,409	18,494 ± 4,160	20,556 ± 4,625
	7.5	7,009 ± 0,512	12,675 ± 3,204	23,633 ± 5,481	31,279 ± 7,042
	9	8,148 ± 0,260	16,836 ± 3,811	32,732 ± 7,333	26,117 ± 6,119
	12	3,801 ± 0,150	9,970 ± 2,255	23,480 ± 5,291	22,228 ± 5,020
	14	3,598 ± 0,123	8,397 ± 1,912	16,471 ± 3,805	18,948 ± 4,874
	16	3,720 ± 0,046	9,521 ± 2,138	14,019 ± 3,159	14,762 ± 3,325
	18	3,660 ± 0,110	7,919 ± 1,813	6,924 ± 1,585	8,436 ± 1,891
	21	5,474 ± 0,190	11,215 ± 2,561	16,099 ± 3,609	13,480 ± 3,096
	23.5	1,962 ± 0,186	6,965 ± 1,659	5,933 ± 1,414	9,010 ± 2,073
Shikimate	1	0,472 ± 0,021	0,468 ± 0,106	0,551 ± 0,124	0,516 ± 0,121
	4	0,659 ± 0,029	0,794 ± 0,178	0,721 ± 0,162	0,657 ± 0,150
	7.5	0,725 ± 0,020	0,744 ± 0,175	0,671 ± 0,153	1,048 ± 0,235
	9	0,764 ± 0,009	0,908 ± 0,203	0,821 ± 0,184	0,833 ± 0,189
	12	0,606 ± 0,019	0,585 ± 0,131	0,688 ± 0,159	0,609 ± 0,139
	14	0,516 ± 0,028	0,539 ± 0,127	0,588 ± 0,133	0,592 ± 0,151
	16	0,494 ± 0,011	0,459 ± 0,103	0,596 ± 0,135	0,433 ± 0,157
	18	0,370 ± 0,013	0,398 ± 0,089	0,419 ± 0,096	0,415 ± 0,093
	21	0,437 ± 0,024	0,393 ± 0,089	0,585 ± 0,131	0,562 ± 0,128
	23.5	0,411 ± 0,021	0,448 ± 0,101	0,455 ± 0,103	0,478 ± 0,111
Succinate	1	0,434 ± 0,052	0,448 ± 0,101	0,713 ± 0,161	0,473 ± 0,107
	4	0,554 ± 0,029	0,802 ± 0,185	0,883 ± 0,200	0,779 ± 0,176
	7.5	0,336 ± 0,023	0,598 ± 0,152	0,793 ± 0,188	1,240 ± 0,278
	9	0,528 ± 0,023	0,920 ± 0,211	1,481 ± 0,339	1,076 ± 0,263
	12	0,544 ± 0,007	0,626 ± 0,142	0,719 ± 0,168	0,693 ± 0,157
	14	0,469 ± 0,030	0,506 ± 0,117	1,031 ± 0,233	0,692 ± 0,179
	16	0,525 ± 0,015	0,602 ± 0,137	0,630 ± 0,146	0,535 ± 0,121
	18	0,458 ± 0,028	0,474 ± 0,107	0,338 ± 0,078	0,373 ± 0,084
	21	0,713 ± 0,030	1,136 ± 0,262	1,219 ± 0,275	0,887 ± 0,204
	23.5	0,483 ± 0,036	0,384 ± 0,090	0,299 ± 0,072	0,305 ± 0,069
Sucrose	1	135,051 ± 6,078	142,523 ± 32,815	164,101 ± 36,739	105,884 ± 24,545
	4	214,510 ± 11,536	183,517 ± 41,059	163,926 ± 36,682	122,095 ± 27,484
	7.5	170,645 ± 5,575	171,367 ± 38,598	137,977 ± 31,184	159,059 ± 35,812
	9	102,599 ± 3,423	93,388 ± 20,886	83,799 ± 20,122	61,127 ± 13,931
	12	125,426 ± 4,865	112,203 ± 25,173	83,807 ± 18,879	72,603 ± 16,321
	14	114,485 ± 10,940	108,672 ± 25,037	88,314 ± 19,896	79,925 ± 22,503
	16	118,202 ± 14,806	102,664 ± 25,767	97,889 ± 21,947	100,066 ± 23,834
	18	95,821 ± 2,237	71,036 ± 18,366	86,522 ± 25,325	47,442 ± 10,758
	21	158,113 ± 7,673	164,239 ± 37,528	130,450 ± 30,611	102,154 ± 23,502
	23.5	53,190 ± 0,739	75,093 ± 16,922	64,491 ± 14,472	60,959 ± 14,642
Threonine	1	2,218 ± 0,103	1,934 ± 0,458	0,751 ± 0,169	0,465 ± 0,109
	4	3,010 ± 0,184	2,288 ± 0,514	1,154 ± 0,259	0,727 ± 0,163
	7.5	3,077 ± 0,147	2,468 ± 0,571	0,957 ± 0,223	1,175 ± 0,264
	9	3,669 ± 0,086	2,818 ± 0,636	1,012 ± 0,227	1,128 ± 0,257
	12	2,665 ± 0,069	2,205 ± 0,496	0,980 ± 0,220	0,969 ± 0,219
	14	2,289 ± 0,109	1,300 ± 0,297	0,708 ± 0,163	0,731 ± 0,189
	16	2,018 ± 0,028	1,387 ± 0,312	0,727 ± 0,166	0,576 ± 0,151
	18	1,791 ± 0,058	0,592 ± 0,134	0,486 ± 0,113	0,327 ± 0,074
	21	1,902 ± 0,077	1,196 ± 0,272	0,933 ± 0,211	0,788 ± 0,179
	23.5	1,697 ± 0,073	1,312 ± 0,296	0,388 ± 0,089	0,471 ± 0,111
Valine	1	0,305 ± 0,005	0,664 ± 0,155	0,467 ± 0,106	0,271 ± 0,076
	4	0,436 ± 0,024	0,993 ± 0,223	0,556 ± 0,125	0,508 ± 0,115
	7.5	0,242 ± 0,016	0,567 ± 0,131	0,579 ± 0,134	0,727 ± 0,164
	9	0,293 ± 0,023	0,639 ± 0,145	0,587 ± 0,135	0,512 ± 0,127
	12	0,176 ± 0,021	0,336 ± 0,076	0,408 ± 0,091	0,408 ± 0,095
	14	0,191 ± 0,010	0,274 ± 0,062	0,332 ± 0,080	0,415 ± 0,109
	16	0,208 ± 0,020	0,408 ± 0,093	0,357 ± 0,080	0,355 ± 0,085
	18	0,195 ± 0,006	0,249 ± 0,063	0,253 ± 0,058	0,241 ± 0,054
	21	0,387 ± 0,016	0,533 ± 0,132	0,564 ± 0,130	0,484 ± 0,111
	23.5	0,131 ± 0,008	0,396 ± 0,089	0,245 ± 0,060	0,373 ± 0,087

Supplementäre Tabelle S3. Liste der Top 180 coexprimierte Genes mit *NADP-ME2* (At5g11670) identifiziert mit der ATTED-II Datenbank. Die Gene, die bekanntlich in die pflanzliche Abwehr gegen unterschiedliche Pathogene und Stress involviert sind, sind fett markiert. MR, Mutual Rank.

	Locus	Funktion	Abbreviation	MR
1	At2g30870	Glutathione transferase	GSTF10	1.4
2	At4g23470	Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein		2.5
3	At3g57280	Unknown plastidic membrane protein		2.8
4	At3g20410	Calmodulin-domain protein kinase	CPK9	3.2
5	At1g59870	ATPase	PEN3	3.5
6	At5g03630	Monodehydroascorbate reductase (NADH)	MDAR2	4.6
7	At5g54500	Flavodoxin-like quinone reductase1	FQR1	4.9
8	At1g06870; At2g30440	Plastidic type I signal peptidase, putative		7.2
9	At3g28940	Avirulence-responsive protein	AIG	7.4
10	At4g23270	Protein kinase family protein	CRK19	8.1
11	At1g07240	UDP-glycosyltransferase	UGT71C5	8.4
12	At1g22070	Transcription factor	TGA3	9.3
13	At5g27380	Glutathione synthetase	GSH2	9.6
14	At3g20510	Unknown protein		9.9
15	At1g59580	MAP kinase	MPK2	10.9
16	At3g49120; At3g49110	Class-III peroxidase, putative	AtPer33 and 34	12.3
17	At1g13000	Unknown protein		14.3
18	At1g27130	Glutathione transferase	GSTU13	19.4
19	At5g23490; At5g23510	Unknown protein		19.6
20	At5g45510	Leucine-rich repeat family protein	LRR	20.9
21	At1g53390	ATPase, coupled to transmembrane movement	ATPase	21.8
22	At4g19880			21.9
23	At1g17500	ATPase, coupled to transmembrane movement	ATPase	22.2
24	At1g04170	Calcium-binding EF hand family protein	Ca-binding EF hand	22.8
25	At4g38550	Phospholipase-like protein, putative		22.9
26	At2g32235; At2g32240	Unknown protein		23.4
27	At2g21620	UspA-like stress-responsive protein, putative	RD2	24.0
28	At4g26910	Dihydrolipoamide succinyltransferase, putative		24.7
29	At2g20630	Protein phosphatase 2C, putative	PIA1	25.8
30	At3g53180	Nodulin/glutamine synthetase-like protein, putative	AtNodGS	25.8
31	At2g40940	Ethylene response sensor 1	ERS1	25.8
32	At5g35735	Auxin-responsive family protein		26.8
33	At1g61250; At1g11180	SCAMP-type membrane protein probably involved in exocytosis	AtSCAMP1	27.8
34	At2g44490	Hydrolyzing O-glycosyl compounds / thioglucosidase	PEN2	28.5
35	At1g25275	Unknown protein		28.8
36	At2g28890	Poltergeist like 4, serine/threonine phosphatase	PLL4	30.2
37	At2g17720	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase		30.3
38	At3g21630	Chitin elicitor receptor kinase 1	CERK1	30.8

39	At2g33630	NAD-dependent epimerase/dehydratase, putative		32.0
40	At3g55830	UDP-glucosyltransferase/ transferase	EPC1	33.0
41	At4g35310	Calmodulin-domain protein kinase 5	CPK5	33.8
42	At1g56140; At1g56130; At1g56120	LRR-type receptor protein kinase, putative		34.2
43	At4g11850	Phospholipase D	PLDGAMMA1	34.7
44	At1g11310	Mildew resistance locus O 2	MLO2	37.9
45	At1g52200	Unknown protein		38.0
46	At5g48380	BAK1-interacting receptor-like kinase	BIR1	41.0
47	At1g08940	Phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase		41.3
48	At4g33430	BRI1-associated receptor kinase	BAK1	42.3
49	At1g19360	Glycosyltransferase, putative		42.5
50	At2g37940	Inositol phosphorylceramide synthase	AtIPCS2/AtERH1	43.0
51	At1g69450	putative ERD4-like membrane protein		43.9
52	At1g19130	Unknown protein		46.2
53	At3g26090	G-protein coupled receptor	RGS1	46.3
54	At2g19130	S-locus lectin protein kinase family protein		46.6
55	At3g09490	Tetratricopeptide repeat-like superfamily protein		47.0
56	At3g03000	Calmodulin, calcium sensor, putative	AtCML18	47.4
57	At4g01700	Chitinase, putative		48.4
58	At4g31500	Cytochrome P450 monooxygenase	CYP83B1	48.4
59	At1g77420	Hydrolase, alpha/beta fold family protein		49.0
60	At2g30860	Glutathione S-transferase PHI 9	GSTF9	49.5
61	At5g10190	Small solute transporter, putative		50.4
62	At5g64120	Class-III Peroxidase	AtPer71	50.9
63	At3g01720	Unknown protein		51.1
64	At1g13110	Monooxygenase	CYP71B7	52.6
65	At5g36880	Acetyl-CoA synthetase, putative	ACS	53.8
66	At4g23850	Long-chain acyl-CoA synthetase	AtLACS4	55.2
67	At4g26970	Aconitate hydratase	ACO2	55.5
68	At3g54640	Tryptophan synthase	TSA1	56.6
69	At3g24503	Aldehyde dehydrogenase	ALDH2C4	56.7
70	At3g17020	Universal stress protein (USP) family protein	USP	57.5
71	At5g37740	C2 domain-containing protein	C2	57.5
72	At5g45260	Resistant to <i>Ralstonia solanacearum</i> 1; transcription factor	RRS1	58.9
73	At5g01210	Acyltransferase, putative		59.1
74	At1g18390	ATP binding protein kinase		60.0
75	At5g40170	Receptor Like Protein 54, kinase	RLP54	60.0
76	At5g37600	Cytosolic glutamine synthetase	GSR1	61.1
77	At2g28840	Ankyrin repeat family protein		61.1
78	At1g54090	Exocyst subunit EXO70 family protein D2	EXO70D2	62.2
79	At4g39270	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative		63.0
80	At4g18930	Cyclic phosphodiesterase		63.6
81	At1g09970	ATP binding / protein serine/threonine kinase	LRR XI-23	64.3
82	At2g22480	6-phosphofructokinase 5	PFK5	64.7
83	At5g44070	Cadmium sensitive 1; Phytochelatin synthase	CAD1	65.1
84	At5g01750	Unknown protein		66.3
85	At5g37480	Unknown protein		67.7
86	At5g01950	ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase		68.0
87	At5g49760	LRR-type receptor protein kinase, putative		69.8
88	At3g28930	AVRRPT2-Induced gene 2	AIG2	69.8
89	At4g38540	Monooxygenase	MO2	69.9

90	At5g40780	Amino acid transmembrane transporter	LHT1	71.5
91	At4g35630	O-phospho-L-serine:2-oxoglutarate aminotransferase	PSAT	72.1
92	At4g25970	Phosphatidylserine decarboxylase 3	PSD3	73.1
93	At2g17130	Isocitrate dehydrogenase 2	IDH2	75.5
94	At4g02370	Unknown protein		75.5
95	At1g63460	Glutathione peroxidase, putative	GPX8	77.3
96	At3g18830	Polyol transporter 5	PLT5	77.6
97	At2g38860	Pfpl-like protein of unknown function	YLS5	78.1
98	At5g15730	Serine/threonine protein kinase, putative		79.3
99	At3g06300	Prolyl-4 hydroxylase	P4H-2	81.5
100	At2g20960	Phospholipase-like protein	pEARLI4	83.2
101	At4g25720	Gamma-glutamylcyclotransferase, putative	QCT	84.8
102	At5g45250	Resistant to <i>P. syringae</i>; receptor	RPS4	85.6
103	At1g61360	Lectin protein kinase family protein		87.1
104	At1g11200	Unknown protein		87.7
105	At5g12200	Dihydropyrimidine amidohydrolase	PYD2	89.8
106	At3g51660	Macrophage migration inhibitory factor family protein	MIF	90.2
107	At3g59660	C2 domain-containing protein	GRAM	91.0
108	At1g07630	Serine/threonine phosphatase	PLL5	92.9
109	At5g21090	Leucine-rich repeat phosphatase 2C like protein	LRR	93.2
110	At4g34180	Cyclase family protein		94.7
111	At3g14840	LRR-type receptor protein kinase, putative		95.0
112	At1g01820	Peroxin 11C	PEX11C	96.0
113	At2g24200	Aminopeptidase		96.2
114	At5g12170	Chloroquine-resistance transporter-like	CLT3	96.6
115	At5g20400	2OG-Fe(II) oxygenase family protein		97.0
116	At4g36750	Quinone reductase family protein		97.1
117	At1g03740	ATP binding serine/threonine kinase		97.6
118	At4g12010	Disease resistance protein	TIR-NBS-LRR	98.0
119	At1g65820	Glutathione S-transferase, putative		98.7
120	At1g14870; At1g14880	Zinc exporter, putative / cadmium resistance protein	AtPCR2 / AtPCR1	100.0
121	At1g59960	Aldo/keto reductase, putative		101.6
122	At5g43100	Aspartyl protease family protein		102.8
123	At1g13210	Autoinhibited Ca ²⁺ /ATPase II	ACA.I	103.2
124	At5g26340	Hexose-specific/H ⁺ symporter	MSS1	103.3
125	At3g13790	Beta-fructofuranosidase	BFRUCT1	104.2
126	At4g20110	Vacuolar sorting receptor 7	VSR7	105.0
127	At2g46620	AAA-type ATPase family protein		106.3
128	At5g20990	Molybdenum ion binding	B73	106.8
129	At1g02930; At1g02920	Class phi glutathione S-transferase, putative	AtGSTF6 / AtGSTF7	108.2
130	At1g06160	Transcription factor	ORA59	109.0
131	At3g50210	2-oxoacid-dependent oxidase, putative		110.4
132	At3g15730	Phospholipase D alpha 1	PLDALPHA1	110.8
133	At5g54810; At4g27070	Beta subunit of tryptophan synthase	AtTSB1	111.2
134	At3g25610	Aminophospholipid translocase, P4-type ATPase	AtALA10	112.9
135	At4g35830	Aconitate hydratase, cytoplasmic	ACO1	114.1
136	At3g16530	Legume lectin family protein		114.5
137	At1g79340	Metacaspase 4; cysteine-type peptidase	MC4	115.9
138	At1g68300	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like	USP	116.2
139	At4g25900	Aldose 1-epimerase, putative		116.4

140	At5g57630	CBL-interacting protein kinase 21	CIPK21	116.9
141	At2g38290	Ammonium transporter 2	AMT2	117.2
142	At5g18310	Unknown protein		119.0
143	At5g60950	Cobra-like protein 5	COBL5	119.5
144	At4g29210	Gamma-glutamyltransferase 4	GGT4	119.7
145	At5g05730	Anthranilate synthase alpha subunit 1	ASA1	120.1
146	At3g04720	Pathogenesis-related 4, chitin binding	PR4	121.1
147	At1g74100	Sulfotransferase 16	SOT16	121.6
148	At4g05150	Octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein	PB1	122.3
149	At1g22360	UDP-glucosyl transferase 85A2	UGT85A2	122.5
150	At4g39950	Monooxygenase	CYP79B2	124.7
151	At1g05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	EFE	126.5
152	At2g02930; At4g02520	Class phi glutathione S-transferase, putative	AtGSTF3 / AtGSTF 2	127.2
153	At4g23460	Adaptin subunit of clathrin adaptor complex, putative		127.6
154	At3g14310	Pectinesterase	PME3	128.5
155	At5g45500	Unknown protein		128.6
156	At2g04400	Indole-3-glycerol phosphate synthase	IGPS	129.4
157	At5g10600; At5g10610	cytochrome P450 monooxygenase	AtCYP81K2 / AtCYP81K 1	129.8
158	At3g19553	Amino acid permease family protein		130.3
159	At2g26560	Phospholipase A 2A	PLA2A	131.0
160	At3g27890	NADPH:Quinone oxidoreductase	NQR	132.9
161	At4g13510	Ammonium transporter 1;1	AMT1;1	133.2
162	At1g33590	Disease resistance protein-related	LRR	133.3
163	At1g50440	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein		133.9
164	At1g76520	Auxin efflux carrier family protein		135.3
165	At1g35720	Annexin	ANNAT1	135.4
166	At1g20840	Tonoplast monosaccharide transporter	TMT1	137.8
167	At4g16260	O-glycosyl hydrolase		137.8
168	At1g02360	chitinase		140.4
169	At1g08930	Early response to dehydration 6; sugar transporter	ERD6	140.6
170	At4g24340; At4g24350	Nucleoside phosphorylase, putative		141.7
171	At4g30530	Gamma-glutamyl peptidase, defence related	AtGGP1	141.7
172	At4g08770	Class-III peroxidase, putative	Prx37	142.1
173	At3g48760	Acyltransferase, putative		142.6
174	At2g20780	PLT subfamily polyol/monosaccharide:proton symporter	AtPMT4/AtPLT4	143.0
175	At1g77920	bZIP family transcription factor	AtbZIP50	143.2
176	At2g26240	Unknown membrane protein		143.4
177	At5g47580	Unknown membrane protein		147.1
178	At1g79670	Kinase, resistance to <i>Fusarium oxysporium</i>	RFO1	147.7
179	At5g50200	Wound-responsive 3; nitrate transmembrane transporter	WR3	147.8
180	At3g43670	Copper amine oxidase, putative		148.2

Supplementäre Tabelle S4

Metabolite levels (relative to the internal standard ribitol) in rosette leaves of wild type (wt), los-of-function (*nadp-me2.1* and *-2.2*), complemented (*nadp-me2.1/ME2-1* and *-2*) and overexpressing (*ME2-1* and *-2*) lines assayed by GC-EI-TOF-MS. Samples were harvested 4 h after the onset of the light period 4-week-old plants. Those values that are significantly different from the wild-type as determined by the Student's t-test ($p < 0.05$) are set into bold type.

	wt		<i>nadp-me2.1</i>		<i>nadp-me2.2</i>		<i>nadp-me2.1/</i> <i>ME2-1</i>		<i>nadp-me2.1/</i> <i>ME2-2</i>		<i>ME2-1</i>		<i>ME2-2</i>	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
2-Oxoglutarate	0,021	0,004	0,011	0,001	0,011	0,002	0,008	0,001	0,018	0,001	0,005	0,001	0,005	0,001
Alanine	1,479	0,108	1,212	0,155	1,205	0,118	0,702	0,149	1,277	0,052	0,661	0,066	0,340	0,132
Ascorbate	0,335	0,072	0,364	0,049	0,399	0,033	0,198	0,030	0,259	0,028	0,542	0,048	0,251	0,084
Asparagine	0,010	0,002	0,007	0,002	0,009	0,002	0,008	0,001	0,008	0,001	0,006	0,001	0,004	0,000
Aspartate	1,023	0,157	0,999	0,110	0,819	0,057	0,451	0,027	0,354	0,012	0,237	0,023	0,225	0,090
(Iso-)Citrate	0,135	0,021	0,663	0,075	0,442	0,044	0,055	0,006	0,076	0,005	0,021	0,003	0,024	0,008
Fructose	7,169	0,215	7,066	0,180	8,077	0,357	7,879	0,278	7,546	0,172	5,410	0,236	4,010	1,149
Fumarate	5,812	0,184	14,670	0,274	12,303	0,515	3,564	0,228	4,807	0,057	2,344	0,133	2,068	0,636
GABA	1,452	0,103	1,617	0,185	1,469	0,064	0,872	0,034	0,959	0,025	0,524	0,028	0,401	0,124
Glucuronate	0,054	0,002	0,059	0,004	0,061	0,005	0,051	0,004	0,049	0,003	0,031	0,003	0,026	0,008
Glucose	23,552	1,021	22,550	1,036	25,627	1,627	28,403	1,677	26,179	1,494	16,305	0,917	12,701	3,642
Glutamate	2,410	0,255	1,971	0,386	1,307	0,339	1,271	0,310	1,880	0,126	1,324	0,153	0,431	0,212
Glutamine	0,213	0,022	0,161	0,009	0,146	0,013	0,133	0,011	0,143	0,011	0,110	0,007	0,103	0,022
Glycerate	0,183	0,003	0,215	0,008	0,233	0,016	0,162	0,008	0,157	0,005	0,101	0,007	0,071	0,021
Glycerol	0,813	0,050	2,023	0,126	1,426	0,128	1,269	0,090	1,069	0,093	0,489	0,092	0,357	0,101
Glycine	1,648	0,043	1,242	0,085	0,979	0,033	1,325	0,056	1,551	0,046	1,149	0,057	1,076	0,291
Glycolate	0,024	0,001	0,023	0,002	0,021	0,001	0,014	0,001	0,017	0,001	0,012	0,000	0,008	0,002
Histidine	0,026	0,004	0,028	0,001	0,029	0,004	0,033	0,001	0,033	0,002	0,019	0,003	0,018	0,005
Isoleucine	0,171	0,004	0,137	0,011	0,142	0,005	0,189	0,013	0,165	0,007	0,144	0,013	0,090	0,027
Leucine	0,029	0,002	0,024	0,001	0,026	0,002	0,041	0,006	0,029	0,004	0,034	0,006	0,015	0,004
Malate	0,862	0,063	1,519	0,069	1,206	0,050	0,445	0,029	0,519	0,005	0,335	0,022	0,204	0,062
Maleate	0,026	0,002	0,033	0,001	0,032	0,002	0,015	0,000	0,018	0,001	0,010	0,001	0,005	0,002
Methionine	0,012	0,002	0,012	0,002	0,012	0,002	0,011	0,004	0,018	0,001	0,011	0,001	0,005	0,000
(Myo-)Inositol	6,404	0,176	5,315	0,101	5,867	0,211	6,297	0,313	6,955	0,167	5,555	0,206	4,369	1,238
Nicotinic acid	0,061	0,012	0,069	0,015	0,063	0,006	0,053	0,007	0,053	0,003	0,032	0,006	0,020	0,004
Ornithine	0,020	0,001	0,010	0,001	0,007	0,001	0,016	0,004	0,021	0,001	0,016	0,006	0,010	0,001
Phenylalanine	0,147	0,010	0,166	0,019	0,154	0,009	0,101	0,004	0,078	0,005	0,062	0,014	0,044	0,019
Pyruvate	0,302	0,010	0,183	0,005	0,169	0,005	0,219	0,016	0,385	0,017	0,110	0,003	0,106	0,031
Serine	0,275	0,007	0,168	0,011	0,174	0,008	0,238	0,007	0,234	0,009	0,232	0,020	0,132	0,042
Shikimate	0,372	0,006	0,409	0,016	0,410	0,025	0,319	0,024	0,348	0,012	0,215	0,014	0,158	0,049
Succinate	0,057	0,004	0,075	0,002	0,062	0,003	0,041	0,002	0,064	0,001	0,025	0,002	0,021	0,007
Sucrose	20,429	0,383	17,673	1,127	19,618	1,152	19,490	1,784	19,462	1,083	14,404	1,153	9,726	3,360
Threonine	0,300	0,013	0,403	0,110	0,301	0,025	0,238	0,054	0,417	0,020	0,243	0,021	0,098	0,038
Tyrosine	0,032	0,005	0,036	0,005	0,035	0,008	0,030	0,006	0,037	0,005	0,030	0,011	0,010	0,003
Valine	0,064	0,007	0,055	0,006	0,061	0,004	0,065	0,007	0,063	0,006	0,049	0,007	0,027	0,008

7 Kurzzusammenfassung und Abstract

7.1 Kurzzusammenfassung

Obwohl Malat und Fumarat in eine Vielzahl von Stoffwechselweg der Pflanze involviert sind, bleibt ihre Funktion als Kohlenstoffquelle in C₃-Pflanzen weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen und Stärkefreimutanten *adgl* (ADG-Glukose-Phosphorylase1 null Mutante) und *pgm1* und *sft1* (Phosphoglucomutase1 null Mutante), die ein plastidäres Mais-NADP-ME (MEM) überexprimierten, wurden genutzt um die Auswirkung eines extrem niedrigen Malat- und Fumarat-Gehalt auf die Physiologie von C₃-Pflanzen zu untersuchen. Die MEM-Überexpressions-Pflanzen entwickelten einen Kohlenstoffmangel-Phänotypen besonders unter Kurz-Tag-Bedingungen. Die Beobachteten Ergebnisse dieses Phänotyp untermauern die physiologische Rolle von Malat und Fumarat als essenzielle transiente Kohlenstoffquellen in C₃-Pflanzen wie *A. thaliana*. Wir postulieren, dass das niedrige Level von organischen Säuren, das einem Karbohydrat-Mangel am Ende der Nacht folgt, als initiales Signal dient und eine Kaskade von Abläufen verursacht, die letztlich zur veränderten Substratnutzung in der Respiration hin zu hoch reduzierten Substraten, wie Fettsäuren und Proteinen während der langen Nachtphase bewirken. Dem folgend unterstützen unsere Ergebnisse die Annahme, dass die organischen Säuren, Malat und Fumarat, äußerst wichtige C-Quellen im Metabolismus von *A. thaliana* darstellen.

NADP-Malat-Enzym (NADP-ME, E.C. 1.1.1.40) katalysiert die oxidative Dekarboxylierung von L-Malat unter Gewinnung von Pyruvat, CO₂ und NADPH. Obwohl die Rolle von NADP-ME in der C₄-Photosynthese bekannt ist, bleiben die physiologischen Funktionen der C₃-Isoformen bisher ungeklärt. Die Analyse des transkriptionalen Coexpressionsmuster zeigt, dass NADP-ME2 in Verbindung mit Genen steht, die in die Pathogenabwehr involviert sind. Unsere Arbeit zeigt, dass die gesamte NADP-ME Aktivität nach Infiltration mit pilzlichen und bakteriellen Elizitoren und nach Infektion mit dem hemibiotrophen pilzlichen Pathogen *Colletotrichum higginsianum* induziert wurde. Des weiteren konnte mit Funktionsverlust-Mutanten und mehreren biochemischen und physiologischen Methoden gezeigt werden, dass die beobachtete Aktivitätsänderung durch NADP-ME2 verursacht wurde und der Verlust des zytosolischen NADP-ME2 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen zur Folge hat. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass NADP-ME2 in Mechanismen involviert ist, die NADPH für die ROS-Produktion bereitstellen könnten. NADP-ME3 könnte eine mögliche Rolle im Abbau der primären oder sekundären PCM-Wand während Pollen Entwicklung.

7.2 Abstract

While malate and fumarate participate in a multiplicity of pathways in plant metabolism, the function of these organic acids as carbon stores in C₃ plants has not been deeply addressed. Here, *Arabidopsis thaliana* plants and starch-free mutants, *adg1* (ADP-glucose pyrophosphorylase1 null mutants) and *pgm1* and *stf1* (phosphoglucomutase1 null mutants) overexpressing a maize (*Zea mays*) plastidic NADP-malic enzyme (ME_m) were used to analyze the consequences of sustained low malate and fumarate levels on the physiology of this C₃ plant. The ME_m-overexpressing plants developed a carbon-starvation phenotype especially when grown in short days. The observed results of this phenotype strengthens the physiological roles of malate and fumarate as essential transient carbon storage molecules in a C₃-plant like *A. thaliana*. We propose that low levels of the organic acids may be the initial signal generated after carbohydrate starvation in the dark phase that triggers a cascade of events which alters use of reserves for respiration towards highly reduced substrates, like fatty acids and proteins, during the starvation phase (long night). Thus, the results are supporting our hypothesis on the importance of the organic acids, malate and/or fumarate as form of fixed carbon at least in *A. thaliana*.

NADP-malic enzyme (NADP-ME, E.C. 1.1.1.40) catalysis the oxidative decarboxylation of L-malate yielding pyruvate, CO₂ and NADPH. Although, NADP-ME is well known for its role in C₄ photosynthesis, the physiological Function of its Isoforms in C₃-Metabolism remains unclear. Analysis of transcriptional co-response patterns of NADP-ME2 reveal an association with genes related to plant defense responses. Our work showed induction of total NADP-ME activity after infiltration with fungal and bacterial elicitors and also after infection with the hemibiotroph fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*. Moreover, using loss of function mutants and several biochemical and physiological tools it could be shown that the observed response is referable to NADP-ME2. Hence, the loss of cytosolic NADP-ME2 is associated with enhanced susceptibility to infections, NADP-ME2 could be involved in mechanisms producing NADPH for the production of ROS. The first attempt to characterize NADP-ME3 suggest a possible role of AtNADP-ME3 in microspore separation by inducing modifications of the primary cell wall composition or changes of the turnover of pollen-mother-cell cell wall layers during development.

8 Danksagung

Im folgenden möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Vero Maurino möchte ich für die überaus interessante Themenstellung und die kompetente, hilfsbereite und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe von Herzen danken.

Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge möchte ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe beginnen zu dürfen, seine stetige Unterstützung und für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur danken.

Frau Prof. Dr. Karin Schnetz danke ich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Lars Voll möchte ich für die überaus gelungene und interessante Zusammenarbeit danken.

Dr. Frank Schleifenbaum und Dr. Kirstin Elgass danke ich für die faszinierende, Interdisziplinäre Zusammenarbeit.

Michael Mielewczik möchte ich für die spannende Zusammenarbeit und die Erweiterung meines Horizontes danken.

Prof. Dr. Klaus Harter danke ich für die spannenden und inspirierenden Fachgespräche.

Allen Mitarbeitern der AG Flügge möchte ich für das nette Arbeitsklima und die freundliche Unterstützung danken. Besonders möchte ich mich bei Dr. Martin Enqvist, Alex Maier, Judith Wienstroer, Anke Kuhn und Nils Jaspert für die fröhlichen und lustigen Gespräche und die tolle Zeit im AG-Maurino-Büro bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Holger Fahnenstich für seinen kompetenten und hilfsbereiten Beistand bedanken. Canan Külahoglu möchte ich für die vielen fesselnden, wissenschaftlichen Gespräche und ihre freundschaftliche Unterstützung danken.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, Erika und Lothar Zell, meiner Schwester Christiane mit ihren Töchtern Catharina und Marie-Josephina, sowie meinen Freunden für ihre große und permanente Unterstützung und Hilfe während meiner gesamten Promotionszeit hier in Köln.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Dr. Verónica G. Maurino betreut worden.

Martina B. Zell