

Bayerische Julius-Maximilians-Universität



**Funktion der zentralen metabolischen Kinase SnRK1
und von ihr abhängiger Transkriptionsfaktoren
bei der Mobilisierung von Speicherstoffen
während der *Arabidopsis* Keimlingsentwicklung**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Markus Henninger
geboren in Bad Windsheim

Würzburg, 2020



Eingereicht am:

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION:

Vorsitzender:

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Zweitgutachterin: Dr. Rosalia Deeken

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	V
2	Einleitung	1
2.1	Samenaufbau, Keimung und Keimlingsentwicklung	1
2.2	Reserven im Samen als Schlüssel zur Keimlingsentwicklung	6
2.3	SnRK1, eine zentrale regulatorische Kinase katabolischer Prozesse . .	14
2.3.1	Aufbau von SnRK1	15
2.3.2	Regulation der SnRK1	17
2.3.3	SnRK1 vermittelt seine Wirkung durch Phosphorylierung von Enzymen, Signalmolekülen und regulatorischen Proteinen . . .	20
2.3.4	SnRK1 regulierte Transkriptionsfaktoren	20
2.4	Zielsetzung der Dissertation	27
3	Material	29
3.1	Pflanzenlinien	29
3.2	Plasmide	30
3.3	Oligonukleotide	30
3.4	Puffer und Lösungen	32
3.5	Größenstandards	39
3.6	Enzyme	39
3.7	Antikörper für Western-Blot	40
3.8	Software	40
3.9	Geräte	41
3.10	Verbrauchsmittel	43
3.11	Chemikalien	43
3.12	Kits	44
4	Methoden	47
4.1	Molekularbiologische Methoden	47
4.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	47
4.1.2	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	47
4.1.3	Agarosegelelektrophorese	47
4.1.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
4.1.5	Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i>	48
4.1.6	Die Polymerase-Ketten-Reaktion	48
4.1.7	Die Kolonien-PCR	50
4.1.8	Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen	51
4.1.9	Bestimmung der DNA-Konzentration	52
4.1.10	Restriktion von DNA	52
4.1.11	Sequenzierung von DNA	52
4.1.12	Chromatin-Immunopräzipitation	52

4.2	Arbeiten mit RNA	56
4.2.1	Das RNase-freie Arbeiten	56
4.2.2	Extraktion von RNA aus Pflanzen	57
4.2.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	57
4.2.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) für die qRT-PCR	58
4.2.5	qRT-PCR	58
4.2.6	Präparation der cDNA-Bibliothek	60
4.3	Proteinchemische Methoden	72
4.3.1	Herstellung von Proteinextrakten	72
4.3.2	SDS-Polyacrylgelelektrophorese	72
4.3.3	Anfärbung von Proteingelen	73
4.3.4	Western-Blot	73
4.3.5	Chlorophyllbestimmung am Photometer	74
4.4	Biophysikalische Methoden	74
4.4.1	Extraktion für die LC-MS-Analysen	74
4.4.1.1	Probenaufbereitung für die TAG-Analyse	75
4.4.1.2	Probenaufbereitung für die Kohlenhydrat-Analyse	77
4.4.1.3	Probenaufbereitung für die Aminosäuren-Analyse	78
4.5	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
4.5.1	Pflanzenanzucht auf Erde	79
4.5.2	Pflanzenanzucht in MS-Medium	79
4.5.3	Floral Dip Transformation von <i>Arabidopsis</i>	79
4.5.4	Identifizierung transgener Pflanzen	80
4.5.5	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> Samen	81
4.6	Protoplasten Transformation	81
4.7	RNA-Sequenzierung	84
4.8	Mikroskopische Arbeiten	86
4.8.1	Arbeiten mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM)	86
4.8.2	PAM-Messung zur Bestimmung der photochemischen Aktivität	86
4.9	Allgemeine Berechnungen	87
4.9.1	Bestimmung der Länge von Primärwurzel bzw. Hypokotyl	87
4.9.2	Berechnung der relativen Geninduktion	87
4.9.3	Berechnung des Frischgewichts	88
4.9.4	Berechnung der Statistik und Erstellen der Grafiken	88
5	Ergebnisse	89
5.1	Etablierung eines Inkubationssystems zur Analyse des Einflusses von <i>SnRK1</i> auf die <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Arabidopsis</i>) Keimung	89
5.1.1	Phänotypische Untersuchung von Wildtyp und <i>snrk1</i> -Mutante	89
5.1.2	Bestimmung des Zeitpunkts der einsetzenden Photosynthese nach Belichtung	92
5.1.3	Messung der Expression eines Markergens für die Chloroplastenentwicklung	93
5.1.4	Untersuchung der Keimlinge bei konstanter Dunkelheit	94

5.1.5	Die <i>snrk1α1/α2</i> -Doppelmutanten zeigen ein beeinträchtigt Wurzel- und Hypokotylwachstum	95
5.2	Lokalisation von SnRK1α1	96
5.2.1	SnRK1α1:GFP wird im Keimling exprimiert	96
5.3	Die Aktivität von SnRK1α1	98
5.3.1	SnRK1 ist sowohl im Kern als auch im Zytosol aktiv	98
5.4	Supplementierung der Wuchsdefizite der SnRK1-Mutante durch Gabe externer Nährstoffe	100
5.4.1	Phänotypische Untersuchung des Keimlingswachstums nach Gabe von Kohlenhydraten	100
5.4.2	Fütterung mit weiteren Metaboliten	104
5.4.3	Wie verändert die Gabe von Glukose die Genexpression in <i>snrk1α1/α2</i> -Mutanten?	107
5.5	Metabolische Analysen zur Nutzung von Speicherstoffen in der sucrose non-fermenting kinase 1 with catalytic subunits 1 and 2 (<i>snrk1α1/α2</i>)- Mutante während der Keimung	108
5.5.1	Untersuchung des Abbaus von TAGs während der Keimung	108
5.5.2	Analyse der Mobilisierung von Kohlenhydraten während der Keimung	109
5.5.3	Vergleich der Aminosäuregehalte in WT und <i>snrk1α1/α2</i> - Keimlingen	112
5.6	Genomweiter Vergleich der Genexpression in WT und <i>snrk1α1/α2</i> - Keimlingen während der Keimlingsentwicklung	116
5.6.1	Die <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante zeigte eine massive differentielle Tran- skription im Vergleich zum WT	117
5.6.2	Identifizierung von SnRK1-abhängigen Genen zur Mobilisie- rung von Speicherstoffen	121
5.6.3	Identifikation von Regulatoren der Speicherstoffmobilisierung durch Clusteranalysen	124
5.7	Identifizierung transkriptioneller Regulatoren ausgewählter metabo- lischer Zielgene während der Keimlingsentwicklung	125
5.7.1	SnRK1- und Glukose-abhängige Induktion des TFs <i>bZIP63</i>	125
5.7.2	Expression von Genen des Aminosäure-Katabolismus durch <i>bZIP63</i>	127
5.8	Regulation des <i>cyPPDK</i> -Promotors durch SnRK1 und <i>bZIP63</i>	128
5.8.1	Regulation der <i>cyPPDK</i> in Protoplasten	128
5.8.2	Nachweis der in vivo Bindung von <i>bZIP63</i> an den <i>cyPPDK</i> - Promotor	130
6	Diskussion	133
6.1	Induzierbare <i>snrk1α1/α2</i> knock-down Mutanten sind geeignet zur Analyse der Keimlingsentwicklung	133
6.2	Snf1-RELATED PROTEIN KINASE 1 (SnRK1) ist essentiell für die Arabidopsis Keimlingsentwicklung	134

6.3	Koordinierung der Mobilisierung von Speicherstoffen ist eine zentrale Funktion von SnRK1 während der Keimlingsentwicklung	138
6.3.1	Kohlenhydrate sorgen für das erste Wachstum der Pflanze . . .	139
6.3.2	SnRK1 reguliert den Abbau von TAGs	141
6.3.3	Die Degradation von Aminosäuren und Proteinen wird massiv von SnRK1 reguliert	143
6.4	SnRK1-abhängige Regulation von Transkriptionsfaktoren (TFs) während der Keimlingsentwicklung	146
6.5	basic Leucine Zipper (bZIP)63 hat entscheidenden Einfluss auf den Aminosäurekatabolismus in der Keimlingsentwicklung	147
6.6	Zusammenfassendes Modell und Ausblick	149
7	Literatur	153
8	Abbildungsverzeichnis	171
9	Tabellenverzeichnis	175
A	Anhang	177
B	Abkürzungsverzeichnis	187
B.1	Abkürzungen	187
B.2	Gene	189
B.3	Einheiten	191
	Danksagung	193
	Bisherige Publikationen	195

1 Zusammenfassung

Pflanzen müssen sich während der Samenkeimung und Keimlingsentwicklung über eingelagerte Speicherstoffe heterotroph versorgen, bis sie, nach Etablierung ihres Photosyntheseapparats, einen autotrophen Lebensstil führen können.

Diese Arbeit geht von der Hypothese aus, dass der evolutionär konservierten zentral-metabolischen Kinase Snf1-RELATED PROTEIN KINASE 1 (SnRK1) eine besondere Rolle bei der Mobilisierung von Speicherstoffen während der Keimlingsentwicklung zukommt. Während die Bedeutung von SnRK1 als zentraler Regulator katabolischer Prozesse unter Energiemangel- und Stresssituationen bereits gezeigt wurde, war die Funktion von SnRK1 im Zusammenhang mit der Samenkeimung weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass SnRK1 in Arabidopsis die Mobilisierung und Degradation von Speicherstoffen, insbesondere von Triacylglyceride (TAGs), Samenspeicherproteinen und Aminosäuren, steuert. Sowohl Studien zur Lokalisation von SnRK1:GFP-Fusionsproteinen als auch Kinaseaktivitätsassays unterstützen eine mögliche Funktion von SnRK1 während der Keimlingsentwicklung. Eine induzierbare *snrk1*-knockdown Mutante zeigt neben einem eingeschränkten Wurzel- und Hypokotylwachstum auch keine Ausbildung eines Photosyntheseapparats, was die zentrale Rolle der SnRK1 in diesem frühen Entwicklungsstadium untermauert. Durch Fütterungsexperimente mit Glukose konnte der Phänotyp einer *snrk1*-Mutante in Keimlingen gerettet werden. Dies zeigt, dass der metabolische Block durch externe Gabe von Kohlenhydraten umgangen werden kann. Die zentrale Funktion von SnRK1 ist folglich der Abbau von Speicherstoffen und keine allgemeine Deregulation des pflanzlichen Stoffwechsels. Durch massenspektrometrische Untersuchungen von Keimlingen des Wildtyps und der *snrk1*-Mutante konnte gezeigt werden, dass TAGs in der Mutante in der späten Keimlingsentwicklung ab Tag 4 langsamer abgebaut werden als im Wildtyp. Ebenso werden Samenspeicherproteine in der Mutante langsamer degradiert, wodurch die Verfügbarkeit von freien Aminosäuren in geringer ist. Entgegen der allgemeinen Annahme konnte gezeigt werden, dass während der Keimlingsentwicklung zumindest in Arabidopsis, einer ölhaltigen Pflanze, zunächst Kohlenhydrate in Form von Saccharose abgebaut werden, bevor die Degradation von TAGs und Aminosäuren beginnt. Diese Abbauprodukte können dann der Glukoneogenese zugeführt werden um daraus Glukose herzustellen. Mittels Transkriptom-Analysen konnten zentrale SnRK1-abhängige Gene in der Speicherstoffmobilisierung von TAG,

beispielsweise PEROXISOMAL NAD-MALATE DEHYDROGENASE 2 (PMDH2) und ACYL-CoA-OXIDASE 4 (ACX4), und Aminosäuren identifiziert werden. Somit wurde ein Mechanismus der SnRK1-abhängigen Genregulation während der Samenkeimung in Arabidopsis gefunden. Bei der Degradation von Aminosäuren wird die cytosolische PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE (*cyPPDK*), ein Schlüsselenzym beim Abbau bestimmter Aminosäuren und bei der Glukoneogenese, SnRK1-abhängig transkriptionell reguliert. Durch Koregulation konnte der Transkriptionsfaktor bZIP63 (BASIC LEUCINE ZIPPER 63) gefunden werden, dessen Transkription ebenfalls SnRK1-abhängig reguliert wird. Außerdem konnte die Transkription von *cyPPDK* in *bzip63*-Mutanten nur noch sehr schwach induziert werden. In Protoplasten konnte der *cyPPDK*-Promotor durch Aktivierungsexperimente mit bZIP63 und SnRK1 α 1 induziert werden. Durch Mutationskartierung und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)_{PCR} konnte mehrfach eine direkte Bindung von bZIP63 an den *cyPPDK*-Promotor nachgewiesen werden. Zusammenfassend ergibt sich ein mechanistisches Arbeitsmodell, in dem bZIP63 durch SnRK1 phosphoryliert wird und durch Bindung an regulatorische G-Box *cis*-Elemente im *cyPPDK*-Promotor dessen Transkription anschaltet. Infolgedessen werden Aminosäuren abgebaut und wird über die Glukoneogenese Glukose aufgebaut. Dieser Mechanismus ist essentiell für die Übergangsphase zwischen heterotropher und autotropher Lebensweise, und trägt dazu bei, die im Samen vorhandenen Ressourcen dem Keimling zum idealen Zeitpunkt zugänglich zu machen. Darüber hinaus werden Gene im Abbau von verzweigt-kettigen Aminosäuren ebenfalls durch bZIP63 reguliert. Dabei wird dem Keimling Energie in Form von Adenosin-Triphosphat (ATP) zur Verfügung gestellt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Mobilisierung von Speicherstoffen auch während der Keimlingsentwicklung direkt von SnRK1 abhängig ist. Die umfangreichen Datensätze der RNA-Seq-Analysen bieten zudem die Möglichkeit, weitere SnRK1-abhängige Gene der Speichermobilisierung zu identifizieren und somit einem besseren Verständnis der Keimlingsentwicklung beizutragen. Aufgrund der zentralen Bedeutung der SnRK1-Kinase in diesem entscheidenden Entwicklungsschritt ist davon auszugehen, dass diese Erkenntnisse mittelfristig auch für bessere Keimungsraten und somit bessere Erträge in der Landwirtschaft genutzt werden können.

Summary

During seed germination and seedling establishment, seedlings must live heterotrophically on the resources stored in the seed. Only after establishing a fully functional photosynthetic apparatus, the young plant can change to an autotrophic lifestyle - one of the key features of plant life and metabolism.

This work is based on the hypothesis that the evolutionarily conserved central metabolic kinase Snf1-RELATED PROTEIN KINASE 1 (SnRK1) plays a crucial role in the mobilization of storage compounds during seedling establishment. Whereas the importance of SnRK1 as a central regulator of catabolic processes during energy deprivation and stress situations has already been demonstrated, so far, the function of SnRK1 in connection with seed germination had remained largely unresolved. Here, we show for the first time that SnRK1 in *Arabidopsis* controls the degradation of storage resources, especially triacylglycerides (TAG), seed storage proteins and amino acids. Studies on the localization of SnRK1:GFP fusion proteins and as well as kinase activity assays support a possible function of SnRK1 during seedling establishment. An inducible *snrk1*-knockdown mutant is strongly impaired in root and hypocotyl growth and the plant does not develop a photosynthetic apparatus. Feeding experiments with glucose rescued the *snrk1*-mutant phenotype, showing that the metabolic block can be bypassed by external administration of carbohydrates. Thus, the central function of SnRK1 is concluded to be the degradation of the storage resources and rather than a general deregulation of the plant metabolism. Mass spectrometric investigations have shown that TAG degradation and seed storage proteins breakdown are partially impaired in the mutant. Thus, the availability of free amino acids in *snrk1* mutant seedlings is lower in comparison to wild-type. It could be shown that - despite the fact that *Arabidopsis* is an oil-seed plant - carbohydrates, especially sucrose, are the primary resource compound for the seedling before the degradation of TAGs and amino acids is initiated. These degradation products can then be used in gluconeogenesis to produce glucose. Transcriptome analyses have identified key SnRK1-dependent genes, that play a key role in the storage resource catabolism, for example ACYL-CoA-OXIDASE 4 (ACX4) and PMDH2 in TAG breakdown. As an example of an enzyme involved in amino acid catabolism, cyPPDK was further investigated in the course of this study. During the degradation of amino acids, cyPPDK, a key enzyme in the degradation of certain amino acids and gluconeogenesis, is transcriptionally regulated in a SnRK1-dependent manner.

Furthermore, it was discovered that the SnRK1-dependent transcription factor bZIP63 (BASIC LEUCINE ZIPPER 63) is involved in the regulation of amino acid breakdown: In qRT-PCR experiments, *bzip63*-mutants showed no induction of *cyPPDK*, and co-regulation studies showed that *cyPPDK* and bZIP63 are subject to the same SnRK1-dependent regulation pattern during early seedling development. Finally, by mutation mapping and chromatin immunoprecipitation (ChIP)_{PCR}, a direct binding of bZIP63 to the promoter could be demonstrated.

Based on these results, a mechanistic working model was established, proposing bZIP63 to be phosphorylated by SnRK1 to then activate transcription of the *cyPPDK* promoter via binding to regulatory G-box *cis* elements. As a consequence, amino acids are degraded and the metabolites are used to produce glucose via gluconeogenesis. This additional source of energy enables the seedling to make the transition from heterotrophy to autotrophy. Additionally, the degradation of branched-chain amino acids is also regulated by bZIP63. Thereby, ATP is generated to fuel the seedlings energy demands.

In summary, this study shows that SnRK1 plays an essential role in the mobilization of storage compounds in seedlings during the transition from heterotrophic to autotrophic life by supplying the seedling with the much-needed additional energy gained from the breakdown of TAGs and amino acids. Mining the extensive RNA-Seq data sets provided by this study will allow the identification of further SnRK1-dependent genes to further unravel this crucial signaling network. Due to the crucial role that these proteins play in early seedling development, these findings will enable future research to increase seedling vigor and finally crop yield.

2 Einleitung

Im Laufe der 500 Millionen Jahren dauernden Evolution der Landpflanzen (Morris *et al.*, 2018) gab es mehrere Evolutionsschritte, damit Pflanzen an Land überleben können. So wurde bei den ersten Vertretern folgende Schlüsselinnovationen festgestellt: a) der Generationenwechsel (mit dem dazugehörigen Merkmal der vielzelligen, von der Elternpflanze abhängigen Embryonen), b) in Sporangien entstehende Sporen mit einer Zellwand, c) vielzellige Gameten und d) das Vorkommen von Apikalmeristemem. Da manche Merkmale im Laufe der Evolution wieder verloren gegangen sind, besitzen nicht alle Landpflanzen diese vier Eigenschaften. Weitere evolutionäre Schritte waren die Ausbildung eines Wurzelsystems, die Bildung von Blättern und die Entwicklung von Samen. Während bei Gymnospermen die Samenanlagen nicht in einem Fruchtknoten eingeschlossen sind, haben Angiospermen (Bedecktsamer) geschlossene Fruchtblätter. Ihre Samen bestehen aus dem Embryo mit einem Keimblatt bei Monocotyledonen oder zwei Keimblättern bei Dicotyledonen sowie dem umgebenden triploiden Endosperm, das als Nährgewebe fungiert (Weitbrecht *et al.*, 2011). Beide Samenarten sind von einer schützenden Samenschale (*Testa*) umgeben und können nach Freisetzung von der Mutterpflanze über Tage, Monate oder sogar Jahre in ihrem Ruhezustand verbleiben und später auskeimen (Bresinsky, 2008). Samen dienen zum einen als Nahrungsmittel, zum anderen stehen sie auch für den Beginn eines neuen Lebenszyklus, dessen Ziel es ist, eine Pflanze zu bilden, die sich erneut fortpflanzen kann. Diese Dissertation befasst sich mit dem Thema der Speicherstoffmobilisierung im auskeimenden Samen sowie mit der Keimlingsentwicklung bis zur autotrophen Versorgung der Pflanze durch Photosynthese.

2.1 Samenaufbau, Keimung und Keimlingsentwicklung

Reservestoffe sind Energiequellen, die dem Samen während der Keimung und frühen Keimlingsentwicklung helfen, seinen Energiebedarf zu decken und somit das Überleben sichern. Je nach Pflanzenart unterscheidet sich die Struktur, der Ort und die Komposition der eingelagerten Reservestoffe, welche aus Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten bestehen können (J. Derek Bewley, 1994; Weitbrecht *et al.*, 2011).

Dabei unterscheidet sich der Aufbau von Samen deutlich. So haben ölhaltige Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) und Gartenkresse (*Lepidium sativum*) eine dünne Endospermschicht, während der Embryo von Tabak (*Nicotiana tabacum*) von einem dicken Endosperm umgeben ist. Erbsen (*Pisum sativum*) dagegen speichern vor allem Proteine und Stärke in ihren Keimblättern. In reifen Erbsensamen gibt es kein Endosperm (Weitbrecht *et al.*, 2011).

Abb. 2.1 zeigt die Morphologie unterschiedlicher Samen. Während bei Erbsen und Arabidopsis die Kotyledonen den Speicher der Reservestoffe darstellen, ist es bei Tabak das Endosperm. Bei Arabidopsis und Tabak befindet sich der Embryo in der Mitte des Samens und wird vom Endosperm umgeben. Bei Erbsen ist durch die großen Speicherkotyledonen für den Embryo kein Platz, wodurch er auf eine Seite gedrängt wird. Alle Embryos sind von einer schützenden Samenschale umgeben. Das mikropylare Endosperm bei Arabidopsis und Tabak ist der Austrittspunkt der Keimwurzel (*Radicula*) bei der Keimung. Während der letzten Reifungsstadien verliert der Samen Wasser bis er nur noch fünf bis fünfzehn Gewichtsprozent Wasser enthält. Danach tritt der Embryo häufig in eine Samenruhe (*Dormanz*) ein (Bewley, 1997). In dieser Zeit sind Wachstum und Stoffwechsel fast komplett eingestellt. Durch Transkriptomanalysen in Arabidopsis konnten allerdings mehr als 10.000 mRNAs identifiziert werden, die in dieser Entwicklungsphase gespeichert sind (Nakabayashi *et al.*, 2005; Kimura und Nambara, 2010; Okamoto *et al.*, 2010) und

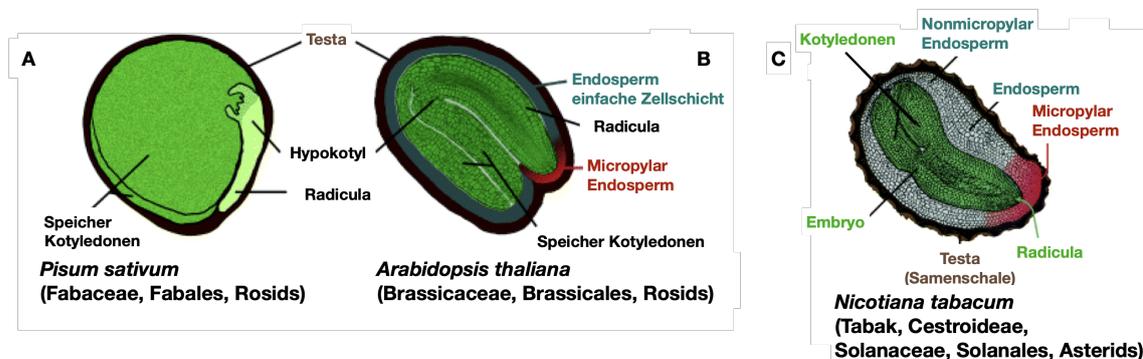


Abbildung 2.1 – Biodiversität der Struktur reifer Samen von Angiospermen. Der diploide Embryo ist von zwei Deckschichten umgeben: dem triploiden (bei den meisten Arten) Endosperm (Nährgewebe) und der diploiden Testa (Samenschale; mütterliches Gewebe). Bei manchen Arten wird das Endosperm während der Samenentwicklung vollständig abgebaut und die Nährstoffe in die Speicherkotyledonen verlagert. Reife Samen von (A) Erbse *Pisum sativum* (ohne Endosperm) und (B) *Arabidopsis thaliana* (einzellige Endospermschicht) sind durch Embryonen mit Speicherkotyledonen gekennzeichnet. (C) zeigt den reifen Samen von Tabak *Nicotiana tabacum* (mehrzellige Endospermschicht) und das mikropylare Endosperm, was als Keimhemmung bei Samen von Solanaceae bekannt ist. Modifiziert nach Finch-Savage und Leubner-Metzger (2006).

dem keimenden Samen nach der Samenruhe schnell zur Verfügung stehen (Weitbrecht *et al.*, 2011). Für das Beenden der Dormanz können die Lebensbedingungen von Art zu Art variieren. Manche Samen benötigen dazu Licht oder Hitze, andere wiederum Kälte bzw. heftigen Regen (Campbell, 2009). Bei *Arabidopsis* verwendet man für das gleichzeitige Auskeimen der Samen sowohl Kälte (Stratifikation) als auch Feuchtigkeit (Shropshire Jr *et al.*, 1961; Cone und Spruit, 1983).

Die Wasseraufnahme erfolgt in drei Phasen, wobei es in der ersten Phase, bedingt durch das niedrige Wasserpotential, zu einer raschen Wasseraufnahme kommt (Woodstock, 1988; Obroucheva und Antipova, 1997), der Samen anschwillt und sich Größe und Form verändern (Robert *et al.*, 2008; Preston *et al.*, 2009). In der zweiten Phase, deren Dauer variabel ist, bleibt der Wassergehalt konstant. Bei Pflanzen mit einem *zweistufigen Keimungsprozess*, beispielsweise Tabak, Kresse oder *Arabidopsis*, umfasst diese Phase den Bruch der Samenschale (Weitbrecht *et al.*, 2011). In der dritten Phase kommt es zu einer erneuten Wasseraufnahme, dem Aufbruch des Endosperms und der Ausstülpung der Keimwurzel, womit die Keimung abgeschlossen wird. Danach setzt sich die Wasseraufnahme im Keimlingswachstum fort (Weitbrecht *et al.*, 2011). Arten, die kein Endosperm enthalten (Erbsen oder Raps), treten nach dem Bruch der Samenschale direkt in die Phase drei ein (Weitbrecht *et al.*, 2011), wodurch man hier von *einstufiger Keimung* spricht. Nach der Quellung werden die Speicherstoffe im Endosperm bzw. den Kotyledonen enzymatisch abgebaut und zu den Wachstumsregionen des Embryos transportiert (heterotrophes Wachstum). Dabei ist die Effizienz der Reservemobilisierung für die Vitalität der Keimlinge entscheidend (Finch-Savage und Bassel, 2016). Bei der Keimung unterscheidet man zwischen epigäischer und hypogäischer Keimung (vgl. Abb. 2.2). Bei Vertretern der

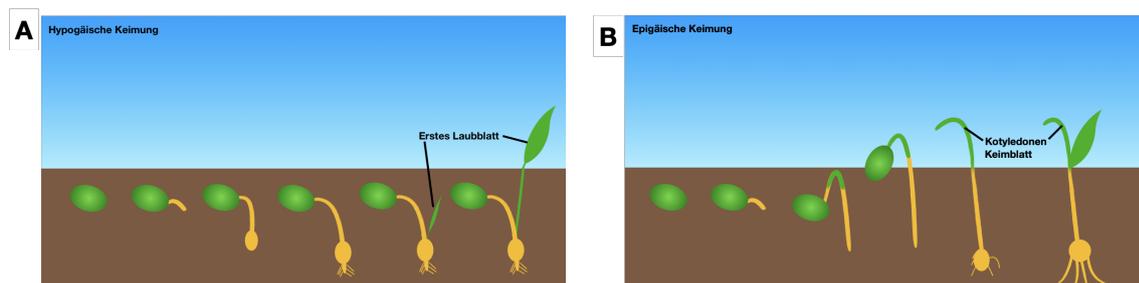


Abbildung 2.2 – Vergleich von hypogäischer und epigäischer Keimung. (A) Bei der hypogäischen Keimung, wie sie bei der Erbse vorkommt, verbleiben die Kotyledonen in der Erde. Die Primärblätter befinden sich darüber. (B) Bei Pflanzen mit epigäischer Keimung wie *Arabidopsis* wachsen die Kotyledonen mit über die Erdoberfläche und bilden die ersten photosynthetisch aktiven Blätter.

hypogäischen Keimung, wie Erbsen, wachsen aus dem Samen sowohl die Radicula als auch das Epikotyl, der Bereich zwischen Keim- und Primärblättern. Aus der Radicula bildet sich die Wurzel. Das Hypokotyl, welches sich im Anschluss an die Radicula befindet, streckt sich nicht. Das Epikotyl streckt sich zur Erdoberfläche, wo es diese durchbricht und die ersten Blätter ausbildet. Die Kotyledonen als Speicherstoffreservoir und die Samenschale verbleiben in der Erde (Mayer, 1982). Bei epigäischer Keimung tritt aus dem Samen die Radicula aus und entwickelt sich zur Wurzel. Das Hypokotyl streckt sich und schiebt den verbleibenden Samen mit Samenschale und Keimblättern zur Oberfläche. Dazu bildet sich ein Hypokotylhaken der geringen Widerstand gegen die Erdoberfläche bietet und die empfindlichen Keimblätter schützt. Mit dem Durchbrechen der Erdoberfläche und dem Erreichen des Tageslichts stoppt das Hypokotylwachstum, die Samenschale fällt ab, der Hypokotylhaken wächst sich aus und die Keimblätter strecken sich dem Licht entgegen (Mayer, 1982). Dabei entwickeln sich Pflanzen, die in Dunkelheit (Skotomorphogenese) angezogen worden sind, anders als vergleichbare Pflanzen im Licht (Photomorphogenese). Abb. 2.3 zeigt die Unterschiede am Beispiel von *Arabidopsis*. So entfalten sich die Kotyledonen bei der Photomorphogenese zügig und ergrünen. Bei der Skotomorphogenese hingegen streckt sich das Hypokotyl, der Hypokotylhaken bleibt geschlossen und das Ergrünen bleibt aus. So kann die Pflanze alle Reservestoffe verwenden um das Licht zu erreichen (Bresinsky, 2008). Dies wird durch einen Komplex

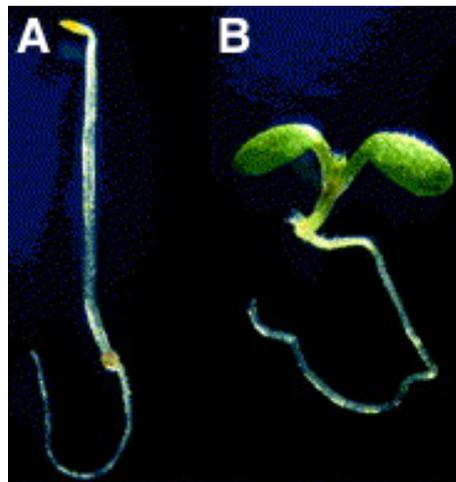


Abbildung 2.3 – Vergleich von Photomorphogenese und Skotomorphogenese am Beispiel von *Arabidopsis*. (A) Keimling der in Dunkelheit angezogen wurde besitzt verlängerte Internodien, einen Hypokotylhaken mit geschlossenen Kotyledonen und besitzen kein Chlorophyll. (B) Keimling, der im Licht gehalten wurde, zeigt ein kurzes Hypokotyl und die Synthese von Chlorophyll in den Kotyledonen (Osterlund *et al.*, 1999).

aus CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)/DEETIOLATED (DET)/FUSCA (FUS)-Proteinen reguliert, der im Kern lokalisiert ist und die Skotomorphogenese im Dunkeln über vielfältige regulatorische Mechanismen auf transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene fördert (Xu, 2019).

In Dunkelheit blockieren PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs), eine Untergruppe der basic helix-loop-helix (bHLH)-TFs, sowie COP1 die durch HYPOCOTYL 5 (HY5), einem bZIP-TF, vermittelte Zellteilung und Expansion der Kotyledonen (Stoynova *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2014). Dabei inhibiert COP1, wie in Abb. 2.4 gezeigt, B-BOX BINDING DOMAIN (BBX)21, HY5 und HY5 HOMOLOG (HYH), indem es diese ubiquitiniert, was zu einer Degradation durch das 26S Proteasom führt (Lau und Deng, 2012; Huang *et al.*, 2014).

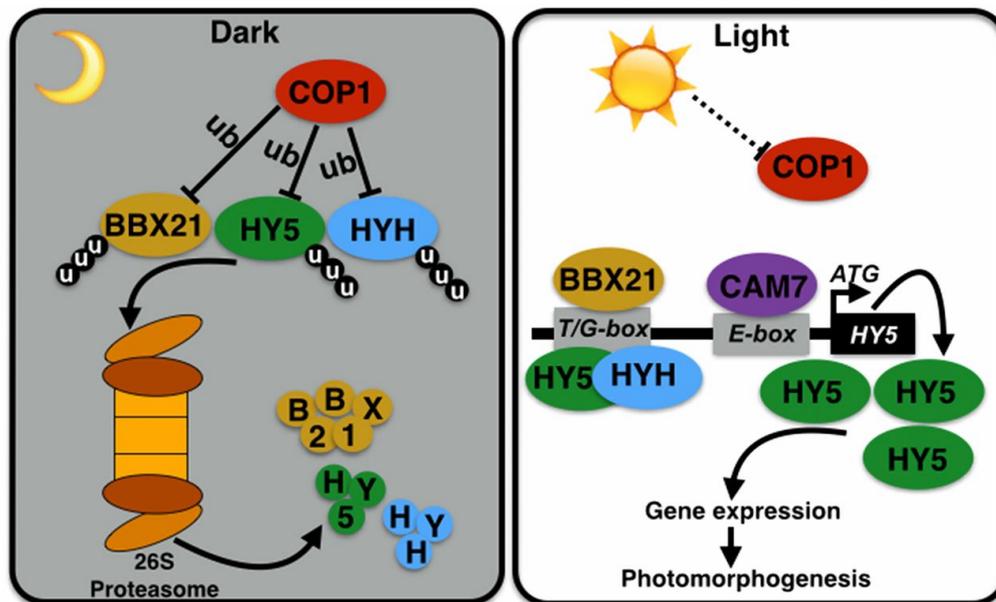


Abbildung 2.4 – Arbeitsmodell das zeigt, wie das Signalnetzwerk COP1-HY5 arbeitet. Im Dunkeln zielt aktiviertes COP1 direkt auf nachgeschaltete Substrate wie BBX21, HY5 und HYH zur Ubiquitinierung, die im weiteren Verlauf mittels Proteolyse durch das 26S-Proteasom-System abgebaut werden. Bei Belichtung wird die Aktivität von COP1 gehemmt, was zur Anreicherung von BBX21, HY5 und HYH führt. Diese können wiederum an den *HY5*-Promotor binden und diesen induzieren, was zu einer Akkumulation von HY5 führt. Dadurch können viele Gene reguliert werden, die an der Förderung der Photomorphogenese beteiligt sind. ub Ubiquitinierung; u Ubiquitin (Xu *et al.*, 2016).

Durch Lichtreize wird die Blockade von HY5 durch COP1 aufgehoben, indem COP1 inaktiviert wird, und es zur Anreicherung von HY5 und HYH kommt (Xu *et al.*, 2016). BBX21, HY5 und HYH binden wiederum an den *HY5*-Promotor und induzieren die Transkription von *HY5*, wodurch HY5 akkumuliert (Xu *et al.*, 2016).

Darüber hinaus ist HY5 im Licht vielfältig an der Regulation der Genexpression beteiligt (Lee *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Die Photomorphogenese schließt dann mit dem Aufrichten des Hypokotyls und der Entfaltung der Keimblätter ab (Josse *et al.*, 2011). In Verlängerung zu den Keimblättern wächst das Epikotyl und es entstehen die ersten Primärblätter. Diese ergrünen und produzieren durch Photosynthese Kohlenhydrate für die Keimpflanze und lösen die Kotyledonen als Energielieferant ab (autotrophes Wachstum). Durch die lichtinduzierte Änderung der Genexpression beendet der Keimling die Photomorphogenese und ist danach selbst in der Lage, Glukose durch Photosynthese herzustellen und sich autotroph zu versorgen.

2.2 Reserven im Samen als Schlüssel zur Keimlingsentwicklung

Speicherstoffe, wie sie in dieser Arbeit untersucht werden, versorgen nach der Reifung den Samen mit Energie. Dabei unterscheidet man zwischen Fetten/Ölen, Kohlenhydraten wie sie bei vielen Getreiden vorkommen und Proteinen beispielsweise in Sojabohnen (*Glycine max*). Lipide, in der Form von Triacylglyceride (TAGs), bilden dabei eine wichtige Speicherform in vielen Pflanzenarten wie Arabidopsis, Sonnenblume (*Helianthus annuus*) und Raps (*Brassica napus*) (Graham, 2008). In Arabidopsis sind 90 % der Speicherstoffe (TAG und Proteine) in den Kotyledonen gespeichert, der Rest im Endosperm (Penfield *et al.*, 2004). Deshalb stellt sie eine geeignete Versuchspflanze für die Untersuchung von Speicherstoffen dar. Die Glukose für die Keimlingsentwicklung wird dabei durch Glukoneogenese aus Fetten und Proteinen der Pflanze zur Verfügung gestellt (Eastmond, 2006; Kelly *et al.*, 2011). Dabei werden TAGs bevorzugt für die Entwicklung von photosynthetischen Organen verwendet, das Öl im Endosperm dient dem Hypokotylwachstum (Gommers und Monte, 2018). Während durch Licht in Arabidopsis, Sonnenblumen und Raps die Mobilisierung von Speicherstoffen verbessert wird (Leivar *et al.*, 2009), ist dies beispielsweise bei Tomaten (*Solanum lycopersicum*) und Senf (*Sinapis alba*) nicht der Fall (Bajracharya und Schopfer, 1979; Eckstein *et al.*, 2016). TAGs werden während der Samenreifung im Endoplasmatischen Reticulum durch einen Knospenprozess zu Öltröpfchen synthetisiert (Huang, 1992; Huang, 1996) und bilden sphärische Organellen, bestehend aus einer TAG-Matrix und umgeben von einer Phospholipid-Einzelschicht, welche durch Oleosine stabilisiert werden (Murphy, 1993). Diese Oleosine besitzen außerdem eine Erkennungssequenz für Lipasen (Chapman *et al.*, 2012).

Für den Abbau von TAGs sind in Arabidopsis die zwei Lipasen SUCROSE DEPENDENT1 (SDP1) und SDP1-LIKE (SDP1L) verantwortlich, wobei SDP1 die bedeutende ist und in einem Mutanten-Screen gefunden wurde, bei dem die Pflanzen keine TAGs abbauen konnten (Eastmond, 2006). Allerdings wuchsen die Mutanten bei Darbietung einer anderen Kohlenstoffkomponente wie Saccharose vergleichbar mit dem Wildtyp (Eastmond, 2006). In der Doppelmutante (*sdp1sdp1l*) konnte kein Speicheröl abgebaut werden und die Pflanzen wuchsen sehr langsam (Eastmond, 2006; Kelly *et al.*, 2011). Bisher ist jedoch nicht gesichert, ob die lichtverstärkte Ölmobilisierung während der Keimlingsentwicklung durch mehr Lipasen oder eine erhöhte Aktivität der Lipasen einhergeht (Gommers und Monte, 2018). Der Abbau von Fettsäuren findet in mehreren Schritten im Peroxisomen statt. Zunächst werden die Fettsäuren über den Transporter PEROXISOMAL ABC TRANSPORTER 1 (PXA1)/PEROXISOME DEFECTIVE 3 (PED3)/COMATOSE (CTS) in das Peroxisom transportiert (Zolman *et al.*, 2001). Die nun im Peroxisom befindlichen Fettsäuren werden durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut. Wichtig dabei sind die Enzyme LONG CHAIN ACYL-CoA-SYNTASE 6/7 (LACS6/7), ACYL-CoA-OXIDASE 1-4 (ACX1-4), je nach Länge der Fettsäuren (Graham, 2008; Khan *et al.*, 2012), MULTIFUNCTIONAL PROTEIN 2 (MFP2) (Rylott *et al.*, 2006), ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM 1 (AIM1) (Richmond und Blecker, 1999) und 3-KETOACYL-CoA THIOLASE 2 (KAT2) (Hayashi *et al.*, 1998; Germain *et al.*, 2001).

PEROXISOMAL NAD-MALATE DEHYDROGENASE 1 (PMDH1) und PMDH2 sind zwar keine direkten Enzyme der β -Oxidation, liefern aber Reduktionsäquivalente (oxidiertes NAD⁺), damit die β -Oxidation weiterlaufen kann (Pracharoenwattana *et al.*, 2007). Für die Verstoffwechslung von ungesättigten Fettsäuren mit Doppelbindungen sind noch weitere Enzyme nötig (Hu *et al.*, 2012). Acetyl-CoA kann, wie in Abb. 2.5 gezeigt, als Produkt der β -Oxidation nur nach Umwandlung zu Zitrat in den Mitochondrien veratmet werden (Pracharoenwattana *et al.*, 2005) oder wird dem Glyoxylat-Zyklus zugeführt (Pracharoenwattana und Smith, 2008). Im Glyoxylat-Zyklus wird es von CITRATE SYNTHASE (CSY) und den pflanzenspezifischen Enzymen ISOCITRATE-LYASE (ICL) und MALATE-SYNTASE (MLS) zu Succinat und Malat umgewandelt und kann so für die Glukoneogenese verwendet werden (Pracharoenwattana und Smith, 2008). Allerdings wird die Aktivität von ICL und MLS durch Licht beeinflusst. Im Zitratzyklus werden Kohlenstoffkörper abgebaut um Energie zu gewinnen. So wird aus Succinat Fumarat gebildet, das durch die Fu-

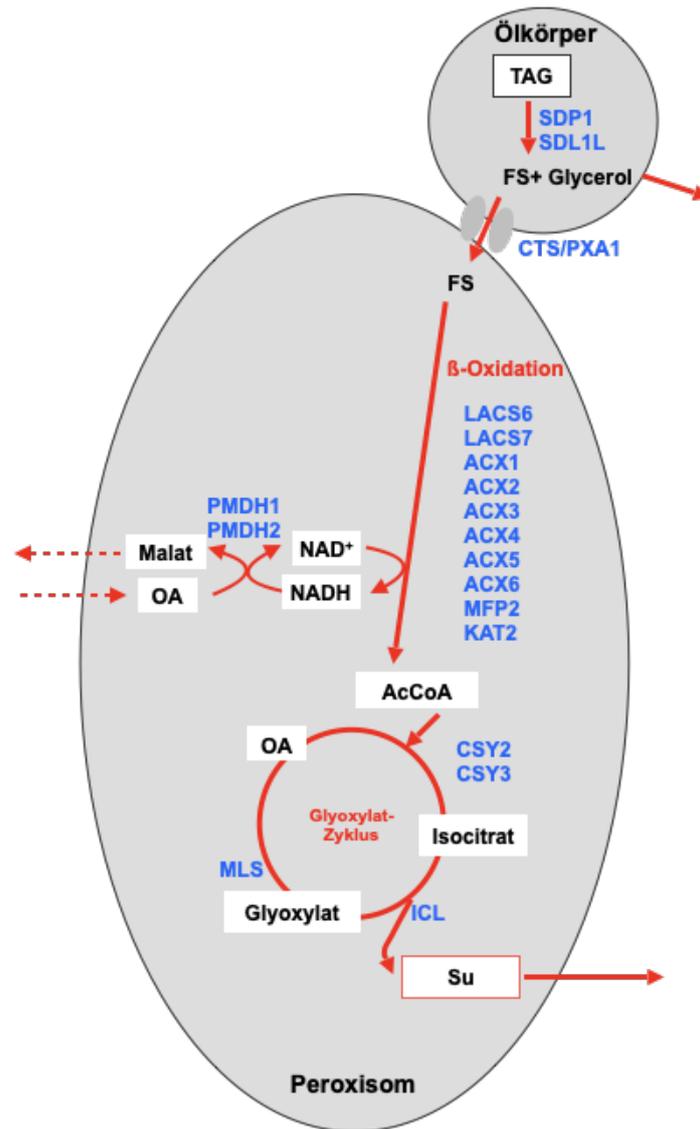


Abbildung 2.5 – Übersicht des Glyoxylatzyklus in den Peroxisomen mit der Rolle der peroxisomalen NAD⁺-Malat Dehydrogenase (PMDH) in Arabidopsis. PMDH oxidiert NADH, damit die β -Oxidation weiterlaufen kann. Das Modell schlägt den Export von Malat aus den Peroxisomen und den Import von Oxalacetat vor, um die Aktivität von PMDH als einen Schlüsselschritt der β -Oxidation, zu unterstützen. TAG Tri Acyl Glycerid, FA Fettsäure, NAD⁺/NADH Nicotinamidadenindinukleotid, OA Oxalacetat, AcCoA Acetyl-CoA, Su Succinat.

marase zu Malat wird. Die Malatdehydrogenase wandelt Malat zu Oxalacetat um. Durch die Zitrat-Synthase wird Zitrat hergestellt (Berg, 2007). Über die Glukoneogenese können aus den Dicarbonsäuren Hexosen erzeugt werden. Dazu wird Oxalacetat aus dem Kreislauf entnommen und über die PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 1 (PCK1) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgewandelt (Ryllott *et al.*, 2003). Die Expression von *PCK1* ist dabei zwei Tage nach Keimung

am stärksten, was mit dem größten Abbau an Speicherstoffen übereinstimmt (Graham, 2008; Eastmond *et al.*, 2015). Obwohl beschrieben wird, dass PCK1 wichtig für die Glukoneogenese ist, weisen *pck1*-Mutanten, sowohl im Dunkeln als auch bei Licht, nur geringe Unterschiede zum Wildtyp auf (Rylott *et al.*, 2003; Penfield *et al.*, 2004). Jedoch nimmt die Überlebensrate von *pck1*-Mutanten unter nicht optimalen Bedingungen, beispielsweise unter geringerer Lichtintensität und verkürzter Photoperiode, im Vergleich zu Wildtypkeimlingen ab (Eastmond *et al.*, 2015). Während es im Samen sowohl bei den Fettsäuren, als auch bei der Proteinmenge keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *pck1*-Mutante gab, war der Fettsäure- und Proteingehalt bei fünf Tage alten Keimlingen leicht erhöht und konnte durch externe Zuckergabe (30 mM Glukose) wieder auf das Niveau des Wildtyps gesenkt werden (Eastmond *et al.*, 2015). Der Zuckergehalt der Mutante hingegen war an Tag 2 um 70 % reduziert, was die Rolle von PCK1 während der Glukoneogenese unterstreicht (Eastmond *et al.*, 2015).

Neben den Ölen bilden auch Samenspeicherproteine (SSPs) eine Energieressource (Stewart und Beevers, 1967). Dabei verändern sich die aminosäurehaltigen Stoffwechselwege im Lebenszyklus einer Pflanze und sind bei keimenden Pflanzen hauptsächlich katabolischer Natur, während sie später der Synthese neuer Aminosäuren und Proteine dienen (Hildebrandt *et al.*, 2015). Bei der Keimung werden zunächst SSPs abgebaut, um Aminosäuren für die Biosynthese der von der wachsenden Pflanze benötigten Proteine zu liefern (Hildebrandt *et al.*, 2015). Bei SSPs, welche durch Osborne (1924) aufgrund ihrer sukzessiven Extrahierbarkeit in Wasser, verdünnter Salzlösung, Alkoholen/Wasser-Gemischen bzw. verdünnter Säure/Alkali in die Gruppen Albumine, Globuline, Prolamine und Gluteline klassifiziert wurden, sind große Mengen an Aminosäuren zu einem kleinen Volumen komprimiert. Dies führt dazu, dass sie während der Samenreifung schlecht abgebaut werden können (Shutov *et al.*, 2003). Die SSPs werden in Proteinspeichervakuolen gelagert. Dabei hängt der Speicherort zum einen von der Pflanze ab, zum anderen welche SSPs eingelagert werden (Jiang *et al.*, 2001; Shewry und Halford, 2002). Der Abbau von SSPs erfolgt durch Proteasen, beispielsweise Cystein-, Serin-, Asparagin oder Metalloproteasen, und Dipeptidasen (Roberts *et al.*, 2012), die teilweise schon während der Samenreifung angelegt wurden und nach Wasseraufnahme aktiv werden (Tan-Wilson und Wilson, 2012). Dabei werden die Proteasen während der Samenreifung schon zu den SSPs gebracht und durch verschiedene Einflüsse, wie der Änderung des pH, des Redox-Status oder der hormonellen Kontrolle, aktiviert (Tan-Wilson und

Wilson, 2012). Neben dem Abbau von SSPs zur Energiegewinnung, wird auch der Katabolismus von Fettsäuren und Stärke, unterstützt bis ein funktionierender Photosyntheseapparat gebildet ist (Galili *et al.*, 2014). Dieses Nährstoffrecycling wird in Pflanzen immer wieder beobachtet und durch den Prozess der Autophagie erreicht (Lv *et al.*, 2014; Avin-Wittenberg *et al.*, 2015). Dabei werden cytosolische Fragmente oder ganze Organellen von Autophagosomen umschlossen, zur Vakuole transportiert und dort degradiert (Avila-Ospina *et al.*, 2014; Michaeli und Galili, 2014). Eine wichtige Rolle während der Degradation nehmen Cystein- und Serin-Proteasen ein (Roberts *et al.*, 2012). Auch beim Abbau von carbonylierten Proteinen, die während der Seneszenz akkumulieren, helfen Proteasomen (Jain *et al.*, 2008). Allerdings sind die Gene, die für die wichtigsten Proteasen des seneszenzassoziierten Proteinabbaus verantwortlich sind, noch weitgehend unbekannt (Distelfeld *et al.*, 2014).

Die Menge an einzelnen Aminosäuren hängt dabei nicht nur vom Verhältnis von Aminosäure-Biosynthese und -Degradation ab, sondern auch vom Abbau und von der Biosynthese von Proteinen (Hildebrandt *et al.*, 2015). So steigen Asparagin, Glutamin, Prolin und Threonin relativ am stärksten während der Keimung in Arabidopsis an, Glycin und Tyrosin am geringsten (Silva *et al.*, 2017). Ähnlich sieht es bei ca. 20 Tage alten Pflanzen aus. Auch hier unterscheidet sich der Pool an freien Aminosäuren von dem an Proteinen gebundenen Aminosäuren (Hildebrandt *et al.*, 2015). Außerdem sind viele Aminosäuren Vorläufer für die Biosynthese anderer Verbindungen wie Nukleotide, Phytohormone oder Sekundärmetabolite (Hildebrandt *et al.*, 2015).

Während bei Tieren für alle 20 Aminosäuren bereits vollständige Abbaupfade beschrieben sind, ist das Wissen über den genauen Abbau pflanzlicher Aminosäuren begrenzt (Bender, 2012; David L. Nelson, 2012). Die Kohlenstoffskelette der Aminosäuren werden im Allgemeinen in Vorläufer- oder Zwischenprodukte des Zitratzyklus abgebaut, tragen so zum mitochondrialen Metabolismus und zur ATP-Produktion bei oder werden in andere Aminosäuren umgewandelt. Außerdem führt die Oxidation mancher Aminosäuren, beispielsweise Leucin, Isoleucin, Valin, Lysin und Prolin, direkt Elektronen in die mitochondriale Elektronentransportkette ein (Engqvist *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2011; Schertl *et al.*, 2014).

Die Energieausbeute unterscheidet sich dabei stark von den zur Verfügung stehenden Aminosäuren. So reicht die Degradation von Glycin zu nur 2,5 Molekülen ATP, während Tyrosin und verzweigtkettige Aminosäuren bis zu 34 Moleküle ATP liefern, was vergleichbar mit Glucose als Substrat ist (Hildebrandt *et al.*, 2015).

Einen Überblick über den Abbau von Aminosäuren in Pflanzen gibt Abb. 2.6.

Neben Fettsäuren können auch bestimmte Aminosäuren zunächst über den Zitratzyklus und weiter über PCK1 zu PEP umgewandelt werden (Malone *et al.*, 2007). Andere Aminosäuren, beispielsweise Alanin, Cystein, Glycin, Serin, Threonin und Tryptophan, werden hingegen zu Pyruvat metabolisiert und anschließend mittels cytosolische PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE (cyPPDK) zu PEP

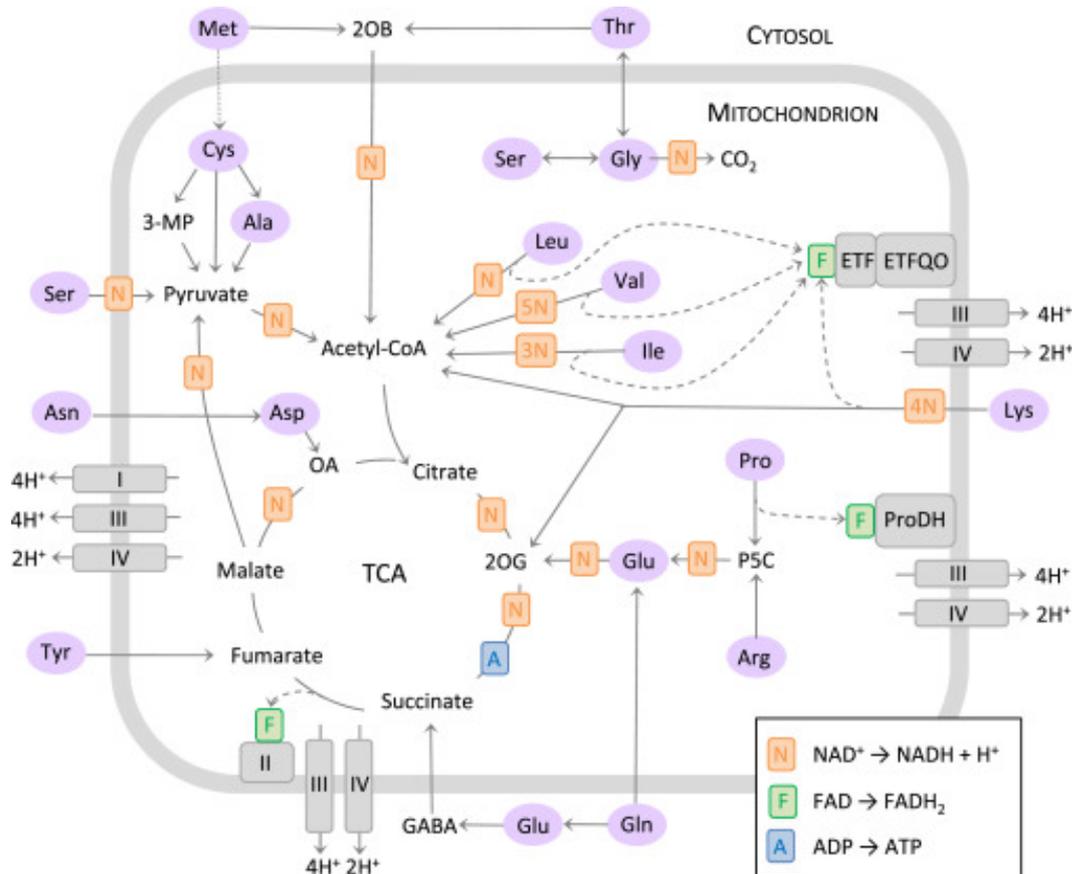


Abbildung 2.6 – Subzelluläre Lokalisation des Aminosäure Katabolismus in Pflanzen. Aminosäuren (violett hervorgehoben) werden zu Vorläufern oder Zwischenprodukten des Zitratzyklus abgebaut. Die meisten Reaktionsschritte finden entweder im Cytosol oder in den Mitochondrien statt. Um die Menge an ATP abzuschätzen, die durch Degradation einzelner Aminosäuren zur Verfügung stehen, sind die Oxidationsstufen farblich dargestellt (NAD-abhängige Dehydrogenasen mit einem orangen „N“ und FAD-abhängige Dehydrogenasen mit einem grünen „F“). Die ATP-Produktion durch Phosphorylierung auf Substratebene ist durch ein blaues „A“ dargestellt. Die Menge an Protonen, die über die innere Mitochondrienmembran mittels der Atmungskettenkomplexe (I, III und IV) transloziert werden ist ebenfalls abgebildet. 2OB, 2-Oxobutyrat; 2OG, 2-Oxoglutarat; 3MP, 3-Mercaptopyruvat; ETF, Elektronentransfer-Flavoprotein; ETFQO, Elektronentransfer-Flavoprotein:Ubichinon-Oxidoreduktase; GABA, γ -Aminobuttersäure; OA, Oxalacetat; P5C, 1-Pyrrolin-5-Carboxylat; ProDH, Prolin-Dehydrogenase; TCA, Tricarbonsäurezyklus. Abb. entnommen von Hildebrandt *et al.* (2015).

umgewandelt, um so durch die Glukoneogenese zu Hexosen aufgebaut zu werden (Eastmond *et al.*, 2015). Dabei unterscheidet man zwei verschiedene PPDK Isoenzymen. Während die chloroplastidäre PPDK in der Keimung nicht exprimiert wird und somit vermutlich hier keine Rolle spielt, ist die cytosolisch lokalisierte PPDK in der Keimlingsentwicklung von entscheidender Bedeutung (Eastmond *et al.*, 2015). Die cyPPDK wird bereits mit der Keimung exprimiert und bleibt während der Keimung konstant (Eastmond *et al.*, 2015). Während Samen der *ppdk*-Mutante keine Unterschiede im Fettsäure- und Proteingehalt zum Wildtyp zeigen, steigt die Fettsäuremenge an Tag 5 an, kann durch Zuckergabe auf das Niveau des Wildtyps reduziert werden. Auch der Zuckergehalt ist bei zwei Tage alten *ppdk*-Mutanten um ca. 30 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert, was zeigt, dass cyPPDK wichtig für die Glukoneogenese ist (Eastmond *et al.*, 2015). Dagegen ist in einer *ppdk-pck1*-Doppelmutante der Zuckergehalt um bis zu 90 % reduziert, während die Aminosäure- und Fettsäuregehalte von fünf Tage alten Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht sind, wobei in Samen noch die gleichen Gehalte vorhanden waren (Eastmond *et al.*, 2015). Da Aminosäuren, die mittels cyPPDK metabolisiert werden, bis zu 1/3 der SSPs ausmachen, ist die Nutzung beider Wege des Abbaus von Speicherstoffen für eine funktionierende Keimlingsentwicklung von großer Bedeutung. Der signifikante Einfluss von *pck1* und *ppdk* auf den Zuckergehalt und die bei der *ppdk-pck1*-Mutante gezeigte additive Wirkung legen nahe, dass beide Kinasen für die Antworten auf Zuckermangel (engl: „sugar-starvation responses“) wichtig sind (Eastmond *et al.*, 2015).

Höhere Pflanzen, wie Getreide, verwenden als Reservestoffe Kohlenhydrat. Die Hauptsubstrate sind Saccharose und Stärke, welche für die Glykolyse verwendet werden (Plaxton, 1996). In Arabidopsis ist Saccharose hauptsächlich in den Kotyledonen und in sehr gering Mengen Stärke in der Samenschale gespeichert (Fallahi *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2017). Bei Getreide ist die Stärke im Endosperm gespeichert und wird zu Malzzucker abgebaut (Lu *et al.*, 2007). Über die Glykolyse, einem katabolischen Weg der Kohlenhydratdegradation, werden zwei grundlegende Funktionen erfüllt. Zum einen werden Hexosen oxidiert, um ATP, Reduktionsmittel und Pyruvat zu erzeugen. Zum anderen produziert die Glykolyse Bausteine für den Anabolismus. Dabei handelt es sich um eine sequentielle Umwandlung von Hexosen in Pyruvat. Diese erfolgt im Zytosol (Plaxton, 1996). Die Separierung zwischen Zytosol und Chloroplasten verhindert das gleichzeitige Auftreten potenziell inkompatibler Stoffwechselprozesse. Bei adulten Pflanzen ist die Hauptaufgabe der Glykolyse in

Chloroplasten im Dunkeln die Beteiligung am Abbau von Stärke und der Erzeugung von Kohlenstoffskeletten, Reduktionsmittel und ATP für anabole Wege. Im Samen wird Saccharose durch SUCROSE SYNTHASE (SUS) und Invertase in Glukose und Fruktose gespalten (Fallahi *et al.*, 2008) und im Falle von Glukose über Glukose-6-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt. Durch Phosphorylierung wird daraus Fruktose-1,6-BisPhosphat und weiter Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P). Über mehrere Schritte (vgl. Abb. 2.7) wird aus G3P Phosphoenolpyruvat und im nächsten Schritt Pyruvat (Plaxton, 1996).

Dieser Prozess kann jedoch auch *umgedreht* werden, um aus Malat wieder Glukose herzustellen. Dabei müssen einige Schritte umgangen werden, weil diese stark exergonisch sind. Pyruvat wird daher zunächst carboxyliert und es entsteht Oxalacetat, welches durch Decarboxylierung und Phosphorylierung mittels PCK1 weiter zu PEP umgewandelt wird. So läuft die Glukoneogenese über mehrere Schritte im Zytosol ab, bis schließlich Glukose gebildet wurde. Dabei erfolgt bei ausreichender Menge von α -D-Fruktose-6-Phosphat die Förderung der Glykolyse. Wenn die Menge von α -D-Fruktose-6-Phosphat unter einen Schwellenwert absinkt, erfolgt die Förderung der Glukoneogenese (Richter, 1997). Bisher wurde die Bedeutung von Glukose während der Keimung und Keimlingsentwicklung häufig im Zusammenhang von Glukose als Signalmolekül, beispielsweise im Zusammenspiel mit Abscisic Acid (ABA) insensitiven Mutanten, beschrieben, nicht aber von Glukose als Speicherstoff (Dekkers, 2006; Eveland und Jackson, 2012).

Zucker ist neben einer Energiequelle auch ein wichtiges Entwicklungssignal. Daher können alle biologischen Systeme auch den Zuckergehalt regulieren. So ist Zucker ein altes und regulatorisch konserviertes Signal, das Genexpression, Wachstum und Entwicklung steuert (Sheen, 2014; Winkler, 2018).

2.3 SnRK1, eine zentrale regulatorische Kinase katabolischer Prozesse

Zucker haben neben der Funktion als Energieträger und Quelle für Kohlenstoffgerüste wichtige Signalfunktionen (Li und Sheen, 2016). Jedes Zuckersignal unterliegt bestimmten Modulationen, beispielsweise nach Stoffwechselweg oder Entwicklungsstadium (Li und Sheen, 2016). Dabei ist Saccharose hauptsächlich die Transportform innerhalb der Pflanze (Zhang *et al.*, 2014) und wird durch Invertasen und SUS abgebaut (Ruan, 2014; Barratt *et al.*, 2009), um Glukose und andere Signal-

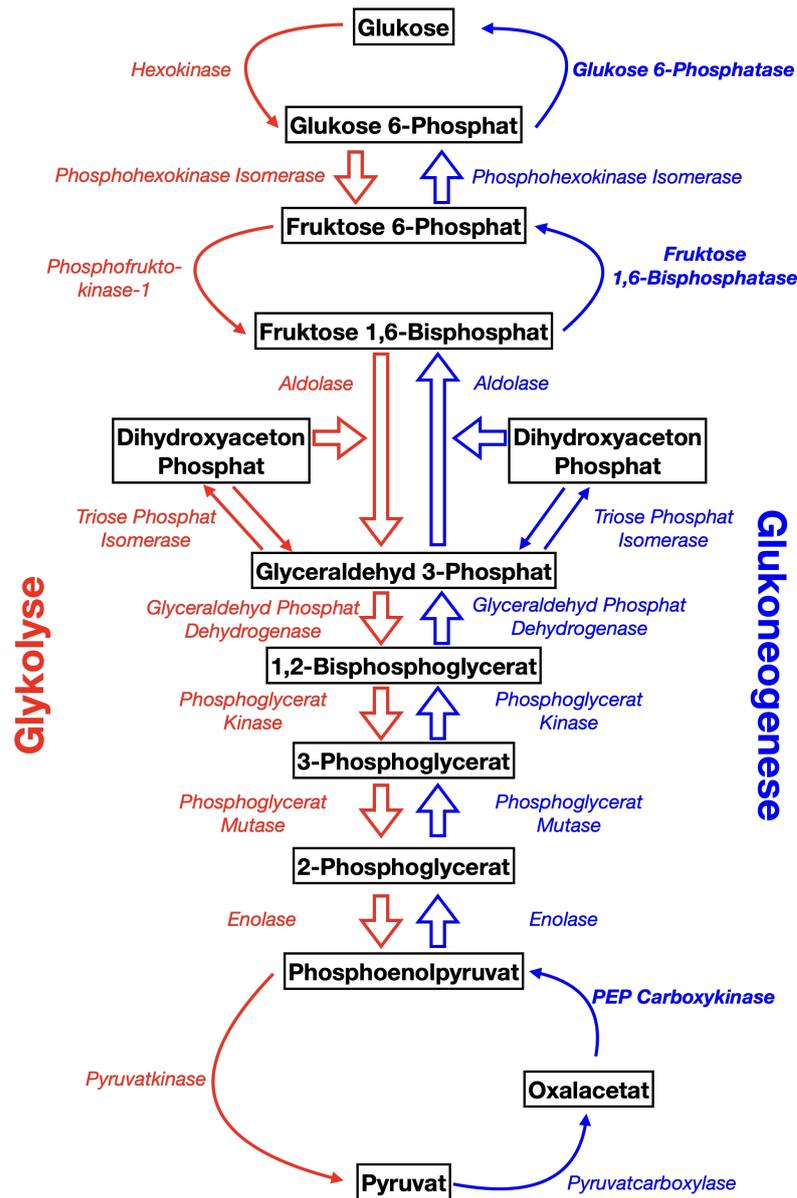


Abbildung 2.7 – Schematische Übersicht von Glykolyse und Glukoneogenese. Abgebildet sind die Enzyme für die Glykolyse in rot und Glukoneogenese in blau. Wichtige Enzyme der Glukoneogenese sind fett gedruckt.

zucker zu erzeugen, welche eine Signaltransduktion durch Wahrnehmung auslösen (Li und Sheen, 2016). Folgende Zuckersensoren sind in Arabidopsis beschrieben: für Fruktose FRUCTOSE INSENSITIVE 1 (FINS1) (Cho und Yoo, 2011) und für Glukose HEXOKINASE 1 (HXK1) als ein direkter Glukose-Sensor (Moore *et al.*, 2003; Li und Sheen, 2016). TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) wird durch Glukose indirekt aktiviert (Xiong *et al.*, 2013). So hat TOR in der Pflanze eine

biologische Funktion während der Embryogenese, der Samen- und Keimlingsentwicklung, dem Stoffwechsel und der Seneszenz (Xiong und Sheen, 2015). Im Gegensatz dazu wird der SnRK1-Komplex in vivo indirekt durch Glukose inhibiert, wobei Snf1-RELATED PROTEIN KINASE 1 (SnRK1) dabei als ein weiterer Glukosesensor gesehen werden kann (Baena-González und Sheen, 2008).

Alle hier beschriebenen Abbauprozesse von Speicherstoffen haben gemein, dass sie dann auftreten, wenn die Pflanze Energie benötigt. Dieser Bedarf an Energie und Baustoffen, wie er in der Keimung vorkommt, führt zur Aktivierung verschiedener biologischer Prozesse und muss kontrolliert werden. In allen Eukaryonten gibt es SnRK1-homologe Proteinkinasen, die konserviert sind und unter anderem für die Kontrolle des Energiehaushalts zuständig sind. Bei Säugetieren wurde gezeigt, dass AMP-abhängige Proteinkinasen (AMPK) diese Aufgabe übernehmen, indem sie die Abhängigkeit der Energieladung, also das Verhältnis von AMP + ADP zu ATP messen (Hardie und Sakamoto, 2006). In Hefe wird SUCROSE NON-FERMENTING1 (Snf1) als Antwort auf Glukoseentzug aktiviert und hat somit eine entscheidende Rolle bei der Umstellung des Metabolismus von Fermentation auf oxidativen Stoffwechsel (Hedbacker und Carlson, 2008). Dabei hebt die Kinase die Repression von Genen auf, welche für alternative Kohlenstoffabbauwege kodieren (Hedbacker und Carlson, 2008). In Pflanzen übernimmt die evolutionär konservierte SnRK1 diese Funktion und kontrolliert verschiedene Aspekte der Entwicklung wie Keimung, Blütenentwicklung und Seneszenz (Tsai und Gazzarrini, 2014; Baena-González und Hanson, 2017). Auch bei der Anpassung an Tag-/Nachtbedingungen ist SnRK1 beteiligt (Frank *et al.*, 2018). So müssen Produkte, die am Tag durch Photosynthese hergestellt werden, gespeichert oder zu Zellkompartimenten transportiert werden, die über keine photosynthetische Aktivität verfügen (Wurzinger *et al.*, 2018). Zusätzlich ist eine metabolische Umprogrammierung nötig, damit die Pflanze ihren Stoffwechsel auf biotische und abiotische Umweltreize anpassen kann (Broeckx *et al.*, 2016). Dies geht häufig mit einer Verringerung bzw. einem Stopp des Wachstums auf der einen Seite und der vermehrten Bildung von Schutz- bzw. Abwehrstoffen auf der anderen Seite einher. An all diesen Prozessen ist der SnRK1-Komplex als evolutionär konservierter Regulator von katabolischen Prozessen beteiligt (Wurzinger *et al.*, 2018).

Bisher wurde nur in einer Arbeit gezeigt, dass SnRK1 an der Mobilisierung von Speicherstoffen beteiligt ist, nämlich beim Stärkeabbau in Reis (Laurie, 2003). So spaltet α -Amylase Stärke in Zucker und unterstützt somit die Keimung und

Keimlingsentwicklung in Getreide (Yu *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1996). SnRK1 induziert die Transkription des α -Amylase-Gens und führt somit zum Abbau von Stärke (Laurie, 2003). Diese Arbeit geht daher von der Hypothese aus, dass SnRK1 als Regulator katabolischer Prozesse weitreichende Funktionen in der Mobilisierung und Degradation von Speicherstoffen hat und so die Keimlingsentwicklung fördert.

2.3.1 Aufbau von SnRK1

Die SnRK1-Kinase besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, der katalytischen α -Untereinheit und den beiden regulatorischen Untereinheiten β und γ (Broeckx *et al.*, 2016). Der ternäre Komplex kann wiederum aus unterschiedlichen Untereinheiten kombiniert werden (Emanuelle *et al.*, 2015). Für Arabidopsis sind das bei der katalytischen Einheit die Isoformen *SnRK1 α 1* (AKIN10/KIN10), *SnRK1 α 2* (AKIN11/KIN11) und *SnRK1 α 3* (AKIN12/KIN12), wobei *SnRK1 α 3* nur äußerst gering exprimiert wird (Schmid *et al.*, 2005). Bei der regulatorischen β -Untereinheit gibt es *SnRK1 β 1* (AKIN β 1/KIN β 1), *SnRK1 β 2* (AKIN β 2/KIN β 2) und *SnRK1 β 3* (AKIN β 3/KIN β 3). Die γ -Untereinheit besteht bei Pflanzen aus dem spezifischen Hybridprotein *SnRK1 β γ* (AKIN β γ / KIN β γ) (Lumbreras *et al.*, 2001; Gissot *et al.*, 2006) (vgl. Abb. 2.8).

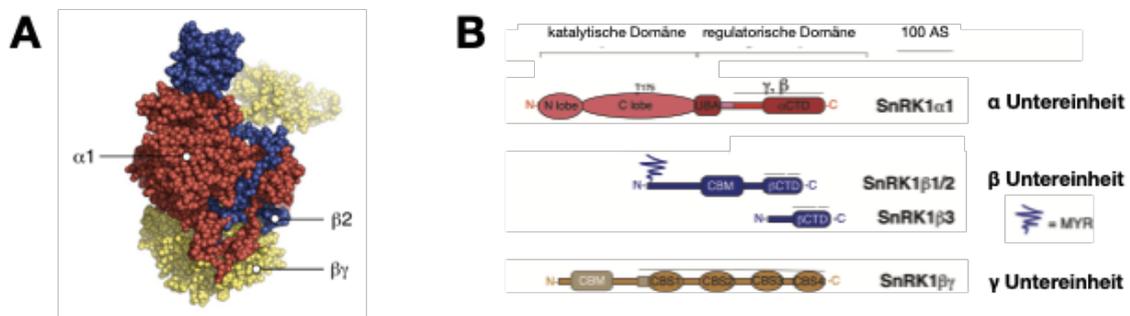


Abbildung 2.8 – Strukturmodell des SnRK1-Enzymkomplexes. (A) Das Modell des SnRK1-Enzymkomplexes basiert auf der Modellierung einzelner Untereinheiten auf der 4RER-Kristallstruktur von aktivierten (phosphorylierten) AMPK (Broeckx *et al.*, 2016). Die katalytische Untereinheit ist rot, die regulatorische β -Untereinheit blau und die γ -Untereinheit gelb eingefärbt. Entnommen aus Crepin und Rolland (2019). (B) Übersicht der Untereinheiten mit ihren Domänen bei Arabidopsis. UBA UBIQUITIN-ASSOCIATED DOMAIN; CTD C-TERMINAL DOMAIN; CBM CARBO BINDING MODULE; CBS CYSTATHIONINE β -SYNTHETASE. Entnommen aus Broeckx *et al.* (2016) und modifiziert.

Die katalytischen α -Untereinheiten besitzen eine C-terminale regulatorische Domäne, über die sie mit der regulatorischen Untereinheit interagieren. Im N-terminalen Bereich befindet sich eine Ser/Thr-Kinase-Domäne, welche durch Phosphorylierung

eines konservierten Threonin-Restes Voraussetzung für die Kinaseaktivität ist (Crepin und Rolland, 2019). Die β -Untereinheiten haben eine C-terminale Domäne, welche für die Interaktion mit der α - und γ -Untereinheit verantwortlich ist (Broeckx *et al.*, 2016). Außerdem befinden sich zentral ein Carbohydrate Binding Motif (CBM) und im N-Terminal eine variable Domäne, die myristyliert ist (Broeckx *et al.*, 2016). Die β -Untereinheiten fungieren dabei als komplexes Gerüst und legen zusätzlich die Lokalisierung, die Substratspezifität und Kinaseaktivität fest (Crepin und Rolland, 2019). Die γ -Untereinheiten enthalten vier hochkonservierte Cystathione- β -Synthetase (CBS), die bei AMPK Adenin-Nukleotide binden können und so das zelluläre Energie-Sensormodul bilden (Broeckx *et al.*, 2016). Die einzigartige hybride $\beta\gamma$ -Untereinheit kommt nur in grünen Pflanzen vor und verwendet einen zusätzlichen N-terminalen CBM als kanonische γ -Untereinheit (Ramon *et al.*, 2013). Während bei Snf1 und AMPK die Aktivität durch die Bindung von Adenosin-Monophosphat (AMP)/Adenosin-Diphosphat (ADP) oder ATP an die regulatorische γ -Untereinheit reguliert wird, ist dies bei SnRK1 nicht der Fall (Hardie *et al.*, 2016; Garcia und Shaw, 2016). Bei einer Bindung von AMP an AMPK führt dies zu einer Konformationsänderung mit Dissoziation einer Auto Inhibiting Domain (AID) von der katalytischen Untereinheit und anschließender allosterischer Aktivierung, Förderung der T-loop-Phosphorylierung und Hemmung der T-loop-Dephosphorylierung (Hardie *et al.*, 2016; Garcia und Shaw, 2016). SnRK1 hat dagegen Mutationen in Schlüsselpositionen in den Nukleotid-Bindestellen und besitzt, anstelle einer AID, eine Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domäne, welche die T-loop-Phosphorylierung durch Signalketten fördert und die katalytische Aktivität aufrecht erhält. Die Kinase SnRK1 kann durch stromaufwärts gelegene SnRK1 aktivierende Kinasen (SnRK1 ACTIVATING KINASE (SnAK)1 und SnAK2), ursprünglich als GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC KINASE (GRIK) identifiziert, aktiviert werden, sich aber auch selbst autophosphorylieren und vermutlich durch eine negative Rückkopplungsschleife SnAK1 bzw. SnAK2 inaktivieren (Baena-González *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009; Crozet *et al.*, 2010; Glab *et al.*, 2017). Eine Überexpression der SnRK1 α -Untereinheit sorgt für eine hohe und spezifische SnRK1-Aktivität in Blattzellen und transgenen Pflanzen (Baena-González *et al.*, 2007). Somit reicht die katalytische α -Untereinheit aus, um eine komplexunabhängige Aktivität zu erreichen (Ramon *et al.*, 2019). Die Autophosphorylierung deutet auf eine Aktivierung dieser Untereinheit im Grundzustand hin, sodass die Kinase durch Derepression aktiviert wird (Crepin und Rolland, 2019). Solche Negativregulationen sind in Pflanzen

weit verbreitet (z.B. in Hormonsignalwegen) und werden durch mathematische Modellierung unterstützt. Dies wurde jedoch noch nicht für SnRK1 gezeigt (Crepin und Rolland, 2019). Da eine Doppelmutante sucrose non-fermenting kinase 1 with catalytic subunits 1 and 2 (*snrk1 α 1/ α 2*) lethal ist (Baena-González *et al.*, 2007), war es für weitere Untersuchungen notwendig, die Aktivität von SnRK1 induzierbar zu reduzieren. Dabei ist es Pedrotti *et al.* (2018) gelungen in eine bestehende *snrk1 α 1* T-DNA-Insertionslinie eine β -Estradiol (β -Est) induzierbare artificial microRNA (amiRNA) für die SnRK1 α 2-Untereinheit einzubauen, damit bei Gabe von β -Est die Proteinmenge reduziert werden kann. In Blättern wurde gezeigt, dass SnRK1 α 2 ein sehr stabiles Protein ist und erst eine β -Est-Gabe über sechs Tage zu einer reduzierten Proteinmenge führt (Pedrotti *et al.*, 2018).

2.3.2 Regulation der SnRK1

Passend zum erwähnten Modell wurde berichtet, dass Zuckerphosphate, beispielsweise Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat und Trehalose-6-Phosphat (T6P), die SnRK1-Aktivität *in vitro* hemmen (Zhang *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2013). Obwohl T6P nur in sehr geringen physiologischen Konzentrationen vorkommt und die Regulation der Saccharose durch T6P nicht klar ist, deuten Experimente mit Inhibitoren auf einen aktiven Prozess hin, der nicht nur die Verfügbarkeit von Substraten, sondern auch die De-novo-Proteinsynthese und Phosphorylierung umfasst (Yadav *et al.*, 2014).

Durch TREHALOSE-6-PHOSPHATASE SYNTHASE (TPS) wird, wenn viel Saccharose vorhanden ist, aus Hexose-P T6P hergestellt und gleichzeitig die Expression von TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE (TPP) reprimiert, wodurch weniger T6P zu Trehalose abgebaut wird. Somit korreliert die Menge von T6P mit der Saccharosemenge, was zur Hypothese führt, dass T6P ein niedermolekulares Signal ist, das die Verfügbarkeit von Saccharose widerspiegelt (Lunn *et al.*, 2014). Dies veranschaulicht nicht nur die Robustheit des Saccharose-T6P-Nexus-Modell (vgl. Abb. 2.9), sondern deutet auch auf ein homöostatisches System hin, in dem T6P (Rückkopplung) die Saccharosekonzentration durch Einschränkung der Saccharosesynthese und/oder Förderung des Saccharoseverbrauchs kontrolliert (Yadav *et al.*, 2014). *In vitro* wurde gezeigt, dass T6P direkt an die katalytische SnRK1 α -Untereinheit bindet und so die Interaktion mit SnAK1/2 und auch die T-loop-Phosphorylierung stört (Zhai *et al.*, 2018). Für die genauen T6P-Bindestellen und die

Wirkungsweise sind allerdings noch weitere biochemische Bindungsstudien und genetische Ansätze notwendig (Crepin und Rolland, 2019). Die derzeitige Modellvorstellung geht davon aus, dass bei Mangel an wichtigen Kohlenhydraten/Energiequellen die Repression von SnRK1 entfällt und damit die Kinase aktiviert wird.

An die CBM der regulatorischen $\beta\gamma$ -Untereinheit können Stärke - als pflanzliches Analogon zu Glykogen bei Tieren - und andere Kohlenhydrate binden (Avila-Castañeda *et al.*, 2014). Maltose kann beispielsweise als ein Produkt des Stärkeabbaus an den SnRK1-Komplex, unter Beteiligung der $\beta\gamma$ -Einheit, binden und diesen in Chloroplasten von Blättern aktivieren. Die genaue Funktion und Bedeutung der CBM ist jedoch noch unklar (Ruiz-Gayosso *et al.*, 2018).

In Studien von Pierre *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass eine post-translationale Modifikation (Myristoylation) mit einer interzellulären Lokalisation von SnRK1 β 1 und SnRK1 β 2 einhergeht. Kürzlich veröffentlichte Daten von Ramon *et al.* (2019) zeigen, dass die α -Untereinheit als Reaktion auf kurzzeitigen Energiemangel, beispielsweise durch Dunkelheit gehemmte Photosynthese und Hypoxie, in den Kern wandert und dort Zielgene aktiviert. Dabei schränken die myristoylierten und membranassoziierten regulatorischen β -Untereinheiten die Retention durch Interaktion der membranassoziierten β -Untereinheit mit der α -Untereinheit ein und hemmen so die Induktion der Zielgene (Ramon *et al.*, 2019). Dies konnte auch an der relativen

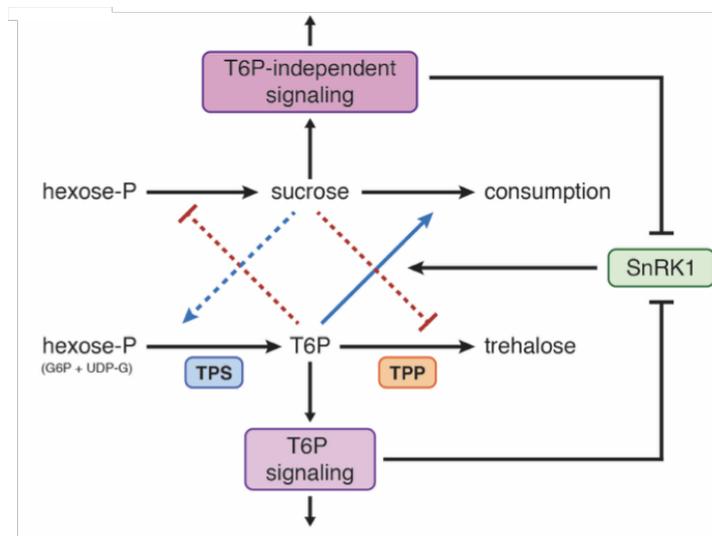


Abbildung 2.9 – T6P-Nexus Modell zur Veranschaulichung der Regulation von SnRK1. Gegenseitige Regulation von Saccharose und T6P nach Verfügbarkeit von Kohlenhydraten und deren Auswirkung auf SnRK1. Trehalose-6-Phosphat (T6P), TREHALOSE-6-PHOSPHATASE SYNTHASE (TPS), TREHALOSE-6-PHOSPHATASE (TPP). Entnommen aus Broeckx *et al.* (2016).

Genexpression von Zielgenen beobachtet werden. Eine SnRK1 α 1-Untereinheit mit NLS-Domäne induzierte die Expression von *DARK-INDUCED (DIN)6/ASPARAGINE SYNTHETASE 1 (ASN1)*, *METHYLCROTONYL-CoA CARBOXYLASE SUBUNIT ALPHA (MCCA)*, *METHYLCROTONYL-CoA CARBOXYLASE SUBUNIT BETA (MCCB)*, *BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSFERASE 2 (BCAT2)* und *ELECTRON-TRANSFER FLAVOPROTEIN:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE (ETFQO)*, während eine SnRK1 α 1-Untereinheit mit β -MYR-Domäne bei allen Genen für eine Reduktion sorgte (Ramon *et al.*, 2019). So kann eine Pflanze durch Derepression der SnRK1 α -Untereinheit für eine schnelle Genantwort auf sich verändernde Umwelbedingungen sorgen. Die Aktivität von SnRK1 kann weiterhin durch Sumoylierung und Ubiquitinierung, als effizienten Feedback-Mechanismus, eingeschränkt werden, indem die Proteinstabilität verändert und dadurch eine anhaltende Stressreaktion vermieden wird (Broeckx *et al.*, 2016; Crozet *et al.*, 2016). Die Regulation der zentral regulatorischen Kinase SnRK1 kann auf verschiedene Arten fein abgestimmt werden, um so eine Überreaktion zu vermeiden und sicherzustellen, dass der Pflanze ausreichend Energie für Wachstum und Abwehr zur Verfügung steht. Die Aktivität hängt folglich von der Verfügbarkeit von Energie/Ressourcen ab und kann damit ein entscheidender Faktor für die Kontrolle des Speicherstoffabbaus während der Samenkeimung sein.

2.3.3 SnRK1 vermittelt seine Wirkung durch Phosphorylierung von Enzymen, Signalmolekülen und regulatorischen Proteinen

Bei Energiemangel kann SnRK1 ein Energiesparprogramm zur Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der Homöostase auf zwei verschiedene Arten auslösen. Einerseits gibt es die direkte Phosphorylierung und Modifikation von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels und von regulatorischen Proteinen, andererseits die umfangreiche transkriptionelle Umprogrammierung der Genexpression durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (TFs) (Broeckx *et al.*, 2016). Dabei gehören Enzyme des Primärmetabolismus, beispielsweise NITRATE REDUCTASE (NR) und SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE (SPS), zu den ersten untersuchten SnRK1-Zielen und wurden durch Phosphorylierung inaktiviert (Broeckx *et al.*, 2016; Robertlee *et al.*, 2017). Vermutliche *in vivo* Ziele ließen sich durch quantitative Phosphoproteomanalysen in einem größeren Maßstab finden, beispielsweise in

Übereinstimmung mit der SnRK1-vermittelten Regulation des Kohlenstoffflusses in Richtung Glykolyse und Atmung oder Fermentation unter Sauerstoff- und Lichtmangel (Nukarinen *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2016). So wird MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MPK6), ein Signalmolekül, unter abiotischem Stress von SnRK1 phosphoryliert. PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 1 (PTP1), ein negativer Regulator der MPK6-Aktivität, der MPK6 direkt dephosphoryliert, wird ebenfalls von SnRK1 reguliert (Cho *et al.*, 2016). Außerdem kann SnRK1 die Regulation der Genexpression beeinflussen, indem beispielsweise Gene über die Aktivierung von TFs induziert werden, die an wichtigen katabolen Pfaden, beispielsweise der Induktion des Abbaus von Branched-Chain Amino Acid (BCAA), und der Autophagie durch direkte Phosphorylierung und Aktivierung des AUTOPHAGY (ATG)1/13-Kinase-Komplexes beteiligt sind (Baena-González *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2017; Pedrotti *et al.*, 2018). Gleichzeitig werden Gene unterdrückt, die mit energieverbrauchenden Prozessen, einschließlich der Ribosomen-Biosynthese, in Verbindung stehen, wie GLUTAMATE SYNTHASE 2 (GLU2), einer Synthase des Aminosäuremetabolismus, oder EXPANSIN 10 (EXP10), einem Expansin der Zellwandmodifikation (Baena-González *et al.*, 2007). Im Wesentlichen wird diese transkriptionelle Umprogrammierung durch TFs vermittelt (Crepin und Rolland, 2019).

2.3.4 SnRK1 regulierte Transkriptionsfaktoren

TFs kontrollieren die Transkription in Prokaryoten und Eukaryoten (Liu *et al.*, 1999; Seshasayee *et al.*, 2011). In Arabidopsis sind derzeit zirka 100 TF-Familien mit mehr als 2000 Mitgliedern bekannt (Wehner *et al.*, 2011). Manche TF-Familien sind pflanzenspezifisch, wie APETALA 2-ERF BINDING FACTOR (AP2-ERF), WRKY u.v.m., und variieren in ihrer Größe mit teilweise über 100 Mitgliedern.

WRINKLED 1 (WRI1), ein SnRK1-abhängig regulierter TF aus der Gruppe der APETALA 2 (AP2)-TF, ist an der Fettsäure-Biosynthese beteiligt und kontrolliert die Expression von mehr als 20 Genen (Zhai *et al.*, 2018). Unter zuckerlimitierenden Bedingungen bindet zunächst GRIK1/2 an SnRK1 α 1 und phosphoryliert diese an der Aminosäure T175 (Zhai *et al.*, 2018). Die aktivierte SnRK1 α 1-Untereinheit phosphoryliert dann WRI1, was zu einer schnellen Degradation des TF führt (Zhai *et al.*, 2017). Dieser Prozess reprimiert die Fettsäurebiosynthese bei energielimitierenden Bedingungen (Zhai *et al.*, 2017). Sind allerdings ausreichend Zucker vorhanden, so wird die Aktivität von SnRK1 heruntergefahren, indem T6P direkt an SnRK1 α 1

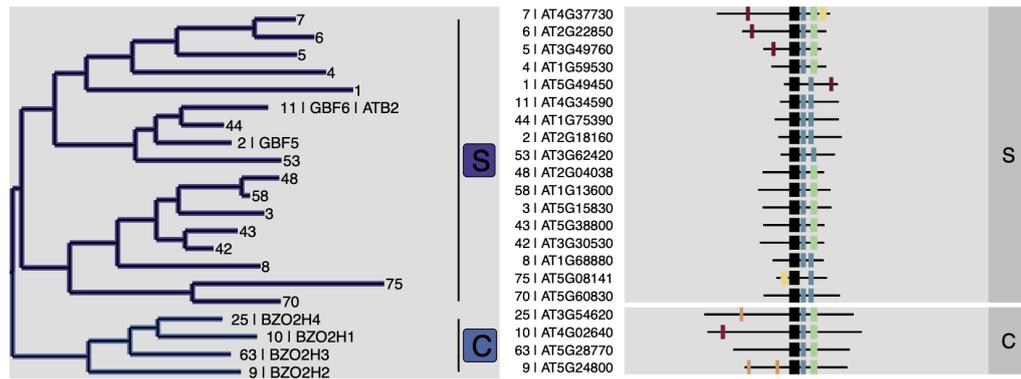


Abbildung 2.10 – Organisation eines Ausschnitts der Arabidopsis bZIP-Familie. Der phylogenetische Baum (links) wurde aus bZIP-Proteinsequenzen berechnet, welche von der Plattform EnsemblPlants Biomart (plants.ensembl.org/biomart/martview/) genommen wurden. Die bZIP-TF wurden aufgrund von konservierten Motiven (HMM wurden von pfam entnommen) und Ähnlichkeiten gruppiert (rechts). Neben der systematischen Benennung der bZIP-TF sind noch Trivialnamen, soweit vorhanden, angegeben. Entnommen aus Dröge-Laser *et al.* (2018) und modifiziert.

bindet. Daraus ergibt sich eine Konformationsänderung, als Hypothese in Analogie zu der Regulation von AMPK durch ATP, von SnRK1 α 1 und GRIK kann nicht mehr binden und somit SnRK1 α 1 nicht mehr aktivieren (phosphorylieren). Dadurch wird WRI1 stabilisiert und erlaubt die Synthese von Fettsäuren (Zhai *et al.*, 2017). Außerdem gibt es nicht pflanzenspezifische TF-Familien, die ebenfalls große Gruppen bilden können, wie MYBs, MADS-Box, bHLH, HomeoBox (HB) und bZIP TFs (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009).

Die bZIP-Familie besteht bei Arabidopsis aus 78 Genen und wurden aufgrund ihrer Homologie in der bZIP-Region und zusätzlichen konservierten Motiven in 13 Gruppen eingeteilt (gekennzeichnet durch A-K, M+S) (Jakoby *et al.*, 2002; Dröge-Laser *et al.*, 2018). In Abb. 2.10 ist ein Ausschnitt der Klassifizierung von bZIP-TF dargestellt, bei denen eine SnRK1-abhängige Regulation schon nachgewiesen wurde. Die bZIP-Domäne hat zwei strukturelle Merkmale (vgl. Abb. 2.11 B) (Hurst, 1995). Zum einen enthält sie eine basische Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid) (DNA)-Bindungsregion mit ~16 Aminosäureresten und einem Kernlokalisierungssignal mit konserviertem N-X₇-R/K-Motiv, das die Bindung mit der DNA vermittelt. Zum anderen enthält sie ein Heptad-Repeat aus Leucin oder anderen sperrigen hydrophoben Aminosäuren, das eine amphipatische Helix bildet. Um an die DNA zu binden, interagieren zwei bZIP-Proteine über Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Oberflächen ihrer Helices, wobei eine *coiled-coil*-Struktur entsteht (vgl. Abb. 2.11 A; (Kouzarides und Ziff, 1989; Vinson *et al.*, 1989).

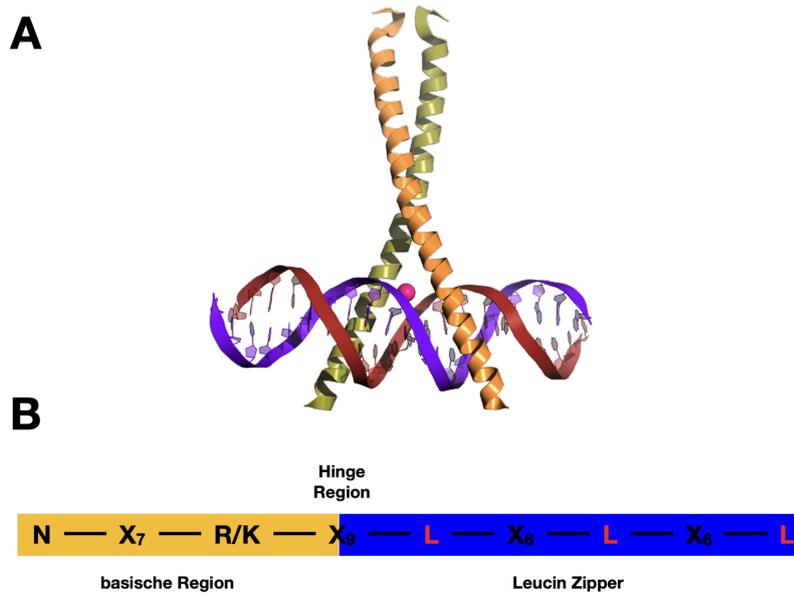


Abbildung 2.11 – Strukturelle Eigenschaften der bZIP-TF. (A) Strukturmodell eines Dimers der bZIP-Domänen am Beispiel von cAMP RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (CREB) (<https://commons.wikimedia.org>). bZIP-Domänen bilden eine kontinuierliche α -Helix-Struktur und dimerisieren über den sogenannten Leucin-Zipper (ZIP). In die große Tasche der DNA legen sich die beiden Enden des TF-Dimers, wobei die basische Domäne den Kontakt zur DNA aufnimmt (*Scissors-Grip-Modell*). (B) Vereinfachte schematische Darstellung der basischen bZIP-Domäne, bestehend aus einer DNA-Basisbindungsregion (orange) und der angrenzenden ZIP-Domäne (blau). In der ZIP-Domäne kommen Leucin (L) oder andere hydrophobe Aminosäuren im Abstand von 7 Basenpaaren in Wiederholungen (*repeats*) vor. In der basischen Region findet sich ein unveränderliches N-X₇-R/K-Motiv mit Asparagin (N) und basischen Aminosäuren (Arginin (R), Lysin (K)) in definierten Abständen (Kouzarides und Ziff, 1989; Vinson *et al.*, 1989).

Am Beispiel von bZIP63 soll die Funktionsweise der bZIP-TFs verdeutlicht werden (vgl. Abb. 2.12). Der TF bZIP63 besteht dabei aus einem variablen N-terminalen Bereich, einer bZIP-Domäne mit basischem Bereich und einem variablen C-terminalen Bereich (Mair *et al.*, 2015). Da die Expression von bZIP63 bei verlängerter Nacht oder Zuckergabe stark reguliert ist (Matiolli *et al.*, 2011; Kunz *et al.*, 2014), konnten unter diesen Bedingungen mittels eines Phostag-Gels die Phosphorylierung von bZIP63 nachgewiesen werden und mittels massenspektrometrischer Analyse alle Phosphorylierungsstellen von bZIP63 in adulten Pflanzen gefunden werden (Mair *et al.*, 2015). In Keimlingen konnte zudem eine Reduzierung der Phosphorylierung festgestellt werden, wenn diese extern mit Zucker (1% Saccharose) gefüttert wurden (Mair *et al.*, 2015). Durch *Pull-down* und anschließende Identifizierung der Peptide mittels Massenspektrometrie konnten potentiell interagierende Kinasen von bZIP63 gefunden werden, u. a. SnRK1 (Mair *et al.*, 2015). Bereits bekannt war, dass SnRK1 die Expression eines *pASN1:LUC*-Reporters G-Box-abhängig durch Koexpression

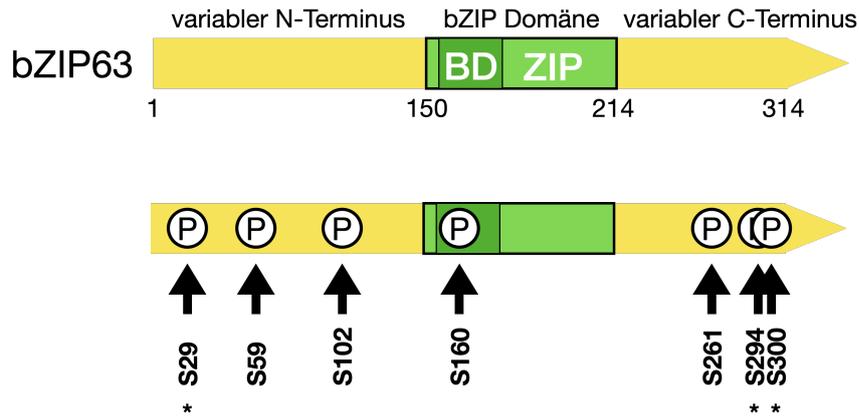


Abbildung 2.12 – Schematische Darstellung von bZIP63 und den in vivo identifizierten Phosphorylierungsstellen. Das Schema zeigt die N-terminale, C-terminale und bZIP-Domäne des bZIP63-Proteins. Unten abgebildet sind die in vivo Phosphorylierungsstellen, welche durch Immunopräzipitation und Massenspektrometrie gefunden wurden (Mair *et al.*, 2015). Sterne markieren die drei konservierten Phosphorylierungsstellen für die Interaktion mit SnRK1 α 1.

bestimmter bZIP-TFs verstärkt (Baena-González *et al.*, 2007). Außerdem wurde postuliert, dass SnRK1 unter Energiemangelbedingungen aktiviert wird (Baena-González *et al.*, 2007), weshalb SnRK1 α 1 und SnRK1 α 2 genauer untersucht wurden. Es wurde gezeigt, dass SnRK1 α 1 mit bZIP63 interagiert und drei konservierte und funktionell wichtige Serinreste phosphoryliert (Mair *et al.*, 2015). Die wichtigen Serinreste sind dabei S294, S300 und S29, wobei letzteres entscheidend für die Heterodimerisierung von bZIP63 mit anderen TFs ist (Mair *et al.*, 2015).

Für die Dimerisierung von bZIP63 ist die Phosphorylierung an Position S29 entscheidend, da eine Heterodimerisierung von bZIP63 mit bZIP1 oder bZIP11, zwei metabolische Regulatoren, die die Transkription von ASN1 und PROLINE DEHYDROGENASE (ProDH) beeinflussen (Hanson *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2011), nur erfolgt, wenn S29 durch SnRK1 α 1 phosphoryliert wurde (Mair *et al.*, 2015). Weiter wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung von Mitgliedern der Gruppe S₁ nur durch SnRK1 α 1 nicht möglich ist (Mair *et al.*, 2015). Somit verstärkt eine Phosphorylierung von bZIP63 in vivo die Heterodimerisierung mit Mitgliedern der Gruppe S₁. Da bZIP-TFs normalerweise als Dimere wirken, führt die Heterodimerisierung zu einer enormen regulatorischen Kombinatorik in Bezug auf die Selektion oder Proteininteraktion (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2017). Die größte Gruppe der bZIP-TFs stellt dabei die Gruppe S mit 17 intronlosen Genen dar, die für kleine, etwa 20 kDa große TF-Proteine kodieren. Allerdings wurde detailliert nur die Gruppe S₁ (bZIP1, bZIP2, bZIP11, bZIP44 und bZIP53) charakterisiert, welche bevorzugt mit Mitgliedern der

C-bZIP-Gruppe (bZIP9, bZIP10, bZIP25 und bZIP63) heterodimerisieren (Weltmeier *et al.*, 2006; Ehlert *et al.*, 2006). Sie heterodimerisieren bei biotischem/abiotischem Stress, der Entwicklung oder bei Energiemangel und leiten Signale in den Zellkern weiter, damit die Expression entsprechender Gene induziert wird. Deshalb werden sie als C/S₁-bZIP-Netzwerk bezeichnet (Dröge-Laser und Weiste, 2018). Sämtliche S₁-bZIP-TFs besitzen offene Leserahmen in der untranslatierten „leader“-Sequenz (upstream OPEN READING FRAMES (uORFs)), was bei Verfügbarkeit von Saccharose zur Bildung eines naszierenden Peptids führt, das dann zum Stillstand der Ribosomen und zur Hemmung der Translation des bZIP-kodierenden ORFs führt (Yamashita *et al.*, 2017; Rahmani *et al.*, 2009). Diese SUCROSE-INDUCED REPRESSION OF TRANSLATION (SIRT) ist ein Mechanismus, der Saccharose in der Zelle misst. Die SIRT- und SnRK1-Regulation sind zwei Mechanismen, mit denen das C/S₁-Netzwerk die Zucker- bzw. Energieverfügbarkeit in eine Genexpression überträgt. Daher stellt sich die Frage, ob die Regulation der Speicherstoffmobilisierung während der Keimung ebenfalls auf diese Weise funktioniert.

Energiemangel, wie er bei kurzzeitig verlängerter Nacht vorkommt, führt zur Aktivierung von Genen des Abbaus von BCAA, besonders des *ETFQO*-Proteins, um eine alternative ATP-Produktion zu gewährleisten (Pedrotti *et al.*, 2018). Da die Expression von *ETFQO* unter Energiemangel induziert ist, konnte gezeigt werden, dass an dieser Induktion SnRK1 und S₁-bZIP-TFs beteiligt sind (Pedrotti *et al.*, 2018). Mit Hilfe von Protoplasten-Aktivierungs-Experimenten konnte der *ETFQO*-Promotor von allen S₁-bZIP aktiviert werden (Pedrotti *et al.*, 2018). Im weiteren Verlauf wurden Heterodimerisierungsexperimente in Protoplasten durchgeführt und gezeigt, dass Gruppe S₁-bZIP zusammen mit bZIP63 in Anwesenheit von SnRK1 α 1 einen heterotrimeren Komplex bildet (Pedrotti *et al.*, 2018). Der transient gebildete Komplex wurde nur am *ETFQO*-Promotor gefunden, wenn phosphoryliertes bZIP63 vorhanden war (Pedrotti *et al.*, 2018). In Hefe wurde bereits gezeigt, dass Snf1 zunächst Histone phosphorylieren kann und die Histone dann acetyliert werden, worauf sich die Chromatinstruktur verändert und die Transkription von Zielgenen reguliert wird (Abate *et al.*, 2012; Lo *et al.*, 2001). So konnten Pedrotti *et al.* (2018) zeigen, dass beim *ETFQO*-Promotor der Lysinrest 14 von Histon 3 bei verlängerter Nacht acetyliert wird (vgl. Abb. 2.13).

Entscheidend für eine Bindung an die Promotoren ist der N-Terminus, welcher polare und saure Aminosäuren aufweisen soll (Weiste und Dröge-Laser, 2014). Weitere SnRK1-abhängige TFs sind beispielsweise FUSCA 3 (FUS3), ein zentraler Regulator

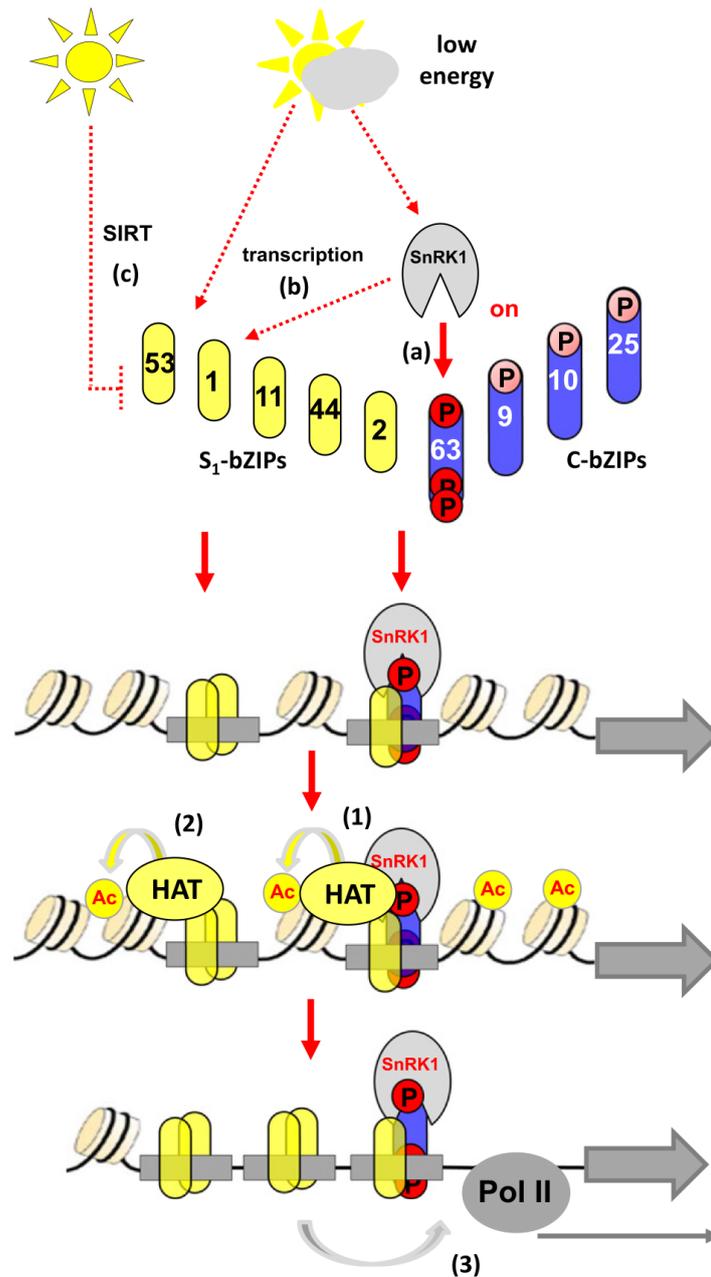


Abbildung 2.13 – Arbeitsmodell, das zeigt, wie die SnRK1-C/S₁-bZIP-Signalkette unter Energiemangel funktioniert. Energielimitierende Bedingungen werden über mehrere Mechanismen in die Aktivierung des C/S₁-bZIP-Netzwerks übertragen: posttranslationale Aktivierung von bZIP63 der Gruppe C über Phosphorylierung (Mair *et al.*, 2015) (a), SnRK1-abhängige transkriptionelle Aktivierung von bZIP1 (b), oder translatorische Regulation aller Mitglieder der Gruppe S₁ über SIRT (Wiese *et al.*, 2004) (c). Die transkriptionelle Aktivierung durch C/S₁-bZIPs wird durch mehrere verschiedene Mechanismen vermittelt: (1) die Bildung eines ternären SnRK1-C/S₁-bZIP-Komplexes induziert die Histonacetylierung (Ac) (diese Arbeit), (2) bZIP11, bZIP2 und bZIP44 rekrutieren HISTON ACETYLTRANSFERASEN (HATs) unabhängig von SnRK1 (Weiste und Dröge-Laser, 2014), und (3) ein weiterer noch nicht definierter Transaktivierungsmechanismus. Pol II, Polymerase II Entnommen und zitiert aus Pedrotti *et al.* (2018).

der späten Samenreifung und Keimung, der SnRK1-abhängig phosphoryliert wird (Tsai und Gazzarrini, 2012). TRANSCRIPTION FACTOR MYBS1 (MYBS1) ist ein TF in Reis (*Oryza sativa*) (Lu *et al.*, 2007), der den Abbau von Speicherstoffen SnRK1-abhängig zeigt, indem er den α Amy3-Promotor induziert und veranlasst, dass das α Amy3-Protein Stärke als Kohlenstoffspeicher abbaut. Die Expression in Reis wird post-translational durch Zucker reguliert. In zuckerhaltigem Medium war die Aktivität von SnRK1 auf die Hälfte reduziert im Vergleich zu Medium ohne Zucker (Lu *et al.*, 2007). Außerdem wird der α Amy3-SRC (Sugar-Response-Complex) durch Glukose reprimiert und die Repression durch Glukose kann von MYBS1 durch direkte Interaktion mit der TA-Box aufgehoben werden (Lu *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). Weiter konnte SnRK1 den *MYBS1*-Promotor in Reis aktivieren und post-translational MYBS1 phosphorylieren (Lu *et al.*, 2007). Phosphoryliertes MYBS1 konnte an die TA-Box des α Amy3-SRC (Sugar-Response-Complex) binden und die Genexpression induzieren, was wiederum zum Stärkeabbau führt und das Keimlingswachstum unterstützt (Lu *et al.*, 2007). Somit wird unter Energiemangelbedingungen zunächst die Inaktivierung von SnRK1 aufgehoben. SnRK1 wiederum kann direkt den Promotor *MYBS1* induzieren und indirekt über MYBS1 die Transkription des α Amy3-Promotors induzieren. Diese Wirkungsweise könnte als Prototyp dienen. In dieser Arbeit soll anhand der Modellpflanze Arabidopsis gezeigt werden, ob SnRK1 auch hier für die Speichermobilisierung während der Keimlingsentwicklung wichtig ist.

2.4 Zielsetzung der Dissertation

Während des Phasenübergangs von Heterotrophie zu Autotrophie kommt es zu starken metabolischen Änderungen in der Keimlingsentwicklung. Dabei spielt die Mobilisierung von Speicherstoffen eine wichtige Rolle. Die Frage ist, ob und wenn ja, wie die evolutionär konservierte regulatorische Kinase SnRK1 an diesen Prozessen beteiligt ist. Bereits bekannt ist, dass SnRK1 katabolische Prozesse kontrolliert. Unklar ist allerdings, ob dies auch bei der Keimlingsentwicklung erfolgt. Am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* sollen dazu Wachstums- und Entwicklungsparameter (Chlorophyllgehalt, Wurzelwachstum, Hypokotylstreckung) zwischen Wildtyp und *snrk1 α 1*/ α 2-Mutante quantifiziert werden. Wenn es Unterschiede zwischen der Mutante und dem Wildtyp in der Samenkeimung bzw. Keimlingsentwicklung gibt, soll untersucht werden, in welchen Geweben/Organen der Pflanze SnRK1 α 1

exprimiert wird und wie sich die SnRK1-Kinaseaktivität verändert. Außerdem soll überprüft werden, ob mögliche Defizite in der Samenkeimung und Keimlingsentwicklung durch Supplementierung verschiedener Metabolite (Glukose, Fettsäuren, Aminosäuren) ausgeglichen werden können, um dadurch Hinweise zu bekommen, welche Ressourcen SnRK1-abhängig mobilisiert werden. Durch Vergleiche zwischen Wildtyp und Mutante sollen anhand einer Metabolitenanalyse in Zeitreihenexperimenten die Speicherstoffe identifiziert werden, die SnRK1-abhängig abgebaut werden und den Keimling mit Energie versorgen. Mittels einer RNA-Seq-Analyse soll die SnRK1-abhängige Transkription zentraler Enzyme der Ressourcen-Mobilisierung identifiziert werden. Die Charakterisierung von TF-Kandidaten, die diese zentralen Gene regulieren, soll über *knock-out* TF-Mutanten, Aktivierung von Promotor:Reporter Konstrukten in Protoplasten, Kartierung von DNA-Bindestellen und direkter DNA-Bindung gezeigt werden. Mit diesen Mitteln wird versucht, einen detaillierteren Einblick in die Speicherstoffmobilisierung zu bekommen. Diese Erkenntnisse sollen mit SnRK1-abhängig regulierten Genen verknüpft werden, die während der Keimlingsentwicklung exprimiert werden.

3 Material

3.1 Pflanzenlinien

Tabelle 3.1 – Pflanzenlinien

Ökotyp/Mutante	Eigenschaften	Referenz
WT (Col-0)	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp vom Ökotyp <i>Columbia</i>	N1092, Kultursorte
WT WS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp vom Ökotyp <i>Wassilewskija</i>	CS2360, Kultursorte
<i>snrk1α2</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygot, T-DNA Insertion im 5'UTR	N851107 (Mair <i>et al.</i> , 2015)
<i>snrk1α1/α2</i>	amiRNA gegen <i>SnRK1α2</i> Transkripte, transformiert in <i>snrk1α1-3</i> Mutanten (GABI KAT GABI_579E09)	(Pedrotti <i>et al.</i> , 2018)
<i>bzip63</i> (WS)	Ökotyp WS Hintergrund, homozygot, T-DNA Insertion im 1. Exon	N700001 (Sussman <i>et al.</i> , 2000)
<i>bzip1/53/9/63</i> (Col-0)	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygot, vierfach Mutante mit SALK_059343 Insertion im ORF (knock out), SALK_069883 Insertion im 5'UTR (knock down), SALK_093416 Insertion im 3. Exon (knock out) und SALK_066531 Insertion im 5'UTR (knock down)	(Dietrich <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pro_{bZIP63}:bZIP63-YFP</i>	Reporterlinie; YFP an bZIP63-Promotor fusioniert	(Mair <i>et al.</i> , 2015)
<i>SnRK1α1-GFP</i>	Reporterlinie; GFP an SnRK1α1-Promotor fusioniert	(Bitrián <i>et al.</i> , 2011)
<i>ACC-GFP</i>	Reporterlinie; GFP und HA an Promotor von <i>TP1</i> fusioniert	Rolland, unveröffentlicht
<i>NLS-ACC-GFP</i>	Reporterlinie; GFP und HA an Promotor von <i>TP1</i> fusioniert mit nuklearer Erkennungssequenz	Rolland, unveröffentlicht
<i>bzip61</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygot, Crispr-Cas9-Linie	diese Dissertation

<i>bzip34</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygot, T-DNA Insertion im 4. Exon	SALK_018864 (N106365) NASC (Stock Center)
<i>bzip34/61</i>	Ökotyp Col-0 Hintergrund, homozygot, Crispr-Cas9-Linie in Hintergrund von <i>bzip34</i> , Verlustmutante	diese Dissertation

3.2 Plasmide

Tabelle 3.2 – Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pJET 1.2	<i>E. coli</i> -cloning vector pJET 1.2/blunt, T7/ <i>P_{lacUV5}</i> Promotor, <i>bla</i> (Ap ^R), rep (pMB1), <i>eco47IR</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
pDONR TM 201	pUC ori, Km ^R , attP1, attP2, Cm ^R , ccdB	Invitrogen, 2001
pBT10	pUC ori, Gal4UAS, GUS-Reporter, Amp ^R	(Hartmann, 2014)
pHBTL	pHBTL-sGFP-Derivat (Sheen, unveröffentlicht), Entfernung des GFP aus dem pHBTL-sGFP durch NcoI/NotI-Verdau, Klenow „fill in“ und Religation, pUC ori, 35S-Promotor, Amp ^R	(Hartmann, 2014)

3.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Klonierungen

Tabelle 3.3 – Oligonukleotide für Klonierungen

Gen	Sequenz
cyPPDK NcoI	TTTTTCCATGGGGTTTTTTGTTTGTTTG
cyPPDK PstI	AAAAACTGCAGGTAAGCCTTTCATTTC
cyPPDK G-Box1 fwd	CTTGCACAAACATTTCTTTTATCTAAAC CTCAATC
cyPPDK G-Box1 rev	GATTGAGGTTTAGATAAAAGAAATGTTT GTGCAAG

cyPPDK G-Box2 fwd	GTATATGTGTTCTTAAACTTTTTCAAAC
cyPPDK G-Box2 rev	ATTTCTGCAATC GATTGCAGAAATGTTTGAAAAAGTTTA AGAACACATATAC
cyPPDK G-Box3 fwd	GCTTTACTATATATATAGATAAAAAATATG
cyPPDK G-Box3 rev	TGTTCTTAAAC GTTTAAGAACACATATTTTTATCTATATA TATAGTAAAGC
cyPPDK G-Box4 fwd	GATAATAATGTATTTTTGATGAAAAATC
cyPPDK G-Box4 rev	CATCAAAAC GTTTTGATGGATTTTTTCATCAAAAATAC ATTATTATC
cyPPDK G-Box5 fwd	GTTATTGTGCCAAAGAATAAAAGAATAT
cyPPDK G-Box5 rev	GTCCAAACGGC GCCGTTTGGACATATTCTTTTATTCTTT GGCACAATAAC
cyPPDK G-Box6 fwd	GATCCACCAATGCCAAAATTTGTTATTG
cyPPDK G-Box6 rev	TGCCAAAG CTTTGGCACAATAACAAATTTTGGCATT GGTGGATC
cyPPDK G-Box7 fwd	GTTTTATGATTCTGAAAAGAGATTCTTG
cyPPDK G-Box7 rev	AGAGAAAC GTTTCTCTCAAGAATCTCTTTTCAGAAT CATAAAAC
cyPPDK G-Box8 fwd	ATACACTTTTTTATTAATAATTTGTTTTAT
cyPPDK G-Box8 rev	GATTC GAATCATAAAACAAATTTTAATAAAAAA GTGTAT
PCK1 ₂₀₀₀ HindIII fwd	AAAAAAAGCTTAAGATTCGAGAAGATCT TC
PCK1 ₂₀₀₀ XhoI rev	TTTTTCTCGAGCTTTTTCCCTGTAACCAC AAC
PMDH2 ₁₀₀₀ HindIII fwd	AAAAAAAGCTTCTTTCTGTCCCGCTCAC
PMDH2 ₁₀₀₀ NcoI rev	GGTG AAAAACCATGGTGTGTGTTTCCTCAGTT TCCTC

Oligonukleotide für qRT-PCR

Tabelle 3.4 – Oligonukleotide für qRT-PCR

Gen	Sequenz
RRN26 fwd	TTCGTCTAAGGGTGCCTAACCG
RRN26 rev	AAACTACCCACCTCGCAGTGTC

ACX4 fwd ACX4 rev	GAAACTGCTTCGCTAGGTCCG CCGTTACTTCCCTCCCTGTT
bZIP63 fwd bZIP63 rev	GAAGAAATCTCCGGTAACCATCAC GATTCTCCGTCTGTCTGCAGC
BCAT2 fwd BCAT2 rev	CACATCTCTACGCAAACTCTG TGTGATGCTCTTGACGCCTC
GLK2 fwd GLK2 rev	TCCTCCCATCGACATTCATC CTCCGTCATAACACCGTCAA
PCK1 fwd PCK1 rev	GGACAAACCATGTACCACTT TGGCTCCTTGATACATCCT
PMDH2 fwd PMDH2 rev	TTCGTGGAGATGCCAACCAGAG ACAGAGTTCTTGGCCTCCATCTG
PPDK fwd PPDK rev	TGAGAAGGGTCATACCGTGAGC ACTCCGCCTCTTTTCGCAATCTC
PPDK ChIP1 fwd PPDK ChIP1 rev	GTTTTTTGTTTGTGTTTGTGTTT CATAATGGACATGTCAAATTTAG
PPDK ChIP2 fwd PPDK ChIP2 rev	CTTTAATTTTGGTCAATTATATTAC CGAATAATTTTATAATATAAAAAC
PPDK ChIP3 fwd PPDK ChIP3 rev	GATTTAAACTAGTATCATAATTTT GTATTCAAAGACCACTTTGC
PPDK ChIP4 fwd PPDK ChIP4 rev	GGGTTATAACCGATAATAATTGAGC GTAAGCCTTTCCATTTCAATC
Actin7 fwd Actin7 rev	CGTTTCGCTTTCCTTAGTGTTAGCT AGCGAACGGATCTAGAGACTCACCTTG
Actin8 fwd Actin8 rev	GGTTTTCCCCAGTGTTGTTG CTCCATGTCATCCCAGTTGC

3.4 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer werden, soweit nicht anders beschrieben, mit ultra pure Wasser (H₂O) angesetzt und anschließend autoklaviert (15 Minuten (Min.), 2 bar, 121 Grad Celsius (°C)).

Tabelle 3.5 – Puffer und Lösungen

CTAB (DNA-Extraktion):

2% Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
100 mM Tris-HCl pH 8,0
20 mM EDTA pH 8,0
1,4 M NaCl

vor Gebrauch 2% β-Mercaptoethanol hinzufügen

DEPC-H₂O (zur Inaktivierung von RNasen):

(Anmerkung: Durch Diethylpyrocarbonat (DEPC) werden Histidinreste in Proteinen modifiziert, was zur Hemmung von RNasen und DNasen führt. Beim Autoklavieren zerfällt DEPC zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Ethanol. Das behandelte Wasser ist frei von RNasen.)

1 l H₂O
1 ml DEPC (Carl Roth GmbH & Co. KG)

über Nacht (ü. N.) kräftig rühren, Flaschendeckel nicht komplett zudrehen.
Autoklavieren (Flaschenöffnung nur mit Alufolie verschließen, nicht mit Schraubdeckel (Gasentwicklung!))

Fällungspuffer (RNA-Extraktion):

1,2 M Natriumchlorid (NaCl)
0,8 M tri-Natrium-Citrat

Färbelösung für Proteine auf Nitrozellulosemembranen:

0,02 % Ponceau S
3 % Trichloressigsäure (v/v)

Harnstoffextraktionspuffer:

4 M Harnstoff
16,6 % Glycerin (100 %) (v/v)
5 % β-Mercaptoethanol (v/v)
5 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (w/v)

etwas Bromphenolblau

Trenngel 12 % (SDS-Polyacrylgelelektrophorese (PAGE)):

4 ml 30 % Acrylamid/BIS-Mix (19:1)
2,5 ml 4x Lower-Puffer
2,0 ml Glycerin (87 %) (v/v)
20 μM APS
20 μM TEMED
1,5 ml H₂O

Sammelgel (SDS-PAGE):

0,83 ml 30 % Acrylamid/BIS-Mix (19:1)
0,88 ml Upper-Puffer
20 μM APS
20 μM TEMED
3,9 ml H₂O

Laufpuffer 1 x (SDS-PAGE):

25 mM Tris-HCl
190 mM Glycin
0,1 % SDS (w/v)

Transferpuffer (Western-Blot):

1922 mM Glycin
25 mM Tris
20 % (v/v) Methanol
0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

vor Gebrauch 2 % β -Mercaptoethanol hinzufügen

TBS (Western-Blot):

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl

pH 7,6 mit HCl einstellen

TBST (Western-Blot):

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
0,1 % Tween20

pH 7,6 mit HCl einstellen

Ladepuffer für Agarosegele (OX):

10 ml TAE
10 ml Glycerin (87 %)
0,2 % Bromphenolblau
0,2 % Orange G
0,2 % Xylencyanol

Trizolpuffer(RNA-Extraktion):

380 ml Phenol mit 0,1 M Citrat-Puffer gesättigt
0,8 M Guanidiniumthiocyanat
0,4 M Ammoniumthiocyanat
33,4 ml/l NaAcetat (3 M pH 5,2 mit Essigsäure)
5 % Glycerin

LB-Medium:

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
pH auf 7,4 einstellen

Tfb 1:

30 mM	Kalium-Acetat, pH 8,5
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin (87 % v/v)

Tfb 2:

10 mM	MOPS pH 6,5
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15 % (v/v)	Glycerin (87 % v/v)

1 x Murashige & Skoog (MS)_{flüssig}:

4,4 g	MS-Salz
1 l	ultra pure H ₂ O

autoklavieren

DYT-Medium:

20 g/l	Trypton
10 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl
	pH auf 7,4 einstellen

TAE (50x):

2 M	Tris-HCl, pH 8,0
1 M	NaOAc
50 mM	EDTA

35 % Percoll:

35 %	Percoll (in GB buffer)
0,5 M	Hexylenglycol
50 mM	PIPES-KOH (pH 7,2)
10 mM	MgCl ₂
1 %	Triton X-100
	Mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen
5 mM	β -Mercaptoethanol

Elutionspuffer:

0,1 M	Glycin (pH 2,5) mit HCl
500 mM	NaCl
0,05 %	Tween20
	Mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen

Extraktionspuffer:

1 M Hexylenglycol
50 mM PIPES-KOH (pH 7,2)
10 mM MgCl₂
Mit H₂O auf 50 ml auffüllen
5 mM β -Mercaptoethanol
Mit Protease Inhibitor Tabletten (1 Tablette je 10 ml)

Crosslinkingpuffer:

50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8)
1 % Formaldehyd

Glycinlösung:

50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8)
0,3 M Glycin

Gradientenpuffer:

0,5 M Hexylenglycol
50 mM PIPES-KOH (pH 7,2)
10 mM MgCl₂
1 % Triton X-100
Mit H₂O auf 50 ml auffüllen
5 mM β -Mercaptoethanol

Sonicpuffer:

10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (pH 8,0)
Mit H₂O auf 50 ml auffüllen

Sonicpuffer (0,5 %SDS):

10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
1 mM EDTA (pH 8,0)
0,5 % SDS
Mit H₂O auf 50 ml auffüllen
Mit Protease Inhibitor Tabletten (1 Tablette je 10 ml)

Sonicpuffer (0,25 %SDS):

10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
1 mM EDTA (pH 8,0)
0,25 % SDS
Mit H₂O auf 50 ml auffüllen

RIPAF:

50 mM HEPES/NaCl (pH 7,4)
 140 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 % Triton X-100
 0,1 % Natriumdeoxycholat (DOC)
 Mit H₂O auf 50 ml auffüllen

RIPAF (+ SDS):

50 mM HEPES/NaOH (pH 7,4)
 140 mM NaCl
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 1 % Triton X-100
 0,1 % DOC
 0,1 % SDS
 Mit H₂O auf 500 ml auffüllen

Enzymlösung:

1,25 % Cellulase R-10 (0,625 g auf 50 ml)
 0,3 % Macrozyme R-10 (0,15 g auf 50 ml)
 0,4 M Mannitol (26,6 ml von 0,75 M auf 50 ml)
 20 mM KCl (2 ml von 0,5 M auf 50 ml)
 20 mM MES (2 ml von 0,5 M auf 50 ml)
 10 mM CaCl₂ (0,5 ml von 1 M auf 50 ml)
 +18,9 ml H₂O

steril filtrieren und bei 4 ° C lagern

MMg:

0,4 M Mannitol (26,6 ml von 0,75 M auf 50 ml)
 15 mM MgCl₂ (1,5 ml von 0,5 M auf 50 ml)
 4 mM MES (0,4 ml von 0,5 M auf 50 ml)
 +21,5 ml H₂O

steril filtrieren und bei 4 ° C lagern

PEG-Lösung:

20 g PEG 4000
 0,2 M Mannitol (13,3 ml von 0,75 M auf 50 ml)
 100 mM CaCl₂ (5 ml von 1 M auf 50 ml)
 Mit H₂O auf 50 ml auffüllen

steril filtrieren und bei 4 ° C lagern

WI:

0,5 M Mannitol (33,3 ml von 0,75 M auf 50 ml)
20 mM KCl (2 ml von 0,5 M auf 50 ml)
4 mM MES (0,4 ml von 0,5 M auf 50 ml)
Mit H₂O auf 50 ml auffüllen

steril filtrieren und bei 4° C lagern

W5:

154 mM NaCl (7,7 ml von 1 M auf 50 ml)
125 mM CaCl₂(2H₂O) (6,25 ml von 1 M auf 50 ml)
5 mM KCl (0,5 ml von 0,5 M auf 50 ml)
2 mM MES (0,2 ml von 0,5 M auf 50 ml)
Mit H₂O auf 50 ml auffüllen

steril filtrieren und bei 4° C lagern

Natriumphosphat-Puffer 50 mM pH 7,0:

57,7 ml Na₂HPO₄ (0,5 M)
42,3 ml NaH₂PO₄ (0,5 M)
900 ml H₂O

Natriumphosphat-Puffer 50 mM pH 7,2:

68,4 ml Na₂HPO₄ (0,5 M)
31,6 ml NaH₂PO₄ (0,5 M)
900 ml H₂O

Natriumphosphat-Puffer 50 mM pH 7,5:

80,95 ml Na₂HPO₄ (0,5 M)
19,05 ml NaH₂PO₄ (0,5 M)
900 ml H₂O

GUS-EX Puffer:

50 mM Natriumphosphat-Puffer mit β -Mercaptoethanol (5 μ l
je 10 ml Puffer)
10 mM EDTA
0,1 % Triton X-100
0,1 % Sarcosyl

GUS-Stopp:

200 mM Na₂CO₃

GUS-Stopp:

330 mM Na₂CO₃

MUG-Substrat:

0,04 g MUG
25 ml GUS-EX Puffer pH 7,5

MUN-Substrat:

Aliquot MUN
1,9 ml GUS-EX Puffer pH 7,0

3.5 Größenstandards

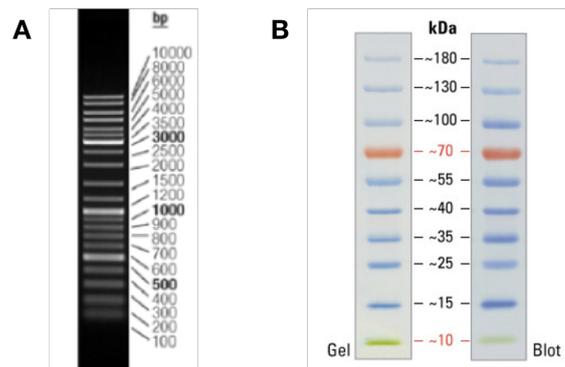


Abbildung 3.1 – Größenstandard für DNA und Protein-Gele. A: DNA-Größenstandard für Agarosegele (Generuler TMDNA Ladder Mix (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*)) **B:** Protein-Größenstandard für SDS-Gele und WesternBlot (PageRuler TMPrestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*))

3.6 Enzyme

Tabelle 3.6 – Enzyme

Enzym	Hersteller
BIOTAQ TM DNA-Polymerase (qRT-PCR)	Bioline Ltd.
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Dream <i>Taq</i> TM DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc.
BP-Clonase TM II Reaction Mix	Invitrogen TM
LR-Clonase TM II Reaction Mix	Invitrogen TM
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Restriktionsenzyme (alle verwendeten)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
RevertAid TM H Minus Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Inc.

Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc.
NEBNext T4 DNA-Ligase	NEW ENGLAND Biolabs [®] Inc.
T7 RNA-Polymerase	Jena Bioscience GmbH

3.7 Antikörper für Western-Blot

Tabelle 3.7 – Antikörper für Western-Blot

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Hersteller
α KIN10	KIN10	polyklonal aus Kanninchen	1:500	Agrisera AB
α KIN11	KIN11	polyklonal aus Kanninchen	1:1000	Agrisera AB
α GFP	GFP-TAG	polyklonal aus Kanninchen	1:4000	Cell signaling
α HA	HA-TAG	polyklonal aus Kanninchen	1:4000	Abcam plc.
α rabbit	Kanninchen Immunoglobulin	polyklonal aus Esel, Peroxidase gekoppelt	1:5000	GE Healthcare Company
α mouse	Maus Immuno- globulin	polyklonal aus Schaf, Peroxidase gekoppelt	1:5000	GE Healthcare Company

3.8 Software

- Erstellen der Dissertationsschrift: Texmaker 5.0.3
- Diagramme erstellt mit Hilfe von Microsoft[®] Office für Mac, Version 16.12
- qRT-PCR Messungen: CFX Manager[™]Software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- Genevestigator, ETH Zürich (Schweiz)
- Geneios R6 (6.1.6), ©2005-2013 Biomatters Limited (Neuseeland)
- RNA-Seq Alignment v1.0.0.0 App (BaseSpace Plattform von Illumina; USA)
- Gene_ Ontology: DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang *et al.*, 2009)
- Experion Software, Version 3.20 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- Statistische Auswertung bioinformatischer Daten: R Version 3.6.1 ©2019 R Foundation (Free Software Environment mit Sitz in Wien, Österreich)

- NanoDroptTM2000/2000c Spectrophotometers V1.6 (©2009 Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
- Messen der Wurzellänge: ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA)
- Arabidopsis eFP Browser; bar.utoronto.ca (University of Toronto, Kanada. Siehe: (Winter *et al.*, 2007; Brady *et al.*, 2007))
- Venn-Diagramme: bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn
- Identifizierung möglicher Bindestellen für Transkriptionsfaktoren: http://neomorph.salk.edu/dap_web/pages/index.php
- Erstellung von Oligonukleotiden: <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar und Remm, 2007)
- Auswertung und Analyse von RNA-Seq Daten: MapMan 3.6.0RC1 (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie)
- Messung der Photonenaktivität: ImagingWin V2.41a (Heinz Walz GmbH)

3.9 Geräte

Tabelle 3.8 – Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VE-100	Systec GmbH
Automatische Pipetten	pipetman Classic TM	Gilson, Inc.
Beleuchtungsapparatur (Fotographie)	Reprostar	CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG (Schweiz)
Digitalkamera	EOS 50D	Canon
elektrische Pipette	Eppendorf Xplorer 15-300 μ l	Eppendorf AG (Deutschland)
Eismaschine	Frimont MF 26	Scotsman ICE srl
Gefriertruhe -20 ° C	Verschieden	Privileg und Bosch
Gefriertruhe -80 ° C	-85 ° C Ultra low freezer	New Brunswick Scientific Co., Inc.
Geldokumentationsanlage	Gel iX Imager	Intas Science Imaging GmbH
Gelelektrophoresekammern	Eigenbau	Werkstatt der Universität Würzburg
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf AG (Deutschland)

Inkubationsschrank 37° C	WB 120	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH
Intelli-Mixer	Überkopfschüttler	ELMI (Lettland)
Klimakammer		York International GmbH
Klimaschrank I	Percival	Percival Scientific, Inc.
Klimaschrank II	Wachstumsschrank	BINDER GmbH
Kühlschränke	Verschieden	Liebherr und Bosch
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG (Deutschland)
Kugelmühle	Schwingmühle MM 400	Retsch GmbH
Lichtmikroskop	BIOMED	Leitz GmbH
Magnetständer, 0,2 ml Tubes	DynaMag™- PCR	Invitrogen™
Magnetrührer	RET basic	IKA® -Werke GmbH & Co. KG
Nanodrop™	NanoDrop™2000c	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Spektralphotometer		Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
PCR-Maschine/ ThermoCycler	T100 Thermal Cycler	
pH-Meter	Five Easy Plus pH/mV	Mettler-Toledo Inc.
RealTime PCR-Gerät	C1000™ Thermal Cycler CFX96 Real-Time System	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
Rotationsschüttler	Orbital-Shaker PSU-10i	Grant Instruments Ltd.
Semi-Dry-Blot- Apparatur	Eigenbau	Werkstatt der Universität Bielefeld
Standzentrifuge	Rotina 420R	Hettich GmbH & Co. KG
Sterilbank	Envircor	Ceag Schirp Reinraumtechnik AG
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417C	Eppendorf AG (Deutschland)
Vortex-Mixer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.
Waage	Kern EW 1500-2M	KERN & Sohn GmbH

3.10 Verbrauchsmittel

Tabelle 3.9 – Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Alufolie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Autoklavierbeutel	Sarstedt AG & Co.
Fließpapier (0,4 mm)	Whatman
Glasware	Schott AG, Brand GmbH & Co. KG
PVDF-Membran (Immun-Blot®)	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
Kunststoff-Einwegmaterial (Reaktionsgefäße, Spitzen für Pipetten, Küvetten, Schraubdeckelgefäße, etc.)	Sarstedt AG & Co., Eppendorf AG, Greiner Bio One International GmbH
Leukopor®	BSNmedical GmbH
Papierfilter	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Papiertücher	Plock GmbH
Petrischalen (Ø 92 mm und 35 mm)	Sarstedt AG & Co. KG
Pflanzentöpfe (Ø 7 cm, TO7D)	Pöppelmann GmbH & Co. KG
Schikanekolben	Schott AG
Spatel, T-Form	VWR International GmbH
96 Well Platten (für qRT-PCR)	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
50 ml Zentrifugenröhrchen (High-Speed)	Herolab GmbH

3.11 Chemikalien

Tabelle 3.10 – Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biometra
Ampicillin	AGS
AMPure XP Beads	Beckman Coulter, Inc.
Brij-35	AppliChem GmbH
BASTA®	AgrEvo
Chloramphenicol	Duchefa Biochemie B.V
Chloroform	Merck KGaA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Co.
DNA Stain G (Gelstain)	SERVA Electrophoresis GmbH
dNTPs	MBI Fermentas
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG
EDTA 25 mM (DNase I-Verdau)	Fermentas
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH

Ethanol, absolut	Merck KGaA
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin (87%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kalimhydroxidlösung (KOH) 50%	Carl Roth GmbH & Co. KG
D-Luciferin Kalium Salz	Synchem
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Murashige & Skoog (MS) -Salze	Duchefa Biochemie B.V
Natriumhypochlorit	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Neudomück [®]	Promega [®] , Neudorff GmbH KG
Nonidet P-40 (oder Igepal)	AppliChem (Sigma)
β -Estradiol	Sigma-Aldrich Co.
Phenol	AppliChem GmbH
Phenylmethylsulfonyl (PMSF)	ApplicChem GmbH
Polyoxyethylene-10tridecaether (PTE)	Sigma-Aldrich Co.
Ponceau rot	Sigma-Aldrich Co.
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (HCl)	Hedinger GmbH & Co. KG
SYBR [®] Green (für qRT-PCR)	Lonza
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween-20	Sigma-Aldrich Co.

Nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, Carl Roth GmbH & Co. KG oder Sigma-Aldrich Co. bezogen.

3.12 Kits

Tabelle 3.11 – Kits

Kit	Hersteller
NEBNext [®] Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (# E7490)	NEW ENGLAND <i>BioLabs</i> [®] <i>Inc.</i>
NEBNext [®] Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) (# E7600)	NEW ENGLAND <i>BioLabs</i> [®] <i>Inc.</i>
NEBNext [®] Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina [®] (# E7530)	NEW ENGLAND <i>BioLabs</i> [®] <i>Inc.</i>
Experion [™] DNA 1K Reagents Kit (# 7007107)	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>

Experion™ DNA Chips (# 7007163)	Bio-Rad <i>Laboratories, Inc.</i>
Enhanced Chemiluminescence Plus Kit (ECL™)	GE Healthcare Company
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	QIAGEN N.V.
RNeasy® Micro Kit	QIAGEN N.V.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Um DNA gezielt in Bakterien einzubringen, werden Bakterien für die Aufnahme von Fremd-DNA nach einer modifizierten Methode von Inoue *et al.* (1990) durch Behandlung mittels der Rubidiumchloridmethode vorbereitet. Am Vortag wird eine Übernachtskultur in LB-Medium ohne Selektionsmarker bei 37 ° C und 160 Umdrehungen pro Minute (engl.: revolution per minute) (rpm) aus einem Glycerolstock angeimpft. Im Anschluss werden 50 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur des gewünschten *Echerichia coli* (*E. coli*)-Stammes angeimpft und bei 37 ° C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Die Bakterienkultur wird dann für 5 Min. bei 4500 rpm bei 4 ° C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden in 5 ml sterilfiltriertem, kalten Tfb I-Puffer resuspendiert und 5 Min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation (5 Min., 4500 rpm, 4 ° C) wird das Bakterienpellet in 2 ml Tfb II-Puffer resuspendiert und dann 30 Min. auf Eis inkubiert. In der Folge wird die Lösung nochmals resuspendiert, zu jeweils 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltenen Aliquots chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen können nun bis zur weiteren Verwendung bei -80 ° C gelagert werden.

4.1.2 Transformation von DNA in *E. coli*

Für die Transformation werden die tiefgefrorenen *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 50 ng DNA oder max. 10 % des Zielvolumens der kompetenten Zellen mit dem Ligationsansatz versetzt. Der Reaktionsansatz wird dann für 30-60 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 45 Sekunden (Sek.) bei 42 ° C. Die Bakteriensuspension wird dann mit 600 µl DYT-Medium versetzt und der Ansatz für 45 Min. bei 37 ° C und 350 rpm zur Expression des Resistenzgens inkubiert. Die Bakteriensuspension wird anschließend auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 ° C inkubiert. (Avery *et al.*, 1944)

4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse von Polymerase Chain Reaction (PCR)-Reaktionen werden 1 % Agarose mit 1 TAE-Puffer erhitzt und 0,01 % DNA Stain G (SERVA) vor dem Erkalten hinzugegeben. Dieser Puffer eignet sich sehr gut, um DNA aus einer DNA-Spaltungsreaktion oder einer PCR-Reaktion aufzureinigen. Zur Überprüfung von Reinheit und Ausbeute kann auch ein TBE-Puffer verwendet werden. Für die Agarosegelelektrophorese werden die auspolymerisierten Gele in eine Gelkammer PerfectBlue (Peqlab) eingesetzt, die Taschen maximal mit der zu untersuchenden Probe

beladen und 5-7 μl des DNA-Größenstandards MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) in eine freie Tasche gegeben. Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wird eine Spannung von 140 V für 45 Min. angelegt. Für die Analyse werden die TAE-Gele auf einem UV-Transilluminator-System (Intas) fotografiert, betrachtet und die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten.

4.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die ausgeschnittenen DNA-Fragmente werden mit dem NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) isoliert. Die Extraktion erfolgt nach den Angaben des Hersteller und wird mit 20 μl Elutionspuffer durchgeführt.

4.1.5 Plasmid-Isolation aus *E. coli*

Zur Isolierung reiner DNA aus Bakterien stehen je nach Menge zwei verschiedene Kits zur Verfügung. Für kleinere Mengen an Plasmid-DNA eignet sich das NucleoSpin[®] Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Sollen größere Mengen DNA isoliert werden, so wird das Plasmid *Plus* Midi-Kit (QIAGEN[®]) verwendet. In beiden Verfahren erfolgt die Extraktion der DNA nach den Angaben in den Herstellerprotokollen.

4.1.6 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Tabelle 4.1 – PCR-Ansatz für Mutagenese/Amplifikation eines DNA-Fragments

Zutat	Menge
DNA-Matrize	10-50 ng
Polymerasepuffer (5 x)	10 μl
dNTP-Mix (100 mM)	1 μl
Oligonukleotid 5' (10 μM)	1 μl
Oligonukleotid 3' (10 μM)	1 μl
Polymerase	1 μl

Mit der PCR lassen sich DNA-Abschnitte gezielt *in vitro* vervielfältigen. Bei der Reaktion wird ein DNA-Stück aus einer vorherigen PCR oder ein Plasmid als Matrize verwendet. Beim Einbau einer Mutation in die DNA verwendet man zwei Oligonukleotide, die komplementär sind und die gewünschte Mutation bei Basenaustauschen nach der Quick-Change[™]-Methode (Startagene) enthalten. Soll dagegen ein DNA-Abschnitt transferiert werden, benutzt man Oligonukleotide, die flankierend an den DNA-Abschnitt binden und die entsprechenden Restriktionsschnittstellen besitzen. Zur Reaktion gibt man freie Desoxyribonukleotide (dNTPs), den Polymerase-spezifischen Reaktionspuffer und die Polymerase (siehe Tab. 4.1). Die Reaktion erfolgt in den drei repetitiven Temperaturschritten Denaturierung, Anlagerung und Kettenverlängerung. In der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang

durch Hitze in seine komplementären Einzelstränge aufgebrochen. Während der Anlagerung hybridisieren die Oligonukleotide an die komplementäre Matrize und in der Verlängerung synthetisiert die Polymerase mit Hilfe freier dNTPs den Doppelstrang (Mullis *et al.*, 1986).

Tabelle 4.2 – PCR-Programm für die Mutagenese/Amplifikation eines DNA-Fragments

Schritt	Temperatur in [° C]	Dauer in [s]	Bemerkungen
Initiale Denaturierung	95	300	
Denaturierung	95	30 - 60	
Anlagerung	52-70 *	30 - 60	
Vervielfältigung	72	30 - 600 **	zurück zur Denaturierung für 20 - 30 Zyklen
finale Vervielfältigung	72	120 - 600	
Kühlung	4	∞	

* abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide

** abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Synthesegeschwindigkeit der DNA-Polymerase

Soll der DNA-Abschnitt in einen anderen Vektor transferiert werden, so wird das bei der PCR generierte Fragment über ein TAE-Gel aufgereinigt und entweder direkt mit entsprechenden Restriktionsenzymen und spezifischem Puffer verdaut oder über den Zwischenvektor pJET 1.2 nach Protokoll des Herstellers ligiert. Anschließend wird der Ligationsansatz in *E. coli DH5α* transformiert, positive Klone einer Plasmidpräparation unterzogen und das erhaltene Plasmid sequenziert (Eurofins, LGC Genomics). Mit diesem Zwischenschritt können geeignete DNA-Fragmente amplifiziert und für die weitere Verarbeitung gewonnen werden. Anschließend werden Zielvektor und Zwischenvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und spezifischem Puffer verdaut. Der Ansatz wird für 1 Stunde (Std.) bei 37 ° C inkubiert, auf ein TAE-Gel aufgetragen, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mit dem Machery-Nagel NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Durch die Fragmentlänge der DNA-Stücke wird das Mischverhältnis zwischen einzufügendem DNA-Stück und verdautem Plasmid in etwa äquimolar eingestellt und mit der T4-Ligase (NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.) mindestens 1 Std. bei RT ligiert. Nach der Ligation werden zum Zielvolumen der kompetenten Zellen max. 10 % des Ligationsansatzes gegeben und transformiert (siehe Kapitel 4.1.2). Mit Hilfe einer Kolonien-PCR (siehe Kapitel 4.1.7) werden positive Klone vorselektioniert sowie der korrekte und fehlerfreie Einbau des DNA-Fragments durch eine Sequenzierung überprüft. Im Fall eines Basenaustauschs entsteht als Produkt ein vollständiges linearisiertes zirkuläres Plasmid mit zwei Einzelstrangbrüchen, das die Mutation an der gewünschten Stelle trägt. Nach der PCR wird der Ansatz mit 10 U der Endonuklease DpnI für mindestens 1 Std. bei 37 ° C inkubiert. Die Endonuklease erkennt spezifisch methylierte DNA und baut diese ab. So verbleibt nur die neu

unmethyliert synthetisierte DNA, welche in chemisch kompetente Zellen transformiert wird (siehe Kapitel 4.1.2). Dort findet auch die Reparatur der Einzelstrangbrüche statt. Von den Klonen wird eine Plasmidpräparation durchgeführt und durch Sequenzieren auf die erfolgte Mutation überprüft.

4.1.7 Die Kolonien-PCR

Diese Methode der Kolonien-Polymerase-Ketten-Reaktion eignet sich zur Vorselektion von neu hergestellten Konstrukten. Dazu wird eine Kolonie in 5 μl H_2O gelöst und initial denaturiert. Anschließend werden die Komponenten aus Tab. 4.3 hinzugefügt und die eigentliche PCR startet.

Tabelle 4.3 – Zusammensetzung einer Kolonien-PCR

Zutat	Menge
eine Kolonie	
dNTP-Mix (10 mM)	1 μl
Oligonukleotid 5' (10 μM)	1 μl
Oligonukleotid 3' (10 μM)	1 μl
Taq-Polymerasepuffer (10 x)	2 μl
Taq-Polymerase	0,2 μl
Wasser	ad 20 μl

Neben dem neu hergestellten DNA-Fragment werden flankierende Oligonukleotide benutzt, die auch für die Sequenzierung genommen werden. Es entsteht ein neuer DNA-Abschnitt der etwas größer ist, als das ursprüngliche Fragment aus der PCR. Zudem wird die Zeit für die Verlängerung der DNA vergrößert, da die verwendete Taq-Polymerase eine geringere Synthesegeschwindigkeit besitzt (siehe Tab. 4.3).

Tabelle 4.4 – Kolonie-PCR Programm

Schritt	Temperatur in [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer in [s]	Bemerkungen
Initiale Denaturierung	95	300	
Denaturierung	95	30	
Anlagerung	54	30	
Vervielfältigung	72	30 - 300 *	zurück zur Denaturierung für 20 - 30 Zyklen
finale Vervielfältigung	72	120 - 600	
Kühlung	4	∞	

* abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Synthesegeschwindigkeit der DNA-Polymerase

Im Anschluss werden die Proben mit DNA-Ladepuffer versehen, auf ein TAE-Gel geladen, das Gel ausgewertet und anhand der Ergebnisse Klone ausgewählt, die für die Sequenzierung geeignet sind.

4.1.8 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen

Bei der Aufreinigung genomischer DNA findet die Extraktion des Pflanzenmaterials mit CTAB-Puffer statt (Doyle, 1990). Bei dieser Methode nutzt man das Prinzip der Phasentrennung. Mit Hilfe von Chloroform kann sich die DNA besser in der hydrophilen Phase lösen, während sich in der hydrophoben Chloroform-Phase Chlorophyll und andere Bestandteile sammeln.

- Pflanzenmaterial homogenisieren.
- 500 μ l CTAB-Puffer hinzugeben.
- Inkubation für 15 Min. bei 65 ° C.
- 500 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (v/v 24:1) zugeben und gut mischen.
- Zentrifugation für 5 Min. mit 13.000 rpm bei Raumtemperatur (RT).
- Obere, wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- In gleichem Volumen eiskaltes Isopropanol zugeben und gut mischen.
- 2 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zentrifugation für 10 Min. mit 13.000 rpm bei RT.
- Überstand vorsichtig abkippen und verwerfen.
- Pellet mit 700 μ l 70% Ethanol (EtOH) waschen.
- Zentrifugation für 5 Min. mit 13.000 rpm bei RT.
- EtOH vorsichtig abnehmen.
- Pellet kurz in der SpeedVac bei 45 ° C trocknen.
- Pellet in 50-100 μ l ddH₂O resuspendieren und am NanoDropTM messen.

4.1.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die photometrische Bestimmung der DNA Konzentrationen findet mit Hilfe des NanoDropTM2000c von *Thermo Fisher Scientific, Inc.* statt. Mit der Referenzlösung von reinem Wasser/Elutionspuffer (1,5 μ l) wird die NanoDropTM Software auf die Referenz abgeglichen. Bei der anschließenden Konzentrationsbestimmung der Proben werden jeweils 1,5 μ l auf die Messoberfläche pipetiert und gemessen. Hierbei werden Lichtblitze mit Hilfe von optischen Lichtleiterkabel durch die wässrige Lösung geschickt, durch ein Spektralphotometer gemessen und Absorptionskoeffizienten bei 260 und 280 nm aufgenommen. Das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 zu 280 nm wird verwendet, um eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren (DNA und RNA) zu machen. Werte von 1,8 bzw. 2,0 werden in Normalfall als *rein* angesehen.

4.1.10 Restriktion von DNA

Mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II lässt sich doppelsträngige DNA innerhalb von spezifischen Erkennungssequenzen schneiden (Smith und Wilcox, 1970). Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei überhängende („sticky“) oder glatte („blunt“) Enden. Die optimalen Reaktionsbedingungen können mit dem Puffersystem der Firma *Thermo Fisher Scientific, Inc.* für die verschiedenen Restriktionsenzyme ermittelt werden. Die DNA wird in einer Endkonzentration von 0,1 μ g/ μ l mit 2 u Enzym/ μ g DNA für 2 Std. bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Spaltung wird eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt und gewünschte DNA-Fragmente isoliert.

4.1.11 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der erstellten Konstrukte auf ihre richtige Basenabfolge wurden die Produkte und Klonierungen sequenziert. Dies wurde von den Firmen LGC Genomics GmbH, Abteilung Berlin und von GATC (jetzt Eurofins) nach der von Sanger entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Anschließend wurden die Ergebnisse der sequenzierten PCR-Produkte mit der Software Geneious R6 (6.1.8) ausgewertet.

4.1.12 Chromatin-Immunopräzipitation

A Kreuzvernetzung der DNA-Protein Komplexe

Die Kreuzvernetzung der DNA-Proteinkomplexe (Solomon *et al.*, 1988; Solomon und Varshavsky, 1985) erfolgt mit Hilfe eines formaldehydhaltigen Crosslinkingpuffers.

- Je 3 Platten mit Keimlingen pro Linie ernten und in Nylonstrümpfe packen.
- In die ChIP-Gefäße überführen und mit ca. 1l Crosslinkingpuffer (+ 1% Formaldehyd) überschichten.

- Vakuum anlegen bis die Keimlinge mit dem Puffer getränkt sind (2 x 6 Min.), dann nochmal 18 Min. ohne Vakuum inkubieren.
- Puffer entsorgen, einmal mit 200 ml kalter Glycinlösung spülen und 800 ml dazugeben.
- 5 Min. Vakuum anlegen.
- 5 Min. bei Raumtemperatur ohne Vakuum inkubieren.
- Keimlinge mit reichlich eiskaltem, doppelt destilliertem H₂O waschen.
- Keimlinge trocken tupfen und in Alubeutel überführen, in flüssigem Stickstoff einfrieren und bei -80° C lagern.

B Isolation der Kerne

In diesem Schritt werden die Kerne von den restlichen Zellorganellen und Zelltrümmern getrennt. Die Durchführung erfolgt bei 4° C.

- Keimlinge in Stickstoff sehr fein aufmörsern und in Stickstoff gekühlte Falcons überführen.
- In 20 ml kalten Extraktionspuffer aufnehmen.
- Mit einem Homogenisator (Micra) auf Stufe B für etwa 15 Min. weiter homogenisieren.
- Anschließend durch 2 Lagen Mircaloth (je 10 x 10 cm) filtrieren und stark nachdrücken.
- Das Volumen mit Extraktionspuffer auf genau 24 ml auffüllen.
- Probe in 30 ml Beckerglas mit kleinem Rührfisch überführen.
- Mit geringer Geschwindigkeit Rühren und langsam 1 ml 25 % Triton zutropfen lassen.
- 15 Min. weiter rühren.
- 6 ml 35 % Percoll in Falcon vorlegen und mit 25 ml Kernen überschichten.
- Bei 4° C und 2000 g (3500 rpm) mit soft Start/Stopp 30 Min. abzentrifugieren.
- Extraktionspuffer und 35 % Percoll vom gräulichen Kernpellet abnehmen.
- Zunächst in 5 ml kalten Gradientenpuffer mit abgeschnittener Spitze aufnehmen, dann in weiteren 15 ml Gradientenpuffer resuspendieren.
- Auf ein neues 6 ml 35 % Percollkissen geben.

- Bei 4 ° C und 2000 g (3500 rpm) mit soft Start/Stopp 10 Min. abzentrifugieren.
- Überstand abnehmen, die Kerne in 0,52 ml kalten Sonicpuffer (+ 0,5 % SDS) aufnehmen und in eiskaltes 2 ml Eppendorfcup überführen.
- 20 Min. unter leichter Schwenkbewegung auf dem Intellimixer (10 rpm) bei 4 ° C inkubieren.
- 0,52 ml kalter Sonicpuffer (ohne SDS) dazugeben und schwenken.
- Je 520 μ l in neues, kaltes 1,5 ml Eppendorfcup überführen.
- 20 μ l für Agarosegelelektrophorese entnehmen und bei -80 ° C lagern.

C Fragmentierung des Chromatins

- Eis und ddH₂O mischen, in das Kühlgefäß des Sonifikators geben.
- Proben in den Sonifikator stellen und die Spitzen des Sonifikators 0,5 cm eintauchen.
- Ultraschallbehandlung: 3 Durchgängen, jeweils 10 Zyklen, 30 Sek. Pulse und 60 Sek. Pause.
- 15 Min. Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4 ° C, anschließend Überstand gepoolt, in Aliquots je 200 μ l in Stickstoff gefrieren und bei -80 ° C gelagert.
- 50 μ l von jedem Ansatz aufgehoben, um damit DNA-Konzentration zu bestimmen und 20 μ l für ein DNA-Gel.

De-crosslinking:

- Zu 50 μ l Probe 150 μ l Sonicpuffer (+ 0,25 % SDS) und 5 μ l Proteinase K (20mg/ml stock) geben.
- Inkubation für 1 Stunde bei 42 ° C.
- Inkubation über Nacht bei 65 ° C.

Quantifizierung der DNA in den Chromatinproben:

- 200 μ l Probe + 200 μ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) vermischen und 30 Sek. vortexen.
- Zentrifugation für 10 Min. mit 13.000rpm bei RT.
- Obere, wässrige Phase in neues Eppendorfgefäß überführen.
- 20 μ l 3 M Na-Acetat (ph 5,2), 0,6 μ l Glykogen (20 mg/ml) und 500 μ l kalten 96 % EtOH dazugeben.

- Gut mischen und 4 Std. bei -80°C lagern.
- Zentrifugation für 1,5 Std. mit 13.000 rpm bei 4°C .
- Pellet mit $900\ \mu\text{l}$ 70 % Ethanol waschen.
- Zentrifugation für 20 Min. mit 13.000 rpm bei 4°C .
- Pellet bei 42°C für 1,5 Min. trocknen, anschließend in $100\ \mu\text{l}$ H_2O lösen.
- Konzentration bestimmen.
- Je $10\ \mu\text{l}$ von sonifizierter Probe und intaktem Chromatin zur Kontrolle der Fragmentgröße mit einem 1 %-igem Agarosegel überprüfen.

D Immunopräzipitation

Die aliquotierten Chromatin-Proteinkomplexe werden nun für die Immunopräzipitation verwendet:

- Chromatin langsam auf Eis auftauen.
- Zentrifugation für 5 Min. mit 13.000 rpm bei 4°C .
- Gleiche Mengen von Kontrolle und Probe in neues Eppendorfgefäß überführen.
- Mit Sonicpuffer (+ 0,25 % SDS) auf $200\ \mu\text{l}$ auffüllen.
- $300\ \mu\text{l}$ RIPAF ohne SDS dazu geben und leicht mischen.
- $50\ \mu\text{l}$ als Input-Kontrolle abnehmen und mit $400\ \mu\text{l}$ Sonicpuffer (+ 0,25 % SDS) versehen.
- Probe mit $3\ \mu\text{g}$ Antikörper versehen.
- Inkubation auf dem Intellimixer (10 rpm) für 4 Std. bei 4°C .
- $75\ \mu\text{l}$ in RIPAF + SDS aufgenommene Magnetic beads zugeben.
- 2 Std. auf dem Intellimixer (10 rpm) bei 4°C .
- Magnetic beads mit gebundenem Antikörper und Proteinen fünf mal mit 1 ml RIPAF waschen.
- Mit 2 x $150\ \mu\text{l}$ Glycin Elutionspuffer eluieren und Eluate vereinen.
- $300\ \mu\text{l}$ Überstand direkt in $150\ \mu\text{l}$ 1 M Tris-HCl (pH 9,7) geben.
- Decrosslinking.

E Aufreinigung der DNA für die Realtime PCR

- 450 μ l des Eluats und der Inputkontrolle mit 450 μ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versehen und vortexen.
- Zentrifugation für 10 Min. mit 13.000 rpm bei RT.
- Wässrige Phase in neues Eppendorfgefäß überführen.
- 450 μ l Chloroform:Isoamylalkohol hinzugeben und vortexen.
- Zentrifugation für 10 Min. mit 13.000 rpm bei RT.
- 450 μ l Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen.
- 45 μ l 3 M Na-Acetat (pH 5,2), 0,6 μ l Glykogen (20 mg/ml) und 1 ml kaltes 96 % EtOH dazugeben.
- Gut mischen und für 4 Std. bei -80° C lagern.
- Zentrifugation für 1,5 Std. mit 13.000 rpm bei 4° C.
- Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol waschen.
- Zentrifugation für 20 Min. mit 13.000 rpm bei 4° C.
- Pellet für 1,5 Min. bei 42° C trocknen.
- IP DNA in 80 μ l H₂O und Inputkontrolle in 300 μ l H₂O lösen.
- Für die Realtime werden jeweils 5 μ l der IP- und Input-DNA eingesetzt.

4.2 Arbeiten mit RNA

4.2.1 Das RNase-freie Arbeiten

Nach dem Ernten der Keimlinge ist bei allen weiteren Arbeiten auf ein RNase-freies Arbeiten zu achten. Damit die RiboNucleic Acid (RNA) im Laufe der weiteren Arbeiten nicht degradiert wird, ist neben dem Tragen von Handschuhen auf folgende Maßnahmen zu achten:

Sämtliche Flüssigkeiten und Puffer sollten mit RNase-freiem Wasser oder DEPC-H₂O hergestellt werden. Alle Gebrauchsmittel sollten vor Gebrauch mit DEPC-H₂O abgespült werden. Außerdem sind die Keimlinge direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Darüber hinaus kann in Betracht gezogen werden, einen RNase-Inhibitor zu verwenden.

4.2.2 Extraktion von RNA aus Pflanzen

Die Gesamt-RNA wird mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Dazu wird der RLT-Puffer vor Beginn der Arbeiten mit 1% (v/v) β -Mercaptoethanol versetzt.

- Die gemörserten Keimlinge werden aus dem Stickstoff geholt, sofort mit 350 μ l RLT-Puffer versetzt und gut geschüttelt.
- Entfernen der Kugeln aus den Reaktionsgefäßen.
- Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 Min..
- Überstand in 350 μ l 70% Ethanol lösen und die gesamte Lösung in die mitgelieferte Säule geben (RNeasy MinElute spin column).
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 20 Sek..
- Durchfluss verwerfen und 700 μ l RW1-Puffer auf die Säule geben.
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 20 Sek..
- Säule in ein neues Auffanggefäß stellen und 500 μ l RPE-Puffer auf die Säule geben.
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 20 Sek..
- Durchfluss verwerfen und 500 μ l 80% Ethanol auf die Säule geben.
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 Min..
- Säule in ein neues Auffanggefäß stellen.
- Zentrifugation mit geöffnetem Deckel bei 14.000 rpm für 5 Min..
- Säule in ein neues Reaktionsgefäß stellen, 14 μ l RNase-freies H₂O auf die Säule geben und 1 Min. bei RT inkubieren.
- Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 Min..

4.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die photometrische Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgt mit Hilfe des NanoDropTM2000c von *Thermo Fisher Scientific, Inc.* und der mitgelieferten Software. RNase-freies Wasser (1,5 μ l) wird als Referenz verwendet. Von jeder Probe werden 1,5 μ l auf die Detektionsfläche pipettiert und gemessen. Hierbei wird die Absorption von Licht durch wässrige Lösungen von RNA bei 260 nm bestimmt. Daneben wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm für Proteine gemessen. Der Quotient aus beiden Werten OD_{260/280} stellt dabei ein Maß für den Reinheitsgrad dar und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

4.2.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) für die qRT-PCR

Da bei der Isolation der RNA noch DNA durch Kontamination vorhanden sein kann, erfolgt zunächst ein Verdau mit DNase I, um mögliche Verunreinigungen zu eliminieren. Hier werden je Ansatz 1 μg RNA als Template in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und mit H_2O auf 16 μl aufgefüllt. Zu diesem Ansatz gibt man 2 μl DNase I und 2 μl 10x DNase I-Puffer. Die Reaktionsansätze werden für 30 Min. bei 37 ° C inkubiert und nach Zugabe von 1 μl EDTA für 10 Min. auf 65 ° C erhitzt. Damit wird die DNase I inaktiviert. Die Eigenschaft der reversen Transkriptase Oligonukleotide die an die RNA gebunden sind, in 3'-Richtung zu verlängern, macht man sich bei der reversen Transkription zu nutze. Eine Mixtur aus Oligo dT und „random nonamer Primern“ bilden die Startbindestellen für die reverse Transkriptase, wobei sich Oligo dTs an den Poly-A-Schwanz der RNA anlagern, während „random nonamer Primer“ an die verschiedensten Stellen der RNA binden. Dadurch werden alle mRNA Basen in eine komplementäre DNA (engl.: complementary DNA) (cDNA) umgeschrieben und es entsteht ein DNA-Einzelstrang.

Hierfür werden zu den Ansätzen aus dem DNase I-Verdau 0,2 μl Oligo dT (100 mM) und 1 μl „random nonamer Primer“ (200 mM) hinzugefügt. Im Thermocycler werden die Ansätze bei 70 ° C für 10 Min. inkubiert. Danach werden 2 μl dNTPs (je 10 mM), 6 μl RevertAidTMH- M-MulV Reverse-Transkriptase-Puffer und 0,25 μl RevertAidTMH-Reverse-Transkriptase hinzu pipettiert. Die Ansätze für 70 Min. bei 42 ° C inkubiert, anschließend auf 70 ° C erhitzt und für 10 Min. gehalten, um die Reaktion zu stoppen. Abschließend werden die Proben auf 4 ° C gekühlt und im Verhältnis 1:6 mit H_2O verdünnt. Die cDNA ist so als Template für die qRT-PCR einsetzbar und kann für spätere Verwendung bei -20 ° C gelagert werden.

4.2.5 qRT-PCR

Die Quantifizierung der DNA kann mit einer quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) durchgeführt werden, welche auf einer Vervielfältigung von DNA einer gewöhnlichen PCR aufbaut. Hier wird neben sequenzspezifischen Oligonukleotiden ein in die DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, welcher eine Quantifizierung der neu synthetisierten PCR-Produktmenge nach jeder Elongationsphase in Echtzeit ermöglicht. Als Farbstoff wird SYBR[®] Green eingesetzt, welcher sich in doppelsträngige DNA einlagern kann und dadurch das Absorptions-/ Emissionsspektrum ändert. Eine Zunahme der Fluoreszenz während einer qRT-PCR spiegelt folglich eine steigende Menge an DNA durch die Amplifikation wieder. Je nach Ausgangsmenge des Template werden mehr oder weniger Zyklen benötigt, um ein Fluoreszenzsignal zu bekommen, welches über dem Hintergrund liegt (Gibson *et al.*, 1996). Beim Vergleich mit dem Produkt aus einer parallel erfolgten qRT-PCR mit Oligonukleotiden für ein ausgewähltes konstitutiv exprimiertes Gen (engl: housekeeping gene) erhält man so die Möglichkeit, auf die ursprüngliche Anzahl Kopien im Verhältnis zum erstellten Standard des Housekeeping-Gens

rückzuschließen (Kubista *et al.*, 2006). Weiter kann man mit einer qRT-PCR die Kopienzahl für ein bestimmtes Gen in einer definierten Zellzahl ermitteln, indem die mRNA isoliert (siehe Kapitel 4.2.2), mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 4.2.4) und als Matrize für die qRT-PCR eingesetzt wird. Eine Verdünnung der cDNA ist notwendig, um die überführten Oligonukleotide und reverse Transkriptase aus der vorherigen Reaktion klein zu halten, da diese die nachfolgende PCR-Reaktion in hohem Maße beeinflussen kann (Chumakov, 1994).

Tabelle 4.5 – Pipettierschema für eine qRT-PCR-Reaktion

17,65 μl	H ₂ O
2,5 μl	10x NH ₄ Reaktions-Puffer
1,0 μl	MgCl ₂ (50 mM)
0,25 μl	dNTPs (je 10 mM)
0,625 μl	sequenzspezifisches Oligonukleotid vorwärts (10 μM)
0,625 μl	sequenzspezifisches Oligonukleotid rückwärts (10 μM)
0,25 μl	SYBR [®] Green
0,1 μl	DNA-Polymerase (BIOTaq DNA-Polymerase, 5 U/ μl)

- 23 μl Master Mix in jede benötigte Kavität der 96 Well Platte vorlegen.
- 223 μl cDNA (1:6 Verdünnung) zum Master Mix geben.
- kurz anzentrifugieren (1000 acrpm, 10 Sek.).
- PCR-Programm starten:
 1. 95.0 ° C for 1:00
 2. 95.0 ° C for 0:15
 3. 56.0 ° C for 0:20
 4. 72.0 ° C for 0:20
+ Plate Read
 5. GOTO 2, 39 more times
 6. 95.0 ° C for 0:10
 7. Melt Curve 70.0 to 95.0 ° C, increment 0.5 ° C
for 0:05 + Plate Read
END

Für eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen doppelsträngigen Abschnitten der DNA reicht das SYBR[®] Green-Signal nicht aus. Diese ist allerdings nötig, um sicher zustellen, dass nur das gewünschte spezifische Produktfragment amplifiziert

wurde und keine sekundären Nebenprodukte durch fehlerhafte Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA oder Dimere aus Oligonukleotiden entstanden sind. Für jede biologische Probe werden drei technische Replikate angesetzt, um den Messfehler zu minimieren. Die relative Expression der Transkripte wird mit der $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) berechnet (siehe Kapitel 4.9.2). Als System wird das CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System von Bio-Rad verwendet. Die Analyse erfolgt mit der CFX Maestro Software. Für die Auswertung und Erstellung der Graphen wird RStudio verwendet.

4.2.6 Präparation der cDNA-Bibliothek zur genomweiten Genexpressionsanalyse durch RNA-Sequenzierung

Für das nachfolgende Protokoll werden folgende drei Kits von NEW ENGLAND Biolabs[®] Inc. benötigt:

- NEBNext[®] Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490)
- MEBCNext[®] Ultra[™]RNA Library Prep Kit for Illumina[®] (#E7530)
- NEBNext[®] Multiplex Oligos for Illumina[®] (Dual Index Primers Set 1) (#E7600)

Als Basis für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde die Gebrauchsanleitung des NEBNext[®] Ultra[™]RNA Library Prep Kit for Illumina[®] verwendet. Diese Anleitung wurde allerdings entscheidend angepasst (vgl. Dissertation, (Froeschel, 2016)) und wird daher ausführlich beschrieben.

Anmerkung: Durch die vielen Waschschrte wird empfohlen, maximal 12 Proben gleichzeitig zu bearbeiten. Sonst die Gefahr besteht, dass die erste Probe zu lange steht, bis die letzte Probe bearbeitet worden ist.

A Die Trennung der mRNA von rRNA und tRNA

Nach Aufreinigung der RNA aus Kapitel 4.2.2 wird nun als erstes die mRNA von rRNA und tRNA getrennt. Dies geschieht mit den Komponenten des NEBNext[®] Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490) Kits.

Vorbereitung: gelagerte RNA auf Eis auftauen lassen.

1. In jedes nukleasefreie 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß werden 20 μ l NEBNext Oligo d(T)₂₅ vorgelegt.
2. Zu den *beads* werden jeweils 100 μ l RNA Binding Buffer (2x) (4 ° C) hinzugegeben. Die *beads* werden durch sechsmaliges Auf- und Abpipettieren gewaschen.
3. Bei RT werden die Reaktionsgefäße für 2 Min. in einen Magnetständer gesteckt.
4. Der komplette Überstand wird abgenommen und verworfen. Die *beads* sollen dabei weder aufgewühlt noch abgesaugt werden.

5. Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
6. Die Schritte 2-5 werden wiederholt, damit insgesamt zweimal gewaschen wird.
7. Die *beads* werden in 50 μl RNA Binding Buffer (2x) resuspendiert.
8. Es werden insgesamt 300 ng RNA eingesetzt. Diese werden mit RNase freiem Wasser auf 50 μl aufgefüllt und anschließend zu den resuspendierten *beads* aus Schritt 7 gegeben.
9. Die Reaktionsgefäße werden mit einem Deckel verschlossen und in einen Thermocycler gestellt. Die Proben werden für 5 Min. auf 65 ° C erhitzt, danach auf 4 ° C gekühlt und gehalten, damit die RNA denaturiert und poly-A-mRNA leichter an die *beads* binden kann.
10. (● pink) NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5x) und (● pink) NEBNext Random Primers langsam auftauen lassen.
11. Wenn die Temperatur des Thermocyclers 4 ° C erreicht hat, werden die Reaktionsgefäße aus der Maschine entnommen.
12. Die Reaktionsgefäße werden für 10 Min. bei RT inkubiert, damit die mRNA an die *beads* binden kann. In dieser Zeit wird jede Probe durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt (6-mal).
13. In der Zwischenzeit in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wird ein Mastermix hergestellt. Je Probe sind nötig:

8 μl	(● pink) NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (5x)
2 μl	(● pink) NEBNext Random Primers
10 μl	Wasser (nukleasefrei)
\sum 20 μl	

Die Mischung wird auf Eis zwischengelagert.
14. Die Reaktionsgefäße werden für 2 Min. bei RT in einen Magnetständer gesteckt. Dabei wird die Poly-A mRNA, welche an den *beads* haftet, vom Rest getrennt.
15. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Dabei dürfen die *beads* nicht aufgewirbelt und abgesaugt werden.
16. Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
17. Die Probe wird gewaschen, um ungebundene mRNA zu entfernen. Dazu werden 190 μl Waschpuffer hinzugegeben und das gesamte Volumen durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt.
18. Die Reaktionsgefäße werden für 2 Min. bei RT in den Magnetständer gesteckt.

19. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Dabei dürfen die *beads* nicht aufgewirbelt und abgesaugt werden.
20. Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
21. Die Schritte 17-20 werden einmal wiederholt, sodass insgesamt zweimal gewaschen wird.
22. Je Probe werden 50 μ l Tris-Puffer hinzugefügt und gründlich, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (6x) des gesamten Volumens, gemischt.
23. Nun werden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und der Deckel verschlossen. Die Proben werden für 2 Min. auf 80 °C erhitzt und danach auf 25 °C gekühlt. Durch diesen Schritt wird die Poly-A mRNA von den *beads* eluiert.
24. Hat der Thermocycler 25 °C erreicht, werden die Proben aus der Maschine entnommen.
25. Zu jeder Probe werden 50 μ l RNA Binding Buffer (2x) gegeben, damit die Poly-A mRNA wieder an die *beads* binden kann. Das gesamte Volumen wird vorsichtig viermal auf- und abpipettiert, um es gründlich zu mischen. Durch diesen Schritt werden Verunreinigungen durch unspezifische Bindungen reduziert.
26. Die Proben werden für 10 Min. bei RT inkubiert und in dieser Zeit sechsmal vorsichtig zum Mischen auf- und abpipettiert.
27. Die Reaktionsgefäße werden für 2 Min. bei RT in den Magnetständer gesteckt.
28. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Dabei dürfen die *beads* nicht aufgewühlt und abgesaugt werden.
29. Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
30. Im folgenden Waschschrift werden 190 μ l Waschpuffer hinzugefügt und das gesamte Volumen durch viermaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt.
31. Die Reaktionsgefäße werden für 2 Min. bei RT in den Magnetständer gesteckt.
32. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Dabei dürfen die *beads* nicht aufgewühlt und abgesaugt werden.
Wichtig: Um eine gute Fragmentierung der mRNA im nächsten Schritt zu erreichen, muss der Überstand sehr gut entfernt werden. Dazu wird zunächst der Überstand grob abgenommen und im Magnetständer anschließend der restliche Tris Puffer mit einer 10 μ l Pipettenspitze vollständig entfernt. Dabei sollen die *beads* nicht aufgewühlt und abgesaugt werden. Anschließend die Proben 1 Min. antrocknen lassen.

33. Die Reaktionsgefäße werden aus dem Magnetständer genommen.
34. **Anmerkung:** Im folgenden Schritt entstehen **200 Basenpaare (bp) RNA** Fragmente. Für eine andere Fragmentlänge muss die Reaktionszeit angepasst werden (siehe dazu die Gebrauchsanleitung des Kits).
Durch Zugabe von $17\ \mu\text{l}$ des Gemisches aus Schritt 13 (First Stand Synthesis Reaction Buffer und Random Primern) wird die mRNA eluiert. Die Proben werden zweimal auf- und abpipettiert und für 15 Min. bei 94°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend werden die Reaktionsgefäße sofort in den Magnetsänder gesteckt.
35. $15\ \mu\text{l}$ der eluierten mRNA werden in ein neues PCR-Reaktionsgefäß überführt.
36. Die Reaktionsgefäße werden auf Eis zwischengelagert. Direkt im Anschluss wird mit der cDNA Synthese fortgefahren.

B Die Einzelstrang cDNA Synthese (First Strand cDNA Synthesis)

37. Es wird ein Mix vorbereitet bei dem für jede Probe folgendes benötigt wird:
- | | | |
|--------------------|----------|--------------------------------------|
| $0,5\ \mu\text{l}$ | (● pink) | Murine RNase Inhibitor |
| $1,0\ \mu\text{l}$ | (● pink) | ProtoScript II Reverse Transcriptase |
| $3,5\ \mu\text{l}$ | | nukleasefreies Wasser |
| \sum | | $5,0\ \mu\text{l}$ |
- Zu den $15\ \mu\text{l}$ aufgereinigter mRNA werden jeweils $5\ \mu\text{l}$ des Synthesemixes gegeben. ($\sum_{total} 20\ \mu\text{l}$).
38. Die Reaktionsgefäße werden mit den Fingern 25-mal geschnippt, damit sich die Ansätze vorsichtig mischen. Mit einer Mikrozentrifuge werden die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert und danach in den Thermocycler gestellt.
39. Die Proben werden wie folgt inkubiert:
- | | |
|---------|------------------------------|
| 10 Min. | bei 25°C |
| 55 Min. | bei 42°C |
| 15 Min. | bei 70°C |
| | auf 4°C kühlen |
40. Sofort mit der Synthese des cDNA Doppelstrangs fortfahren.

C Die Doppelstrang cDNA Synthese (Second Strand cDNA Synthesis)

41. **Vorbemerkung:** Den (● orange) Second Strand Synthesis Buffer (10x) gut auftauen lassen, damit sich weiße Kristalle auflösen.
Zu jeder Probe ($20\ \mu\text{l}$) werden folgende Komponenten direkt hinzugefügt:
- | | |
|-------------------|---|
| $48\ \mu\text{l}$ | nukleasefreies Wasser |
| $8\ \mu\text{l}$ | (● orange) Second Strand Synthesis Buffer (10x) |
| $4\ \mu\text{l}$ | (● orange) Second Strand Synthesis Enzyme Mix |
| \sum | $80\ \mu\text{l}$ |

42. Die Proben werden durch viermaliges Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt.
43. Die Reaktionsgefäße werden für 65 Min. bei 16 ° C im Thermocycler inkubiert, wobei die Temperatur des Deckels ≤ 40 ° C sein soll.
44. In der Zwischenzeit sollen die Agencourt AMPure XP *Beads* (Beckman Coulter) und der TE-Puffer auf RT kommen. Der TE-Puffer muss 1:10 verdünnt werden, damit ein 0,1 TE-Puffer entsteht.

D Die Aufreinigung der Doppelstrang cDNA mittels 1,8x Agencourt AMPure XP *Beads* (Beckman Coulter)

45. Das Fläschchen mit den AMPure XP *Beads* wird geschwenkt, damit die am Boden befindenden *Beads* resuspendiert werden.
46. 144 μ l (1,8x) der resuspendierten AMPure XP *Beads* werden zu den 80 μ l Ansätzen gegeben und auf einem Vortex-Mixer gemischt.
47. Die Proben werden für 6 Min. bei RT inkubiert.
48. In dieser Zeit stellt man 80 % Ethanol (aus nukleasefreiem Wasser und reinem Ethanol) her.
49. In einer Mikrozentrifuge werden die Proben kurz anzentrifugiert, damit sich die gesamte Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes sammelt. Anschließend werden die Reaktionsgefäße in den Magnetständer gestellt. Die *Beads* trennen sich vom Überstand ab. Nach ca. 10 Min. ist die Lösung klar, der Überstand kann vorsichtig abgenommen und verworfen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die *Beads* nicht aufgewühlt und abgesaugt werden.
50. In jedes Reaktionsgefäße werden 190 μ l des frisch präparierten Ethanols gegeben. Dabei verbleiben die Reaktionsgefäße im Magnetständer. Die Proben werden 30 Sek. bei RT inkubiert. Anschließend wird das Ethanol wieder vorsichtig entfernt.
51. Wiederholung des Schritts 50 damit insgesamt zweimal gewaschen wird.
52. Nach dem zweiten Waschen wird das restliche, sich am Boden befindende, Ethanol mit einer 10 μ l Pipettenspitze entfernt.
53. Die *Beads* werden an der Luft für 5-7 Min. bei RT getrocknet. Dabei befinden sich die Reaktionsgefäße mit geöffnetem Deckel noch im Magnetständer.
54. Nun wird die doppelsträngige DNA durch Zugabe von 58 μ l nukleasefreiem 0,1x TE-Puffer (aus: 1x Tris-EDTA Puffer Lösung pH 8,0 „BioUltra“ von *Sigma-Aldrich Co.*) eluiert. Die Proben werden durch sechsmaliges Auf- und Abpipettieren sowie auf dem Vortex-Mixer gemischt. Danach werden die Ansätze

in einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugiert, 2 Min. inkubiert und in den Magnetständer gesteckt, bis die Lösung klar wird.

55. 55,5 μl des Überstands werden in ein neues 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß überführt.

Anmerkung: An diesem Punkt im Protokoll können die Proben bei -20°C zwischengelagert werden.

E Reparation der cDNA Endstücke (End Repair/dA-tail of cDNA Library)

56. **Vorbemerkung:** Den (● green) NEBNext End Repair Reaction Buffer (10x) gut auftauen lassen, damit sich weiße Kristalle auflösen.

In jede Probe der aufgereinigten cDNA werden nun gegeben:

6,5 μl (● green) NEBNext End Repair Reaction Buffer (10x)

3,0 μl (● green) NEBNext End Prep Enzyme Mix

\sum 65 μl

Die Reaktionsgefäße werden durch 25-maliges Schnippen mit den Fingern und anschließend dreimaligen Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Danach werden die Proben kurz in einer Mikrozentrifuge anzentrifugiert und in den Thermocycler gestellt.

57. Im Thermocycler werden die Proben wie folgt inkubiert (Deckel 75°C)

30 Min. bei 20°C

30 Min. bei 65°C

auf 4°C kühlen

58. Unmittelbar mit der Adapter Ligation fortfahren.

F Adapter Ligation (Adapter Ligation)

59. Der (● red) NEBNext Adaptor for Illumina ($15\ \mu\text{M}$) wird durch eine zehnfach Verdünnung (1:9) mit sterilem Wasser auf seine Endkonzentration gebracht. Diese Verdünnung ist stets frisch anzusetzen.

60. Hier keinen Mastermix ansetzen, um Adapter-Dimer Bildung zu vermeiden. Zu jeder dA-tailed cDNA (65 μl) werden folgende Komponenten hinzugefügt:

2,5 μl nukleasefreies Wasser

15,0 μl (● red) Blunt/TA Ligase Master Mix (langsam pipettieren)

1,0 μl Adapter Verdünnung aus Schritt 59

\sum 83,5 μl

61. Das gesamte Volumen wird durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt.

62. Die Proben werden nun für 15 Min. bei 20°C im Thermocycler inkubiert. Die Deckelheizung ist ausgeschaltet.

63. In jedes Reaktionsgefäß werden 3 μl (● red) USER Enzyme pipettiert.
64. Die Ansätze werden 50-mal mit dem Fingern geschnippt, damit sich die Proben vorsichtig mischen. Anschließend wird für 25 Min. bei 37 ° C im Thermocycler (Deckel 40 ° C) inkubiert.
65. In der Zwischenzeit die Agencourt AMPure XP *Beads* (Beckman Coulter) auf RT kommen lassen.

G Aufreinigung der Ligationsreaktion mit den Agencourt AMPure XP *Beads* (Beckman Coulter)

66. Die Proben (86,5 μl) werden mit nukleasefreiem Wasser (13,5 μl) auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt.
67. **Anmerkung:** x bezieht sich auf das in Schritt 66 eingestellte Volumen von 100 μl . Durch gründliches Schwenken des Fläschchens werden die sich am Boden abgesetzten AMPure *Beads* resuspendiert und 100 μl zu jedem Ligationsansatz hinzugefügt. Auf dem Vortex-Mixer werden die Proben kurz gemischt.
68. Die Reaktionsgefäße werden für 6 Min. bei RT inkubiert. In dieser Zeit bindet die cDNA an die *Beads*.
69. Aus nukleasefreiem Wasser und reinem Ethanol wird 80 % Ethanol hergestellt.
70. Die Proben werden in einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Danach werden diese in einen Magnetständer gestellt. Es wird so lange gewartet, bis sich die *Beads* vom Überstand trennen und die Lösung klar wird. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Dabei ist darauf zu achten, dass die *Beads* nicht aufgewühlt und abgesaugt werden.
71. Zu jeder Probe werden 190 μl des frisch präparierten 80 %-igen Ethanol gegeben. Dabei verbleiben die Reaktionsgefäße im Ständer. Die Ansätze werden für 30 Sek. bei RT inkubiert und das Ethanol anschließend vorsichtig entfernt.
72. Der Schritt 71 wird einmal wiederholt, damit insgesamt zweimal gewaschen wird.
73. Um das restliche Ethanol nach dem zweiten Waschen zu entfernen, wird dieses mit einer 10 μl Pipettenspitze vom Boden aufgesaugt.
74. Die *Beads* werden bei geöffnetem Deckel für 5 Min. bei RT getrocknet, während die Proben im Magnetständer verbleiben. Eine längere Trocknungszeit kann zu einer verringerten DNA-Elution führen.

75. Durch Zugabe von 50 μl nukleasefreiem 0,1 x TE-Puffer wird die cDNA eluiert. Zum Mischen werden die Proben viermal auf- und abpipettiert und kurz auf dem Vortex-Mixer inkubiert. Danach werden die Ansätze in einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugiert, 2 Min. bei RT inkubiert und in einen Magnetständer gestellt, bis die Lösung klar ist.
76. Der Überstand (50 μl) wird in ein neues 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß überführt und die *Beads* werden verworfen.
77. Nun werden zu den 50 μl -Ansätzen 50 μl der resuspendierten AMPure XP *Beads* gegeben und auf dem Vortex-Mixer kurz gemischt.
78. Die Proben werden für 6 Min. bei RT inkubiert, damit die cDNA erneut an die *Beads* binden kann.
79. Aus nukleasefreiem Wasser und reinem Ethanol wird 80 % Ethanol hergestellt.
80. Die Proben werden in einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Danach werden diese in einen Magnetständer gestellt. Es wird so lange gewartet, bis sich die *Beads* vom Überstand trennen und die Lösung klar wird. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Dabei ist darauf zu achten, dass die *Beads* nicht aufgewühlt und abgesaugt werden.
81. Für den Abschnitt H den High-Fidelity PCR Master Mix (2x) (● blue) auf Eis stellen und auftauen lassen. Nach dem Auftauen den Mix durch Invertieren vorsichtig mischen.
82. Zu jeder Probe werden 190 μl des frisch präparierten 80 %-igen Ethanols gegeben. Dabei verbleiben die Reaktionsgefäße im Ständer. Die Ansätze werden für 30 Sek. bei RT inkubiert und das Ethanol anschließend vorsichtig entfernt.
83. Der Schritt 82 wird einmal wiederholt, damit insgesamt zweimal gewaschen wird.
84. Um das restliche Ethanol nach dem zweiten Waschen zu entfernen, wird dieses mit einer 10 μl Pipettenspitze vom Boden aufgesaugt.
85. Die *Beads* werden bei geöffnetem Deckel für 5 Min. bei RT getrocknet, während die Proben im Magnetständer verbleiben.
86. Durch Zugabe von 21 μl nukleasefreiem 0,1 TE-Puffer wird die cDNA von den *Beads* eluiert. Zum Mischen werden die Proben viermal auf- und abpipettiert und kurz auf dem Vortex-Mixer inkubiert. Danach werden die Ansätze in einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugiert, 2 Min. bei RT inkubiert und in einen Magnetständer gestellt, bis die Lösung klar ist (10 Min.).

87. In ein neues 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß werden 20 μl des Überstands überführt.

Anmerkung: Bei diesem Schritt dürfen keine *Beads* überführt werden, da diese die Aktivität der Polymerase im nächsten PCR Schritt beeinträchtigen können.

Tipp: Zur Sicherheit können die transferierten Proben erneut in den Magnetständer gestellt und Schritt 87 erneut durchgeführt werden.

H Vervielfältigung der Bibliothek durch PCR (PCR Library Enrichment)

88. Folgende Komponenten werden zu jedem Ansatz (20 μl) direkt hinzugegeben:

25,0 μl (● blue) NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix (2x)

2,5 μl (10 μM) NEBNext **i5X** Index Primer

2,5 μl (10 μM) NEBNext **i7X** Index Primer

Σ 50 μl

Durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren vorsichtig mischen.

Anmerkung: Für eine Multiplex Probenaufbereitung mit anschließender RNA-Sequenzierung auf der Illumina Plattform sind NEBNext Index Primer gut geeignet. Dabei darf je Probe nur **ein** i5X mit **einem** i7X Primer kombiniert werden. Die Kombination kann dabei frei gewählt werden. Das X bezieht sich dabei auf die im Kit unterschiedlichen Primer, die vom Hersteller nummeriert sind (i501 bis i508 bzw. i701 bis i712).

89. PCR-Programm (Deckel: 100 ° C)

Zyklusbeschreibung	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	98 ° C	30 Sek.	1
Denaturierung	98 ° C	10 Sek.	12-15*
Annealing/Extension	65 ° C	75 Sek.	
Terminale Extension	65 ° C	5 Min.	1
Kühle Lagerung	4 ° C	∞	

* Die Zahl der PCR-Zyklen muss entsprechend der RNA Ausgangsmenge (gemessen in 4.2.3) angepasst werden. **Empfehlung:** $c_{gesamt} \geq 17 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 13 Zyklen, $c_{gesamt} 15\text{-}17 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 14 Zyklen, $c_{gesamt} \leq 15 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 15 Zyklen. Mehr als 15 Zyklen sind nicht empfehlenswert.

Um eine Überamplifikation zu vermeiden ist es wichtig, die PCR Zyklen zu limitieren. Sollte es zu einer Überamplifikation gekommen sein, werden auf dem DNA 1K Chip (Kapitel 87) größere Produkte (> 500 bp) detektiert.

I Aufreinigung der PCR Produkte mittels Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter)

90. **Anmerkung:** Das x bezieht sich jetzt auf das Volumen von 50 μl aus dem PCR Schritt. Durch Schwenken des Fläschchens werden die am Boden abgesetzten AMPure XP Beads resuspendiert. Zu den PCR-Ansätzen (50 μl) werden 45 μl (0,9x) der gelösten AMPure XP Beads gegeben und auf dem Vortex-Mixer gemescht.
91. Nun werden die Proben für 6 Min. bei RT inkubiert.
92. Aus nukleasefreiem Wasser und reinem Ethanol wird 80 % Ethanol hergestellt.
93. Die Proben werden in einer Mikrozentrifuge kurz anzentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Danach werden diese in einen Magnetständer gestellt und so lange gewartet, bis sich die Beads vom Überstand trennen und die Lösung klar wird. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Beads nicht aufgewühlt und abgesaugt werden.
94. Zu jeder Probe werden 190 μl des frisch präparierten 80 %-igen Ethanols gegeben. Dabei verbleiben die Reaktionsgefäße im Ständer. Die Ansätze werden für 30 Sek. bei RT inkubiert und das Ethanol anschließend vorsichtig entfernt.
95. Der Schritt 94 wird einmal wiederholt, damit insgesamt zweimal gewaschen wird.
96. Um das restliche Ethanol nach dem zweiten Waschen zu entfernen, wird dieses mit einer 10 μl Pipettenspitze vom Boden aufgesaugt.
97. Die Beads werden bei geöffnetem Deckel für 5 Min. bei RT getrocknet, während die Proben im Magnetständer verbleiben.
98. Durch Zugabe von 21 μl nukleasefreiem 0,1 TE-Puffer wird die cDNA von den Beads eluiert. Zum Mischen werden die Proben viermal auf- und abpipettiert und auf dem Vortex-Mixer inkubiert. Danach werden die Ansätze in einer Mikrozentrifuge anzentrifugiert, 2 Min. bei RT inkubiert und in einen Magnetständer gestellt, bis die Lösung klar ist (10 Min.).
99. In ein neues 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß werden 20 μl des Überstandes überführt. Hierbei handelt es sich um die für die Sequenzierung benötigten Bibliotheken. Vor der Sequenzierung wird die Qualität der Bibliotheken auf dem ExperionTM Messgerät bestimmt und die Proben äquimolar eingestellt.
Anmerkung: An dieser Stelle können die Proben bei -20 ° C gelagert werden.

J Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliothek

Um die Proben vergleichen und von jeder Bibliothek eine äquimolare Menge für die Sequenzierung verwenden zu können, müssen die Qualität und Konzentrationen der cDNA-Bibliotheken bestimmt werden. Mit dem ExperionTMDNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad *Laboratories Inc.*) wird die Messung durchgeführt. Dafür werden folgende Komponenten benötigt:

- ExperionTMDNA 1K Reagents Kit (#7007164)
- ExperionTMDNA Chips (#7007163)

Die genaue Anleitung liegt dem Kit bei. Dabei wurde grundsätzlich nach den Herstellerangaben vorgegangen. Änderungen, die vorgenommen wurden, sind blau markiert.

1. Äquilibrierung der Reagenzien
2. Gelfärbelösung (GS) vorbereiten
3. Primen des Chips
4. Beladen des Chips mit den Proben und dem Marker

- Die Vorbereitung der Proben und des Markers: 5,5 μ l *loading buffer* in 1,5 ml Reaktionsgefäß vorlegen. In eines der vorbereiteten Reaktionsgefäße 1,1 μ l Marker pipettieren und die restlichen Vertiefungen des Chips mit je 1,1 μ l Probe ergänzen. Die Proben auf dem Vortex-Mixer mischen und anschließend zentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu sammeln. **Anmerkung:** Den DNA 1K Chip nicht zuerst beladen und anschließend vortexen.
- Je 9 μ l in die drei vorgesehenen Kavitäten pipettieren.
- In die Vertiefungen 1-11 6 μ l der vorbereiteten Proben geben und in die Vertiefung L den Marker ebenfalls blasenfrei pipettieren.

5. Die DNA 1K Analyse starten
6. Reinigung der Elektroden

Idealerweise sieht die Größenverteilung der Bibliotheken wie in Abb. 4.1 aus, mit einem Maximum zwischen 200-300 bp (ca. 200 bp Fragmente und 50 bp Adapter). Die Konzentration ergibt sich aus der Fläche unter dem Peak. Für die RNA-Sequenzierung werden äquimolare Mengen der Proben verwendet. Dazu stellt man alle Proben beispielsweise auf 50 nM ein und pipettiert gleiche Volumina der Proben in ein neues Reaktionsgefäß.

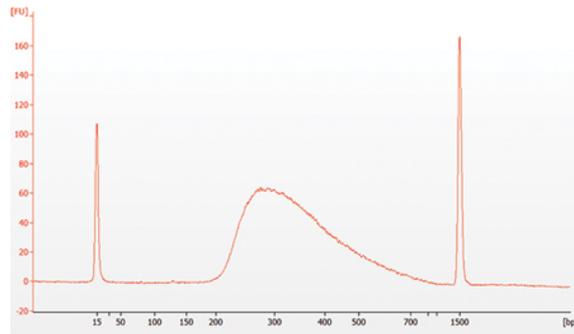


Abbildung 4.1 – Ideale Größenverteilung einer cDNA-Bibliothek. Die Bibliothek befindet sich zwischen 200 und 1.000 bp. Quelle: manual NEBNext[®] Ultra[™]RNA Library Prep Kit for Illumina[®].

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

Mit Harnstoffextraktionspuffer werden Proteine aus dem Pflanzenmaterial isoliert. Dazu wird das Pflanzenmaterial geerntet und zusammen mit Kugeln in Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff gefroren. Zum Aufschließen des Pflanzenmaterials werden die Reaktionsgefäße, in durch Stickstoff vorgekühlten Einsätzen, mit einer Kugelmühle bei 21 Hz für 5 Min. gemörsert. Anschließend wird Harnstoffextraktionspuffer dazugegeben und beides gemischt. Die Proben werden bei 80 ° C für 10 Min. im Heizblock inkubiert und danach für 10 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 ° C gelagert.

4.3.2 SDS-Polyacrylgelelektrophorese

Um Proteine detektieren und analysieren zu können, wird eine Auftrennung des Gemischs mit einer Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). Dadurch können Aussagen über das Molekulargewicht sowie die Reinheit bzw. Zusammensetzung der aufgetragenen Proben getroffen werden. Die Auftrennungsstärke der SDS-Gele wird durch Anpassung des Polyacrylamid-Gehalts und somit der Porengröße und der Vernetzung je nach Bedarf eingestellt. Soweit nicht anders beschrieben, sind in dieser Arbeit nur 12 %-ige SDS-Gele verwendet worden.

Um das Gel herzustellen, wurden zwei Glasplatten in eine Gelgieß-Apparatur eingesetzt, die Trenngellösung zwischen die Glasplatten eingegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisation des Trenngels wird das Isopropanol abgegossen, die Sammelgellösung über das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisation wird das Gel in eine Laufkammer gespannt und mit 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet. Die Proben werden vor Beladung des Gels in einem Heizblock bei 65 ° C für 5 Min. gekocht und anschließend in die Probenaschen des Gels geladen. Durch die Detergenz SDS, welche an die

Proteine bindet, erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Dabei übersteigt die Ladung der gebundenen Detergenz die Eigenladung des Proteins. Neben dem Natriumdodecylsulfat, welches für eine Entfaltung der Proteine sorgt, bewirkt optional zugesetztes β -Mercaptoethanol eine Reduzierung von Disulfidbrücken (Abbas *et al.*, 1991). Die Trennung erfolgte für 45 Min. bei 180 Volt (V) Spannung. Je Geltasche wurden 5 μ l PageRulerTMPrestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Inc.) oder 15 μ l Proteinextrakt aufgetragen.

4.3.3 Anfärbung von Proteingelen

Coomassie-Blau-Färbelösung	250 ml Essigsäure 99 % (v/v) 1 l Methanol 1,25 l ddH ₂ O 6,25 g Brilliant Blue R für 2,5 l
SDS-Gel Entfärber	10 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 99 % (v/v)

Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Trenngel für 1 Std. in Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt. Der Gellintergrund wird danach so lange mit SDS-Gel Entfärber inkubiert, bis Proteinbanden deutlich zu sehen sind. Die Detektionsgrenze für Proteine bei Verwendung von Coomassie-Färbungen liegt ca. bei 100 ng Protein. (Kang *et al.*, 2002)

4.3.4 Western-Blot

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
TBS	50 mM Tris-HCl pH 7,6 150 mM NaCl
TBS-T	50 mM Tris-HCl pH 7,6 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Triton X-100

Bei der Western-Blot-Analyse werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine spezifisch über eine Antikörperbindung an proteineigene Antigene nachgewiesen. Dazu werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel für 1 Std. bei einer angelegten Stromstärke (1 mAmpere (A) / cm² Membrangröße) im Semidry-Blotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf der Membran werden nach dem Transfer die für den Antikörper unspezifischen Bindestellen zunächst mit einer Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS gelöst) abgesättigt, bevor mit einem spezifischen Antikörper das entsprechende Antigen detektiert werden kann.

Tabelle 4.9 – Protokoll für Wasch- und Inkubationsschritte bei einer Western-Blot-Analyse

Lösung	Dauer in Min.
Blockierlösung	120
primärer Antikörper 1:1000	über Nacht bei 4 ° C
TBS	3 x 10
sekundärer Antikörper 1:2500	240
TBS-T	5 x 5

Nach dem abschließenden Waschschrift wird der Blot entwickelt. Bei Verwendung eines Antikörpers mit gekoppelter Meerrettichperoxidase (HRP; engl: HorseRaddish Peroxidase) wird die zu entwickelnde Blotmembran mit gleichen Mengen beider Lösungen des ECL-Kits (Bio-Rad) für 2 Min. bei RT inkubiert. Danach wird der überschüssige Substrat-Mix entfernt. Die Detektion erfolgt mithilfe eines Chemilumineszenzgeräts und der Software ImageLab (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Sollen verschiedene Proteine auf der gleichen Membran nachgewiesen werden, so wird nach erfolgreicher Detektion die Membran mit Abstreifpuffer für 1 Std. bei 55 ° C inkubiert. Die Membran wird durch Waschen vom Abstreifpuffer befreit, indem sie 2 x mit TBS-T für je 10 Min. und 2 x mit TBS für je 5 Min. gewaschen wird. Danach folgt der gleiche Ablauf wie bei der ersten Immundetektion.

4.3.5 Chlorophyllbestimmung am Photometer

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehalts am Photometer muss das Chlorophyll aus den Keimlingen gelöst werden. Dazu gibt man Holzgeist auf die Probe und inkubiert diese für 30 Min. bei 60 ° C im Heizblock. Danach lässt man die Proben bei RT 10 Min. abkühlen, bevor sie für 10 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert werden. Dann wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß oder direkt in die Messküvette überführt. Die Proben werden jeweils bei OD₆₅₀ für Chlorophyll A und bei OD₆₆₅ für Chlorophyll B gemessen. Die Berechnung erfolgt mit folgender Formel:

$$Chl_{gesamt/ml} = A_{650} * 0.025 + A_{665} * 0.005$$

4.4 Biophysikalische Methoden

4.4.1 Extraktion für die LC-MS-Analysen

Für die Extraktion der Metabolite wurden Keimlinge (25 Stück) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sowohl hydrophile als auch hydrophobe Metaboliten wurden mit 600 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) extrahiert (modifiziert nach (BLIGH

und DYER, 1959)). Durch Zugabe von Zirkoniumdioxidkugeln und Verwendung einer Kugelmühle bei 21 Hz wurden die Keimlinge für 5 Min. homogenisiert. Für die Lipidanalyse wurde die organische Phase mit einem Vakuumkonzentrator bei 40 ° C zur Trocknung eingengt und in 100 μ l Isopropanol resuspendiert.

4.4.1.1 Probenaufbereitung für die TAG-Analyse

An einem ACQUITY UPLC-System, gekoppelt an ein Synapt G2 HDMS qTOF-MS (Waters, Eschborn, Deutschland), wurde die organische Phase analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine VanGuard-Vorsäule mit Online-Partikelfilter und einer BEH C18-Säule (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m; Waters) bei 60 ° C. Ein linearer, binärer Lösungsmittelgradient wurde mit 30-100 % Eluent B über 10 Min. bei einer Flussrate von 0,3 ml/ Min. angewandt. Eluent A bestand aus 60:40 Wasser/Acetonitril (v/v) mit 10 mM Ammoniumacetat. Eluent B bestand aus 90:10 Isopropanol/Acetonitril (v/v) mit 10 mM Ammoniumacetat. Nach der chromatographischen Trennung wurden die lipophilen Metabolite mit einer Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) im positiven Modus ionisiert und mit einem Flugzeit-Massenspektrometer nachgewiesen. Die angelegte ESI-Kapillarspannung betrug 0,8 kV. Stickstoff wurde als Desolvationsgas (bei 350 ° C, Durchflussrate 800 l/Std.) verwendet. Der Quadrupol wurde im Breitband-HF-Modus betrieben. Die Daten wurden über einen Massenbereich von 50-1200 Da erfasst. Zwei Erfassungsfunktionen wurden automatisch generiert. Dabei sammelte die erste Funktion die Niedrigenergie-daten, bei denen Molekülonen erfasst wurden, während die zweite Funktion die Fragmente der Molekülonen (Hochenergie-daten) unter Verwendung einer Kollisionsenergie-rampe von 15 bis 35 eV (MS^E) erfasste. Für die Aufzeichnung und Verarbeitung der Daten wurden MassLynx und QuanLynx (Version 4.1) verwendet. Die Bestimmung der definierten Lipidspezies erfolgte mit TG 30:0 bzw. TG 51:0 (je 0,24 μ g/Probe) als internem Standard (IS). Für die semi-quantitative Analyse wurden die Peakflächen der Analyten und IS im extrahierten Gesamtionenchromatogramm bestimmt und die Lipidkonzentrationen unter Verwendung eines Response-Faktors von 1 für jedes Analyt/IS-Paar berechnet. Die Retentionszeit (RT) und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Lipide sind in Tabelle 4.10 enthalten.

Tabelle 4.10 – m/z und RT von TAGs

	m/z	RT [Min.]
Triacylglycerid (TAG)-Spezies, ionisiert als $[M + NH_4^+]^+$		
TG 30:0 (IS)	572.488	7.65
TG 46:2	792.706	9.51
TG 46:3	790.691	9.34
TG 48:1	822.754	9.85
TG 48:2	820.739	9.70
TG 48:3	818.724	9.54

TG 50:1	850.789	10.01
TG 50:2	848.772	9.86
TG 50:3	846.757	9.71
TG 50:4	844.740	9.54
TG 50:5	842.727	9.38
TG 50:6	840.710	9.22
TG 50:7	838.694	9.03
TG 50:8	836.676	8.84
TG 50:9	834.664	8.65
TG 52:1	878.813	10.15
TG 52:2	876.804	10.01
TG 52:3	874.790	9.86
TG 52:4	872.774	9.71
TG 52:5	870.756	9.56
TG 52:6	868.741	9.41
TG 52:7	866.727	9.22
TG 52:8	864.711	9.05
TG 52:9	862.693	8.86
TG 54:1	906.846	10.28
TG 54:2	904.834	10.14
TG 54:3	902.820	10.01
TG 54:4	900.805	9.86
TG 54:5	898.788	9.71
TG 54:6	896.773	9.56
TG 54:7	894.757	9.40
TG 54:8	892.741	9.24
TG 54:9	890.726	9.07
TG 56:1	934.881	10.41
TG 56:2	932.866	10.28
TG 56:3	930.850	10.13
TG 56:4	928.836	10.01
TG 56:5	926.821	9.86
TG 56:6	924.804	9.73
TG 56:7	922.789	9.59
TG 56:8	920.773	9.43
TG 58:1	962.910	10.52
TG 58:2	960.895	10.40
TG 58:3	958.883	10.26
TG 58:4	956.867	10.14
TG 58:5	954.854	10.02
TG 58:6	952.837	9.89
TG 58:7	950.820	9.75
TG 58:8	948.805	9.59
TG 60:2	988.929	10.50

TG 60:3	986.910	10.38
TG 60:4	984.900	10.26
TG 60:5	982.883	10.15
TG 60:6	980.866	10.03
TG 60:7	978.849	9.92
TG 62:4	1012.931	10.39

4.4.1.2 Probenaufbereitung für die Kohlenhydrat-Analyse

Um die Zuckergehalte der Proben von *Arabidopsis thaliana* zu analysieren wurden 30 μ l aus der wässrigen Phase des Extrakts aus Methode 4.4.1 in UPLC-Vials überführt und gemessen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine VanGuard-Vorsäule mit Online-Partikelfilter und einer BEH-Amidsäule (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm; Waters) gemäß der Waters-Applikation WA60126 mit Modifikationen. Die Elutionen wurden mit einem linearen Lösungsmittelgradienten (0,2 ml/Min. bei 35 ° C) von 75 % bis 45 % Acetonitril mit 1 % Ammoniumhydroxid in 10 Min. durchgeführt. Die Zucker wurden mit einer Acquity-UPLC, gekoppelt an ein Quattro Premier Triple Quadrupol-Massenspektrometer (UPLC-MS/MS, Waters, Eschborn, Deutschland), analysiert. Für jeden Analyten wurde ein spezifischer Übergang mittels MRM (Multiple Reaction Monitoring) bestimmt (vgl. Tab. 4.11). Die Betriebsparameter der chromatographischen Auftrennung wurden auf eine Kapillarspannung von 3,25 kV und eine Quelltemperatur von 120 ° C eingestellt. Die Desolvationstemperatur betrug 350 ° C. Der Desolvationsgasfluss von Stickstoff hatte eine Geschwindigkeit von 800 l/Std.. Die Ionisierung der Zucker erfolgte mittels negativer Elektrospray-Ionisation. Die kollisionsinduzierte Dissoziation jeder Verbindung für die MRM wurde unter Verwendung von Argon als Kollisionsgas mit einer Flussrate von 0,31/Min. und einem Druck von 3,0 x 10⁻³ mbar durchgeführt. Die folgenden MRM-Übergänge wurden gemessen:

Tabelle 4.11 – Identifikationsparameter für Kohlenhydrate

	m/z	Retentionszeit	verwendeter IS	Responsefaktor
Inositol	179>87	4.62	D2-Glukose	0.49
Fructose	179>89	4.99	D2-Glukose	0.3
Glukose	179>89	3.27	D2-Glukose	0.33
D2-Glukose	181>89	3.25	IS	
Saccharose	341>179	3.91	D2-Trehalose	0.94
Maltose	341>179	5.26	D2-Trehalose	0.49
Galactinol	341>179	5.79	D2-Trehalose	1.56
D2-Trehalose	343>180	4.51	IS	
Raffinose	503>179	5.33	D2-Trehalose	0.46
Stachyose	665>383	6.65	D2-Trehalose	1.04

4.4.1.3 Probenaufbereitung für die Aminosäuren-Analyse

Folgend an eine Extraktion von Zuckern kann mit den verbliebenen Proben eine Messung der Aminosäuren durchgeführt werden. Dazu mussten diese derivatisiert werden, was mit dem Waters AccQ•TagTMUltra Derivatization Kit erfolgte. Zunächst wurden 70 μl AccQ•TagTMUltra Borate Puffer vorgelegt, mit 10 μl der Probe gemischt und gevortext. Danach wurden 20 μl Reconstitute AccQ•TagTMReagent dazugegeben und die Lösung gemischt. Anschließend wurde die Probe 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie für 10 Min. im Heizblock bei 55 °C erwärmt wurde. Danach wurden 50 μl in ein UPLC Vial überführt. Die derivatisierten Proben wurden mit einem ACQUITY UPLC-System, gekoppelt an ein Synapt G2 HDMS qTOF-MS (Waters, Eschborn, Deutschland), analysiert. Die chromatographische Auftrennung der Aminosäuren erfolgte über eine VanGuard-Vorsäule mit Online-Partikelfilter und einer BEH C18-Säule (2,1 x 100 mm, 1,7 μm ; Waters). Als Elutionsmittel A wurde Wasser mit 0,1% Ameisensäure (FOH), als Elutionsmittel B Acetonitril (ACN) verwendet. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte bei 35 °C, wobei ein linearer Gradient über 15 Min. aufgebaut wurde, der von 30% auf 100% Elutionsmittel mit einer Flussrate von 0,4 ml/Min. stieg. Die Gesamtdauer eines Laufes betrug 18 Min. und es wurden 5 μl Probenlösung injiziert. Die Betriebsparameter waren mit denen der TAG-Analyse identisch. Als interner Standard diente Norvalin. Die Retentionszeit (RT) und das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Aminosäuren sind in Tabelle 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.12 – Identifikationsparameter für Aminosäuren

	m/z	Retentionszeit	Responsefaktor
Asp	304.093	4.69	0.093
Arg	345.167	4.12	0.016
Glu	318.109	4.94	0.087
Ser	276.098	4.26	0.094
Gly	246.087	4.53	0.572
Gln	317.124	4.23	0.087
Ala	260.103	5.67	0.337
Pro	286.119	6.20	0.173
Lys	317.161	7.28	0.028
Tyr	352.129	7.77	0.617
Met	320.106	8.12	0.415
Nor	288.134	8.30	IS
Cys	338.063	9.18	0.367
Ile	302.15	9.94	1.125
Leu	302.15	10.14	1.125
Phe	336.134	10.56	0.841
Trp	375.145	10.88	0.590
Asn	303.109	3.94	0.096

Thr	290.114	5.31	0.334
Val	288.134	7.54	0.586

4.5 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

4.5.1 Pflanzenanzucht auf Erde

Um Pilze und Pilzsporen abzutöten wird die Erde vor der Aussaat für 30 Min. bei 90 °C gedämpft. Nach dem Befüllen der Pflanzentöpfe mit Erde werden diese mit Neudomück[®]-Lösung (Neudorff, siehe Herstellerangaben) gegossen, um Mückenlarven abzutöten. Mit Chlorgas oberflächensterilisierte Samen werden ausgelegt und für 3-4 Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert, damit die Samen gleichmäßig und besser keimen. Nach der Stratifikation werden die Samen in einen Klimaschrank mit 22 °C und einer Luftfeuchte von 60 % gestellt und unter Normaltag-Bedingungen kultiviert (12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkel; in dieser Arbeit mit 3dL, für 3 Tage Normalbedingungen abgekürzt).

4.5.2 Pflanzenanzucht in MS-Medium

Um die Samen in Flüssigkultur anzuziehen wird zunächst 1 x MS-Medium in den Kavitäten vorgelegt. Anschließend werden die oberflächensterilisierten Samen in die Flüssigkultur gegeben. Die Gefäße werden mit Leukopor[®] verschlossen, um das Medium vor Kontaminationen zu schützen und einen Gasaustausch zu gewährleisten. Danach werden die Samen für 3-4 Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert, um eine gleichzeitige Keimung zu gewährleisten. Anschließend werden die Samen im Klimaschrank bei 21 °C und einer Luftfeuchte von 60 % zunächst für drei Tage bei konstanter Dunkelheit angezogen, an den folgenden Tagen unter Normaltag-Bedingungen weiter inkubiert. Erfolgt die Keimung auf Agarplatten, so wird zu 1 x MS-Medium 9 g/l Phyto-Agar gegeben, autoklaviert und die Platten gegossen. Nach dem Auslegen der Samen auf den Platten werden diese ebenfalls mit Leukopor verschlossen, 3-4 Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wird wie bei Experimenten mit Flüssigkultur verfahren.

4.5.3 Floral Dip Transformation von *Arabidopsis*

Ein klassischer Weg zur Transformation von Pflanzen stellt der *Agrobakterien*-vermittelte Gentransfer dar. Dabei hat *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) die Fähigkeit, ein sog. Ti-Plasmid, welches einen Abschnitt durch zwei Bordersequenzen definiert, in eine Pflanzenzelle zu transportieren und dort an einer beliebigen Stelle ins Genom zu integrieren (Herrera-Estrella *et al.*, 1992). Der übertragene DNA-Abschnitt wird dabei als T-DNA bezeichnet. Das Ti-Plasmid wurde so modifiziert, dass man Gene gezielt in das pflanzliche Genom einfügen kann. Dazu wird die gewünschte Ziel-DNA-Sequenz zwischen die Border-Sequenzen integriert und somit

als T-DNA eingebaut. Auf einem zweiten Plasmid befinden sich die für den Transfer notwendigen Funktionen. Mit diesem binären Vektorsystem lassen sich Pflanzen mittels *A. tumefaciens* effektiv transformieren. Damit die *Agrobakterien* vermittelte Transformation von *Arabidopsis* möglichst erfolgreich ist, wird eine einfache Methode verwendet (Clough und Bent, 1998). Dabei werden die ersten Blütenstände abgeschnitten und die Pflanze dadurch zur Bildung mehrerer sekundärer Blütenstände angeregt. Dies erhöht die Transformationsrate. Die Blütenstände werden in eine Lösung aus transformierten *Agrobakterien* und einem Benetzungsmittel getaucht. Dabei wird die T-DNA in die sich entwickelnde Eizelle transferiert (Bent, 2000). Aus diesen Zellen entstehen nach Befruchtung heterozygote transgene Samen. In dieser Dissertation wurden Wildtyppflanzen des Ökotyps Col-0 als Ausgangsmaterial verwendet und folgendermaßen vorgegangen:

- *Arabidopsis* Pflanzen werden unter Langtag-Bedingungen (16 Std. Licht) auf Erde in Töpfen angezogen. Damit junge Blütenknospen austreiben, werden die ersten Blütenknospen entfernt (4-6 Tage vor der Transformation).
- Aus einer Selektionsplatte wird über Nacht bei 28 °C auf einem Schüttler eine 5 ml (YEB-Medium) Vorkultur angezogen. Durch Zugabe von Antibiotika werden Kontaminationen verhindert und auf die Anwesenheit des Helfer- und Ti-Plasmids selektioniert.
- Die Hauptkultur (400 ml) mit entsprechenden Antibiotika wird aus 1 ml der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C auf dem Schüttler inkubiert.
- Bei einer OD₆₀₀ von 2,0 werden die *Agrobakterien* für 10 Min. bei 5.000 rpm abzentrifugiert.
- Das Pellet wird in einer frisch angesetzten 5%igen (w/v) Saccharose-Lösung mit 0,02% Silwet (v/v) resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,8 eingestellt.
- 500 ml der Bakterienlösung werden in ein Becherglas gegeben und regelmäßig gerührt, damit sich die *Agrobakterien* nicht absetzen. Die Pflanzen mit den Blütenständen werden kopfüber für 20-30 Sek. tief in die Lösung getaucht (engl. *Floral Dip*).
- Danach werden die Pflanzen unter Langtag-Bedingungen gehalten und für 2 Tage mit einer transparenten Haube abgedeckt, um ein Austrocknen der Bakterienlösung zu verhindern.

4.5.4 Identifizierung transgener Pflanzen

Da für die Arbeiten homozygote Pflanzen benötigt werden, müssen die transgen hergestellten Pflanzen getestet werden. Dazu streut man Samen auf mit entsprechendem Selektionsmedium versetzte Platten aus und verschließt diese mit Leukopor[®]. Nach

einer Stratifikationsphase von 3-4 Tagen werden die Platten je nach Selektionsmedium direkt in den Klimaschrank (12 Std. Licht / 12 Std. Dunkelheit) gestellt oder einem Lichtimpuls ausgesetzt und dann im Klimaschrank bei konstanter Dunkelheit inkubiert. Wenn die Keimlinge groß genug sind (nach 4-7 Tagen) werden die positiven Keimlinge (grüne Keimlinge mit langen Wurzeln bzw. langes Hypokotyl) auf Töpfe mit Erde überführt und im Klimaschrank (12 Std. Licht / 12 Std. Dunkelheit) bis zur Samenreife kultiviert. Durch PCR wird überprüft, ob die ausgewählten Transformanten das gewünschte Konstrukt enthalten. In der nachfolgenden Generation können durch erneute Selektion weitere homozygote Pflanzen identifiziert werden.

4.5.5 Oberflächensterilisation von Arabidopsis Samen

Vor dem Auslegen der Samen werden diese oberflächensterilisiert, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Die Sterilisation der Samenoberfläche wird mit Chlorgas durchgeführt:

- Die Samen werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt (maximale Füllhöhe: 0,5 cm).
- 70 ml 12%ige Natriumhypochloritlösung werden in einem Becherglas in einem Exsikkator vorgelegt.
- Die mit Samen befüllten und geöffneten Reaktionsgefäße werden in einen Kunststoffständer in den Exsikkator auf das Becherglas gestellt.
- Nun werden 7 ml HCl (31 - 33 %) zu der Hypochloritlösung gegeben und der Exsikkator schnell mit dem Deckel verschlossen. Im Inneren entsteht eine Chlorgasatmosphäre.
- Nach 2,5-3,5 Std. wird der Exsikkator geöffnet. Die Reaktionsgefäße werden mit geöffnetem Deckel unter eine Sterilbank zum Ausdampfen gestellt.
- Die sterilisierten Samen können unter der Sterilbank auf die vorbereiteten Medien verteilt werden.

Achtung: Die Samen haben nach der Chlorgasbehandlung nur eine begrenzte Lagerzeit, da die Keimungsrate mit zunehmender Dauer abnimmt.

4.6 Protoplasten Transformation

A Arabidopsis-Protoplasten Gewinnung

1. Blätter von 4 bis 5 Wochen alten Pflanzen abschneiden und die Blattunterseite fein mit einem Skalpell in 1 mm Abstand einritzen.

2. Blätter mit der Blattunterseite nach unten auf 10 ml Enzymlösung in eine Petrischale legen, bis diese voll bedeckt ist.
3. Der Zellwandverdau erfolgt bei RT unter Vakuum für ca. 5 Std..
4. Vorsichtiges Schwenken der Petrischale bis zum Ausfall der Protoplasten in die Lösung.
5. Protoplastenlösung durch ein W5-Puffer benetztes Metallnetz (0,063 mm) vorsichtig in ein 50 ml-Gefäß gießen.
6. Für 2 Min. bei 100 g und RT bei langsamer Beschleunigung und Bremse (Programm 1) zentrifugieren.
7. Überstand mit abgeschnittener Spitze vollständig entfernen.
8. Vorsichtig mit 4 ° C kalter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen und die Protoplasten durch leichtes Schwenken resuspendieren.
9. 1 Min. bei 100 g und RT bei langsamer Beschleunigung und Bremse (Programm 2) zentrifugieren.
10. Überstand mit abgeschnittener Spitze vollständig entfernen.
11. Vorsichtig mit 4 ° C kalter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen und vorsichtig resuspendieren.
12. Für mindestens 10 Min., maximal 5 Std. auf Eis inkubieren.

B Arabidopsis Protoplasten PEG-Transformation

13. Protoplastenlösung für 1 Min. bei 100 g und RT zentrifugieren (Programm 2).
14. Überstand mit abgeschnittener Spitze entfernen.
15. Protoplasten mit gewünschter Menge MMg-Lösung versetzen und durch leichtes Schwenken resuspendieren.
16. In 2 ml-Gefäßen 40 µg DNA* vorlegen.

* GUS-Assay 40 µg DNA in 20 µl H₂O
(für 20 µg DNA je die Hälfte)

Kontrolle: 9 µg Promotor, 28 µg ΔGFP-Vektor, 3 µg
NAN-Normalisierungsplasmid

Probe: 9 µg Promotor, 14 µg Transkriptionsfaktor, 14 µg ΔGFP-Vektor,
3 µg NAN-Normalisierungsplasmid

17. 2 ml-Gefäß schräg halten und 200 μ l Protoplasten-Lösung mit abgeschnittener Spitze hinzufügen.
18. Vorsichtig 7 mal invertieren.
19. 220 μ l PEG-Lösung mit abgeschnittener Spitze hinzufügen.
20. 14 mal vorsichtig invertieren, bis PEG- und Protoplastenlösung vollständig vermischt sind.
21. 21 Min. bei RT inkubieren.
22. 800 μ l W5-Lösung mit drehender Bewegung hinzugeben, dabei den Rand des Gefäßes abspülen und anschließend invertieren.
23. 1 Min. bei 1500 rpm und RT zentrifugieren (Soft Start!).
24. Mit abgeschnittener Spitze 1 ml des Überstands entfernen und mit einer Insulin-Spritze den Rest vom Überstand abnehmen.
25. 300 μ l WI-Lösung zugeben und Protoplasten vorsichtig durch leichtes Schwenken resuspendieren.
26. Über Nacht im Klimaschrank inkubieren.

C Arabidopsis Protoplasten GUS-Assay

27. Überstand vorsichtig abnehmen und Protoplasten in flüssigem Stickstoff einfrieren.
28. 140 μ l GUS-Ex + β -Mercaptoethanol (5 μ l pro 10 ml Puffer) pH 7,2 dazugeben und vortexen.
29. Proben für spätere Verwendung in Kühlschrank stellen.
30. Platten auf Eis vorbereiten (vgl. Abbildung 4.2):
31. Für t₀ Wert die Platten 10 Min. bei 37 ° C inkubieren.
32. Zum Abstoppen die Proben (100 μ l GUS-Probe / 8 μ l NAN-Probe) in die jeweiligen Stopp-Puffer pipettieren.
33. Für t₆₀ Wert die Platten 60 Min. bei 37 ° C inkubieren.
34. Zum Abstoppen 100 μ l GUS-Stopp in die GUS-Probe und 8 μ l NAN-Probe in das jeweilige Well mit NAN-Stopp-Puffer pipettieren.
35. Die GUS-NAN Quantifizierungsplatte am Photometer auslesen.

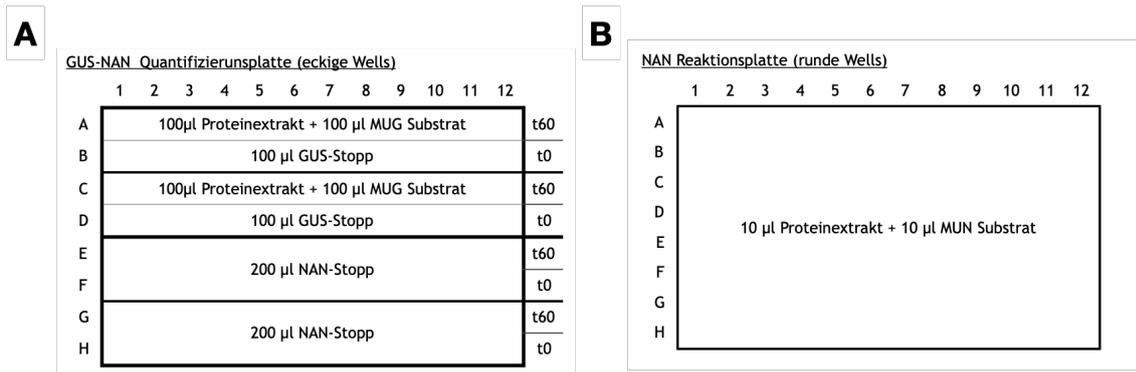


Abbildung 4.2 – Schematische Darstellung des Pipettierschemas für Protoplasten GUS-Assay. (A) Abgebildet ist die GUS-NAN Quantifizierungsplatte mit den entsprechenden Pufferlösungen. (B) Zeigt die NAN-Reaktionsplatte.

4.7 RNA-Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung wurde von der Core-Unit Systemmedizin der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg durchgeführt. Dort wird mit der Illumina[®] Sequenzieretechnik gearbeitet. Dabei gliedert sich der Arbeitsfluss für das RNA-Sequenzieren nach dem Illumina[®] Konzept in vier Abschnitte:

A Die cDNA-Bibliothek (Library)

Die cDNA-Bibliothek wird durch zufällige Fragmentierung der isolierten mRNA gestartet (Fragmentierung durch Hitze bei 94 °C) und danach in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. An die jeweiligen Enden (3' und 5') werden spezielle Adapter ligiert und in einer PCR amplifiziert (vgl. 4.2.6).

B Cluster Erzeugung (Cluster Generation)

Zur Cluster-Erzeugung wird die Bibliothek auf einen speziellen Chip (engl: *Flow Cell*), geladen der mit vielen oberflächengebundenen Oligonukleotiden ausgestattet ist, die mit den verwendeten Adaptern komplementär sind. Somit kann jedes Fragment an ein Oligonukleotid binden. Durch Brückenamplifikation werden von jedem Fragment klonale Cluster hergestellt. Das gesamte Cluster besteht aus ungefähr 1000 klonalen Kopien und wird für die Sequenzierung benötigt.

C Ablauf der Sequenzierung

Mit Hilfe der Sequenzieren-beim-Synthetisieren (SBS, engl: *Sequencing-by-Synthesis*) Technik werden die Fragmente der Bibliothek auf dem Durchfluss-Chip gelesen. Dabei detektiert SBS einzelne Basen, sobald sie in die DNA-Template-Stränge eingebaut werden. Indem jede der vier dNTP Arten einen anderen Farbstoff hat und bei jedem Zyklus nur eine dNTP Art eingebaut wird, fluoresziert das gesamte Cluster und das frei gesetzte Licht wird registriert. So können Millionen von Clustern parallel gelesen werden. Es entsteht eine Base-für-Base Sequenzierung aller Cluster

auf dem Durchfluss-Chip. Die Länge der Reads wird dabei von der Zyklenanzahl bestimmt. Die gespeicherten Daten liegen im fastq Format vor. Die Sequenzierung wurde im paired-end Verfahren durchgeführt. Dieses liefert genauere Ergebnisse, da hier die cDNA von beiden Seiten gelesen wird und diese miteinander abgeglichen werden. Auf einen Durchfluss-Chip können viele Proben geladen werden, da anhand der verwendeten Index-Oligonukleotide während der PCR-Amplifikation die Reads bei der Auswertung den einzelnen Proben zugeordnet werden können.

D Auswertung der Daten

Die identifizierten Sequenzen werden im ersten Schritt auf ein Referenzgenom abgeglichen (engl: *Alignment*). Für die weitere bioinformatische Auswertung stehen eine Vielzahl an Programmen und unterschiedlichen Wegen zur Verfügung. In dieser Arbeit ist das Alignment mit STAR (engl: *Spliced Transcripts Alignment to a Reference*) durchgeführt worden. Dazu wird ein Index erzeugt, auf den die gesamten Reads gemappt werden. Danach werden die Anzahl der Reads mit FeatureCount gezählt, diese Daten in RStudio[®] eingelesen und ausgewertet. Dabei werden immer die behandelten Proben (Mutanten) mit dem Wildtyp verglichen und nach einer Normalisierung Listen zusammengestellt, die auf verschiedenen Signifikanz-Niveaus beruhen. Zusätzlich wird ein LRT (engl: *Likelihood Ratio Test*) durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die sich über die Zeit verändern. Für die Auswertung der RNA-Seq Daten wurden folgende Pakete in RStudio[®] geladen und verwendet:

- DESeq2 (Love *et al.*, 2014)
- pheatmap (Kolde, 2019)
- ReportingTools (Huntley *et al.*, 2013)
- ggplot2 (Wickham, 2016)

Mit Hilfe von Clusteranalysen können Gene identifiziert werden, die ähnlich reguliert sind. Dafür wurden folgenden Pakete verwendet:

- org.At.tair.db (Carlson, 2019a)
- clusterProfiler (Yu *et al.*, 2012)
- org.Hs.eg.db (Carlson, 2019b)
- DOSE (Yu *et al.*, 2014)
- pathview (Luo und Brouwer, 2013)
- AnnotationHub (Morgan, 2019)
- ensemblDb (Rainer *et al.*, 2019)
- tidyverse (Wickham *et al.*, 2019)
- annotables (Turner, 2020)

4.8 Mikroskopische Arbeiten

4.8.1 Arbeiten mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (CLSM)

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, bei der fluoreszierende Materialien mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und dadurch Licht einer anderen Wellenlänge abstrahlen. Durch das Präparat wird der Großteil Licht absorbiert. Das Emissionslicht wird in das Objektiv zurückgeworfen. Dieses Fluoreszenzlicht lässt sich im Fluoreszenzmikroskop betrachten. Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie als eine erweiterte Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie bietet den Vorteil, dass durch den Einsatz einer Lochblende nur ein sehr geringer Anteil des Fluoreszenzlichtes in das Mikroskop gelangt, wodurch sich Hintergrundsignale reduzieren lassen. Die moderne konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) ermöglicht es, bei mehrschichtigen Objekten durch die verschiedenen Ebenen zu scannen und anschließend durch Überlagerung der Einzelbilder ein 3D-Bild zu erzeugen. Um die fluoreszierenden Strukturen im Präparat lokalisieren zu können, werden Durchlicht- und Fluoreszenzbilder überlagert.

In dieser Arbeit wird das Fluoreszenzlicht des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aufgenommen, welches mit einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 450-490 nm angeregt wird und sein Emissionsmaximum bei 509 nm hat. Zusätzlich wird das Fluoreszenzlicht von Propidiumiodid aufgenommen, welches sich in Zellwände einlagern kann, jedoch nicht in lebende intakte Zellen gelangt. Es wird ebenfalls mit der Wellenlänge von GFP angeregt, jedoch bei 590 nm emittiert.

4.8.2 PAM-Messung zur Bestimmung der photochemischen Aktivität

Die photosynthetische Aktivität von Pflanzen lässt sich auch mit Hilfe der Messung der Chlorophyllfluoreszenz durch PAM-Messungen (Pulse-Amplitude modulierte Fluoreszenz) nachweisen. Das vom Photosystem II nicht aufgenommene Sonnenlicht wird als Chlorophyllfluoreszenz wieder abgegeben. Diese Energie steht daher nicht für die Bildung von NADPH für den Calvin-Zyklus zur Verfügung. Die Stärke der Chlorophyllfluoreszenz ist teilweise umgekehrt proportional zur photosynthetischen Aktivität (Lavorel und Etienne, 1977). Durch Chlorophyllmoleküle wird Lichtenergie absorbiert und für die Photosynthese genutzt, als Wärme deaktiviert oder als Fluoreszenz abgestrahlt. Unter optimalen Bedingungen werden etwa 80 % in Wärme und ca. 0,5 % in Fluoreszenzlicht umgewandelt. Besteht jedoch keine Möglichkeit die Energie im photosynthetischen CO₂ zu nutzen, werden ca. 97,5 % in Wärme umgewandelt und der Rest als Fluoreszenz abgestrahlt. Für diese Fluoreszenz sind hauptsächlich die Chlorophyll- α -Moleküle im Photosystem II (PSII) der Elektronentransportkette verantwortlich (Bolhar-Nordenkampf *et al.*, 1989). Für die Messungen wurde eine bildgebende PAM M-Serie Maxi-Version verwendet, die amplitudenmoduliertes Licht erzeugt. Dazu wurden die Kotyledonen vom Rest des

Keimlings getrennt und auf eine mit Wasser befeuchtete Membran gelegt. Danach erfolgte eine Dunkeladaption von 15 Min., anschließend wurden die Blätter in die Maxi-PAM gelegt. Nun wurden in der Software die AOI (engl: *Area of Interest*) ausgewählt und die aufzunehmenden Parameter eingestellt. Dann wurde eine Kinetik aufgenommen. Nach Abschluss der Messung sicherte man die Daten für die weitere Auswertung. Die Bestimmung der Quantenausbeute im PSII bei der Umwandlung von Lichtquanten in Energie wurde wie folgt berechnet:

$$F_v/F_{max} = F_{max} - F_0, F_{max}$$

Dabei entspricht F_{max} der maximalen Fluoreszenzausbeute, die nach Dunkeladaption erreicht wurde, F_0 der minimalen Fluoreszenzausbeute, nachdem alle Pigmentkomplexe aufgrund der Dunkeladaption offen sind. F_v (variable Fluoreszenz) stellt die Differenz zwischen maximaler und minimaler Fluoreszenzausbeute dar. Der Quotient gibt an, wie viel Lichtenergie effektiv für die Photosynthese zur Verfügung stand. Ohne Stress liegt dieser Wert zwischen 0,75-0,85. Sinkt der Wert unter 0,75, so war die Pflanze UV-Stress ausgesetzt und gab überschüssige Lichtenergie entweder in Form von Wärme oder Fluoreszenz ab oder baute einen pH-Gradienten auf (Brooks und Niyogi, 2011).

4.9 Allgemeine Berechnungen

4.9.1 Bestimmung der Länge von Primärwurzel bzw. Hypokotyl

Für alle Versuche, bei denen das Hypokotyl bzw. die Primärwurzel gemessen wird, werden die Samen auf MS-Medium in quadratischen Petrischalen auf einer Linie ausgelegt und unter bestimmten Bedingungen, die bereits in vorangegangenen Kapiteln erläutert wurden, angezogen. Die gekeimten Pflanzen werden mit Hilfe eines Scanners aufgenommen und die Aufnahmen mit der Software ImageJ (<http://imagej.net>) ausgewertet.

4.9.2 Berechnung der relativen Geninduktion ($2^{\Delta Ct}$ -Methode)

Diese Methode wird angewandt, um qRT-PCR Daten auszuwerten. Dazu wird zunächst vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens der Ct-Wert des Referenzgens abgezogen = ΔCt (relative Expressionsstärke). Bei mehreren technischen Replikaten (häufig 3 je Probe) wird aus diesen nach Berechnung der relativen Expressionsstärke der Mittelwert (arithmetisches Mittel) gebildet und in folgende Gleichung eingesetzt $2^{-\Delta Ct}$. Es wird davon ausgegangen, dass nach jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA-Menge erfolgt. Mit einer weiteren Berechnung der Oligonukleotid-Bindeeffizienz kann die Verdopplungszahl berücksichtigt werden. Nach dieser Berechnung wird die relative Expressionsstärke der Kontrolle auf 1 gesetzt. Die restlichen

Proben werden als Vielfaches der Kontrollgruppe dargestellt, also als relative Geninduktion gegenüber der Kontrolle. Zum Erstellen der Grafiken wurde RStudio[®] verwendet.

4.9.3 Berechnung des Frischgewichts

Das Frischgewicht der Keimlinge wurde unmittelbar nach der Ernte bestimmt. Dazu wird vor der Ernte das Leergewicht der Reaktionsgefäße bestimmt, direkt nach der Ernte die Proben in das Reaktionsgefäß gegeben und das Gewicht bestimmt. Im Anschluss werden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Berechnung wurde das Gewicht_{Leergewicht} vom Gewicht_{Probe} subtrahiert. Aus mehreren biologischen Replikaten wird mit RStudio[®] der Mittelwert (arithmetisches Mittel), die Standardabweichung und die Statistik berechnet.

4.9.4 Berechnung der Statistik und Erstellen der Grafiken

Zur Berechnung der Statistik und zum Erstellen der Grafiken wurde RStudio[®] verwendet. Zunächst werden die Werte und Varianzen auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wird einer den Daten entsprechender statistischer Test durchgeführt. Zur richtigen Auswahl wurde die Methodenberatung der Universität Zürich (<https://www.methodenberatung.uzh.ch/de.html>) zur Hilfe genommen. Folgende Pakete wurden bei der Berechnung und der Erstellung der Graphen benutzt:

- ggplot2 (Wickham, 2016)
- reshape2 (Wickham, 2007)
- extrafont (Winston, 2014)
- gdtools (Gohel *et al.*, 2020)
- multcompView (Graves *et al.*, 2019)
- emmeans (Lenth, 2020)
- RVAideMemoire (Hervé, 2020)
- car (Fox und Weisberg, 2019)
- ggpubr (Kassambara, 2020)
- dplyr (Wickham *et al.*, 2020)

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines Inkubationssystems zur Analyse des Einflusses von *SnRK1* auf die Arabidopsis Keimung

5.1.1 Phänotypische Untersuchung von Wildtyp und *snrk1*-Mutante

Während der Keimung finden große Umstrukturierungen im Samen statt, die genau aufeinander abgestimmt und kontrolliert werden müssen. Ein zentraler metabolischer Regulator dabei ist SnRK1. Dessen Aufgabe soll während der Keimung genauer untersucht werden. Für die Analyse der Keimlingsentwicklung ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Samen zum selben Zeitpunkt keimen. Dies erreicht man am ehesten, indem man Samen verwendet, die unter gleichen Bedingungen angezogen wurden und ein vergleichbares Alter haben. Neben dem Wildtyp vom Ökotyp Columbia (Col-0) wurden auch die *knock-out*-Mutanten (*snrk1α1* und *snrk1α2*) sowie eine *knock-down*-Doppelmutante verwendet (Pedrotti *et al.*, 2018). Bei der Doppelmutante handelt es sich um eine T-DNA-Insertionslinie für *snrk1α1* mit einer Estradiol-induzierbaren amiRNA, die gegen *snrk1α2* gerichtet ist. Durch Nutzung dieses induzierbaren knock-down-Ansatzes konnten Versuche mit *knock-out*-Charakter durchgeführt werden, da eine Doppelmutante letal ist (Baena-González *et al.*, 2007). Die oberflächensterilisierten Samen wurden dazu in 1 x MS-Medium einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen gelegt und mit Leukopor verschlossen. Je nach Versuch wurde noch Estradiol (Est; 10 μ M) hinzugegeben. Danach wurden die Schalen für 3,5 Tage im Kühlschrank stratifiziert. Vor dem Wechsel in den Klimaschrank wurde das estradiolhaltige Medium gewechselt. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Klimaschrank für 3 Tage bei kompletter Dunkelheit. Dann wurden die Keimlinge unter Normaltagbedingungen (12 Std. Licht / 12 Std. Dunkelheit) weiter inkubiert (Abb. 5.1 A). Am Ende der Nacht wurden jeweils Fotos aufgenommen und die Keimlinge geerntet. Mit einem Western-Blot wurde überprüft, ob die SnRK1 α 1 bzw. SnRK1 α 2 Proteinmengen in der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp reduziert sind. Während sich im Wildtyp sowohl die Banden für SnRK1 α 1 als auch für SnRK1 α 2 nachweisen ließen, konnten im Western-Blot

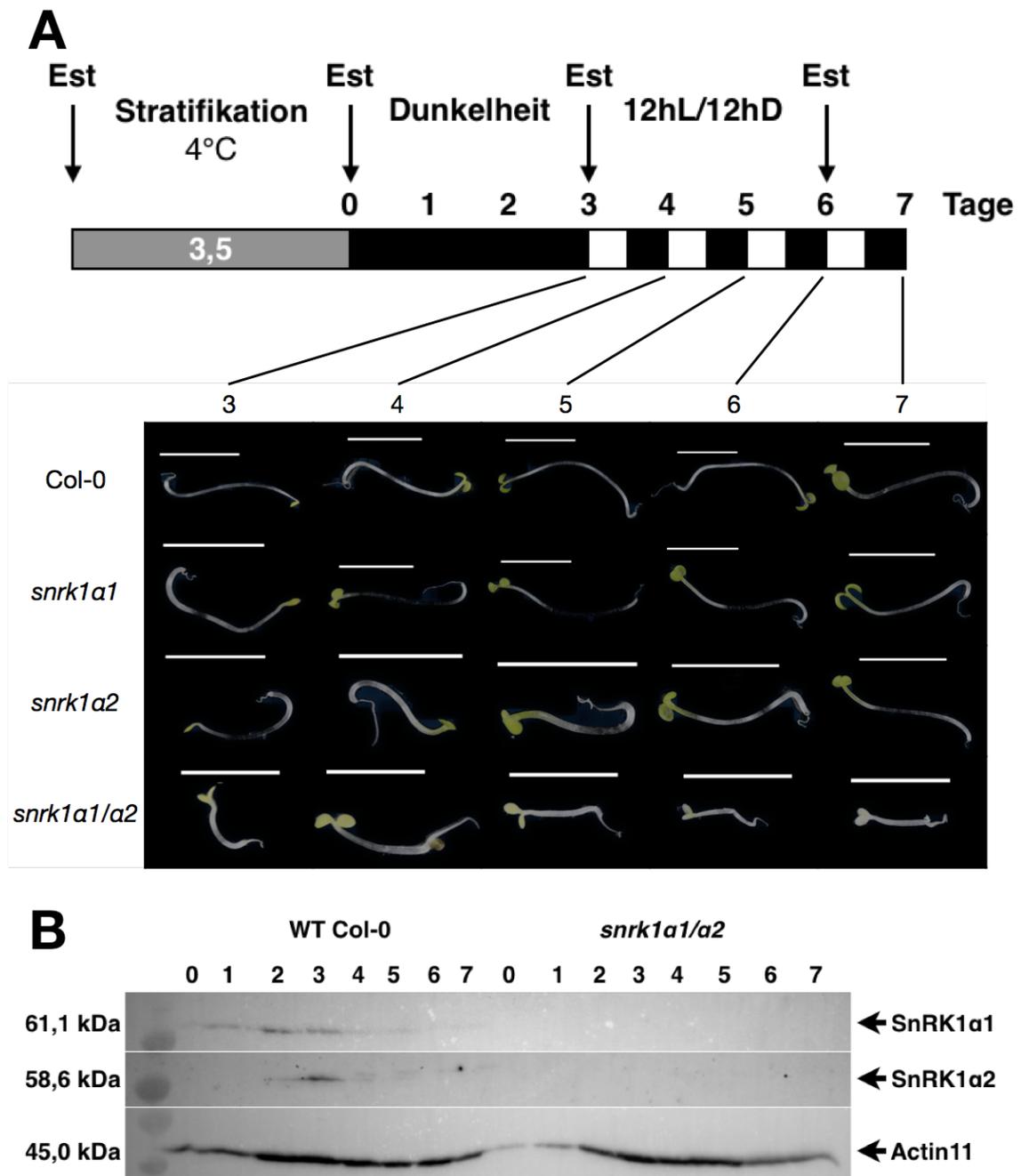


Abbildung 5.1 – Phänotypische Untersuchung der Keimung von WT (Col-0) und *snrk1* Mutanten. (A) Gezeigt sind repräsentative Keimlinge am Ende der Nacht entsprechend dem Verlaufsschema. Gezeigt sind Fotos von WT, Einzelmutante (*snrk1α1* bzw. *snrk1α2*) und Doppelmutante *snrk1α1/α2*. Die beobachteten Phänotypen wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Der Maßstab beträgt 20 mm. (B) Immunologischer Proteinnachweis der katalytischen α -Untereinheiten von *SnRK1* in WT und *snrk1α1/α2*-Mutante. Der Ladungsabgleich erfolgte mit ACTIN11 Antikörper. Das Experiment wurde 3 mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

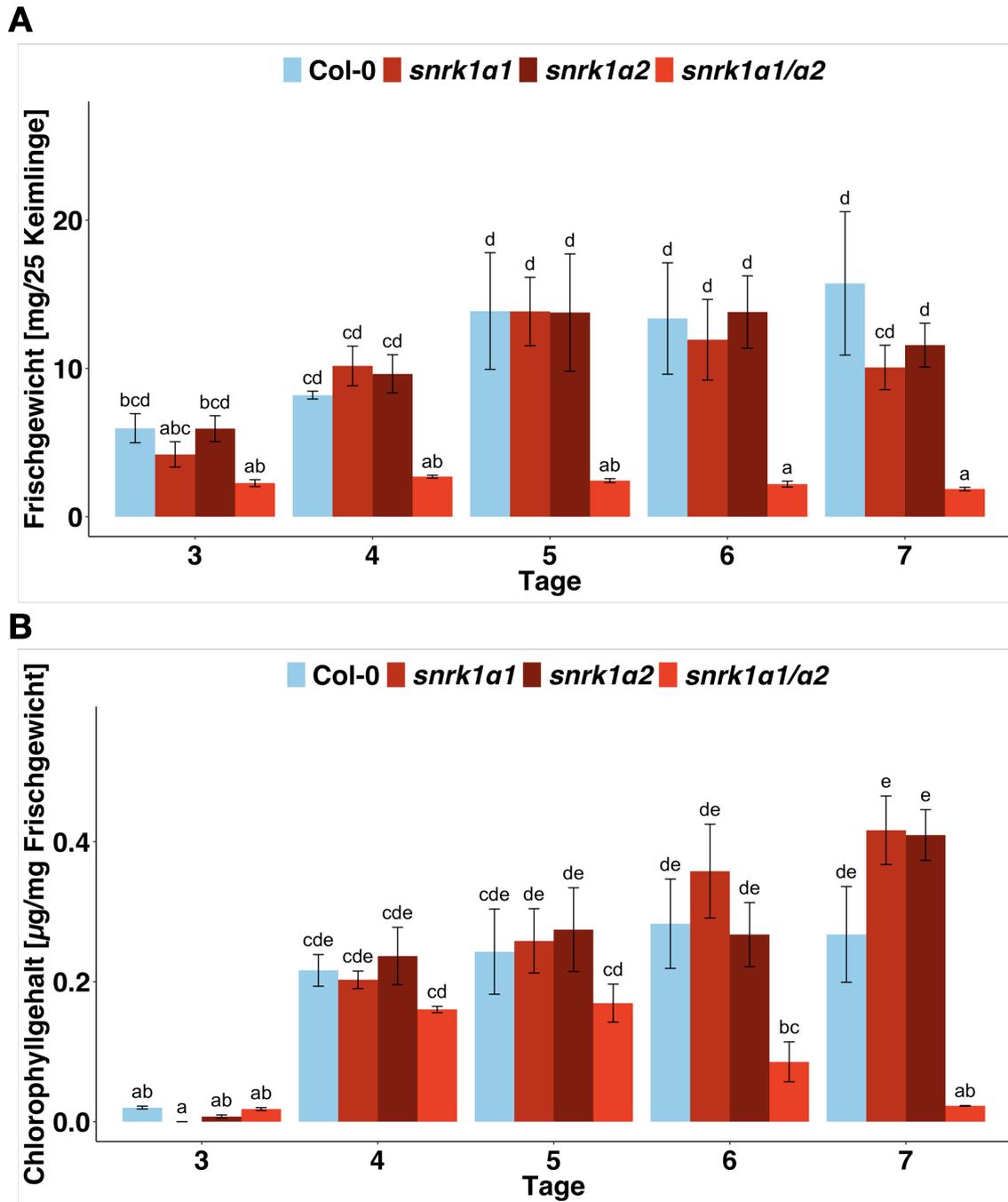


Abbildung 5.2 – Keimlinge der *snrk1a1/a2* Doppelmutante zeigen sowohl ein reduziertes Frischgewicht, als auch einen geringeren Chlorophyllgehalt. Keimlinge wurden entsprechend dem Schema in 4.5.2 angezogen. Die Keimlinge wurden am Ende der Nacht geerntet und das Frischgewicht (A) und der Chlorophyllgehalt (B) photometrisch bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse der Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

keine Banden für die genannten Proteine in den Proben von *snrk1 α 1/ α 2* detektiert werden. Das SnRK1 α 1-Protein konnte im Wildtyp über die gesamte Zeit detektiert werden, mit dem stärksten Signal an Tag 2. Die zweite Untereinheit SnRK1 α 2 war an den Tagen 2 bis 6 sichtbar, mit der stärksten Bande an Tag 3, jedoch mit deutlich schwächerem Signal als bei SnRK1 α 1. Die Ladekontrolle mit einem Antikörper gegen ACTIN11 zeigte, dass in allen Proben eine vergleichbare Menge an Protein vorhanden war (Abb. 5.1 B). Eine erneute Est-Gabe alle drei Tage sorgte für eine dauerhafte Reduktion von SnRK1 und gewährleistete konstante Bedingungen bei den Versuchen. Außerdem veränderte sich die Expression der beiden katalytischen Untereinheiten während der Keimung kaum (vgl. Anhang A.1), weshalb man davon ausgehen kann, dass die Expression von SnRK1 unverändert blieb und somit keine Auswirkung auf die Proteinmenge hatte. Wie in Abb. 5.1 zu sehen ist, wurden von den Keimlingen Aufnahmen an den Tagen 3-7 gemacht und die Keimlinge geerntet. Dabei zeigten sowohl der Wildtyp als auch die Einzelmutanten *snrk1 α 1* und *snrk1 α 2* keinen Unterschied, in Bezug auf Frischgewicht und Chlorophyllgehalt, zueinander (Abb. 5.2). Die Est-induzierte *Doppelmutante snrk1 α 1/ α 2* dagegen wies sowohl ein deutlich reduziertes Frischgewicht ab Tag 4, als auch einen signifikant geringeren Chlorophyllgehalt ab Tag 6, auf (Abb. 5.2). Darüber hinaus war in den Aufnahmen zu erkennen, dass das Chlorophyll in den Kotyledonen von *snrk1 α 1/ α 2* ab Tag 4 deutlich zurück ging und an Tag 7 kaum mehr sichtbar war.

5.1.2 Bestimmung des Zeitpunkts der einsetzenden Photosynthese nach Belichtung

Entscheidend für das Überleben der Pflanze ist die Fähigkeit, Glukose durch Photosynthese herzustellen. Daher wurde überprüft, wann die Keimlinge mit der Photosynthese beginnen. Nachdem die Pflanzen bis zum Ende des 3. Tages im Dunkeln standen, wurden Keimblätter geerntet und auf eine Zellulosemembran gelegt. Nach einer Dunkeladaptation von 30 Min. wurde mit einer Maxi-PAM die Photosyntheseaktivität gemessen. Für den Wildtyp konnte nach etwa zwei Stunden Belichtung eine erste Photosyntheseaktivität gemessen werden, welche nach etwa 6 Stunden ein Plateau erreichte (Abb. 5.3). Beim Vergleich von WT mit der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante ließ sich feststellen, dass der Wildtyp an Tag 4 bereits fast das Maximum der Photosyntheseaktivität erreicht hatte. Zwar stieg auch die Photosyntheseaktivität in der Mutante zunächst an, nahm jedoch im weiteren Verlauf der Tage 5-7 wieder ab.

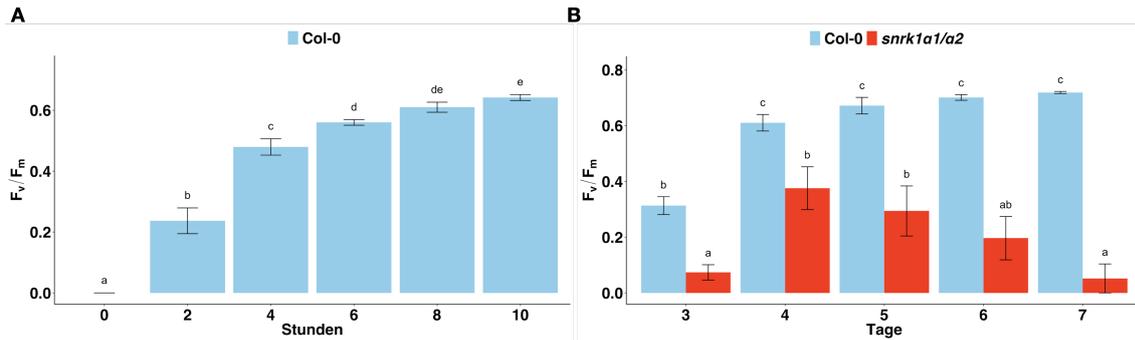


Abbildung 5.3 – Bestimmung der photosynthetischen Aktivität in Keimlingen. (A) Puls-Amplituden-Modulierte Fluoreszenz Messung (PAM) zur Bestimmung der photosynthetischen Aktivität in WT-Keimlingen. (B) In WT und *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen wurde die photosynthetische Aktivität über einen Zeitraum von fünf Tagen gemessen. Die Kotyledonen wurden geerntet und auf einer feuchten Zellulosemembran dunkeladaptiert. Danach wurde die maximale Effizienz des Photosystems II F_v/F_m in den Blättern ermittelt. Mittelwerte \pm Standardfehler von 12 Kotyledonen sind angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

5.1.3 Messung der Expression eines Markergens für die Chloroplastenentwicklung

Da für die Abnahme der Quantenaktivität im Photosystem II (Abb. 5.3) von *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen auch die Chloroplastenentwicklung verantwortlich sein könnte, wurde die Expression des Transkriptionsfaktorgens GOLDEN2-LIKE2 (*GLK2*) mittels qRT-PCR untersucht. Wie man in Abb. 5.4 sehen kann, nahm die

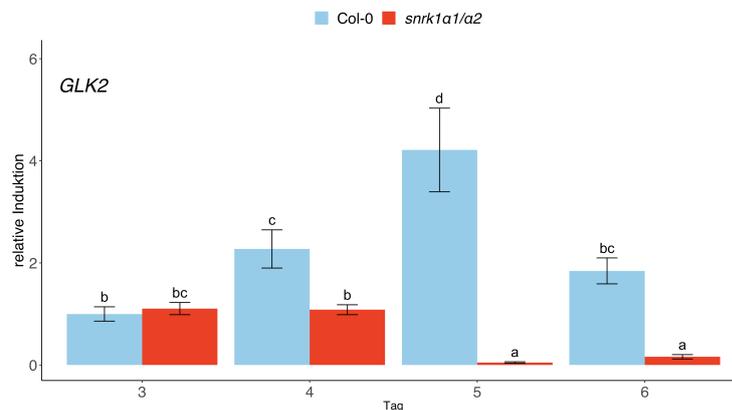


Abbildung 5.4 – Die Genexpression von *GLK2* wird SnRK1-abhängig induziert. Mit Keimlingen wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt und über einen Zeitraum (3 - 5 Tage) die relative Induktion des *GLK2*-Gens dargestellt. Dabei wurde Tag 3 im Wildtyp als Referenz genommen. Die Berechnung wurde nach der $2^{-\Delta C_t}$ Methode durchgeführt. Als Referenzgen wurde *RRN26* verwendet. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

Transkriptmenge von *GLK2* im Wildtyp von Tag 3 bis 5 kontinuierlich zu und erreichte am fünften Tag ein Maximum. Danach ging die Expression auf das Niveau zwischen Tag drei und vier zurück. Bei der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante hingegen wurde keine Induktion der *GLK2*-Genexpression festgestellt. Während sie an Tag 4 auf dem Niveau des Vortages war, ging die relative Transkriptmenge an den Tagen fünf und sechs weiter zurück und blieb auf einem sehr geringen Level. Dies lässt vermuten, dass die Chloroplastenentwicklung in der SnRK1-Mutante durch die fehlende Induktion von GLK2 nicht stattfinden kann.

5.1.4 Untersuchung der Keimlinge bei konstanter Dunkelheit

Für die Untersuchungen der Keimlinge war es wichtig herauszufinden, was für die veränderten Eigenschaften (Genexpression, Phänotyp) verantwortlich war. Daher wurde der Lichtstimulus entfernt und die Keimlinge bei konstanter Dunkelheit inkubiert. Die Keimlinge wurden für 7 Tage im Dunkeln angezogen und geerntet. Wie in Abb. 5.5 zu erkennen ist, verhalten sich die Einzelmutanten wie der Wildtyp. Das Frischgewicht in der Doppelmutante ist dagegen deutlich geringer als im Wildtyp.

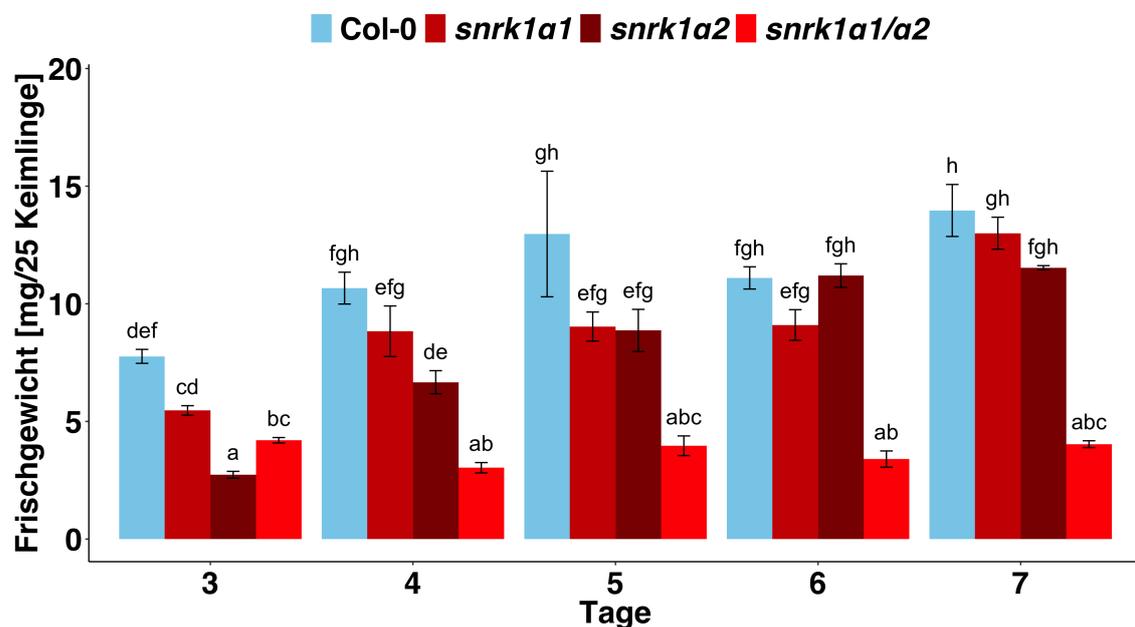


Abbildung 5.5 – Die Frischgewichtsmessung in Keimlingen zeigt ein reduziertes Gewicht in der Doppelmutante *snrk1 α 1/ α 2* bei konstanter Dunkelheit. Das Frischgewicht wurde unmittelbar nach dem Ernten der Keimlinge bestimmt. Der Mittelwert wurde aus drei biologischen Replikaten mit je 25 Keimlingen gebildet. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test. Abgebildet ist der Standardfehler.

Da der Lichtstimulus offenbar keinen Einfluss auf das Frischgewicht von Wildtyp und *snrk1 α 1/ α 2*-Doppelmutante hat, wurde im nächsten Experiment das Wurzel- und Hypokotylwachstum untersucht.

5.1.5 Die *snrk1 α 1/ α 2*-Doppelmutanten zeigen ein beeinträchtigtetes Wurzel- und Hypokotylwachstum

Neben der veränderten Chloroplastenentwicklung in *snrk1 α 1/ α 2* unterschied sich die Mutante auch im Wurzel- und Hypokotylwachstum vom WT (Abb. 5.1). Da aus der Untersuchung des Frischgewichts keine Aussage darüber getroffen werden kann, welches Organe in der Mutante betroffen ist, wurden ergänzende Messungen zum Wurzel- und Hypokotylwachstum durchgeführt. Dazu wurden Samen auf Platten mit 1 x MS-Medium ausgelegt, 3 Tage bei konstanter Dunkelheit inkubiert und dann entweder für weitere 3 Tage bei konstanter Dunkelheit gehalten oder unter 12 Std. Licht und 12 Std. Dunkelheit inkubiert. Während im Wildtyp im Licht die Pflanzen kein weiteres Hypokotylwachstum zeigten, streckte sich das Hypokotyl des WT in Dunkelheit. Die *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante hingegen zeigte eine deutlich reduzierte Hypokotyllänge im Vergleich zum Wildtyp. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Mutante im Licht oder bei Dunkelheit inkubiert wurde (Abb. 5.6). Bei der Messung der Wurzellänge wurde nach dem gleichen Prinzip wie beim Hypokotylwachstum vorgegangen. Der Wildtyp bildete im Licht längere Wurzeln als bei konstanter Dunkelheit. Wie schon bei der Hypokotyllänge zeigte auch die Wurzellänge bei der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante ein verkürztes Wachstum auf. Zwischen Licht (3d dunkel, 3d

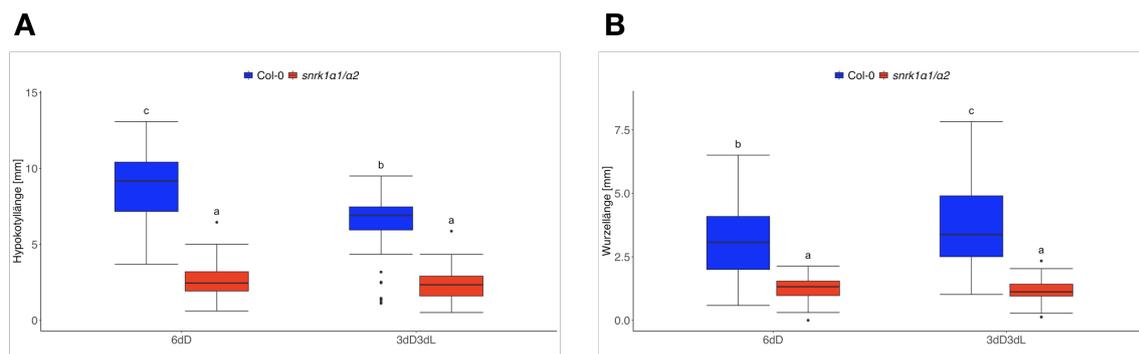


Abbildung 5.6 – Messung der Hypokotyl- und Wurzellänge in WT und *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante. Die Hypokotyllänge (A) sowie die Wurzellänge (B) unterscheiden sich sowohl im Genotyp (WT und *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante) als auch in den Anzuchtbedingungen 6dD und 3dD3dL. Abgebildet in einem Box-Plot sind die Daten aus 60 Keimlingen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

Normalbedingungen) und konstanter Dunkelheit (6d) gibt es bei der Mutante keine Unterschiede (siehe Abb. 5.6).

5.2 Lokalisation von SnRK1 α 1

5.2.1 SnRK1 α 1:GFP wird im Keimling exprimiert

Um herauszufinden, wo und in welcher Entwicklungsphase SnRK1 α 1 in den Keimlingen exprimiert wird, wurden die Keimlinge an mehreren aufeinander folgenden Tagen unter dem Laser Scanning Mikroskop (LSM) angesehen und Fotos aufgenommen. Hierfür wurden SnRK1:GFP-Pflanzen, die ein Fusionsprotein aus SnRK1 α 1 gekoppelt an ein GFP exprimieren, verwendet. Als Kontrolle wurde der Wildtyp Col-0 verwendet.

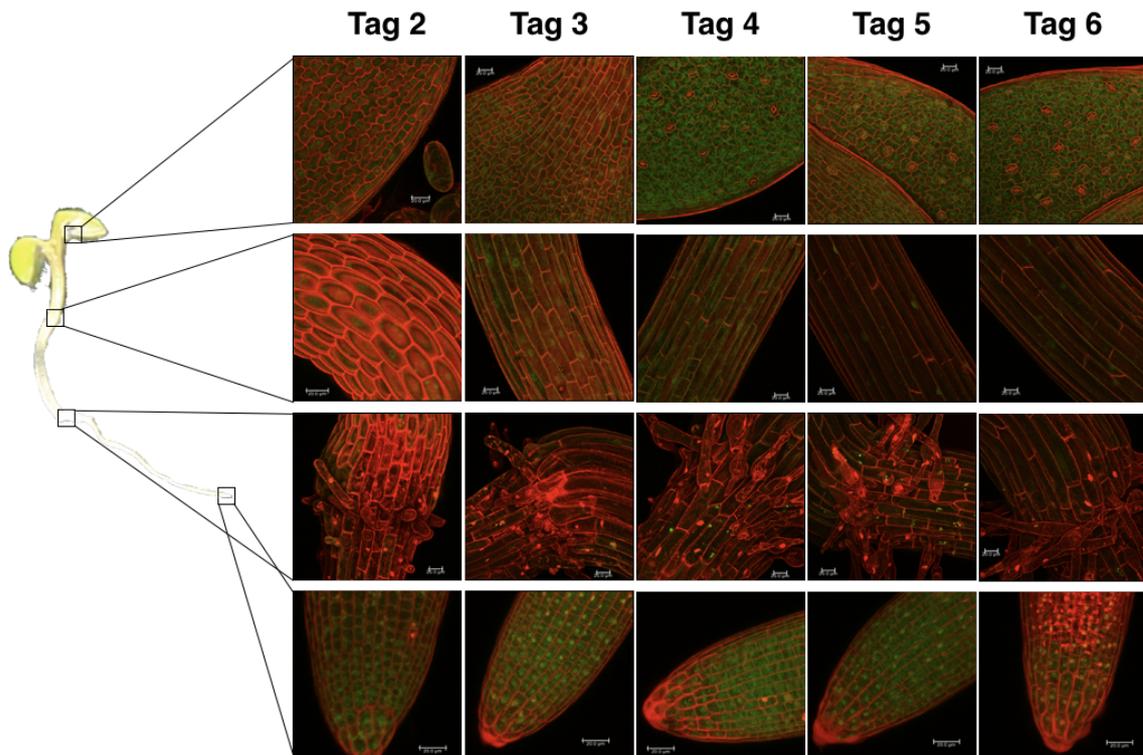


Abbildung 5.7 – Nachweis der Expression von SnRK1 α 1:GFP Fusionsproteinen in Kotyledonen, Hypokotyl, Übergang von Hypokotyl und Wurzel und Wurzelspitze in Dunkelheit. Gezeigt sind Aufnahmen von Keimlingen im Dunkeln an den Tagen 2 - 6 und aus verschiedenen Geweben (siehe Schema links). Mit Propidiumjodid wurden Zellwände (rot) angefärbt. Das exprimierte Fusionsprotein ist grün dargestellt. Gelbe Bereiche entstehen aus einer Überlagerung von Zellwänden (rot) und Fusionsprotein (grün). Der Maßstab beträgt 20 μ m. Die Ergebnisse wurden in 3 Experimenten bestätigt.

Die Expression von SnRK1 α 1 wurde über den ganzen Versuchszeitraum (Tag 2 bis 6) bei Dunkelheit in der Wurzel nachgewiesen (Abb. 5.7). Am Übergang zwischen Wurzel und Hypokotyl war das GFP-Protein nur zwischen Tag drei und Tag fünf sichtbar. Im Hypokotyl war die Expression von SnRK1 α 1 an den Tagen zwei und drei am stärksten und wurde danach schwächer. Die grün-fluoreszierenden Signale in den Kotyledonen stammen von den Chloroplasten. Dies war auch im Wildtyp bei identischen Einstellungen zu sehen (vgl. Anhang A.2). Die grünen Bereiche in den Kotyledonen von Wildtyp und Mutante sind allerdings kleiner als die detektierten Bereiche im Hypokotyl, im Übergang von Hypokotyl zur Wurzel und in der Wurzelspitze bei den SnRK1 α 1:GFP Keimlingen. Sie stammen vermutlich von Chloroplasten. In der Wurzelspitze war sowohl bei konstanter Dunkelheit als auch nach dem Wechsel ins Licht (3dD3dL) bevorzugt eine Kernlokalisierung zu sehen. Im Übergang

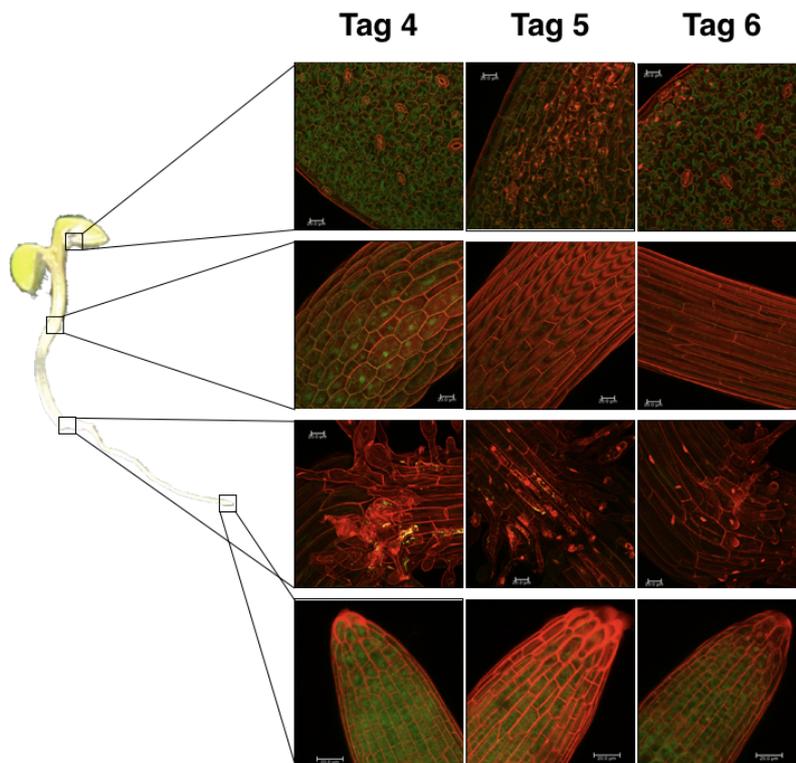


Abbildung 5.8 – Nachweis der Expression von SnRK1 α 1:GFP Fusionsproteinen in Kotyledonen, Hypokotyl, Übergang von Hypokotyl und Wurzel und Wurzelspitze nach dem Wechsel in einen Licht/Dunkel Rhythmus (12hL/12hD) an Tag 4. Gezeigt sind Aufnahmen von Keimlingen nach dem Ende der Nacht im Licht (12hL/12hD) an den Tagen 4 bis 6 und aus verschiedenen Geweben. Mit Propidiumjodid wurden Zellwände (rot) angefärbt. Das exprimierte Fusionsprotein ist grün dargestellt. Gelbe Bereiche entstehen aus einer Überlagerung von Zellwänden (rot) und Fusionsprotein (grün). Der Maßstab beträgt 20 μ m. Die Ergebnisse wurden in 3 Experimenten bestätigt.

von Wurzel zu Hypokotyl war ebenfalls bei beiden Zuständen (6dD und 3dD3dL) an den Tagen 4 und 5 eine Kernlokalisierung zu erkennen. Die Lokalisation im Hypokotyl war dagegen differenzierter. Während bei konstanter Dunkelheit an den Tagen 2 und 3 hauptsächlich eine Kernlokalisierung vorlag, war das Fusionsprotein an Tag 4 auch deutlich im Zytosol zu sehen. Bei Keimlingen nach dem Wechsel ins Licht war an Tag 4 nur eine Kernlokalisierung zu sehen. An den Tagen 5 und 6 hingegen konnte keine Fluoreszenz des Fusionsproteins aufgenommen werden (Abb. 5.8, als Kontrolle Anhang A.3). Das Fusionsprotein zeigte eine ubiquitäre Lokalisation fast im gesamten Keimling, allerdings mit einer spezifischen Kernlokalisierung zu Beginn der Keimlingsentwicklung. Die Lokalisation im Kern legt somit eine Genregulation durch SnRK1 nahe.

5.3 Die Aktivität von SnRK1 α 1

5.3.1 SnRK1 ist sowohl im Kern als auch im Zytosol aktiv

Neben der Lokalisation ist es von entscheidender Bedeutung, wann und wo (in einer Zelle) SnRK1 aktiv ist. Dazu wurden Pflanzen mit einem Konstrukt verwendet, die ein *Acetyl-CoA carboxylase (ACC)* Peptid aus Ratten exprimieren, welches in Pflanzen von SnRK1 spezifisch phosphoryliert werden kann. Außerdem enthält dieses Fusionsprotein sowohl HA- als auch GFP-Tags (Abb. 5.9 A). Bei den transgenen Linien weist eine Linie eine Kern-Lokalisationssequenz auf, damit das Peptid in den Kern transportiert werden kann. Mit diesem Konstrukt kann unterschieden werden, ob die Kinase im Kern oder im Cytosol aktiv war. Mittels einer immunologischen Erkennung kann die Phosphorylierung durch spezifische Antikörper durch einen Western-Blot nachgewiesen werden. So zeigen Banden, wann und wo das spezifische Peptid durch SnRK1 phosphoryliert wurde und somit die Kinase aktiv war. Die Quantifizierung der Signale des Western-Blots sind in der Grafik abgebildet (Abb. 5.9 B). Diese zeigt, dass SnRK1 seine stärkste Aktivität bei der zytosolisch lokalisierten Variante im Dunkeln (Tag 3 und 4) hat. Danach ging die Aktivität deutlich zurück. Das ACC-Peptid als Zielpeptid der Phosphorylierung durch SnRK1 gab an Tag 4 im Licht ein stärkeres Signal als im Dunkeln. Das Signal stieg an Tag 5 im Licht leicht an. Danach ging die Aktivität von SnRK1 wieder auf das Level von Tag 6 im Dunkeln zurück. Für die kernlokalisierte Variante (NLS-ACC) war die Aktivität von SnRK1 im Dunkeln über die gesamte Versuchsdauer annähernd gleich. Im Licht

war die Aktivität vergleichbar mit der zytosolischen Variante, jedoch stärker als im Dunkeln und ging an den Tagen 5 und 6 stark zurück. Sie war an Tag 6 deutlich geringer als bei der NLS-ACC Variante im Dunkeln. Diese unterschiedliche Aktivität von SnRK1 deutet auf unterschiedliche Aufgaben in der Zelle hin und belegt, dass

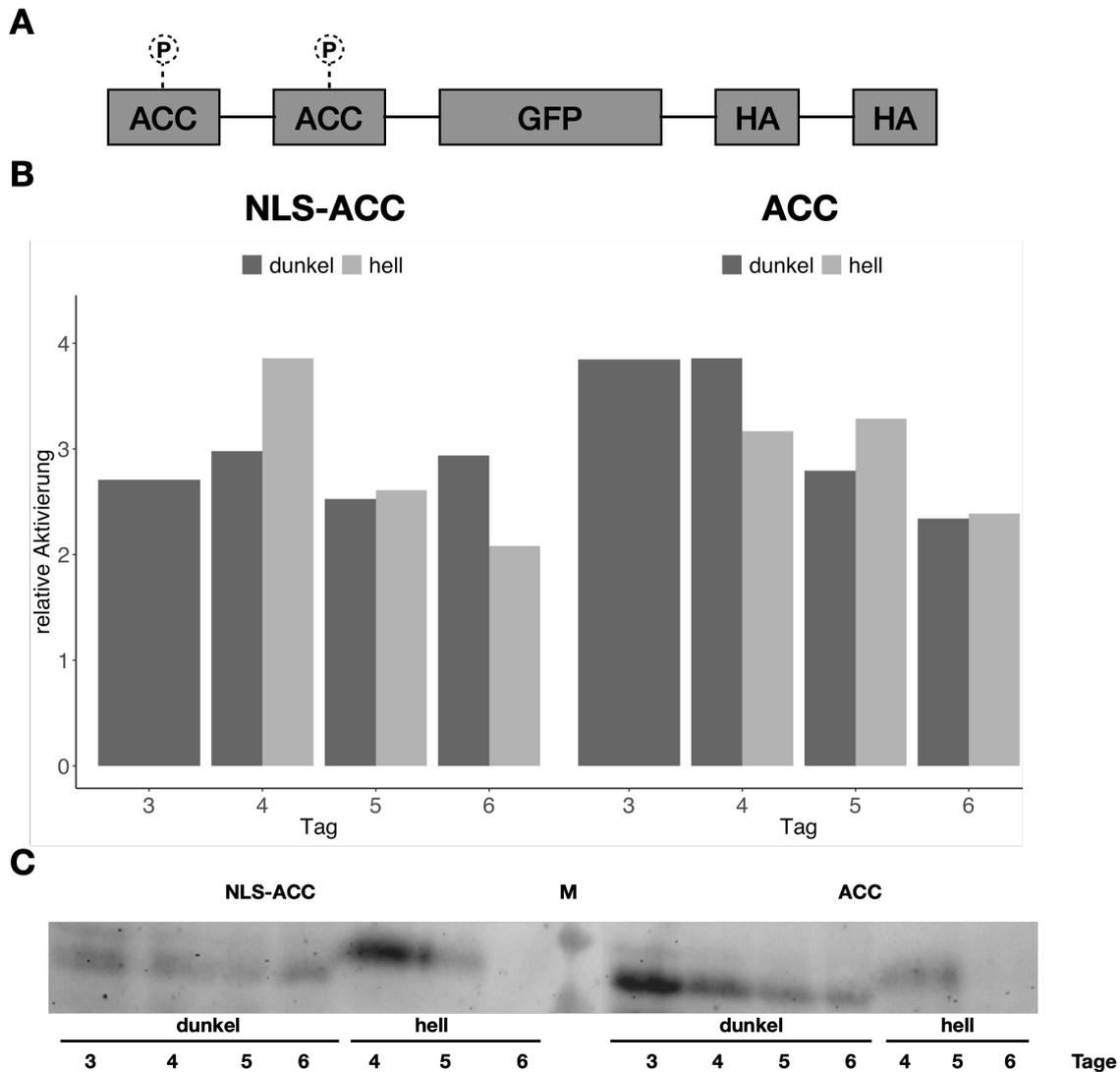


Abbildung 5.9 – Die Phosphorylierung des ACC-Peptids durch SnRK1 unterscheidet sich sowohl zwischen hell und dunkel als auch in der Position der Lokalisation. (A) Gezeigt ist das Fusionsprotein mit den Phosphorylierungsstellen des murinen ACC-Peptids, der GFP-Tag sowie zwei HA-Tags. (B) Abgebildet ist die Quantifizierung der Signale, die durch Phosphorylierung der cytosolischen (ACC) und kernlokalisierten (NLS-ACC) Fusionsproteine im Western-Blot detektiert wurden. Abgebildet ist links das NLS-ACC-Peptid im Dunkeln (dunkelgrau) und im Licht (hellgrau). Das ACC-Peptid (rechts) im Dunkeln (dunkelgrau) und im Licht (hellgrau). (C) Der gezeigte WesternBlot wurde mit dem spezifischen Phospho-Antikörper für die ACC-Erkennungssequenz inkubiert; ein Abgleich erfolgte mit anti-GFP Antikörpern.

die Regulation durch SnRK1 sowohl im Zytosol als auch im Kern, beispielsweise durch Phosphorylierung von TFs, stattfindet. Allerdings war eine relative Quantifizierung über TAGs nicht immer möglich. Eine Wiederholung des Versuchs lieferte zudem keine deutlichen Unterschiede.

5.4 Supplementierung der Wuchsdefizite der SnRK1-Mutante durch Gabe externer Nährstoffe

5.4.1 Phänotypische Untersuchung des Keimlingswachstums nach Gabe von Kohlenhydraten

Für die weiteren Untersuchungen war es notwendig herauszufinden, ob es sich bei der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante um eine pleiotrophe Mutante handelt oder ob sie durch einen spezifischen Block in einem metabolischen Weg eingeschränkt ist, der durch Supplementierung umgangen werden kann. Der Versuchsaufbau ist identisch mit der Untersuchung in Kapitel 5.1.1. Allerdings wurde hier Glukose (Endkonzentration 3%) nach dem dritten Tag zugegeben und unter Normalbedingungen weiter inkubiert. Während die Keimlinge ohne Glukose wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben wuchsen, so entwickelte sich die *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante nach Glukosegabe identisch zum Wildtyp. Die Wurzel wuchs weiter und die Kotyledonen ergrünten vollständig (Abb. 5.10). Dies spricht dafür, dass es sich bei der SnRK1-Mutante um einen metabolischen Block handelt, der durch Glukose-Supplementierung umgangen werden kann. Nach der Ernte der Keimlinge wurde das Frischgewicht und der Chlorophyllgehalt in den Keimlingen bestimmt. Nach Gabe von Glukose nahm das Frischgewicht - wie in Abb. 5.10 verdeutlicht - sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante über die Zeit signifikant zu (Lastdrager *et al.*, 2014). So konnte durch Glukosegabe das Frischgewicht der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante am Ende der Zeitreihe das Frischgewicht des Wildtyps ohne Glukose erreichen. Das Frischgewicht der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante ohne Glukose blieb auf einem sehr niedrigen Niveau. Nach dem Abschluss der Zeitreihe wurde aus allen Proben das Chlorophyll extrahiert und der Chlorophyllgehalt der Keimlinge am Photometer bestimmt. Der Chlorophyllgehalt erhöhte sich zunächst bei alle Proben von Tag 3 auf Tag 4, ehe bei der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante der Chlorophyllgehalt über die Zeit kontinuierlich abnahm. Mit Glukose hingegen zeigte

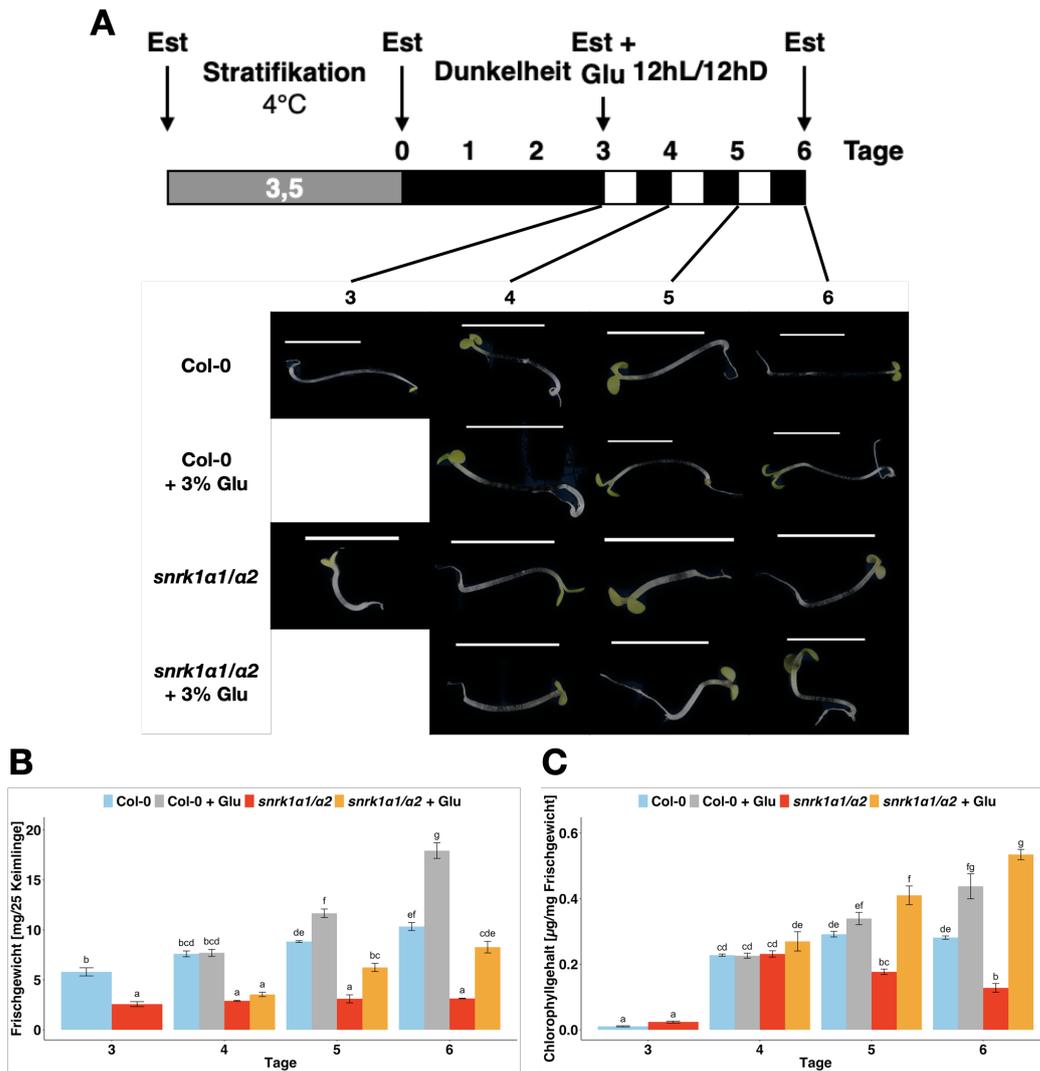


Abbildung 5.10 – Glukose-Gabe kann das Überleben der *snrk1α1/α2*-Mutante retten. In allen Supplementierungs-Experimenten wurde Glukose (3% Endkonzentration) nach Tag 3 zum Medium gegeben. (A) Repräsentative Bilder wurden jeweils am Ende der Nacht aufgenommen. Der Maßstab beträgt 2 mm. (B) Glukose führte zu einer Erhöhung des Frischgewichts in der *snrk1α1/α2*-Mutante. (C) Supplementierung mit Glukose führte zu einer Erhöhung des Chlorophyllgehalts in Wildtyp und *snrk1α1/α2*-Keimlingen. Für Abbildungen (B) und (C): Der Wildtyp Col-0 ist blau und nach Glukosegabe grau dargestellt. Die *snrk1α1/α2*-Mutante ist rot bzw. nach Glukosegabe von 3% orange dargestellt. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten mit jeweils 25 Keimlingen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

die *snrk1α1/α2*-Mutante einen ähnlichen Verlauf wie der Wildtyp. Der Chlorophyllgehalt konnte sowohl beim WT als auch der *snrk1α1/α2*-Mutante gesteigert werden (Abb. 5.10). Somit kann durch Glukose-Supplementierung in den *snrk1α1/α2*-Keimlingen ein funktionierender Photosyntheseapparat gebildet werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob die einmalige Gabe von Glukose ausreicht, um den Mutantenkeimling zu retten. Dazu wurden in einem weiteren Versuch die Pflanzen kontinuierlich alle drei Tage mit frischem glukosehaltigem MS-Medium versorgt bzw. nach einmaliger Glukosegabe am dritten Tag wieder auf normales MS-Medium (ohne Glukose) umgestellt. Auch hier erfolgte der Mediumsaustausch alle drei Tage. Wie in Abb. 5.11 zu sehen ist, konnten sowohl der Wildtyp als auch die *snrk1α1/α2*-Mutante mit Glukose schneller und besser wachsen sowie frühzeitig einen Photosyntheseapparat entwickeln. Außerdem war zu sehen, dass sich der Wildtyp nach einmaliger Glukosegabe (für 3 Tage) normal entwickelte. Er benötigte jedoch deutlich länger für das Wachstum als der Wildtyp dem wiederholt Zucker verabreicht wurde. Die einmalige Supplementierung mit Glukose sorgte bei der *snrk1α1/α2*-Mutante für kein weiteres Wachstum. Diese Mutantenpflanzen wiesen mit fortschreitender

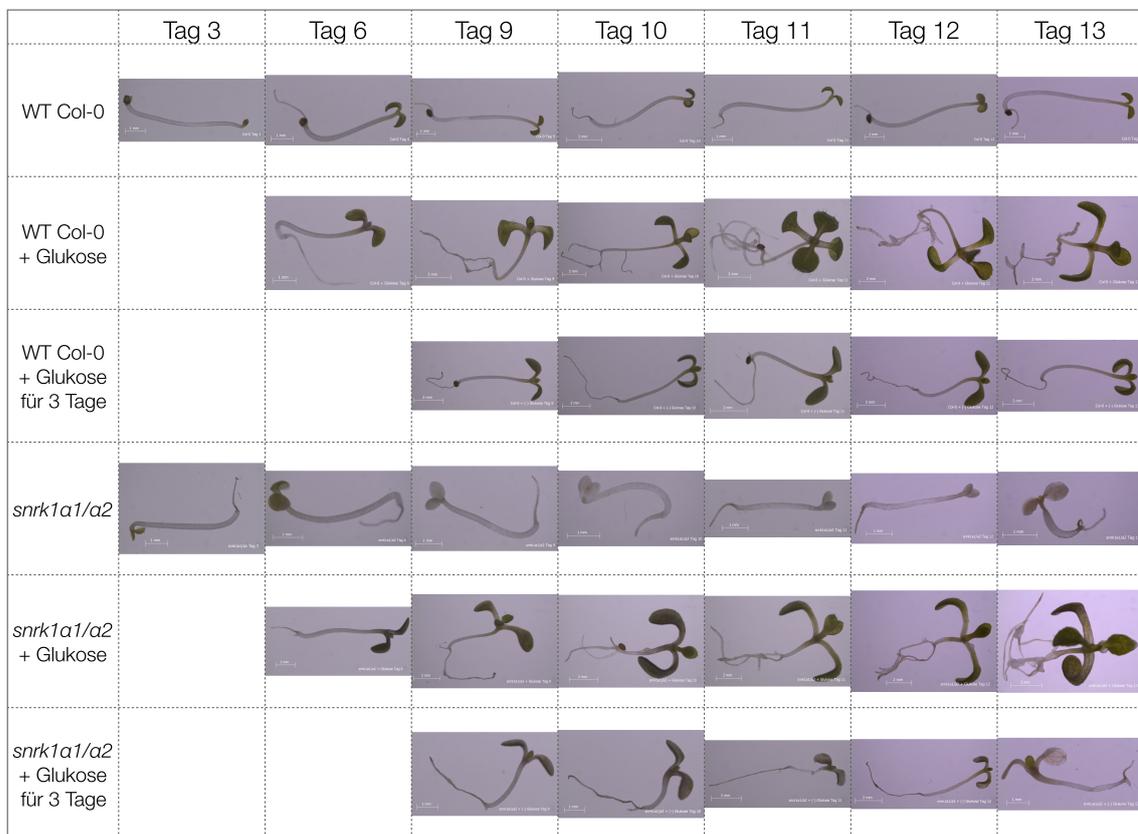


Abbildung 5.11 – Einmalige Glukosefütterung reicht nicht für das Überleben von *snrk1α1/α2*-Keimlingen. In Flüssigkultur angezogene Keimlinge wurden entweder gar nicht (Zeilen 1 und 4), konstant an den Tagen 3, 6, 9 und 12 (Zeilen 2 und 5) oder einmalig an Tag 3 mit 3% Glukose gefüttert (Zeilen 3 und 6). Der Wildtyp ist in den Zeilen 1-3 abgebildet, Keimlinge der *snrk1α1/α2*-Mutante in den Zeilen 4-6. Repräsentative Bilder wurden am Ende der Nacht aufgenommen. Unabhängige Testreihen lieferten vergleichbare Ergebnisse.

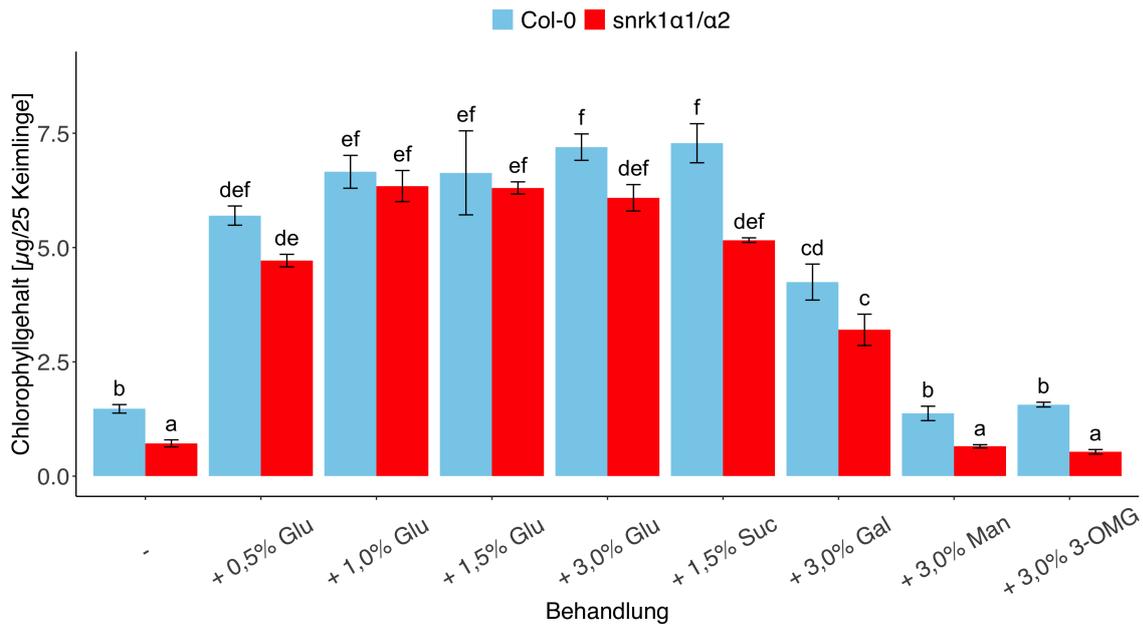


Abbildung 5.12 – Fütterung mit verschiedenen metabolisierbaren Zuckern rettet die *snrk1α1/α2*-Mutante. Je Probe wurden 25 Keimlinge wurden am Ende der Nacht geerntet. Glukose (Glu) wurde in Konzentrationen von 0,5 %, 1,0 %, 1,5 % und 3,0 % eingesetzt. Saccharose (Suc) wurde mit 1,5 % eingesetzt. Galaktose (Gal), Mannitol (Man) und 3-Orthomethylglukose (3-OMG) wurden jeweils mit 3,0 % Endkonzentration eingesetzt. Der Wildtyp ist blau, die *snrk1α1/α2*-Mutante rot dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

Dauer hellere Kotyledonen auf und wuchsen deutlich langsamer als vergleichbare Pflanzen mit konstanter Glukose-Supplementierung. Zum Schluss hatten Pflanzen mit einmaliger Glukosegabe kein Chlorophyll mehr in den Kotyledonen und waren farblos. Daher ist eine dauerhafte Glukosegabe notwendig, um die Pflanze zu retten. Als nächstes wurde untersucht, ob die Rettung des Phänotyps nur durch Glukose erfolgen kann oder ob andere Kohlenhydrate dafür ebenfalls geeignet sind. Dazu war der Versuchsablauf weitgehend identisch mit dem für Glukose. Anstelle von Glukose wurden jedoch andere Kohlenhydrate verwendet. Für die Vergleichbarkeit wurde der Chlorophyllgehalt als Messgröße herangezogen, der die Keimlingsentwicklung im Licht widerspiegelt. Die Fütterungsversuche (Abb. 5.12) zeigten deutlich, dass Glukose konzentrationsunabhängig im Bereich von 0,5 %- 3,0 % ausreichte, um den Chlorophyllgehalt in der *snrk1α1/α2*-Mutante auf das Niveau des Wildtyps zu bringen. Einen ähnlichen Chlorophyllgehalt wie mit Glukose erreichte man mit der Gabe von Saccharose als Energieträger. Etwas geringer fiel der Chlorophyllgehalt dagegen bei der Gabe von Galaktose aus, obwohl auch hier ein signifikanter Anstieg

gegenüber der Kontrolle erreicht wurde. Bei den osmotischen Kontrollen mit Mannitol und dem nicht metabolisierbaren Zucker 3-Orthomethylglukose (Cortes *et al.*, 2003) wurde dagegen keine Veränderung zur Kontrolle festgestellt. Somit sind metabolisierbare Zucker in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen notwendig, um ein Ergrünen der Kotyledonen (Zunahme des Chlorophyllgehalts) zu ermöglichen. Demnach handelt es sich bei den *snrk1 α 1/ α 2*-Pflanzen um einen metabolischen Block, der für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist.

5.4.2 Fütterung mit weiteren Metaboliten

Neben Kohlenhydraten können auch Fette/Öle den Samen mit Energie versorgen. So wurden im folgenden Versuch Keimlinge mit Fettsäuren gefüttert (Pulsifer *et al.*, 2012). Dazu erfolgte die Anzucht der Keimlinge nach dem gleichen Schema wie bei der Gabe von Glukose. Allerdings wurde den Keimlingen Natriumoktanoat als Energieträger bereitgestellt. Wie in Abb. 5.13 zu sehen ist, war der Chlorophyllgehalt, als Marker für die Entwicklung im Licht, an Tag 3 bei den Proben identisch und

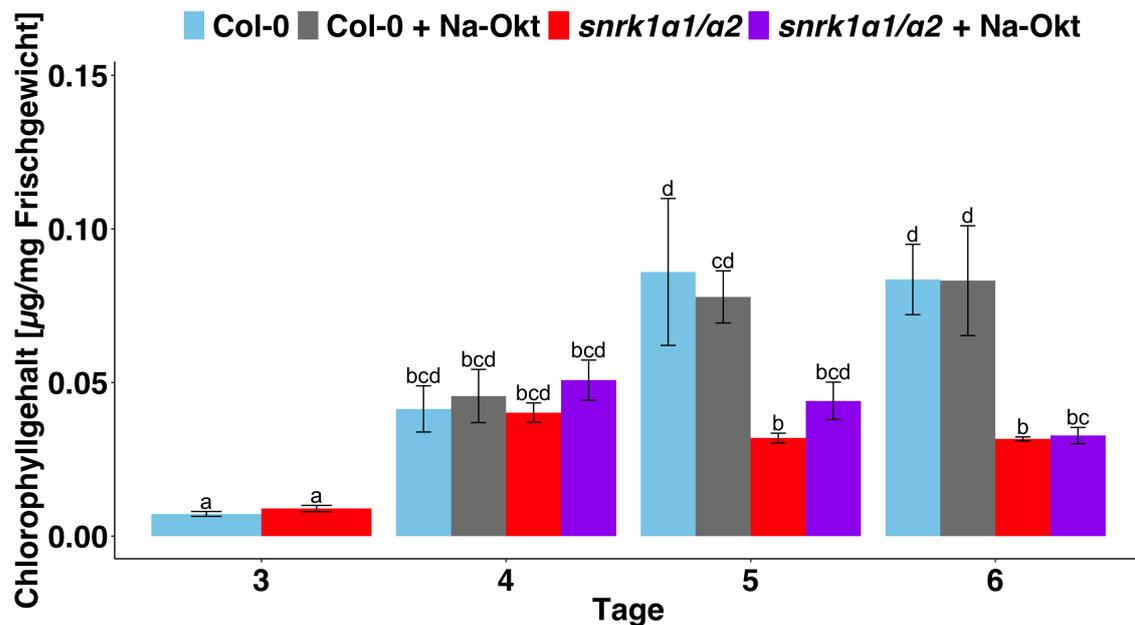


Abbildung 5.13 – Die Gabe kurzkettiger Fettsäuren supplementiert nicht den Mutantenphänotyp. Die Anzucht erfolgte gemäß dem Schema 5.1.1. Die Keimlinge wurden mit einer Konzentration von 100 μ M Na-Oktanoat gefüttert. Die Keimlinge wurden am Ende der Nacht geerntet. 25 Keimlinge bildeten dabei ein biologisches Replikat. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

stieg auch bis zu Tag 4 gleichmäßig über alle Proben hinweg an. Ab Tag 5 konnten nur noch die Wildtyppflanzen Chlorophyll aufbauen bzw. halten. In der *snrk1α1/α2* Mutante hingegen nahm der Chlorophyllgehalt an den Tagen 5 und 6 im Vergleich zu Tag 4 wieder ab. Sowohl beim Wildtyp als auch bei der *snrk1*-Mutante zeigte sich zwischen den *mock*-Kontrollen und den mit Natriumoktanoat gefütterten Keimlingen kein Unterschied.

Wie in der Einleitung beschrieben können auch extern applizierte Aminosäuren als Energiequelle fungieren (Pedrotti *et al.*, 2018). So wurden alle biogenen Aminosäuren (Ala, Arg, Asp, Asn, Cys, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr und Val) einzeln gelöst und den Keimlingen anstelle von Zuckern und Fettsäuren gegeben. Die Keimlinge wurden für drei weitere Tage im Klimaschrank kultiviert, am Ende des sechsten Tages geerntet und der Chlorophyllgehalt bestimmt. Durch das Zusetzen von Aminosäuren zum MS-Medium sollten die Pflanzen als Marker für die Entwicklung mehr Chlorophyll produzieren. Abb. 5.14 zeigt jedoch

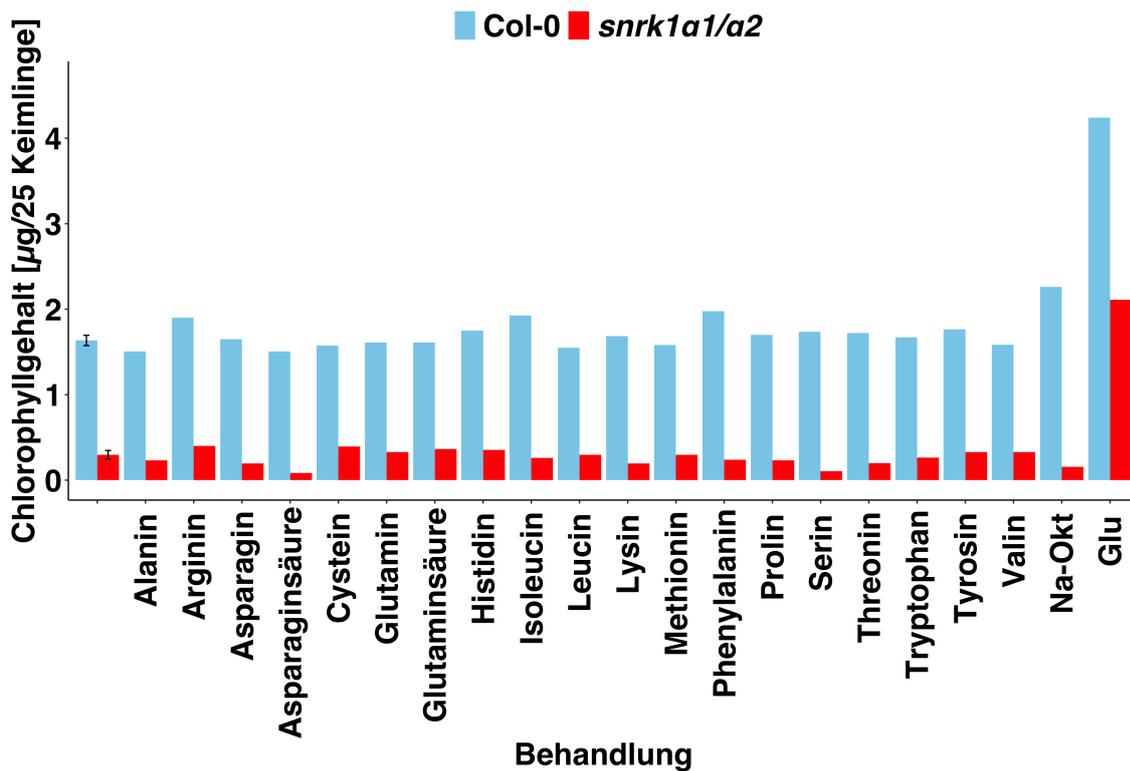


Abbildung 5.14 – Supplementierung von Aminosäuren rettet nicht den Phänotyp in der *snrk1α1/α2*-Mutante. Die Keimlinge wurden nach dem Schema 5.1.1 angezogen und mit Aminosäuren, Na-Oktanoat (je 10 µM) oder Glukose (3%) gefüttert. Die Keimlinge wurden am Ende der Nacht geerntet. 25 Keimlinge bildeten das biologische Replikat.

einen stabilen Chlorophyllgehalt von ca. $1,6 \mu\text{g}$ bei 25 Keimlingen im Wildtyp und von ca. $0,3 \mu\text{g}$ bei *snrk1 α 1/ α 2*-Mutanten. Allerdings führte die Gabe von Asparaginsäure, Serin und Natriumoktanoat in der Mutante zu einem verringertem Chlorophyllgehalt, während dieser im Wildtyp unverändert blieb. Die Positivkontrolle mit Glukose zeigte wie erwartet einen Anstieg des Chlorophyllgehalts, und zwar von $1,6$ auf $4,2 \mu\text{g}$ im Wildtyp und von $0,3$ auf $2,0 \mu\text{g}$ in der SnRK1-Mutante.

Nachdem die Fütterung mit den primären Energieträgern bis auf Kohlenhydrate erfolglos war, wurden den Keimlingen zentrale Metabolite des Energiestoffwechsels angeboten. Hier erfolgte die Anzucht analog zum bisherigen Verlauf. Nach dem dritten Tag wurde den Keimlingen PEP oder Oxalacetat (je $10 \mu\text{M}$) als Energiequelle gegeben. Abb. 5.15 zeigt den Chlorophyllgehalt als Marker für die Keimlingsentwicklung im Licht.

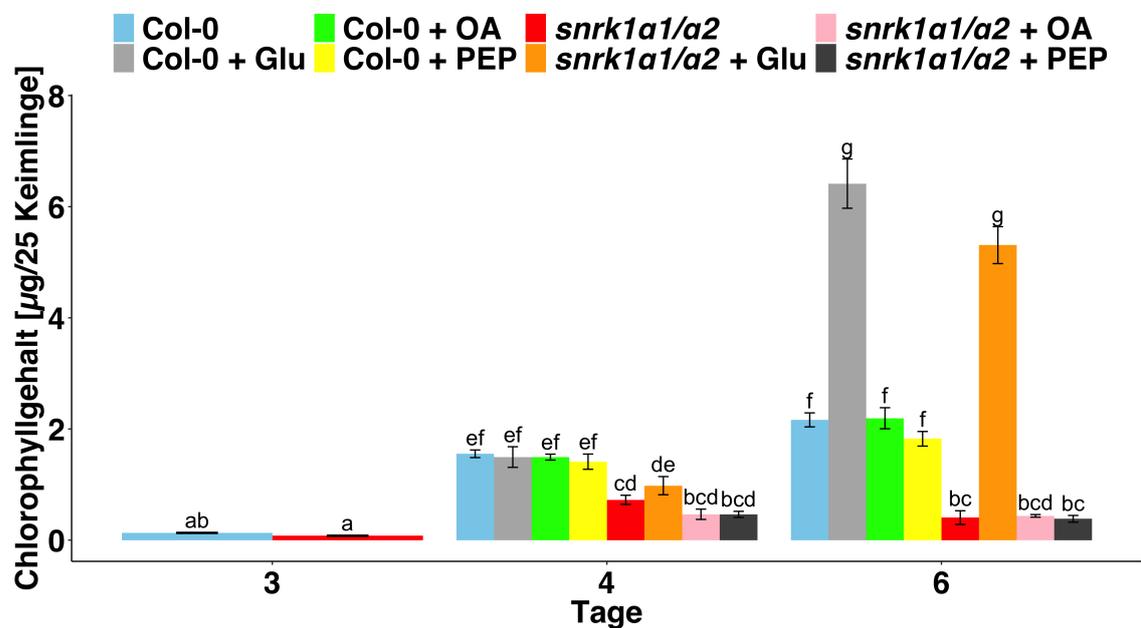


Abbildung 5.15 – Oxalacetat und PEP als zentrale Metabolite des Energiestoffwechsels können den Phänotyp der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante nicht retten. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte nach dem Schema 5.1.1. Oxalacetat und PEP wurden in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ eingesetzt, Glukose als Positivkontrolle mit 3%. Die Keimlinge wurden am Ende der Nacht geerntet. 25 Keimlinge bildeten dabei ein biologisches Replikate. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

Die Fütterungsexperimente mit Aminosäuren, Fettsäuren und den zentralen Metaboliten führten zu keiner Rettung des Mutanten-Phänotyps. Somit war nur die Supplementierung mit Kohlenhydraten erfolgreich.

5.4.3 Wie verändert die Gabe von Glukose die Genexpression in *snrk1 α 1/ α 2*-Mutanten?

Nachdem Glukose erfolgreich den Phänotyp retten konnte, wurde eine RNA-Sequenzierung mit wildtypischen und *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen durchgeführt. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte analog zum Schema 5.1.1 mit der Gabe von Glukose nach dem dritten Tag. Die Ernte der Pflanzen im Licht und im Dunkeln erfolgte 24 Std. später.

Abb. 5.16 zeigt das Histogramm der veränderten Genexpression von Wildtyp und *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante. Die Gabe von Glukose führte zu einer deutlich veränderten Genexpression in den Keimlingen. So glichen die Expressionsmuster der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante denen des Wildtyps im Dunkeln (4dD) bzw. im Licht (3dD+1dL) sehr. Sowohl im Dunkeln als auch im Licht wurden große Gencluster ähnlich induziert bzw. reprimiert. Diese genomweite, molekulare Analyse unterstützt die Hypothese, dass Glukose-Gabe die Keimlingsentwicklung der Mutante weitestgehend an der des Wildtyps angleichen kann.

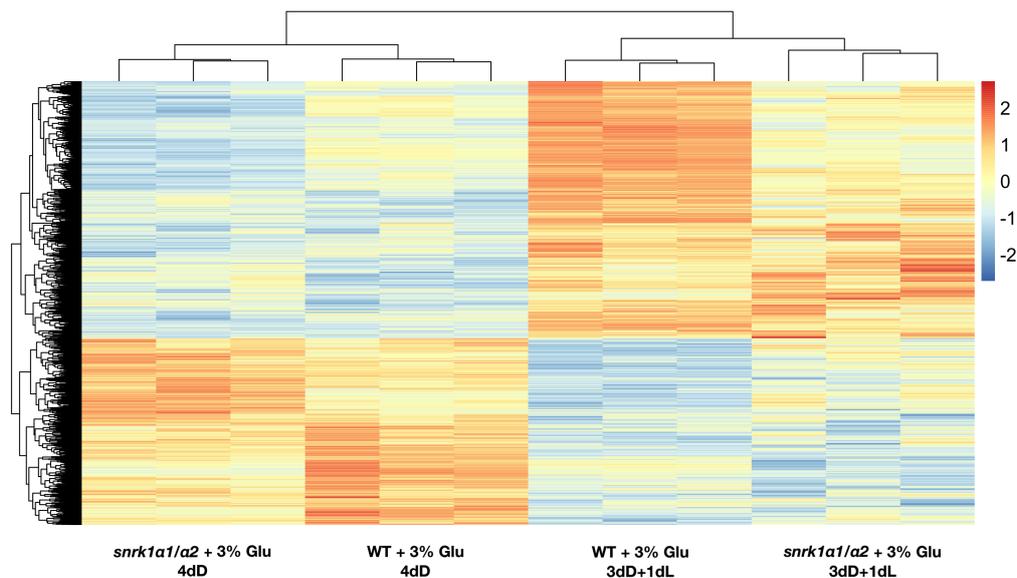


Abbildung 5.16 – Glukose verändert die Genexpression in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante. Hierarchische Clusterung von Genen mit unterschiedlicher Expression zwischen den Proben (p-Value von $\leq 0,05$). Der Wildtyp ist mit WT angegeben, die Mutante mit *snrk1 α 1/ α 2*. Auf der x-Achse sind die zusammengefassten Replikate für die jeweiligen Bedingungen angegeben (4dD für 4 Tage konstante Dunkelheit, 3dD+1dL für 3 Tage konstante Dunkelheit und 1 Tag unter Normalbedingungen (12 Std. Licht/12 Std. Dunkelheit)). Induzierte Gene sind rot angegeben, reprimierte Gene blau. Auf der linken und oberen Seite befinden sich die geclusterten Gene bzw. hierarchisch zusammengehörende Proben.

5.5 Metabolische Analysen zur Nutzung von Speicherstoffen in der *snrk1α1/α2*-Mutante während der Keimung

5.5.1 Untersuchung des Abbaus von TAGs während der Keimung

In den Fütterungsversuchen konnte gezeigt werden, dass es bei der Mobilisierung von Speicherstoffen einen metabolischen Block gibt. Da TAGs den wichtigsten Energieträger in ölhaltigen Pflanzen darstellen, wurden diese als erstes untersucht, um herauszufinden ob hier Unterschiede im Abbau zwischen der Mutante und dem Wildtyp vorliegen. Dazu wurden jeweils 25 Samen pro Probe verwendet und nach dem Schema 5.1.1 angezogen. Die Ernte erfolgte jeweils am Ende der Nacht bzw. der Stratifikationsphase. Zusätzlich wurden trockene Samen untersucht. Abb. 5.17 zeigt die Veränderungen des TAG-Gehalts während der Keimung. In der ersten Phase der

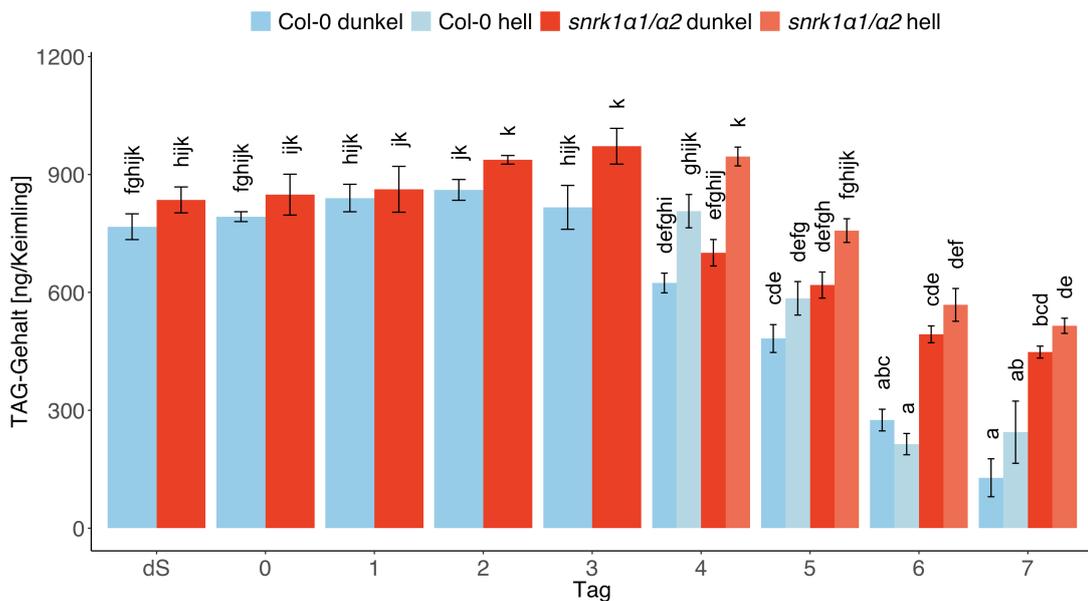


Abbildung 5.17 – Der TAG-Gehalt nimmt in den Keimlingen mit der Zeit ab. Die Keimlinge wurden nach dem Schema 5.1.1 angezogen und am Ende der Nacht geerntet. 25 Samen bzw. Keimlinge bildeten dabei ein biologische Replikat. Keimlinge, die nach 3 Tagen ins Licht gestellt wurden, sind in hellen Farben (hellblau für Col-0; hellrot für *snrk1α1/α2*-Keimlinge) dargestellt. Die entsprechenden Pflanzen im Dunkeln sind in dunklen Farben abgebildet (blau für Col-0 und rot für *snrk1α1/α2*-Keimlinge). Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

Keimung von trockenen Samen (dS, dry Seeds) bis zum Ende des dritten Tages blieb der TAG-Gehalt sowohl im Wildtyp als auch in der *snrk1*-Mutante konstant. Ab dem vierten Tag nahm der TAG-Gehalt in den Keimlingen ab. Den stärksten Rückgang verzeichnete dabei der Wildtyp im Dunkeln, gefolgt vom Wildtyp im Licht, welcher aber nicht signifikant war. Bei den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen nahm der TAG-Gehalt zwar ebenfalls ab, jedoch fiel die Abnahme signifikant geringer als im Wildtyp aus. Weitere kleine, nicht signifikante Unterschiede gab es unabhängig vom Licht. Somit ist SnRK1 für den Abbau von TAGs verantwortlich und damit entscheidend an der Keimlingsentwicklung beteiligt.

Schaut man sich die Zusammensetzung der TAGs genauer an, so erhöhte sich mit zunehmender Keimungsdauer die Anzahl der mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Vor allem TAGs mit 52 Kohlenstoffatomen wiesen an den letzten Tagen (5 - 7) deutlich mehr ungesättigte Fettsäuren auf als zu Beginn des Experiments (vgl. Anhang. A.4). Das bedeutet, dass der Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren SnRK1-abhängig inhibiert ist.

5.5.2 Analyse der Mobilisierung von Kohlenhydraten während der Keimung

Neben den Fettsäuren stellen auch kohlenhydrathaltige Verbindungen wie Zucker eine wichtige Energiequelle dar. Die Aufreinigung der Proben erfolgte wie im Protokoll 4.4.1 Abschnitt 4.4.1.2 beschrieben. Abb. 5.18 zeigt den Gesamtgehalt an Zuckern während der Keimung. Der Gesamtzuckergehalt unterschied sich im Samen nicht zwischen dem Wildtyp und der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante und blieb mit ca. 300 ng je Keimling sowohl in trockenen Samen als auch nach der Stratifikation konstant (Abb. 5.18). Im weiteren Verlauf der Keimung nahm der Gesamtzuckergehalt in beiden Pflanzenlinien ab. Keimlinge, die in der Dunkelphase geerntet wurden, wiesen keinen Unterschied zwischen der Mutante und dem Wildtyp auf. Nach der Inkubation der Wildtyppflanzen im Licht veränderte sich die Gesamtkonzentration an Zucker leicht nach unten. Bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen veränderte sich der Zuckergehalt in Dunkelheit nicht und war auf einem vergleichbaren Gehalt mit den Wildtyppflanzen im Licht. Erfolgte allerdings nach 3 Tagen die weitere Inkubation im Licht, so wurden mit fortschreitender Dauer (Tag 4 - Tag 7) immer weniger Kohlenhydrate in den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen gemessen. Am 7. Tag waren diese fast nicht mehr vorhanden, obwohl Licht für die Photosynthese zur Verfügung gestanden

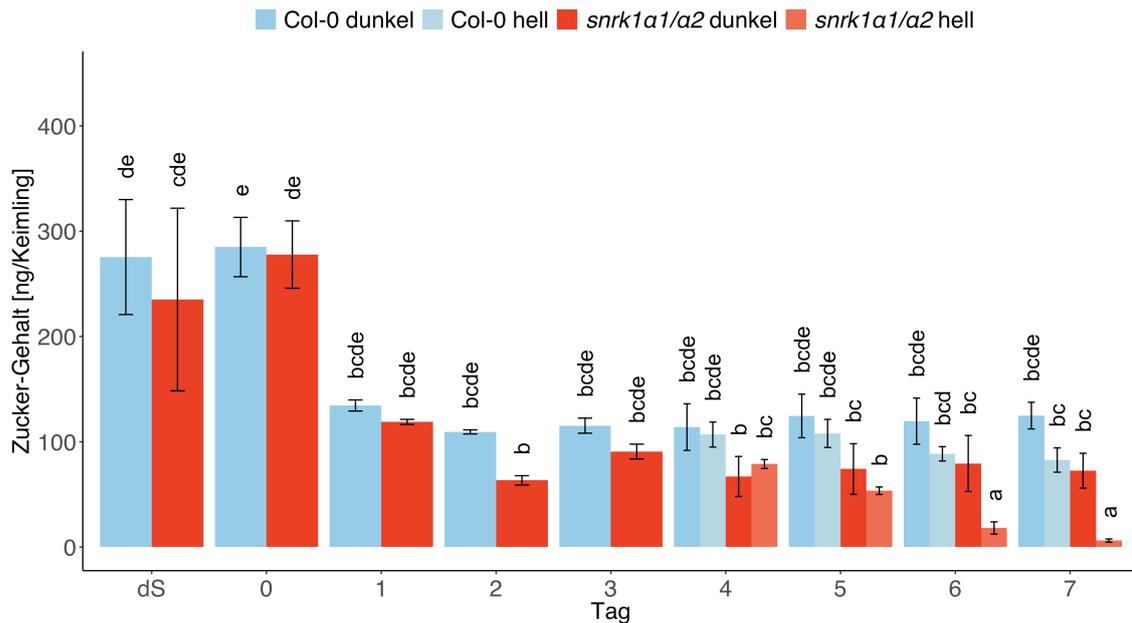


Abbildung 5.18 – Der Gesamtzucker-gehalt verhält sich im Wildtyp und in der *snrk1α1/α2*-Mutante ähnlich. Die Keimlinge wurden nach dem Schema 5.1.1 angezogen und am Ende der Nacht geerntet. 25 Samen bzw. Keimlinge bildeten dabei ein biologische Replikat. Keimlinge, die nach 3 Tagen ins Licht gestellt wurden, sind in hellen Farben (hellblau für Col-0; hellrot für *snrk1α1/α2*-Keimlinge) dargestellt. Die entsprechenden Pflanzen im Dunkeln sind in dunklen Farben abgebildet (blau für Col-0 und rot für *snrk1α1/α2*-Keimlinge). Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

hatte. Die Glykolyse ist somit nicht SnRK1-abhängig reguliert. Zusammen mit den Supplementierungsversuchen mit Zuckern zeigt dies, dass der Zuckermetabolismus unabhängig von SnRK1 reguliert wird und die Pflanzen bei der Keimlingsentwicklung auf diese Energieressourcen zurückgreifen können.

Eine genauere Betrachtung der einzelnen Zucker (Abb. 5.19) zeigte deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung und im zeitlichen Verlauf. In den Proben von trockenen Samen und Keimlingen an Tag 0 wurde hauptsächlich Saccharose nachgewiesen. Die Menge an Saccharose entspricht dabei zum Großteil dem Gesamtzucker-gehalt zu diesen Zeitpunkten. Im weiteren Verlauf nahm der Saccharosegehalt sowohl im Wildtyp als auch in der *snrk1α1/α2*-Mutante fast identisch ab. Somit wurde Saccharose in beiden Pflanzenlinien gleich genutzt, was auf einen SnRK1-unabhängigen Stoffwechsel hindeutet. Lediglich im Wildtyp wurde die Abnahme des Saccharose-gehalts unter Lichtausschluss gestoppt und blieb im weiteren Verlauf der Keimung konstant. Erfolgte die Inkubation der Keimlinge (WT und *snrk1α1/α2*) im Licht, nahm dagegen die Saccharosemenge mit fortschreitender Keimungsdauer weiter ab.

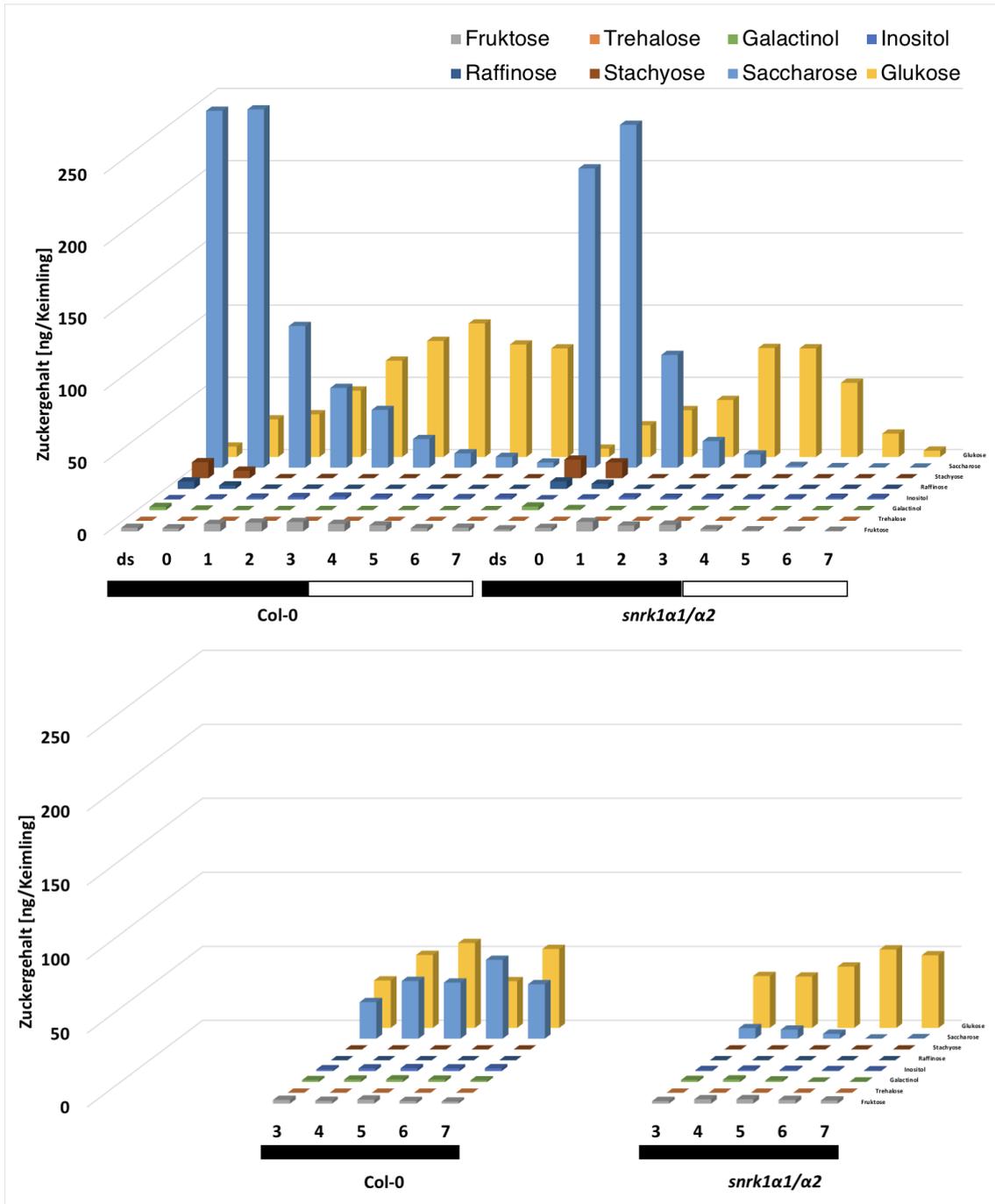


Abbildung 5.19 – Die quantitative Zuckerzusammensetzung unterscheidet sich zwischen dem Wildtyp und der *snrk1*-Mutante. Die Keimlinge wurden nach 3 Tagen ins Licht gestellt (weißer Balken) bzw. wurden über die gesamte Dauer des Versuchs in Dunkelheit gehalten (schwarzer Balken). Die gemessenen Komponenten sind wie folgt dargestellt: Saccharose (hellblau), Trehalose (orange), Fructose (grau), Glukose (gelb), Inositol (blau), Galactinol (grün), Raffinose (dunkelblau) und Stachyose (braun). Die Keimlinge wurden am Ende der Nacht geerntet. 25 Keimlinge bildeten dabei ein biologisches Replikate. Es wurden je drei biologische Replikate verwendet.

Neben Raffinose, Stachyose und Galactinol ist auch Glukose in trockenen Samen nur in sehr geringen Konzentrationen messbar. So stieg der Gehalt von Glukose sowohl im Wildtyp als auch in der *snrk1*-Mutante kontinuierlich an. Wildtyppflanzen erreichten ihr Maximum an Tag 5 im Licht und nahmen danach wieder leicht ab. Keimlinge der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante erreichten ihren maximalen Glukosegehalt an Tag 3, bei Inkubation im Licht nahm der Glukosegehalt danach gleichmäßig bis Tag 7 ab. In Dunkelheit schwankte die Menge an Glukose um ca. 50 ng/Keimling zwischen Tag 3 und Tag 7 unabhängig davon, ob es sich um Wildtyp- oder *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlinge handelte. Der Gehalt an Fruktose war über den gesamten Zeitraum sehr gering und wurde erst ab Tag 1 gemessen. Beim Abbau von einem Molekül Saccharose entstand je ein Molekül Glukose und ein Molekül Fruktose, welches vermutlich zu Glukose umgewandelt wurde. Daher war der Fruktosegehalt über den Untersuchungszeitraum sehr gering. Weiter wurden Stachyose, Raffinose und Galactinol nur in trockenen Samen (dS) und an Tag 0 gemessen, wobei die Menge sehr gering war und es keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante gab.

5.5.3 Vergleich der Aminosäuregehalte in WT und *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen

Als weitere Energiequelle stehen den Pflanzen während der Keimung Aminosäuren zur Verfügung. Diese werden entweder de novo synthetisiert oder durch Abbau von Samenspeicherproteinen gebildet. Abb. 5.20 zeigt die SDS-PAGE von Samenspeicherproteinen während der ersten Tage der Keimung, welche durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht wurden. In beiden Pflanzenlinien waren Albumine und Globuline (saure und basische) als Samenspeicherproteine vorhanden (Abb. 5.20). Während die basischen Globuline im Wildtyp von trockenen Samen hin zu Keimlingen an Tag 3 deutlich abnahmen, war im gleichen Zeitraum bei Proben der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante keine Abnahme sichtbar. Saure Globuline waren in trockenen Samen und Samen an Tag 0 ebenfalls vorhanden, nahmen danach ab und waren ab Tag 2 nicht mehr vorhanden. Bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen waren dagegen saure Globuline von trockenen Samen bis zu Keimlingen an Tag 2 konstant und erst an Tag 3 erfolgte ein Abbau dieser. Albumine waren nur in trockenen Samen des Wildtyps nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten Albumine in *snrk1 α 1/ α 2*-Pflanzen die gesamte Zeit über nachgewiesen werden. Zur weiteren Analyse der Aminosäuren wurden die beiden

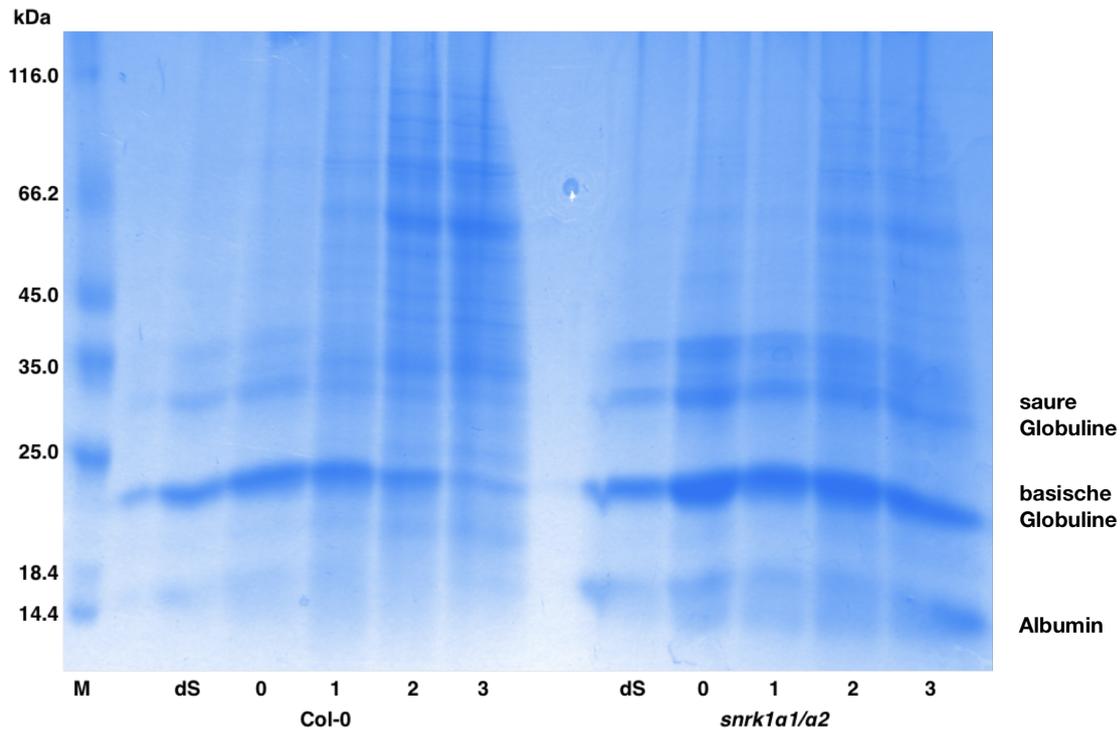


Abbildung 5.20 – Der Abbau von Samenspeicherproteinen ist in der *snrk1*-Mutante verlangsamt. Die Anzucht der Samen bzw. Keimlinge erfolgte nach Protokoll 5.1.1. Am Ende der Nacht wurden die Keimlinge geerntet, die Proteine mit Harnstoffextraktionspuffer extrahiert und mit einem 12%-iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Anfärbung der Banden erfolgte mit Coomassie-Blau. Aufgetragen sind der Proteingrößenstandard (M), trockene Samen (dS) und Keimlinge nach 0, 1, 2 und 3 Tagen, jeweils für den Wildtyp (Col-0) und die Mutante *snrk1 α 1/ α 2*. Albumine befinden sich auf einer Höhe von ca. 14 kDa, basische Globuline bei ca. 23 kDa und saure Globuline bei ca. 31 kDa.

Genotypen massenspektrometrisch untersucht. Dazu wurden die Proben nach dem Protokoll 4.4.1.3 (Kapitel 4.4.1) aufgereinigt. In Abb. 5.21 ist der Gesamtaminosäuregehalt während der Keimung dargestellt. Im trockenen Samen wurden kaum freie Aminosäuren gemessen. Mit fortschreitender Dauer konnten immer mehr freie Aminosäuren gemessen werden (Tag 2). Danach stieg der Aminosäuregehalt bei wildtypischen Pflanzen weiter an bis zum Maximum an Tag 5 im Licht. Anschließend blieb er auf einem hohen Niveau von ca. 400 nmol/Probe. Auch *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlinge zeigten an Tag 2 und 3 einen stabilen Aminosäuregehalt, welcher vergleichbar mit dem Wildtyp war. Während der Aminosäuregehalt im Wildtyp weiter anstieg, war der Gehalt in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen bis Tag 5 weiterhin konstant und nahm bis zu Tag 7 stark ab. In Dunkelheit betrug der Aminosäuregehalt von Wildtyp-Keimlingen von Tag 4 bis Tag 7 konstant etwa 200 nmol/Probe. Mutanten-Keimlinge dagegen verwerteten freie Aminosäuren schneller, sodass ab Tag 4 der Gehalt kontinuierlich

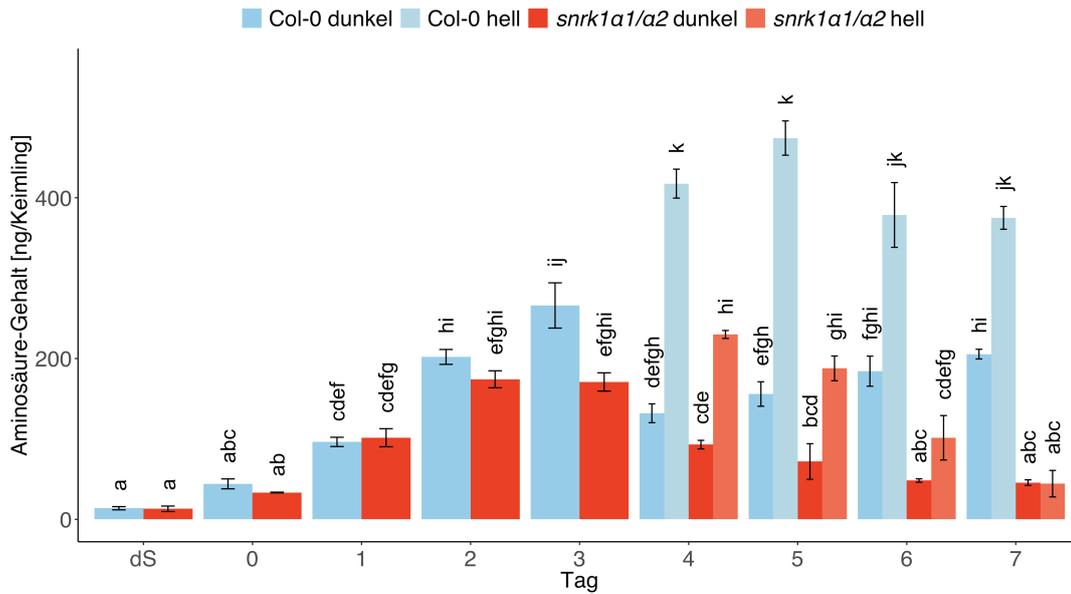


Abbildung 5.21 – Der Gesamtamino­säuregehalt unterscheidet sich im Verlauf der Keimung zwischen Wildtyp und *snrk1α1/α2*-Mutante. Die Keimlinge wurden nach dem Schema 4.5.2 angezogen und am Ende der Nacht geerntet. 25 Samen bzw. Keimlinge bildeten dabei ein biologische Replikat. Keimlinge, die nach 3 Tagen ins Licht gestellt wurden, sind in hellen Farben (hellblau für Col-0; hellrot für *snrk1α1/α2*-Keimlinge) dargestellt. Die entsprechenden Pflanzen im Dunkeln sind in dunklen Farben abgebildet (blau für Col-0 und rot für *snrk1α1/α2*-Keimlinge). Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

bis Tag 7 abnahm. Schaute man sich die Aminosäurezusammensetzung im Detail an, so wurden deutliche Unterschiede in der Komposition der Aminosäuren festgestellt (Abb. 5.22). Wie schon bei der Zuckeranalyse gab es auch hier deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *snrk1*-Mutante. So waren die beiden Aminosäuren Glutamin und Asparagin in beiden Genotypen stark vertreten. Im Wildtyp nahm der Gehalt von Glutamin ab Tag 0 stark zu und erreichte an Tag 5 im Licht sein Maximum (ca. 250 nmol/Probe). An den letzten beiden Tagen ging der Gehalt auf etwa 150 nmol/Probe zurück. In *snrk1α1/α2*-Keimlingen erreichte Glutamin seinen Höhepunkt bereits an Tag 4 (140 nmol/Probe) und fiel danach im Licht stark ab auf 13 nmol/Probe an Tag 7. In Dunkelheit lag der Glutamingehalt in Wildtyp-Keimlingen bei einer konstanten Menge von etwa 50 nmol/Probe bis zu Tag 7. Der Glutamingehalt in *snrk1α1/α2*-Keimlingen bei Dunkelheit war dagegen deutlich geringer und nahm bis zu Tag 7 sogar noch weiter ab. Asparagin war ebenfalls ab Tag 0 messbar, nahm kontinuierlich in Keimlingen des Wildtyps zu und erreichte sowohl im Licht als auch bei Dunkelheit das Maximum an Tag 7 bei etwa 75 nmol/Probe.

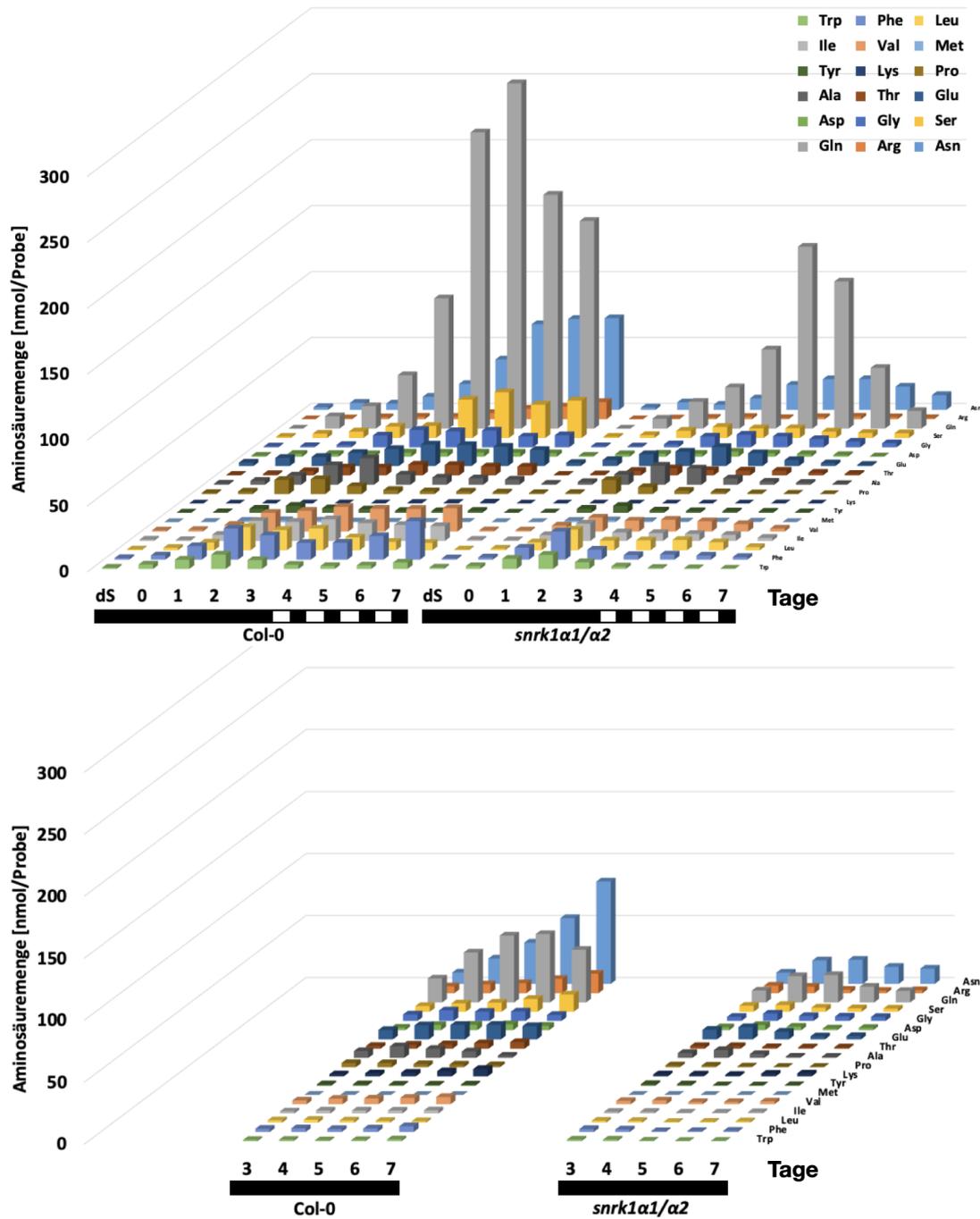


Abbildung 5.22 – Die quantitative Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich deutlich zwischen dem Wildtyp und der *snrk1*-Mutante. Die Samen/Keimlinge wurden nach 3 Tagen ins Licht gestellt (weißer Balken) bzw. wurden über die gesamte Dauer des Versuchs in Dunkelheit gehalten (schwarzer Balken). Die gemessenen Komponenten sind wie folgt dargestellt: Tryptophan (hellgrün), Phenylalanin (blau), Leucin (gelb), Isoleucin (hellgrau), Valin (orange), Methionin (hellblau), Tyrosin (dunkelgrün), Lysin (dunkelblau), Prolin (braun), Alanin (dunkelgrau), Threonin (rotbraun), Glutaminsäure (dunkelblau), Asparaginsäure (hellgrün), Glycin (blau), Serin (gelb), Glutamin (hellgrau), Arginin (orange) und Asparagin (hellblau). Die Keimlinge wurden am Ende der Nacht geerntet. 25 Keimlinge bildeten dabei ein biologisches Replikat. Es wurden je drei biologische Replikate verwendet.

Bei Proben der Mutante *snrk1 α 1/ α 2* nahm Asparagin ebenfalls von Tag 0 an zu und hatte sowohl im Licht als auch in Dunkelheit sein Maximum an Tag 4 bei etwa 25 nmol/Probe. Danach nahm der Gehalt wieder leicht ab. Die Aminosäuren Serin und Arginin nahmen in wildtypischen Proben von Tag 1 an Menge zu und erreichten ihr Maximum an Tag 5 bzw. Tag 7 im Licht. Bei Dunkelheit hatten sowohl Serin als auch Arginin ihr Maximum an Tag 7. Die beiden Aminosäuren wurden bei *snrk1 α 1/ α 2*-Proben dagegen über den gesamten Keimungsverlauf kaum gemessen. Die verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin sowie die Aminosäure Phenylalanin zeigten einen ähnlichen Verlauf. Sie nahmen ab Tag 1 an Gehalt zu. In wildtypischen Keimlingen blieb diese Menge auf einem stabilen Niveau von etwa 20 nmol/Probe im Licht. Einzige Ausnahme war Leucin, dessen Gehalt gegen Ende der Versuchsreihe wieder abnahm. Bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen wurde der größte Gehalt dieser Aminosäuren an Tag 2 gemessen. Danach nahm ihr Gehalt schnell ab und ging an Tag 7 gegen 0 nmol/Probe. In Dunkelheit dagegen war die Menge der Aminosäuren sowohl im Wildtyp als auch in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante über die gesamte Dauer sehr niedrig. Alle weiteren Aminosäuren konnten in den untersuchten Proben gemessen werden, jedoch ohne wesentliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante.

Daraus folgt, dass in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen die Samenspeicherproteine langsamer abgebaut werden und somit erst später freie Aminosäuren verfügbar sind. Durch den Abbau von Samenspeicherproteinen sollten alle Aminosäuren vorkommen, nicht nur hohe Gehalte von Asparagin und Glutamin, die als Transportformen des Stickstoff gelten und für das Überleben der Pflanze wichtig sind. Somit wird sowohl der Abbau von Samenspeicherproteinen als auch die Degradation von Aminosäuren SnRK1-abhängig reguliert und ist für eine erfolgreiche Keimlingsentwicklung nötig.

5.6 Genomweiter Vergleich der Genexpression in WT und *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen während der Keimlingsentwicklung

Mit einem Zeitreihenexperiment zur Genexpression sollen Gene identifiziert werden, die im Vergleich von Wildtyp und Mutante SnRK1-abhängig reguliert werden. Da eine RNA-Sequenzierung über mehrere Zeitpunkte teuer ist, sollten zunächst Voruntersuchungen durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass auch eine

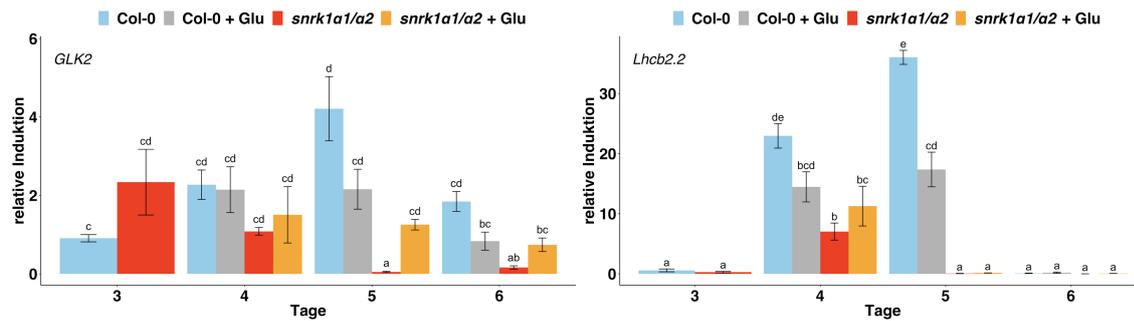


Abbildung 5.23 – Kontrolle der Expressionsanalyse in Keimlingen und Nachweis einer differentiellen Genexpression durch Analyse von Markergenen in Wildtyp und *snrk1α1/α2*-Mutante. qRT-PCR Analysen zeigten die Induktion ausgewählter Markergene im Wildtyp (blau), Wildtyp mit Glukose (grau), *snrk1α1/α2*-Mutante (rot) und *snrk1α1/α2*-Mutante mit Glukose (orange). Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die Statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

differentielle Genexpression im untersuchten Zeitraum vorliegt. Von der RNA einer jeden Probe wurde ein Teil von dieser genommen und damit eine cDNA-Synthese (siehe Absatz 4.2.4) durchgeführt. Abb. 5.23 zeigt dabei eine deutlich veränderte Genexpression bezogen auf den Wildtyp im Zeitraum von Tag drei bis Tag fünf. Nachdem in der *snrk1α1/α2*-Mutante die Markergene (*GLK2* und *LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING 2* (*LHCB2.2*)) nicht induziert wurden, konnte die RNA-Seq-Analyse durchgeführt werden.

5.6.1 Die *snrk1α1/α2*-Mutante zeigte eine massive differentielle Transkription im Vergleich zum WT

Ziel der RNA-Seq Analyse war die Identifizierung von Genen, die bei der Metabolisierung von Speicherstoffen SnRK1-abhängig reguliert wurden. Dazu wurden wildtypische und *snrk1α1/α2*-Keimlinge für drei Tage in Dunkelheit angezogen und anschließend entweder weiter bei kompletter Dunkelheit inkubiert (Abb. 5.25 A) oder nach dem dritten Tag ins Licht gestellt und unter Normalbedingungen (12 h Licht/12h Dunkelheit) inkubiert (Abb. 5.26 A). Die Ernte der Keimlinge erfolgte jeweils am Ende der Nacht (vgl. Pfeile bei Abb. 5.25 A bzw. 5.26 A). Die RNA-Sequenzierung von wildtypischen und *snrk1α1/α2*-Keimlingen zeigte während der Keimlingsentwicklung, dass es bei gleicher Gesamttranskriptmenge viele differentiell exprimierte Gene (DEGs) gibt (exemplarisch für komplette Dunkelheit Abb. 5.24). Exemplarisch wird hier nur der *smear plot* für den Datensatz bei kompletter Dunkelheit gezeigt. Dabei wurde eine große Anzahl an Genen *snrk1α1/α2*-abhängig

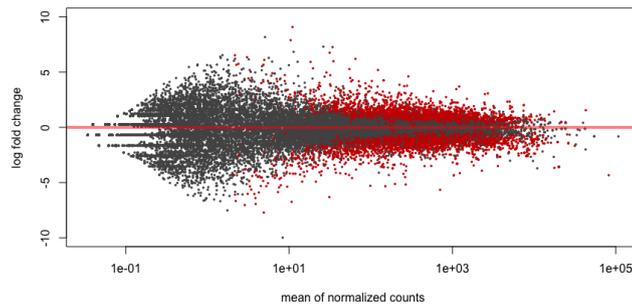


Abbildung 5.24 – Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression in *smear plots* von Wildtyp und *snrk1*-Mutante bei kompletter Dunkelheit. RNA-Seq Daten zeigen den Vergleich von WT und *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen in Dunkelheit. Mit RStudio und dem Paket dseq2 wurde der *smear plots* erzeugt, der signifikant differentiell exprimierte Gene (rot) mit einem $p_{\text{Adjust}} \leq 0,05$ (BH-Methode) zeigt. Schwarz-markierte Gene hingegen weisen keine differentielle Genexpression auf. Die differentiell exprimierten Gene sind als logFC (*FoldChange*) angegeben. logFC Werte > 0 entsprechen einer Induktion, logFC Werte < 0 einer Repression. Auf der x-Achse ist der Mittelwert der normalisierten Counts als Parameter für die absolute Expressionsstärke angegeben.

reguliert (rote Punkte). Viele Gene wiesen jedoch einen relativ geringen logFC-Wert auf, was auf eine geringe Änderung der Genexpression schließen lässt.

Betrachtet man die DEGs bei kompletter Dunkelheit im Detail, so konnten deutliche Unterschiede in der *snrk1 α 1/ α 2*-abhängigen Regulation festgestellt werden (Abb. 5.25). Durch die RNA-Seq Analyse konnte gezeigt werden, dass bei kompletter Dunkelheit insgesamt ca. 4500 Gene induziert wurden. Dabei wurden die meisten Gene (3055) an allen Tagen (3, 4 und 5) induziert und Gene, die nur an einem Tag induziert wurden, nahmen von Tag 3 hin zu Tag 5 ab. Dies bedeutet, dass man bei längerer Dunkelheit eine große Zahl an hochregulierten SnRK1-abhängigen DEGs findet. Ebenso wurden bei kompletter Dunkelheit ca. 4300 Gene reprimiert. Auch hier gab es eine deutliche Gemeinsamkeit für alle drei Tage (3012 Gene). Mit zunehmender Dauer wurden an Tag 5 die meisten Gene reprimiert (4341 Gene), was bedeutet, dass bei längerer Dunkelheit auch eine große Anzahl an Genen im Vergleich von Wildtyp und *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante reprimiert wird. Die großen Blöcke an gleich regulierten Genen waren auch in der *Heatmap* deutlich zu erkennen, welche zu Clustern zusammengefasst wurden. Dabei wurden Gene, die *snrk1 α 1/ α 2*-abhängig gleich reguliert waren, zusammen gruppiert. Ebenso bildeten Gene, die unterschiedlich reguliert wurden, gemeinsame Cluster. So ergaben sich 31 Cluster, bei denen die Gene SnRK1-abhängig ähnlich reguliert wurden. Aus diesen Cluster können so Ideen zur Metabolisierung von Speicherstoffen gewonnen werden.

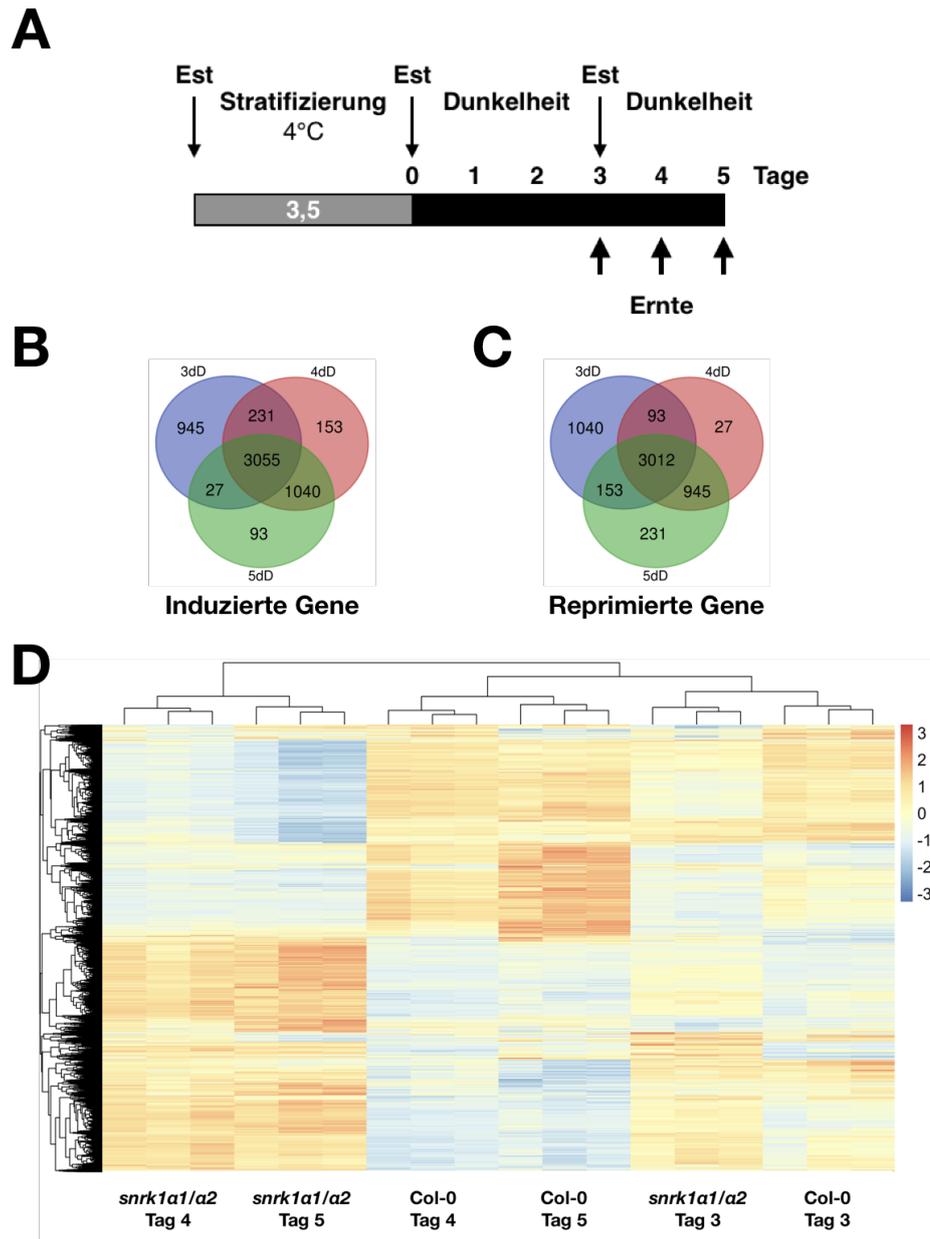


Abbildung 5.25 – Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression von Wildtyp und *snrk1α1/α2*-Mutante bei kompletter Dunkelheit. (A) Inkubationsschema für das RNA-Seq Experiment bei kompletter Dunkelheit. (B) Venn-Diagramm von induzierten DEG mit einem p-Value < 0,01 und einem logFC ≥ 2 . (C) Venn-Diagramm von *snrk1α1/α2*-abhängig reprimierten DEG mit einem p-Value < 0,01 und einem logFC ≤ 2 . (B + C) Die Tage sind farblich markiert: blau = 3 Tage, rot = 4 Tage, grün = 5 Tage. In Schnittmengen ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene angegeben, die an zwei oder mehr Tagen gefunden wurden. Die Anzahl an Genen, die spezifisch an einem Tag induziert wurden, ist in der Menge zu finden, die sich mit keiner anderen schneidet. (D) Hierarchische Clusterung von Genen mit unterschiedlicher Expression zwischen den Proben (p-Value < 0,05). Induzierte Gene sind rot, reprimierte Gene blau angegeben. Die logFC-Skala reicht von -3 bis 3. Hierarchische Cluster sind links für ähnlich regulierte Gene und oben für zusammen gehörende Proben.

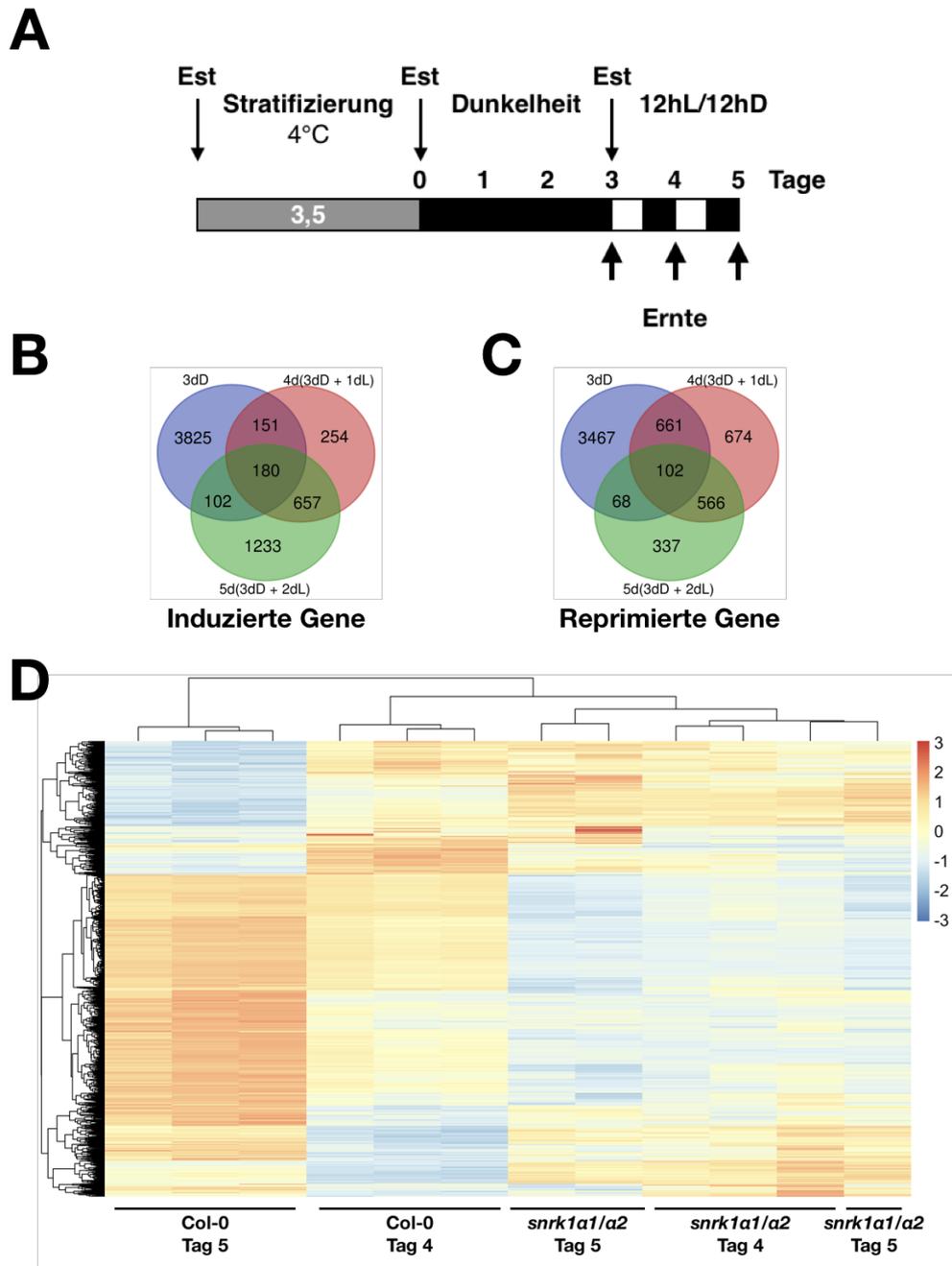


Abbildung 5.26 – Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression von Wildtyp und *snrk1α1/α2*-Mutante im Licht. (A) Inkubationsschema für das RNA-Seq Experiment im Licht. (B) Venn-Diagramm von induzierten DEG mit einem p-Value $< 0,01$ und einem $\log_{2}FC \geq 2$. (C) Venn-Diagramm von *snrk1α1/α2*-abhängig reprimierten DEG mit einem p-Value $< 0,01$ und einem $\log_{2}FC \leq -2$. (B + C) Die Tage sind farblich markiert: blau = 3 Tage, rot = 4 Tage, grün = 5 Tage. In Schnittmengen ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene angegeben, die an zwei oder mehr Tagen gefunden wurden. Die Anzahl an Genen, die spezifisch an einem Tag induziert wurden, ist in der Menge zu finden, die sich mit keiner anderen schneidet. (D) Hierarchische Clusterung von Genen mit unterschiedlicher Expression zwischen den Proben (p-Value $< 0,05$). Induzierte Gene sind rot, reprimierte Gene blau angegeben. Die $\log_{2}FC$ -Skala reicht von -3 bis 3. Hierarchische Cluster sind links für ähnlich regulierte Gene und oben für zusammen gehörende Proben.

Wurden die Pflanzen allerdings nach dem dritten Tag unter Normalbedingungen weiter inkubiert, so ergab sich eine andere Regulation der Gene. Zur Verdeutlichung der Änderung wurde hier Tag 3 bei Dunkelheit genommen, um die Veränderung zum Licht hin deutlich zu machen. Beim Wechsel ins Licht zeigte sich eine hohe Zahl an Genen, die von der Belichtung abhängig sind (ca. 1900 induzierte Gene an Tag 5 und viele rote Balken in Abb. 5.26 D). Dies zeigt, dass ein neues Entwicklungsprogramm (Photomorphogenese) angeschaltet wurde. Daher ist die Überlappung zwischen Tag 4 und 5 so groß (600 Gene) im Vergleich zu Tag 3 und 4 bzw. Tag 3 und 5 (151 bzw. 102 Gene). Die Zahl an reprimierten Genen im Licht war dagegen geringer (Abb. 5.26 C bzw. D blaue Markierungen), was darauf hindeutet, dass nur eine kleine Anzahl an Genen bei Licht SnRK1-abhängig reprimiert werden muss.

5.6.2 Identifizierung von SnRK1-abhängigen Genen zur Mobilisierung von Speicherstoffen

Um eine genauere Vorstellung von der Mobilisierung von Speicherstoffen zu bekommen, können RNA-Seq Daten mit Hilfe des Programms MapMan analysiert werden. So können biologische Zusammenhänge in verschiedenen regulatorischen Netzwerken und Abbauwegen dargestellt werden.

Die massenspektrometrische Untersuchung der TAGs zeigte bereits, dass diese Speicherstoffe SnRK1-abhängig degradiert werden. Bei der Transkriptomanalyse konnten im TAG-Abbau ebenfalls Gene identifiziert werden, bei denen die Transkription SnRK1-abhängig reguliert ist. So waren bei konstanter Dunkelheit (3dD, 4dD und 5dD) CTS/PXA1, LACS6/7, ACYL-CoA-OXIDASE (ACX)2 und PCK1 SnRK1-abhängig reguliert. Im Licht (4dL und 5dL) war dagegen die Transkription von SDP1, ACX6, CSY2 und 3 SnRK1-abhängig reguliert. Lediglich ACX4 und PMDH2 waren während der gesamten Dauer der Transkriptomanalyse SnRK1-abhängig reprimiert. Auch aus den MapMan-Daten lassen sich keine Abbauwege finden, die SnRK1-abhängig reguliert sind (vgl. Anhang. A.5). Ebenso sind auch die Kohlenhydratabbaugene wenig differentiell SnRK1-abhängig reguliert. Somit liegt der Fokus auf den Aminosäuren. Hier zeigte die metabolische Untersuchung besonders starke Unterschiede zwischen dem WT und der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante. In der MapMan Analyse in Abb. 5.28 ist ersichtlich, wie unterschiedlich Gene sowohl in der Aminosäuresynthese, als auch im Abbau von Aminosäuren reguliert sind. Ein Auszug von regulierten Genen wird im folgenden besprochen.

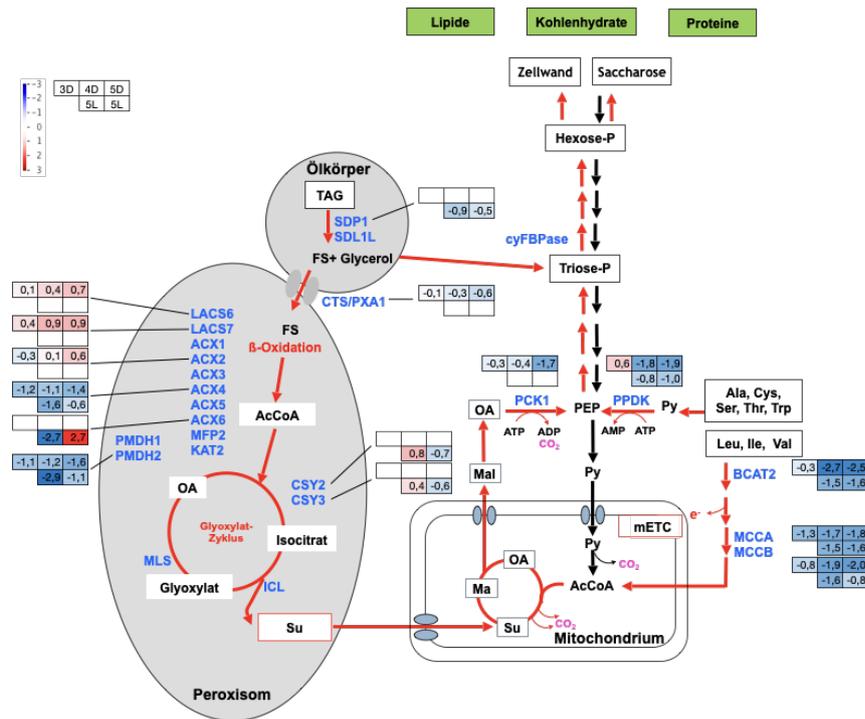


Abbildung 5.27 – Übersichtszeichnung SnRK1-abhängig regulierter Gene im Speicherstoffabbau während der Keimlingsentwicklung. Abbauwege von TAGs und AA sowie die Glukoneogenese sind rot dargestellt, die Glykolyse schwarz. Transkriptionell SnRK1-abhängig reprimierte Gene sind blau und induzierte Gene rot eingefärbt. FS Fettsäure, AcCoA Acetyl-CoA, OA Oxalacetat, Su Succinat, Ma Malat, PEP Phosphoenolpyruvat, Py Pyruvat.

Während bei der Aminosäure-Synthese die überwiegende Anzahl an Genen (*ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 1 (AGT1)*, *DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2 (P5CS2)* und *BCAT2*) über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich von WT und Mutante reprimiert ist, gibt es Ausnahmen mit differenzierter Regulation. So wird *ASN1* an Tag 3 leicht induziert (+0,9) und an den Tagen 4 und 5 sowohl im Licht als auch im Dunkeln in der Mutante herunterreguliert. Bei *TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3 (TAT3)* verhält es sich deutlich differenzierter. So war dieses Gen in der Mutante an Tag 3 stark induziert (+9,5), an den weiteren Tagen im Dunkeln aber reprimiert (-3,7 bzw. -5,3). Dagegen war die Aminotransferase in der Mutante im Licht wieder deutlich induziert (+5,2 bzw. +3,6). Beim Abbau von Aminosäuren waren *MCCA*, *MCCB* und *HOMOGENTISATE 1,2-DIOXYGENASE (HGO)* an allen Tagen reprimiert. *THREONINE ALDOLASE 1 (THA1)* war dagegen an Tag 3 induziert. an den folgenden Tagen wieder reprimiert. Auch *ORNITHINE-DELTA-AMINOTRANSFERASE (DELTA-OAT)* war an Tag 3 (+0,1) und Tag 4 im Licht

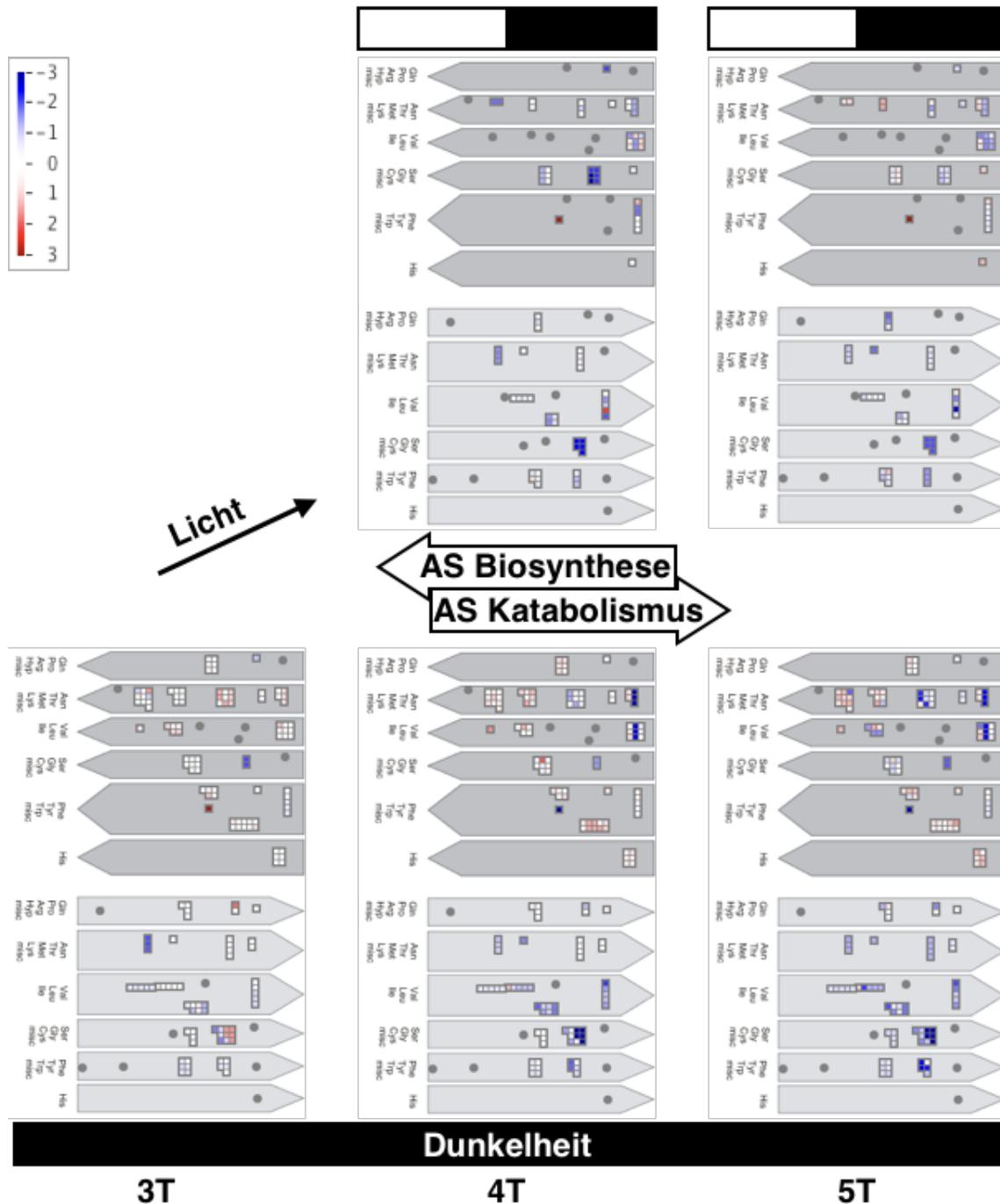


Abbildung 5.28 – MAPMAN Analyse der Synthese und des Abbaus von Aminosäuren während der Keimlingsentwicklung. Die Daten stammen aus dem RNA-Seq Experiment. Jedes Kästchen symbolisiert dabei ein Transkript. Blau markierte Kästchen zeigen, dass das Gen *snrk1α1/α2*-abhängig reprimiert wurde, rote Kästchen dagegen eine Induktion des Gens durch SnRK1. Dabei reicht die Skala von -3 bis 3. Unten wurden die Zeitpunkte im Dunkeln dargestellt, oben im Licht.

(+0,5) induziert, an den übrigen Tagen (Tag 4 im Dunkeln (-0,5), Tag 5 im Dunkeln (-1,2) und Tag 5 im Licht (-0,7)) wieder reprimiert. Somit ist der komplette Abbau von BCAA SnRK1-abhängig reprimiert. Außerdem werden weitere Abbau-gene bestimmter Aminosäuren wie Asparagin, Prolin, Glutamin, Glycin und Serin transkriptionell in der SnRK1-Mutante reprimiert. Daraus folgt, dass viele Gene im Aminosäurekatabolismus auf transkriptioneller Ebene SnRK1-abhängig reguliert werden, während beim TAG-Abbau die SnRK1-abhängige Regulation vermutlich auf post-transkriptioneller Ebene erfolgt.

5.6.3 Identifikation von Regulatoren der Speicherstoffmobilisierung durch Clusteranalysen

Durch Gemeinsamkeiten in der Regulation sollen Gene identifiziert werden, welche an der Mobilisierung von Speicherstoffen beteiligt sind. Bei der Analyse der SnRK1-abhängigen Genexpression in kompletter Dunkelheit wurden die Gene in 31 unterschiedliche Cluster eingeteilt (vgl. Anhang A.6). Cluster 2 wird als Beispiel ähnlich regulierter Gene verwendet. Auf diese Weise soll gezeigt werden, wie mit weiteren bioinformatischen Methoden auf eine Genregulation geschlossen werden kann. Abb. 5.29 A zeigt eine veränderte Genexpression von Wildtyp und Mutante. Während in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante eine Reduktion der Transkription stattgefunden hat, blieb die Expression der Transkripte im Wildtyp annähernd konstant, was charakteristisch für dieses Cluster ist. In der darauffolgenden Annotation für ähnlich regulierte Gene zeigte sich eine deutliche Anreicherung bei biosynthetischen und metabolischen Prozessen. Außerdem sind einige Photosynthese-Prozesse dabei. An den mit Pfeilen markierten Prozessen ist *PMDH2* beteiligt. Ebenso befanden sich in diesem Cluster TFs, deren Transkription SnRK1-abhängig reprimiert ist, wie *bZIP34* und *bZIP61*. Von diesen ist bekannt, dass sie während der Keimlingsentwicklung exprimiert und SnRK1-abhängig reguliert werden. Auf diese Weise können weitere koregulierte Gene gefunden werden. So gibt es im Licht ein Cluster, bei dem viele metabolische und photosynthetische Prozesse auftreten. In diesem Cluster ist neben *PMDH2* und *BCAT2* auch *cyPPDK* vertreten (vgl. Anhang A.10), welche SnRK1-abhängig reprimiert werden.

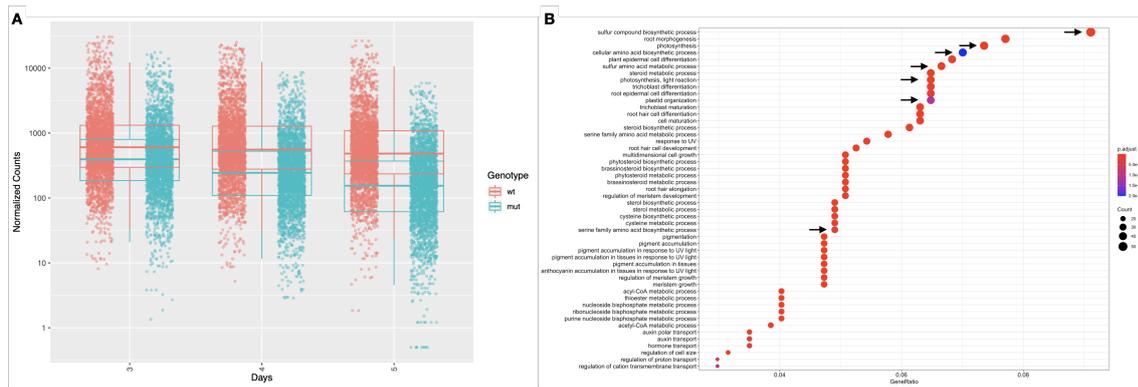


Abbildung 5.29 – Cluster 2 zeigt, wie Gene im Vergleich von Wildtyp und *snrk1α1/α2*-Mutante, die im Dunkeln exprimiert wurden, einen ähnlichen Verlauf haben. (A) Punkte markieren unterschiedliche Gene, deren Transkription ähnlich reguliert ist und deshalb zu einem Cluster zusammen gefasst wurden. Angezeigt sind auf der y-Achse die Anzahl der normalisierten Counts, auf der x-Achse die Tage, an denen die Proben geerntet wurden. Für die Erstellung des Clusters wurden differentiell exprimierte Gene mit einem p-Value von 0,05 ausgewählt. Gene des WT (grün) und der *snrk1α1/α2*-Mutante (rot) wurden mit einem Boxplot und einer Verlaufslinie dargestellt. (B) GO-Annotation für Cluster 2, bei dem Gene spezifischen biologischen Prozessen zugeordnet werden. Auf der linken Seite befinden sich die einzelnen biologischen Prozesse, auf der x-Achse die Anzahl von Genen im Cluster. In der Punktgröße wird die Anzahl der Transkripte verdeutlicht, in der Farbe der p.adjust-Wert. Mit Pfeilen sind Prozesse markiert, bei denen *PMDH2* beteiligt ist.

5.7 Identifizierung transkriptioneller Regulatoren ausgewählter metabolischer Zielgene während der Keimlingsentwicklung

5.7.1 SnRK1- und Glukose-abhängige Induktion des TFs *bZIP63*

Die Auswertung der RNA-Seq-Ergebnisse zeigte, dass mehrere TFs durch SnRK1 reguliert wurden. Unter den TFs waren auch mehrere bZIP vertreten, unter anderem der schon aus dem Aminosäure-Katabolismus bekannte TF *bZIP63*. Abbildung 5.30 zeigt die veränderte Genexpression von *bZIP63* während der Keimlingsentwicklung. Die Keimlinge wurden nach Schema 4.5.2 angezogen. Proben mit Zucker enthielten Medium mit 3% Glukose, welches nach jeweils drei Tagen erneuert wurde. Wie aus Abbildung 5.30 hervorgeht, wurden *bZIP63*, *MCCA*, *PMDH2*, *cyPPDK* und *ACX4* an den Tagen 4-6 im Wildtyp induziert. Die Gabe von Glukose führte dazu, dass die Expression reprimiert wurde. In den *snrk1α1/α2*-Keimlingen konnte die Genexpression weder mit noch ohne Glukose induziert werden. Das bedeutet, dass

eine Expression dieser Gene im Licht und in Anwesenheit von SnRK1 erfolgt und durch Glukosegabe unterdrückt werden kann. Im Gegensatz dazu war die Expression von *PCK1* uneinheitlich. So bewirkte Glukose eine Reduktion der Genexpression im Wildtyp, in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante sorgte sie jedoch für eine Induktion. In Abwesenheit von SnRK1 war hingegen keine Induktion in den Keimlingen festzustellen. Auch Pedrotti *et al.* (2018) haben gezeigt, dass der TF bZIP63 beim Abbau von

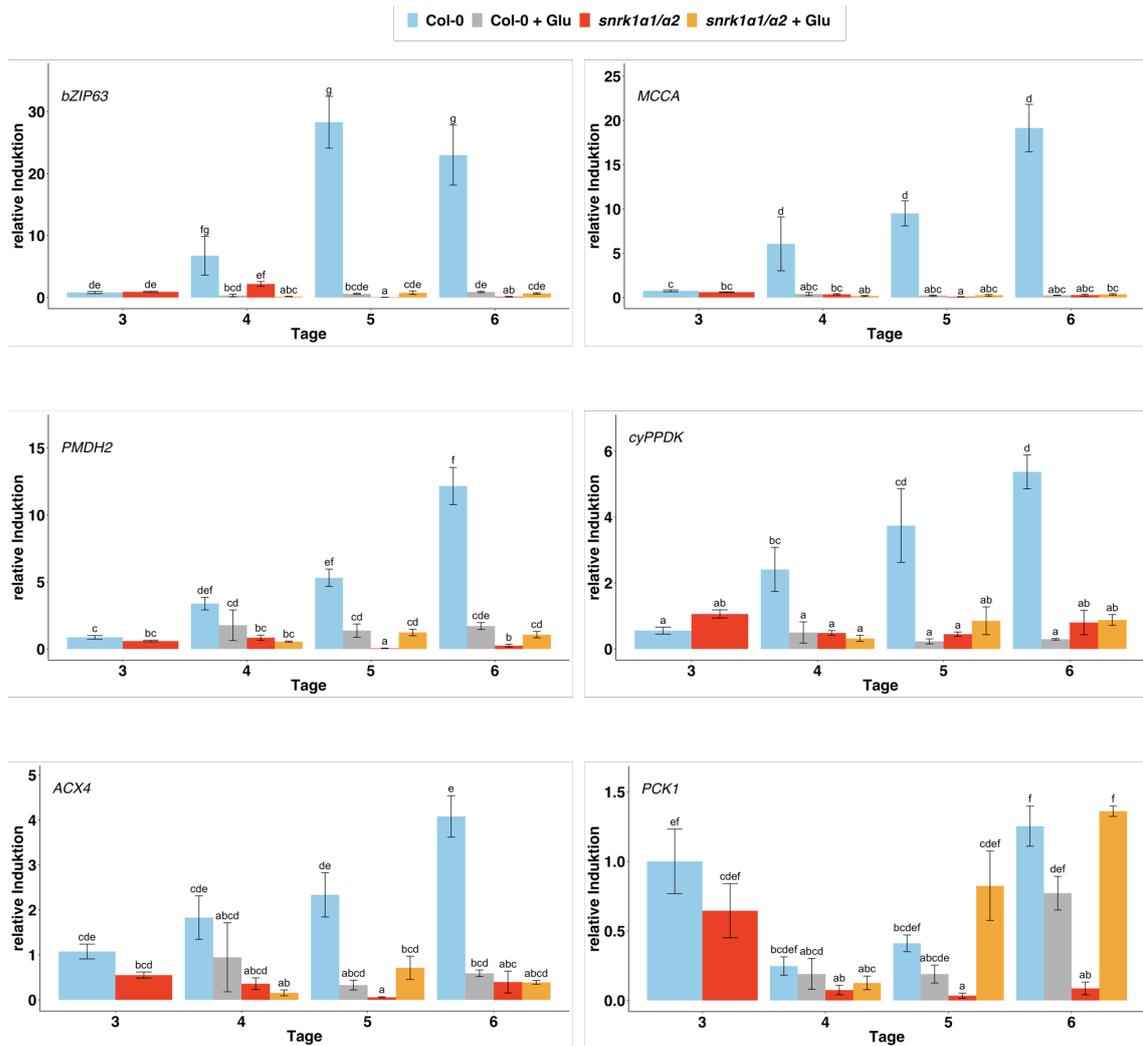


Abbildung 5.30 – Transkriptionsanalyse SnRK1-abhängiger Genexpression während der Keimung. Abgebildet sind die Gene bZIP63, MCCA, PMDH2, cyPPDK, ACX4 und PCK1 während der Keimlingsentwicklung. Wildtyp Col-0 (hellblau), + Glu (3%, grau) und *snrk1 α 1/ α 2* (rot), + Glu (3%, orange). Auf der y-Achse ist die relative Induktion dargestellt, wobei Werte > 1 eine Induktion und Werte < 1 eine Repression bedeuten. Auf der x-Achse sind die Tage nach der Keimung angegeben. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten (n=15). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

verzweigt-kettigen Aminosäuren beteiligt und *MCCA* als ein Zielgen bei der Dunkelinduktion im Blatt beschrieben ist. Dies konnte nun im Keimling bestätigt werden. Aufgrund dieses interessanten Expressionsschemas bei mehreren Genen könnte der TF *bZIP63* ein wichtiger Regulator der Expression auch anderer Gene sein.

5.7.2 Expression von Genen des Aminosäure-Katabolismus durch *bZIP63*

Um zu bestätigen, dass *bZIP63* Einfluss auf die Expression von *cyPPDK* hat, wurde ein Keimungsexperiment mit einer *knock-out*-Mutante des TF *bZIP63* durchgeführt. Abb. 5.31 zeigt die Genexpression von *cyPPDK*, *PMDH2*, *PCK1*, *MCCA* und als Kontrolle *bZIP63*. Die Expression von *cyPPDK* steigt, wie im vorherigen Experiment, sowohl beim Wildtyp WS als auch beim Ökotyp Col-0 von Tag 3 zu Tag 6 an. Die beiden Mutanten *bzip63* und *bzip1/53/9/63* zeigten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp einen deutlich geringeren Anstieg an beiden Tagen. Da keine Expression von

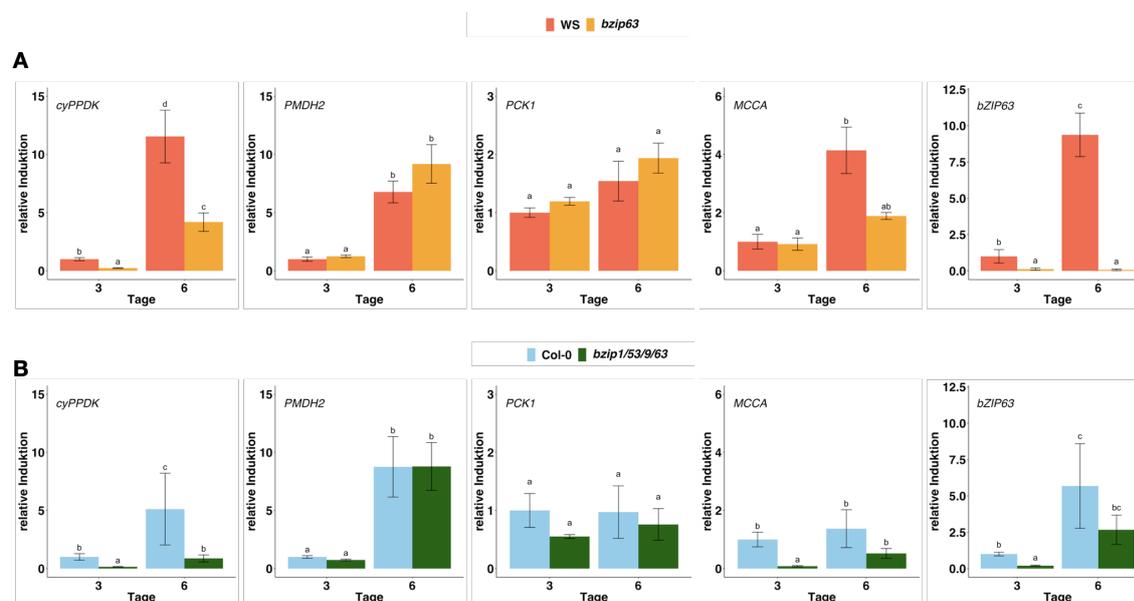


Abbildung 5.31 – Transkriptionsanalyse *bZIP63*-abhängiger Zielgene während der Keimung. Abgebildet sind die Gene *cyPPDK*, *PMDH2*, *PCK1*, *MCCA* und *bZIP63* während der Keimlingsentwicklung. (A) WT WS (hellrot) und *bzip63* (orange). (B) WT Col-0 (hellblau) und *bzip1/53/9/63* (grün). Auf der y-Achse ist die relative Induktion dargestellt. Auf der x-Achse sind die Tage nach der Keimung angegeben. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten (n=15). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

bZIP63 in der *bzip63*-Mutante vorlag, konnte bestätigt werden, dass die *cyPPDK* Expression von bZIP63-abhängig und spezifisch ist.

5.8 Regulation des *cyPPDK*-Promotors durch SnRK1 und bZIP63

5.8.1 Regulation der *cyPPDK* in Protoplasten

Wie Eastmond *et al.* (2015) beschreibt, befindet sich der Promotor für die cytosolisch-lokalisierte Variante (AT4G15530.2) des *cyPPDK*-Gens im ersten Intron der chloroplastisch-lokaliserten Variante (vgl. Anhang A.7). Die cytosolisch-lokalisierte Variante ist wichtig, da die Verwendung von Metaboliten des Aminosäure-Katabolismus im Cytosol stattfindet und nicht in den Chloroplasten. Der cytosolisch-lokalisierte Promotor wurde über eine PCR amplifiziert und mittels Restriktionsenzymen (*HindIII* und *KpnI*) in den *pBT10:GUS*-Vektor inseriert. Die korrekte Sequenz wurde mittels Sequenzierung überprüft (vgl. Anhang A.9).

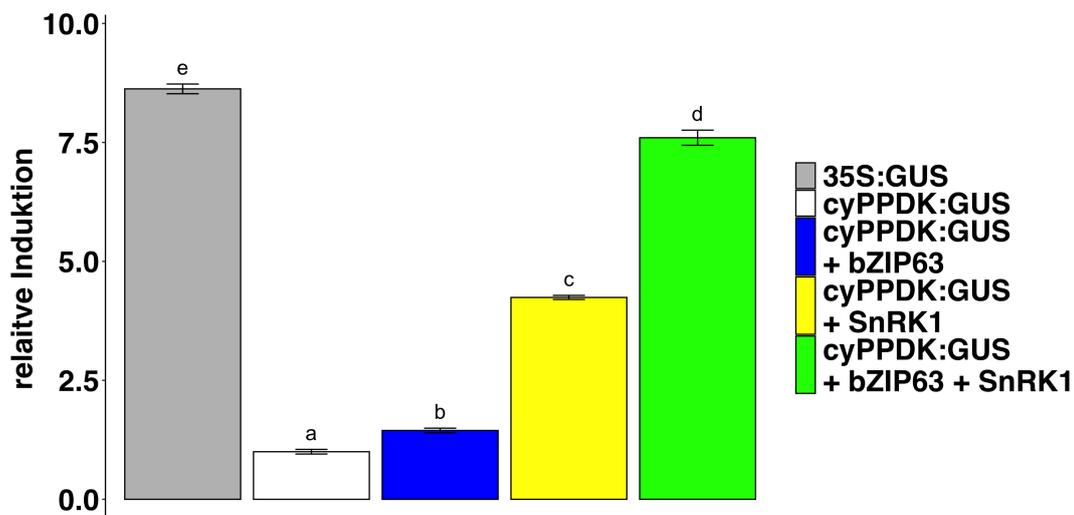


Abbildung 5.32 – Aktivierung des PPDK-Promotors mit verschiedenen Effektoren. 35S:GUS ist ein Promotor, der von der 35S-Untereinheit des CMV getrieben wird. bZIP63 ist die DNA des TFs und dient als Effektor. SnRK1 ist die $\alpha 1$ -Untereinheit von SnRK1 und dient als zweiter Effektor. Eingesetzt wurden $4,5 \mu\text{g}$ vom Promotor und jeweils $7 \mu\text{g}$ von den Effektoren. Abgebildet ist der Standardfehler bei drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

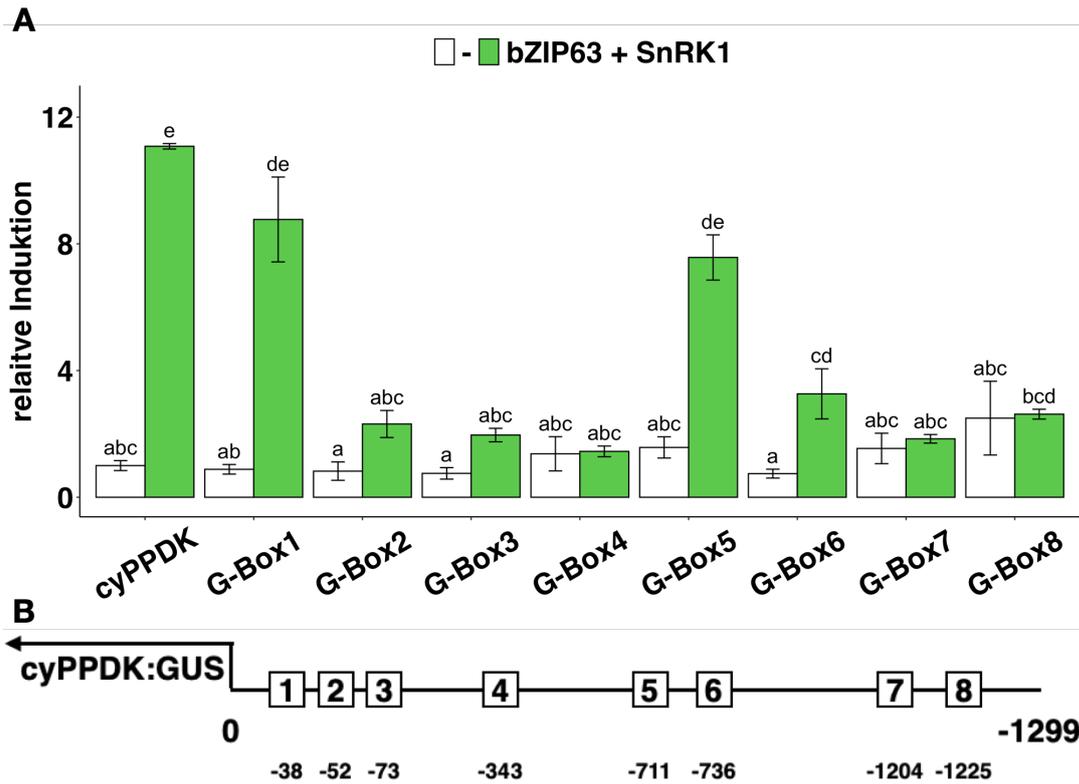


Abbildung 5.33 – Mutationskartierung des *PPDK*-Promotors. (A) Gezeigt wird die Induktion des Promotors *cyPPDK* relativ zu einem Ansatz ohne Effektor. Die Kontrollen ohne Effektoren sind weiß, die Koexpression von *bZIP63* und *SnRK1 α 1* ist grün dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Holm Post-Hoc Test. (B) Lokalisation der G-Box Bindemotive auf dem Promotor.

Dazu wurden Blatt-Mesophyllprotoplasten mit Promotor- und Effektor-DNA transformiert und die Induktion des Promotors gemessen. Bei der Expression von *bZIP63* mit dem Promotor alleine wurde eine geringe, aber doch signifikante Steigerung erreicht. *SnRK1 α 1* alleine konnte den Promotor deutlich stärker induzieren als *bZIP63*. Die stärkste relative Induktion des PPDK-Promotors (7,5 x), gekoppelt an das GUS-Gen (*cyPPDK*:GUS), erhielt man, wenn neben dem TF *bZIP63* gleichzeitig *SnRK1 α 1* exprimiert wurde (Abb. 5.32). Die Kombination aus beiden Effektoren erreichte dabei fast die Werte der Positivkontrolle (*p35S*:GUS). Vermutlich benötigt *bZIP63* zusätzlich den *SnRK1*-Stimulus (Mair *et al.*, 2015).

Nachdem *bZIP63* den Promotor induzieren konnte, wurde im nächsten Versuch untersucht, in welchem Bereich des Promotors der TF bindet. Da *bZIP*-TFs häufig mit G-Box (CACGTG) ähnlichen Bindemotiven interagieren, wurden alle im Promotorbereich befindlichen Bindemotive (mit einem ACGT-Kern) zu TTTT-Motiven

mutiert (vgl. Liste mit Oligonukleotiden Tabelle 3.3). Abb. 5.33 B zeigt die Anordnung der Bindemotive auf dem Promotor. Da, wie in Abb. 5.32 gezeigt, die Kombination aus bZIP63 und SnRK1 α 1 den Promotor deutlich aktivieren konnte, wurde jede mutierte Bindestelle mit dieser Kombination getestet, um herauszufinden, bei welcher Mutation der G-Box-Bindestelle keine Induktion mehr möglich war (Abb. 5.33 A). Eine signifikante Induktion des Promotors war nur bei nicht mutiertem Promotor sowie bei den G-Box-Mutationen 1, 5 und 6 zu sehen. Bindestellen 2 und 3 konnten leicht aktiviert werden, bei den G-Boxen 4, 7 und 8 wurde keine Aktivierung des PPK-Promotors erreicht. Daher ist zu vermuten, dass die bZIP63/SnRK1-vermittelte Promotoraktivierung insbesondere über diese G-Box-Bindemotive herbeigeführt wird.

5.8.2 Nachweis der *in vivo* Bindung von *bZIP63* an den *cyPPDK*-Promotor

Sowohl die qRT-PCR Resultate als auch die Ergebnisse der Protoplasten Transaktivationsversuche sprechen dafür, dass der TF bZIP63 die Transkription des *PPDK*-Promotors direkt oder indirekt reguliert. Um dies zu überprüfen wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt und die Bindung mittels einer RealTime-PCR überprüft. Dazu wurden Samen von *p_{bzip63}::bZIP63:YFP*, Komplementation einer *bzip63*-Mutante gekoppelt an einen YFP-Tag mit endogenem Promotor, und vom Wildtyp WS ausgelegt und die Keimlinge nach drei Tagen geerntet. Da die *p_{bzip63}::bZIP63:YFP*-Samen nur bZIP63:YFP-Protein enthalten, können über einen YFP/GFP-Antikörper, DNA an denen das Protein gebunden ist, isoliert und mit Hilfe einer PCR identifiziert werden. Da die Bindemotive teilweise zu eng beieinander lagen, wurden die Oligonukleotide für die PCR-Bestimmung der Bindung wie in Abb. 5.34 B gewählt und die einzelnen G-Boxen zu Gruppen zusammengefasst. Das Gen Actin7 wurde als nichtbindende Kontrolle verwendet.

Abgebildet ist die relative immunologische Anreicherung von Promotorfragmenten gegenüber dem Wildtyp, was die Stärke der Bindung zwischen dem Promotor und dem bZIP63:YFP-Protein verdeutlicht. Da die zur Verfügung stehenden Geräte nur Scherprodukte (DNA-Fragmente bestimmter Länge) von ca. 800 bp zulassen, liegt hier die Limitierung der Auflösung. Die dargestellte Analyse zeigt, dass die stärkste Bindung bei G-Box 4 erreicht wurde. G-Boxen 1-3 und 5+6 zeigten zwar ebenfalls eine signifikante Bindung, doch war diese deutlich geringer im Vergleich zu G-Box 4.

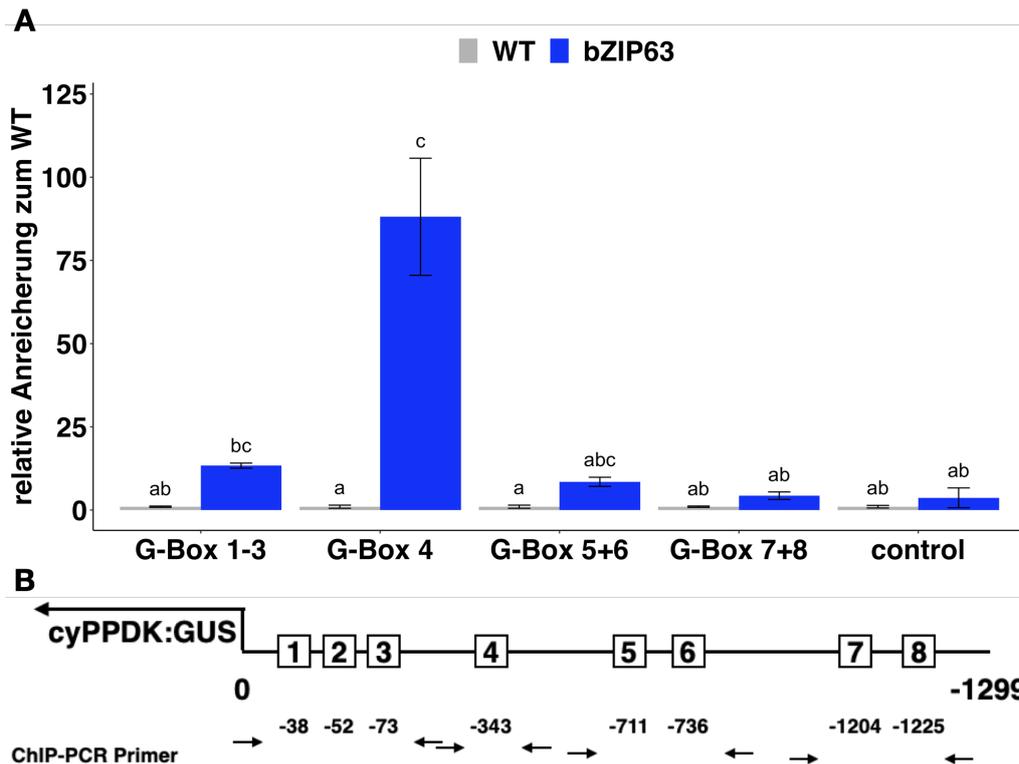


Abbildung 5.34 – ChIP_{PCR} zur Bestätigung der direkten Bindung von *bZIP63* an den *PPDK*-Promotor. (A) Gezeigt wird die relative Anreicherung von Promotor-Fragmenten in den *pbzip63::bZIP63:YFP*-Keimlingen (blau) gegenüber dem Wildtyp WS (grau) nach der ChIP. Als Kontrolle wurde Actin7 verwendet. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler von drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni-Holm Post-Hoc Test. (B) Abgebildet sind die Bindestellen der verschiedenen Oligonukleotide für die Bindung an den Promotor, wobei die Pfeile die Orientierung der Oligonukleotide symbolisieren (vgl. Liste mit den Oligonukleotiden Tabelle 3.4). Die Zahlen in den Quadraten entsprechen der jeweiligen G-Box, beginnend vom Startkodon des Gens in aufsteigender Reihenfolge. Die Gesamtlänge des Promotors und die Positionen der Bindemotive wurden ebenfalls mit der Entfernung zum ATG-Startkodon angegeben. Das ChIP-Experiment wurde zusammen mit Christoph Weiste durchgeführt.

Dies ist vermutlich eine Folge der geringen Scherkraft. Somit konnte gezeigt werden, dass durch *SnRK1* aktiviertes *bZIP63* direkt an den *PPDK*-Promotor binden konnte und den Katabolismus von Aminosäuren unter Mangelbedingungen reguliert.

6 Diskussion

Die evolutionär konservierten metabolischen Kinasen SnRK1/AMPK/Snf1 haben eine zentrale Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase in allen Eukaryonten (Broeckx *et al.*, 2016) und sind an der Bewältigung von Stress- und Mangelsituationen bzw. einer Vielzahl von Entwicklungsvorgängen beteiligt (Baena-González und Hanson, 2017). In dieser Arbeit wurde die Funktion von SnRK1 bei der Mobilisierung von Speicherstoffen während der Keimlingsentwicklung untersucht.

6.1 Induzierbare *snrk1 α 1/ α 2* knock-down Mutanten sind geeignet zur Analyse der Keimlingsentwicklung

Normalerweise werden bei genetischen Untersuchungen *gain-of-function* oder *loss-of-function* Mutanten verwendet. Bei Untersuchungen mit *gain-of-function* Pflanzen wird der Phänotyp durch Überexpression eines Gens verändert (Behe, 2010). Diese Mutanten zeigen dauerhaft den veränderten Phänotyp und das Gen wird auch in Zellen exprimiert, in denen es normalerweise nicht exprimiert wird, was zu Missinterpretationen führen kann. Bei einem *loss-of-function*-Ansatz haben Pflanzen Einschränkungen aufgrund einer veränderten Funktionsfähigkeit des betroffenen Genprodukts (Behe, 2010). Da SnRK1, als zentrale Kinase, eine Vielzahl an Genen reguliert, sind Überexpressionspflanzen kein optimales Untersuchungsobjekt. Außerdem ist es das Ziel in der vorliegenden Arbeit, die „normale“ Funktion von SnRK1 aufzuklären. Von den drei α -Untereinheiten wird die dritte SnRK1 α 3 in Arabidopsis kaum exprimiert (Schmid *et al.*, 2005). Die anderen beiden katalytischen Untereinheiten SnRK1 α 1 und SnRK1 α 2 sind redundant und eine Doppelmutante *snrk1 α 1/ α 2* ist lethal (Baena-González *et al.*, 2007). So konnten auch keine phänotypischen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Einzelmutanten *snrk1 α 1* und *snrk1 α 2* festgestellt werden. Dadurch wird eine genetische Analyse erschwert. Daher wurde in eine bestehende T-DNA-Insertionslinie von SnRK1 α 1 eine β -Estradiol (Est) induzierbare amiRNA für die Untereinheit SnRK1 α 2 eingebaut, welche zu einer Reduzierung der Proteinmenge führt (Pedrotti *et al.*, 2018). Da die β -Est Gabe erst nach Tagen eine Wirkung zeigte, die RNA aber schnell reduziert wurde, muss es sich bei der SnRK1 α 2-Untereinheit im Blatt um ein sehr stabiles Protein handeln

(Pedrotti *et al.*, 2018). Dieser Ansatz wurde in Keimlingen getestet und mit einer β -Est Gabe von Beginn an konnte eine Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze eines Western-Blots erreicht werden. Durch die Gabe von β -Est gleich zu Beginn des Experiments konnte die Proteinbiosynthese für die Untereinheit SnRK1 α 2 wirksam unterdrückt werden und somit wurden auf den Immunoblots keine Banden für die Untereinheiten von SnRK1 α 1 und SnRK1 α 2 detektiert. Damit die Aktivität von SnRK1 α 2 dauerhaft unter der Nachweisgrenze gehalten werden konnte, wurde das Medium alle drei Tage durch frisches β -Est-haltiges Medium ersetzt. Aus diesem Grund war eine Anzucht der Keimlinge auf Agarplatten nicht möglich. Die Keimlinge wurden in Flüssigkultur auf Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen angezogen. Das hat den Vorteil, dass pro Platte gleiche Bedingungen angenommen werden können und eine Supplementation problemlos durch den Austausch des Mediums erfolgen konnte.

6.2 SnRK1 ist essentiell für die Arabidopsis Keimlingsentwicklung

Nach der Keimung verlängerten sich Wurzel und Hypokotyl bei wildtypischen Keimlingen in Dunkelheit, während die *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlinge kaum Wachstum zeigten. Dass SnRK1 unter Energiemangelbedingungen wichtig ist, zeigte Baena-González *et al.* (2007), indem SnRK1 α 1 überexprimiert wurde und Keimlinge ein stärkeres Wurzelwachstum als der Wildtyp zeigten. Dagegen hatten *snrk1 α 1*-Keimlinge eine kürzere Wurzel als der Wildtyp. In älteren Pflanzen führte die Gabe von Saccharose zu gegenteiligen Effekten (Baena-González *et al.*, 2007). So hatten die Überexpressionspflanzen eine kürzere Wurzel und die *knock-out*-Pflanzen eine längere Wurzel als der Wildtyp. Dies stimmt auch mit Beobachtungen in dieser Arbeit überein, bei denen das Wurzelwachstum in den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war. Außerdem bestätigten Aufnahmen, dass das Fusionsprotein SnRK1 α 1:GFP im Dunkeln in Zellkernen des Wurzelmeristems vorkommt. Dies stimmt mit bereits publizierten Daten überein, die zeigen, dass in 10 Tage alten Keimlingen ein im Kern lokalisiertes SnRK1 α 1-Protein das Wurzelwachstum fördert. Im Gegensatz dazu weisen Keimlinge mit SnRK1-Protein, welches nur im Zytosol vorkommt, kein verändertes Wurzelwachstum zum Wildtyp auf (Ramon *et al.*, 2019). Im Licht ist eine Lokalisation im Kern nur an Tag 4 nachweisbar, was drauf hindeutet, dass SnRK1 danach für kein weiteres primäres Wurzelwachstum

sorgt (Williams *et al.*, 2014). Da nach Tag 3 die Keimlinge im Licht sind, können sie Photosynthese betreiben und Glukose herstellen, was ein Signal für TOR ist. TOR wiederum steuert das Wurzelwachstum während der Keimlingsentwicklung (Xiong *et al.*, 2013). So könnte TOR in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen prinzipiell das Wurzelwachstum induzieren. Allerdings fehlt diesen Keimlingen Glukose. Dadurch konnte TOR nicht aktiviert werden. Außerdem gibt es eine Verbindung zwischen TOR und SnRK1. Das Zusammenspiel von TOR und SnRK1 ist bei der Kontrolle des Wurzelwachstums sowohl im Dunkeln und als auch im Licht entscheidend beteiligt. Es ist noch nicht abschließend geklärt, wie die genaue Regulation aussieht.

Die Elongation des Hypokotyls wird ebenfalls durch SnRK1 reguliert, da bis zu Tag 4 im Licht und im Dunkeln eine Lokalisation des SnRK1 α 1:GFP-Fusionsproteins im Kern zu sehen war. Außerdem zeigten *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlinge sowohl im Licht als auch im Dunkeln ein verkürztes Hypokotyl. Dies stimmt mit Daten überein, die zeigen, dass *snrk1 α 1*-Keimlinge ein verkürztes Hypokotyl im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, wenn diese durch Saccharose (3%) komplementiert werden (Simon *et al.*, 2018a). Weitere Energiemangelbedingungen wie kurze Lichtperioden (4Std.) führten ebenfalls zu einem Hypokotylwachstum. Eine Belichtungsdauer von 16 Std. führte dazu, dass sowohl die Mutante als auch der Wildtyp ein sehr kurzes Hypokotyl hatte (Simon *et al.*, 2018a). Dazu passt auch, dass *SnRK1 α 1*-Überexpressionslinien bei Zuckergabe (Saccharose) ein verkürztes Hypokotyl hatten, unabhängig von der Belichtungsdauer (4, 8 oder 16 Std.). Bei Dauerlicht hingegen hatten alle Pflanzen ein sehr kurzes Hypokotyl (Simon *et al.*, 2018b). Dies deutet darauf hin, dass es in Anwesenheit von SnRK1 zu einem reduzierten Hypokotyl kommt und die ausgebliebene Streckung des Hypokotyls durch Zucker nicht komplementiert werden kann. Außerdem wird im Wildtyp HY5 von COP1 gebunden. PIF-TFs sorgen für die Expression von Expansinen, die für ein Zellwachstum sorgen und sich das Hypokotyl somit im Dunkeln streckt (Leivar *et al.*, 2009). Somit könnte es sein, dass diese Regulation in den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen nicht mehr stattfindet und deshalb die Streckung des Hypokotyls ausbleibt. Im Licht sorgen außerdem Photorezeptoren für eine Degradation von PIF-TFs und eine Inaktivierung von COP1, was zu einem Freisetzen von wachstumsinhibierenden Proteinen wie HY5 führt, woraufhin der Keimling keine weite Hypokotylstreckung mehr vornimmt (Gommers und Monte, 2018). Dies passt zu den RNA-Seq Daten, die zeigen, dass die Expression von *HYH* im Vergleich von WT und Mutante SnRK1-abhängig im Dunkeln induziert ist, während die Expression von *PIF5* im Licht reduziert ist. Allerdings kann nicht

ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp im Glukosemangel begründet liegt, da Simon *et al.* (2018) zeigen konnten, dass externe Saccharose-Gabe in *snrk1 α 1*-Keimlingen zum Hypokotylwachstum führte und in den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen keine Glukose durch Glukoneogenese hergestellt werden konnte. Wäre ausschließlich Glukose nötig, so sollten SnRK1 α 1-Überexpressionspflanzen mit normalem Medium ein längeres Hypokotyl aufweisen, was Simon *et al.* (2018) jedoch nicht zeigen konnten. Daher könnte SnRK1 dafür sorgen, dass im Dunkeln die Unterdrückung der Expression von HYH unterbleibt und *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlinge daher kein verlängertes Hypokotyl aufweisen. Außerdem sorgt SnRK1 für eine reduzierte Expression von PIF5 im Licht, was ebenfalls kurze Hypokotyle erklären kann, da die durch PIF hervorgerufene Hypokotylstreckung ausbleibt. Somit ist sowohl Glukose als auch SnRK1 für das Hypokotylwachstum notwendig.

Während bei Dunkelheit die Ausbildung des photosynthetischen Apparats durch PIF-TFs inhibiert werden und zusätzlich HY5 von COP1 gebunden wird, ist das beim Wechsel ins Licht nicht der Fall (Stoynova-Bakalova *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2014). Im Licht wird die Inhibierung von HY5 aufgehoben. HY5 sorgt für die Ausbildung eines funktionierenden Photosyntheseapparats (Lee *et al.*, 2007). Außerdem werden PIF-TFs und COP1 degradiert (Gommers und Monte, 2018). Da es bei *snrk1 α 1/ α 2* zu keinem funktionierenden Photosyntheseapparat kommt, hat SnRK1 vermutlich auch Einfluss auf die Ausbildung des Photosyntheseapparats, indem es entweder Proteine, die am Aufbau des Photosyntheseapparats beteiligt sind, nicht aktivieren kann oder für keine Degradation von Proteinen sorgt, welche die Photosynthesebildung inhibieren. Dass die Entwicklung der Chloroplasten erfolgt, sobald die Keimlinge über Photorezeptoren Licht wahrnehmen, zeigte sich dadurch, dass wildtypische Pflanzen bereits nach etwa sechs Stunden Belichtung photosynthetisch aktiv waren, während dies bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen nicht beobachtet werden konnte. Dazu war die Expression von *GLK2*, einem TF der Chloroplastenentwicklung, im Licht an beiden Tagen SnRK1-abhängig reduziert. Ebenso war die Expression von Light Harvesting Complex (LHC)-bindenden Genen an allen Tagen SnRK1-abhängig reduziert. Dies passt zu den Ergebnissen von Gommers und Monte (2018), der nach Belichtung mit geringer Lichtintensität ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) innerhalb von 24 Stunden feststellen konnten, dass sich ein photoautotropher Lebensstil der Pflanze eingestellt hat. Da bei den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen keine photosynthetische Aktivität festgestellt werden konnte, ist an der Ausbildung eines photosynthetischen Apparats SnRK1 durch Regulation von *GLK2* beteiligt.

So bringt der Wechsel ins Licht viele morphologische Änderungen mit sich, welche SnRK1-abhängig sind und erst nach dem Wechsel ins Licht festgestellt wurden. Beispiele dafür sind der Aufbau eines Photosyntheseapparats, die Inhibierung der Hypokotylstreckung oder des Wurzelwachstums. Das Ausschalten zentraler Regulatoren stellt dabei ein Problem des Ansatzes dar.

Um den Übergang von Heterotrophie zu Autotrophie erfolgreich zu meistern, ist eine massive transkriptionelle Umprogrammierung der Pflanzen notwendig (Silva *et al.*, 2017). Neben der Speicherstoffmobilisierung gehört dazu die Keimlingsentwicklung mit der Skoto-/Photomorphogenese. Dies zeigte sich in den Transkriptionsdaten aus den RNA-Seq Experimenten, bei denen im Dunkeln viele Gene an den Zeitpunkten (3dD, 4dD und 5dD) gleich reguliert wurden. Nach der Inkubation im Licht führte dies zu einer Verschiebung, denn Gene für die Chloroplasten-Biosynthese sind eng mit dem Phasenübergang von Dunkel nach Licht verknüpft. Daher wurde an Tag 5 (3dD2dL) eine große Anzahl an induzierten Genen gefunden. So ist für die Entwicklung von funktionsfähigen Chloroplasten neben dem Lichtstimulus eine Beteiligung von SnRK1 entscheidend. Darüber hinaus ist an der Bildung der Photosysteme unter anderem der LHC nötig. So wurde LHCB4.2 in 5 Wochen alten Blättern nach verlängerter Nacht SnRK1-abhängig phosphoryliert (Nukarinen *et al.*, 2016), während in den RNA-Seq Daten von Keimlingen die Transkription von *LHCB4.2* im Vergleich von WT und Mutante im Dunkeln reprimiert ist. Außerdem sind PIF und GLK2 in den RNA-Seq Daten im Vergleich von WT und Mutante SnRK1-abhängig reprimiert. Somit beeinflusst SnRK1 die Chloroplastenentwicklung (Kim *et al.*, 2017; Fitter *et al.*, 2002; Oh und Montgomery, 2014; Waters *et al.*, 2009). Dementgegen steht HY5, das die Chloroplastenentwicklung während des Lichtübergangs und der frühen Reifungsphasen fördert (Lee *et al.*, 2007). In den RNA-Seq Daten ist *HYH* an den Tag 3-5 im Dunkeln SnRK1-abhängig reprimiert. Im Licht wird die Transkription von *HYH* jedoch nicht SnRK1-abhängig reguliert. Die fehlende direkte transkriptionelle Regulation von *HY5* könnte daraus resultieren, dass die Proteinmenge von HY5 SnRK1-abhängig reguliert wird. Da die Transkription von *PIF3* in den RNA-Seq Daten in der Mutante reduziert ist und HY5 und HYH instabil sind, kann eine Chloroplastenentwicklung in den *snrk1α1/α2*-Keimlingen nicht stattfinden.

BBX25 und BBX28 sind Proteine, die ebenfalls die mit COP1 interagieren und an der Chloroplastenentwicklung beteiligt sind (Gangappa *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2018). Dabei ist die Transkription von *BBX28* sowohl im Licht als auch bei Dunkelheit

reprimiert. Die Transkription von BBX25 dagegen ist nur im Licht und an Tag 3 im Dunkeln reprimiert, außerdem an den Tagen 4 und 5 im Dunkeln induziert. Das bedeutet, dass die Transkription der beiden BBX Proteine SnRK1-abhängig reguliert wurde und dadurch die Interaktion mit HY5, die Photomorphogenese und die Chloroplastenentwicklung beeinträchtigt. Dies ist entscheidend, da sich Keimlinge nach dem Übergang von Dunkelheit zu Licht selbstständig durch Photosynthese mit Energie (Glukose) versorgen müssen.

6.3 Koordinierung der Mobilisierung von Speicherstoffen ist eine zentrale Funktion von SnRK1 während der Keimlingsentwicklung

Durch Supplementierung mit Glukose konnte ein Großteil der Phänotypen der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante, der indirekt durch Mangel an Ressourcen verursacht wurde, gerettet werden. Durch externe Glukosegabe wurde der Defekt im Wachstum aufgehoben und die *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante wies keine deutlich sichtbaren Unterschiede zum Wildtyp mit Glukose auf. Beide Genotypen wuchsen im Licht gleich und zeigten weder beim primären noch beim sekundären Wurzelwachstum Unterschiede. Ebenso hatten sie eine vergleichbare Hypokotyllänge und die Kotyledonen ergrün-ten und blieben bei kontinuierlicher Supplementierung grün und photosynthetisch aktiv. Allerdings war das Frischgewicht trotz der Glukosegabe an Tag 6 deutlich niedriger im Vergleich zum Wildtyp mit Glukose, was zeigt, dass es weitere SnRK1-abhängige Funktionen gibt, die nicht glukoseabhängig reguliert sind. Das zeigen auch die RNA-Seq Daten mit Glukose, bei denen eine große Anzahl an Genen differentiell exprimiert wird. So findet sich in den RNA-Seq Daten beispielsweise wieder PIF5, bei dem die Expression in der Mutante signifikant reduziert ist und somit weiterhin einen Effekt auf die Chloroplastenentwicklung hat. Dabei konnte nicht nur Glukose, unabhängig von der Konzentration, den Chlorophyllgehalt steigern und somit den Phänotyp retten. Auch Saccharose und Galaktose konnten den Phänotyp retten, nicht jedoch Mannitol und 3-O-Methyl-D-Glucopyranose (3-OMG), welche als osmotische Kontrolle eingesetzt wurden. Da die beiden letztgenannten Zucker nicht metabolisierbar sind, kann man davon ausgehen, dass es auch kein Glukosesignal war, das für die weitere Entwicklung sorgte, sondern Glukose als Energieträger.

3-OMG wird von Pflanzen aufgenommen und bindet an HXK1, führt aber nicht zu Veratmung und Biosynthese, kann jedoch sehr wohl phosphoryliert werden und akkumuliert dann in Zellen als 3-OMG-6-Phosphat (Cortes *et al.*, 2003). Bei Fütterung mit 3-OMG verhält sich der Katabolismus von Proteinen und Fetten in den Wurzel so wie in Organen bei Zuckermangel. Somit konnten SnRK1-Keimlinge mit Glukose, Saccharose und Raffinose als extern gegebene Energieträger gerettet werden. Da Fütterungen mit Fettsäuren (C8-Körper), Aminosäuren, Oxalacetat, PEP und Glycerin zu keiner Rettung des Phänotyps in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen führte, konnten anscheinend nur Kohlenhydrate für ein Ergrünen der Kotyledonen sorgen. Dass es sich um ein Problem der Aufnahme dieser Metaboliten handelt, kann für Aminosäuren ausgeschlossen werden, da Pedrotti *et al.* (2018) zeigen konnten, dass eine Fütterung mit BCAAs zu erhöhten Chlorophyllmengen im Vergleich zur Kontrolle führte. Um die Aufnahme von Fettsäuren zu erleichtern, wurden extra kurzkettige Fettsäuren verwendet. Pedrotti (2015) zeigte außerdem, dass zu hohe Konzentrationen von Fettsäuren toxisch waren. Auch Oxalacetat und PEP sollten von den Keimlingen aufgenommen worden sein, da diese Moleküle in ausreichender Menge zugegeben wurden (10 μ M). Aufgrund des Konzentrationsgradienten sollte es zu einer Aufnahme durch die Keimlinge gekommen sein. Da ohne externe Glukosefütterung morphologische Unterschiede bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen auftraten und durch Supplementierung behoben werden konnten, handelt es sich bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen um einen metabolischen Block, bei dem verschiedene Stoffwechselwege, die Metabolite in die Glukoneogenese einbringen, blockiert sein könnten, wie der Abbau von Fettsäuren oder Aminosäuren. Durch Supplementierung mit Fettsäuren oder Aminosäuren konnte die Mutante nicht gerettet werden. Das zeigt, dass die Regulation durch SnRK1 abwärts im Katabolismus der Reservestoffe liegt und durch mehrere regulatorische Elemente erfolgt. Nicht von dem metabolischen Block betroffen ist dabei die Glykolyse. So reichten schon geringe Konzentrationen von extern gegebener Glukose aus, um Chlorophyll zu bilden und photosynthetisch aktiv zu sein.

6.3.1 Kohlenhydrate sorgen für das erste Wachstum der Pflanze

Aus den Fütterungsexperimenten lässt sich eine metabolische Funktion von SnRK1 bei der Mobilisierung von Speicherstoffen schließen. Der Phänotyp der

snrk1 α 1/ α 2-Keimlinge konnte durch Fütterung mit Kohlenhydraten gerettet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass der Abbau von Kohlenhydraten nicht SnRK1-abhängig reguliert wird. Mit Hilfe von HPLC-MS Untersuchungen wurde gezeigt, dass es in den Samen keinen Unterschied in der Menge und Verfügbarkeit von Kohlenhydraten als Speicherstoffe gab. Der Ausgangsgehalt an Kohlenhydraten stimmte dabei im Wesentlichen mit den Daten von Baud *et al.* (2002) überein, wobei die Menge an Speicherstoffen von den Bedingungen der Samennachzucht abhängig war. Daher wurden in dieser Arbeit alle Experimente mit der gleichen Samennachzucht und dem gleichen Samenalter durchgeführt. Während es keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp im Licht (3dD3dL), Wildtyp im Dunkeln (6dD) und *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen im Dunkeln gab, war der Gehalt an Kohlenhydraten in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante im Licht signifikant reduziert. Daher hatte SnRK1 keinen Einfluss auf den Kohlenhydrat-Metabolismus im Dunkeln. Insgesamt gab es sehr wohl Unterschiede in den Mengen der einzelnen Kohlenhydrate. Während Saccharose nur beim Wildtyp im Dunkeln vorhanden war, wurde es in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante und beim Wildtyp im Licht metabolisiert. Das lässt darauf schließen, dass beim Wildtyp im Dunkeln SnRK1 den Metabolismus inhibiert, um weiterhin Reservestoffe zu haben, wenn der Keimling ins Licht kommt und die Photomorphogenese abschließt. Da kaum Fruktose gemessen wurde, erfolgte eine rasche Umwandlung in Glukose, die in der Glykolyse verstoffwechselt wurde. Dabei wurden weder die Verstoffwechslung von Saccharose noch die Umwandlung von Fruktose zu Glukose und die weiteren Schritte der Glykolyse entscheidend von SnRK1 reguliert. So steht ein großes Verhältnis von Glukose zu Saccharose für Zellteilung (Weber *et al.*, 1997). Eine interessante Fragestellung, die über das Thema dieser Arbeit hinausgeht, ist der Einfluss des Verhältnisses von Saccharose zu Hexose in den Keimlingen. Laut Weber *et al.* (1997) beeinflusst dieses Verhältnis den Kohlehydrat-Speicher-Weg. Dies erklärt jedoch nicht den noch vorhandenen Glukosegehalt bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen an Tag 6 in Dunkelheit. Da das Frischgewicht ab Tag 3 nicht weiter zunimmt und der Saccharosegehalt abnimmt, reichen der Pflanze die Vorräte vermutlich zum Erhalt ihrer Stoffwechselfunktionen ohne Wachstum aus. Interessant wäre eine Glukosefütterung bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 6 oder 7), um zu sehen, ob sich damit die Keimlinge ebenfalls retten lassen. In massenspektrometrischen Untersuchungen wurde bestätigt, dass bei *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen an Tag 7 in Dunkelheit noch Glukose vorhanden war. Offensichtlich konnte der Keimling die noch vorhandene Glukose nicht mehr verstoffwechseln. Die *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlinge

starben, wie auch im Licht, nach etwa sieben Tagen. Ein möglicher Grund für die Abnahme der Glukose bei Licht könnte sein, dass die Saccharose aufgebraucht ist und die Photosynthese noch nicht abläuft. Außerdem funktionieren der Abbau von Aminosäuren und TAGs nur eingeschränkt, was zur Folge hat, dass sich der Glukosespeicher leert und die Pflanze stirbt (Gommers und Monte, 2018). Nach dem Wechsel ins Licht konnte sich im Wildtyp der Photosyntheseapparat entwickeln und somit neue Energie erzeugen. Da die Entwicklung des Photosyntheseapparats in den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen gestört ist, konnte in diesen Pflanzen trotz Nachweis von Chlorophyll und Photonaktivität keine Photosynthese stattfinden. Insgesamt zeigt sich, dass Glukose als wichtiges Signal auch in *snrk1 α 1/ α 2*-Mutanten vorhanden ist. Die Menge reicht jedoch nicht aus, was dazu führt, dass der Glukosegehalt langfristig sinkt. Das korreliert wiederum mit der Abnahme an Chlorophyll sowie der Photonaktivität und führt zum Absterben der Mutanten. Außerdem sind viele Gene der Photosynthese in den RNA-Seq Daten in ihrer Expression SnRK1-abhängig reduziert. Das sorgt dafür, dass keine neuen funktionsfähigen Chloroplasten entstehen können. Somit geht die Energie der Glukosespeicher in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen im Licht zu Ende und kann offensichtlich auch nicht durch Abbau von TAGs und Aminosäuren über Glukoneogenese aufgefüllt werden. Dass Kohlenhydrate in ölhaltigen Pflanzen zuerst abgebaut werden, ist erstaunlich, da in den Samen überwiegend Öle und Fette gespeichert sind.

6.3.2 SnRK1 reguliert den Abbau von TAGs

In Arabidopsis liegen Öle und Fette in Form von TAGs vor. Sie waren in den Samen beider Genotypen gleich stark vertreten. In früheren Studien konnte ein ähnlicher TAG-Gehalt je Samen gemessen werden. Schwankungen lagen an unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und anderen Messmethoden (Li *et al.*, 2006). Da zunächst nur Kohlenhydrate zur Energiegewinnung verwendet wurden, blieb der TAG-Gehalt in Dunkelheit konstant und nahm erst später ab. Dabei erfolgte die Degradation in Wildtyppflanzen schneller als in der Mutante, unabhängig von der Verfügbarkeit von Licht. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Prozess des TAG-Abbaus um einen, anders als in der Literatur behauptet (Eastmond, 2006), lichtunabhängigen aber SnRK1-abhängigen Prozess handelt. Dies könnte daher kommen, dass durch die Abnahme des Glukosespeichers eine größere Energiemangelsituation herrscht und es daher auch ohne Licht zum Abbau von TAGs kommt. Um eine detailliertere Aussage darüber machen zu können, welche Enzyme am TAG-Abbau

SnRK1-abhängig reguliert sind, muss in weiteren Versuchen mit Enzymaktivität oder durch Phosphoproteomics geklärt werden. Kürzlich konnten Cai *et al.* (2020) zeigen, dass SDP1 durch AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 4 (AHL4) reguliert wird und den TAG-Abbau fördert. Außerdem konnten Kelly *et al.* (2011) zeigen, dass es bei einer *sdp1sdp1l*-Mutante zu einer vergleichbaren Abnahme des TAG-Gehalt kommt, wie dies für *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlinge gezeigt wurde. Da *SDP1* in den RNA-Seq Daten nur im Licht leicht SnRK1-abhängig reprimiert war und *SDP1L* kaum transkriptionell reguliert war, kann eine Modifikation von SDP1 und SDP1L auch post-translational erfolgt sein. Die Abnahme des TAG-Gehalts in den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen resultierte vermutlich daraus, dass es sich bei den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen um eine *knock-down*-Mutante handelte und eine Restaktivität vorhanden war. Diese Restaktivität resultierte von noch vorhandenem SnRK1 α 2, was jedoch unterhalb der Nachweisgrenze eines Western-Blots lag. In Protoplasten konnte der Promotor *SDP1* unterschiedlich durch Koexpression mit SnRK1 α 1 induziert werden. In einigen Versuchen konnte der Promotor gut, in anderen schlecht induziert werden. Dies lag unter anderem an seiner hohen Basisaktivität, wodurch Unterschiede sehr gering waren. Post-translationale Modifikationen beispielsweise Phosphorylierungen könnten in weiteren Experimenten über ein Phostag-Gel nachgewiesen werden und eine regulatorische Funktion erklären.

Neben der Regulation von SDP1 konnte auch eine SnRK1-abhängige transkriptionelle Regulation in der β -Oxidation bei ACX4 und PMDH2 nachgewiesen werden. So ist PMDH2 zwar kein direktes Enzym der β -Oxidation, stellte aber das wichtige Reduktionsäquivalent NAD⁺ zur Verfügung und wurde transkriptionell SnRK1-abhängig reguliert. An allen Tagen fand hier eine Repression der Transkription in den *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen statt, unabhängig von Licht oder Dunkelheit. Die SnRK1-abhängige Regulation konnte in Keimlingen und Protoplasten nachgewiesen werden. Allerdings ist noch unklar, welcher TF die Transkription steuert. Eine Beteiligung der TFs bZIP1, bZIP9, bZIP53 und bZIP63 kann ausgeschlossen werden, da die Regulation in der Vierfach-Mutante der des Wildtyps entsprach. Ein geeigneter TF könnte im Hochdurchsatz-PTA-Verfahren gefunden werden. Entscheidend ist, dass die β -Oxidation weiterlaufen kann und TAG-Abbaumetabolite in den Glyoxylatzyklus eingespeist werden können. Nach der β -Oxidation, dem Glyoxylat- und Zitratzyklus ist aus den abgebauten TAGs Oxalacetat entstanden, das durch PCK1 zu PEP umgewandelt wird. Wie Eastmond *et al.* (2015) gezeigt haben, wird PCK1 während der Keimung exprimiert. In Abwesenheit von SnRK1

ist die Transkription von *PCK1* in Dunkelheit in den RNA-Seq Daten reduziert, besonders an Tag 5. Folglich ist in Dunkelheit die Versorgung mit Energie durch den Abbau von TAG aufgrund der Reduktion der Transkription beeinträchtigt. Dies kann auch zu einem verkürztem Hypokotylwachstum führen. Eastmond *et al.* (2015) bestätigte, dass bei *pck1*-Mutanten nach fünf Tagen Dunkelheit das Hypokotylwachstum im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls signifikant reduziert war. Außerdem wurde in qRT-PCR-Analysen eine SnRK1-Abhängigkeit der PCK1 bestätigt, die durch Glukosegabe revertiert werden kann. Dass die SnRK1-Abhängigkeit in den RNA-Seq Daten im Licht nicht auftrat, liegt in der höheren Sensitivität der qRT-PCR begründet. Darüber hinaus konnte der *PCK1*-Promotor in Protoplasten durch Koexpression mit *SnRK1 α 1* induziert werden, wenn auch nur gering. Somit liegt der Regulation der PCK1 ein anderer Mechanismus als der PMDH2 und cyPPDK zugrunde. Mögliche TFs sind noch nicht bekannt und könnten ebenfalls im Hochdurchsatz-PTA-Verfahren gefunden werden. Da es sich hier um einen Engpass im Katabolismus von TAGs und teilweise Aminosäuren handelt, ist eine posttranslationale Regulation wahrscheinlich. Somit kann die Degradation von TAGs an verschiedenen Stellen von SnRK1 reguliert und an Umweltbedingungen angepasst werden. Für die Glukoneogenese gibt es neben dem Abbau von TAGs den Katabolismus von Aminosäuren.

6.3.3 Die Degradation von Aminosäuren und Proteinen wird massiv von SnRK1 reguliert

SSPs stehen den Pflanzen als dritte Energiequelle zur Verfügung. Zu Beginn der Keimung hatten beiden Genotypen in den Samen geringe Mengen an freien Aminosäuren zur Verfügung, was auch Baud *et al.* (2002) schon gezeigt haben. Während der Gehalt an freien Aminosäuren in der späten Phase des reifenden Samen abnahm, stieg das Proteingewicht zeitgleich an, was zu ca. 2/3 aus Samenspeicherproteinen bestand (Baud *et al.*, 2002). Bezogen auf trockene Samen und an Tag 0 konnten die Werte von Baud *et al.* (2002) mit Glutamin und Serin, als die am stärksten vertretenen Aminosäuren, bestätigt werden. Durch den Abbau von SSPs wird der Keimling mit Energie versorgt. Die Menge an SSPs war in trockenen Samen der beiden Genotypen vergleichbar (Fujiwara *et al.*, 2002). Der Abbau der SSPs durch Proteasen wurde von SnRK1 reguliert, was auch die länger sichtbaren Banden (Tag 2 und 3) der SSPs in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen zeigten. Während an Tag 3 im Wildtyp

wenige Globuline und Albumine vorhanden waren, konnten diese beiden Arten von SSPs in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen stärker nachgewiesen werden. Obwohl nicht bekannt ist, welche Proteinasen für den Abbau von SSPs verantwortlich sind, konnte in den RNA-Seq Daten eine Aspartat-Type-Endopeptidase (AT5G19120) gefunden werden, die an allen Tagen transkriptionell SnRK1-abhängig reprimiert war. Etwa 1/3 der SSPs werden von Pyruvat durch die cyPPDK zu PEP in Energie umgewandelt. Damit trägt cyPPDK entscheidend zur Energiegewinnung bei (Eastmond *et al.*, 2015). Auch in den *snrk1 α 1/ α 2*-Mutanten war die Transkription von cyPPDK deutlich reprimiert, was auf eine SnRK1-Abhängigkeit schließen lässt. In Transkriptomanalysen zeigten außerdem *pck1-ppdk*-Doppelmutanten *Sugar-Starvation responses*, was ebenfalls als Hinweis auf die Beteiligung von SnRK1 gewertet werden kann (Eastmond *et al.*, 2015). Normalerweise ist die Transkription von cyPPDK bei verlängerter Nacht oder dunkelinduzierter Seneszenz induziert (Lin und Wu, 2004; Parsley und Hibberd, 2006). Durch die SnRK1-bedingte fehlende Aktivierung der Transkription von cyPPDK und der damit verbundenen Abwesenheit von PPK lassen sich die geringen Mengen an freien Aminosäuren von Serin und Threonin in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen nicht erklären. Der Gehalt von freien Aminosäuren bis einschließlich Tag 2 zeigte keinen signifikanten Unterschied. Daher ist noch zu klären, was mit der Energie bzw. den Abbauprodukten von SSPs geschehen ist. Mögliche Ursachen dafür sind: 1) Der Abbau von SSPs war in der Mutante geringer, was zu einer Verschiebung des Aminosäure-Pools führte. 2) Freie Aminosäuren wurden nach der Degradation aus SSPs weiter zu anderen Aminosäuren umgesetzt. 3) Freie Aminosäuren wurden dem Zitratzyklus zur ATP-Gewinnung zugeführt und konnten somit nicht gemessen werden.

Der Aminosäuregehalt in wildtypischen Pflanzen in Dunkelheit war signifikant geringer als von Pflanzen im Licht (3dD3dL). Offenbar war durch die Dunkelheit und der damit nicht stattfindenden Photosynthese die Synthese von Aminosäuren beeinträchtigt. Da der Aminosäuregehalt sowohl bei Licht als auch bei Dunkelheit in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert war, zeigte deutlich, dass der Aminosäuregehalt licht- und SnRK1-abhängig reguliert war. Die hohen Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin (Gln) und Asparagin (Asn) sind zwar wichtige Transportformen für Stickstoff und Kohlenstoff (Monné *et al.*, 2019), jedoch können diese nicht nur durch den Abbau von SSPs erklärt werden. Somit muss auch die Expression von Genen (GLUTAMINE SYNTHETASE 1 (GLN1) oder ASN1) bzw. die Synthese von SnRK1 reguliert werden, was die

RNA-Seq Daten belegen. So war beispielsweise die Transkription von *GLN1* an Tag 5 induziert. Gleichzeitig war die Umwandlung von Glutamin zu Glutamat durch *GLU2* bzw. *GLUTAMATE SYNTHASE 1 (GLT1)* kaum reguliert, was den Anstieg der Glutaminmenge erklären würde. Die Transkription von *ASN1* war an den Tagen 4 und 5 deutlich SnRK1-abhängig reduziert, was den hohen Gehalt an Glutamin erklären kann. Da vermutlich eine Restaktivität von SnRK1 vorhanden war, konnte eine gewisse Menge Glutamin in Asparagin umgewandelt werden.

Durch Versuche in Blättern bei verlängerter Nacht wurde bereits gezeigt, dass der Abbau von BCAAs transkriptionell SnRK1-abhängig war (Pedrotti *et al.*, 2018). So war die Transkription von *BCAT2*, *MCCA*, *MCCB* und *ETFQO* in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp reduziert, wodurch keine ATP-Gewinnung aus BCAAs mehr stattfindet. Diese Regulation konnte jetzt ebenfalls für die Keimlingsentwicklung gezeigt werden, was bestätigt, dass der Abbau von BCAAs auch für die ATP-Gewinnung während der Samenkeimung wichtig ist. Allerdings stiegen die Mengen der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen nicht an. Eine mögliche Begründung dafür könnten die fehlenden Substrate Threonin und Pyruvat sein. Pyruvat könnte für die Glukoneogenese verwendet werden und würde somit nicht für die Synthese von Leucin und Valin zur Verfügung stehen. Außerdem könnte die Neusynthese von Aminosäuren erst dann beginnen, wenn die Menge der freien Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin abnimmt.

Neben den Genen *BCAT2*, *MCCA* und *MCCB* wurden auch bZIP TFs transkriptionell SnRK1-abhängig reguliert, wie bZIP63, der in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen bei Dunkelheit transkriptionell reprimiert war. Bereits gezeigt wurde, dass bZIP63 beim Abbau von BCAAs beteiligt ist (Pedrotti *et al.*, 2018), indem es an den Promotor von *ETFQO* bindet und diesen zusammen mit bZIP2 induziert. Somit kontrolliert bZIP63 direkt den Metabolismus der BCAAs und trägt bereits hier zur Energiegewinnung bei.

So gibt es bei der Mobilisierung von Speicherstoffen einige Gene, die von der zentral-metabolischen Kinase SnRK1 reguliert werden, wie cyPPDK, *MCCA*, *MCCB* und *BCAT2*, und zur Aufrechterhaltung des Energiehaushalts beitragen.

6.4 SnRK1-abhängige Regulation von TFs während der Keimlingsentwicklung

Ein bekannter TF in der Keimung ist beispielsweise WRKY6 (Huang *et al.*, 2016). Die Transkription dieses TF war in den RNA-Seq Daten an allen Tagen bis auf Tag 5 im Licht induziert, womit die SnRK1-Abhängigkeit des TF gezeigt ist. Außerdem war die RAV1-Expression im Dunkeln in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen reduziert, was zu einer verringerten Repression von ABI3-5 führte und dadurch die Keimlingsbildung förderte, da ABI-Gene im Dunkeln SnRK1-reguliert waren und speziell die Transkription von ABI4 induziert war. Auch MYB96 ist ein TF, dessen Expression sowohl in den RNA-Seq Daten als auch in qRT-PCR Experimenten während der Keimung an allen Tagen SnRK1-abhängig reduziert war. So regulierte MYB96 direkt die Expression von *ABI4*. *ABI4* wirkte in der Kontrolle der Samenkeimung epistatisch zu MYB96 (Lee *et al.*, 2015). Da *ABI4* auch als Repressor des Lipidabbaus wirkte, regulierte das Zusammenspiel von *ABI4*-MYB96 speziell im Embryo die Lipidmobilisierung, um eine korrekte Keimung der Samen bei suboptimalen Bedingungen zu gewährleisten (Lee *et al.*, 2015). So gibt es verschiedene TF-Familien, die die Genexpression SnRK1-abhängig regulieren und für die Keimung und Mobilisierung von Speicherstoffen sorgen. Aus den RNA-Seq Daten können daher auch SnRK1-abhängige TF gewonnen werden (vgl. Tabelle A.10). So war die Transkription von den Mitgliedern der bZIP-Gruppe E, bZIP34 und bZIP61, in *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen reduziert. Während bZIP34 in den RNA-Seq Daten nur in Dunkelheit transkriptionell reprimiert war, zeigten qRT-PCR-Analysen, dass die Expression des TF auch im Licht SnRK1-abhängig reprimiert war und durch Glukosegabe aufgehoben werden konnte. Die Expression des TF bZIP61 war in den RNA-Seq Daten und in der qRT-PCR sowohl im Licht als auch in Dunkelheit reprimiert und konnte ebenfalls durch Glukosegabe revertiert werden. Die genauen Interaktionspartner von bZIP34 und bZIP61 sind zwar noch nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass sie mit bZIP-TFs der Gruppen I und S interagieren können (Shen *et al.*, 2007). Erste Versuche mit den Einzelmутanten *bzip34* und *bzip61* sowie mit der erstellten Doppelmutante *bzip34bzip61* zeigten in einem Keimungsexperiment keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp (Henninger, unveröffentlicht). Dies könnte daran liegen, dass der Heterodimerisierungspartner das Fehlen des TF ausgleichen kann. Möglich wäre auch, dass die TFs bZIP34 und bZIP61 in der β -Oxidation oder Keimlingsentwicklung von Bedeutung sind. Hier sind allerdings noch weitergehende

Untersuchungen nötig, beispielsweise eine ChIP-Seq von einem bzw. beiden TFs, um mögliche Zielgene zu finden.

6.5 bZIP63 hat entscheidenden Einfluss auf den Aminosäurekatabolismus in der Keimlingsentwicklung

Da neben PMDH2, MCCA und cyPPDK auch TFs in den qRT-PCR Daten koreguliert waren, konnten auf diese Weise ebenfalls TF-Kandidaten für Zielgene gefunden werden. So konnte gezeigt werden, dass bZIP63 mit den genannten Genen während der Keimlingsbildung koreguliert wird. Bereits gezeigt wurde, dass unter Energiemangelbedingungen, wie längere Dunkelheit, alternative Substrate benötigt werden. Diese werden entweder im Zitratzyklus weiter oxidiert oder zur Erzeugung von Elektronen verwendet, welche dann über ETFQO direkt auf die mitochondriale Elektronentransportkette übertragen werden (Araújo *et al.*, 2011). Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Degradation von BCAAs, um damit Elektronen über ETFQO an die mitochondriale Elektronentransportkette (mETC) zu spenden. So sind Aminosäuren alternative Substrate, die dafür sorgen, die Atmung bei Kohlenhydratmangel aufrechtzuerhalten (Cavalcanti *et al.*, 2017). Die SnRK1-Abhängigkeit der ETFQO konnte auch in den RNA-Seq Daten nachgewiesen werden, in denen die Transkription im Vergleich von Wildtyp und Mutante an allen Tagen reprimiert war. So schlugen Hanson *et al.* (2008), Dietrich *et al.* (2011) und Hartmann *et al.* (2015) eine funktionelle Verbindung von SnRK1 über bZIP-TFs vor, die den Aminosäureabbau, besonders von Pro- und BCAAs, reguliert. Pedrotti *et al.* (2018) zeigten, dass ETFQO direkt Elektronen in die mETC einschleusen konnte und als Zielgen von bZIP63 identifiziert wurde. Dadurch wurde eine funktionelle Verbindung zwischen SnRK1 und mitochondrialem Energiestoffwechsel in Blättern bei verlängerter Dunkelheit gezeigt. In dieser Arbeit konnte eine weitere Verbindung zwischen SnRK1 und dem Aminosäureabbau zur Aufrechterhaltung der Glukoneogenese gezeigt werden. In *bzip63*-Mutanten war die Expression von *cyPPDK* in Keimlingen deutlich reduziert und auch die RNA-Seq Daten zeigten deutlich, dass die Transkription von *cyPPDK*, bis auf Tag 3, reduziert war. Dies passt auch zu Daten von Baena-González *et al.* (2007), die in Protoplasten zeigen konnten, dass die Expression von *cyPPDK* bei Koexpression von SnRK1 α 1, bei verlängerter Nacht und bei

Energie- bzw. Saccharosemangel induziert war. Ebenso war die Transkription von *bZIP63* in den RNA-Seq Daten im Dunkeln reduziert, was sich mit Daten von Mair *et al.* (2015) deckt, die gezeigt haben, dass die Expression von *bZIP63* SnRK1-abhängig war und bZIP63 von SnRK1 α 1 phosphoryliert wurde. Zudem zeigten Protoplasten-Transaktivierungs-Assays, dass bZIP63 den *cyPPDK*-Promotor zwar alleine signifikant induzieren konnte, allerdings sehr schwach. Dies könnte daran liegen, dass bZIP63 für eine stärkere Aktivierung einen Heterodimerisierungspartner benötigt. Bei Koexpression von *bZIP63* und *SnRK1* konnte der *cyPPDK*-Promotor am stärksten induziert werden. Das legt nahe, dass es eine Verbindung zwischen bZIP63 und cyPPDK in Anwesenheit von SnRK1 gibt. Durch ChIP_{PCR} Experimente in Keimlingen konnte eine direkte Bindung von bZIP63 höchst wahrscheinlich über G-Box 4 an den *cyPPDK*-Promotor gezeigt werden. Die G-Boxen liegen im *cyPPDK*-Promotor sehr nahe beieinander und konnten durch die Kräfte beim Scheren der DNA nicht komplett voneinander getrennt werden. Somit gab es DNA-Fragmente mit mehreren G-Boxen. Zudem liegen manche G-Boxen so eng beieinander, dass die Oligonukleotide für die ChIP_{PCR} mehrere G-Boxen abdecken. Allerdings belegten sowohl die ChIP_{PCR} als auch die Mutationskartierung in den Protoplasten, dass die Bindung von bZIP63 an den *cyPPDK*-Promotor über G-Box 4 erfolgte. Mechanismus und Heterodimerisierungspartner sind jedoch noch unbekannt. Sollte es sich um den gleichen Mechanismus wie bei ETFQO handeln, so müsste nach dem Modell von Pedrotti *et al.* (2018) eine SnRK1-abhängige bZIP63 Phosphorylierung zur Heterodimerisierung und Komplexbildung am Chromatin führen. Dies ließe sich entweder in transgenen *bzip63*-Alaninmutantenpflanzen oder in Protoplasten mit einer bZIP63 Alanin-Mutante (S29A/S294A/S300A) abklären. Dann dürfte es im Vergleich zum Wildtyp keine Induktion der Expression geben und das Niveau müsste auf dem von *bzip63* Protoplastenpflanzen liegen.

Ob die Translokation der aktiven SnRK1-Kinase ausreicht, um Gene anzuschalten oder zusätzlich noch aktiviert werden muss, konnte nicht abschließend aufgeklärt werden (Ramon *et al.*, 2019). Würde die Kinaseaktivität steigen, so müsste die Steigerung in den durchgeführten semi in vitro Phosphorylierungsergebnissen zu sehen sein. Erste Ergebnisse zeigten einen leichten Anstieg der Aktivität von SnRK1 im Zytosol an den Tagen 3 und 4 bei Dunkelheit sowie im Kern an Tag 4 im Licht. Dies deckt sich mit der Lokalisierung von SnRK1 α 1 im Kern. Die Wiederholbarkeit des Aktivitätstest in dieser Arbeit ist allerdings schwierig, da ein Abgleich der Phosphorylierung über dasselbe Peptid gemacht werden muss und somit der

Western-Blot von vorherigen Antikörpern befreit werden muss. Dabei können nicht alle bindenden Antikörper entfernt werden oder es wird zusätzlich Protein entfernt, was eine weitere Auswertung erschwert. Außerdem ist der dynamische Bereich des Systems nicht groß genug, was eine weitere Schwäche dieses Tests darstellt. Verbesserte Linien könnten hier Abhilfe schaffen. Die Vorteile dieses Systems überwiegen dennoch, da kein radioaktivmarkiertes Phosphor verwendet werden muss und der Test *in vitro* durchgeführt werden kann. Zudem deuten Ergebnisse des Kinaseassays darauf hin, dass die Aktivität im Kern ansteigt und somit aktiviertes SnRK1 für die Induktion von Genen ausreicht. Allerdings könnte der *cyPPDK*-Promotor durch den Heterodimerisierungspartner trotzdem induziert werden, wenn dieser es schafft, ohne bZIP63 die Expression zu steigern. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Frage, ob auch C/S1-bZIP-TFs den *cyPPDK*-Promotor induzieren können. Hartmann *et al.* (2015) zeigten, dass eine Vierfach-Mutante (*bzip1/53/10/25*) den Promotor nicht mehr induzieren kann. In den RNA-Seq Daten war außerdem die Transkription von *bZIP1* im Dunkeln reduziert und im Licht nicht SnRK1-abhängig reguliert. Da bZIP63 auch mit TFs der Gruppen G und I heterodimerisiert, konnte in den RNA-Seq Daten lediglich für drei TFs dieser Gruppen eine SnRK1-abhängig regulierte Transkription festgestellt werden. Die Transkription von *bZIP52* aus der Gruppe I wurde im Dunkeln und an Tag 4 im Licht SnRK1-abhängig reduziert und an Tag 5 im Licht induziert. Von bZIP41 (GBF1) war die Transkription an allen Tagen SnRK1-abhängig reduziert und von bZIP54 (GBF2) an den Tagen 3 im Dunkeln und 4 im Licht induziert und an den anderen Tagen (4+5 im Dunkeln, 5 im Licht) reduziert. Somit kann bZIP63, in Abhängigkeit von SnRK1, an den *cyPPDK*-Promotor über G-Box 4 binden und diesen während der Keimlingsentwicklung induzieren. Dadurch können Aminosäuren über Glukoneogenese zu Zuckern aufgebaut werden und stehen damit für die weitere Verwendung in der Pflanze zur Verfügung.

6.6 Zusammenfassendes Modell und Ausblick

Während der Keimlingsentwicklung liegt im Samen vermutlich eine Energiemangelsituation durch die Abnahme von Saccharose vor und SnRK1 ist aktiv. Allerdings bleibt die Frage offen, wie SnRK1 aktiviert wird. Dies könnte über die Verringerung der Saccharosekonzentration erfolgen, welche über T6P gemessen wird (Lunn *et al.*, 2014). Bei Abnahme der Saccharosekonzentration entfällt die Inhibierung von

abnimmt und gleichzeitig die Menge/Aktivität von SnRK1 steigt. Zum Wiederherstellen der Homöostase werden TAGs, Samenspeicherproteine und Aminosäuren degradiert. Da dies nicht unbedingt über die Transkription reguliert sein muss, sind hier weitere Untersuchungen, insbesondere Phosphoproteomics oder Kinase-Assays mit zentralen Enzymen der Speicherstoffmobilisierung, notwendig, um diese Fragen zu klären. Hier könnte eine Messung von Metaboliten des Zitratzyklus Aufschluss geben, an welcher Stelle sich der Katabolismus zwischen *snrk1 α 1/ α 2*-Keimlingen und dem Wildtyp unterscheidet. Da bZIP63 unter Mangelbedingungen transkriptionell und durch Phosphorylierung post-translational aktiviert wird, kann dieser zusammen mit SnRK1 an den cytosolischen *PPDK*-Promotor binden, diesen induzieren und somit zu einer erhöhten Umwandlung von Pyruvat zu PEP führen. Dieses geht schließlich in die Glukoneogenese ein und führt zu einem Anstieg von Glukose (vgl. Abbildung 6.1). Ob allerdings eine Phosphorylierung von bZIP63 notwendig für die Bindung an den *cyPPDK*-Promotor ist, konnte noch nicht bestätigt werden. Sie wurde aber von Pedrotti *et al.* (2018) für den Abbau von BCAAs bei verlängerter Nacht in Blättern gezeigt. Dies könnte mit Pflanzen, in denen die SnRK1-vermittelte Phosphorylierung von bZIP63 durch bZIP63-Alanin-Austauschmutanten unterbunden wurde, getestet werden. Ebenfalls unbekannt ist der Heterodimerisierungspartner von bZIP63, der den *cyPPDK*-Promotor induzieren kann. Die durch Aminosäure- und TAG-Katabolismus gewonnene Energie kann der Keimling für Wurzel- und Hypokotylwachstum sowie für die Ausbildung eines funktionierenden Photosyntheseapparats nutzen.

Insgesamt tragen die in dieser Dissertation gewonnen Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Samenkeimung beim Übergang von Heterotrophie zu Autotrophie, einer kritischen Phase im pflanzlichen Lebenszyklus, bei und sind für die Landwirtschaft, vor allem bei der Ertragssteigerung, von Bedeutung.

7 Literatur

- Abate, Georgia *et al.* (Mai 2012). “Snf1/AMPK regulates Gcn5 occupancy, H3 acetylation and chromatin remodelling at *S. cerevisiae* ADY2 promoter.” *Biochimica et biophysica acta* 1819 (5), S. 419–427.
- Abbas, AK, AH Lichtman und JS Pober (1991). *Cellular and Molecular Immunology*.
- Araújo, Wagner L *et al.* (Sep. 2011). “Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants.” *Trends in plant science* 16 (9), S. 489–498.
- Avery, O T, C M Macleod und M McCarty (1944). “STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III”. *J Exp Med* 79.2, S. 137–58.
- Avila-Castañeda, Alejandra *et al.* (2014). “Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKIN β 2 and AKIN β γ .” *Frontiers in plant science* 5, S. 199.
- Avila-Ospina, Liliana *et al.* (Juli 2014). “Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling.” *Journal of experimental botany* 65 (14), S. 3799–3811.
- Avin-Wittenberg, Tamar *et al.* (Feb. 2015). “Global analysis of the role of autophagy in cellular metabolism and energy homeostasis in Arabidopsis seedlings under carbon starvation.” *The Plant cell* 27 (2), S. 306–322.
- Baena-González, Elena und Johannes Hanson (Feb. 2017). “Shaping plant development through the SnRK1-TOR metabolic regulators.” *Current opinion in plant biology* 35, S. 152–157.
- Baena-González, Elena und Jen Sheen (Sep. 2008). “Convergent energy and stress signaling.” *Trends in plant science* 13 (9), S. 474–482.
- Baena-González, Elena *et al.* (Aug. 2007). “A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling.” *Nature* 448 (7156), S. 938–942.
- Bajracharya, D. und P. Schopfer (Jan. 1979). “Effect of light on the development of glyoxysomal functions in the cotyledons of mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings.” *Planta* 145 (2), S. 181–186.
- Barratt, DH Paul *et al.* (2009). “Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.31, S. 13124–13129.
- Baud, Sébastien *et al.* (2002). “An integrated overview of seed development in Arabidopsis thaliana ecotype WS”. *Plant Physiology and Biochemistry* 40.2, S. 151–160.

- Behe, Michael J (Dez. 2010). “Experimental evolution, loss-of-function mutations, and ” the first rule of adaptive evolution ” .” *The Quarterly review of biology* 85 (4), S. 419–445.
- Bender, D.A. (2012). *Amino Acid Metabolism*. 3rd. New York: Wiley- Blackwell.
- Bent, A F (2000). “Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species”. *Plant Physiol* 124.4, S. 1540–7.
- Berg, Jeremy (2007). *Biochemie*. Heidelberg: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.
- Bewley, J Derek (1997). “Seed germination and dormancy.” *The plant cell* 9.7, S. 1055.
- Bitrián, Marta *et al.* (März 2011). “BAC-recombineering for studying plant gene regulation: developmental control and cellular localization of SnRK1 kinase subunits.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65 (5), S. 829–842.
- BLIGH, E G und W J DYER (1959). “A rapid method of total lipid extraction and purification”. *Can J Biochem Physiol* 37.8, S. 911–7.
- Bolhar-Nordenkamp, H. R., S. P. Long und E. G. Lechner (1989). “The determination of the photosynthetic capacity using chlorophyll fluorescence to measure stress levels in trees”. *Phyton (Austria)* 29.1, S. 119–135.
- Brady, Siobhan M *et al.* (2007). “A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns”. *Science* 318.5851, S. 801–6.
- Bresinsky, Andreas (2008). *Lehrbuch der Botanik*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Broeckx, Tom, Sander Hulsmans und Filip Rolland (Dez. 2016). “The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function.” *Journal of experimental botany* 67 (22), S. 6215–6252.
- Brooks, Matthew D und Krishna K Niyogi (2011). “Use of a pulse-amplitude modulated chlorophyll fluorometer to study the efficiency of photosynthesis in Arabidopsis plants”. In: *Chloroplast Research in Arabidopsis*. Springer, S. 299–310.
- Cai, Guangqin *et al.* (Apr. 2020). “Transcriptional Regulation of Lipid Catabolism During Seedling Establishment.” *Molecular plant*. aheadofprint.
- Campbell Neil A.; Reece, Jane B. (2009). *Biologie*. Addison-Wesley Verlag.
- Carlson, Marc (2019a). *org.At.tair.db: Genome wide annotation for Arabidopsis*. R package version 3.10.0.
- Carlson, Marc (2019b). *org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human*. R package version 3.10.0.

- Cavalcanti, João Henrique F. *et al.* (Dez. 2017). “Differential impact of amino acids on OXPHOS system activity following carbohydrate starvation in Arabidopsis cell suspensions.” *Physiologia plantarum* 161 (4), S. 451–467.
- Chapman, Kent D., John M. Dyer und Robert T. Mullen (Feb. 2012). “Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man.” *Journal of lipid research* 53 (2), S. 215–226.
- Chen, Liang *et al.* (2017). “The AMP-Activated Protein Kinase KIN10 Is Involved in the Regulation of Autophagy in Arabidopsis.” *Frontiers in plant science* 8, S. 1201.
- Cho, Hsing-Yi *et al.* (Apr. 2016). “Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in Arabidopsis under submergence.” *Journal of experimental botany* 67 (9), S. 2745–2760.
- Cho, Young-Hee und Sang-Dong Yoo (Jan. 2011). “Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in Arabidopsis thaliana.” *PLoS genetics* 7 (1), e1001263.
- Cho, Young-Hee *et al.* (Apr. 2012). “Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development.” *Plant physiology* 158 (4), S. 1955–1964.
- Chumakov, K M (1994). “Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation”. *PCR Methods Appl* 4.1, S. 62–4.
- Clough, S J und A F Bent (1998). “Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana”. *Plant J* 16.6, S. 735–43.
- Cone, JW und CJP Spruit (1983). “Imbibition conditions and seed dormancy of Arabidopsis thaliana”. *Physiologia Plantarum* 59.3, S. 416–420.
- Cortes, Sandra *et al.* (2003). “In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar”. *Plant Physiology* 131.2, S. 824–837.
- Crepin, Nathalie und Filip Rolland (Okt. 2019). “SnRK1 activation, signaling, and networking for energy homeostasis.” *Current opinion in plant biology* 51, S. 29–36.
- Crozet, Pierre *et al.* (Apr. 2010). “Cross-phosphorylation between Arabidopsis thaliana sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities.” *The Journal of biological chemistry* 285 (16), S. 12071–12077.
- Crozet, Pierre *et al.* (Jan. 2016). “SUMOylation represses SnRK1 signaling in Arabidopsis.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 85 (1), S. 120–133.
- David L. Nelson, Michael M. Cox (21. Nov. 2012). *Lehninger Principles of Biochemistry*. WORTH PUBL INC. 1340 S.

- Dekkers, S.J.W. (Jan. 2006). "Sugar signalling during germination and early seedling establishment in Arabidopsis".
- Dietrich, Katrin *et al.* (Jan. 2011). "Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress." *The Plant cell* 23 (1), S. 381–395.
- Distelfeld, Assaf, Raz Avni und Andreas M. Fischer (Juli 2014). "Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley." *Journal of experimental botany* 65 (14), S. 3783–3798.
- Doyle J.J. Doyle, J.L. (1990). "Isolation of plant DNA from fresh tissue". *Focus* 12.1, S. 13–15.
- Dröge-Laser, Wolfgang und Christoph Weiste (Mai 2018). "The C/S₁ bZIP Network: A Regulatory Hub Orchestrating Plant Energy Homeostasis." *Trends in plant science* 23 (5), S. 422–433.
- Dröge-Laser, Wolfgang *et al.* (Okt. 2018). "The Arabidopsis bZIP transcription factor family—an update." *Current opinion in plant biology* 45 (Pt A), S. 36–49.
- Eastmond, Peter J (März 2006). "SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds." *The Plant cell* 18 (3), S. 665–675.
- Eastmond, Peter J. *et al.* (Apr. 2015). "Arabidopsis uses two gluconeogenic gateways for organic acids to fuel seedling establishment." *Nature communications* 6, S. 6659.
- Eckstein, Aleksandra *et al.* (Aug. 2016). "Mobilization of storage materials during light-induced germination of tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds." *Plant physiology and biochemistry : PPB* 105, S. 271–281.
- Ehlert, Andrea *et al.* (Juni 2006). "Two-hybrid protein-protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors." *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (5), S. 890–900.
- Emanuelle, Shane *et al.* (Apr. 2015). "SnRK1 from Arabidopsis thaliana is an atypical AMPK." *The Plant journal : for cell and molecular biology* 82 (2), S. 183–192.
- Engqvist, Martin *et al.* (Sep. 2009). "Two D-2-hydroxy-acid dehydrogenases in Arabidopsis thaliana with catalytic capacities to participate in the last reactions of the methylglyoxal and beta-oxidation pathways." *The Journal of biological chemistry* 284 (37), S. 25026–25037.
- Eveland, Andrea L. und David P. Jackson (Mai 2012). "Sugars, signalling, and plant development." *Journal of experimental botany* 63 (9), S. 3367–3377.

- Fallahi, Hossein *et al.* (2008). “Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development.” *Journal of experimental botany* 59 (12), S. 3283–3295.
- Finch-Savage, W E und G W Bassel (2016). “Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation”. *J Exp Bot* 67.3, S. 567–91.
- Finch-Savage, William E. und Gerhard Leubner-Metzger (2006). “Seed dormancy and the control of germination.” *The New phytologist* 171 (3), S. 501–523.
- Fitter, David W. *et al.* (Sep. 2002). “GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 31 (6), S. 713–727.
- Fox, John und Sanford Weisberg (2019). *An R Companion to Applied Regression*. Third. Thousand Oaks CA: Sage.
- Frank, Alexander *et al.* (Aug. 2018). “Circadian Entrainment in *Arabidopsis* by the Sugar-Responsive Transcription Factor bZIP63.” *Current biology : CB* 28 (16), 2597–2606.e6.
- Froeschel, C. (2016). “Genomweite Analyse der zellschichtspezifischen Expression in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Inokulation mit pathogenen und mutualistischen Mikroorganismen”. Diss. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Fujiwara, Toru *et al.* (2002). “Storage proteins.” *The arabidopsis book* 1, e0020.
- Galili, Gad *et al.* (2014). “The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development.” *Frontiers in plant science* 5, S. 447.
- Gangappa, Sreeramaiah N. *et al.* (Apr. 2013). “The *Arabidopsis* B-BOX protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating BBX22 expression to suppress seedling photomorphogenesis.” *The Plant cell* 25 (4), S. 1243–1257.
- Garcia, Daniel und Reuben J Shaw (Juni 2016). “AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance.” *Molecular cell* 66 (6), S. 789–800.
- Germain, V *et al.* (Okt. 2001). “Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 28 (1), S. 1–12.
- Gibson, U E, C A Heid und P M Williams (1996). “A novel method for real time quantitative RT-PCR”. *Genome Res* 6.10, S. 995–1001.
- Gissot, Lionel *et al.* (Nov. 2006). “AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence.” *Plant physiology* 142 (3), S. 931–944.

- Glab, Nathalie *et al.* (März 2017). “The impact of *Arabidopsis thaliana* SNF1-related-kinase 1 (SnRK1)-activating kinase 1 (SnAK1) and SnAK2 on SnRK1 phosphorylation status: characterization of a SnAK double mutant.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 89 (5), S. 1031–1041.
- Gohel, David *et al.* (2020). *gdtools: Utilities for Graphical Rendering*. R package version 0.2.2.
- Gommers, Charlotte M M und Elena Monte (Feb. 2018). “Seedling Establishment: A Dimmer Switch-Regulated Process between Dark and Light Signaling.” *Plant physiology* 176 (2), S. 1061–1074.
- Graham, Ian A (2008). “Seed storage oil mobilization.” *Annual review of plant biology* 59, S. 115–142.
- Graves, Spencer, Hans-Peter Piepho und Luciano Selzer (2019). *multcompView: Visualizations of Paired Comparisons*. R package version 0.1-8.
- Hanson, Johannes *et al.* (März 2008). “The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 53 (6), S. 935–949.
- Hardie, D Grahame und Kei Sakamoto (Feb. 2006). “AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle.” *Physiology (Bethesda, Md.)* 21, S. 48–60.
- Hardie, D Grahame, Bethany E Schaffer und Anne Brunet (März 2016). “AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs.” *Trends in cell biology* 26 (3), S. 190–201.
- Hartmann, Laura (2014). “Die funktionelle Rolle der Transkriptionsfaktoren bZIP1 und bZIP53 in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel nach Salzstress”. Diss. Julius-Maximilians-Universität.
- Hartmann, Laura *et al.* (Aug. 2015). “Crosstalk between Two bZIP Signaling Pathways Orchestrates Salt-Induced Metabolic Reprogramming in *Arabidopsis* Roots.” *The Plant cell* 27 (8), S. 2244–2260.
- Hayashi, M *et al.* (Feb. 1998). “2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation.” *The Plant cell* 10 (2), S. 183–195.
- Hedbacker, Kristina und Marian Carlson (Jan. 2008). “SNF1/AMPK pathways in yeast.” *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, S. 2408–2420.
- Herrera-Estrella, L *et al.* (1992). “Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. 1983”. *Biotechnology* 24, S. 377–81.

- Hervé, Maxime (2020). *RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics*. R package version 0.9-75.
- Hildebrandt, Tatjana M *et al.* (Nov. 2015). “Amino Acid Catabolism in Plants.” *Molecular plant* 8 (11), S. 1563–1579.
- Hu, Jianping *et al.* (Juni 2012). “Plant peroxisomes: biogenesis and function.” *The Plant cell* 24 (6), S. 2279–2303.
- Huang, A. H. (Apr. 1996). “Oleosins and oil bodies in seeds and other organs.” *Plant physiology* 110 (4), S. 1055–1061.
- Huang, Anthony HC (1992). “Oil bodies and oleosins in seeds”. *Annual review of plant biology* 43.1, S. 177–200.
- Huang, Da Wei, Brad T. Sherman und Richard A. Lempicki (2009). “Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.” *Nature protocols* 4 (1), S. 44–57.
- Huang, Xi, Xinhao Ouyang und Xing Wang Deng (Okt. 2014). “Beyond repression of photomorphogenesis: role switching of COP/DET/FUS in light signaling.” *Current opinion in plant biology* 21, S. 96–103.
- Huang, Yun *et al.* (Feb. 2016). “Arabidopsis WRKY6 Transcription Factor Acts as a Positive Regulator of Abscisic Acid Signaling during Seed Germination and Early Seedling Development.” *PLoS genetics* 12 (2), e1005833.
- Huntley, Melanie A. *et al.* (Dez. 2013). “ReportingTools: an automated result processing and presentation toolkit for high-throughput genomic analyses.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (24), S. 3220–3221.
- Hurst, H. C. (1995). “Transcription factors 1: bZIP proteins.” *Protein profile* 2 (2), S. 101–168.
- Inoue, H, H Nojima und H Okayama (1990). “High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids”. *Gene* 96.1, S. 23–8.
- J. Derek Bewley, Michael Black (31. Juli 1994). *Seeds*. Springer US. 464 S.
- Jain, Vanita, Werner Kaiser und Steven C. Huber (Mai 2008). “Cytokinin inhibits the proteasome-mediated degradation of carbonylated proteins in Arabidopsis leaves.” *Plant & cell physiology* 49 (5), S. 843–852.
- Jakoby, Marc *et al.* (März 2002). “bZIP transcription factors in Arabidopsis.” *Trends in plant science* 7 (3), S. 106–111.
- Jiang, L. *et al.* (Dez. 2001). “The protein storage vacuole: a unique compound organelle.” *The Journal of cell biology* 155 (6), S. 991–1002.

- Josse, Eve-Marie *et al.* (2011). “A DELLA in disguise: SPATULA restrains the growth of the developing Arabidopsis seedling”. *Plant Cell* 23.4, S. 1337–51.
- Kang, Dong-Hoon *et al.* (2002). “Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23.11, S. 1511–1512.
- Kassambara, Alboukadel (2020). *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*. R package version 0.2.5.
- Kelly, Amélie A *et al.* (Okt. 2011). “Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis.” *Plant physiology* 157 (2), S. 866–875.
- Khan, Bibi Rafeiza, A Raquel Adham und Bethany K Zolman (Jan. 2012). “Peroxisomal Acyl-CoA oxidase 4 activity differs between Arabidopsis accessions.” *Plant molecular biology* 78 (1-2), S. 45–58.
- Kim, Geun-Don, Young-Hee Cho und Sang-Dong Yoo (Juni 2017). “Regulatory Functions of Cellular Energy Sensor SNF1-Related Kinase1 for Leaf Senescence Delay through ETHYLENE- INSENSITIVE3 Repression.” *Scientific reports* 7 (1), S. 3193.
- Kimura, Mitsuhiro und Eiji Nambara (Mai 2010). “Stored and neosynthesized mRNA in Arabidopsis seeds: effects of cycloheximide and controlled deterioration treatment on the resumption of transcription during imbibition.” *Plant molecular biology* 73 (1-2), S. 119–129.
- Kolde, Raivo (2019). *heatmap: Pretty Heatmaps*. R package version 1.0.12.
- Koressaar, Triinu und Mairo Remm (2007). “Enhancements and modifications of primer design program Primer3”. *Bioinformatics* 23.10, S. 1289–91.
- Kouzarides, T und E Ziff (Aug. 1989). “Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding.” *Nature* 340 (6234), S. 568–571.
- Kubista, Mikael *et al.* (2006). “The real-time polymerase chain reaction”. *Mol Aspects Med* 27.2-3, S. 95–125.
- Kunz, Sabine, Edouard Pesquet und Leszek A. Kleczkowski (2014). “Functional dissection of sugar signals affecting gene expression in Arabidopsis thaliana.” *PLoS one* 9 (6), e100312.
- Laemmli, U. K. (Aug. 1970). “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

- Lastdrager, Jeroen, Johannes Hanson und Sjeff Smeekens (März 2014). “Sugar signals and the control of plant growth and development.” *Journal of experimental botany* 65 (3), S. 799–807.
- Lau, On Sun und Xing Wang Deng (Okt. 2012). “The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later.” *Trends in plant science* 17 (10), S. 584–593.
- Laurie, S. (2003). “Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos”. *Journal of Experimental Botany* 54.383, S. 739–747.
- Lavorel, J. und A. L. Etienne (1977). “In vivo chlorophyll fluorescence.” *Barber J, ed. Primary Processes of Photosynthesis, Elsevier*, 203–268.
- Lee, Jungeun *et al.* (März 2007). “Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development.” *The Plant cell* 19 (3), S. 731–749.
- Lee, Kyounghee *et al.* (Juni 2015). “The Arabidopsis MYB96 Transcription Factor Is a Positive Regulator of ABSCISIC ACID-INSENSITIVE4 in the Control of Seed Germination.” *Plant physiology* 168 (2), S. 677–689.
- Lee, Yi-Ching *et al.* (2003). “An ABA-responsive bZIP protein, OsBZ8, mediates sugar repression of α -amylase gene expression”. *Physiologia Plantarum* 119.1, S. 78–86.
- Leivar, Pablo *et al.* (Nov. 2009). “Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young Arabidopsis seedlings.” *The Plant cell* 21 (11), S. 3535–3553.
- Lenth, Russell (2020). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*. R package version 1.4.6.
- Li, Lei und Jen Sheen (Okt. 2016). “Dynamic and diverse sugar signaling.” *Current opinion in plant biology* 33, S. 116–125.
- Li, Yonghua *et al.* (2006). “Oil content of Arabidopsis seeds: the influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation”. *Phytochemistry* 67.9, S. 904–915.
- Lin, Fang *et al.* (Sep. 2018). “B-BOX DOMAIN PROTEIN28 Negatively Regulates Photomorphogenesis by Repressing the Activity of Transcription Factor HY5 and Undergoes COP1-Mediated Degradation.” *The Plant cell* 30 (9), S. 2006–2019.
- Lin, Ji-Feng und Shu-Hsing Wu (Aug. 2004). “Molecular events in senescing Arabidopsis leaves.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39 (4), S. 612–628.
- Liu, L., M. J. White und T. H. MacRae (Juni 1999). “Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation.” *European journal of biochemistry* 262 (2), S. 247–257.

- Livak, K J und T D Schmittgen (2001). “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method”. *Methods* 25.4, S. 402–8.
- Lo, W. S. *et al.* (Aug. 2001). “Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription.” *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532), S. 1142–1146.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber und Simon Anders (2014). “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.” *Genome biology* 15 (12), S. 550.
- Lu, Chung-An *et al.* (2002). “Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -amylase gene expression”. *The Plant Cell* 14.8, S. 1963–1980.
- Lu, Chung-An *et al.* (2007). “The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice”. *The Plant Cell* 19.8, S. 2484–2499.
- Lumbreras, V. *et al.* (Jan. 2001). “Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution.” *EMBO reports* 2 (1), S. 55–60.
- Lunn, John Edward *et al.* (Aug. 2014). “Trehalose metabolism in plants.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 79 (4), S. 544–567.
- Luo, Weijun und Cory Brouwer (2013). “Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization”. *Bioinformatics* 29.14, S. 1830–1831.
- Lv, Xin *et al.* (Juni 2014). “The roles of autophagy in development and stress responses in *Arabidopsis thaliana*.” *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 19 (6), S. 905–921.
- Mair, Andrea *et al.* (Aug. 2015). “SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants.” *eLife* 4.
- Malone, Susan *et al.* (März 2007). “Phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis*: changes in gene expression, protein and activity during vegetative and reproductive development.” *Plant & cell physiology* 48 (3), S. 441–450.
- Matiolli, Cleverson Carlos *et al.* (Okt. 2011). “The *Arabidopsis* bZIP gene AtbZIP63 is a sensitive integrator of transient abscisic acid and glucose signals.” *Plant physiology* 157 (2), S. 692–705.
- Mayer, A. M. (1982). *The Germination of Seeds*. Burlington: Elsevier Science.
- Michaeli, Simon und Gad Galili (Mai 2014). “Degradation of organelles or specific organelle components via selective autophagy in plant cells.” *International journal of molecular sciences* 15 (5), S. 7624–7638.

- Mitsuda, Nobutaka und Masaru Ohme-Takagi (Juli 2009). “Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis.” *Plant & cell physiology* 50 (7), S. 1232–1248.
- Monné, Magnus *et al.* (2019). “Mitochondrial Carriers for Aspartate, Glutamate and Other Amino Acids: A Review”. *International Journal of Molecular Sciences* 20.18, S. 4456.
- Moore, Brandon *et al.* (Apr. 2003). “Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling.” *Science (New York, N.Y.)* 300 (5617), S. 332–336.
- Morgan, Martin (2019). *AnnotationHub: Client to access AnnotationHub resources*. R package version 2.18.0.
- Morris, Jennifer L *et al.* (März 2018). “The timescale of early land plant evolution.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (10), E2274–E2283.
- Mullis, K *et al.* (1986). “Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction”. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, S. 263–73.
- Murphy, Denis J (1993). “Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants”. *Progress in lipid research* 32.3, S. 247–280.
- Nakabayashi, Kazumi *et al.* (März 2005). “Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 41 (5), S. 697–709.
- Nukarinen, Ella *et al.* (Aug. 2016). “Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation.” *Scientific reports* 6, S. 31697.
- Nunes, Cátia *et al.* (Feb. 2013). “Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate.” *Plant physiology and biochemistry : PPB* 63, S. 89–98.
- Obroucheva, NV und OV Antipova (1997). “Physiology of the initiation of seed germination”. *Russian Journal of Plant Physiology* 44.2, S. 250–264.
- Oh, Sookyung und Beronda L. Montgomery (2014). “Phytochrome-dependent coordinate control of distinct aspects of nuclear and plastid gene expression during anterograde signaling and photomorphogenesis.” *Frontiers in plant science* 5, S. 171.
- Okamoto, Masanori *et al.* (Apr. 2010). “Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in dry and imbibed seeds of Arabidopsis using tiling arrays.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62 (1), S. 39–51.
- Osterlund, M. T., L. H. Ang und X. W. Deng (März 1999). “The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development.” *Trends in cell biology* 9 (3), S. 113–118.

- Parsley, Kate und Julian M. Hibberd (Okt. 2006). "The Arabidopsis PPDK gene is transcribed from two promoters to produce differentially expressed transcripts responsible for cytosolic and plastidic proteins." *Plant molecular biology* 62 (3), S. 339–349.
- Pedrotti, L. (2015). "The SnRK1-C/S1-bZIPs network: a signalling hub in Arabidopsis energy metabolism regulation". Diss. Julius-Maximilian-Universität Wuerzburg.
- Pedrotti, Lorenzo *et al.* (Feb. 2018). "Snf1-RELATED KINASE1-Controlled C/S₁ -bZIP Signaling Activates Alternative Mitochondrial Metabolic Pathways to Ensure Plant Survival in Extended Darkness." *The Plant cell* 30 (2), S. 495–509.
- Penfield, Steven *et al.* (Okt. 2004). "Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1." *The Plant cell* 16 (10), S. 2705–2718.
- Pierre, Michèle *et al.* (Sep. 2007). "N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis." *The Plant cell* 19 (9), S. 2804–2821.
- Plaxton, William C. (Juni 1996). "THE ORGANIZATION AND REGULATION OF PLANT GLYCOLYSIS." *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47, S. 185–214.
- Pracharoenwattana, Itsara und Steven M Smith (Okt. 2008). "When is a peroxisome not a peroxisome?" *Trends in plant science* 13 (10), S. 522–525.
- Pracharoenwattana, Itsara, Johanna E. Cornah und Steven M. Smith (Juli 2005). "Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination." *The Plant cell* 17 (7), S. 2037–2048.
- Pracharoenwattana, Itsara, Johanna E Cornah und Steven M Smith (2007). "Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in β -oxidation but not in the glyoxylate cycle". *The plant journal* 50.3, S. 381–390.
- Preston, Jeremy *et al.* (Okt. 2009). "Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions." *Plant & cell physiology* 50 (10), S. 1786–1800.
- Pulsifer, Ian P, Sabine Kluge und Owen Rowland (Feb. 2012). "Arabidopsis long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast." *Plant physiology and biochemistry : PPB* 51, S. 31–39.
- Rahmani, Fatemeh *et al.* (Juli 2009). "Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide." *Plant physiology* 150 (3), S. 1356–1367.
- Rainer, Johannes, Laurent Gatto und Christian X Weichenberger (2019). "ensemldb: an R package to create and use Ensembl-based annotation resources". *Bioinformatics* 35.17. Hrsg. von John Hancock, S. 3151–3153.

- Ramon, Matthew *et al.* (Juli 2013). “The hybrid four-CBS-domain KIN $\beta\gamma$ subunit functions as the canonical γ subunit of the plant energy sensor SnRK1.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 75 (1), S. 11–25.
- Ramon, Matthew *et al.* (Juli 2019). “Default Activation and Nuclear Translocation of the Plant Cellular Energy Sensor SnRK1 Regulate Metabolic Stress Responses and Development.” *The Plant cell* 31 (7), S. 1614–1632.
- Richmond, T A und A B Bleecker (Okt. 1999). “A defect in beta-oxidation causes abnormal inflorescence development in Arabidopsis.” *The Plant cell* 11 (10), S. 1911–1924.
- Richter, Gerhard (1997). *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Physiologie und Biochemie des Primär-und Sekundärstoffwechsels*. Georg Thieme Verlag.
- Robert, Céline *et al.* (Juni 2008). “Morphological analysis of seed shape in Arabidopsis thaliana reveals altered polarity in mutants of the ethylene signaling pathway.” *Journal of plant physiology* 165 (9), S. 911–919.
- Robertlee, Jekson *et al.* (Apr. 2017). “AKIN10, a representative Arabidopsis SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1), phosphorylates and downregulates plant HMG-CoA reductase.” *FEBS letters* 591 (8), S. 1159–1166.
- Roberts, Irma N *et al.* (Mai 2012). “Senescence-associated proteases in plants.” *Physiologia plantarum* 145 (1), S. 130–139.
- Rodríguez-Martínez, José A *et al.* (Feb. 2017). “Combinatorial bZIP dimers display complex DNA-binding specificity landscapes.” *eLife* 6.
- Ruan, Yong-Ling (2014). “Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling”. *Annual review of plant biology* 65, S. 33–67.
- Ruiz-Gayosso, Ana *et al.* (Okt. 2018). “A role for the carbohydrate-binding module (CBM) in regulatory SnRK1 subunits: the effect of maltose on SnRK1 activity.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 96 (1), S. 163–175.
- Rylott, Elizabeth L., Alison D. Gilday und Ian A. Graham (Apr. 2003). “The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis is essential for seedling establishment.” *Plant physiology* 131 (4), S. 1834–1842.
- Rylott, Elizabeth L *et al.* (März 2006). “The Arabidopsis thaliana multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal beta-oxidation is essential for seedling establishment.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45 (6), S. 930–941.
- Sanger, F, S Nicklen und A R Coulson (1977). “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74.12, S. 5463–7.
- Schertl, Peter *et al.* (Juni 2014). “Biochemical characterization of proline dehydrogenase in Arabidopsis mitochondria.” *The FEBS journal* 281 (12), S. 2794–2804.

- Schmid, Markus *et al.* (Mai 2005). “A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development.” *Nature genetics* 37 (5), S. 501–506.
- Seshasayee, Aswin Sai Narain, Karthikeyan Sivaraman und Nicholas M. Luscombe (2011). “An overview of prokaryotic transcription factors : a summary of function and occurrence in bacterial genomes.” *Sub-cellular biochemistry* 52, S. 7–23.
- Sheen, Jen (Apr. 2014). “Master Regulators in Plant Glucose Signaling Networks.” *Journal of plant biology = Singmul Hakhoe chi* 57 (2), S. 67–79.
- Shen, Huaishun, Kaiming Cao und Xiping Wang (Okt. 2007). “A conserved proline residue in the leucine zipper region of AtbZIP34 and AtbZIP61 in *Arabidopsis thaliana* interferes with the formation of homodimer.” *Biochemical and biophysical research communications* 362 (2), S. 425–430.
- Shen, Wei, Maria Ines Reyes und Linda Hanley-Bowdoin (Juni 2009). “*Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop.” *Plant physiology* 150 (2), S. 996–1005.
- Shewry, Peter R. und Nigel G. Halford (2002). “Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization”. *Journal of Experimental Botany* 53.370, S. 947–958.
- Shropshire Jr, W, WH Klein und VB Elstad (1961). “Action spectra of photomorphogenic induction and photoinactivation of germination in *Arabidopsis thaliana*”. *Plant and Cell Physiology* 2.1, S. 63–69.
- Shutov, A. D. *et al.* (Juli 2003). “Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution.” *Journal of experimental botany* 54 (388), S. 1645–1654.
- Silva, Anderson Tadeu, Wilco Ligterink und Henk W. M. Hilhorst (Nov. 2017). “Metabolite profiling and associated gene expression reveal two metabolic shifts during the seed-to-seedling transition in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant molecular biology* 95 (4-5), S. 481–496.
- Simon, Noriane M. L., Ellie Sawkins und Antony N. Dodd (2018a). “Involvement of the SnRK1 subunit KIN10 in sucrose-induced hypocotyl elongation.” *Plant signaling & behavior* 13 (6), e1457913.
- Simon, Noriane M L *et al.* (Feb. 2018b). “The Energy-Signaling Hub SnRK1 Is Important for Sucrose-Induced Hypocotyl Elongation.” *Plant physiology* 176 (2), S. 1299–1310.
- Smith, H. O. und K. W. Wilcox (Juli 1970). “A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties.” *Journal of molecular biology* 51 (2), S. 379–391.

- Solomon, M J und A Varshavsky (1985). “Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82.19, S. 6470–4.
- Solomon, M J, P L Larsen und A Varshavsky (1988). “Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene”. *Cell* 53.6, S. 937–47.
- Stewart, Cecil R und Harry Beevers (1967). “Gluconeogenesis from amino acids in germinating castor bean endosperm and its role in transport to the embryo”. *Plant Physiology* 42.11, S. 1587–1595.
- Stoynova, Ludmila, Ramona Solórzano und Elaine D Collins (März 2004). “Generation of large deletion mutants from plasmid DNA.” *BioTechniques* 36 (3), S. 402–4, 406.
- Stoynova-Bakalova, E *et al.* (2004). “Cell division and cell expansion in cotyledons of Arabidopsis seedlings”. *New Phytologist* 162.2, S. 471–479.
- Sussman, M. R. *et al.* (Dez. 2000). “The Arabidopsis knockout facility at the University of Wisconsin-Madison.” *Plant physiology* 124 (4), S. 1465–1467.
- Tan-Wilson, Anna L. und Karl A. Wilson (Mai 2012). “Mobilization of seed protein reserves.” *Physiologia plantarum* 145 (1), S. 140–153.
- Tsai, Allen Y.-L. und Sonia Gazzarrini (2014). “Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture.” *Frontiers in plant science* 5, S. 119.
- Tsai, Allen Yi-Lun und Sonia Gazzarrini (Okt. 2012). “Overlapping and distinct roles of AKIN10 and FUSCA3 in ABA and sugar signaling during seed germination.” *Plant signaling & behavior* 7 (10), S. 1238–1242.
- Turner, Stephen (2020). *annotables: Ensembl Annotation Tables*. R package version 0.1.91.
- Untergasser, Andreas *et al.* (2012). “Primer3–new capabilities and interfaces”. *Nucleic Acids Res* 40.15, e115.
- Usadel, Björn *et al.* (Sep. 2009). “A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize.” *Plant, cell & environment* 32 (9), S. 1211–1229.
- Vinson, C R, P B Sigler und S L McKnight (Nov. 1989). “Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins.” *Science (New York, N. Y.)* 246 (4932), S. 911–916.
- Waters, Mark T. *et al.* (Apr. 2009). “GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis.” *The Plant cell* 21 (4), S. 1109–1128.

- Weber, Hans, Ljudmilla Borisjuk und Ulrich Wobus (1997). “Sugar import and metabolism during seed development”. *Trends in plant science* 2.5, S. 169–174.
- Wehner, Nora *et al.* (Nov. 2011). “High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of Arabidopsis transcription factor function.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 68 (3), S. 560–569.
- Weiste, Christoph und Wolfgang Dröge-Laser (Mai 2014). “The Arabidopsis transcription factor bZIP11 activates auxin-mediated transcription by recruiting the histone acetylation machinery.” *Nature communications* 5, S. 3883.
- Weitbrecht, Karin, Kerstin Müller und Gerhard Leubner-Metzger (Juni 2011). “First off the mark: early seed germination.” *Journal of experimental botany* 62 (10), S. 3289–3309.
- Weltmeier, Fridtjof *et al.* (Juli 2006). “Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors.” *The EMBO journal* 25 (13), S. 3133–3143.
- Wickham, Hadley (8. Juni 2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag GmbH.
- Wickham, Hadley *et al.* (2007). “Reshaping data with the reshape package”. *Journal of statistical software* 21.12, S. 1–20.
- Wickham, Hadley *et al.* (2019). “Welcome to the Tidyverse”. *Journal of Open Source Software* 4.43, S. 1686.
- Wickham, Hadley *et al.* (2020). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 0.8.5.
- Wiese, Anika *et al.* (Juli 2004). “A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation.” *The Plant cell* 16 (7), S. 1717–1729.
- Williams, Sarah P. *et al.* (2014). “Regulation of Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1 genes in Arabidopsis thaliana.” *Frontiers in plant science* 5, S. 324.
- Wingler, Astrid (Feb. 2018). “Transitioning to the Next Phase: The Role of Sugar Signaling throughout the Plant Life Cycle.” *Plant physiology* 176 (2), S. 1075–1084.
- Winston, Chang (2014). *extrafont: Tools for using fonts*. R package version 0.17.
- Winter, Debbie *et al.* (2007). “An „Electronic Fluorescent Pictograph“ browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets”. *PLoS One* 2.8, e718.
- Woodstock, LW (1988). “Seed imbibition: a critical period for successful germination”. *Journal of Seed Technology*, S. 1–15.

- Wurzinger, Bernhard *et al.* (Feb. 2018). “The SnRK1 Kinase as Central Mediator of Energy Signaling between Different Organelles.” *Plant physiology* 176 (2), S. 1085–1094.
- Xiong, Yan und Jen Sheen (Dez. 2015). “Novel links in the plant TOR kinase signaling network.” *Current opinion in plant biology* 28, S. 83–91.
- Xiong, Yan *et al.* (Apr. 2013). “Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems.” *Nature* 496 (7444), S. 181–186.
- Xu, Dongqing (Okt. 2019). “COP1 and BBXs-HY5-mediated light signal transduction in plants.” *The New phytologist*. aheadofprint.
- Xu, Dongqing *et al.* (Juli 2016). “BBX21, an Arabidopsis B-box protein, directly activates HY5 and is targeted by COP1 for 26S proteasome-mediated degradation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (27), S. 7655–7660.
- Xu, Xiaosa *et al.* (Mai 2014). “PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1 Enhances the E3 Ligase Activity of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 to Synergistically Repress Photomorphogenesis in Arabidopsis.” *The Plant cell* 26 (5), S. 1992–2006.
- Yadav, Umesh Prasad *et al.* (März 2014). “The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P.” *Journal of experimental botany* 65 (4), S. 1051–1068.
- Yamashita, Yui *et al.* (Mai 2017). “Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling at the stop codon of Arabidopsis bZIP11 uORF2.” *FEBS letters* 591 (9), S. 1266–1277.
- Yu, Guangchuang *et al.* (2012). “clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters”. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 16.5, S. 284–287.
- Yu, Guangchuang *et al.* (2014). “DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis”. *Bioinformatics* 31.4, S. 608–609.
- Yu, Su-May *et al.* (1992). “Regulation of α -amylase-encoding gene expression in germinating seeds and cultured cells of rice”. *Gene* 122.2, S. 247–253.
- Yu, Su-May *et al.* (1996). “Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of α -amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains”. *Plant molecular biology* 30.6, S. 1277–1289.
- Zhai, Zhiyang, Hui Liu und John Shanklin (Apr. 2017). “Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 Results in Its Proteasomal Degradation, Providing a Link between Energy Homeostasis and Lipid Biosynthesis.” *The Plant cell* 29 (4), S. 871–889.

- Zhai, Zhiyang *et al.* (Okt. 2018). “Trehalose 6-Phosphate Positively Regulates Fatty Acid Synthesis by Stabilizing WRINKLED1.” *The Plant cell* 30 (10), S. 2616–2627.
- Zhang, Cankui *et al.* (2014). “Symplastic phloem loading in poplar”. *Plant physiology* 166.1, S. 306–313.
- Zhang, Huiyong *et al.* (Feb. 2011). “Genome-wide mapping of the HY5-mediated gene networks in Arabidopsis that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation.” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65 (3), S. 346–358.
- Zhang, Yuhua *et al.* (Apr. 2009). “Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate.” *Plant physiology* 149 (4), S. 1860–1871.
- Zolman, B K, I D Silva und B Bartel (Nov. 2001). “The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation.” *Plant physiology* 127 (3), S. 1266–1278.

8 Abbildungsverzeichnis

2.1	Biodiversität der Struktur reifer Samen von Angiospermen.	2
2.2	Vergleich von hypogäischer und epigäischer Keimung.	3
2.3	Vergleich von Photomorphogenese und Skotomorphogenese am Beispiel von Arabidopsis.	4
2.4	Arbeitsmodell das zeigt, wie das Signalnetzwerk COP1-HY5 arbeitet.	5
2.5	Übersicht des Glyoxylatzykluses in den Peroxisomen mit der Rolle der peroxisomalen NAD ⁺ -Malat Dehydrogenase (PMDH) in Arabidopsis.	8
2.6	Subzelluläre Lokalisation des Aminosäure Katabolismus in Pflanzen.	11
2.7	Schematische Übersicht von Glykolyse und Glukoneogenese.	13
2.8	Strukturmodell des SnRK1-Enzymkomplexes.	16
2.9	T6P-Nexus Modell zur Veranschaulichung der Regulation von SnRK1.	18
2.10	Organisation eines Ausschnitts der Arabidopsis bZIP-TF-Familie.	22
2.11	Strukturelle Eigenschaften der bZIP-TF.	23
2.12	Schematische Darstellung von bZIP63 und den in vivo identifizierten Phosphorylierungsstellen.	24
2.13	Arbeitsmodell, das zeigt, wie die SnRK1-C/S ₁ -bZIP-Signalkette unter Energiemangel funktioniert.	26
3.1	Größenstandard für DNA und Protein-Gele.	39
4.1	Ideale Größenverteilung einer cDNA-Bibliothek	72
4.2	Schematische Darstellung des Pipettierschemas für Protoplasten	84
5.1	Phänotypische Untersuchung der Keimung von WT (Col-0) und <i>snrk1</i> Mutanten.	90
5.2	Keimlinge der <i>snrk1α1/α2</i> Doppelmutante zeigen sowohl ein reduziertes Frischgewicht, als auch einen geringeren Chlorophyllgehalt.	91
5.3	Bestimmung der photosynthetischen Aktivität in Keimlingen.	93
5.4	Die Genexpression von <i>GLK2</i> wird SnRK1-abhängig induziert.	93
5.5	Die Frischgewichtsmessung in Keimlingen zeigt ein reduziertes Gewicht in der Doppelmutante <i>snrk1α1/α2</i> bei konstanter Dunkelheit.	94
5.6	Messung der Hypokotyl- und Wurzellänge im WT und der <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante.	95
5.7	Nachweis der Expression von SnRK1α1:GFP Fusionsproteinen in Kotleedonen, Hypokotyl, Übergang von Hypokotyl und Wurzel und Wurzelspitze in Dunkelheit.	96
5.8	Nachweis der Expression von SnRK1α1:GFP Fusionsproteinen in Kotleedonen, Hypokotyl, Übergang von Hypokotyl und Wurzel und Wurzelspitze nach dem Wechsel in einen Licht/Dunkel Rhythmus (12hL/12hD) an Tag 4.	97

5.9	Die Phosphorylierung des ACC-Peptids durch SnRK1 unterscheidet sich sowohl zwischen hell und dunkel als auch in der Position der Lokalisation.	99
5.10	Glukose-Gabe kann das Überleben der <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante retten.	101
5.11	Einmalige Glukosefütterung reicht nicht für das Überleben von <i>snrk1α1/α2</i> -Keimlingen.	102
5.12	Fütterung mit verschiedenen metabolisierbaren Zuckern rettet die <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante.	103
5.13	Die Gabe kurzkettiger Fettsäuren supplementiert nicht den Mutantenphänotyp.	104
5.14	Supplementierung von Aminosäuren rettet nicht den Phänotyp in der <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante.	105
5.15	Oxalacetat und PEP als zentrale Metabolite des Energiestoffwechsels können den Phänotyp der <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante nicht retten.	106
5.16	Glukose verändert die Genexpression in der <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante.	107
5.17	Der TAG-Gehalt nimmt in den Keimlingen mit der Zeit ab.	108
5.18	Der Gesamtzuckergehalt-Gehalt verhält sich im Wildtyp und in der <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante ähnlich.	110
5.19	Die quantitative Zuckerzusammensetzung unterscheidet sich zwischen dem Wildtyp und der <i>snrk1</i> -Mutante.	111
5.20	Der Abbau von Samenspeicherproteinen ist in der <i>snrk1</i> -Mutante verlangsamt.	113
5.21	Der Gesamtaminosäuregehalt unterscheidet sich im Verlauf der Keimung zwischen Wildtyp und <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante.	114
5.22	Die quantitative Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich deutlich zwischen dem Wildtyp und der <i>snrk1</i> -Mutante.	115
5.23	Kontrolle der Expressionsanalyse in Keimlingen und Nachweis einer differentiellen Genexpression durch Analyse von Markergenen in Wildtyp und <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante.	117
5.24	Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression in <i>smear plots</i> von Wildtyp und <i>snrk1</i> -Mutante bei kompletter Dunkelheit.	118
5.25	Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression von Wildtyp und <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante bei kompletter Dunkelheit.	119
5.26	Genomweite Übersicht der differentiellen Genexpression von Wildtyp und <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante im Licht.	120
5.27	Übersichtszeichnung SnRK1-abhängig regulierter Gene im Speichersstoffabbau während der Keimlingsentwicklung.	122
5.28	MAPMAN Analyse der Synthese und des Abbaus von Aminosäuren während der Keimlingsentwicklung.	123
5.29	Cluster 2 zeigt, wie Gene im Vergleich von Wildtyp und <i>snrk1α1/α2</i> -Mutante, die im Dunkeln exprimiert wurden, einen ähnlichen Verlauf haben.	125
5.30	Transkriptionsanalyse SnRK1-abhängiger Genexpression während der Keimung.	126

5.31	Transkriptionsanalyse bZIP63-abhängiger Zielgene während der Keimung.	127
5.32	Aktivierung des PPDK-Promotors mit verschiedenen Effektoren.	128
5.33	Mutationskartierung des <i>cyPPDK</i> -Promotors.	129
5.34	ChIP _{PCR} zur Bestätigung der direkten Bindung von <i>bZIP63</i> an den <i>PPDK</i> -Promotor.	131
6.1	Modell der SnRK1-abhängigen Regulation von Speicherstoffabbau während der Keimlingsbildung.	150
A.1	Transkriptionsanalyse von SnRK1 α 1 und SnRK1 α 2 während der Keimlingsentwicklung.	177
A.2	Kontrolle zu den GFP-Expressionsbildern von SnRK1 α 1 in Dunkelheit.	178
A.3	Kontrolle zu den GFP-Expressionsbildern von SnRK1 α 1 nach dem Wechsel ins Licht (12hL/12hD).	179
A.4	Die TAG-Zusammensetzung ändert sich mit der Zeit hin zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren.	180
A.5	Induzierte und reprimierte Gene des Lipidstoffwechsels während der Keimlingsentwicklung.	181
A.6	Gene des RNA-Seq in Dunkelheit können 31 Clustern zugeordnet werden.	182
A.7	Der cytosolisch-lokalisierte Promotor PPDK befindet sich im ersten Intron des PPDK-Gens.	183
A.8	Vergleich unterschiedlicher Promotoren mit ihrer Aktivierbarkeit durch SnRK1 α 1.	183
A.9	Karten der Promotor:GUS-Konstrukte von ACX2, PPDK, PCK1, PMDH2 und SDP1.	184
A.10	Vergleich der SnRK1-abhängigen Expression von Genen.	185

9 Tabellenverzeichnis

3.1	Pflanzenlinien	29
3.2	Plasmide	30
3.3	Oligonukleotide für Klonierungen	30
3.4	Oligonukleotide für qRT-PCR	31
3.5	Puffer und Lösungen	32
3.6	Enzyme	39
3.7	Antikörper für Western-Blot	40
3.8	Geräteliste	41
3.9	Verbrauchsmittel	43
3.10	Chemikalien	43
3.11	Kits	44
4.1	PCR-Ansatz für Mutagenese/Amplifikation eines DNA-Fragments	48
4.2	PCR-Programm für die Mutagenese/Amplifikation eines DNA-Fragments	49
4.3	Zusammensetzung einer Kolonien-PCR	50
4.4	Kolonie-PCR Programm	50
4.5	Pipettierschema für eine qRT-PCR-Reaktion	59
4.9	Protokoll für Wasch-und Inkubationsschritte bei Western-Blots	74
4.10	m/z und RT von TAGs	75
4.11	Identifikationsparameter für Kohlenhydrate	77
4.12	Identifikationsparameter für Aminosäuren	78

A Anhang

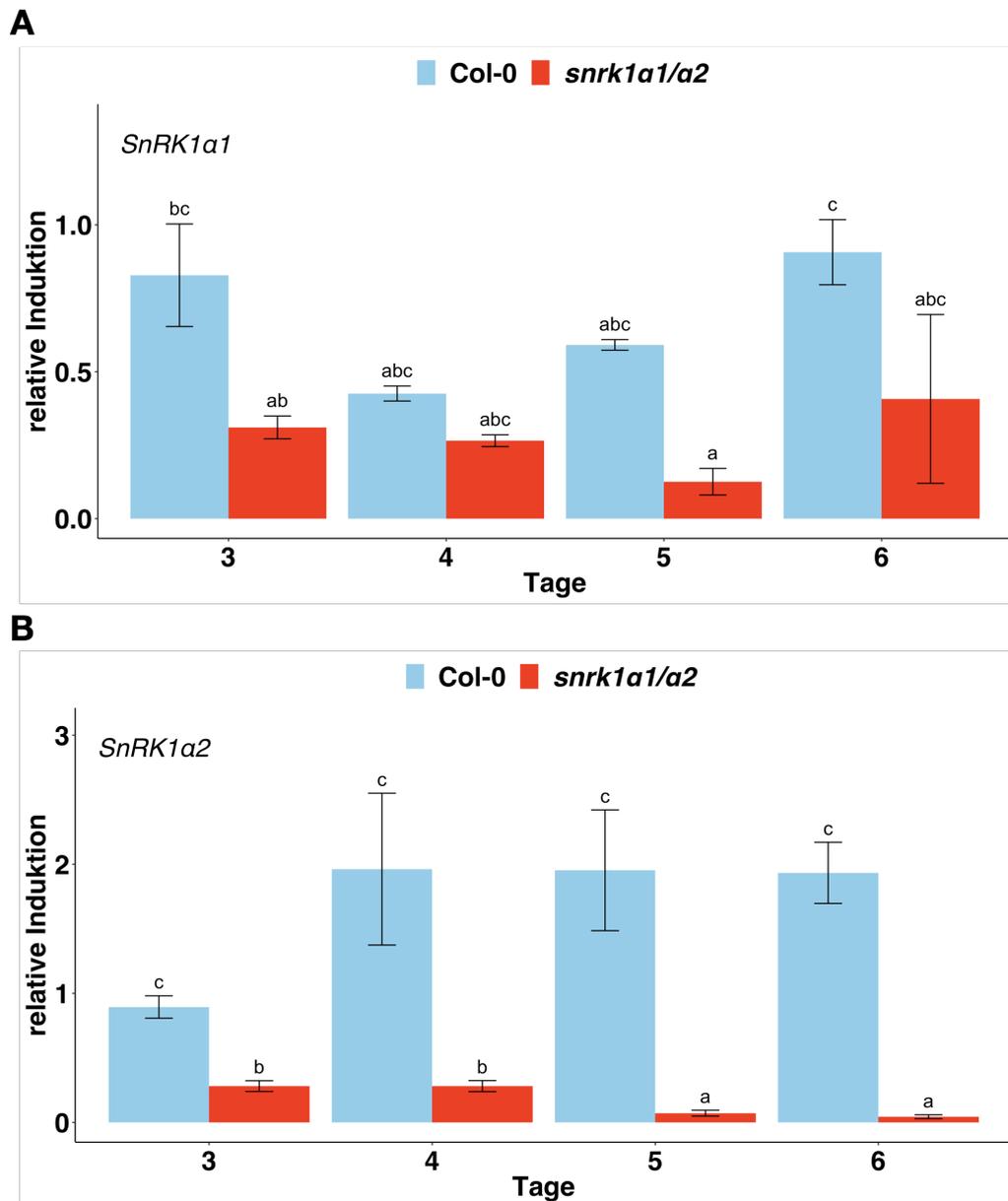


Abbildung A.1 – Transkriptionsanalyse von SnRK1 α 1 und SnRK1 α 2 während der Keimlingsentwicklung. Abgebildet sind die Gene SnRK1 α 1 (A) und SnRK1 α 2 (B) während der Keimlingsentwicklung. Wildtyp Col-0 (hellblau) und *snrk1 α 1/ α 2* (rot). Auf der y-Achse ist die relative Induktion dargestellt, wobei Werte > 1 eine Induktion und Werte < 1 eine Repression bedeuten. Auf der x-Achse sind Tage nach Keimung angegeben. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus drei biologischen Replikaten (n=15). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Holm Post-Hoc Test.

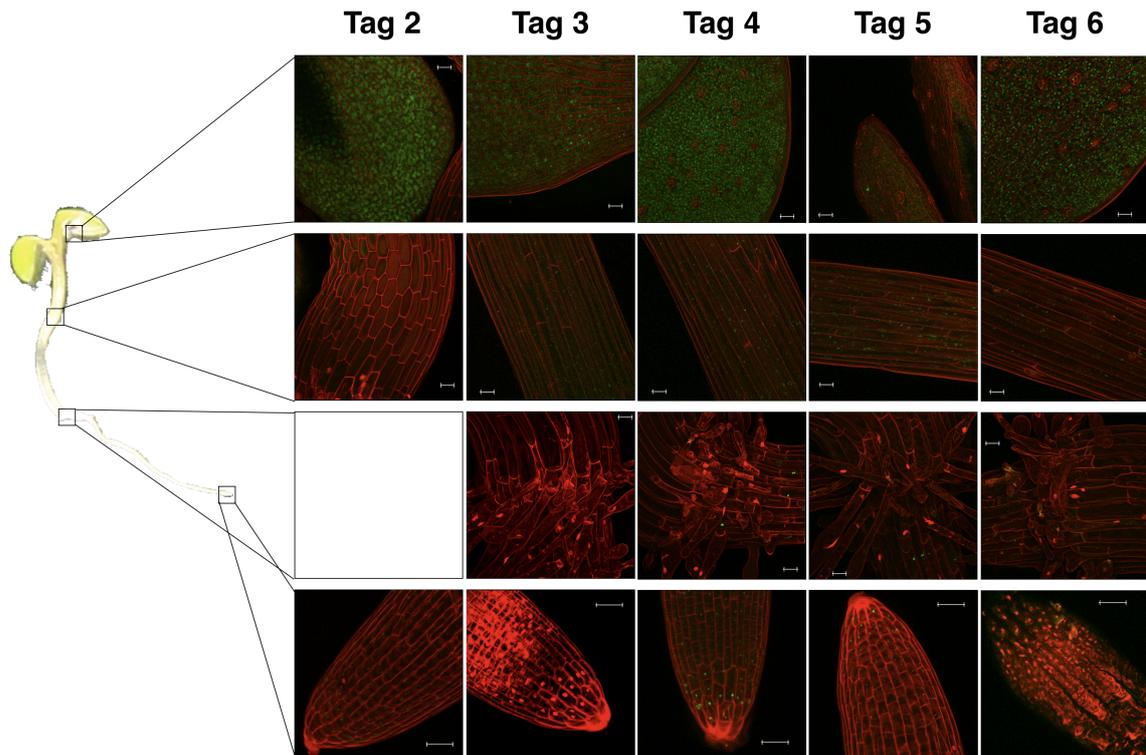


Abbildung A.2 – Kontrolle zu den GFP-Expressionsbildern von SnRK1 α 1 in Dunkelheit. Gezeigt sind jeweils Bilder von Keimlingen im Dunkeln an verschiedenen Tagen und aus verschiedenen Geweben (siehe Schema links). Von oben nach unten sind Kotyledonen, Hypokotyl, der Übergang von Hypokotyl zu Wurzel und die Wurzel abgebildet. Mit Propidiumjodid wurden Zellwände (rot) angefärbt. Das exprimierte Gen wäre grün dargestellt. Gelbe Punkte entstehen aus einer Überlagerung von Zellwänden (rot) und Fusionsprotein (grün). Der Maßstab beträgt 20 μ m. Die Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten bestätigt.

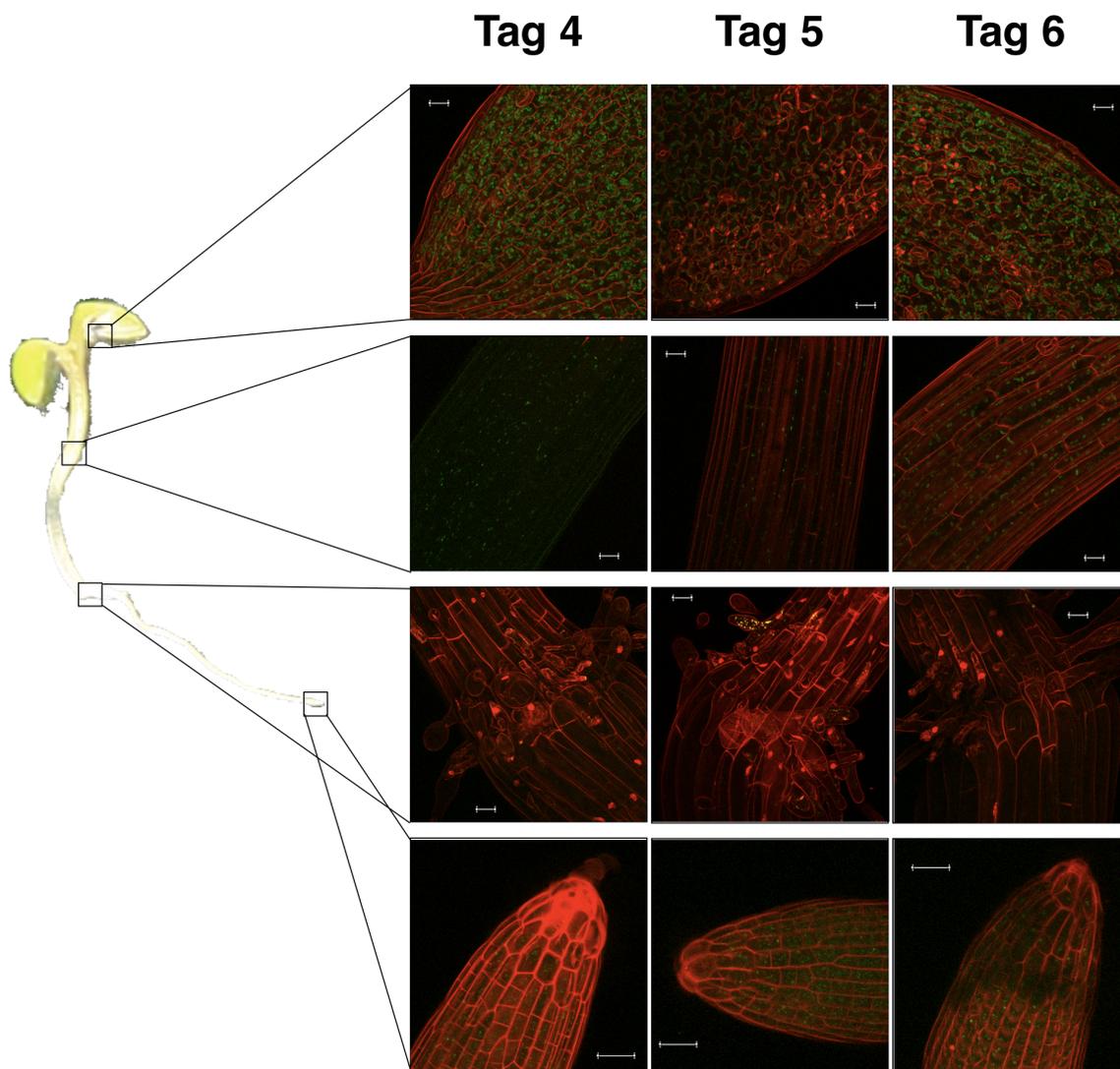


Abbildung A.3 – Kontrolle zu den GFP-Expressionsbildern von SnRK1 α 1 nach dem Wechsel ins Licht (12hL/12hD). Gezeigt sind jeweils Bilder von Keimlingen im Dunkeln an verschiedenen Tagen und aus verschiedenen Geweben (siehe Schema links). Von oben nach unten sind Kotyledonen, Hypokotyl, der Übergang von Hypokotyl zu Wurzel und die Wurzel abgebildet. Mit Propidiumjodid wurden Zellwände (rot) angefärbt. Das exprimierte Gen wäre grün dargestellt. Gelbe Punkte entstehen aus einer Überlagerung von Zellwänden (rot) und Fusionsprotein (grün). Der Maßstab beträgt 20 μ m. Die Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten bestätigt.

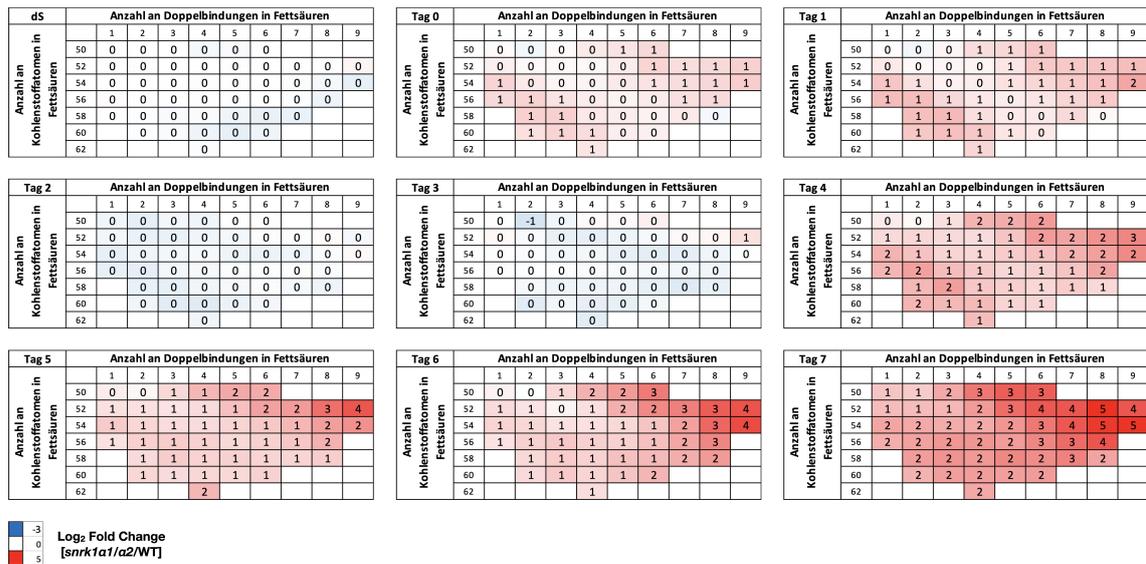


Abbildung A.4 – Die TAG-Zusammensetzung ändert sich mit der Zeit hin zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Grundlage für diese Heatmap waren die TAGs aus der massenspektrometrischen Untersuchung. Dabei sind auf der y-Achse die Anzahl der Kohlenstoffatome in den TAGs angegeben, und auf der x-Achse die Anzahl der Doppelbindungen in den TAGs. Die angegebenen Werte stellen die \log_2 -fache Anreicherung der Mutante gegenüber dem Wildtyp dar (rote Kästchen). Bei blauen Kästchen (Werte < 1) fand dagegen eine x-fache Verringerung statt. Die Skala reicht von -5 bis 3.

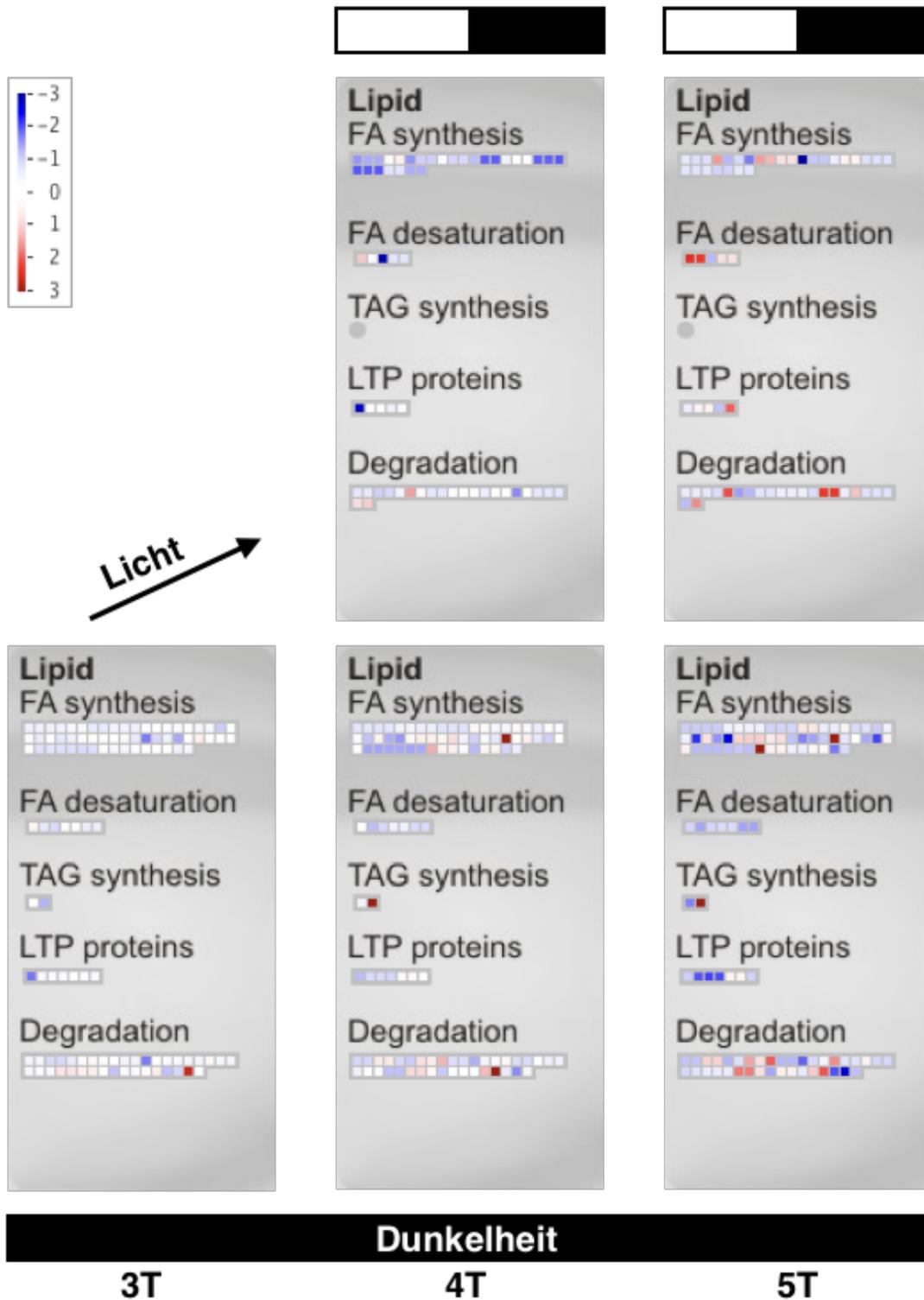


Abbildung A.5 – Induzierte und reprimierte Gene des Lipidstoffwechsels während der Keimlingsentwicklung. MAPMAN (Usadel *et al.*, 2009) Repräsentation von RNA-Seq Daten aus dem Experiment 5.25. Jedes Kästchen symbolisiert dabei ein Transkript in ausgewählten Lipid-Stoffwechselwegen. Blau markierte Kästchen bedeuten, dass die Transkriptmenge in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante relativ zum Wildtyp reduziert ist. Rote Kästchen dagegen stellen eine Induktion des Gens in der *snrk1 α 1/ α 2*-Mutante dar. Dabei reicht die *Log Fold-Change*-Skala von -3 bis 3. Unten wurden die Zeitpunkte im Dunkeln dargestellt, oben im Licht.

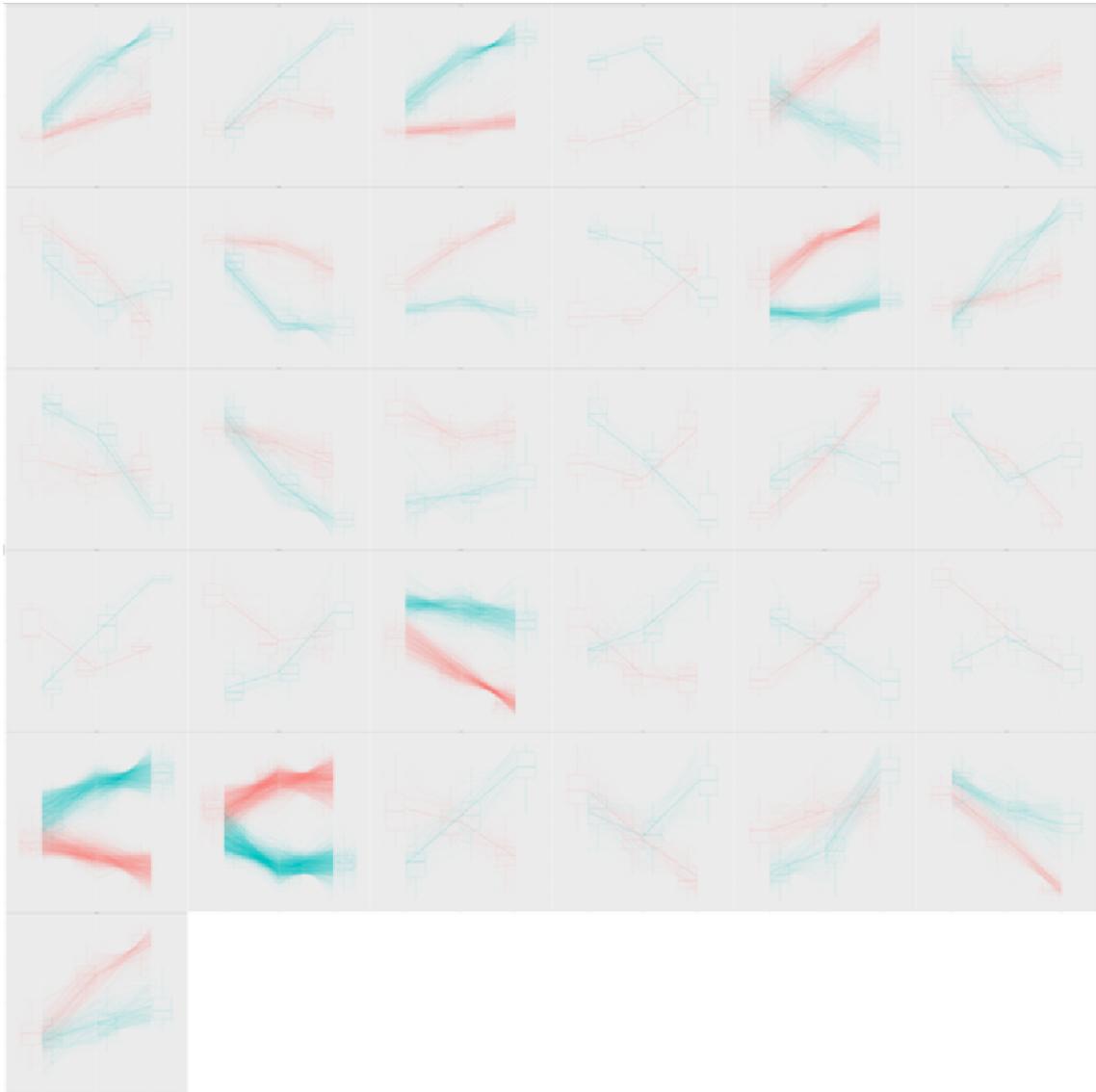


Abbildung A.6 – Gene des RNA-Seq in Dunkelheit können 31 Clustern zugeordnet werden. Die Gene aus dem RNA-Seq-Experiment in Dunkelheit konnten 31 Clustern zugeordnet werden. Rot ist die Mutante *snrk1α1/α2*, grün der WT Col-0 dargestellt.

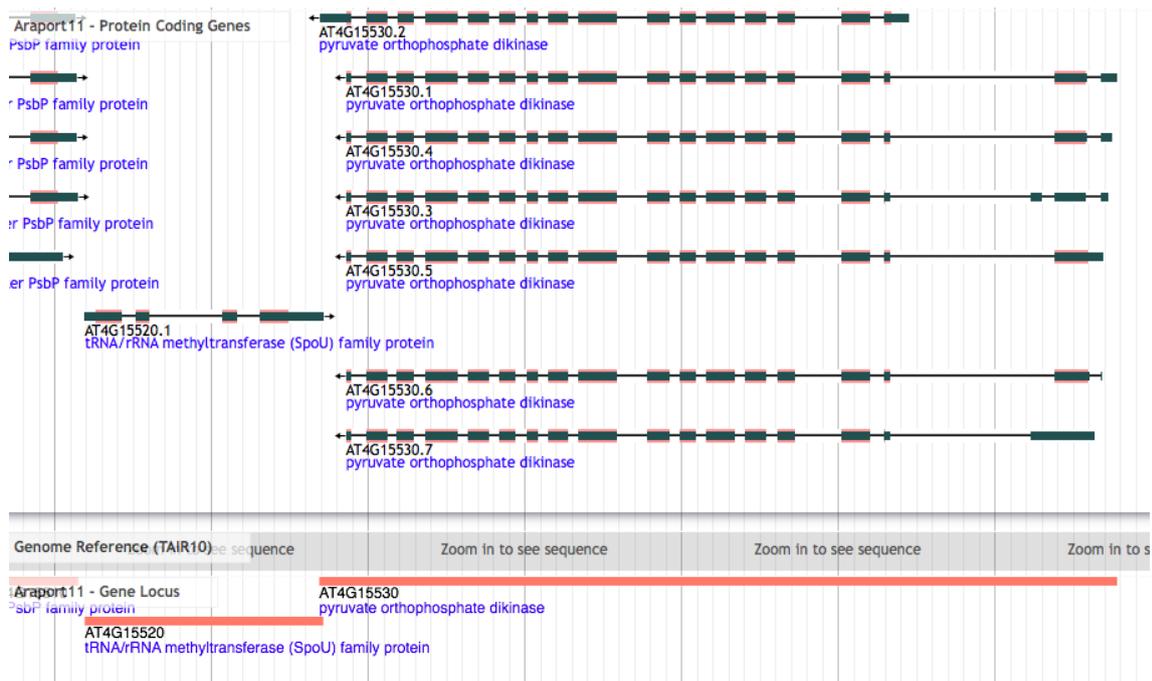


Abbildung A.7 – Der cytosolisch-lokalisierter Promotor PPDK befindet sich im ersten Intron des PPDK-Gens. Abgebildet ist der Abschnitt des PPDK-Gens. Blau sind Exons dargestellt. Schwarze Linien markieren die Intronbereiche des Gens.

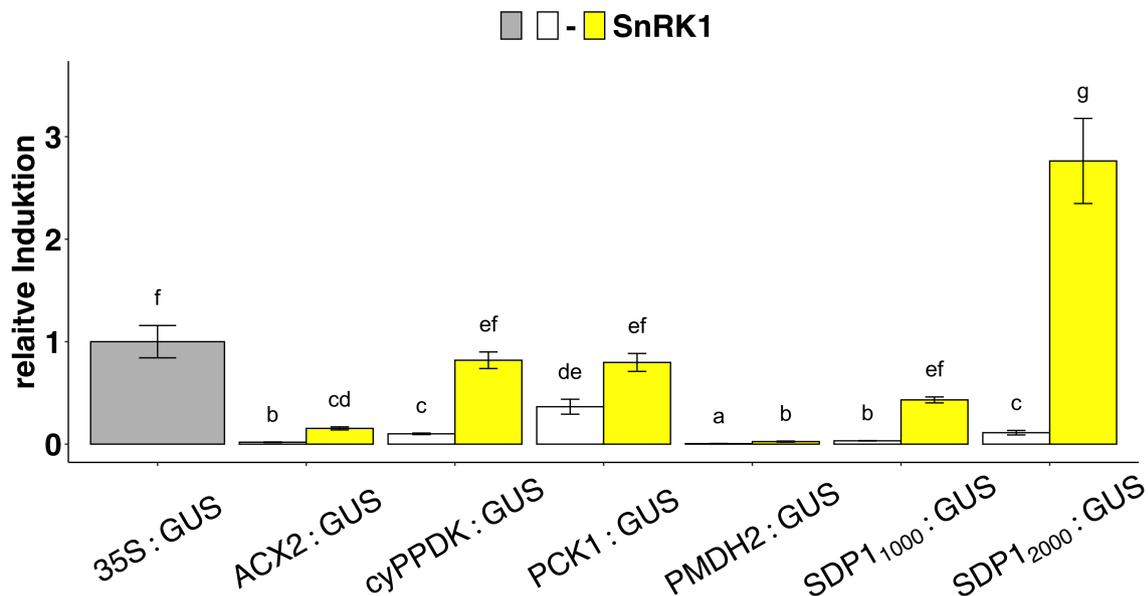


Abbildung A.8 – Vergleich unterschiedlicher Promotoren mit ihrer Aktivierbarkeit durch SnRK1 α 1. Je Promotor:GUS-Konstrukt wurden 4,5 μ g DNA (weiß) und 7 μ g Effektor-DNA (gelb) eingesetzt. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten \pm Standardfehler. Die Ergebnisse wurden relativ auf die Positivkontrolle 35S:GUS (grau) bezogen.

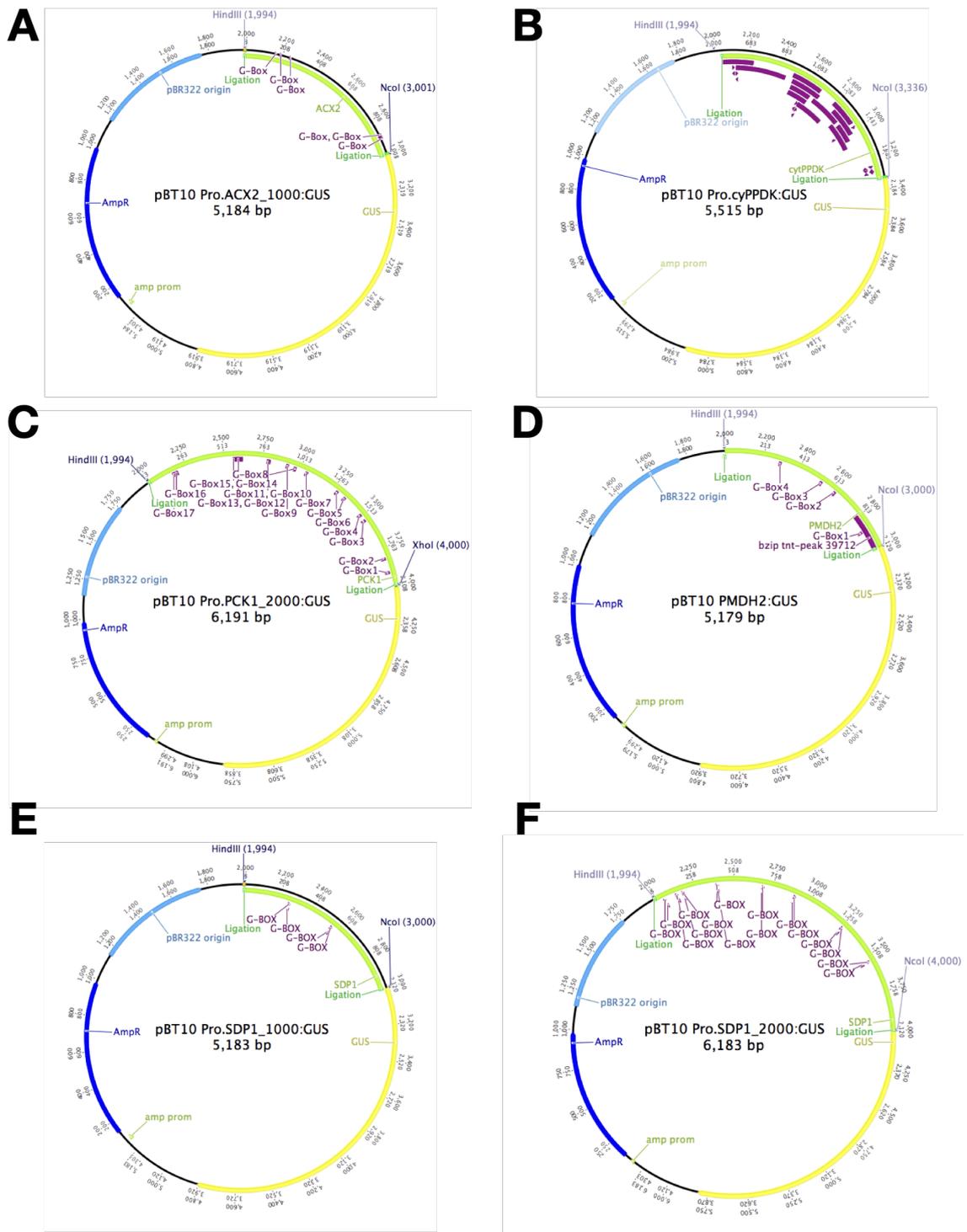


Abbildung A.9 – Karten der Promotor:GUS-Konstrukte von ACX2, PPKD, PCK1, PMDH2 und SDP1. Abgebildet sind die Karten der Promotor:GUS-Konstrukte von ACX2 (A), cyPPDK (B), PCK1 (C), PMDH2 (D), SDP1₁₀₀₀ (E) und SDP1₂₀₀₀ (F). Die Karten wurden mit Genius erstellt. Promotorbereiche sind grün, GUS-Gen (gelb), Amp^R (dunkelblau), G-Box Binde-motive (lila) und der Ursprung der Replikation pBR322 (hellblau). Flankierend zu den Promotoren sind die Restriktionsenzyme angegeben.

DEG aus RNA-Seq (p-Value 0,05)

Gen	AT-Nummer	Tag 3 dunkel	Tag 4 dunkel	Tag 4 hell	Tag 5 dunkel	Tag 5 hell
SDP1	AT5G04040			-0,90		-0,50
DAD1-like LIPASE1	AT4G16820					
LIP1	AT2G15230					
PXA1	AT4G39850	-0,07	-0,32		-0,64	
LACS6	AT3G05970	0,13	0,44		0,71	
ACX1	AT4G16760					
ACX2	AT5G65110	-0,34	0,09		0,60	
ACX4	AT3G51840	-1,18	-1,10	-1,63	-1,43	-0,63
ACX6	AT1G06310			-2,73		2,73
MFP2	AT3G06860					
AIM1	AT4G29010					
KAT2	AT2G33150					
PMDH1	AT2G22780					
PMDH2	AT5G09660	-1,13	-1,21	-2,89	-1,63	-1,08
PCK1	AT4G37870	-0,26	-0,40		-1,71	
ICL	AT3G21720					
CSY2	AT3G58750			0,82		-0,67
CSY3	AT2G42790			0,38		-0,59
MLS	AT5G03860					
MCCA	AT1G03090	-1,31	-1,74	-1,53	-1,77	-1,64
MCCB	AT4G34030	-0,75	-1,88	-1,60	-2,01	-0,80
BCAT2	AT1G10070	-0,33	-2,67	-1,53	-2,52	-1,64
PPDK	AT4G15530	0,55	-1,79	-0,84	-1,87	-1,02
cyFBPase	AT1G43670			-1,49		-0,98
ASN1	AT3G47430	0,92	-2,97	-1,41	-2,52	-1,34
ASN2	AT5G65010					
ASN3	AT5G10240	0,15	0,91	0,02	0,81	0,99
	AT2G03667					
GLN1.3	AT3G17820	0,08	0,32		0,32	
GS2	AT5G35630					
GSR1	AT5G37600					
GLN1.5	AT1G48470			-1,08		5,09
GSR2	AT1G66200	-0,04	0,23	0,21	-0,20	-0,36
GLN1.4	AT5G16570	1,28	-1,57		-1,64	
bZIP48	AT2G04038					
bZIP34	AT2G42380	-1,30	-0,50		-1,19	
bZIP3	AT5G15830					
TGA8	AT1G68640	-0,41	-0,60		-1,24	
bZIP1	AT5G49450	-0,54	-0,92		-0,92	
bZIP24	AT3G51960					
bZIP18	AT2G40620	-0,65	-0,81		-0,89	
bZIP61	AT3G58120	-0,88	-1,16	-1,47	-1,34	1,28
bZIP58	AT1G13600					
bZIP27	AT2G17770					
bZIP52	AT1G06850	-0,65	-0,46	-0,74	-0,59	1,27
bZIP29	AT4G38900	-0,39	-0,15		0,60	
bZIP21	AT1G08320					
bZIP63	AT5G28770	-0,55	-0,59		-0,97	

Abbildung A.10 – Vergleich der SnRK1-abhängigen Expression von Genen. Abgebildet ist eine Auswahl an Genen, die in der Speicherstoffmobilisierung SnRK1-abhängig reguliert waren mit einem p-Value $\leq 0,05$. Tag 3 dunkel (3dD), Tag 4 dunkel (4dD), Tag 4 hell (3dD1dL), Tag 5 dunkel (5dD) und Tag 5 hell (3dD2dL).

B Abkürzungsverzeichnis

B.1 Abkürzungen

ABA	Abscisic Acid
ADP	Adenosin-Diphosphat
AID	Auto Inhibiting Domain
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A. tumefaciens	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCAA	Branched-Chain Amino Acid
bp	Basenpaare
CBM	Carbohydrate Binding Motif
CBS	Cystathione- β -Synthetase
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CLSM	konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEG	Differentiell exprimiertes Gen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotid
DOC	Natriumdeoxycholat
DTT	1,4-Dithiothreit

E. coli *Echerichia coli*

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EtOH Ethanol

G3P Glycerinaldehyd-3-Phosphat

H₂O Wasser

HCl Salzsäure

KOH Kaliumhydroxidlösung

LHC Light Harvesting Complex

mETC mitochondriale Elektronentransportkette

MS Murashige & Skoog

NaCl Natriumchlorid

PAGE Polyacrylgelelektrophorese

PCR Polymerase Chain Reaction

PEP Phosphoenolpyruvat

PMSF Phenylmethylsulfonyl

PTE Polyoxyethylene-10tridecaether

qRT-PCR quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

RNA RiboNucliec Acid

RT Raumtemperatur

SDS Natriumdodecylsulfat

snrk1 α 1/ α 2 sucrose non-fermenting kinase 1 with catalytic subunits 1 and 2

SSP Samenspeicherprotein

T6P Trehalose-6-Phosphat

TAG Triacylglycerid

TF Transkriptionsfaktor

UBA Ubiquitin-assoziierte

ü. N. über Nacht

uORF upstream OPEN READING FRAME

B.2 Gene

ACX ACYL-CoA-OXIDASE

ACX1-4 ACYL-CoA-OXIDASE 1-4

AGT1 ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 1

AHL4 AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 4

AIM1 ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM 1

AMPK AMP-abhängige Proteinkinasen

AP2 APETALA 2

AP2-ERF APETALA 2-ERF BINDING FACTOR

ASN1 ASPARAGINE SYNTHETASE 1

ATG AUTOPHAGY

BBX B-BOX BINDING DOMAIN

BCAT2 BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSFERASE 2

bHLH basic helix-loop-helix

bZIP basic Leucine Zipper

COP1 CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1

CREB cAMP RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN

CSY CITRATE SYNTHASE

CTS COMATOSE

DELTA-OAT ORNITHINE-DELTA-AMINOTRANSFERASE

DIN DARK-INDUCED

ETFQO ELECTRON-TRANSFER FLAVOPROTEIN:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE

EXP10 EXPANSIN 10

FINS1 FRUCTOSE INSENSITIVE 1

FUS3 FUSCA 3

GLK2 GOLDEN2-LIKE2

GLN1 GLUTAMINE SYNTHETASE 1
GLT1 GLUTAMATE SYNTHASE 1
GLU2 GLUTAMATE SYNTHASE 2
GRIK GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC KINASE
HAT HISTON ACETYLTRANSFERASE
HB HomeoBox
HGO HOMOGENTISATE 1,2-DIOXYGENASE
HXK1 HEXOKINASE 1
HY5 HYPOCOTYL 5
HYH HY5 HOMOLOG
ICL ISOCITRATE-LYASE
KAT2 3-KETOACYL-CoA THIOLASE 2
LACS6/7 LONG CHAIN ACYL-CoA-SYNTHASE 6/7
LHCB2.2 LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING 2
MCCA METHYLCROTONYL-CoA CARBOXYLASE SUBUNIT ALPHA
MCCB METHYLCROTONYL-CoA CARBOXYLASE SUBUNIT BETA
MFP2 MULTIFUNCTIONAL PROTEIN 2
MLS MALATE-SYNTHASE
MPK6 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6
MYBS1 TRANSCRIPTION FACTOR MYBS1
NR NITRATE REDUCTASE
PCK1 PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 1
PED3 PEROXISOME DEFECTIVE 3
PIF PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR
PMDH1 PEROXISOMAL NAD-MALATE DEHYDROGENASE 1
PMDH2 PEROXISOMAL NAD-MALATE DEHYDROGENASE 2

cyPPDK cytosolische PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE
ProDH PROLINE DEHYDROGENASE
PTP1 PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 1
PXA1 PEROXISOMAL ABC TRANSPORTER 1
SDP1 SUCROSE DEPENDENT1
SDP1L SDP1-LIKE
SIRT SUCROSE-INDUCED REPRESSION OF TRANSLATION
SnAK SnRK1 ACTIVATING KINASE
Snf1 SUCROSE NON-FERMENTING1
SnRK1 Snf1-RELATED PROTEIN KINASE 1
SPS SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE
SUS SUCROSE SYNTHASE
TAT3 TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3
THA1 THREONINE ALDOLASE 1
TOR TARGET OF RAPAMYCIN
TPP TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE
TPS TREHALOSE-6-PHOSPHATASE SYNTHASE
WRI1 WRINKLED 1

B.3 Einheiten

A Ampere

bp Basenpaare

° C Grad Celsius

Min. Minute

rpm Umdrehungen pro Minute (engl.: revolution per minute)

Sek. Sekunde

Std. Stunde

V Volt

Danksagung

Eine erfolgreiche Arbeit ist ohne die Unterstützung und Hilfe lieber Menschen vermutlich nicht zu schaffen.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Erstgutachter Wolfgang Dröge-Laser für die gute Betreuung in den letzten vier Jahren, für die Finanzierung des Projektes und die besonderen Ideen und Anreize, die in diese Arbeit eingeflossen sind. Deine stets optimistische Ausstrahlung und deine Begeisterung für die Forschung haben mich oft zu neuen Projekten motiviert. Während dieser Zeit hattest du immer ein offenes Ohr und eine offene Tür, wenn es beispielsweise Probleme mit den Protoplasten gab, weil mal wieder das Wasser oder das Wetter sich änderte. Danke auch für deine Einsicht, dass ein Kaffeevollautomat sinnvoll und motivierend für eine Arbeitsgruppe ist ;)

Ein großes Dankeschön an die hilfsbereite Rosalia Deeken für das Lesen der vielen Seiten als Zweitgutachterin und Mitglied des Promotionskomitees. Meine Fragen hast du gerne hilfreich und zügig beantwortet. Deine Anregungen und Diskussionsbereitschaft haben meinem Projekt sehr gut getan.

An meine großartigen Kooperationspartner:

Agnes Fekete und Maria Lesch danke ich für die ersten Versuche zur Messung von TAG und Aminosäuren. Frank Waller danke ich für die Beantwortung von Fragen zu qPCR und Western-Blots sowie den Nachschub an Nervennahrung. Filip Rolland (KU Leuven) danke ich für die Konstrukte zur Messung der Aktivität von SnRK1 α 1 und für viele neue Ideen. Maximilian Klepsch und William Lopez für die Hilfe bei der Auswertung der RNA-Seq-Daten. Besonderer Dank gilt Markus Kruschke, der mich mit zahlreichen MS-Messungen und Auswertungen unterstützt hat, mich bei Kickerspielen ans „Dalle“ oder auswärts begleitete und mich zum Seenlandlauf inspirierte.

Genauso möchte ich meinen Sport- und Laborkameraden Christian Fröschel und Christoph Weiste danken, die mich nach getaner Arbeit zum Laufen überredet haben und mir damit einen guten Ausgleich zum Laboralltag ermöglichten. Außerdem standet ihr mir im Labor hilfreich zur Seite. Danke dafür!

Meiner Masterstudentin Lena GÜnder danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen mit den *bzip63*-Mutanten in Bezug auf die Induktion von *cyPPDK*. Vielen Dank auch allen ehemaligen und aktuellen Kollegen im Labor: Martina, Sarah, Theresa, Prathiba, Jan, Philipp und Theresa. Ein großes Dankeschön auch an Jörn und

Susi, die mich in die Arbeit mit Pflanzen, zu Beginn der Doktorarbeit, bestens eingeführt haben und mir so sehr weitergeholfen haben. Es war mir stets eine Freude mit und neben euch zu arbeiten. Ihr habt im Labor für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt und für lustige Runden in den Pausen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Laura. Danke für eure Unterstützung, Zuversicht und die passenden Worte zur richtigen Zeit. Ohne euch wäre ich sicherlich nicht so weit gekommen. Herzlichen Dank, Laura, für deine Unterstützung als beste Spitzensteckerin und Beschrifterin ;) Tusen tack!

Zum Schluss noch ein paar Zeilen für meinen Vater. Obwohl du nicht mit uns feiern kannst, hast du mich gelehrt, wie wichtig das Leben ist und mir so den Weg gezeigt, den ich jetzt gehe. Die Erfahrungen werden mich immer begleiten. Du hast mir gezeigt, wofür es sich zu kämpfen lohnt. Du wirst immer ein Vorbild für mich sein!

Bisherige Publikationen

Henninger M., Pedrotti L., Krischke M., Fekete A., Müller MJ., Weiste C., Dröge-Laser W. (submitted)

The evolutionary conserved metabolic kinase SnRK1 orchestrates resource mobilization during Arabidopsis seedling establishment. *Cell*