

**Environmental Metabolomics -  
Metabolomische Studien zu Biodiversität,  
phänotypischer Plastizität und biotischen  
Wechselwirkungen von Pflanzen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“  
(Dr.rer.nat.)

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Diplom-Biologe  
Christian Scherling

Potsdam den 25.03.2009

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3241/>  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus-32411  
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-32411>]

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Oktober 2005 bis Februar 2009 am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam angefertigt. Für sein mir entgegen gebrachtes Vertrauen und die Möglichkeit, diese Arbeit dort durchzuführen, danke ich herzlich **Herrn Prof. Wolfram Weckwerth**.

Katja Morgenschlau für die analytische Ausbildung.

Weiterhin danken möchte ich den Kooperationspartnern meiner Arbeit:

Dr. Kristina Ulrich und Dr. Dietrich Ewald vom Institut für Forstgenetik des vTI in Waldsiedersdorf,

Dr. Christiane Roscher und Prof. Ernst-Detlef Schulze vom Max-Planck-Institut für Biogeochemie in Jena,

Jakob Prestele und Prof. Christine Gietl von der Ludwig-Maximilian-Universität in München.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Metabolitprofilanalyse – Metabolomics.....	6
1.2	Targeted und untargeted Metabolomics in der Umweltanalytik.....	8
1.3	Metabolite- Varianzen.....	12
1.4	Zielsetzung .....	13
<b>2</b>	<b>Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf den Metabolismus von <i>in vitro</i>-Pappelklonen</b> .....	<b>15</b>
2.1	Endophytische Bakterien bei höheren Pflanzen am Beispiel der Pappel .....	15
2.2	Metabolic Profiling an mit Paenibacillus P22 inokulierten <i>in vitro</i> - Sprossen eines Pappelklones .....	18
2.3	Diskussion .....	23
<b>3</b>	<b>„Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch - Biodiversität und phänotypische Plastizität</b> .....	<b>26</b>
3.1	Das Jena Experiment – eine Biodiversitätsstudie.....	26
3.1.1	Ziele der Metabolitanalyse.....	28
3.1.2	Experimentelles Design des Freilandversuches.....	29
3.2	Analytische Strategie .....	31
3.2.1	Gegenüberstellung der Auswerteprogramme TagFinder und LECO®ChromaTOF™ – untargeted und targeted Profiling.....	33
3.2.2	Untargeted Profiling via LC-FT-MS.....	36
3.3	Ergebnisse.....	38
3.3.1	Metabolite Profiling 2006 .....	38
3.3.2	Metabolite Profiling 2008 .....	46
3.4	Diskussion .....	60
3.4.1	Metabolite Profiling 2006 .....	62
3.4.2	Metabolite Profiling 2008 .....	66
3.4.3	Phänotypische Plastizität von Pflanzen als Adaptation an sich ändernde Interaktionsmuster in Pflanzengesellschaften .....	71
<b>4</b>	<b>Metabolische Charakterisierung der <i>Arabidopsis thaliana</i> PEX 10 Photorespirationsmutante</b> .....	<b>73</b>
4.1	Einleitung .....	73
4.2	Ergebnisse.....	75
4.2.1	Vergleich Wildtyp und PEX 10 Mutanten unter Normalatmosphäre .....	76
4.2.2	Konditionierung des Phänotyps der PEX 10 Mutante durch unterschiedlichen CO <sub>2</sub> - Partialdruck .....	79
4.3	Diskussion .....	85
4.3.1	Der „metabolische Photorespirationsphänotyp“ von PEX 10 Mutanten bei Normalatmosphäre .....	86

4.3.2	Der konditionierte „metabolische Photorespirationsphänotyp“ von PEX 10 Mutanten .....	87
4.3.3	Reduzierter photorespiratorischer Fluss in PEX 10 Mutanten mündet in eine schlechtere Performance des Primärstoffwechsels .....	89
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>93</b>
5.1	Materialien und Equipment .....	93
5.1.1	Chemikalien und Referenzverbindungen .....	93
5.1.2	Analytisches Equipment .....	93
5.2	Pflanzliches Untersuchungsmaterial .....	94
5.3	Software .....	96
5.4	Extraktion und Derivatisierung .....	96
5.4.1	Metabolitextraktion mit CH <sub>3</sub> OH/CHCl <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O für GC-TOF-MS .....	96
5.4.2	Derivatisierung für GC-TOF-MS .....	96
5.4.3	Metabolitextraktion mit Methanol für LC-FT-MS .....	97
5.5	Metabolite Profiling .....	97
5.5.1	GC-TOF-MS basierte Metabolitanalyse .....	97
5.5.2	UPLC-FT-ICR-MS basierte Metabolitanalyse .....	98
5.6	Chemometrische Analyse .....	99
5.6.1	Dimensionsreduktion – Hauptkomponentenanalyse (PCA) .....	99
5.6.2	T-Test- Clustering .....	99
5.6.3	Varianzanalyse .....	99
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>115</b>

## Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AIC	Analytical Ion Chromatogram
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
CE	Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis)
CI	chemische Ionisierung
Da	Dalton
EI	Elektronenstoss-Ionisierung
ESI	Electrospray Ionisation
eV	Elektronenvolt
FT	Fourier-Transformation
FG	Frischgewicht
GC	Gaschromatographie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICA	Unabhängige Komponentenanalyse (Independent Components Analysis)
ICR	Ionen Cyclotron Resonanz
ID	Innendurchmesser
kV	Kilovolt
LAR	Blattfläche/Gesamtrockengewicht (leaf area ratio)
NMR	Kern(spin)resonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
MW	Mittelwert
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (zur Verwerfung der Nullhypothese)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Components Analysis)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIG	Einzelpflanzenanlage
Q	Quadrupol
R	Regressionskoeffizient
RI oder RT	Retentionsindex
RubisCO	Ribulose 1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
sek	Sekunde
Stabw	Standardabweichung
TCA	Citrat- oder Krebs- Zyklus (Tricarboxylic acid cycle)
TIC	Total Ion Chromatogram
TOF	Flugzeit (Time-of-flight)
UPLC™	Ultrahochdruckflüssigchromatographie
dZn	delta Zink

# 1 Einleitung

## 1.1 Metabolitprofilanalyse – Metabolomics

Ein genereller Ansatz zur Charakterisierung von biologischen Systemen bietet die Untersuchung des Metaboloms. Der Begriff Metabolom wurde in Analogie zu den Begriffen Genom und Proteom geprägt und meint die Gesamtheit des Metabolitspektrums eines Organismus, dessen Analyse als „Metabolomics“ bezeichnet wird (1). „Omics“- Technologien haben das Ziel, ohne Selektionskriterien möglichst alle Bestandteile einer biologischen Probe zu detektieren (identifizieren und quantifizieren), um daraus Rückschlüsse auf nicht vorhersehbare und somit neuartige Korrelationen in biologischen Systemen zu ziehen (2). Durch die neu entstandenen Omics- Plattformen wurden zwei große Entwicklungen bzw. Richtungen in den Biowissenschaften ausgelöst: Zum einem die Hochdurchsatz- (High-Throughput) Analyse, die das simultane Messen von hunderten bis zu tausenden von molekularen Reaktanden erlaubt; und zum anderem die Systembiologie, die sich um die Integration dieser enormen Datenmengen aus Genomics, Proteomics und Metabolomics bemüht und diese zu regulatorischen Netzwerken verknüpft. Damit wird die Lücke zwischen Genotyp und Phänotyp geschlossen. Ein zentrales Dogma in der Biologie besteht in der Kausalität zwischen Gen – Enzym - und Metabolite. Perturbationen auf einer Ebene rufen systemische Antworten hervor, die in einem veränderten Phänotyp münden.

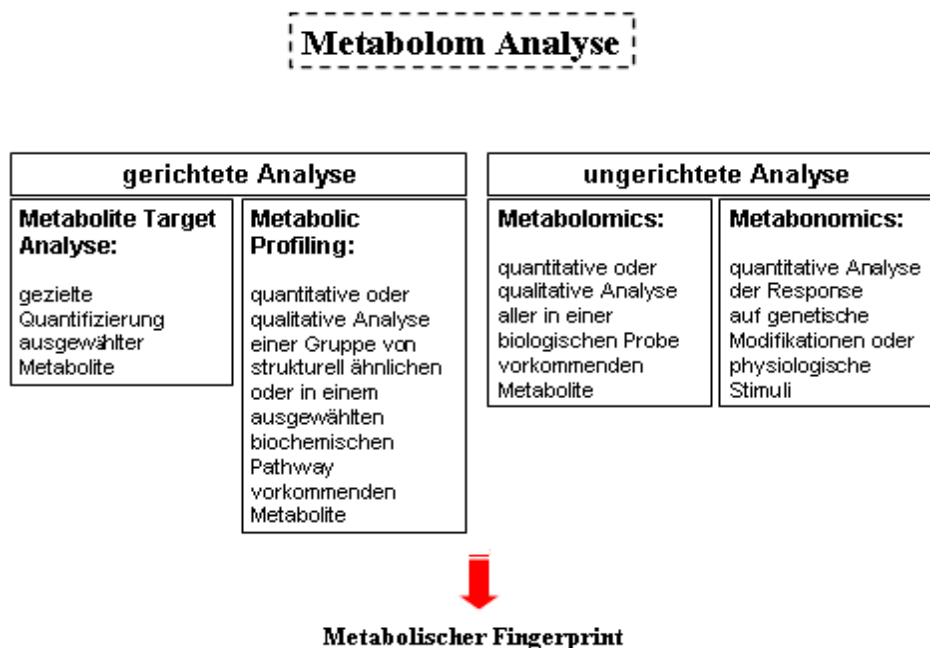
Die Erhebung und statistische Auswertung solcher Datenmengen – der so genannte „bottom up“ Ansatz in der Systembiologie geht einher mit der mathematischen Modellierung des biologischen Systems – dem so genannten „top down“ Ansatz.

Metabolite sind die Endprodukte von zellulären regulatorischen Prozessen, deren Abundanz durch die Resonanz auf genetische Modifikationen oder Umwelteinflüsse zurückzuführen ist (2). Gerade in der klassischen Biochemie liegt die Bedeutung der Metabolitanalyse in der Untersuchung von Stoffwechselwegen wie Krebszyklus, Pentosephosphatzyklus oder Calvinzyklus. Neben der Identifikation geht es vor allem um Beziehungen und Wechselwirkungen zwischen den Stoffen. Metabolite, die finalen Gene- Produkte, repräsentieren ultimativ den Phänotyp eines Organismus und haben die Fähigkeit als Biomarker zu fungieren (3).

Die umfassende Charakterisierung aller Metabolite in einem System stellt jedoch hohe Anforderungen an die verwendeten analytischen Methoden, weil Metabolite aus stofflicher Sicht mannigfaltig sind und in einem weiten Konzentrationsbereich vorliegen. Bei zunehmenden Organisationsgrad der zu untersuchenden Spezies steigt auch der Gehalt an zu erwartenden Verbindungen. So schätzt man beispielsweise bei Mikroorganismen wie *Escherichia coli* die Metabolitanzahl auf 800 (4), in höheren Pflanzen dagegen ist mit einer

Metabolanzahl von 200000 (5) zu rechnen. Für die quantitative und reproduzierbare Herauslösung von Molekülen aus Zellen, Zellorganellen oder Gewebeverbänden ist die Wahl einer geeigneten Extraktionsmethode essentiell. Weitere Kriterien sind die Stabilität der Zielanalyten und die Kompatibilität mit der Analysetechnik, welche im Protokoll zur Analyse von Metaboliten aus gefrorenem Pflanzenmaterial von Weckwerth *et al.* (6) berücksichtigt werden. In der Regel kann mit der vorhandenen Applikation aber nie die Gesamtheit des Metaboloms erfasst werden, daher etablierte sich in den letzten Jahren in der Pflanzenphysiologie der differenziertere Terminus des „Metabolic oder Metabolite Profiling“. Hiermit ist eine gerichtete Analyse gemeint, die sich auf die relative Quantifizierung ausgewählter Metabolite in einem bestimmten Stoffwechselvorgang oder einer Substanzklasse beschränkt.

Bei der Untersuchung des Metaboloms werden im Allgemeinen zwei grundlegende analytische Konzepte angewandt: Der gerichtete Ansatz (targeted approach) und/oder der ungerichtete Ansatz (untargeted approach). Abb.1.1.1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Strategien zur Analyse des Metaboloms.



**Abb.1.1.1: Strategien zur Analyse des Metaboloms.** Gerichtete und ungerichtete Profiling Methoden ergeben spezifische metabolische Muster (Metabolischer Fingerprint).



Die in Abb.1.1.1 dargestellte Terminologie (nach O. Fiehn (5)) befindet sich noch im Fluss, daher können sich einige Definitionen in ihrer Bedeutung und in ihrem Gebrauch überlappen. Das Resultat der verschiedenen Profiling Methoden ist ein spezifisches metabolisches Muster der biologische „Fingerprint“, der zur Charakterisierung von verschiedenen Organismen, Genotypen oder Phänotypen verwendet werden kann. In Kombination mit Protein und mRNA Messungen zeigte sich, dass der metabolische Fingerprint eine hohe biologische Spezifität aufweist und damit prädestiniert ist, um unterschiedliche Proben zu klassifizieren und korrespondierende Biomarker zu identifizieren (7).

So genannte metabolische Fingerprints basierend auf NMR, GC/MS oder LC/MS Technologien, die sich als sehr erfolgreich erwiesen haben und weit verbreiteten Einsatz für diverse Fragestellungen in der Metabolom Analyse finden.

### 1.2 Targeted und untargeted Metabolomics in der Umweltanalytik

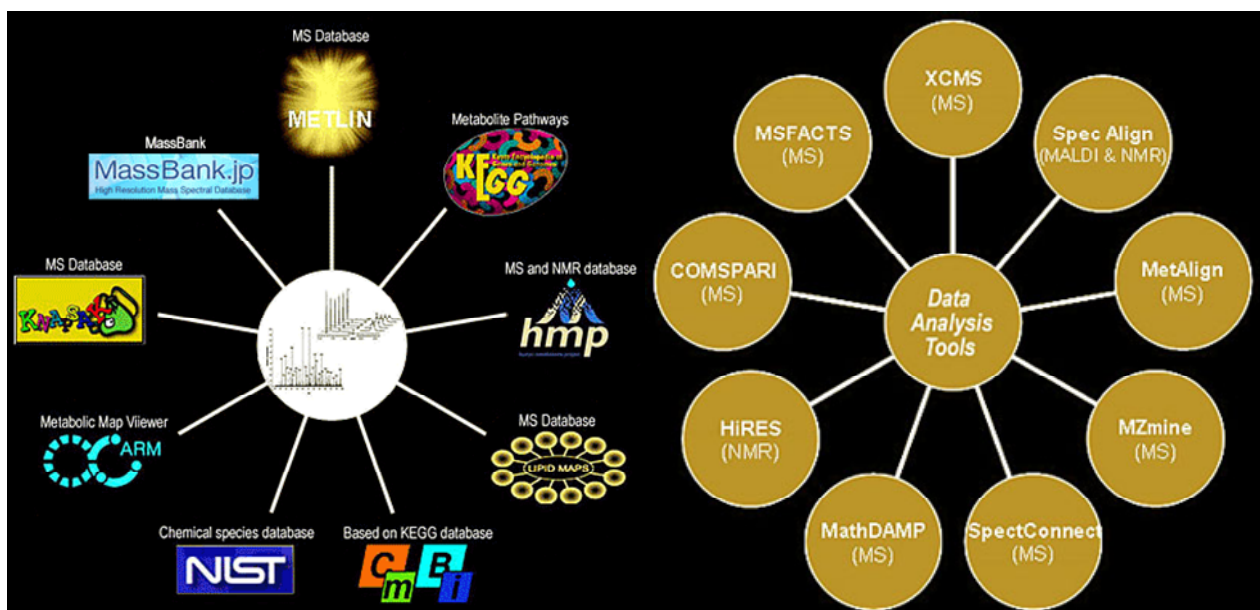
Moderne Metabolomics- Techniken sind das targeted und untargeted Profiling, die zur Charakterisierung von biologischen Systemen breite Anwendung in den Lebenswissenschaften gefunden haben. Targeted und untargeted Profiling sind zwei komplementäre Strategien zur Metabolomanalyse, wobei das targeted Profiling zielgerichtet alle bekannten Analyten und das untargeted Profiling alle potentiellen messbaren Verbindungen quantifiziert (5,8).

Durch umweltbedingte Einflüsse (Licht, Wasser, Nährstoffe, Temperatur) reagiert oft der ganze Organismus. Daher muss der analytische Ansatz möglichst umfassend sein, um das gesamte biologische System charakterisieren zu können. Aus dieser Schlussfolgerung resultiert der untargeted Profiling- Ansatz. Hier wird versucht möglichst alle relevanten biologischen Analyten zu identifizieren, was durch adäquate Extraktions- und Messmethoden erreicht werden kann. Für eine globale Auswertungsstrategie der gemessenen Chromatogramme ist eine automatisierte Alignment- Software essentiell. Diese muss in der Lage sein, Peaks (Analyten) bzw. dekonvolutierte Massenspektren in allen Chromatogrammen zu einem definierten Zeitpunkt wiederzuerkennen und abzugleichen. Da in der Regel kommerzielle Software- Pakete für universelle Analysen unzureichend geeignet sind, arbeiten viele Bioinformatik- Gruppen an Alignment- Strategien. Einige Programme für die Analyse von GC/MS und LC/MS Daten sind in Abb.1.2.1 dargestellt. In dieser Arbeit wurde für das untargeted Profiling der GC/MS Daten die TagFinder- Auswertesoftware verwendet (9), welche in Kap.3.2.1 näher erläutert wird. Die untargeted Profiling Daten der LC/MS Analyse wurden mit der SIEVE® (Thermo Fisher Scientific) Software ausgewertet

## 1. Einleitung

(Kap.3.2.2). Die so entstandenen hochdimensionalen Daten- Matrizen werden anschließend mit multivariaten und univariaten Methoden nach biologisch relevanten Analyten gefiltert. Der Vorteil dieser Methodik liegt in der Determination hunderter potentieller Metabolite, die aber nur teilweise identifizierbar sind. Das Potential dieser Methodik liegt in der Identifikation von unbekanntem biologisch relevanten Metaboliten, die neue Stoffwechselwege aufzeigen. Die gut etablierte GC-TOF-MS Analytik ist für diesen Ansatz ungeeignet, da pro Analyten mehrere Derivatisierungsprodukte möglich sind und eine Strukturaufklärung von unbekanntem Metaboliten mit korrespondierenden Elektronenstoßionisierungs-Fragmentspektren kaum möglich ist (10). Zwar lassen sich mittels GC-TOF-MS viele „Unknowns“ bestimmen, aber eine exakte Identifikation ist fast ausschließlich nur mit Hilfe einer Referenz möglich.

Aus diesem Grund gewinnt die LC/MS Analytik mittels FT-ICR-, Orbitrap- oder Q-ToF-Massenanalysatoren immer mehr an Bedeutung in der Charakterisierung unbekannter biologischer Substanzen in untargeted Profiling- Analysen. Der Vorteil dieser Geräte liegt in der Bestimmung exakter Masse zu Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ), wodurch mit Hilfe von MS/MS- Experimenten Summenformel und Strukturaufklärung der unbekanntem Analyten möglich wird. Aufgrund des großen Scan- Bereiches der LC/MS können in einer Analyse einige tausend  $m/z$ -Verhältnisse bestimmt werden (11,12). Die exakte Identifikation aller gemessenen unbekanntem Analyten ist momentan noch illusorisch, deshalb liegt der Fokus auf wenigen (hundert) biologisch relevanten Metabolite.



**Abb. 1.2.1: Überblick über frei zugängliche Datenbanken und Auswertungssoftwares für die Metabolitanalyse, die auf der ASMS 2008 vorgestellt wurden. 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry in Denver 2008.**

## 1. Einleitung

---

Infolge der momentan noch unvollständigen Identifikation zahlreicher Metabolite in der untargeted Analyse, ist die Target Analyse weiterhin eine adäquate Profiling- Methode zur biologischen Diagnostik. Für das targeted Profiling sind Referenz- Bibliotheken, in denen potentielle Zielsubstanzen via Fragmentationsspektren und Retentionsindex hinterlegt sind, elementare Bestandteile der Identifikation. Frei zugängliche standardisierte Datenbanken sind in Abb.1.2.1 dargestellt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Golm- Metabolom- Datenbank ([GMD@CSB.DB](#)) gearbeitet, die ein diverses Spektrum an pflanzlichen Metaboliten enthält. Mit Hilfe von Referenz- Bibliotheken können zielgerichtet bekannte Analyten annotiert und in einem Referenz- Chromatogramm hinterlegt werden, welches dann zum Abgleich gegen andere Chromatogramme verwendet wird. Die Fokussierung in der targeted Analyse liegt auf definierten Referenzmetaboliten eines Stoffwechselweges, wodurch die Analyse wesentlich sensitiver wird (5). Nachteilig ist der hohe Aufwand, der betrieben werden muss, um hunderte von Analyten für eine Referenz- Bibliothek zu vermessen.

In Tab.1.2.1 werden die aktuell leistungsstärksten Metabolitanalyse- Techniken anhand ihrer Vor- und Nachteile verglichen. Dabei ist jede vorgestellte Technik mehr oder weniger geeignet für das targeted oder untargeted Profiling.

Hinsichtlich der jeweiligen Limitierung der einzelnen Techniken hat es sich als sinnvoll erwiesen die NMR, die GC/MS und die CE/MS Technik sowie einige LC/MS Anwendungen (Quadrupol, Linear Ion Trap) vorwiegend zum Target bzw. zum Metabolic Profiling einzusetzen. Die NMR- Spektroskopie eignet sich hervorragend zur Bestimmung von Molekülstrukturen und zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Dadurch lassen sich sehr schnell Proben klassifizieren, allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit und der Identifikation individueller Metabolite. Der Vorteil von LC- und GC- MS Techniken liegt in ihrer Empfindlichkeit, Universalität, Selektivität und Robustheit. Die CE/MS Technik zeichnet sich durch eine große chemische Bandbreite und ein hohes Auflösungsvermögen in der Chromatographie aus. Nachteilig für die LC- und CE/MS Techniken wirkt sich das Fehlen von Referenz- Bibliotheken sowie die Nichtvergleichbarkeit zwischen verschiedenen Analyse- Laboren wegen fehlender Standardisierung aus. Obwohl die GC/MS-Technik den Nachteil der Derivatisierung hat, ist sie die Standard Methode in der Metabolitanalytik aufgrund hoher Trennleistungen, enormer Sensitivität, kurzen Analysenzeiten und standardisierten Referenz- Bibliotheken.

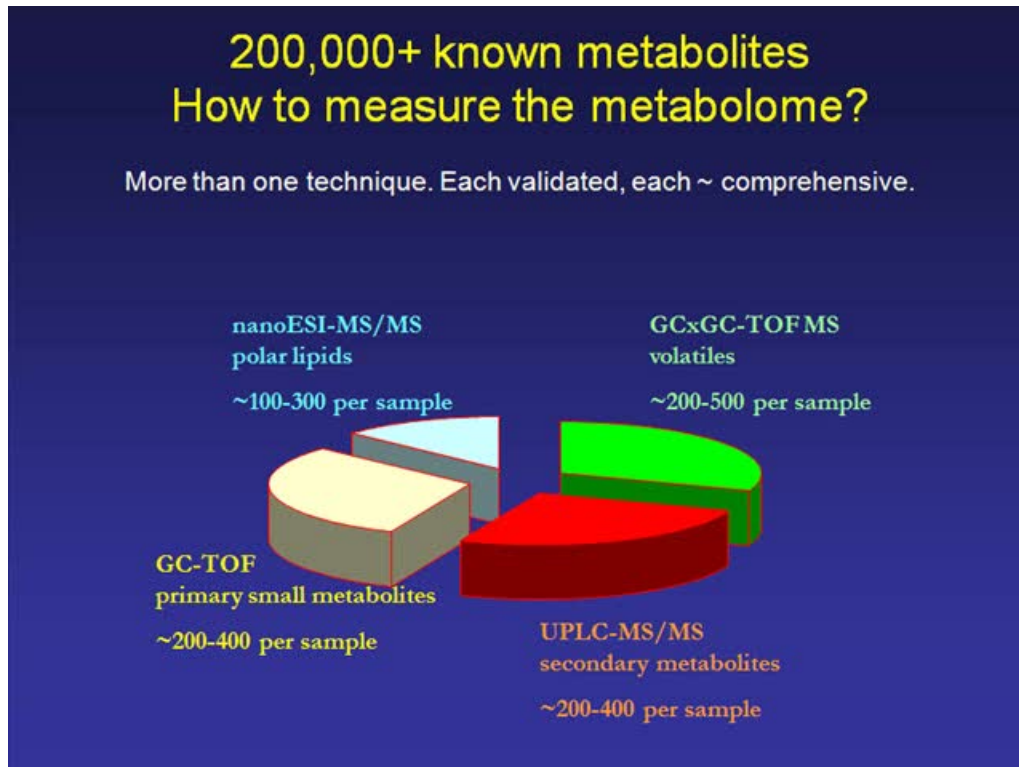
Durch den Einsatz von nano- oder ultra- Hochleistungsflüssigkeitschromatographien (HPLC) und die Kopplung an hochauflösenden Massenspektrometern offenbaren sich völlig neue Profiling- Methoden. Aufgrund der gesteigerten Kapazität der analytischen Systeme und der damit verbundenen gesteigerten Diversität des erfassbaren Metabolitspektrums geht der Trend in der Metabolitanalyse momentan in Richtung LC/MS-Analyse mit exakter Massenbestimmung, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Exemplarisch

dafür stehen UPLC gekoppelte FT-ICR Massenspektrometer (Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz), die sich durch akkurate Massenbestimmung auszeichnen, und mit deren Auflösungsvermögen und Empfindlichkeit sich mehrere tausend Analyten (Features) in einer komplexen biologischen Matrix gleichzeitig bestimmen lassen, wobei die uneindeutige Identifikation nach wie vor ein Problem darstellt (siehe auch oben).

Analytische Methode	Vorteile	Nachteile
<b>NMR</b>	schnelle Analyse; hohe Auflösung; Strukturaufklärung	geringe Sensitivität; convolvierte Spektren; mehrere Peaks pro Analyten; limitierte Referenz- Bibliotheken
<b>FT-ICR-MS</b>	schnelle, sensitive Analyse; exakte Massenbestimmung 1ppm; Strukturaufklärung; breites chem. Substanzspektrum	mehrere Molekül- Peaks pro Analyten; wenige exakte Datenbankeinträge
<b>GC-TOF-MS</b>	schnelle, sensitive und robuste Analyse; frei verfügbare Referenz- Bibliotheken;	begrenzt chemisches Substanzspektrum (temperatur- instabile oder zu große Analyten); Derivatisierung;
<b>LC/MS</b>	vielfältige Separationsmodi; breites chemisches Substanzspektrum; Strukturaufklärung;	chromatographische Nachteile gegenüber der GC; keine Referenz- Bibliotheken; schlechte Vergleichbarkeit durch die Vielfalt an Methoden
<b>CE/MS</b>	hohes chromatographisches Auflösungsvermögen; schnelle, sensitive Analyse; integrale Analyse von ungeladenen und geladenen Analyten	keine Referenz- Bibliotheken; limitierte Ladungskapazität; Detektion- Limits; geringer Dynamic Range

**Tab. 1.2.1: Überblick über aktuelle Metabolite Profiling Techniken, die zur targeted und untargeted Analyse eingesetzt werden.**

Dennoch die Heterogenität der Analyten einer biologischen Komplexprobe ist zu groß, um alle in ihr enthaltenen chemisch diversen Komponenten mit einer Analysetechnik erfassen zu können. Das erklärte Ziel von Metabolomics- Analysen ist es jedoch, das Metabolom eines biologischen Systems vollständig zu charakterisieren. Daher erfolgt in modernen Metabolomics- Strategien ein Splitting der Proben, die dann mittels 2-3 komplementären analytischen Methoden vermessen werden, um so einen globalen chemischen Ansatz zu gewährleisten (Abb.1.2.2).



**Abb.1.2.2: Begrenzung jeder Metabolitanalyse auf ein bestimmtes chem. Spektrum. Kombination verschiedener Techniken zur Metabolom- Analyse.** Originalabbildung von O. Fiehn auf der 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry in Denver 2008.

### 1.3 Metabolite- Varianzen

Die Bestimmung und die Interpretation der *in vivo* auftretenden Metabolitdynamik bzw. Fluktuationen durch biochemische Pathways hindurch stellt heute eine der größten Anforderungen in der Metabolomanalyse dar. Der Zustand eines lebenden Systems ist durch typische Eigenschaften wie Fließgleichgewicht, Homöostasis und Entwicklung gekennzeichnet, dabei können Metabolitprofile nur den „steady state“ Zustand reflektieren. Metabolite weisen eine inhärente Variabilität in ihrer Abundanz auf, wobei man zwischen analytischer, biologischer und induzierter Varianz unterscheidet. Selbst bei hypothetisch vollständiger Eliminierung der analytischen Ungenauigkeit und bei identischen Kultivierungsbedingungen zeigen Pflanzen des gleichen Genotyps Variationen in ihrer phänotypischen Ausprägung, was als biologische Varianz bezeichnet wird.

Morgenthal *et al.* (13) verglich den analytischen Fehler und die biologische Varianz der GC-TOF-MS Analyse mittels technischer und biologischer Replikate von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Dabei lagen die Variationskoeffizienten verschiedener Metabolite der technischen

Replikate zumeist unter 25 %, welche die Summe aller möglichen Fehler während der Extraktion, der Derivatisierung, der Messung sowie der Datenauswertung umfassten. In der Analyse der biologischen Variabilität zweier Genotypen zeigte sich, dass selbst unter Standardbedingungen im Phytotron die biologische Varianz den analytischen Fehler um ein Vielfaches überstieg. Dieser Nachweis zeigt zweifelsfrei, wie sensitiv Metabolic Profiling Methoden biologische Schwankungen von analytischen Schwankungen unterscheiden können.

Detaillierte Korrelationsanalysen in Metabolomics- Studien wiesen "Koregulation" zwischen den verschiedensten Metabolite- Paaren nach, wobei artifizielle Phänomene in Folge zufälliger Messunsicherheiten ausgeschlossen werden konnten. Somit können determinierte Metabolite- Korrelationen als direkte phänotypische Ausprägung des genetischen Hintergrunds sowie umweltbedingter Einflüsse interpretiert werden und stellen somit einen definierten physiologischen Zustand dar, welcher durch minimale Fluktuationen extrinsischer Parameter erzeugt werden kann (7,13). Durch die Verknüpfung beobachteter Korrelationsmuster zu metabolischen Netzwerken lassen sich regulatorische Veränderungen und Metabolitdynamiken erfassen. Insbesondere die integrative Analyse komplementärer Stoffwechselebenen stellt eine Möglichkeit dar, Koregulationen von Metaboliten, Transkripten und Proteinen innerhalb biochemischer Netzwerke aufzudecken und Einblicke in die Organisation des Metabolismus zu erhalten (6).

Metabolische Varianzen eines Phänotyps reflektieren die genotyp-abhängige Resonanz des Organismus auf umweltbedingte Parameter (abiotischer und biotischer Stress, Entwicklung) und können mit sensitiven Metabolite Profiling Methoden determiniert werden (14). Diese Anwendungen haben unter anderem auch zum Begriff des „Environmental Metabolomics“ geführt (15).

### 1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten verschiedene analytische Strategien als auch verschiedene Profiling Techniken genutzt werden, um biologische Systeme, die in Interaktion mit ihrer Umwelt stehen, zu charakterisieren und um physiologische Resonanz- Muster zu erkennen. Dabei standen die metabolische, phänotypische und genotypische Plastizität von Pflanzen im Fokus der Untersuchungen.

Um den interessierten Leser einen Einstieg in die Plastizität des Metabolismus von Pflanzen als Resonanz auf veränderte Umweltbedingungen zu gewähren, wurde das *in vitro*- System

## 1. Einleitung

---

Pappelklone – Endophyten (Kap.2) dieser Arbeit vorangestellt. Betrachtet wurden hier die biotischen Interaktionen von endophytischen Bakterien und deren Auswirkungen auf den Metabolismus von Pappelklonen. Bisherige Studien analysierten vor allem die durch Mykorrhiza assoziierten oder die exogen bakteriellen Einflüsse auf den pflanzlichen Stoffwechsel. Aufgrund der endophytischen Lebensweise der Bakterien in den Pflanzen erfolgen mögliche Stimuli endogen, was eine neue Betrachtungsweise in der umweltbedingten Einflussnahme darstellt. Die Motivation dieser Untersuchung lag in der Fragestellung: In wiefern eine metabolische Interaktion zwischen Pappeln und Endophyten stattfindet, und ob diese anhand von veränderten Intermediate- Gehalten nachweisbar wären? Stoffwechselphysiologische Analogien des *in vitro*- Systems Pappelklone/Endophyten finden sich dann in Kapitel 3 wieder, wo ein auf Nachbarpflanzen indirekter durch Leguminosen/Bakterien induzierter Effekt registriert wurde.

Im Jena Experiment (Kap.3) dieser Arbeit sollte die metabolische Plastizität von Pflanzen im Freiland auf veränderte biotische Interaktionsmuster (Konkurrenz/Diversität/ Artenzusammensetzung) geprüft werden. Aufgrund der sehr variablen abiotischen wie biotischen Bedingungen im Freiland, sind sehr präzise experimentelle und analytische Methoden notwendig, um biologisch relevante Einflussfaktoren herauszufiltern. Die zu testenden Hypothesen waren: Wie schaffen es kleine konkurrenzschwache Kräuter unter dominanten Arten zu existieren? Induzieren veränderte pflanzliche Interaktionsmuster metabolische Adaptationen und lassen sich dafür metabolische Marker finden? Weiterhin sollte nach Hinweisen gesucht werden, ob und inwiefern sich Stickstoff- oder Kohlenstoffverfügbarkeit limitierend auf das Pflanzenwachstum auswirken können.

Ein dritter Teil der Arbeit (Kap.4) betrachtet den Prozess der Photorespiration am Modellsystem *Arabidopsis thaliana*. Es sollte geprüft werden, in wiefern der Metabolismus einer Photorespirationsmutante (PEX 10) Unterschiede zum Wildtyp aufzeigt, potentielle Auswirkungen auf den photorespiratorischen C<sub>2</sub>-Zyklus zu erwarten sind und diese im stoffwechselphysiologischen Kontext zu anderen Mutanten stehen? Mittels veränderlicher abiotischer Bedingungen (CO<sub>2</sub>-Konzentration) kann ein dysfunktionaler Phänotyp der Mutante unterdrückt werden. Aufgrund der genetischen Präferenz stand zur Disposition, ob sich trotz Unterdrückung des morphologischen Phänotyps ein metabolischer Phänotyp manifestiert.

## **2 Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf den Metabolismus von *in vitro*-Pappelklonen**

### **2.1 Endophytische Bakterien bei höheren Pflanzen am Beispiel der Pappel**

Höhere Pflanzen sind seit Beginn ihrer Evolution mit mikrobiellen Organismen assoziiert, was zu co-evolutionären Kooperations- und Abhängigkeitsverhältnissen im Stoffwechsel und Entwicklungsgeschehen führte. Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen reichen von symbiotischen bis zu parasitären Beziehungen, wobei diese nur die Grenzfälle eines weiten Spektrums unterschiedlich gestalteter Wechselwirkungssysteme darstellen. Auch in pflanzlichen Geweben wurden bakterielle Interaktionspartner nachgewiesen, die so genannten Endophyten, die wahrscheinlich ubiquitär im Pflanzenreich vertreten sind (16,17). Viele dieser Bakterienarten wechseln zwischen endophytischer und epiphytischer Lebensweise (18), das heißt, die in der Phyllosphäre oder Rhizosphäre assoziierten Bakterien sind in der Lage, aktiv oder passiv Pflanzen fakultativ endophytisch zu besiedeln (19). Sie gehen eine mutualistische Symbiose mit ihrem pflanzlichen Wirt ein, die für beide Partner von Nutzen sein kann. Endophytische Bakterien sind in der Lage, durch einfache Konkurrenzwirkung oder die Produktion von antimikrobiellen Substanzen die Ausbreitung phytopathogener Pilze und Bakterien zu hemmen oder zu verhindern (20,21). Ebenso sind pflanzenwachstumsfördernde Wirkungen bekannt, die auf die Bildung von Phytohormonen wie Auxin und Cytokinin zurückzuführen sind (22). Diese antagonistischen beziehungsweise wachstumsfördernden Wirkungen der Endophyten auf ihren Wirt veranlassten Hallmann et al. (17) zu einer Definition, die sich auf neutrale Besiedler, Symbionten und ökologische Nutzbringer bezieht, aktiv pathogene Bakterien jedoch ausschließt. Danach werden als endophytische Bakterien die Bakterien bezeichnet, die aus oberflächensterilisiertem Pflanzengewebe isoliert oder aus dem Inneren von Pflanzen extrahiert werden können und mindestens eine Phase ihres Lebenszyklus im Inneren einer Pflanze verbringen ohne jedoch sichtbare Krankheitssymptome zu verursachen. Bisherige Untersuchungen zum Einfluss von Endophyten beschränkten sich vorrangig auf landwirtschaftliche Nutzpflanzen. Seit einiger Zeit werden aber auch Forstgehölze aufgrund ihrer wirtschaftlichen Bedeutung in diese Betrachtungen mit einbezogen.

Untersuchungen am Institut für Forstgenetik des vTI in Waldsiedersdorf zeigten endophytische Bakterienbesiedlung auch in *in vitro*- Vermehrungssystemen (pflanzliche Zellkulturen) wie z. B. in Pappel-, Lärchen-, Fichten- und Robinienklonen (23,24). Endophyten, die *in vivo* zur natürlichen Bakterienflora der Pflanze gehören, sind in der Lage sich unter den speziellen *in vitro*- Bedingungen so stark zu vermehren, dass sie einerseits

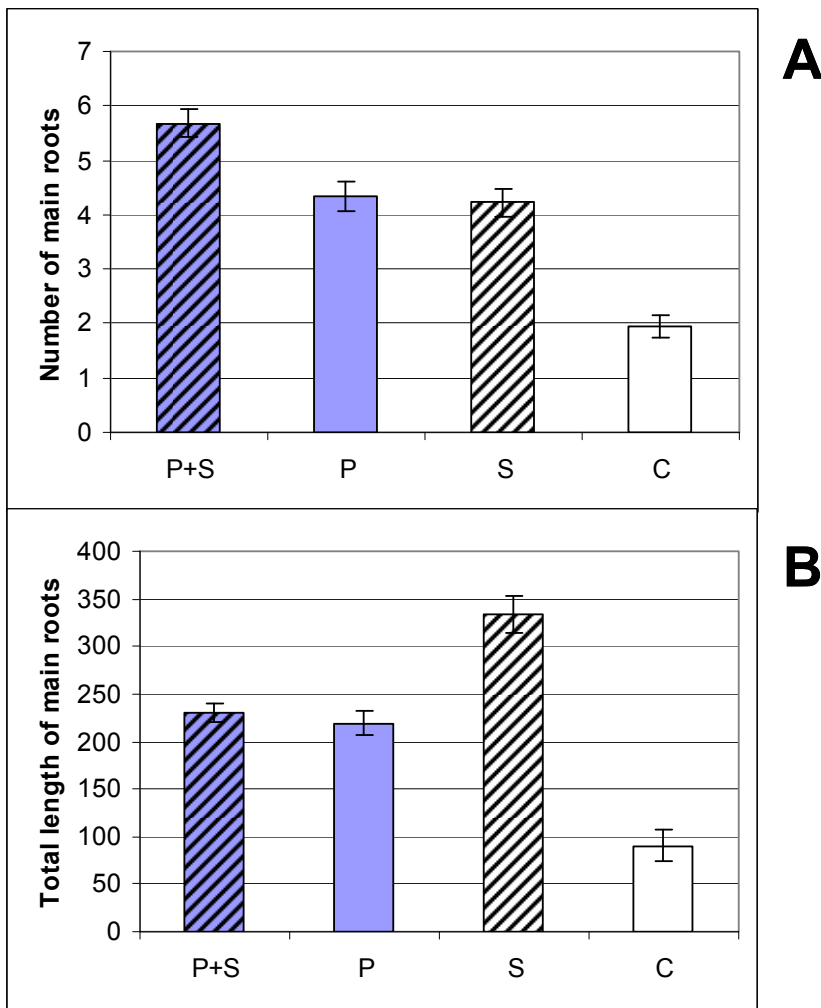


## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*-Pappelklonen

das Pflanzenwachstum beeinträchtigen, es aber andererseits auch fördern können (25,26). Weiterhin zeigten sich Besiedlungsunterschiede darin, dass Freiland-Pappelklone weitaus diverser von Endophyten besiedelt wurden, als die *in vitro*-Pappelklone, die vorwiegend von Bakterien der Gattung *Paenibacillus* kolonisiert waren (27). 16S-rDNA- Sequenzvergleiche der am häufigsten in den *in vitro*- Kulturen vorkommenden *Paenibacillus*- Isolate zeigten eine starke Übereinstimmung (99,7%) mit der Art *Paenibacillus humicus* (28). Im Gegensatz zu Freilandkulturen konnte eine starke *in vitro*- Verbreitung der *P. humicus*- Gruppe (unabhängig von Pflanzenart und Labor) festgestellt werden, was auf eine besondere Anpassung an die speziellen Kultivierungsbedingungen hinweist (25). Auch für verschiedene Arten/Stämme der Gattung *Paenibacillus* sind pflanzenwachstumsfördernde Wirkungen bekannt, ein Umstand der auf die Bildung von Phytohormonen (29), antibiotisch wirksamen Verbindungen (30) oder Enzymen (31) zurückzuführen ist. Außerdem wurden bei *Arabidopsis thaliana* Rhizobakterien der Art *Paenibacillus polymixa* gefunden, die der Pflanze einen besseren Schutz gegen Pathogene und abiotischen Stress verliehen (32). Inokulationsversuche mit Isolaten der *P. humicus*- Gruppe, die an *in vitro*- vermehrten Pappelklonen in Waldsiefersdorf durchgeführt wurden, ergaben signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zu den bakterienfreien Kontrollpflanzen. Zur Beimpfung wurden aus Meristemen regenerierte Pflanzen des chinesischen Pappelklons 741 (♀ (*P. alba* x (*P. davidiana* + *P. simonii*) x *P. tomentosa*), Prof. Han, Beijing, China) verwendet, die frei von kultivierbaren endophytischen Bakterien waren. Abb.2.1.1. zeigt die signifikant erhöhte Anzahl der Hauptwurzeln und eine ebenfalls signifikant größere Gesamtlänge der Hauptwurzeln bei der beimpften Variante. Die verwendete Abbildung ist unverändert aus einer Untersuchung verwendet, wo auch andere Endophyten (*Stenotrophomonas*) auf ihre pflanzenwachstumsfördernden Wirkungen betrachtet wurden.

Diese durch Endophyten verursachten Wachstumsinduktionen sollten durch eine Metabolitprofilanalyse näher untersucht werden, um die physiologischen Auswirkungen des Systems Pflanze- Endophyt charakterisieren zu können. Die Fragestellung dieser Untersuchung lautete: In wiefern eine biotische (metabolische) Interaktion zwischen Pappeln und Endophyten stattfindet, und ob diese anhand von veränderten Intermediate- Gehalten nachweisbar sind?

## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*-Pappelklonen



**Abb.2.1.1: Einfluss der Endophyten- Inokulation auf das Wurzelwachstum von *in vitro* Sprossen des Pappelklones 741.**

**A:** Anzahl der Hauptwurzeln **B:** Gesamtlänge der Hauptwurzeln

P+S - Paenibacillus + Stenotrophomonas

P - Paenibacillus (als Endophyt)

S - Stenotrophomonas (beimpft)

C - Kontrolle (Meristem, frei von kultivierbaren Bakterien)

(Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dietrich Ewald, vTI Waldsiedersdorf)

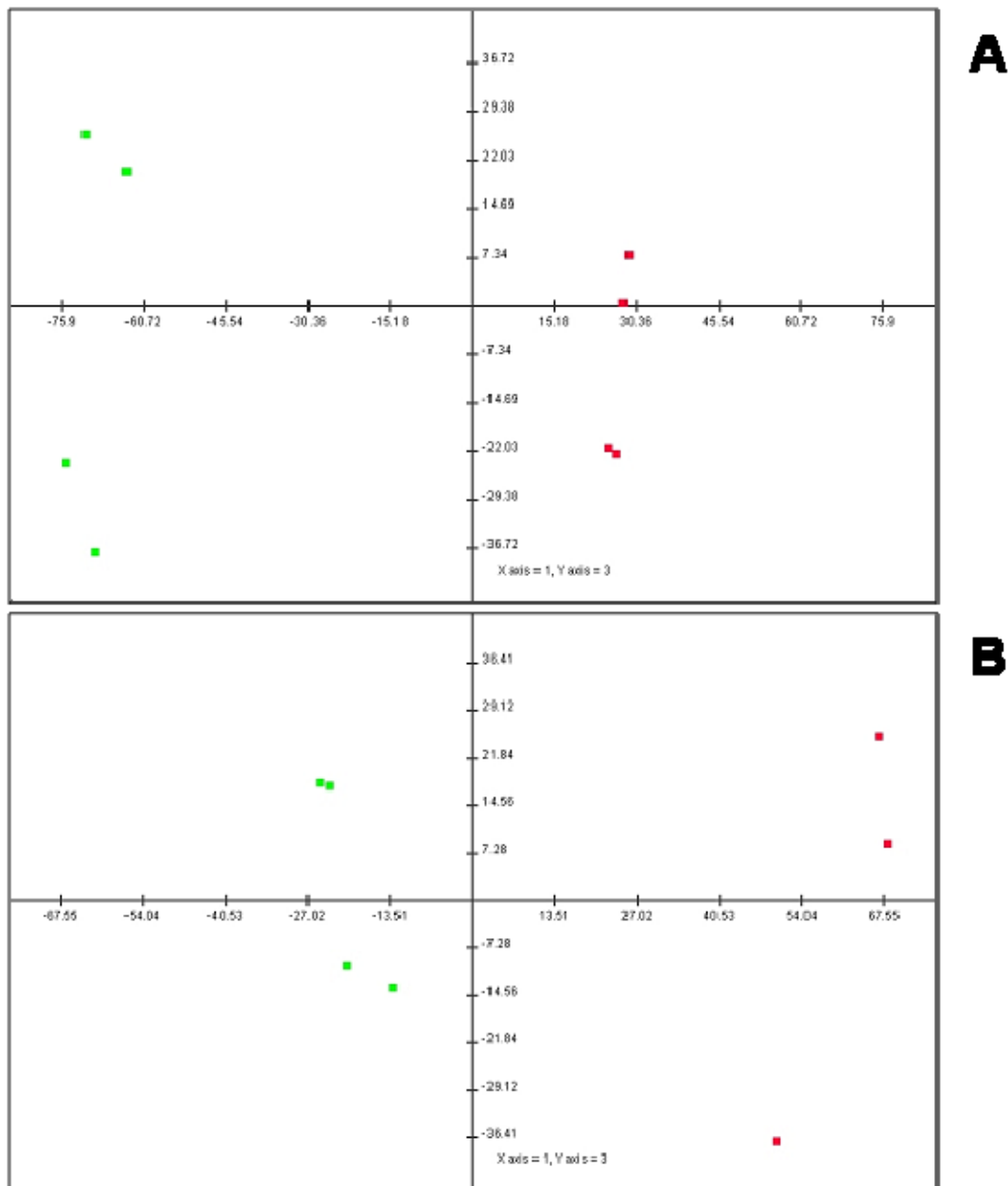
### **2.2 Metabolic Profiling an mit *Paenibacillus* P22 inokulierten *in vitro*- Sprossen eines Pappelklones**

Explantate (Meristeme) des Pappelklons 741 wurden frei von kultivierbaren Bakterien als *in vitro*- Kulturen vermehrt. Sprosse dieser Pflanzen wurden mit *Paenibacillus* P22 Isolaten inokuliert und drei Wochen subkultiviert. Die mit Endophyten beimpften Pflanzen zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl der Hauptwurzeln und eine ebenfalls signifikant größere Gesamtlänge der Hauptwurzeln im Vergleich zu den unbeimpften Kontrollen (25). Diese Arbeiten erfolgten am Institut für Forstgenetik in Waldsiedersdorf, wobei der gleiche Versuchsaufbau 2mal mit einem Monat Abstand durchgeführt wurde, so dass zwei unabhängige biologische Experimente für die Metabolitanalyse zur Verfügung standen (2 Experimente: jeweils 4 biologische Test- und Kontrollklone).

Die Untersuchung der zwei Zustände der Pappelpflanzen (+ und – Endophyten) erfolgte mittels Metabolic Profiling, um zielgerichtet Substanzen des Primärmetabolismus identifizieren zu können, die durch den Einfluss der endophytischen Bakterien Veränderungen aufweisen. Hierzu wurde die GC-TOF-MS Plattform von LECO® verwendet, wobei die Prozessierung der Rohdaten mit der Analysesoftware von LECO®ChromaTOF™ durchgeführt wurde. Für eine zielgerichtete Annotation eignet sich die hauseigene Spektren- und Retentionsbibliothek ([GMD@CSB.DB](#)), die auch problemlos in die ChromaTOF™ Software integriert werden kann. Um einen genauen Retentionsabgleich mit der Bibliothek zu gewährleisten, müssen die systembedingten Retentions Shifts mit Hilfe von n-Alkanen und der Berechnung des Retentions Index ausgeglichen werden. Die annotierten Peaks werden daraufhin in einem Referenz- Chromatogramm markiert, welches anschließend gegen alle Chromatogramme abgeglichen wird. Dabei konnten 68 polare Verbindungen vorwiegend aus dem Primärstoffwechsel in allen Chromatogrammen nachgewiesen werden. Für die akkurate relative Quantifizierung wurde jede Fläche mittels isotope markierten Internen Standard und Frischgewicht normalisiert. Die von LECO®ChromaTOF™ erzeugten Daten konnten dann mit Hilfe der Software GC-GC-MS Data Matrix Creator (Jan Hummel, Doktorarbeit in Vorbereitung) exportiert und als Matrix zur statistischen Auswertung abgelegt werden. Diese hier üblicherweise erzeugten Matrizen enthalten alle gemessenen Deskriptoren oder Variablen in den Zeilen, wohingegen die Spalten die Anzahl der Proben repräsentieren. Diese Präsentation der Daten hat den Vorteil, dass ein breites Spektrum an Algorithmen zur direkten Datenanalyse verwendet werden kann. Aufgrund der zielgerichteten Suche nach bekannten Metaboliten, die sich aber auf den gesamten Primärstoffwechsel bezog, wurde für diese Analyse der Terminus des Metabolic Profiling verwendet.

## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*-Pappelklonen

Ein mögliches Auswerteverfahren zur Analyse von umfangreichen Daten- Matrizen stellt die Hauptkomponentenanalyse (PCA) dar, indem eine Vielzahl statistischer Variablen durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen (die "Hauptkomponenten") genähert wird. Abb.2.2.1 zeigt die Visualisierung zweier hochdimensionaler Datensätze, die Metabolitprofile der biologisch gleichen aber unabhängigen Experimente A und B.



**Abb.2.2.1: PCA der zwei unabhängigen Experimenten (A / B): grüne Punkte = Pappelpflanzen ohne Endophyten (4 biolog. Replikate); rote Punkte = Pappelpflanzen mit Endophyten (3-4 biolog. Replikate).** PCA mit normalisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei beide Komponenten 73% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate mit 68 quantitativ bestimmten Metaboliten.

## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*-Pappelklonen

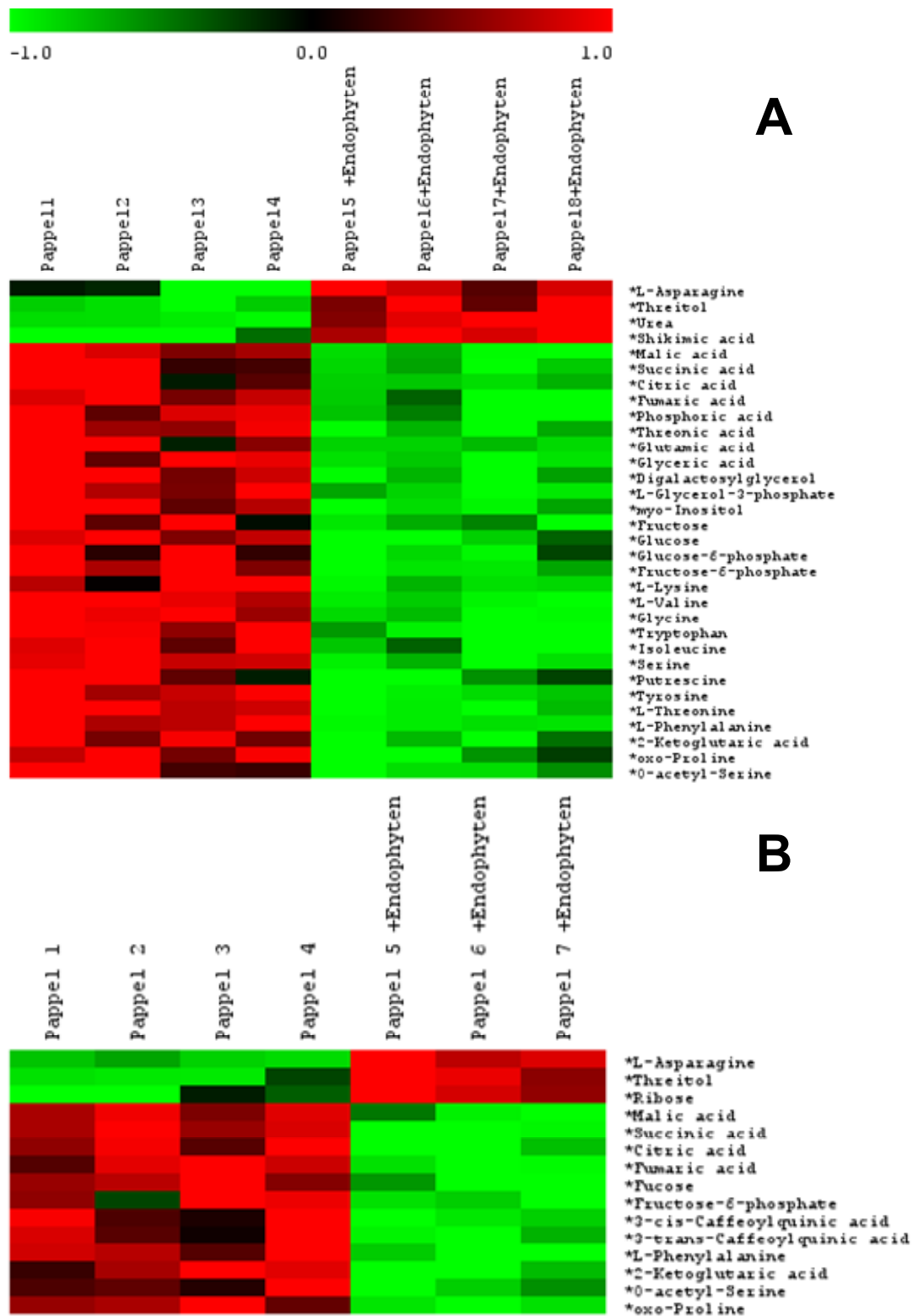
Wie bereits beschrieben, wurde der gleiche biologische Versuchsansatz wiederholt, so dass 2 vergleichbare aber unabhängige Experimente zur Verfügung standen. Basierend auf der Identifikation und Quantifikation von 68 Metaboliten zeigt der Vergleich beider Experimente ein sehr ähnliches Muster in der PCA-Darstellung. Deutlich zu erkennen ist in beiden Experimenten die Separierung der mit Endophyten beimpften Pappeln (rote Punkte) von den unbehandelten Pappeln (grüne Punkte), was auf ein unterschiedliches Metabolitprofil hinweist.

Zur Veranschaulichung der durch die Bakterien hervorgerufenen multifaktoriellen Unterschiede im Metabolitprofil wurde ein Signifikanztest mit gekoppelter Clusteranalyse durchgeführt (Abb.2.2.2). Dargestellt sind alle signifikant unterschiedlichen Metabolite zwischen den unbehandelten und behandelten Pappelpflanzen, dabei wurden relative Abnahmen (grün) und Zunahmen (rot) im Metabolitgehalt farblich codiert. Aufgrund der wenigen biologischen Replika wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  gewählt, was bei vergrößerter Stichprobenanzahl wesentlich strenger gefasst werden könnte. Daraufhin konnten für 32 Metabolite in Experiment A und für 15 Metabolite in Experiment B signifikante Veränderungen festgestellt werden, die durch Bakterien-Inokulation induziert wurden. Insgesamt treten sehr ähnliche Muster im Metabolitprofil in beiden Experimenten hervor, wobei 11 Metabolite die gleichen signifikanten Veränderungen aufweisen. In Experiment B traten technische Probleme während der Extraktion oder der Messung auf, woraus eine deutlich verschlechterte Peakidentifikation resultierte. Vergleichend zu Experiment A wurden daraufhin 14 Metabolite weniger erkannt.

Nachdem die durch den Endophyteneinfluss hervorgerufenen Änderungen im Metabolitgehalt identifiziert werden konnten, wurden diese dann in ein Stoffwechselschema eingegliedert und dargestellt (Abb.2.2.3). Signifikante Veränderungen, die in beiden Experimenten hervortraten, wurden mit Pfeilen symbolisiert (rot: relative Abnahme; grün: relative Zunahme).

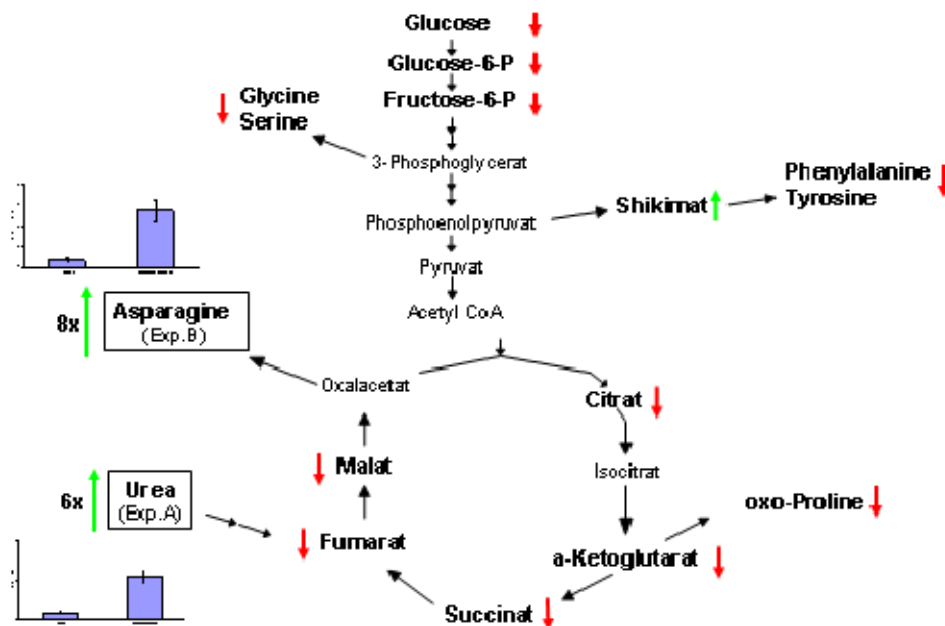
Die Pappelpflanzen in Experiment A und B zeigen (nach Bakterien-Beimpfung) signifikante Erhöhungen von Asparagin und Threitol, aber auch signifikante Abnahmen von organischen Säuren wie Malat, Fumarat und Citrat. Darüber hinaus zeigen die Pflanzen signifikante Abnahmen von Aminosäuren (oder deren Vorstufen) wie Phenylalanin, 2-Ketoglutarat und oxo-Prolin, und Abnahmen von Zuckern, wobei die Abnahme aber nur für Fruktose-6-P in beiden Experimenten signifikant war. Interessanterweise führt die Anwesenheit von endophytischen Bakterien zu einer 6fachen Zunahme an Harnstoff in Experiment A und analog zu einer 8fachen Zunahme an Asparagin in Experiment B.

## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*-Pappelklonen



**Abb.2.2.2: T-Test- Clustering** der zwei unabhängigen Experimente (A / B): Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen von Pappelpflanzen mit Endophyten und ohne Endophyten. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ( $\alpha=0,05$ ) durchgeführt, wobei die rote Farbcodierung erhöhte Konzentrationen und grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen darstellt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*-Pappelklonen



**Abb.2.2.3: Schematische Darstellung einiger Intermediate aus dem Primärmetabolismus die durch die Endophyten- Behandlung signifikante Veränderungen aufwiesen.**

Die Unterschiede im Metabolitprofil zwischen den unbehandelten und behandelten Pappelpflanzen treten in beiden Experimenten deutlich hervor, allerdings ist die Anzahl der signifikant veränderten Metabolite in Experiment A höher. So konnten wesentlich mehr signifikante Veränderungen bei Zuckern und Aminosäuren in Experiment A festgestellt werden als in Experiment B. Trotzdem wurden tendenziell ähnliche Veränderungen auch in Experiment B gefunden, da sie aber nicht signifikant waren, wurde auf eine Darstellung verzichtet.

### 2.3 Diskussion

In gegenseitig nutzbringenden Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen übergeben Pflanzen an ihre Partner chemische Energie in Form von Kohlenhydraten, dagegen beliefern die Mikroorganismen ihren Wirt mit anorganischen Verbindungen, für die sie bessere Aufnahmekinetiken besitzen. Vielfältige Beispiele hierfür sind beschrieben, wie die Mykorrhiza- oder Rhizobium- Vergesellschaftungen (33-35). Diese durch Coevolution entstandenen, universell vorkommenden Wechselbeziehungen zwischen Pflanze und Mikroorganismen, zeichnen sich durch permanente physiologische Interaktionen aus. Pflanzen interagieren beispielsweise durch Chemotaxis (36), Allelopathie (37) aber auch durch das Ausscheiden von organischen Verbindungen als Substrat für Mikroorganismen. Mikroorganismen dagegen sorgen für eine bessere Verfügbarkeit von mineralischen Nährstoffen ( $N_2$ -Fixierer, Mykorrhiza- Bildung), können aber auch durch Hormonbildung (Cytokinin, Auxin, Indolelessigsäure, Gibberellinsäure, Ethylen) oder Fixierung von Stickstoff aus der Luft (Rhizobien, freilebende  $N_2$ -Fixierer) unmittelbar pflanzliches Wachstum beeinflussen (38-40) und induzieren dadurch einen veränderten metabolischen Phänotyp.

Der in dieser Studie untersuchte Mutualismus zwischen Pappelpflanzen und *Paenibacillus* P22 Isolaten sollte die durch Endophyten induzierten möglichen Veränderungen im Metabolismus der Pappeln überprüft werden. Für diese These gab es vielfältige Hinweise. So berichteten Glick *et al.* (22) von besserem Wachstum und mehr Vitalität hervorgerufen durch Endophyten. Des Weiteren wiesen Ulrich *et al.* (28) hohe Dichten von *Paenibacillus* *sp.* in Sterilkulturen von verschiedensten Gehölzen nach. In diesen speziellen *in vitro*-Bedingungen scheinen die Endophyten das Wurzelwachstum nachhaltig zu stimulieren, dabei zeigten Testpflanzen signifikant mehr Wurzeln und höhere Gesamtwurzellängen gegenüber den Kontrollpflanzen (Abb.2.1.1). Explizit für die Gattung *Paenibacillus* wurde die Bildung von Phytohormonen (Auxin und Cytokinin), Peptidantibiotika und hydrolysierenden Enzymen aber auch die Fähigkeit zur Fixierung von Stickstoff nachgewiesen (30,32,41,42).

Metabolite Profiling- Techniken in Kombination mit multivariater Datenanalyse sind wirkungsvolle Instrumentarien, welche standardisiert eingesetzt werden, um verschiedene Geno- oder Phänotypen metabolisch zu charakterisieren (14,43). Auch in dieser Analyse konnten zwei unterschiedliche metabolische Phänotypen von genetisch identischen Pappelpflanzen mittels Metabolitprofilanalyse unterschieden werden. Zum einem der durch *Paenibacillus*- Inokulation induzierte metabolische Phänotyp und zum anderen der endophytenfreie metabolische Phänotyp. Mit Hilfe der schnellen und robusten Target Analyse, war es möglich 68 polare Intermediate vorwiegend aus dem Primärmetabolismus zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Visualisierung des hochdimensionalen Datensatzes erfolgte mittels Hauptkomponentenanalyse (Abb. 2.2.1), dabei wurden



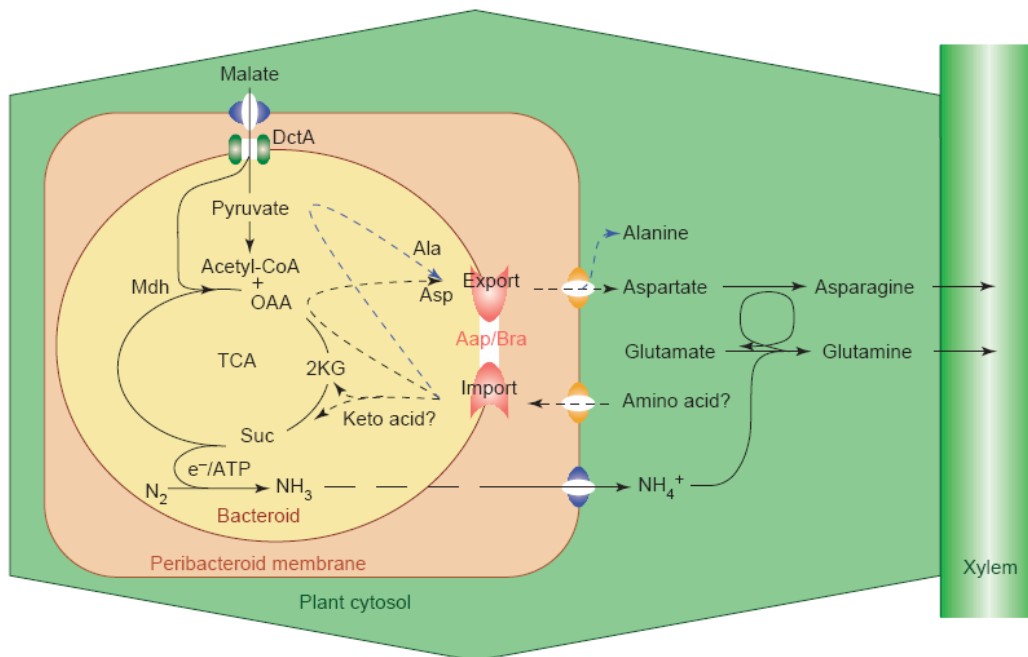
## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*- Pappelklonen

multifaktorielle Unterschiede im Metabolitprofil der verschiedenartig behandelten Pappelpflanzen determiniert. Pflanzen die mit *Paenibacillus* P22 Isolaten inokuliert wurden und Pappelpflanzen ohne Endophyten- Inokulation konnten in der PCA in zwei Gruppen separiert werden. Dabei traten in beiden Experimenten (A und B) jeweils die gleichen Muster auf, was auf eine gute Reproduzierbarkeit trotz weniger biologischer Replikate hinweist. Weiterhin deutete die Separierung in der PCA auf ein unterschiedliches metabolisches Verhalten in Bezug auf die Endophyten- Behandlung der Pappelpflanzen hin. Dies wurde mit Hilfe eines Signifikanztestes belegt (Abb. 2.2.2), der eine Gruppe deutlich veränderter Metabolite identifizieren konnte. 11 Metabolite wiesen reproduzierbar in Experiment A und B gleich signifikante Unterschiede auf, wenngleich in Experiment A wesentlich mehr Metabolite Veränderungen aufzeigten. Die Reduktion von 32 auf 15 signifikant veränderten Metaboliten von Experiment A zu B ist wahrscheinlich auf die Probleme während der Probenvorbereitung oder des Messvorgangs zurückzuführen, ein Indiz dafür sind die weniger identifizierten Peaks im Wiederholungsexperiment .

Aufgrund dessen, dass zahlreiche Metabolite in beiden Experimenten verändert sind, führt die Beimpfung mit *Paenibacillus* sp. nicht zu einer Identifikation von wenigen metabolischen Markern, sondern der gesamte Primärmetabolismus insbesondere Citrat- Zyklus und Aminosäure- Metabolismus werden durch die Bakterien konditioniert. Daher kann von einem metabolischen Phänotyp gesprochen werden, der durch die Endophyten- Inokulation hervorgerufen wird. Hauptsächlich kam es zu einer Reduktion von organischen Säuren aus dem Citrat- Zyklus und einem möglicherweise gesteigertem Aminosäure- Stoffwechsel. Für einen veränderten Aminosäure- Umsatz sprechen deutliche Akkumulationen von Harnstoff oder Asparagin, aber auch die Abnahmen von einigen anderen Aminosäuren. Die gemessenen Unterschiede im Aminosäurestoffwechsel, welche auf eine verstärkte Stickstoffassimilation hinweisen, könnten eine direkte Resonanz auf die symbiotische Interaktion mit *Paenibacillus* sp. sein, oder es ist eine generelle Antwort des Primärstoffwechsels bei besserer Stickstoffversorgung. Stickstofffixierung und Wachstumsförderung sind bekannte mutualistische Effekte von *Paenibacillus* sp. (44). Zudem können *Paenibacillus* P22 Isolate ohne Stickstoff im Medium kultiviert werden, was eine N<sub>2</sub>-Fixierung der Endophyten wahrscheinlicher werden lässt.

Prell et al. (45) beschreiben anhand des Modells von Rhizobium- Symbionten am Beispiel der Erbse den Stickstoff- und Kohlenstoffaustausch zwischen den Partnern (Abb.2.3.1). Dem Model zufolge liefert die Pflanze organischen Säuren wie Malat, Fumarat und Citrat aus dem Citrat- Zyklus als Kohlenstoffquelle, dafür erhält sie von ihrem Symbiont Stickstoffassimilate, die sie in Glutamin oder Asparagin umwandelt. Des Weiteren importieren die Bakterien wahrscheinlich auch Aminosäuren von der Pflanze, um Transaminierung und Sekretion aufrechterhalten zu können. Dieses Modell der metabolischen Interaktion zwischen Pflanze und assoziierten Bakterien deckt sich sehr gut mit den Beobachtungen, die wir für die Interaktion Endophyten- Pappel in Abb.2.2.3 skizzieren konnten.

## 2. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf *in vitro*-Pappelklonen



**Abb.2.3.1: Model des Kohlenstoff- und Stickstoffaustausches während der Symbiose von Rhizobium- Bakterien und Erbsenpflanzen.** (Abbildung aus Prell et al. 2006, *TRENDS in Microbiology* Vol.14 No.4 April 2006)

Basierend auf dem Model von Prell et al. (45) kann von einer Verknüpfung der Kohlenstoff- und Stickstoffkreisläufe beider Symbionten ausgegangen werden. Aktuelle Hinweise aus der Literatur zeigen, dass verschiedene endophytische Bakterien in der Pappel zur Stickstofffixierung in der Lage sind und damit das Pflanzenwachstum fördern (40). Andererseits ist der gemessene metabolische Phänotyp auch als generelle Resonanz auf Wachstums- und Entwicklungsprozesse interpretierbar, der potentiell auch von Phytohormonen der *Paenibacillus*- Isolate initiiert worden sein kann. Für *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass Metabolite aus dem Primärmetabolismus, wie Zuckerphosphate und organische Säuren (Citrat- Zyklus) mit Wachstums- und Entwicklungsprozessen korrelierten, und dabei als Energieressource dienen (46).

Bakterielle oder pflanzliche Metaboliten konnte in dieser Arbeit nicht explizit unterschieden werden, was aufgrund der geringen Biomasse der endophytischen Bakterien auch nicht notwendig war (in 1 g Pflanzenmasse befinden sich ca.  $1 \times 10^{-5}$  g Bakterien). Allerdings sollte in nachfolgenden Experimenten ergründet werden, wodurch der metabolische Phänotyp induziert wurde. Ein Ansatz wäre die Markierung der Bakterienkultur mit stabilen Isotopen, um metabolische Flüsse zu identifizieren. Des Weiteren könnte eine Phytohormonanalyse Aufschluss über stattfindende Kommunikationsprozesse zwischen den Symbionten geben.

### **3 „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch - Biodiversität und phänotypische Plastizität**

#### **3.1 Das Jena Experiment – eine Biodiversitätsstudie**

Der Begriff Biodiversität oder biologische Vielfalt umfasst die Vielfalt „biologischer Einheiten“ in einem bestimmten Zeitfenster und innerhalb eines definierten Raumes: „Biologische Einheiten“ können Genotypen einer Art innerhalb einer Population sein, ebenso die Anzahl an Taxa, Lebensformen und funktionellen Typen, und beschreibt ferner die Vielfalt an Biozönosen und Ökosystemen (47). Eine hohe Biodiversität wird vielfach als eine der Grundvoraussetzungen für eine hohe Resilienz der Ökosysteme gegenüber Störeinflüssen betrachtet, da sie potentiell vielfältigere Rückkopplungsmechanismen besitzen. Der Einfluss der Biodiversität auf die Funktionsfähigkeit von Ökosystemen wird seit langem kontrovers diskutiert. Grundlegende empirische Untersuchungen mit positiven Effekten der Biodiversität auf Ökosystemfunktionen beruhen auf Freilandexperimenten von David Tilman in Cedar Creek in den USA (48) und dem europäischen BIODDEPTH- Projekt (49) an Grasland-Ökosystemen. Aufgrund der trotzdem noch ungeklärten Mechanismen der Beziehung zwischen Biodiversität und Ökosystemprozessen, aber auch wegen vielfältiger Kritik am Versuchsaufbau, wie der Auswahl funktioneller Gruppen von Pflanzenarten und statistischer Effekte des „Sampling“ gegenüber der Komplementarität von Pflanzen, wurde eine neue Biodiversitäts- Studie initiiert, das Jena Experiment.

Das Jena Experiment ist ein großflächiges ökologisches Freilandexperiment, bei dem seit 2002 Zusammenhänge zwischen Pflanzendiversität und Ökosystemprozessen untersucht werden. Angelehnt an das Modellökosystem einer „mitteleuropäischen Grünlandgesellschaft“, dem Arrhenatherion (50) mit der bestandsbildenden Charakterart *Arrhenatherum elatius* (Gewöhnliche Glatthafer), werden langjährige Experimente mit Artenmischungen verschiedener Artenzahl und –Zusammensetzung durchgeführt. Artenreiche Graslandgesellschaften haben sich in den temperierten Zonen Mitteleuropas durch moderate landwirtschaftliche Aktivitäten herausgebildet. Wesentliche Voraussetzungen für den Artenreichtum dieser Biozönosen sind eine extensive Bewirtschaftung, was die Entnahme von Phytomasse durch periodisches Mähen einschließt, Konkurrenzausschluss verhindert und die Koexistenz vieler Pflanzenarten auf kleiner Fläche ermöglicht (51,52). Die Zusammensetzung dieser artenreichen Ökosysteme hat sich in den letzten Jahrzehnten stark verändert. Durch die Intensivierung der Landwirtschaft wie hohe

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Düngegaben, häufigeren Schnitt und die Einsaat von hochproduktiven Arten verschob sich die Zusammensetzung der Pflanzengesellschaften hin zu wenigen dominanten Arten. Um grundlegende ökologische Fragen beantworten zu können – Was bestimmt die Häufigkeit und Verteilung einer Art in einem System? – müssen verschiedenste Einflussfaktoren wie abiotische Rahmenbedingungen, wie z.B. die Ressourcenverfügbarkeit, und biotische Interaktionen wie Konkurrenz (intra- und interspezifische), Mutualismus, Prädation und Parasitismus berücksichtigt werden, wobei letztendlich die Dynamik und die Kombination dieser Faktoren entscheidet (53).

Ökosysteme beinhalten oftmals viele konkurrierende Arten; Ressourcenlimitation, Heterogenität, Nischen- Differenzierung, positive Interaktionen und interspezifische Unterschiede können die Koexistenz vieler Arten auf engem Raum erklären (54). Periodische Störungen durch Herbivorie, Mähen, Brände und Trockenheit halten den „Trade off“ zwischen konkurrenzschwachen und konkurrenzstarken Arten im Gleichgewicht, und ermöglichen so die Koexistenz vieler Arten mit überlappenden ökologischen Nischen. Pflanzen konkurrieren um Ressourcen (Licht, Nährstoffe, Wasser, Raum), dabei beeinflussen sie sich gegenseitig negativ in Bezug auf Überlebensrate, Wachstum und Reproduktion (55). Gleichzeitig erlangen sie in der Gemeinschaft Widerstandsfähigkeit gegenüber Pathogenen, Herbivoren, potenziellen Konkurrenten oder extremes Klima und sind teilweise in der Lage sich mit zusätzlichen Nährstoffen durch mikrobiellen Symbiosen zu beliefen (56). Diese vielseitigen Wechselbeziehungen wirken sich einerseits auf die Physiologie und Morphologie von Pflanzen aus, andererseits auf die Verteilung und Häufigkeit von Arten. Deshalb sind Pflanzeninteraktionen wichtige Schlüsselprozesse bei der Strukturierung und Dynamik von Pflanzengesellschaften (48,55).

Pflanzengemeinschaften befinden sich in einem ständigen Wandel bei dem sich Artenzusammensetzung und Dominanzverhältnisse verändern können. Ausgehend von Pioniergemeinschaften verläuft eine typische Sukzession über die Entwicklung von charakteristischen Zwischenstufen bis hin zu standorttypischen Klimax- Gesellschaften, deren Zusammenbruch wieder einen neuen Kreislauf initiiert. Eine wesentliche Triebkraft für Sukzessionsprozesse ist die Konkurrenz der Arten um die gleichen Ressourcen, was in produktiven Ökosystemen zu Nährstoffmangel und erhöhtem Selektionsdruck führt. Der Mangel an Nährstoffen wirkt einschränkend auf die Produktivität und kann Populationsdichten und die Artenzusammensetzung von Pflanzengemeinschaften beeinflussen. In Graslandökosystemen ist Stickstoff der limitierende Faktor für pflanzliche Produktivität (57), daher wird der Symbiose von Leguminosen mit Knöllchenbakterien der Gattung *Rhizobium* besondere Bedeutung bemessen. Durch deren Interaktion wird atmosphärischer Stickstoff in das Ökosystem eingeführt, ein Vorgang der positive

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

komplementäre Effekte bei anderen Pflanzenarten bewirkt und die Produktivität des Ökosystems steigert (58,59). Deshalb werden Leguminosen auch als Schlüsselarten bezeichnet, die eine Pflanzengesellschaft generieren können (58).

Biodiversität ist die lebende Natur selbst (60), die durch Eigendynamik und ständige Weiterentwicklung eine hohe Anpassungs- und Evolutionsfähigkeit erlangt. Einerseits ist ihre Bedeutung auf die Zukunft gerichtet (wie durch die erwähnte Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Bedingungen), andererseits liegt sie in der Ausbildung integrierter Strukturen von höherer Komplexität, in denen durch komplementäre und synergistische "Zusammenarbeit" die Leistungsfähigkeit und Stabilität des Ökosystems erhöht sein kann (61).

#### **3.1.1 Ziele der Metabolitanalyse**

Ziel dieser Studie war es anhand von Metabolitdaten aufzuzeigen, ob metabolische Veränderungen auftreten, wenn Pflanzen veränderten biotischen Interaktionsmustern (Konkurrenz / Diversität / Artenzusammensetzung) ausgesetzt sind. Die grundlegende Fragestellung dahinter ist: Wie gelingt es konkurrenzschwachen kleinen Arten sich gegenüber konkurrenzstarken großen Arten trotz schlechterer Lichtverfügbarkeit zu behaupten? Induzieren veränderte pflanzliche Interaktionsmuster metabolische Adaptationen und lassen sich dafür metabolische Marker finden? Weiterhin sollte nach Hinweisen gesucht werden, ob und inwiefern sich Stickstoff- oder Kohlenstoffverfügbarkeit limitierend auf das Pflanzenwachstum auswirken können.

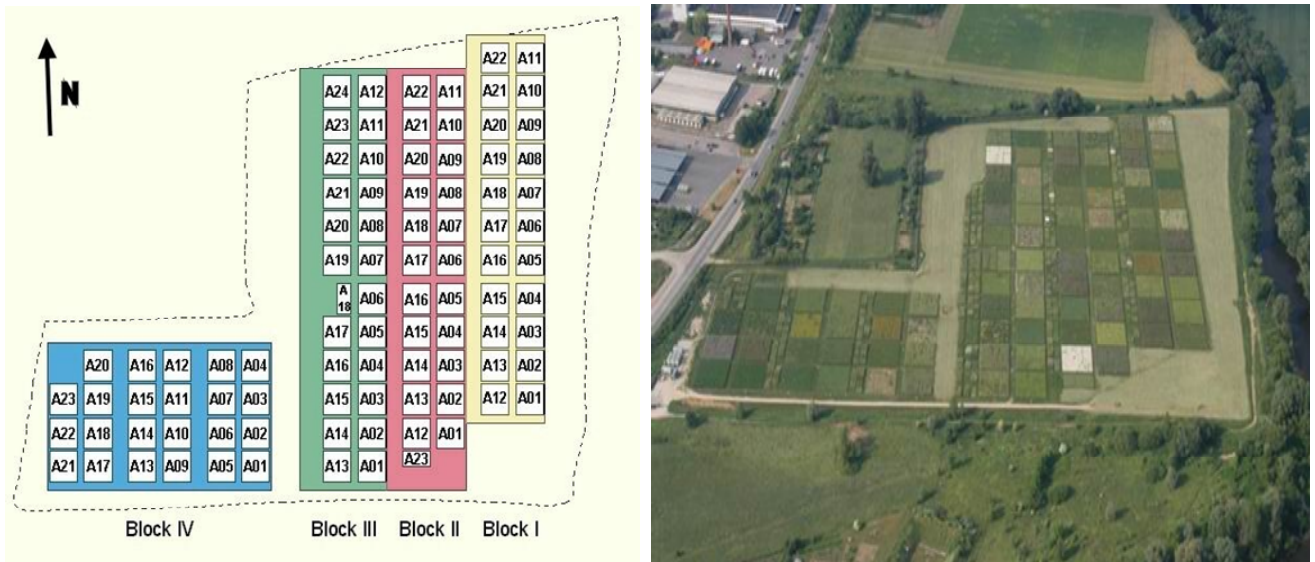
#### **3.1.2 Experimentelles Design des Freilandversuches**

Das Jena Experiment wurde als langjährige und großflächige Biodiversitäts- Studie von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Max-Planck-Institut für Biogeochemie und der Friedrich-Schiller-Universität in Jena konzipiert und wird seit 2002 betrieben. Die Versuchsfläche des Experiments befindet sich auf einer ehemaligen landwirtschaftlichen Nutzfläche in der Aue der Saale in Jena (Thüringen, Germany, 50°55`N, 11°39`E, 130 m). Die Jahresdurchschnittstemperatur des Gebietes beträgt 9.3 °C und die durchschnittliche jährliche Niederschlagsmenge 587 mm (62). Basierend auf einer mitteleuropäischen Arrhenatherion- Gesellschaft, die als Modellökosystem fungierte, wurden 60 charakteristische Pflanzenarten in verschiedenen Kombinationen zusammengestellt. Dabei wurden 90 Versuchsflächen je 20 x 20 m großer Plots mit 1-60 Arten kombiniert, um unterschiedliche Konkurrenzverhältnisse und Diversitätsniveaus zu simulieren. Die Zusammensetzung der Plots besteht aus Mischungen von 1, 2, 4, 8, 16 bzw. 60 Arten. Um Variabilitäten abschätzen zu können, erfolgte eine Replikation aller Artenmischungen. Zudem wurde jede Art in einer Einzelpflanzenanlage (PIG-Plot) ohne Konkurrenz angepflanzt. Die 60 verschiedenen Arten lassen sich in 4 funktionelle Gruppen einteilen: Gräser (16 Arten), Leguminosen (12 Arten), kleine Kräuter (12 Arten), große Kräuter (20 Arten) (63).

Grundsätzlich wird in dieser Arbeit zwischen konkurrenzschwachen und konkurrenzstarken Arten unterschieden. Damit werden in der Ökologie zwei konträre Lebensstrategien (r- und K- Strategie) bezeichnet (64). r- Strategen investieren in schnelle und zahlreiche Reproduktion auf Kosten der Lebensdauer, K- Strategen hingegen setzen auf vegetatives Wachstum und individuelle Persistenz. Beide Lebensstrategien finden sich in den vier funktionellen Gruppen des Versuchsansatzes wieder. Obwohl die Zuordnung der kleinen Kräuter zu den r- Strategen nicht eindeutig ist, da Wiesenpflanzen sehr langlebig sein können und in ihren eigenen Erhalt investieren, kann man doch eine Einteilung in konkurrenzschwache und konkurrenzstarke Arten vornehmen. Die Gruppe der Leguminosen nimmt aufgrund ihrer Fähigkeit Stickstoff zu fixieren eine gesonderte Stellung ein.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Die Aufteilung der Versuchsfläche in Plots mit unterschiedlichen Artenkombinationen ist in Abb. 3.1.2 als schematische Skizze und als Luftbild abgebildet. Weiterhin wurde versucht dem Bodengradienten in Richtung Fluss mit der Einteilung der Fläche in vier verschiedene Blöcke zu berücksichtigen.



**Abb.3.1.2: Schematische Skizze und Luftbildaufnahme der Versuchsfläche des Jena Experiments. (Photo:J. Baade)**

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei unabhängige Studien durchgeführt. Im Mai 2006 und 2008 erfolgten dafür die Probenentnahmen von ausgewählten Plots. 2006 lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den kleinen Kräutern und deren Strategie neben den konkurrenzstarken Arten bestehen zu können. Exemplarisch wurden fünf kleine Kräuter *Veronica chamaedrys*, *Prunella vulgaris*, *Leontodon autumnalis*, *Glechoma hederacea* und *Bellis perennis* ausgewählt, um deren metabolisches Verhalten in verschiedenen Konkurrenzsituationen zu testen. Außerdem sollten tageszeitliche Schwankungen im Metabolitspiegel berücksichtigt werden, indem morgens, mittags und abends geerntet wurde.

Aufbauend auf den Untersuchungen aus dem Jahr 2006 erfolgte 2008 eine Modifizierung der Fragestellung hinsichtlich der Gegenüberstellung von konkurrenzstarken und konkurrenzschwachen Arten. Dazu wurden die zwei konkurrenzschwachen kleinen Kräuter *Leontodon autumnalis* und *Bellis perennis* (Kontrolle 2006 / 2008) dem konkurrenzstarken großen Kraut *Knautia arvensis* gegenübergestellt. Außerdem wurde der konkurrenzschwachen Leguminose *Lotus corniculatus* eine konkurrenzstarke Leguminose *Medicago x varia* gegenübergestellt.

Eine standardisierte Probennahme im Freiland ist schwierig und konnte aufgrund des Mangels an Personal nur eingeschränkt durchgeführt werden. Es musste eine große Fläche mit nur wenigen Personen möglichst zeitgleich beprobt werden, um diurnale metabolische Schwankungen auszuschließen zu können. Zusätzlich mussten die Probenehmer bestimmungssicher Arten identifizieren und morphologische Kenntnisse nachweisen können, damit jeweils die richtige Art und Blätter mit einem vergleichbaren Entwicklungsstadium beprobt werden. Da Varianz innerhalb der Plots bestehen kann, zum Beispiel hinsichtlich Bodeneigenschaften, Nährstoffgradienten, Lichtgradienten, unterschiedliche Herbivorie, etc., was die Vergleichbarkeit wesentlich beeinflussen würde, wurde beschlossen, die Proben einer Art innerhalb eines Plots zu einer Mischprobe zusammenzufassen. Zudem ergeben bei einigen Arten einzelne Blätter nicht hinreichend Material für eine Metabolitanalyse. Dadurch konnte die Varianz dieser unerwünschten Einflussfaktoren innerhalb eines Plots eliminiert werden, und gleichzeitig wurde wesentlich schneller geerntet. Aus dieser Analyse entwickelte sich folgende Ernte- Strategie: 3m x 3m große Subplots innerhalb eines Plots; die Blätter von 3 Pflanzen pro Art und Plot werden als Mischprobe zusammengefasst; biologische Replika ergeben sich aus unterschiedlichen Tageszeiten (Probenahme: morgens, mittags, abends) oder durch Plots mit gleicher Artenstruktur.

## **3.2 Analytische Strategie**

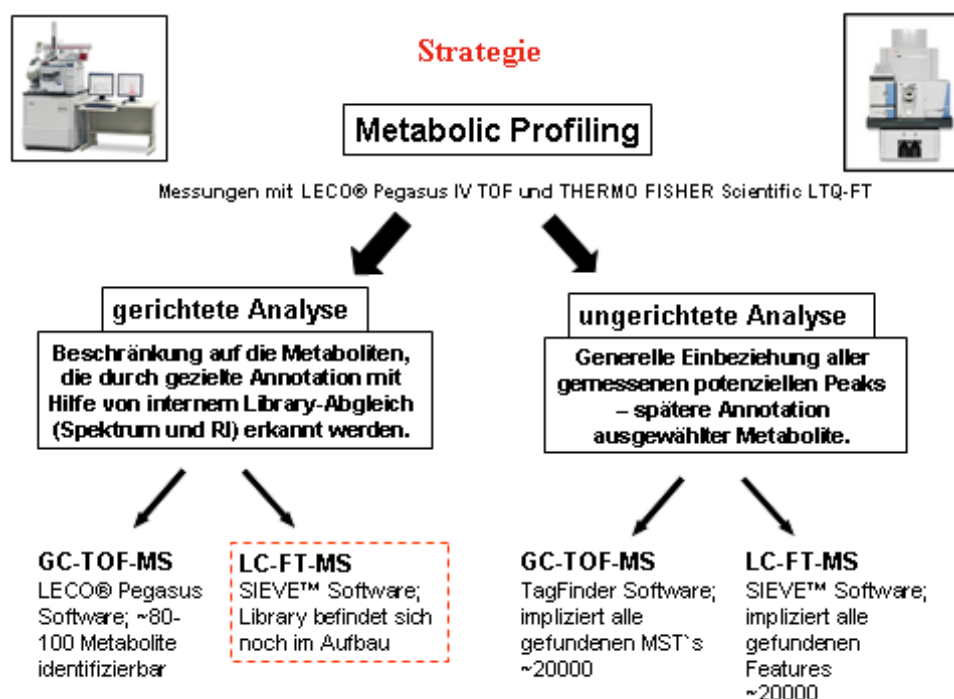
Für die Metabolite Analyse standen zwei analytische Plattformen zur Verfügung: Die Kopplung von Gaschromatographie mit einem Time of Flight Massenanalysators (GC-TOF-MS) von der Firma LECO® (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA) und die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit einem Fouriertransformations- Ionencyclotronresonanz Massenanalysators (FT-ICR-MS) von der Firma Thermo Fisher Scientific (Somerset, NJ, USA). Beide Gerätespezifikationen sind Messplattformen, die standardisiert zum Metabolite Profiling eingesetzt werden können.

Die Strategie dieser Arbeit bestand darin, die oben genannten analytischen Plattformen sowohl für die gerichtete (targeted) als auch für die ungerichtete (untargeted) Analyse einzusetzen (Abb.3.2). Targeted und untargeted Profiling sind zwei komplementäre Techniken zur Metabolomanalyse, wobei targeted Profiling nur die bekannten (in einer Referenz- Bibliothek notierten) und untargeted Profiling alle potentiellen messbaren Verbindungen quantifiziert (5,8). Für die targeted Analyse werden Referenz- Bibliotheken



### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

benötigt, in denen Zielsubstanzen mit ihren Charakteristika wie Fragmentationsspektren und Retention Indizes hinterlegt sind. Mit Hilfe der Mess- und Auswertesoftware von LECO®ChromaTOF™, in der verschiedene Bibliotheken integrierbar sind, wie zum Beispiel die Golm Metabolom Datenbank ([GMD@CSB.DB](http://GMD@CSB.DB)), wurden die Analyten jedes Chromatogramms aus der GC-TOF-MS Messung zielgerichtet annotiert. Daraus resultierende Datenmatrizen enthielten ca. 100 identifizierte und semi-quantifizierte Metabolite. Die LC-FT-MS targeted Analyse konnte nicht durchgeführt werden, da sich entsprechende Datenbanken im Aufbau befinden.



**Abb.3.2: Metabolic Profiling Strategie.** Gerichtete und ungerichtete Analyse mit zwei analytischen Plattformen.

Das untargeted Profiling wurde mit beiden analytischen Plattformen durchgeführt. Für die Auswertung der GC-TOF-MS Daten wurde die TagFinder Software von Luedemann *et al.* (9) verwendet, welche alle gemessenen Fragment- Ionen eines Zeitpunkts zu MST's (mass spectral tags) integriert und diese für alle entsprechenden Chromatogramme via Alignment zu einer Datenmatrize generiert. Die Auswertung der LC-FT-MS Messungen erfolgte mit der SIEVE™- Software (Thermo Fisher Scientific), die automatisiert LC/MS Datensätze semi-quantitative auswertet und dabei alle gemessenen m/z (features) berücksichtigt.

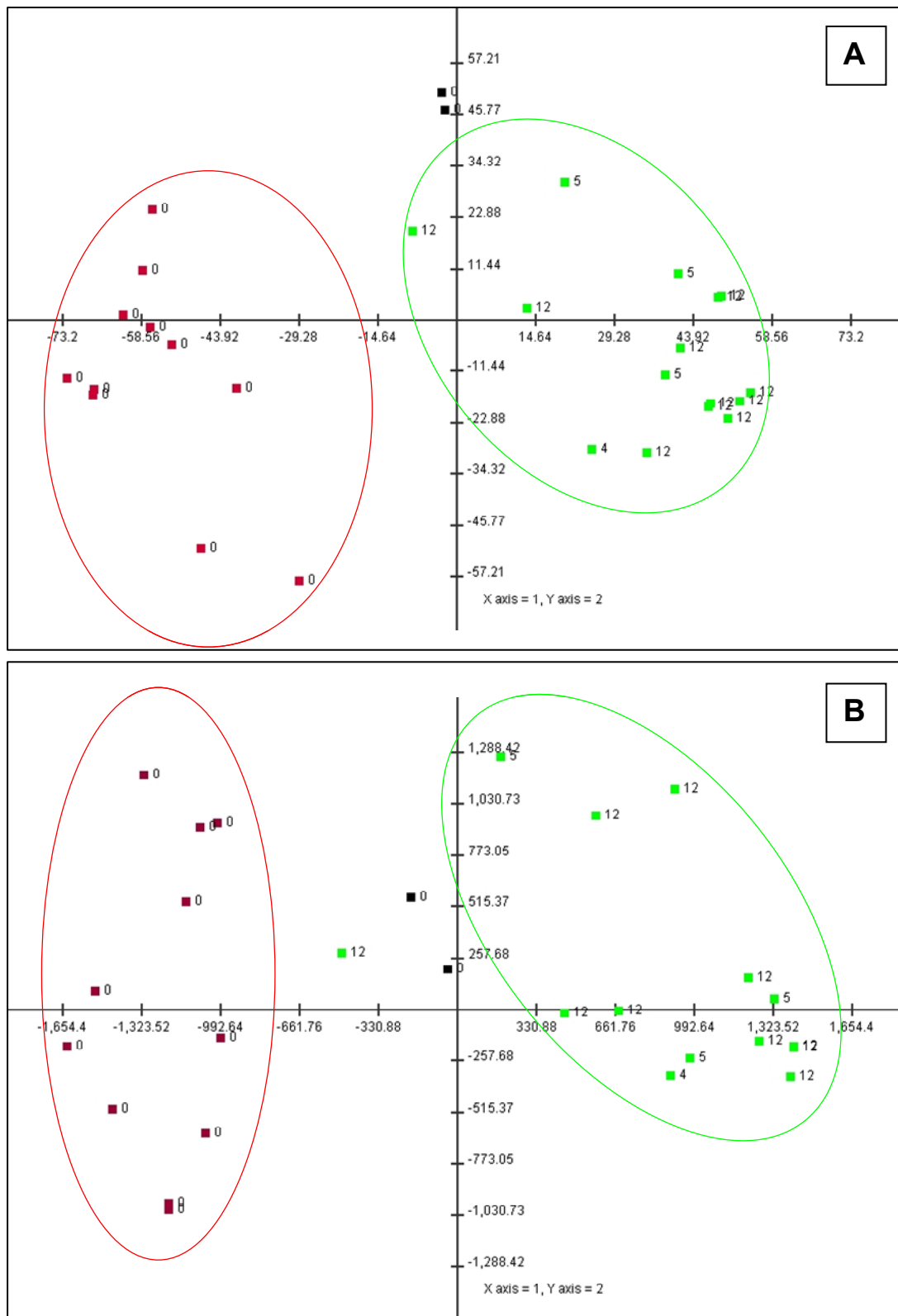
### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Der Vorteil des untargeted Profiling gegenüber der targeted Analyse besteht in der Integration aller gemessener Peaks, auch wenn sie nicht bei der Datenbanksuche annotiert wurden. Nachteilig wirkt sich die große Datenmenge auf den Auswertungsvorgang aus, denn „gute“ Peaks müssen erst von den „schlechten“ Peaks getrennt werden. Diese Selektion ist immer subjektiv und kann zu Fehleinschätzungen führen.

#### **3.2.1 Gegenüberstellung der Auswerteprogramme TagFinder und LECO®ChromaTOF™ – untargeted und targeted Profiling**

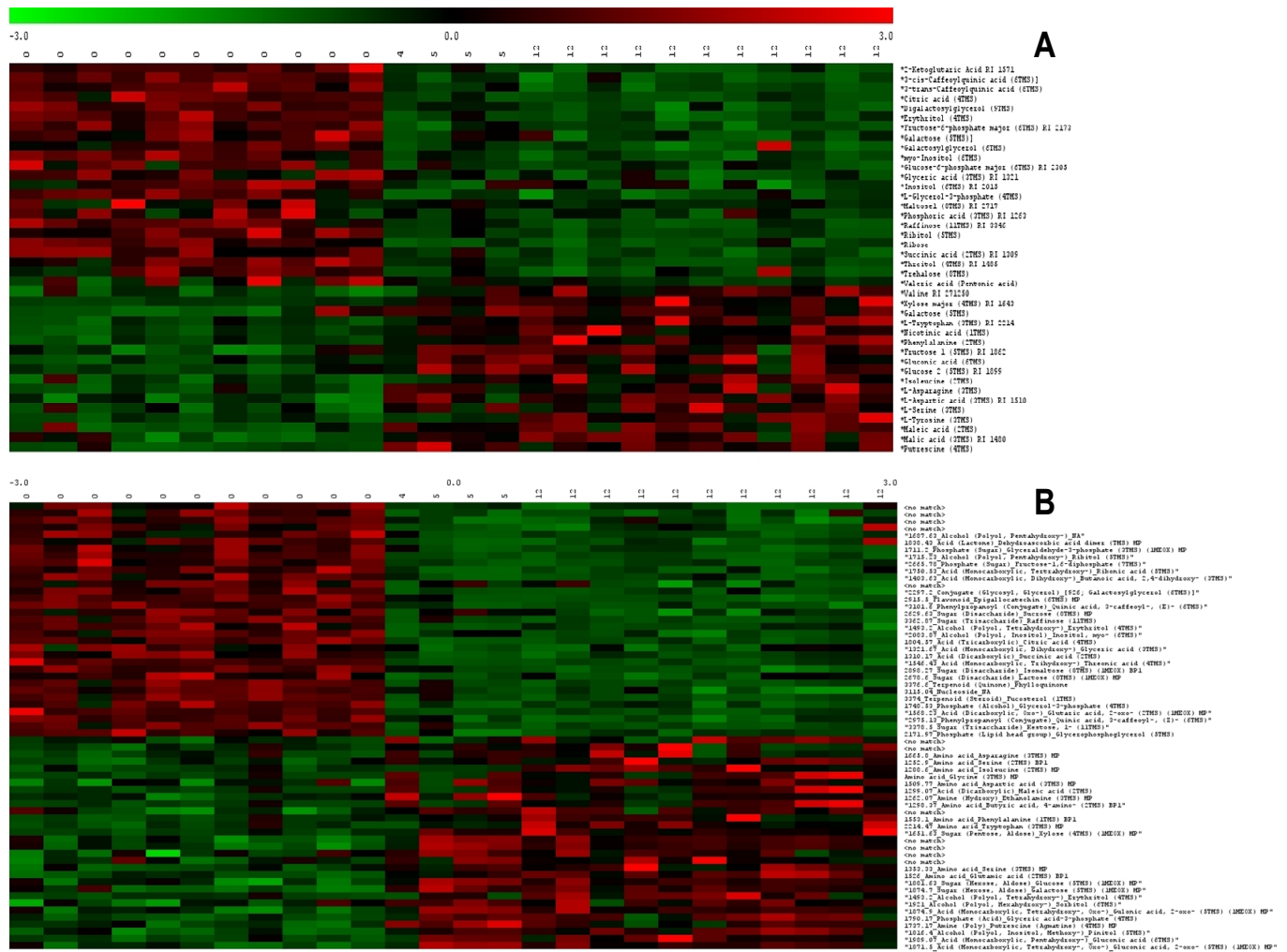
Im Folgenden werden exemplarisch die für eine Art (*Bellis perennis*) möglichen unterschiedlichen Vorgehensweisen bei der Auswertung von GC-TOF-MS Metabolitprofilen veranschaulicht. Im Haus standen zwei Auswerteprogramme zur Verfügung, die TagFinder- und die LECO®ChromaTOF™- Software, die jeweils gegensätzliche Profiling Strategien umsetzen können. Aufgrund einer guten Übersichtlichkeit und Bedienbarkeit eignet sich die LECO®ChromaTOF™- Software sehr gut für das gezielte Annotieren von Peaks. Demgegenüber hat die TagFinder- Software den Nachteil, dass nicht direkt im gemessenen Chromatogramm annotieren werden kann und sich somit die Peakidentifikation schwierig gestaltet. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den Auswerteprogrammen besteht darin, dass die TagFinder- Software alle potentiell gemessenen Peaks als MST's automatisch in ihrer Prozessierung berücksichtigt, und diese via Alignment vergleichbar zwischen den Chromatogrammen werden. Bei der LECO®ChromaTOF™- Software dagegen müssen alle Peaks in einer Referenz annotiert werden, mit der dann mittels Substanz-Abgleich Vergleichbarkeit zwischen den Chromatogrammen hergestellt wird. Aufgrund des globaleren Ansatzes in der Alignment- Strategie ist der TagFinder ideal für das untargeted Profiling. In Abb.3.2.1.1 sind die Ergebnisse beider Profiling- Strategien anhand eines Datensatzes (*Bellis perennis*) mittels PCA visualisiert (**A** – targeted; **B** – untargeted).

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.2.1.1: Vergleich zweier PCA- Plots mit unterschiedliche Metabolite Profiling- Strategien. A** targeted Profiling mit LECO®ChromaTOF™ und **B** untargeted Profiling mit TagFinder. PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten drei Komponenten 77% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate. Auf die Beschriftung der Achsen musste aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet werden. (Leguminosen-Effekt siehe Kap.3.3.1)

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.2.1.2: T-Test- Clustering des targeted (A) und des untargeted (B) Profiling: Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen zweier unterschiedlicher Gruppen von *Bellis perennis*- Proben.**

Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte Konzentrationen und die grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ( $\alpha=0,01$ ) durchgeführt. Die Standardisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Beide Profiling- Strategien erzeugen sehr ähnliche Muster in der PCA- Darstellung, wobei jeweils eine deutliche Separierung der *Bellis*- Proben in zwei Gruppen (rote und grüne Kreise) zu erkennen ist. Der einzig sichtbare Unterschied ist in der etwas größeren Verteilung der roten und grünen Punkte über die PCA in Darstellung B (untargeted) zu erkennen. Da sich prinzipiell keine Unterschiede in der PCA zwischen den zwei Auswertemethoden feststellen ließen, wurde mit Hilfe eines T-Tests und integriertem Clustering versucht, detailliert Differenzen der zwei Methoden aufzuzeigen (Abb.3.2.1.2). Mittels T-Test wurden signifikante Unterschiede zwischen den zwei Gruppen (die sich vorher in der PCA separierten) im Metabolitgehalt festgestellt. Beim targeted Profiling waren 40 von 80 annotierten Peaks signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen (Abb.3.2.1.2: A). Im Gegensatz dazu konnten mittels untargeted Profiling 438 MST's identifiziert werden, die

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen waren. Aufgrund der Tatsache, dass bei der untargeted Methode die MST's noch nicht in Zeitgruppen zusammengefasst wurden und auch keine Annotation stattgefunden hatte, findet sich jeder Peak mehrfach in der Auswertung wieder. Durch eine anschließende Zusammenfassung der 438 MST's in Zeitgruppen u. einer nachträglichen Annotation war es möglich 63 Peaks zu identifizieren (Abb.3.2.1.2: **B**). Die 40 signifikant unterschiedlichen Metabolite, die mit der targeted Methode gefunden wurden, konnten auch mit der untargeted Methode identifiziert werden. Zusätzlich wurden 23 weitere Metabolite mit Hilfe des untargeted Profiling registriert, wovon aber 12 Metabolite nicht identifizierbar waren. Der Vergleich der Profiling- Methoden zeigt, dass beide Vorgehensweisen zu sehr ähnlichen Resultaten führen. Allerdings hat das untargeted Profiling den Vorteil, zusätzliche Informationen bereitzustellen oder potentielle Metaboliten zu identifizieren, die durch die gezielte Annotation nicht gefunden worden sind.

#### **3.2.2 Untargeted Profiling via LC-FT-MS**

Aufgrund der Tatsache, dass ein targeted Profiling für die LC-FT-MS Messungen nicht zu verwirklichen war, wurde versucht mit Hilfe der exakten Massenbestimmung des Gerätes, alle messbaren Peaks in einen globalen Ansatz zu integrieren, um dann später biologisch relevante Peaks gezielt bestimmen zu können.

In Abb.3.2.2 ist der Arbeitsablauf des in dieser Arbeit durchgeführten untargeted Profiling mit LC-FT-MS Daten dargestellt. Im Full- Scan- Modus werden Molekül- Ionen zwischen 200-2000 Da gemessen, deren elementare Zusammensetzung dann mittels exakter Masse berechnet werden kann. Voraussetzung für eine untargeted Auswertung der Daten ist eine Software, die die gemessenen Peaks aus den Chromatogrammen extrahiert und anschließend diese Peaks via Alignment von verschiedenen chromatographischen Läufen (Proben) abgleicht. Das heißt, Peaks einer spezifischen Masse in einem definierten Zeitfenster aller chromatographischen Läufe werden wiedererkannt und in Relation zueinander gestellt. Hierfür wurde die automatisierte Alignment- Software SIEVE™ von Thermo Fisher Scientific verwendet. SIEVE™ ist in der Lage alle gemessenen m/z (Massen) zu berücksichtigen, semi-quantitativ auszuwerten und sie in einer Datenmatrize zu integrieren. Diese Datenmatrizen können bei Komplexproben bis zu 20000 m/z enthalten. Üblicherweise werden Datenmatrizen dieser Größe via PCA oder ANOVA reduziert, so dass nur die signifikant veränderten Massen (Substanzen) weiter betrachtet werden. Mit Hilfe der Software GoBioSpace (Jan Hummel, Doktorarbeit in Vorbereitung) wird für biologisch relevante Massen die Summenformel kalkuliert, wodurch dann mittels Datenbanksuche

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

entsprechende Metabolite offeriert werden (Abb.3.2.2). Allerdings werden bei höheren Massen in der Regel mehrere Summenformeln generiert, was eine eindeutige Identifizierung von Metaboliten in der Regel ausschließt. Potentiell besteht die Möglichkeit, biologisch interessante Peaks, die nicht eindeutig via Datenbank identifiziert werden können, zu fraktionieren, und dann über MS-MS Experimente weiter zu charakterisieren. Außerdem können bei nicht eindeutiger Zuordnung Referenzsubstanzen vermessen werden.

Der Vorteil des untargeted Profiling liegt in der potentiellen Identifizierung von unbekanntem Metaboliten, die sich anhand von exakter Masse, Formelkalkulation und Datenbanksuche bestimmen lassen. Weiterhin ist es nicht zwingend notwendig, eine Referenzbibliothek aufzubauen, die hunderte oder tausende Substanzen enthalten muss, um Metabolite Profiling Experimente durchführen zu können.

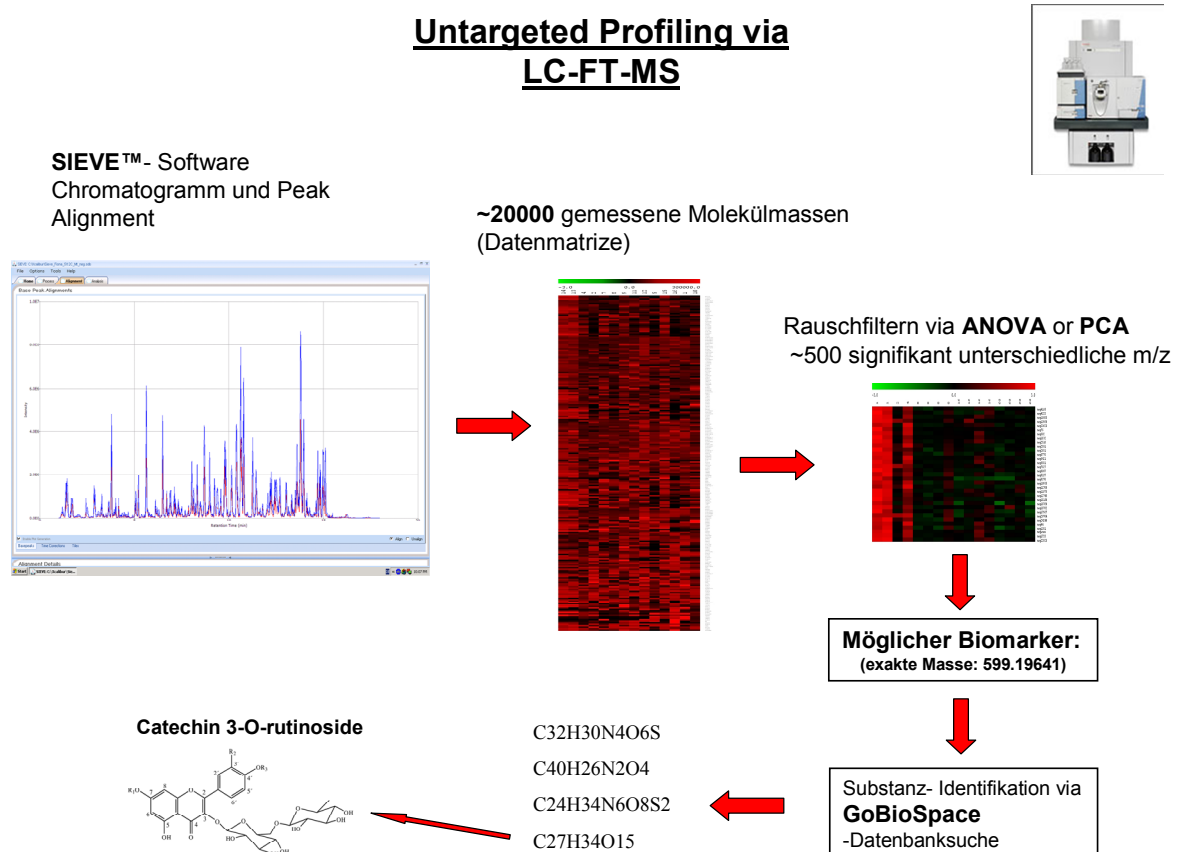


Abb.3.2.2: Arbeitsablauf des untargeted Profiling mittels LC-FT-MS.

### **3.3 Ergebnisse**

Wie im Kapitel 3.1.2 erklärt, wurden für das Jena- Projekt (dieser Arbeit) zwei unabhängige Studien durchgeführt: Die Beprobung der kleinen Kräuter im Mai 2006 und die Beprobung von konkurrenzstarken und konkurrenzschwachen Arten im Mai 2008. Für die Metabolitanalyse wurde die GC-TOF-MS- und die LC-FT-MS- Plattform genutzt, wobei für die Analyse der Proben von 2006 nur GC/MS zur Verfügung stand.

Für die statistische Auswertung der Daten wurden vier Einflussfaktoren berücksichtigt:

- Diversität
- Funktionelle Gruppen (Gräser, Leguminosen, große und kleine Kräuter)
- Tageszeit (nur im Jahr 2006)
- Block- Effekt als Korrektur (Gradient für Boden, Mähen, Ernte, Nährstoffe, ec.)

In den Hauptkomponentenanalysen wurden alle Einflussfaktoren hinsichtlich der Probengruppierung berücksichtigt. Des Weiteren wurden alle Metabolite in den Varianz- und Clusteranalysen in Bezug auf die Einflussfaktoren getestet.

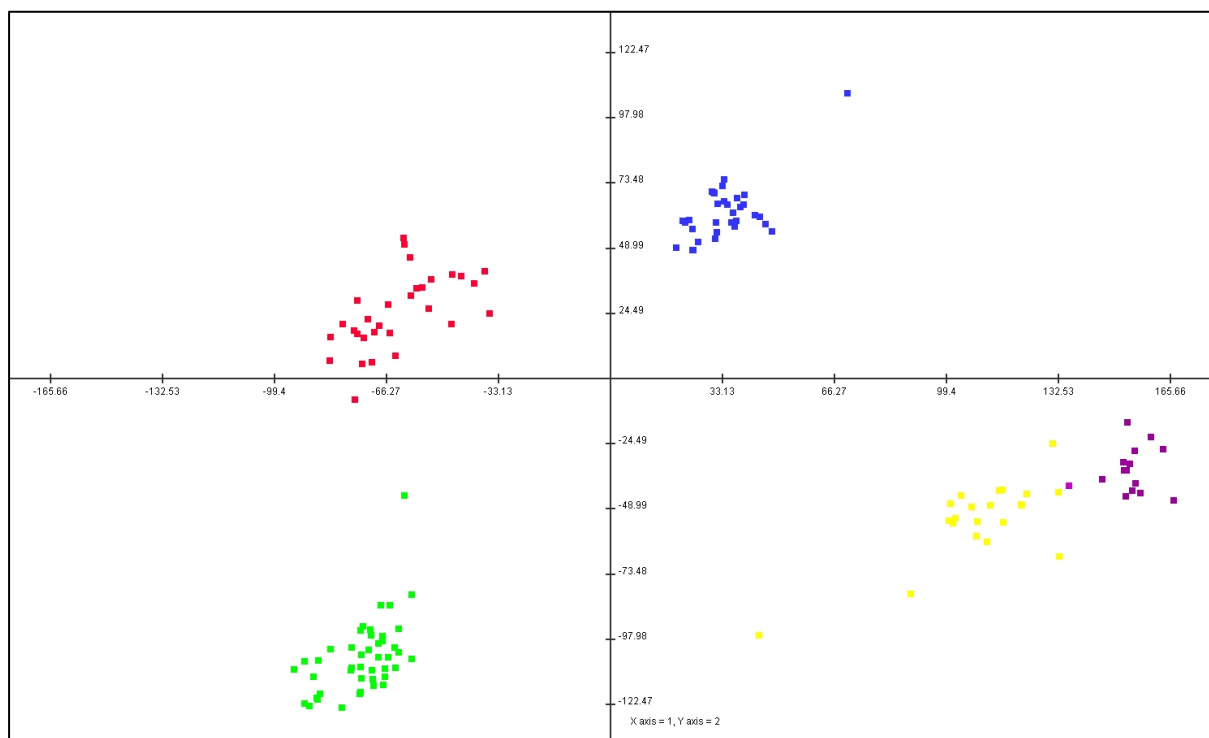
#### **3.3.1 Metabolite Profiling 2006**

Im Mai 2006 erfolgte die Beprobung der kleinen Kräuter *Veronica chamaedrys*, *Prunella vulgaris*, *Leontodon autumnalis*, *Glechoma hederacea* und *Bellis perennis* in Plots mit unterschiedlicher Artenzusammensetzung und -zahl. Der Versuchsaufbau des Jena Experimentes ist so gewählt, dass jede Art in Einzelanpflanzungen (PIG-Plots), Monokultur und in Artenmischungen von 2, 4, 8, 16 und 60 Arten vorkommt. Allerdings ist das Vorkommen der Arten in den Mischungen nicht balanciert, da die einzelnen Arten den Mischungen zufällig zugeordnet wurden. In den PIG-Plots wachsen die Pflanzen konkurrenzlos unter hoher Nährstoffversorgung und unter vollem Licht, in den Monokulturen herrscht intraspezifische Konkurrenz und in den Mehrartenmischungen ist interspezifische Konkurrenz dominierend. Aufgrund dieser Struktur konnten Plots mit gleicher Diversität als biologische Replika zusammengefasst werden. Allerdings mussten Plots mit gleichem Diversitätsniveau aber unterschiedlichen funktionellen Gruppen unterschieden werden. So wurde beispielsweise eine klare Differenzierung zwischen Plots mit und ohne Leguminosen

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

vorgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte 2006 ausschließlich mit der GC/MS Plattform.

Zunächst wurde ein Vergleich der Metabolitprofile aller Arten durchgeführt, um die Unterscheidbarkeit der fünf Arten anhand der Metabolitdaten darzustellen. Dafür wurden die Metabolite, die in allen Arten identifiziert werden konnten (60 Metabolite), in eine Datenmatrix integriert und mittels PCA visualisiert. Die PCA in Abb.3.3.1.1 zeigt eine klare Trennung der Arten gegeneinander. Das heißt, die Metabolitprofile der einzelnen Arten unterscheiden sich eindeutig voneinander. Die Unterschiede zwischen den Arten sind nicht nur an veränderten Metabolitabundanz determinierbar, sondern zeigen sich auch an deutlich abweichenden Chromatogrammen, wobei für jede Art spezifische Substanzen nachgewiesen werden konnten.

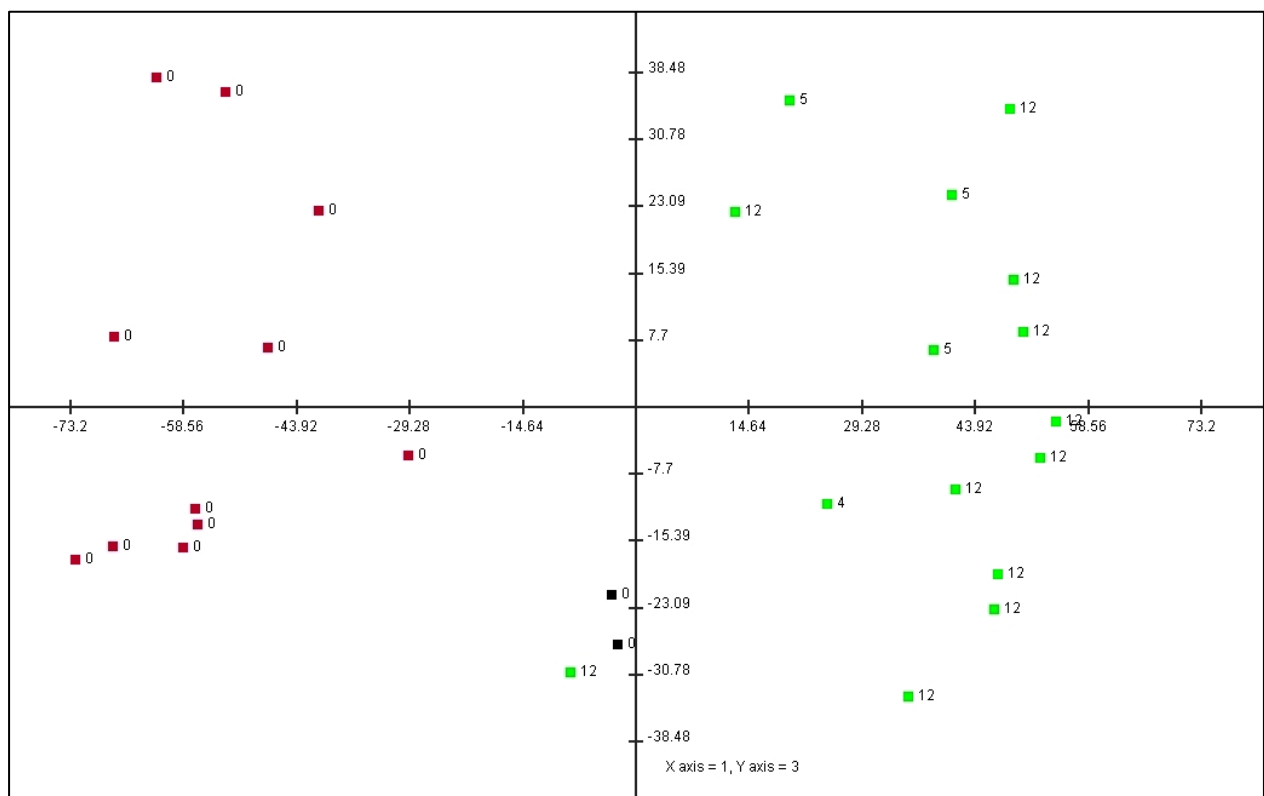


**Abb.3.3.1.1: Integration der Metabolitprofile aller fünf Arten in einer PCA- Darstellung.** Farbcodierung: gelb - *Prunella vulgaris*; pink - *Leontodon autumnalis*; grün - *Veronica chamaedrys*; blau - *Glechoma hederacea*; rot - *Bellis perennis*. PCA mit standardisierte Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten drei Komponenten 85% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate.



### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Ein wesentlicher Effekt der im Jahr 2006 in den Metabolitdaten registriert wurde, ist der Einfluss der Leguminosen auf die kleinen Kräuter. Abb.3.3.1.2 zeigt, wie sich die Proben von *Bellis perennis* in der PCA in zwei Gruppen separieren, in Pflanzen die mit Leguminosen (grüne Symbole) und in Pflanzen die ohne Leguminosen (rote Symbole) in den Artenplots wuchsen. Zur Veranschaulichung des Leguminoseneinflusses wurden Zahlen dargestellt, die die Anzahl an Leguminosen- Arten (0-12) in den Plots repräsentieren sollen. Interessanterweise gibt es zwei Plots (0,0; schwarze Symbole) am unterem Rand der PCA, die sich außerhalb beider Gruppen befinden. Diese Pflanzen wurden in den PIG-Plots geerntet, und unterscheiden sich im Metabolitprofil deutlich gegenüber Pflanzen, die in intra- und interspezifischer Konkurrenz wuchsen. Der Einfluss der Leguminosen auf das Metabolitprofil der *Bellis perennis* Pflanzen war 2006 so stark, das er alle anderen untersuchten Effekte überlagerte. Mögliche Faktoren wie Tageszeit (morgens, mittags, abends) oder funktionelle Gruppen (z.B. Gräser) hatten nur einen geringen Einfluss auf die Verteilung der Bellis- Proben in der PCA.

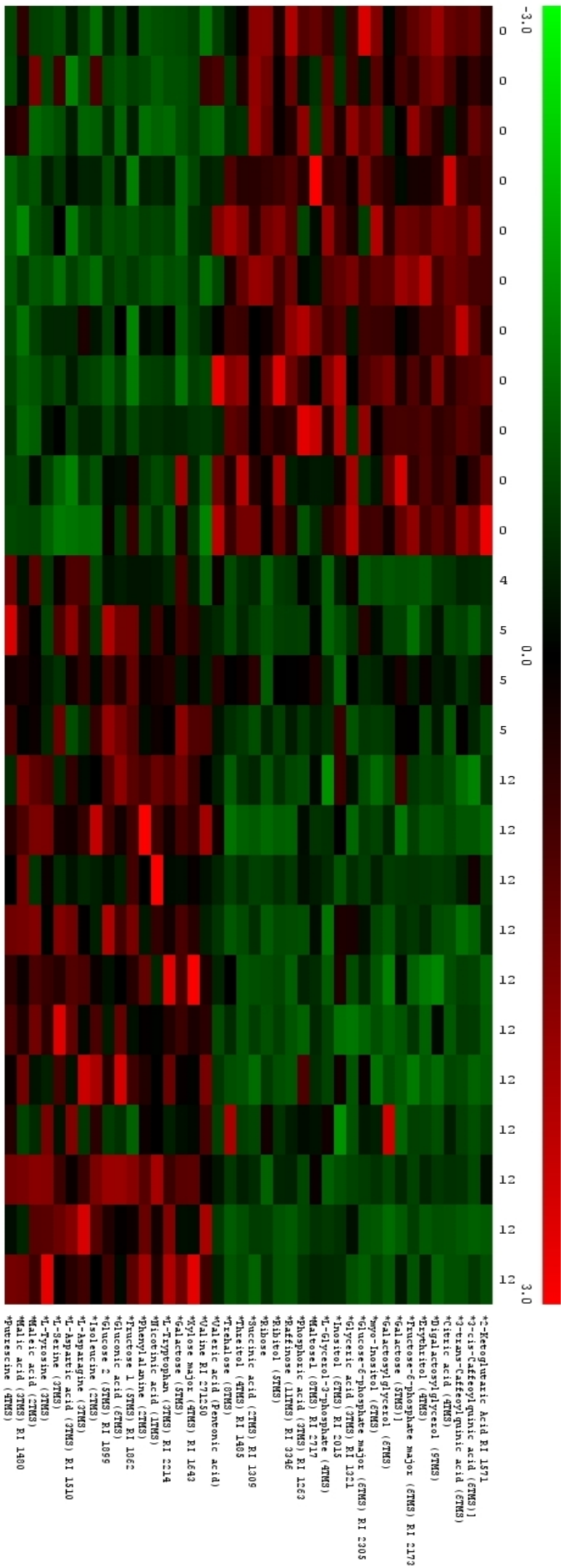


**Abb.3.3.1.2: PCA der Metabolitdaten von *Bellis perennis*.** Rote Symbole umfassen Proben aus Plots ohne Leguminose; grüne Symbole umfassen Proben mit Leguminosen. Die Zahlen repräsentieren jeweils die Anzahl an Leguminosen- Arten im Plot. PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten drei Komponenten 57% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Um den Leguminosen- Effekt detaillierter zu veranschaulichen, wurden zwei Proben-Gruppen von *Bellis* gebildet: + und – Leguminosen- Artenplots, die dann anhand eines T-Test mit kombiniertem Clustering verglichen werden konnten. Abb.3.3.1.3 zeigt 40 signifikant unterschiedliche Metabolite zwischen den beiden Gruppen, wobei Metabolite mit ähnlichem Verhalten Clustern. Des Weiteren zeigt die farbliche Codierung, ob sich die Abundanz der Substanz gegenüber der anderen Gruppe des T-Tests relativ erhöht (rot) oder vermindert (grün). Durch diese Darstellungsweise konnte das konträre Verhalten der Metabolite der beiden Proben- Gruppen veranschaulicht und stoffwechselrelevante Substanzen identifizierbar gemacht werden. Bei den *Bellis perennis* Pflanzen, die mit Leguminosen gewachsen sind, sind signifikante Abnahmen von Substanzen aus dem Citrat- Zyklus (2-Ketoklutarat, Citrat, Succinat), Glykolyse- Abbauprodukte (Glucose-6-P, Fructose-6-P), diverse Zucker (Maltose, Raffinose, Trehalose, Erythritol, Ribitol, Threitol, Inositole) aber auch Vorstufen von Sekundär- Metaboliten (Kaffeat, Caffeoylquinic acid) zu erkennen. Signifikante Zunahmen von Substanzen der Leguminosen- Gruppe sind dagegen vor allem bei Aminosäuren (Isoleucin, Threonine, Asparagin, Phenylalanin, Aspartat, Tyrosin, Tryptophan, Putrescin, Serin) und einigen Intermediaten (Malat, Glucose, Fructose, Gluconsäure) zu beobachten.

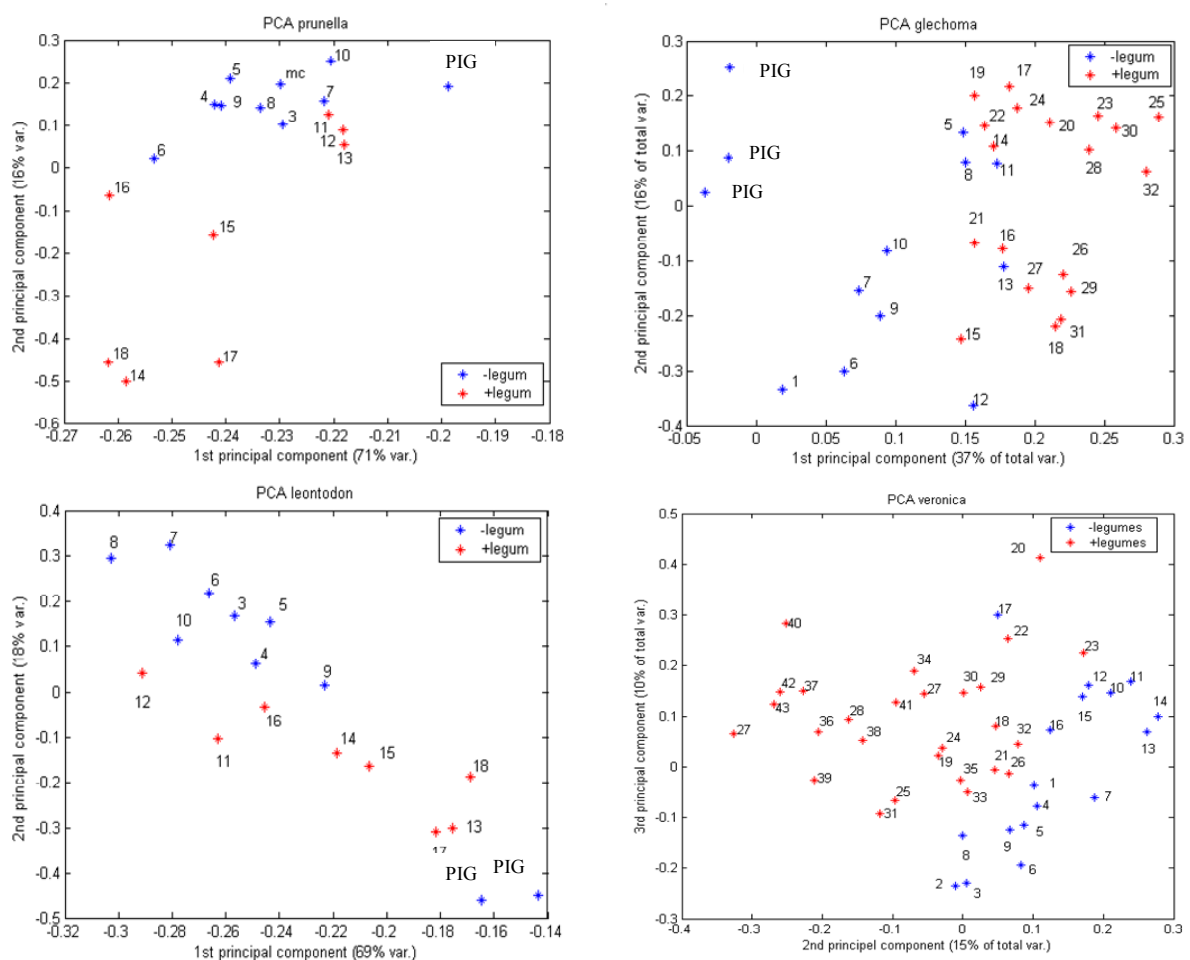
### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb. 3.3.1.3: T-Test- Clustering zweier unterschiedlicher Gruppen von *Bellis perennis* Proben: 4-12 Leguminosenarten im Plot (rechts oben abgebildet) und 0 Leguminosenarten im Plot (links oben abgebildet).**  
 Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen zwischen den beiden Gruppen, wobei die rote Farbcodierung erhöhte Konzentrationen und grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen wiedergibt. Die gemessenen Metabolite sind auf der rechten Seite der Darstellung abgebildet. Der Signifikanztest wurde mit dem Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen und einem kritischen p- Wert von 0,01 durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ .

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Der Leguminosen- Effekt, der bei *Bellis perennis* gezeigt werden konnte, trat auch bei den anderen kleinen Kräutern auf. Abb.3.3.1.4 zeigt zusammenfassend vier PCA-Plots von *Prunella*, *Glechoma*, *Leontodon* und *Veronica*: wobei es sich bei den jeweils Blau markierten Punkten um Pflanzen handelte, die ohne (-) Leguminosen im Plot wuchsen; die jeweils rot markierten Punkte waren Pflanzen, die mit (+) Leguminosen im Plot wuchsen. Auch für diese kleinen Kräuter findet eine Separierung in der PCA statt zwischen + und – Leguminosen-Plots. Allerdings ist die Separierung und damit der Leguminosen- Effekt nicht so deutlich ausgeprägt wie bei *Bellis perennis*. Eine weitere Übereinstimmung mit *Bellis* besteht bei den PIG-Plots (Einzelpflanzungen), die sich von den Mehrartenplots deutlich trennen.



**Abb.3.3.1.4: Kombinierte PCA- Darstellungen der Metabolitdaten von *Prunella vulgaris*; *Glechoma hederacea*; *Leontodon autumnalis*; *Veronica chamaedrys*; rote Punkte repräsentieren Proben aus Plots mit Leguminosen; blaue Punkte repräsentieren Proben aus Plots ohne Leguminosen; PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei jeder Punkt 3 technische Replikate repräsentiert.**

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

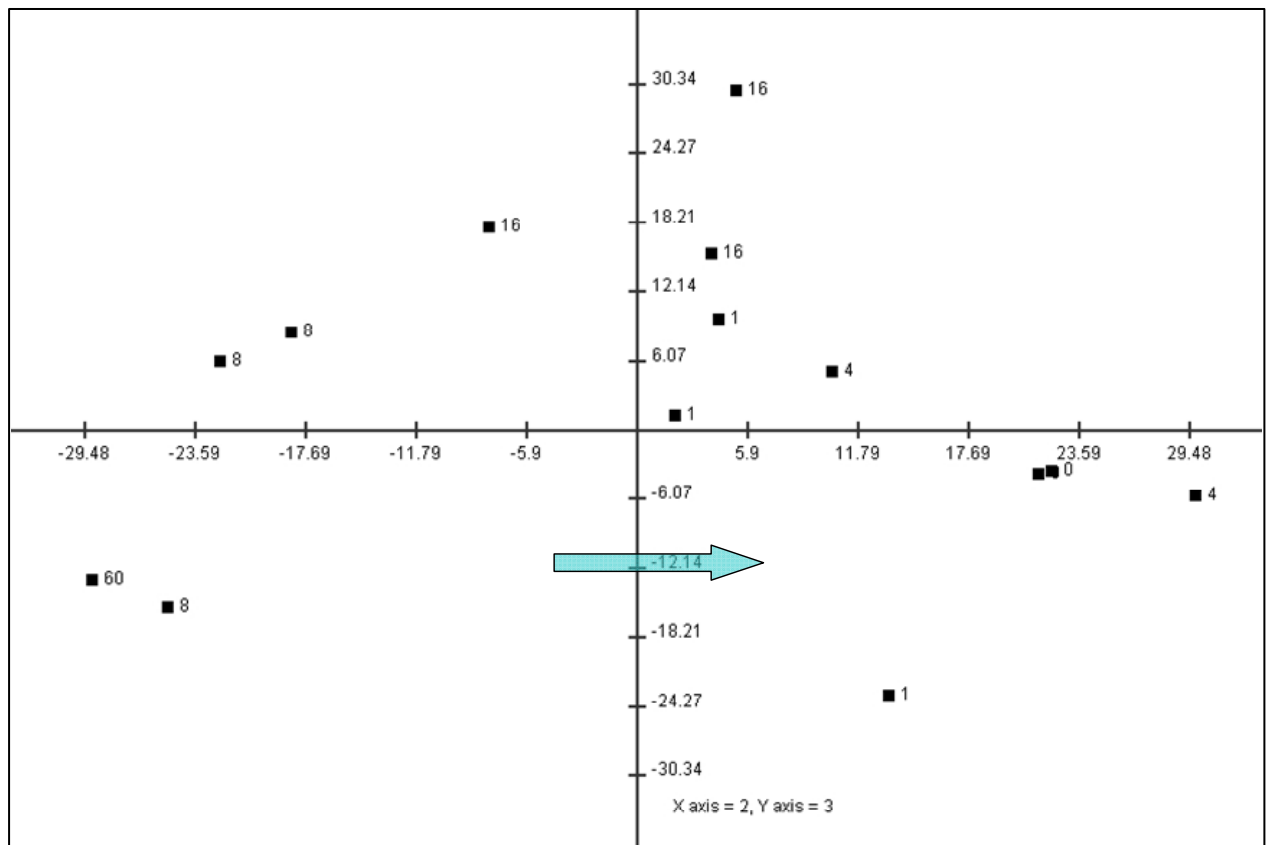
Ausgehend von den am stärksten durch Leguminosen beeinflussten Metaboliten (hohe Loadings in der PCA) wurden Ratios zwischen +Leguminosen/- Leguminosen Plots gebildet, mittels Signifikanztest und linearer Korrelation (nicht dargestellt) geprüft, und daraufhin über die Arten verglichen (Tab.3.3.1). Im Vergleich der fünf kleinen Kräuter zeigt sich ein genereller Trend bei der Anwesenheit von Leguminosen im Artenplot: die relative Zunahme bei Aminosäuren und die relative Abnahme von einigen Intermediaten. Das heißt, die Resonanz der Kräuter auf die Leguminosen Präsenz fällt relativ ähnlich aus, allerdings ist sie bei Glechoma, Prunella und Veronica deutlich abgeschwächt.

	Bellis		Leontodon		Glechoma		Prunella		Veronica	
	ratio	T-Test	ratio	T-Test	ratio	T-Test	ratio	T-Test	ratio	T-Test
Serin	1.41		4.00	*	0.58		0.98		1.19	
Aspartat	2.22		9.40	.	1.62		9.17		2.10	
Phenylalanin	6.89	*	1.40		1.61		2.10		1.58	
Putrescin	1.98	*	2.63		2.32		0.39		0.97	
Tryptophan	15.87	.	1.02		1.71	*	1.02		1.07	
Raffinose	0.02	*	0.31	*	1.08		0.42	*	2.61	**
Xylitol	0.09	**	0.44	**	0.66		0.95		0.59	*
Ribonat	0.18		0.74		0.27	*	0.54	*	0.80	
Citrat	0.17	**	0.27	**	0.46		1.42		1.41	
Maltose	0.10	**	0.24	**	1.53		0.90		0.69	*
2-Ketogutarat	0.06	**	1.13		0.67		1.01		1.02	
Caffeoylquinic acid	0.30	**	n.a.		0.48	*	n.a.		n.a.	
Kaffeäat	1.06		0.45	**	0.97		0.60		0.48	***

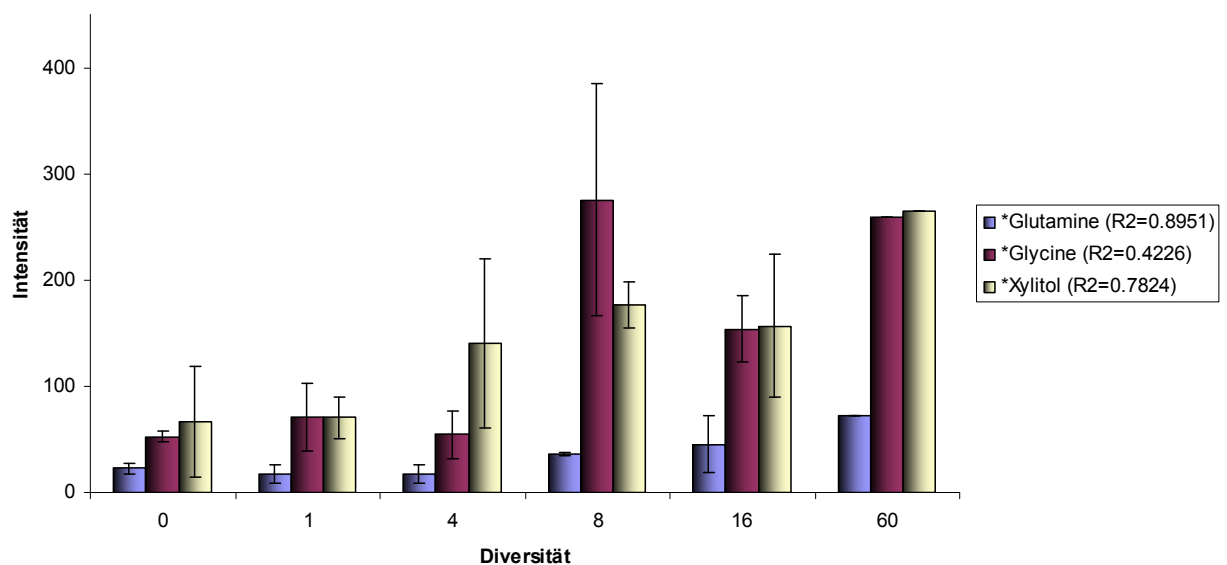
**Tab.3.3.1: Metabolite- Ratios und Signifikanztest von + Leguminosen/- Leguminosen Plots aller kleinen Kräuter.** Blaue Felder symbolisieren relative Zunahme (ab 1,5 fach); rote Felder symbolisieren relative Abnahme (ab 0,5 fach); Signifikanz Codes: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1. (bei signif. unterschiedlichen Metabolite- Paaren ist eine lineare Korrelation gegeben)

Zusätzlich zum Leguminosen- Effekt konnte für *Leontodon autumnalis* eine Korrelation von einigen Metaboliten mit der Diversität festgestellt werden. Abb.3.3.1.5 zeigt eine PCA der Metabolitdaten von Leontodon, dabei symbolisieren die angegebenen Zahlen das Diversitätsniveau der dargestellten Plots. Die PCA zeigt einen Gradienten zwischen den Artenplots von niedriger Diversität (0) hin zu hoher Diversität (60) auf (Pfeil). Eine Diversität von 0 bedeutet in diesem Fall, dass die hier untersuchte Art in PIG-Plots ohne Konkurrenz gewachsen ist, wohingegen die anderen Plots durch intra- und interspezifische Konkurrenz mit unterschiedlicher Artenanzahl gekennzeichnet sind. Der Diversitätsgradient zwischen den Leontodon- Plots der durch die PCA aufgezeigt wird, weist auf Korrelationen von Metaboliten mit der Diversität hin. Aufgrund dessen wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt und die drei signifikantesten Korrelationen ausgewählt, die sich in Abb.3.3.1.6 wieder finden. Die Metabolite Glutamin, Glycin und Xylitol korrelieren mit der Diversität, wobei sich das niedrige Bestimmtheitsmaß für Glycin ( $R^2=0,4226$ ) aus der großen Standardabweichung bei dem Diversitätsniveau von 8 erklären lässt.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.3.1.5: PCA der Metabolitdaten von *Leontodon autumnalis*.** Die Zahlen repräsentieren jeweils die Anzahl an Arten im Plot beziehungsweise die Diversität. PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten drei Komponenten 58% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate.



**Abb.3.3.1.6: Drei ausgewählte Metabolite- Korrelationen mit der Diversität für *Leontodon autumnalis*** (insgesamt 7 schwach signifikant veränderte Metabolite). Das Korrelationsmaß  $R^2$  steht für jede Substanz in der Legende; für jedes Diversitätsniveau standen 2-4 biologische Replika also äquivalente Plots zur Verfügung.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

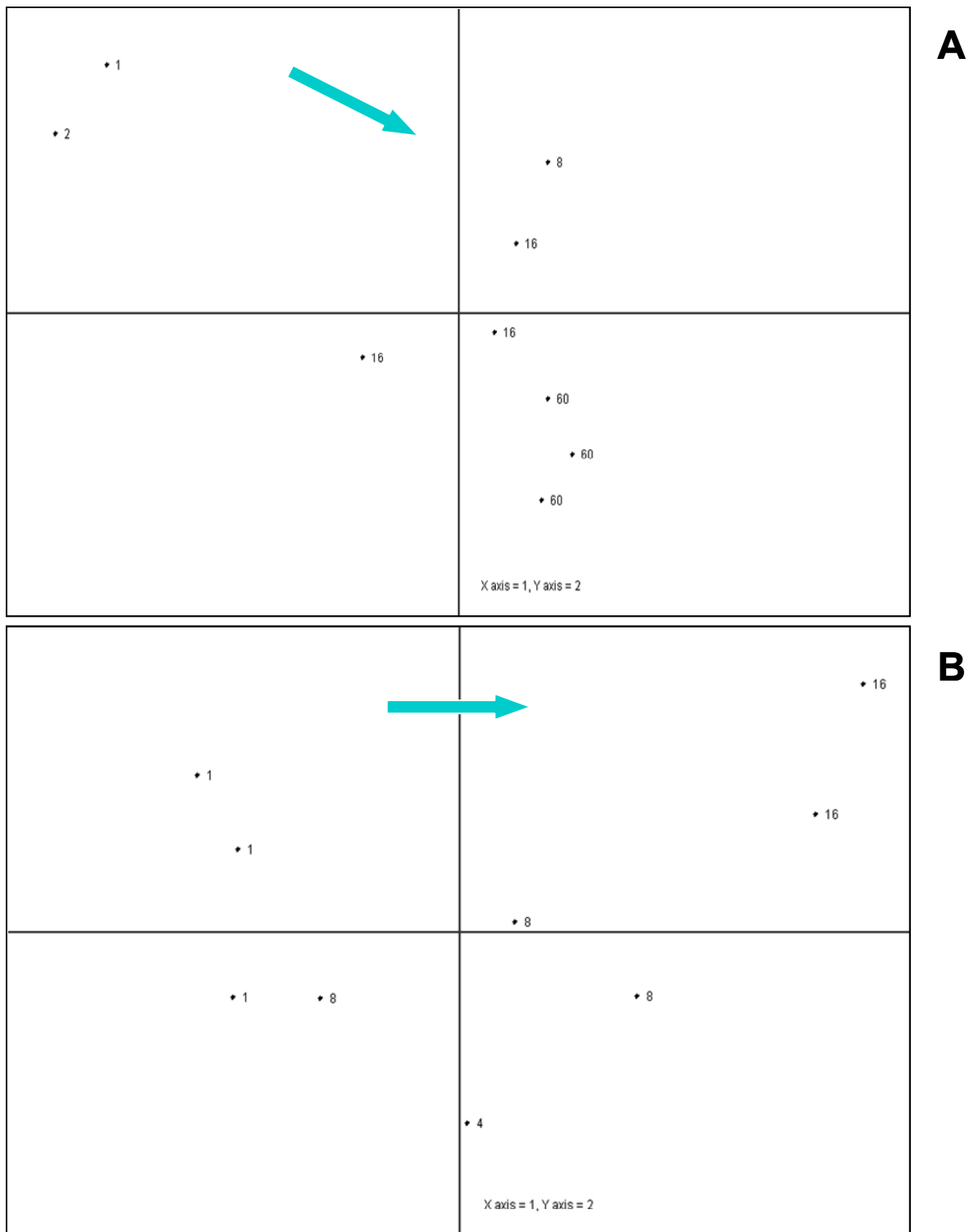
Einschränkend muss erwähnt werden, dass der Diversitätseffekt nicht sonderlich stark in den Daten repräsentiert ist. Deutlich wird dieser Umstand daran, dass der Diversitätsgradient nur in der 2. und 3. Komponente der PCA sichtbar wird, aber wesentlich mehr Varianz durch die 1. Komponente erklärt ist. Das heißt, der Leguminosen- Effekt der durch die 1. und 2. Komponente sichtbar wird (Abb.3.3.1.4), ist wesentlich stärker ausgeprägt und überlagert die Korrelation zur Diversität. Ein weiteres Problem bestand für *Leontodon* darin, dass nur wenige biologische Replika vorhanden waren. Weiterhin muss erwähnt werden, dass *Leontodon* bei der Beprobung 2006 nur noch in zwei 60 Arten- Mischungen gefunden wurde. Als zusätzlich erschwerend hat sich der Verlust einiger Proben bei der Aufarbeitung erwiesen. Aufgrund dieser Probleme fehlen Standardfehler bei einigen Plots oder schwanken stark, aber Trends sind erkennbar.

#### **3.3.2 Metabolite Profiling 2008**

Aufgrund der Erkenntnisse von 2006 änderte sich die Fragestellung hinsichtlich der Beprobung 2008. Als Kontrolle zu den Ergebnissen von 2006 wurden die kleinen Kräuter *Leontodon autumnalis* und *Bellis perennis* erneut beprobt. Zusätzlich wurde das konkurrenzstarke große Kraut *Knautia arvensis* für eine Gegenüberstellung mit den kleinen Kräutern in die Untersuchung mit aufgenommen. Infolge des Leguminosen- Effektes von 2006 der bei allen untersuchten Arten auftrat, wurden 2008 die Leguminosen *Lotus corniculatus* und *Medicago varia* in die Untersuchung einbezogen, um zu prüfen, ob bei den Leguminosen selbst in Mischungen mit verschiedener Artenzahl ein Diversitätseffekt zu beobachten ist. Ein weiterer Unterschied zu 2006 besteht in der analytischen Methodik; 2008 erfolgte das Metabolic Profiling mittels GC-TOF-MS und zusätzlich mittels LC-FT-MS.

In der Untersuchung von 2008 wurde der Versuch unternommen, den Leguminosen- Effekt bei den kleinen Kräutern *Leontodon autumnalis* und *Bellis perennis* von 2006 zu verifizieren. Interessanterweise war der Leguminosen- Einfluss 2008 nicht mehr nachweisbar, anstatt dessen wurde für beide Arten ein Diversitätsgradient festgestellt. Abb.3.3.2.1 zeigt zwei PCA- Plots von *Bellis* (A) und *Leontodon* (B), in denen das Diversitätsniveau der untersuchten Artenplots durch die dargestellten Zahlen repräsentiert wird. Für beide Arten ist ein Gradient von geringer zu hoher Diversität (Pfeile) sichtbar. Das bedeutet für beide Teilabbildungen (A und B), dass Pflanzen die in Plots mit geringer Diversität wuchsen, auf der linken Seite in der PCA zu finden sind und antagonistisch dazu sind Pflanzen, die in Plots mit hoher Diversität wuchsen, auf der rechten Seite in der PCA abgebildet.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.3.2.1: PCA der Metabolitdaten (GC/MS) von *Bellis perennis* (A) und von *Leontodon autumnalis* (B).** Die Zahlen repräsentieren jeweils die Anzahl an Arten im Plot beziehungsweise die Diversität. PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten zwei Komponenten 50%(A) bzw. 55%(B) der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate. Auf die Beschriftung der Achsen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

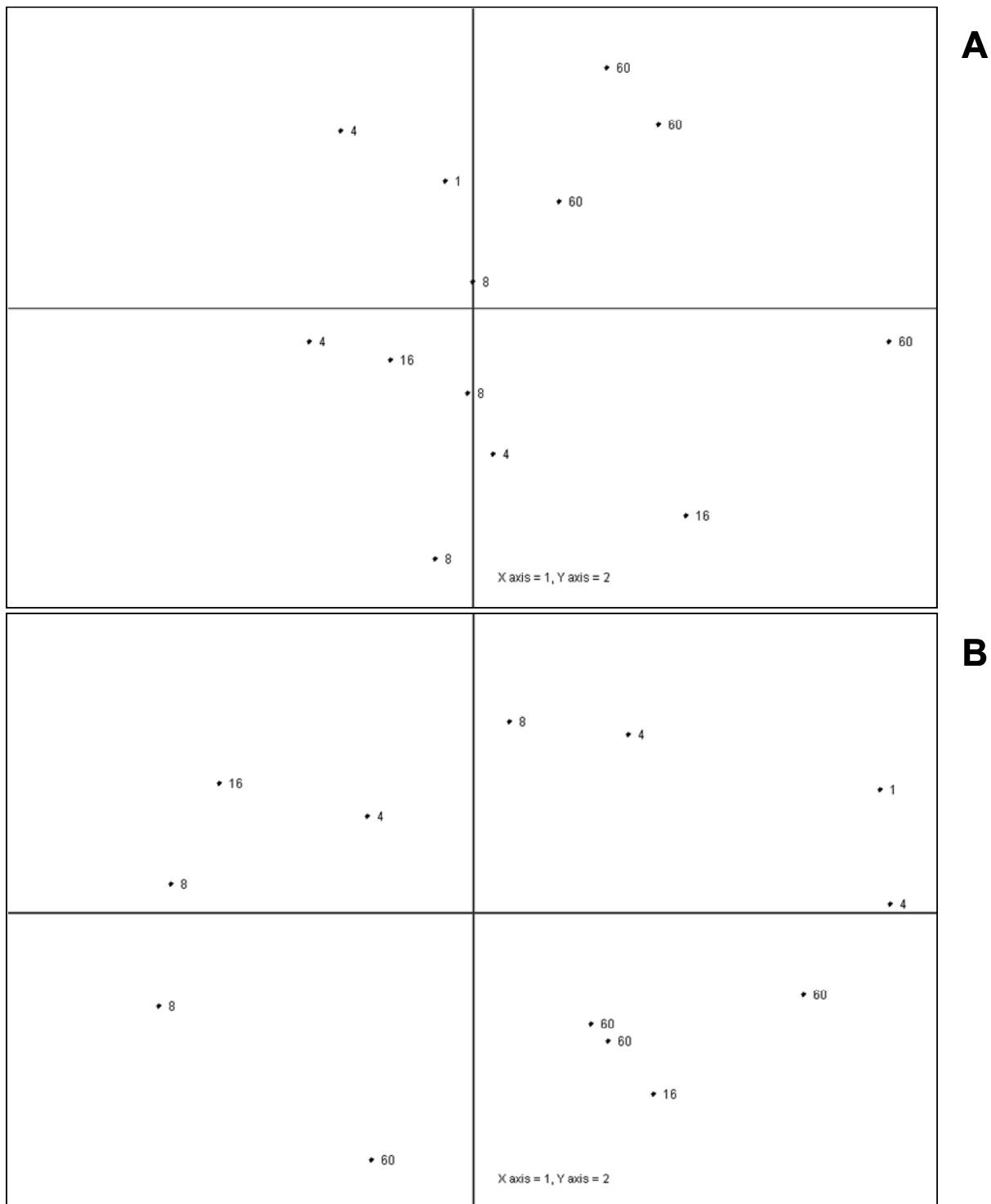


### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

In Analogie zu Leontodon (2006) zeigt sich in den Metabolitprofilen von Bellis und Leontodon (2008) eine Korrelation von Metaboliten mit der Diversität. Im Unterschied zu 2006 ist der Diversitätseffekt 2008 aber wesentlich stärker in den Daten determiniert. Das heißt, 2006 wurde der Effekt bei Leontodon nur auf der 2. und 3. PCA- Komponente festgestellt (10%-25% der Varianz). 2008 hingegen ist der Einfluss der Diversität mit 50% (Bellis) bzw. 55% (Leontodon) der Wahrscheinlichkeit auf der 1. und 2. Komponente der PCA erklärt.

Abb.3.3.2.2 zeigt zwei PCA- Plots der Metabolitdaten des großen Krautes *Knautia arvensis*, dabei sind im Teil A GC/MS Daten und im Teil B LC/MS Daten abgebildet. Im Gegensatz zu den kleinen Kräutern ist für *Knautia* kein Diversitätsgradient für beide Datensätze auf den ersten beiden Komponenten der PCA sichtbar. Das wird daran ersichtlich, dass Plots mit geringer Artenanzahl (1 – 4) unmittelbar benachbart sind zu Plots mit hoher Artenanzahl (16 - 60). Ein Zusammenhang zwischen Diversität und Metaboliten findet sich für *Knautia* nur für die GC/MS Daten auf der 3. PCA- Komponente (nicht dargestellt). Die 3. PCA- Komponente der GC/MS Daten erklärt aber nur 8% der Gesamtvarianz. Das heißt, eine Korrelation von Metaboliten und der Diversität ist auch für *Knautia* nachweisbar, allerdings tritt diese im Vergleich mit Bellis und Leontodon wesentlich abgeschwächer in den GC-MS- Daten hervor. Weiterhin ist zu bemerken, dass die Ergebnisse aus den GC/MS und LC/MS Messungen zwar in unterschiedliche Verteilungsmuster der Proben in den PCA-Plots resultieren, trotzdem sind die Aussagen der beiden Messungen sehr ähnlich. Das bedeutet für *Knautia*, dass keine signifikanten Effekte auf der 1. und 2. Komponente der PCA-Plots für beide Datensätze feststellbar sind; nur die 3. PCA- Komponente der GC/MS Daten enthält mit geringer Einflusswahrscheinlichkeit Diversitätseffekte (Tab.3.3.2).

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



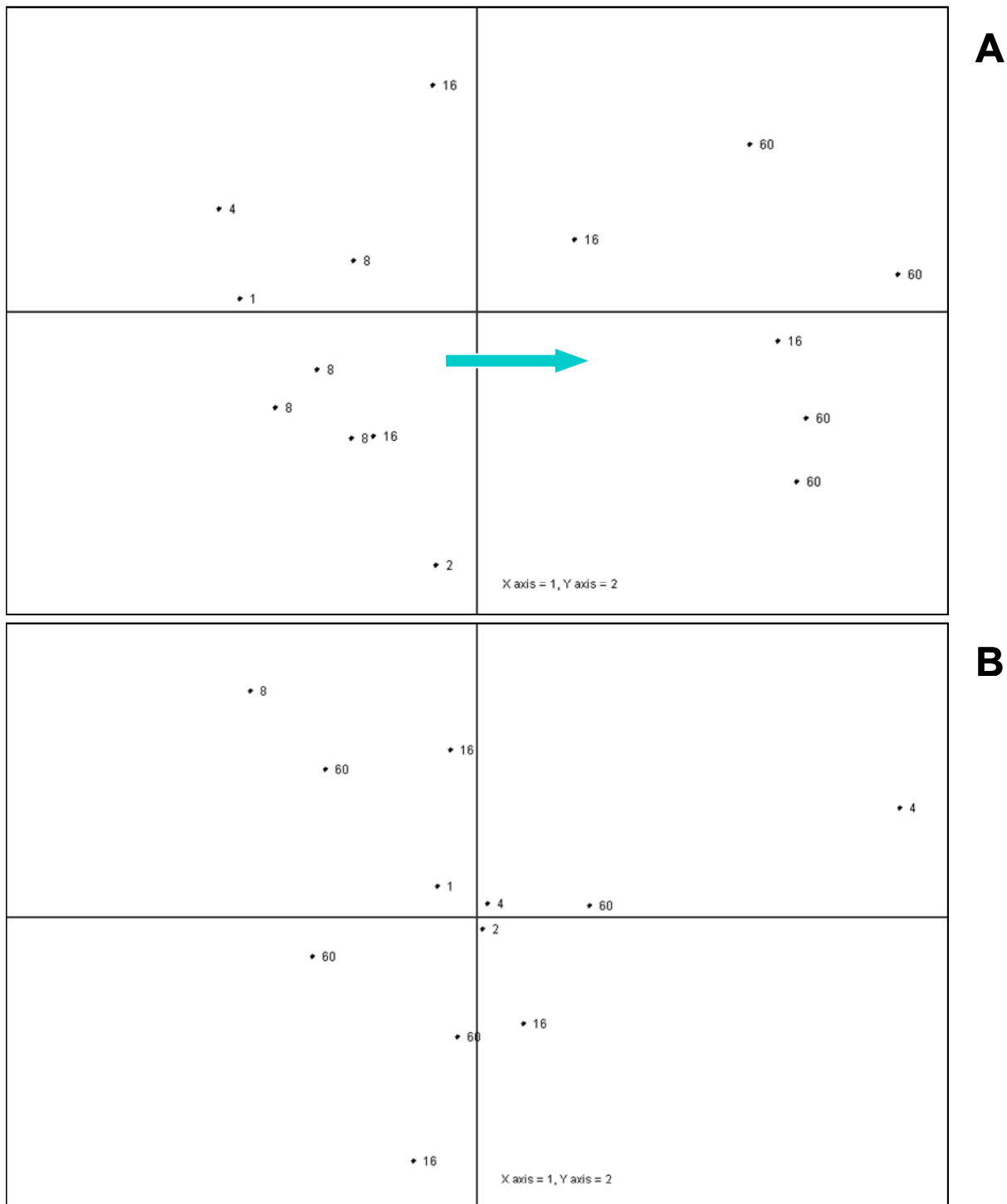
**Abb.3.3.2.2: PCA- Plots der Metabolitdaten von *Knautia arvensis*. A: GC/MS Daten; B: LC/MS Daten.** Die Zahlen repräsentieren jeweils die Anzahl an Arten im Plot beziehungsweise die Diversität. PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten zwei Komponenten 36% (A) und 30% (B) der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate. Auf die Beschriftung der Achsen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Ein weiteres Untersuchungsziel 2008 bestand in einem Vergleich der beiden Leguminosen *Lotus corniculatus* und *Medicago varia*. In Abb.3.3.2.3 sind die GC/MS Daten der beiden Leguminosen mittels PCA verglichen, dabei ist im Teil A der Abbildung der PCA-Plot für Lotus und im Teil B der PCA-Plot für *Medicago* dargestellt. Auch in dieser Abbildung repräsentieren die dargestellten Zahlen das Diversitätsniveau der untersuchten Artenplots. In Teil A wird zwischen 1. und 2. Komponente der PCA ein Diversitätsgradient von links nach rechts aufgespannt, was durch den dargestellten Pfeil veranschaulicht ist. Das bedeutet, Lotus- Pflanzen die in Plots mit geringer Diversität wuchsen sind auf der linken Seite der PCA abgebildet, und Lotus- Pflanzen die in Plots mit hoher Diversität wuchsen sind eher auf der rechten Seite der PCA zu finden. Im Gegensatz dazu sind im Teil B der Abbildung für *Medicago* kein Gradient oder andere Effekte sichtbar. Gegen einen Diversitätseffekt spricht auch die Verteilung der Plots in der PCA, so sind Plots mit geringer Diversität (1-4) nicht separiert von Plots mit hoher Diversität (16; 60). Eine anschließende Varianzanalyse ergab für *Medicago* keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem GC/MS Metabolitprofil und der Diversität oder anderen Einflussfaktoren, wohingegen für Lotus signifikante Korrelationen zwischen Metaboliten und der Diversität gefunden wurden (Tab.3.3.2).

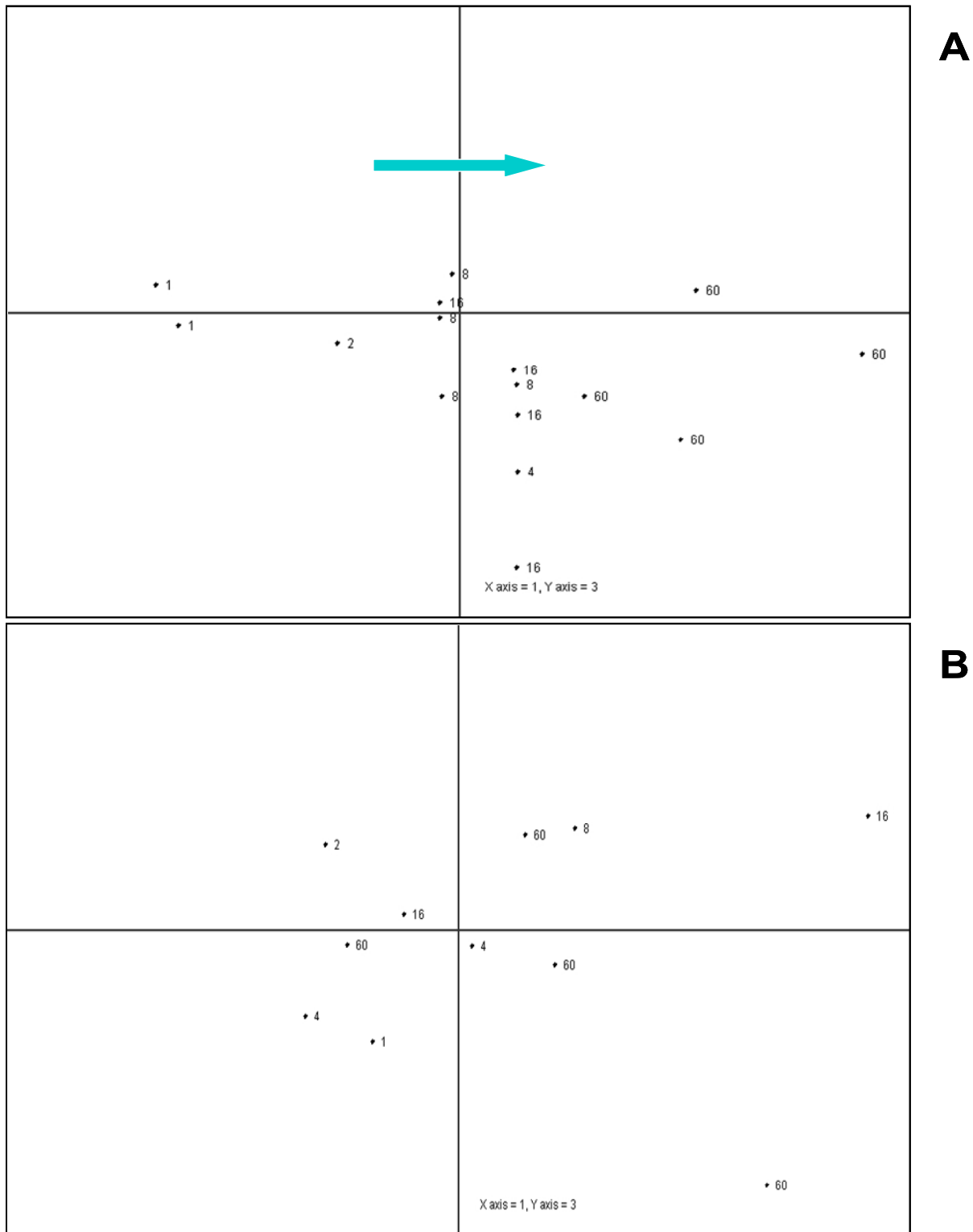
In Abb.3.3.2.4 sind die LC/MS Daten von Lotus (A) und *Medicago* (B) entsprechend zur GC/MS Analyse dargestellt. Abweichend wurden hier die 1. und 3. Komponente der PCA aufgrund einer besseren Darstellbarkeit verwendet. Das Muster, welches in den PCA-Plots von Lotus und *Medicago* auftritt, ist dem der GC/MS Auswertung äquivalent. Auch hier findet sich ein Diversitätsgradient für Lotus (Pfeil), der für *Medicago* nicht vorhanden ist. Im Gegensatz zu den GC/MS Daten konnten in den LC/MS Daten in einer Varianzanalyse signifikant veränderte Metabolite für *Medicago* zwischen den unterschiedlichen Diversitätsniveaus gefunden werden, allerdings wurden für Lotus deutlich mehr signifikant veränderte Metabolite gefunden (Abb.3.3.2.5).

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.3.2.3: PCA- Plots der Metabolitdaten (GC/MS) von *Lotus corniculatus* (A) und von *Medicago varia* (B).** Die Zahlen repräsentieren jeweils die Anzahl an Arten im Plot beziehungsweise die Diversität. PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten zwei Komponenten 50%(A) bzw. 58%(B) der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate. Auf die Beschriftung der Achsen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.3.2.4: PCA- Plots der Metabolitdaten (LC/MS) von *Lotus corniculatus* (A) und von *Medicago varia* (B).** Die Zahlen repräsentieren jeweils die Anzahl an Arten im Plot beziehungsweise die Diversität. PCA mit standardisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten drei Komponenten 66%(A) bzw. 68%(B) der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 3 technische Replikate. Auf die Beschriftung der Achsen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse (PCA) konnten die Einflussfaktoren für jede Art näher bestimmt werden, und für die Untersuchung von 2008 auf den Diversitätsfaktor eingeschränkt werden. Anschließend wurden in Varianzanalysen mittels ANOVA signifikant unterschiedliche Metabolite zwischen unterschiedlichen Diversitätsniveaus für die einzelnen Arten bestimmt. In Tab.3.3.2.1 sind alle signifikant unterschiedlichen Metabolite (GC/MS Daten) für alle Arten außer für Medicago, welche keine signifikanten Unterschiede zeigte, abgebildet. Für die ANOVA wurden die Plots mit unterschiedlicher Artenzahl (1/2/4/8/16/60) in 3 oder 4 Diversitätsgruppen eingeteilt (z.B.: die Plots mit einer Artenzahl von 1/2/4 wurden zu einer Gruppe zusammengefasst) und mittels Fisher- Test auf signifikante Unterschiede im Metaboliteniveau zwischen den Gruppen getestet. Signifikante Unterschiede konnten für Metaboliten aus dem Primärmetabolismus (organische Säuren, Zucker und Aminosäuren) und bei Vorstufen von Sekundärmetaboliten (untere Gruppe in der Tabelle) erkannt werden. Außerdem kann man die individuelle Resonanz der einzelnen Arten, bezogen auf die Diversität, in der Tabelle erkennen. Das heißt, für jede Art wurden spezifische Metabolite gefunden, die zwischen den Plots mit geringer und hoher Diversität signifikant verändert waren (Ausnahme: für Bellis und Lotus waren zwei Metabolite identisch).

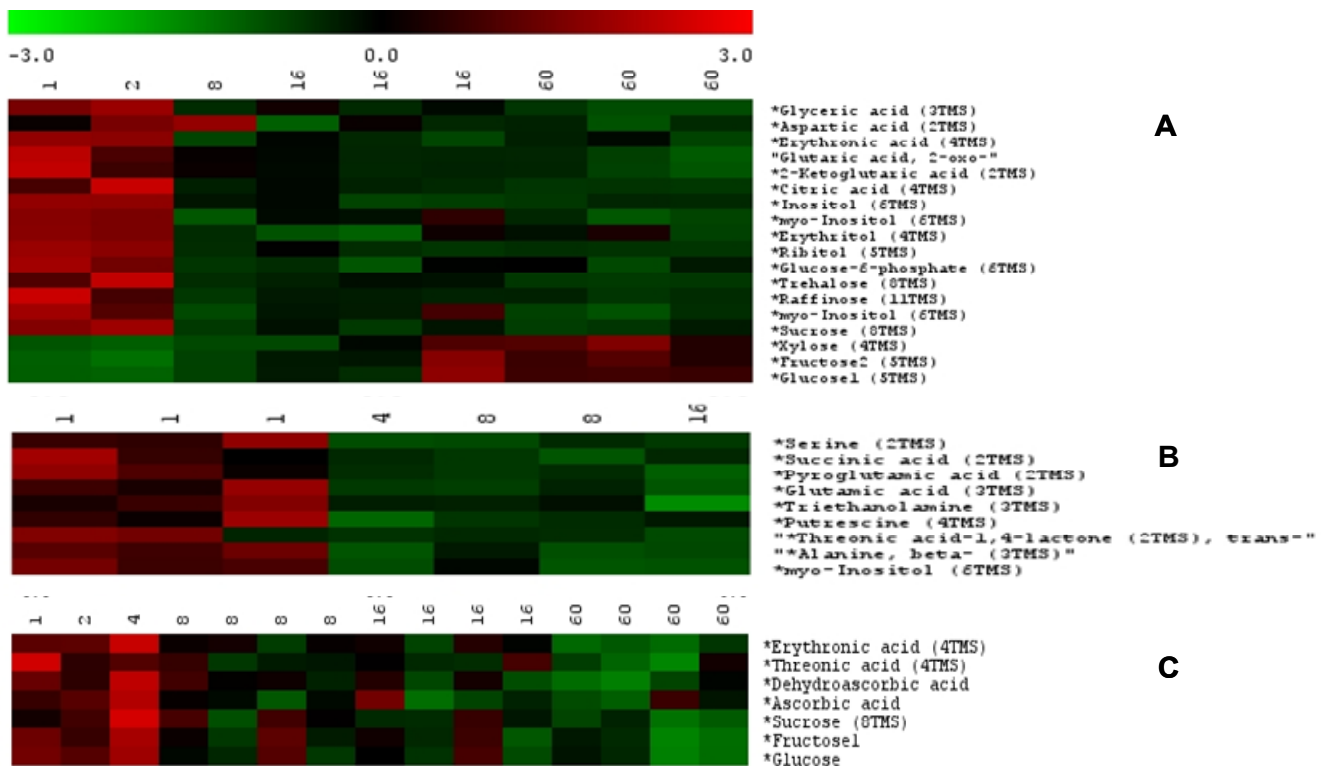
Metabolite	Bellis			Krautia			Leontodon			Lotus		
	F-Test	Gruppen	p-Wert	F-Test	Gruppen	p-Wert	F-Test	Gruppen	p-Wert	F-Test	Gruppen	p-Wert
*Glycerat	45.699	3	2.34E-04									
*Erythronic acid	36.173	3	4.49E-04							14.801	4	3.54E-04
*Pentonic acid				7.641	4	0.007608						
*Dehydroascorbat										6.768	4	0.007509
*Aspartat							14.663	3	0.0049			
*Glutamat							11.796	3	0.008336			
*Ribitol				18.190	4	3.68E-04						
*Inositol	54.175	3	1.44E-04									
*Serin							17.348	3	0.003205			
*Alanin, beta-							32.030	3	6.28E-04			
*5-trans-Caffeoylquinic acid	46.265	3	2.26E-04									
*3-cis-Caffeoylquinic acid	56.411	3	1.29E-04									
*Phenyl-..? RI 2824	61.049	3	1.03E-04							7.429	4	0.005424
*Quercitrin										11.100	4	0.001179
*Phenyl-..? RI 1570										20.493	4	8.26E-05
*Lumichrom										12.914	4	6.33E-04

**Tab.3.3.2.1: ANOVA zwischen 3 bzw. 4 Diversitätsgruppen (1-4/8/16/60) vergleichend für die untersuchten Arten von 2008 (GC/MS Daten).** Rote Zahlen symbolisieren signifikante Unterschiede (p-Wert<0.01; Fisher- Verteilung) des Metaboliten zwischen den getesteten Diversitätsniveaus. Medicago zeigte keine signifikanten Unterschiede.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Weiterhin wurde mittels T-Test versucht, metabolische Unterschiede zwischen Wenig- Arten- Plots und Viel- Arten- Plots herauszufiltern (Abb. 3.3.2.5). Für die Arten Bellis (A), Leontodon (B) und Lotus (C), die Diversitätsgradienten in den Metabolitprofilen aufwiesen, wurden einige signifikante Unterschiede zwischen Plots mit geringer Diversität und Plots mit hoher Diversität gefunden. In den Viel- Arten- Plots waren bei alle drei Arten die organischen Säuren reduziert insbesondere bei Bellis. Weiterhin zeigten Bellis (Ausnahme: Glucose und Fructose) und Lotus reduzierte Transport- und Assimilat- Zucker, was für Leontodon nicht zutraf. Bei Leontodon dagegen waren einige Aminosäuren bei hoher Diversität im Plot reduziert.

Für Knautia und Medicago, die in den PCA- Darstellungen keine Metabolite- Korrelationen mit der Diversität zeigten, wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Wenig- Arten- Plots und Viel- Arten- Plots gefunden.



**Abb. 3.3.2.5: T-Test- Clustering zwischen Wenig- Arten- Plots (1-4) und Viel- Arten- Plots ((8)-16-60) für die Arten A: *Bellis perennis*; B: *Leontodon autumnalis* und C: *Lotus corniculatus*. Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen zweier unterschiedlicher Diversitätsgruppen.**

Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte Konzentrationen und die grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ( $\alpha=0,05$ ) durchgeführt. Die Standardisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

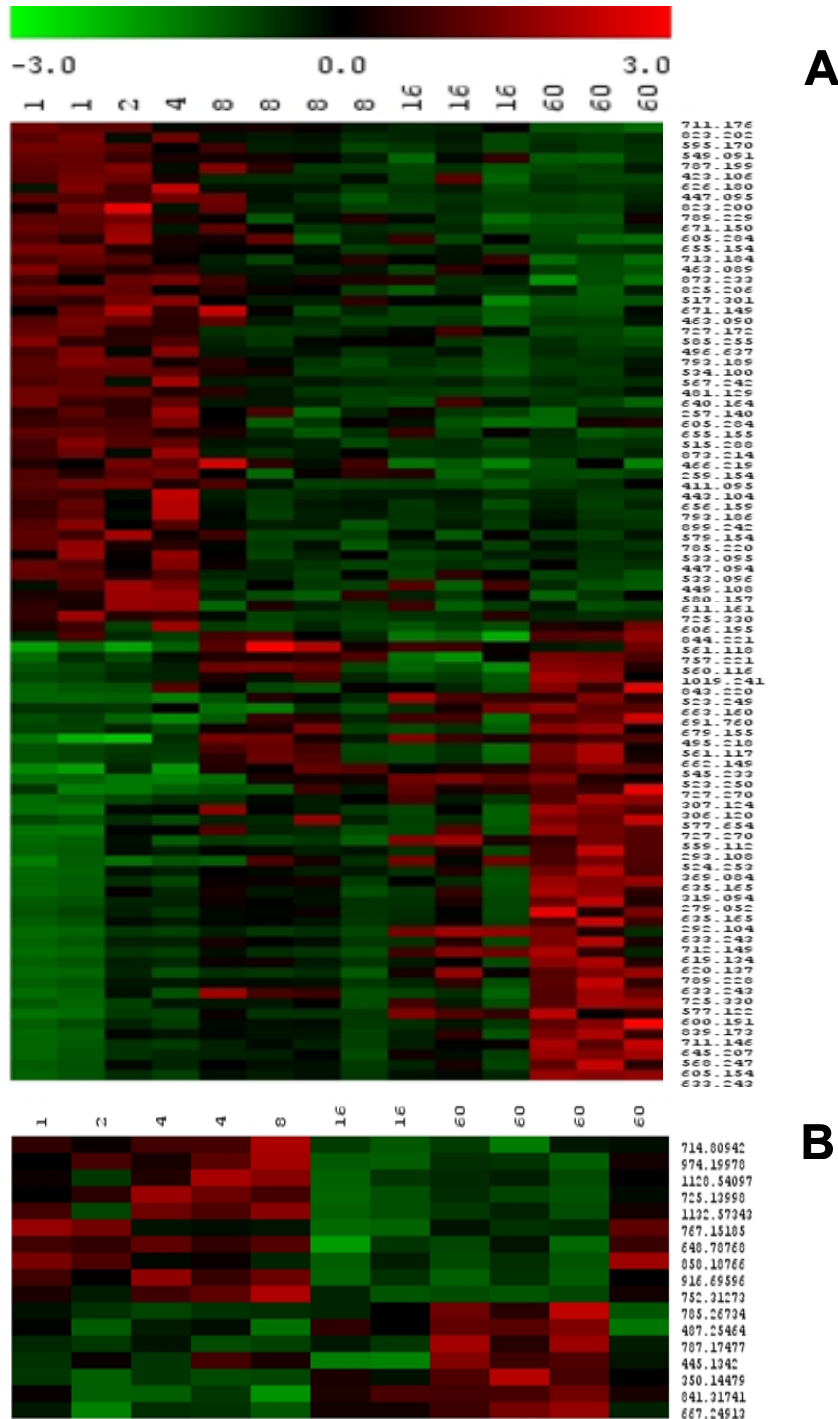
### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Die LC-FT-MS- Messungen konnten nur für die Arten *Knautia arvensis*, *Lotus corniculatus* und *Medicago varia* durchgeführt werden. Dabei ergab die Analyse der Daten für Knautia und Medicago keine signifikante Einflussnahme durch einen der vier untersuchten Faktoren. Für Lotus dagegen konnte, wie bereits in der PCA- Analyse beschrieben, der Faktor Diversität als Einflussgröße dargestellt werden.

In einer Varianzanalyse der LC/MS Daten konnten für Lotus und Medicago signifikant veränderte Metabolite zwischen unterschiedlichen Diversitätsniveaus gefunden werden, allerdings wurden für Lotus deutlich mehr signifikant veränderte Metabolite gefunden. Abb.3.3.2.6 zeigt zwei ANOVA- Auswertungen, worin alle signifikant veränderte Metabolite für Lotus (Teil A) und für Medicago (Teil B) abgebildet sind. Gleichzeitig sind Metabolitänderungen farbcodiert und mittels Clustering dargestellt, so dass Metabolite mit ähnlichem Verhalten gruppieren. Für die Varianzanalyse wurden die Plots mit unterschiedlicher Artenzahl (1/2/4/8/16/60) in 4 Diversitätsgruppen eingeteilt. Mit Hilfe des Fisher- Test konnte nach signifikanten Unterschieden im Metabolitniveau zwischen den Gruppen getestet werden. Die Analyse der unterschiedlichen Diversitätsniveaus ergab für Lotus 94 signifikant veränderte Metabolite, wohingegen für Medicago nur 17 signifikant veränderte Metabolite registriert wurden. Anhand der Farbcodierung sind für beide Arten Metabolitgradienten zu erkennen, die von geringer Diversität zu hoher Diversität relativ zunehmen oder sich konträr verhalten. Die dargestellten potentiellen Metabolite sind nur anhand ihrer exakten Masse charakterisiert (rechte Seite der Abbildung), weitere Spezifikationen bzw. eine Annotation wurde mittels Datenbanksuche versucht (Tab.3.3.2.2).



### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.3.2.6: ANOVA mit integriertem Clustering, A: *Lotus corniculatus* B: *Medicago varia*; Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolitkonzentrationen unterschiedlicher Diversitätsgruppen.**

Plots mit unterschiedlicher Artenanzahl sind oben in der Abbildung mit den entsprechenden Zahlen dargestellt. Die gemessenen Metabolite sind mit der exakten Masse auf der rechten Seite der Darstellung abgebildet. Der Signifikanztest wurde mit der Fisher-Verteilung und einem kritischen p-Wert von 0,01 durchgeführt. Die rote Farbcodierung zeigt erhöhte Konzentrationen und die grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen an. Die Standardisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Nachfolgend wurden nur die Ergebnisse der Varianzanalyse von Lotus näher untersucht, da die Korrelationen zwischen Metaboliten und der Diversität signifikanter waren als bei Medicago. Die 94 gefundenen signifikant veränderten Metabolite aus der ANOVA wurden auf deterministische Abhängigkeiten mit der Diversität durch eine Regressionsanalyse getestet, die stringentesten Korrelationen sind in Tab.3.3.2.2 dargestellt. Außerdem wurden für diese signifikant- korrelierenden m/z beispielhaft mögliche Summenformeln berechnet, so dass eine nachträgliche Bestimmung möglich ist. Erschwert wird eine eindeutige Identifizierung der gemessenen m/z dadurch, dass bei höheren Molekülmassen mehrere Summenformeln kalkuliert werden können. Für vier von sieben dargestellten Massen zu Ladungsverhältnissen wurden mehrere Summenformeln kalkuliert, wodurch diese nicht weiter eingrenzend bestimmt werden konnten. Für die Massen 823.199 und 711.1457 konnte keine Summenformel generiert werden. Beispielsweise erzielte die Masse 711.1763 mehrere Einträge in verschiedenen Datenbanken. In der Metabolomics.JP- Datenbank (nicht dargestellt), die spezifisch für Sekundärmetabolite aus Leguminosen ist, wurden drei Isomere (m/z 711.1763) gefunden: 1. Succinylcyanin; 2. Peonidin 3-(6'-malonylglucoside)-5-glucoside; 3. Delphinidin 3,5-di(6-acetylglucoside) (Stoffgruppe der Anthocyane). Auch wenn eine nähere Bestimmung aller gemessenen Massen nicht möglich war, konnten viele m/z bis auf verwandte Stoffgruppen einschränkend bestimmt werden. Alle ausgewerteten Massen zu Ladungsverhältnissen konnten den verschiedenen Stoffklassen der Flavonoide zugeordnet werden. Für detaillierte Identifikationen müssen die gefundenen m/z in weiteren MS-MS-Experimenten oder durch das Vermessen von Referenzen näher bestimmt werden.

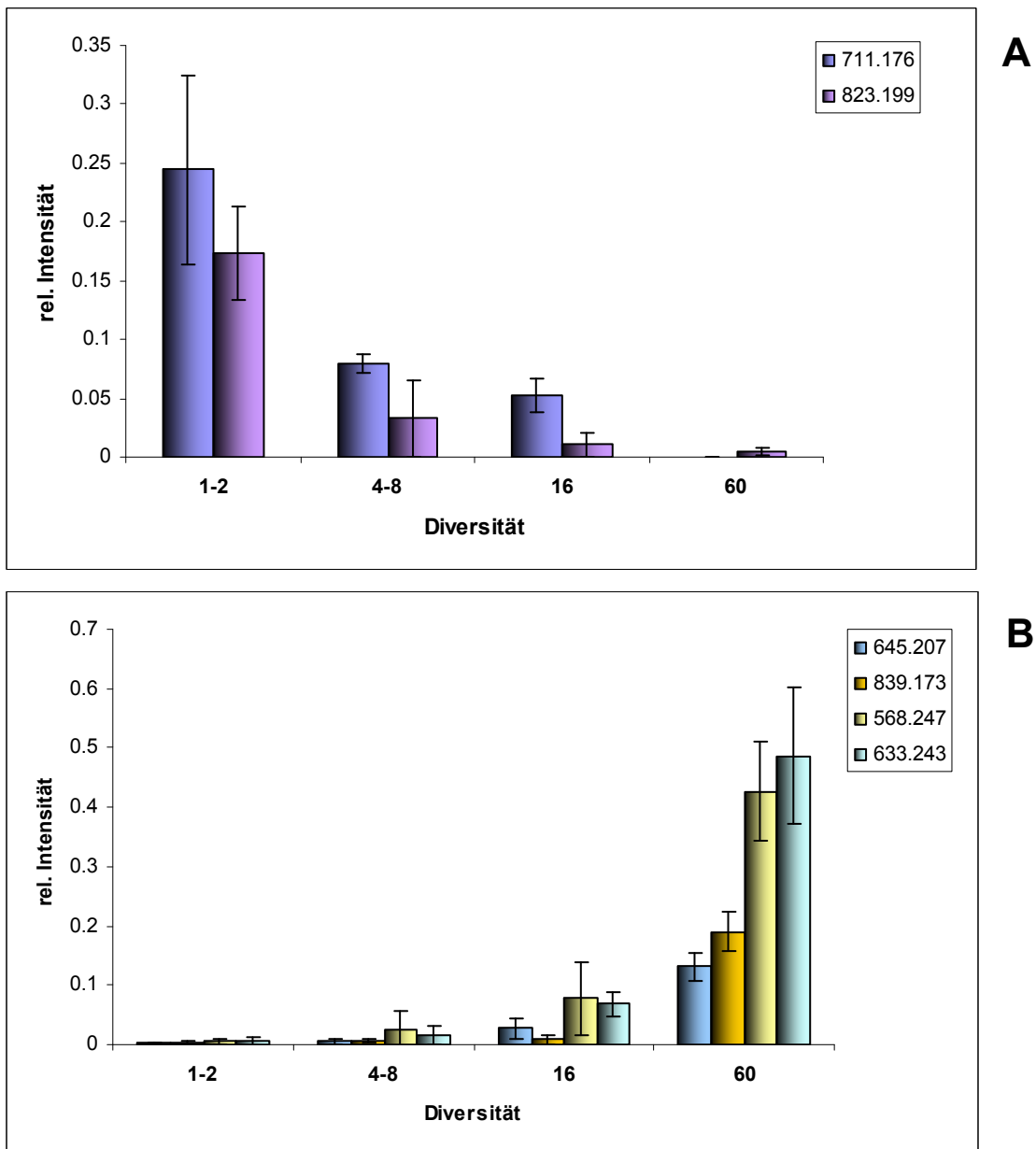
Zur besseren Veranschaulichung sind sechs signifikant- korrelierende Massen aus Tab.3.3.2.2 in Abb.3.3.3.6 dargestellt, dabei zeigt Teil A negativ und Teil B positiv korrelierte m/z zur Diversität. Dargestellt sind die Mittelwerte der Massen aus Artenplots mit gleicher Diversitätsstruktur.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Metabolite		ANOVA			Korrelation	Berechnete Formeln (Zppm)		Datenbankvorschläge							
mode	m/z	Zeit	F	Gruppen	p-Wert	R2									
neg	645,2065	8,95	69,81	4	5,22E-07	0,95	3	C8H34N2O4P2	ChemSpider ID: 93349251						
								C11H32N8O4S2	ChemSpider ID: 12932623						
								C26H44O12S3	M0089232		M0089233				
neg	568,2473	4,99	49,35	4	2,67E-06	0,92	3	C30H37N3O6S	ChemSpider ID: 414946	ChemSpider ID: 415024	ChemSpider ID: 449089	ChemSpider ID: 2467031			
								C8H83N4	ChemSpider ID: 480436	ChemSpider ID: 4102285	ChemSpider ID: 4158108	ChemSpider ID: 8113623			
								C22H41N5O8S2	CO: 22862094						
neg	633,2425	9,55	60,24	4	1,05E-06	0,94	5	C26H40N4O12S	ChemSpider ID: 439803						
								C8H36N2O6S	ChemSpider ID: 2896668	ChemSpider ID: 2814914	ChemSpider ID: 3307421	ChemSpider ID: 3333638			
								C36H41O6PS	ChemSpider ID: 9257879						
								C25H46O14P2	ChemSpider ID: 9942089						
								C42H35N3OP	ChemSpider ID: 9073105						
pos	711,1763	9,04	24,79	4	6,01E-05	0,99	4	C11H35O19	ChemSpider ID: 8625308	ChemSpider ID: 8946383	ChemSpider ID: 9825322	KNUpSack ID: C00004425			
								C37H34N4O5S3	ChemSpider ID: 3649944	ChemSpider ID: 5113057	ChemSpider ID: 12848863	ChemSpider ID: 12848928			
								C44H26N2O8	ChemSpider ID: 9322048						
								C36H30N4O10S	ChemSpider ID: 8050705						
neg	839,1729	8,54	112,44	4	5,29E-08	0,93	1	C46H34N2O10S2	ChemSpider ID: 9073421						
neg	711,1457	5,38	9,09	4	0,00332	0,72	x								
neg	823,1989	9,56	22,81	4	3,32E-05	0,75	x								

**Tab.3.3.2.2: Metabolite (m/z) von *Lotus corniculatus* mit stringenter Korrelation zur Diversität; Signifikanztest via ANOVA (Fisher-Verteilung) zwischen den Diversitätsgruppen 1-2/4-8/16/60. Mit Hilfe der exakten Masse und einer Toleranz von 2ppm wurden Summenformeln generiert, wobei mehrere Varianten möglich sind.**

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch



**Abb.3.3.2.6: Korrelationen von repräsentativen Massen ( $m/z$ ) mit der Diversität für *Lotus corniculatus* (A= negative Korrelation und B= positive Korrelation mit der Diversität). Dargestellt sind die Mittelwerte von  $m/z$  für Artenplots mit gleicher Diversitätsstruktur; für jedes Diversitätsniveau standen 3-4 biologische Replika also äquivalente Plots zur Verfügung.**

#### **3.4 Diskussion**

In dieser Studie wurde der Einfluss von biotischen Interaktionen auf den metabolischen Zustand von Freilandpflanzen getestet. Demzufolge wurde untersucht, wieweit sich der metabolische Phänotyp von Pflanzen ändert, wenn sie graduell unterschiedlichen Konkurrenzbedingungen ausgesetzt sind. Durch sich ändernde pflanzliche Interaktionsmuster werden physiologische Adaptationen stimuliert, was letztendlich die phänotypische Ausprägung beeinflusst. Verglichen wurde dabei die phänotypische Plastizität von konkurrenzschwachen kleinen Pflanzen gegenüber konkurrenzstarken großen Pflanzen. Die zu testende Hypothese war: Wie schaffen es kleine konkurrenzschwache Kräuter unter dominanten Arten zu existieren?

Konkurrenzbeziehungen zwischen Organismen sind ubiquitär verbreitet und modellieren Ökosysteme. Konkurrenz zwischen Pflanzen entsteht als Folge gemeinsamer Ressourcenausbeutung oder durch Interferenz mit Individuen einer anderen Art. Konkurrenzbedingte Interferenzen führen zu einer Verminderung der Fruchtbarkeit, der Überlebensfähigkeit oder des Wachstums, und münden in eine Auskonkurrierung von Arten aus ihren optimalen Standorten (53). Aus diesen Überlegungen resultiert eine der klassischen ungelösten Fragen in der Ökologie: Wie kann eine Anzahl von Pflanzenarten nebeneinander auf engem Raum koexistieren?

Erklärt wurde die Koexistenz lange mit der Nischendifferenzierung. Demzufolge ist der Ressourcenbedarf der einzelnen Arten qualitativ nicht identisch, wodurch die Pflanzen wenigstens teilweise der Konkurrenz ausweichen (Konkurrenzausschlussprinzip) (65). Da Pflanzen an einem gegebenen Standort aber auf die gleichen Ressourcen wie Bodennährstoffe, Wasser und Licht angewiesen sind, wird das Nischenkonzept neuerdings auf räumliche und zeitliche Differenzierung der Lebensaktivität ausgedehnt (66). Wird in ein erweitertes Nischenkonzept auch die Widerstandsfähigkeit gegen Pathogene und Herbivore, oder sogar differenzielle mutualistische Beziehungen mit Mykorrhizapilzen und Bestäubern eingeschlossen, dann wird die Nische zum Synonym für die Summe aller Eigenschaften einer Pflanze (67,68). Durch N<sub>2</sub>-fixierende Leguminosen kommt es insbesondere in heterogenen Artenmischungen zu positiven Komplementaritätseffekten, wodurch auch konkurrenzschwächere Arten in der Lage sind knappe Ressourcen zu nutzen (58,69). Andererseits werden in stabilen Systemen ohne Störungen konkurrenzstarke Arten über längere Perioden dominant gegenüber konkurrenzschwachen Arten (53).

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Bezüglich der oben genannten Fragestellung wurden 2 unabhängige Metabolomics- Studien von 2006 und von 2008 analysiert und verglichen. Die Metabolitprofile der analysierten Arten wurden dabei nach potentiellen Einflussfaktoren untersucht (Kap.3.3). In Metabolomics-Studien ist die Hauptkomponentenanalyse eine häufig angewandte Methode zur Dimensionsreduktion und Mustererkennung von hochdimensionalen Datensätzen. Hochdimensionale Merkmalsräume entstehen durch die große Anzahl der gemessenen Metabolite als Variablen, die in einen niedrigdimensionalen Unterraum transformiert werden. Die sogenannten Hauptkomponenten, welche aus Linearkombinationen der ursprünglichen Matrixelemente gebildet werden, beinhalten dabei die Gesamtvarianz des Datensatzes. Die größte Varianz des Datensatzes ist jeweils auf der ersten Hauptkomponente lokalisiert, für alle nach geordneten Hauptkomponenten nimmt die Varianz zwingend ab. Bei ausreichend repräsentativen Daten und linearen Zusammenhängen können die Hauptkomponenten häufig interpretiert werden (13). Aus diesen Überlegungen heraus wurde der Versuch unternommen, Muster bzw. Einflussfaktoren in den Metabolitprofilen zu erkennen und zu charakterisieren. Ergänzend wurden auch Varianzanalysen durchgeführt, um die Einflusswahrscheinlichkeit aller untersuchten Faktoren abschätzen zu können.

Überraschenderweise hatten Tageszeit oder die funktionellen Gruppen der Gräser sowie der großen Kräuter keinen Einfluss auf die Metabolitprofile der untersuchten Arten für die Studie von 2006 und 2008. Diurnale Metabolite- Fluktuationen wie bei Gibon *et al.* (70) und Weckwerth *et al.* (7) wurden auch in unserem Freilandversuch erwartet, konnten aber kaum festgestellt werden. Als problematisch erwies sich für unsere Untersuchung die zeitliche Auflösung der Probenahme, die wesentlich schneller und homogener hätte durchgeführt werden müssen, um tageszeitliche Schwankungen messen zu können. Von ökologischem Interesse ist die Tatsache, dass die Gruppe der Gräser und die Gruppe der großen Kräuter in dieser Studie als funktionelle Gruppe keinen direkten Einfluss auf die untersuchten Arten aufwiesen. Auch konnte keine Suppression der dominanten Gräser auf die kleinen Kräuter festgestellt werden. Allerdings erhöhten alle funktionellen Gruppen durch ihre Präsenz das Diversitätsniveau in den Artenplots, und übten folglich Konkurrenzdruck auf andere Arten aus, welcher aber als funktionale Einheit nicht hervortrat. Der Nicht- Einfluss der Gräser wirkt vordergründig überraschend, da *Arrhenatherum elatius* die dominierende Art im mitteleuropäischen Grassland ist (50) und viel Biomasse trotz hohem Konkurrenzdruck produzieren kann (71). Die funktionelle Gruppe der Gräser war in diesem Experiment sehr divers aufgegliedert. Demzufolge bestand die Gruppe aus dominanten und weniger dominanten Grasarten, weshalb der starke Konkurrenzdruck den *Arrhenatherum elatius* ausübt, nicht charakteristisch für die gesamte funktionelle Einheit ist.

#### **3.4.1 Metabolite Profiling 2006**

Aus den Daten von 2006 konnte die wesentliche Indikation gewonnen werden, dass jede untersuchte Art ein sehr charakteristisches Metabolitprofil aufweist (Abb.3.3.1.1). Gleichwohl für die Co-Varianz- Analyse nur 60 gemeinsame Metabolite der fünf Arten zur Verfügung standen, tritt eine deutliche Separierung der kleinen Kräuter auf. Zudem erzeugen spezifischen Substanzen jeder Art sehr individuelle Chromatogramme. Diese Feststellung ist natürlich nicht überraschend, da mit Metabolite Profiling- Methoden sogar Unterschiede zwischen Ökotypen (72) und Populationen (73) der gleichen Art sichtbar werden.

Der wesentlichste Einflussfaktor, der 2006 in allen untersuchten Arten gefunden wurde, war der Leguminosen- Effekt. Das Design des Jena Experimentes beinhaltet Versuchsplots mit und ohne Leguminosen, wobei die Anzahl der Leguminosenarten von 1-12 variiert. Es konnte festgestellt werden, dass Pflanzen die in Artenplots mit Leguminosen wuchsen, deutlich veränderte Metabolitprofile aufwiesen als Pflanzen die in Artenplots ohne Leguminosen wuchsen (Abb.3.3.1.2). Das heißt, die metabolische Komposition benachbarter Pflanzen wurde durch die Leguminosenanwesenheit stark beeinflusst, und äußerte sich in einem signifikant veränderten metabolischen Phänotyp. Der Leguminosen- Effekt ist deutlich in den Metabolitdaten von *Bellis perennis* determiniert, was durch die ersten drei Komponenten der PCA sichtbar wird und 77% der Gesamtvarianz der Daten ausdrückt. In vielen Studien wurde gezeigt, dass stickstofffixierende Leguminosen mit benachbarten Pflanzen interagieren (58,59,74). Die Bedeutung des Stickstoffeintrags der Leguminosen im Jena Experiment nahm mit der Zeit zu, da kontinuierlich Nährstoffe aus dem Versuchsfeld aufgrund des Mähens eliminiert wurden. Leguminosen sind in der Lage durch ihre komplementäre Stickstoffzufuhr, die Bodenstickstoffversorgung zu erhöhen, und dadurch positiv mit benachbarten Pflanzen zu interagieren (49,75). Den Stickstofftransfer von Leguminosen auf benachbarte Pflanzen demonstrierten Spehn *et al.* (58). Mit Hilfe von Biomassedaten und stabilen Stickstoffisotopen wiesen sie erhöhten Stickstoffgehalt im Gewebe bei Pflanzen nach, die mit Leguminosen wuchsen.

Anhand einer Varianzanalyse wurden bei *Bellis perennis* stoffwechselrelevante Metabolite identifiziert, die durch den Leguminosen- Einfluss signifikante Veränderungen aufwiesen. Pflanzen die mit Leguminosen wuchsen, zeigten signifikant reduzierte organische Säuren aus dem Citrat- Zyklus sowie signifikante Abnahmen von einigen Zuckern und Zuckerphosphaten. Signifikante Zunahmen wiesen dagegen vor allem „major“ Aminosäuren wie Asp, Asn und Ser, die direkt aus Intermediaten des primären Kohlenstoffmetabolismus synthetisiert werden (76). Ebenfalls signifikante Zunahmen zeigten „minor“ Aminosäuren des

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Shikimat- Stoffwechselweg wie Phe, Tyr und Trp, die die Verbindung zum Sekundärmetabolismus herstellen (76). Zusätzlich konnten Vorstufen aus dem Sekundärmetabolismus identifiziert werden, die signifikant reduziert waren. Im Kontext dazu zeigten Fritz *et al.* (77) einen Zusammenhang zwischen einem Nitrat- Defizit und einer Stimulation des Phenylpropanoid- Stoffwechsels.

Vor allem die erhöhten Aminosäure- Werte und die reduzierten Intermediate aus dem Citrat- Zyklus deuten auf eine bessere Stickstoffversorgung der in Leguminosen- Plots gewachsenen Pflanzen hin. Zusätzlicher Stickstoff kann über Intermediate aus dem Citrat- Zyklus in Aminosäuren und Proteinen inkorporiert werden (76,78). Stickstoff ist der wichtigste anorganische Nährstoff für Pflanzen und Hauptbestandteil von Proteinen, Nukleinsäuren, Co-Faktoren und Sekundärmetaboliten (79), der alle Ebenen (Metabolismus, Ressourcen- Allokation, Wachstum und Entwicklung) von Pflanzenfunktionen beeinflusst (79,80). Scheible *et al.* (81) zeigten anhand von Transkriptions- und Metabolitprofilen an Arabidopsis- Keimlingen, dass nach  $\text{NO}_3^-$ -Zugabe unter anderem Gene aus der Aminosäure- Synthese und aus dem Phenylpropanoid- Stoffwechsel gesteigerte Aktivität aufwiesen sowie einen Anstieg des Gehalts an „major“ Aminosäuren.

In Pflanzen sind Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus eng miteinander verknüpft. Pflanzen müssen eine Balance zwischen Assimilation, Akkumulation und Wachstum finden. Dabei wird Saccharose von „Source“- zu „Sink“- Organen transportiert und dient beispielsweise für die Aminosäuresynthese. Ist die Produktion von Assimilaten (Source- Aktivität) größer als der Verbrauch durch das Wachstum (Sink- Aktivität), akkumuliert die Differenz in Form von Kohlenhydraten. Daraus folgt: geringe Kohlenhydrat- Konzentrationen können „Source“- Limitierung andeuten (C-Limitierung), hohe Kohlenhydrat- Konzentrationen dagegen weisen auf „Sink“- Limitierung hin (geringer C-Verbrauch), was wiederum auf eine Stickstoff- Limitation hindeutet (82). Daraus lässt sich schließen, dass der photosynthetische Kohlenstofffluss in Blättern in zwei konkurrierenden Reaktionen alterniert: Zum einen in die Saccharose- Synthese, zum anderen in den Citrat- Zyklus. Beide Reaktionen werden von invers aktiven Enzymen gesteuert (Saccharose-P- Synthase und PEP-Carboxylase)(79). Eine hohe PEP-Carboxylase- Aktivität beansprucht anaplerotische Intermediate aus dem Citrat- Zyklus, die wiederum für die Stickstoffassimilation genutzt werden können (79).

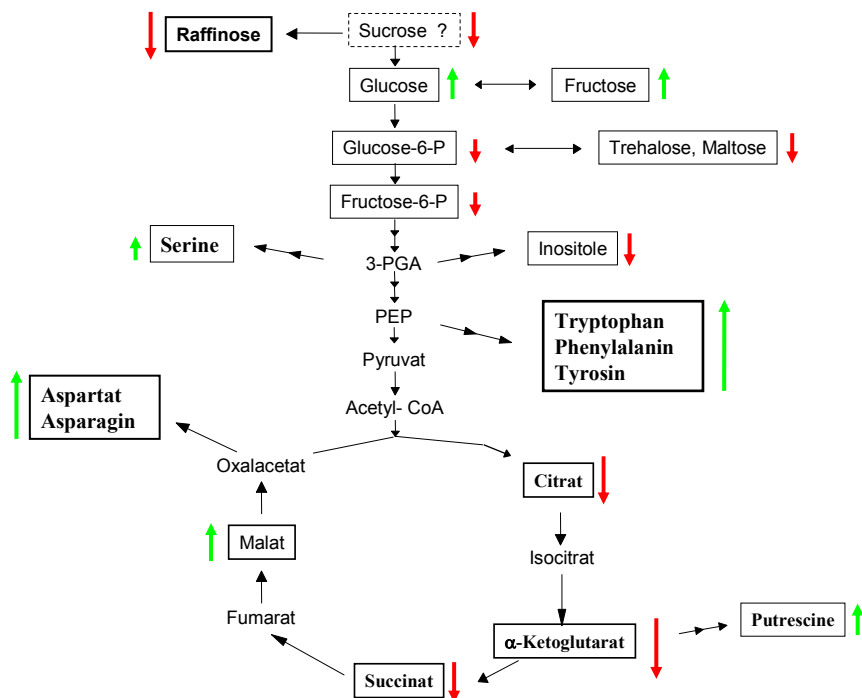
Das Szenario einer erhöhten Aktivität des Citrat- Zyklus aufgrund einer besseren Stickstoffversorgung könnte für die kleinen Kräuter insbesondere für *Bellis perennis* zutreffen, da Pflanzen die mit Leguminosen wuchsen, reduzierte Mengen an verschiedenen Kohlenhydraten (insbesondere des Transportzuckers Raffinose) und reduzierte TCA- Intermediate aufgewiesen haben. Bei Saccharose konnte ein ähnlicher Trend in den Metabolitprofilen registriert werden. Allerdings war die Optimierung der GC/MS nicht auf diesen, mit hohem Gehalt vorkommenden, Transportzucker ausgerichtet, so dass eine



### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

verlässliche Aussage nicht möglich ist. Dassler *et al.* (83) fanden für *Veronica chamaedrys* im Jena Experiment 2004 geringere Kohlenhydrat- Konzentrationen, wenn die Pflanzen in Leguminosen- Plots wuchsen, wobei der Stickstoffgehalt der Blätter negativ korrelierte.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein Modell des Primärmetabolismus in Abb.3.4.1 skizziert, welches die stoffwechselrelevanten Veränderungen durch Leguminosen- Einfluss bei den kleinen Kräutern darstellt. Durch den zusätzlichen Stickstoffeintrag der Leguminosen kommt es zu einer gesteigerten Aminosäuresynthese und wahrscheinlich auch zu einer gesteigerten Proteinsynthese. Für die gesteigerte Aminosäuresynthese werden Intermediate aus dem Citrat- Zyklus und vermehrt auch Assimilate (Transportzucker) aus der Photosynthese verwendet. Die erhöhten Malat- Konzentrationen lassen sich anhand eines pH- Stabilisierungsprozess erklären, wobei Malat, aufgrund einer gesteigerten Nitrat- Aufnahme, vermehrt in der Vakuole gespeichert wird (79). Nicht in das Schema passen die erhöhten Glucose- und Fructose- Konzentrationen.



**Abb.3.4.1: Modell des veränderten Primärmetabolismus der kleinen Kräuter durch Leguminosen- Einfluss.** Die Pfeile symbolisieren relative Zu- oder Abnahmen von Metabolitkonzentrationen.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Der Leguminosen- Effekt konnte auch bei den anderen kleinen Kräutern *Prunella vulgaris*, *Glechoma hederacea*, *Leontodon autumnalis* und *Veronica chamaedrys* nachgewiesen werden (Abb.3.3.1.4). Allerdings ist der Leguminosen- Einfluss gegenüber *Bellis perennis* deutlich abgeschwächt in den Metabolitdaten determiniert, was am Grad der Separierung der Pflanzen (+/- Leguminosen im Artenplot) in den PCA-Plots sichtbar wird. Auch die Gegenüberstellung von relevanten Metaboliten der fünf kleinen Kräuter (Tab.3.3.1), zeigt eine graduelle Abschwächung des Leguminosen- Effekts bei *Glechoma*, *Prunella* und *Veronica* gegenüber dem deutlichen Einfluss bei *Bellis* und *Leontodon*. Im Vergleich der fünf kleinen Kräuter zeigt *Bellis perennis* die stärkste Resonanz auf den Leguminosen- Einfluss.

Dassler *et al.* (83) zeigten für *Veronica chamaedrys* im Jena Experiment für das Jahr 2004 einen Anstieg an Gesamtstickstoff im Blatt, wenn die Pflanzen mit Leguminosen im Plots wuchsen. Dieser Effekt war für *Veronica* anhand von Metabolitprofilen im Jahr 2006 nur noch schwach feststellbar, was auf veränderte Interaktionen zwischen den Arten bzw. auf fortschreitende Sukzession hindeutet. Auch in der Studie von Dassler *et al.* (83) reagierten die untersuchten kleinen Kräuter unterschiedlich auf das zusätzliche Stickstoffangebot. Im Gegensatz zu *Veronica chamaedrys* offenbarte *Plantago media* keine Resonanz in Bezug auf die Leguminosen, weder im Stickstoff- noch im Kohlenhydratgehalt.

Für die Untersuchungsjahre 2003/2004 konnten Temperton *et al.* (84) im Jena Experiment ebenfalls einen Leguminosen- Effekt bei den Kräutern *Plantago lanceolata* und *Knautia arvensis*, dem Gras *Festuca pratensis* und einen negativen Effekt bei der Leguminose *Trifolium pratense* nachweisen. Dabei zeigten die untersuchten Arten auch hier unterschiedliche Resonanzmuster auf die Interaktion mit den Leguminosen, wobei *Festuca pratensis* am stärksten von dem zusätzlichen Stickstoffangebot profitierte. Mit Hilfe stabiler Isotopenmessungen wiesen Temperton *et al.* (84) bei drei Arten einen erhöhten Stickstoffgehalt im Gewebe nach, sofern sie mit Leguminosen im Plot wuchsen. Sie interpretierten ihre Ergebnisse nicht mit einem direkten Stickstofftransfer, sondern führten die bessere Stickstoffversorgung der Pflanzen auf eine geringere N-Konkurrenz zurück. Diese positive Interaktion wird dadurch erzeugt, dass die sehr stickstoffhaltigen Leguminosen nach ihrem Absterben mineralisieren und den Boden mit Stickstoff anreichern. Somit können auch benachbarte Pflanzen von dem zusätzlichen N-Eintrag profitieren (85). Alternativ besteht die Möglichkeit des direkten Stickstofftransfers über Wurzelexudate und Mykorrhiza-Verknüpfungen verschiedener Pflanzen (86,87). Der Nutzen, welcher sich den Nachbarpflanzen durch stickstofffixierende Leguminosen ergeben kann, hängt zum einen von der Fixierungskapazität der verschiedenen Leguminosenarten ab, zum anderen von artspezifischen Aufnahmekapazitäten der benachbarten Pflanzen (84). Natürlich können Leguminosen auch negativen Einfluss auf ihre Nachbarpflanzen ausüben, indem sie mit ihnen um Ressourcen konkurrieren (54), wodurch sich negative Interaktionen mit anderen

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Leguminosenarten bei Temperton *et al.* (84) erklären lassen. Leguminosen beeinflussen die N-Dynamik in Grassland- Ökosystemen entscheidend (87), deshalb wird ihnen eine Schlüsselrolle in Ökosystemprozessen, wie der Strukturierung von Lebensgemeinschaften, zugestanden (58,88).

Neben dem sehr dominanten Leguminosen- Effekt der für die kleinen Kräuter im Untersuchungsjahr 2006 registriert wurde, konnte für *Leontodon autumnalis* ein weiterer Effekt in den Daten determiniert werden – der Diversitätseffekt. Der Einfluss der Diversität auf die Metabolitkomposition von *Leontodon* wird in der PCA in Abb.3.3.1.5 sichtbar. Die 2. und 3. Komponente der PCA (25% der Gesamtvarianz werden erklärt) stellen einen Gradienten von *Leontodon*- Plots mit geringer Diversität (0) zu hoher Diversität (60) heraus. Das bedeutet, dass unterschiedliche Konkurrenzbedingungen im Metabolitprofil einer Pflanze sichtbar werden können. Generell scheint eine starke Konkurrenzsituation für *Leontodon* zu bestehen, da diese Art im Jahr 2006 fast vollständig aus den 60 Arten-Mischungen auskonkurriert wurde. Das gesteigerte Konkurrenzniveau in den Plots mit 8 – 60 Arten führt zu veränderten Metabolitkonzentrationen im Vergleich zu den Plots mit wenig Arten (0 – 4). Diese Veränderungen waren aber nur für 7 Metabolite nachweisbar und zudem schwach signifikant (nicht dargestellt). Die geringe statistische Aussagekraft bzgl. des Einflusses der Diversität auf die Metabolitkonzentrationen von *Leontodon* im Untersuchungsjahr 2006, lag zum einem an der geringen Anzahl von biologischen Replika, zum anderem aber auch an dem dominanten Leguminosen- Einfluss, der die Korrelationen mit der Diversität stark überlagerte. Aufgrund dieser Problematik folgt eine umfassende Erörterung des Diversitätseffekts im anschließenden Kapitel, da für das Untersuchungsjahr 2008 die Daten wesentlich aussagekräftiger waren.

#### **3.4.2 Metabolite Profiling 2008**

In der Untersuchung von 2008 wurde der Versuch unternommen, den Leguminosen- Effekt bei den kleinen Kräutern *Leontodon autumnalis* und *Bellis perennis* von 2006 zu verifizieren. Interessanterweise war der Leguminosen- Einfluss 2008 nicht mehr nachweisbar, obwohl er 2006 der wesentlichste Einflussfaktor in den Daten gewesen ist. Eine wahrscheinliche Erklärung für den Nicht- Einfluss der Leguminosen für 2008 ist der Einbruch der Leguminosen- Abundanzen in den Artenplots. 2008 enthielten die Pflanzengemeinschaften

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

deutlich weniger Leguminosenpflanzen, wodurch sich offensichtlich die Effekte auf die Nachbarpflanzen verringerten bzw. nicht mehr nachweisbar waren.

Anstatt dessen wurde in der Untersuchung von 2008 (in Analogie zu 2006 für *Leontodon*) für die kleinen Kräuter *Leontodon autumnalis* und *Bellis perennis* sowie für die Leguminose *Lotus corniculatus* ein Diversitätsgradient in den Metabolitprofilen festgestellt. Der Diversitätsgradient, der in den Hauptkomponentenanalysen für die erwähnten Arten gefunden wurde, war der einzige jedoch dominante Einflussfaktor der 2008 in den Metabolitdaten identifiziert werden konnte. Im Vergleich zum Untersuchungsjahr 2006 war die Einflusswahrscheinlichkeit der Diversität auf die Metabolitkomposition der drei Arten 2008 wesentlich deutlicher, so dass jeweils mehr als 50% der Varianz der Daten mit den ersten beiden Komponenten der PCA (die den Diversitätsgradienten aufspannen) erklärt werden können. Für das Untersuchungsjahr 2008 ändern sich die Interaktionsmuster für die kleinen Kräuter vollständig, die Leguminosen- Förderung von 2006 entfällt, anstelle dessen tritt gesteigerter Konkurrenzdruck in den Viel- Arten- Mischungen auf. Die Zunahme des Konkurrenzdruckes wird besonders am Beispiel von *Leontodon* deutlich. 2006 wurden nur schwach signifikante Metabolite- Diversität- Korrelationen des Primärmetabolismus festgestellt (Abb.3.3.1.6), 2008 hingegen waren die Korrelationen stark signifikant (Tab.3.3.2). Ein weiterer Hinweis für den gestiegenen Konkurrenzdruck in den Viel- Arten- Mischungen für die kleinen Kräuter zeigt die vollständige Auskonkurrierung von *Leontodon* 2008 in den 60 Artenmischungen (Roscher, nicht veröffentlicht). Das heißt, die Vegetationsmuster in den Viel- Arten- Mischungen scheinen sich im Verlauf der Jahre sukzessiv zu ändern, indem einige konkurrenzschwache Arten von dominanten Arten langsam verdrängt werden. Im Gegensatz zum Leguminosen- Effekt sind die metabolischen Veränderungen, die durch den Einflussfaktor Diversität bei den kleinen Arten hervorgerufen werden, auf wenige Metabolite des Primärmetabolismus beschränkt (Tab.3.3.2.1). Durch den gestiegenen Konkurrenzdruck bei den kleinen Arten wird kein metabolischer Phänotyp induziert, sondern es ändern sich artspezifisch einige Substanzen in ihrem Gehalt. Für die Metabolite des Sekundärmetabolismus ergibt sich ein völlig anders Bild, welches später am Beispiel von *Lotus* diskutiert wird.

Als Gegenüberstellung zu den kleinen Kräutern *Bellis perennis* und *Leontodon autumnalis* wurde das große und konkurrenzstarke Kraut *Knautia arvensis* in die Untersuchung 2008 aufgenommen. Als ein Vorteil für die Einbeziehung dieser Art in die Untersuchung erwies sich das Vorkommen von *Knautia* in fast allen Plots, somit würde sich über mögliche Resultate statistisch besser argumentieren lassen. Überraschenderweise wurde für *Knautia* kein Einflussfaktor in den Metabolitprofilen identifiziert, sowohl für die Metabolite des Primärmetabolismus (GC/MS Daten) als auch für die Metabolite des Sekundärmetabolismus

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

(LC/MS Daten) fanden sich keine relevanten Zusammenhänge (Abb.3.3.2.2). Die Ausnahme bildeten 2 Korrelationen in den GC/MS Daten (Tab.3.3.2.1), die aber kaum Einfluss auf das PCA- Muster hatten (geringe Loadings), und somit als Artefakte interpretiert werden können. Die „Nicht- Beeinflussung“ des Metabolismus von *Knautia* durch den Diversitätsfaktor ist ökologisch durchaus relevant, da *Knautia* im Vergleich zu *Bellis* oder *Leontodon* offenbar keinen Konkurrenzdruck in den Viel- Arten- Mischungen unterliegt. Der Unterschied zu *Bellis* oder *Leontodon* liegt in der Größe von *Knautia*, wodurch die Konkurrenzfähigkeit gegenüber anderen Arten steigt.

Aufgrund des ausgeprägten Leguminosen- Effekts, der 2006 bei allen untersuchten kleinen Kräutern auftrat, wurden in der Studie von 2008 zwei Leguminosen in die Analyse mit eingeschlossen. Der konkurrenzschwachen Leguminose *Lotus corniculatus* wurde eine konkurrenzstarke Leguminose *Medicago varia* gegenübergestellt. Ähnlich wie bei der Gegenüberstellung kleine Kräuter / große Kräuter wurde für die konkurrenzschwächere Leguminose *Lotus* ein Diversitätsgradient in den Metabolitprofilen gefunden, der bei *Medicago* nicht auftrat. Der Diversitätsgradient für *Lotus* manifestiert sich in den Hauptkomponentenanalysen der GC/MS Daten (Abb.3.3.2.3) und in den LC/MS Daten (Abb.3.3.2.4), dabei verändert sich die metabolische Zusammensetzung der Pflanzen mit steigender Diversität der Artenplots. Es wurden sowohl Korrelationen von Metaboliten des Primärmetabolismus (Tab.3.3.2.1) als auch Korrelationen von Metaboliten des Sekundärmetabolismus (Abb.3.3.2.6) mit der Diversität gefunden. Im Gegensatz dazu konnten für *Medicago* keine Korrelationen des Primärmetabolismus (Tab.3.3.2.1), aber einige Korrelationen des Sekundärmetabolismus (Abb.3.3.2.6) mit der Diversität identifiziert werden. Die gefundenen Korrelationen für *Medicago* waren allerdings nicht so zahlreich und stringent wie die für *Lotus*, zudem scheint deren Einfluss auf die PCA nicht dominant zu sein. Diese Aussagen führen zu der Schlussfolgerung, dass *Lotus* in Resonanz auf unterschiedliche Konkurrenzsituationen spezifische Veränderungen im Primärmetabolismus sowie universale Veränderungen im Sekundärmetabolismus realisiert. Im Gegensatz dazu zeigt *Medicago* keine Resonanz im Primärmetabolismus und wenig Resonanz im Sekundärmetabolismus auf die unterschiedlichen Konkurrenzsituationen in den verschiedenen Artenplots. Das unterschiedliche metabolische Verhalten der beiden Leguminosen in Bezug auf den Einflussfaktor Diversität weist (analog zu *Leontodon* und *Bellis*) auf erhöhten Konkurrenzdruck für *Lotus* in den Viel- Arten- Mischungen hin, wohingegen *Medicago* (analog zu *Knautia*) kaum Resonanz auf erhöhten Konkurrenzdruck zeigt. Die analysierten Metabolitprofile bestätigen die vorherige Einteilung der beiden Leguminosen in die konkurrenzschwache Art *Lotus* und die konkurrenzstarke Art *Medicago*.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Schon in der Analyse der GC/MS Daten waren einige Vorstufen des Sekundärmetabolismus von Lotus mit der Artenzahl korreliert (Tab.3.3.2.1). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden einige Arten in Bezug auf Metabolite des Sekundärmetabolismus vermessen. Leider konnten *Bellis* und *Leontodon* aus Kapazitätsgründen nicht gemessen werden. Dennoch wird am Beispiel von Lotus ersichtlich, welches Potential in der Profiling- Technik von Sekundärmetaboliten liegt. Beide Leguminosen enthielten sichtbar hohe Dichten an Flavonoiden im Chromatogramm, deutlich mehr als die routinemäßig vermessenen *Arabidopsis* Pflanzen. Giavalisco *et al.* (12) identifizierten via Direkt- Infusion in die FT-ICR- MS über 1000 biologisch relevante Analyten bei *Arabidopsis thaliana*, wohingegen die Zahl der Analyten bei Lotus und *Medicago* deutlich höher liegen dürfte. Aufgrund der größeren Kapazität der LC-FT-MS Technik ist die Anzahl der Analyten um 10fache höher gegenüber der GC/MS Analyse (ca. 100 Analyten). Dadurch konnten im Vergleich zum Primärmetabolismus wesentlich mehr Metabolite des Sekundärmetabolismus von Lotus identifiziert werden, welche signifikante Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Diversitätsniveaus aufzeigten. Die LC/MS Profiling- Technik mit ihrer exakter Massen- Bestimmung birgt viel Potential für zukünftige detailliertere Untersuchungen und offeriert die Charakterisierung neuer Metabolite bzw. Stoffwechselwege (12).

Mit Hilfe multivariater Datenanalyse konnte für die Untersuchung von 2008 ein Diversitätsgradient in den Metabolitprofilen der konkurrenzschwachen Arten *Leontodon autumnalis*, *Bellis perennis* und für *Lotus corniculatus* nachgewiesen werden. Diese Arten zeigten spezifische Resonanzen des Primärmetabolismus (Tab.3.3.2.1) und am Beispiel von Lotus, universale Resonanzen des Sekundärmetabolismus (Abb.3.3.2.6) entlang eines Artengradienten. Des Weiteren finden sich in Abb.3.3.2.5 Indizien für eine C-Limitierung dieser drei Arten, was die These einer erhöhten Beschattung konkurrenzschwacher Arten durch konkurrenzstarke Arten unterstützen würde. Durch eingeschränkte Photosynthese- Aktivität, die durch die Beschattung von Blättern verursacht werden kann, können Assimilat- und Transport- Zucker in Pflanzen reduziert sein (70,82,89), was wiederum auch die Intermediate des Citrat- Zyklus (organische Säuren) und die Aminosäuresynthese beeinflusst. Erhärtet wird die Annahme einer C-Limitierung für die konkurrenzschwachen Arten durch die Tatsache, dass für die konkurrenzstarken Arten *Knautia* und *Medicago* keine Reduktionen bei Assimilat- und Transport- Zucker in den Viel- Arten- Plots vorlagen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt E. Hettmann (nicht publiziert) in ihrer Untersuchung an kleinen Kräutern im Jena Experiment. Auch sie fand reduzierte Zuckergehalte bei den kleinen Kräutern bei erhöhtem Konkurrenzdruck in den Viel- Arten- Plots.

### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

Die Umweltbedingungen unter denen Pflanzen in einer Gemeinschaft essentielle Nährstoffe wie Wasser, Kohlendioxide, Licht und mineralische Nährstoffe akquirieren, beeinflussen die Interaktionen mit Nachbarpflanzen (83) und somit die Konkurrenzfähigkeit jeder Art. Pflanzengesellschaften mit hohem Diversitätsgrad sind in der Regel zusammengesetzt mit kleinen und großen Arten, wobei die Großen prozentual mehr Bestrahlungsdichte erhalten und dadurch dominant werden (90-92). Aus der erhöhten Lichtverfügbarkeit dieser Arten resultieren eine hohe Biomassenproduktion und ein starker Einfluss auf die Ökosystemfunktionen (90,91). In dieser Studie könnte die durch die größeren und konkurrenzstärkeren Arten hervorgerufene Beschattung, der wesentliche Grund für den Diversitätsgradienten im Metabolismus von *Leontodon*, *Bellis* und *Lotus* im Untersuchungsjahr 2008 sein. Die Reduktion der Kohlenhydrate und anderer Intermediate aus dem Primärmetabolismus bei den unter Konkurrenzdruck stehenden kleinen Arten ist eine Indikation von „Source“- Limitierung, die durch geringere Photosyntheseleistung und folglich weniger Assimilatbildung hervorgerufen wird (82). Die durch Beschattung erzeugte C-Limitierung kann zu Allokation in oberirdische Pflanzenorgane führen (93). Typische ökophysiologische und morphologische Adaptationen sind die Ausbildung von Schattenblättern und die Erhöhung der Blattfläche pro Gesamtbiomasse (LAR) (94), was von Dassler *et al.* (83) im Jena Experiment für einige kleine Kräuter mit zunehmender Diversität bestätigt wurde. Weitere morphologische Veränderungen entdeckten Thein *et al.* (95) bei kleinen Kräutern im Jena Experiment. So zeigte unter anderem insbesondere die konkurrenzschwache Art *Lotus corniculatus* geringeres Wachstum entlang eines Diversitätsgradienten. Obwohl die Lichtverfügbarkeit für kleine Arten in der Nachbarschaft großer Arten schlechter ist, kann die Nähe zu dominanten Pflanzen auch positive Effekte haben. Beispielsweise ist der Kohlendioxidgehalt unmittelbar über dem Boden in den 60 Arten- Mischungen erhöht. Dassler *et al.* (83) wiesen in 2cm Höhe deutlich mehr CO<sub>2</sub> nach als in 10 cm oder 100 cm über dem Boden. Eine weitere positive Interaktion besteht in der durch Leguminosen- Anwesenheit erzeugte zusätzliche Stickstoffverfügbarkeit, welche in der Untersuchung von 2006 für kleine Kräuter festgestellt wurde. Die beschriebenen morphologischen und physiologischen Anpassungen stellen bekannte Mechanismen von Pflanzen dar, um erhöhte Lichtkonkurrenz in dichter Vegetation zu kompensieren, wobei die induzierte Plastizität artspezifisch ist (95).

Weitere Gründe für den gefundenen Diversitätsgradienten im Metabolismus der konkurrenzschwachen Arten könnten schlechtere Nährstoffverfügbarkeit oder Interferenzen durch Sekundärmetabolite dominanter Arten sein. Allerdings kann in diese Richtung momentan nicht argumentiert werden, da vergleichbare Daten nicht vorhanden sind.

### 3.4.3 Phänotypische Plastizität von Pflanzen als Adaptation an sich ändernde Interaktionsmuster in Pflanzengesellschaften

Phänotypische Plastizität bezeichnet die Wechselwirkung des Genotyps mit sich ändernden Umweltbedingungen, wobei unterschiedliche Phänotypen ausgeprägt werden können. Die Variabilität in der Ausprägung des Phänotyps im Rahmen der durch den Genotyp festgelegten Reaktionsnorm, dient bei Pflanzen vor allem der Anpassung des Organismus an wechselnde abiotische und biotische Standortfaktoren, um letztendlich die Ressourcen-Verfügbarkeit zu optimieren (47).

In dieser Studie wurden metabolische Genotypen, sowie durch Leguminosen sowie durch Konkurrenzdruck induzierte metabolische Phänotypen bei konkurrenzschwachen Arten mit Hilfe von Metabolite Profiling Techniken identifiziert. Die biologische Variation jedes Genotyps aufgrund modifizierter Standortbedingungen wird bereits in der integrativen Metabolitanalyse der fünf kleinen Kräuter sichtbar (Abb.3.3.1.1). Die gefundene metabolische Plastizität in Bezug auf die Einflussfaktoren Leguminosen bzw. Diversität manifestierte sich vor allem bei den kleinen konkurrenzschwachen Arten. Arten mit höherer Dominanz wiesen deutlich geringere Variationen in Bezug auf die analysierten Einflussfaktoren in den Metabolitprofilen auf. Dementsprechend konnten für die fünf kleinen Kräuter in der Untersuchung von 2006 artspezifische, metabolische Phänotypen aufgrund von Leguminosen- Anwesenheit charakterisiert werden. Im Untersuchungsjahr 2008 dagegen wurden artspezifische, metabolische Phänotypen von konkurrenzschwachen Pflanzen entlang eines Diversitätsgradienten gefunden. Induziert wurde die phänotypische Plastizität bei den konkurrenzschwachen Arten durch veränderte pflanzliche Interaktionsmuster, die metabolische Adaptationen zur Folge hatten. Die metabolischen Adaptationen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, konnten auch in anderen Arbeiten zum Jena Experiment anhand von morphologischen und physiologischen Anpassungen bestätigt werden (83,84,95). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zusammensetzung der Pflanzengemeinschaft die Interaktionen der Arten bestimmt. Die Resonanz auf sich ändernde Konkurrenzbeziehungen sind individuelle, phänotypische Anpassungen, womit sich folgende Kernaussagen für das Jena Experiment treffen lassen:

1. Innerhalb von zwei Untersuchungsjahren änderten sich die pflanzlichen Interaktionsmuster und Konkurrenzbeziehungen (Leguminosen- Dominanz schwindet; Auskonkurrierung einzelner kleiner Arten - siehe Leontodon).
2. Änderungen in der Ressourcen- Verfügbarkeit, insbesondere Licht- und Stickstoff-Verfügbarkeit, induzieren phänotypische Plastizität.



### 3. „Environmental Metabolomics“ in einem ökologischen Freilandversuch

3. Die Plastizität ist größer bei kleinen, konkurrenzschwachen Arten, da diese Limitationen kompensieren müssen.

Die adaptiven Fähigkeiten einer Pflanze, das heißt ihre Reaktionsbreite gegenüber Umwelteinflüssen, sind in der Regel streng festgelegt. Dies trifft nicht nur auf der Ebene der Arten zu, sondern auch auf Ökotypen ein und derselben Art, welche sich im Verlauf der Evolution an bestimmte Umweltbedingungen genetisch angepasst haben (96). In der Morphogenese einer Pflanze kann diese in vielen Fällen sehr elastisch auf äußere Störungen reagieren und sich bei gleichem Genotyp zu einem stark abgeänderten Phänotyp differenzieren (97). Ein weiteres interessantes Phänomen sind die Variabilitäten in der Merkmalsausprägung bei genetisch identischen Linien oder gar bei Klonen, die unter standardisierten Bedingungen gewachsen sind. Dieses sogenannte „ontogenetisches Restrauschen“ beruht auf Zufallsereignissen im molekularen Bereich (deterministisches Chaos). Die strenge Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp beruht daher nicht nur auf äußeren Umwelteinflüssen, sondern hat auch eine endogene Komponente (96).

Metabolite sind die ultimativen Substituten des Phänotyps, die das Potential eines leistungsstarken diagnostischen Indikators haben (3).

## **4 Metabolische Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante**

### **4.1 Einleitung**

Das abundanteste Enzym in grünen Pflanzen ist die RuBisCO, das Schlüsselenzym der Photosynthese. Sie hat nicht nur eine Carboxylase-, sondern auch eine Oxygenase-Aktivität. Infolge der unspezifischen Affinität der RuBisCO wird die Leistungsfähigkeit der Photosynthese reduziert, indem anstelle von C<sub>3</sub>-Körpern nicht für den Calvin- Zyklus verwertbare C<sub>2</sub>-Körper gebildet werden. In angeschlossenen Reaktionen muss die Pflanze dem Calvin- Zyklus entzogenen Kohlenstoff energetisch aufwendig zurückgewinnen. Dieser Prozess ist ein lichtabhängiger, metabolischer Kreislauf von organischer Substanz, bei dem Sauerstoff veratmet wird. Demzufolge heißt die Reaktion „Photorespiration“.

Die Metabolisierung des photosynthetisch in der Oxygenase- Reaktion gebildeten Glycolats erfolgt in den Kompartimenten der Peroxisomen und Mitochondrien, die in engem Kontakt mit dem Chloroplasten lokalisiert sind. Dabei erfolgt die Entgiftung des Glycolats, welches bei Licht in großen Mengen erzeugt wird, über verschiedene energieabhängige, enzymatische Reaktionen, die in der Rückgewinnung von C<sub>3</sub>-Körpern für den Calvin- Zyklus münden. Der oxidative photorespiratorische C<sub>2</sub>-Zyklus (dargestellt in Abb.4.1.1) beginnt mit der Oxidation von Glycolat zu Glyoxylat, anschließend folgt die Aminierung des Glyoxylats zu Glycin, die Decarboxylierung von 2 Glycin zu 1 Serin und in einer Serin-Glyoxylat-Aminotransferase Reaktion entsteht Hydroxy-Pyruvat, welches durch Umwandlung zu Glycerat wiederum in den Calvin- Zyklus eingeschleust wird. Durch die Transferierung von Amino- Gruppen zwischen Intermediaten der Photorespiration entsteht eine Kopplung mit dem Stickstoffkreislauf, welcher energetisch durch die Photosynthese angetrieben wird und die assimilatorische Nitratreduktion um ein Vielfaches übersteigen kann (96).

Mit Hilfe von Photorespirationsmutanten, denen einzelne Enzyme des C<sub>2</sub>-Zyklus fehlen, konnten zahlreiche Reaktionen charakterisiert werden (98,99). Typischerweise gedeihen Photorespirationsmutanten bei hoher CO<sub>2</sub>- oder niedriger O<sub>2</sub>-Konzentration normal, was an der Unterdrückung der Oxygenase- Reaktion der RuBisCO liegt (96). Im Gegensatz dazu sind solche Mutanten, die unter Normalbedingungen wachsen, teilweise oder vollständig letal aufgrund der Akkumulation toxischer Mengen an Glycolat. Die Reaktionen der Photorespiration finden in den Chloroplasten, dem Peroxisom und den Mitochondrien statt. Die Untersuchungen dieser Arbeit beschränken sich auf die physiologische Rolle der Zink RING-Finger- Peroxine in den Peroxisomen. Insbesondere liegt der Fokus in der Darstellung spezifischer Aspekte der Photorespiration auf der Charakterisierung von Arabidopsis C3HC4 Zink- RING- Finger- Mutanten den E3 Ubiquitin- Ligasen (PEX10, PEX12 und PEX2). Im Allgemeinen sind C3HC4 Zink-Finger- Peroxine peroxisomale Cytosol- oder integrale

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

Membran- Proteine, deren Funktion in der Membran- Biogenese des Matrix-Protein- Imports und der Proliferation von Peroxisomen liegt (100). Mutationen der PEX- Gene in Pflanzen können in einer eingeschränkten Biogenese und in einer schlechteren Chloroplasten-Assoziation resultieren (101), was letale Embryonen verursachen kann (Schumann 2003). Abhängig vom Gewebe- oder Zelltyp variiert der Gehalt an speziellen Enzymen von Peroxisomen, was eine große metabolische Plastizität bedingt und sich in funktional unterschiedlichen Organellen der Peroxisomen und Glyoxysomen differenziert (100).

Ziel dieser Studie war es, aufgrund des dysfunktionalen Phänotyps, den potentiell veränderten Metabolismus der Photorespirationsmutante (PEX 10) gegenüber dem Wildtyp zu charakterisieren, und denkbare Auswirkungen auf den photorespiratorischen C<sub>2</sub>-Zyklus in einen stoffwechselphysiologischen Kontext zu anderen Mutanten zu stellen. Mittels veränderlicher abiotischer Bedingungen (CO<sub>2</sub>-Konzentration) kann ein dysfunktionaler Phänotyp der Mutante unterdrückt werden. Aufgrund der genetischen Präferenz stand weiterhin zur Disposition, ob sich trotz Unterdrückung des morphologischen Phänotyps ein metabolischer Phänotyp manifestiert.

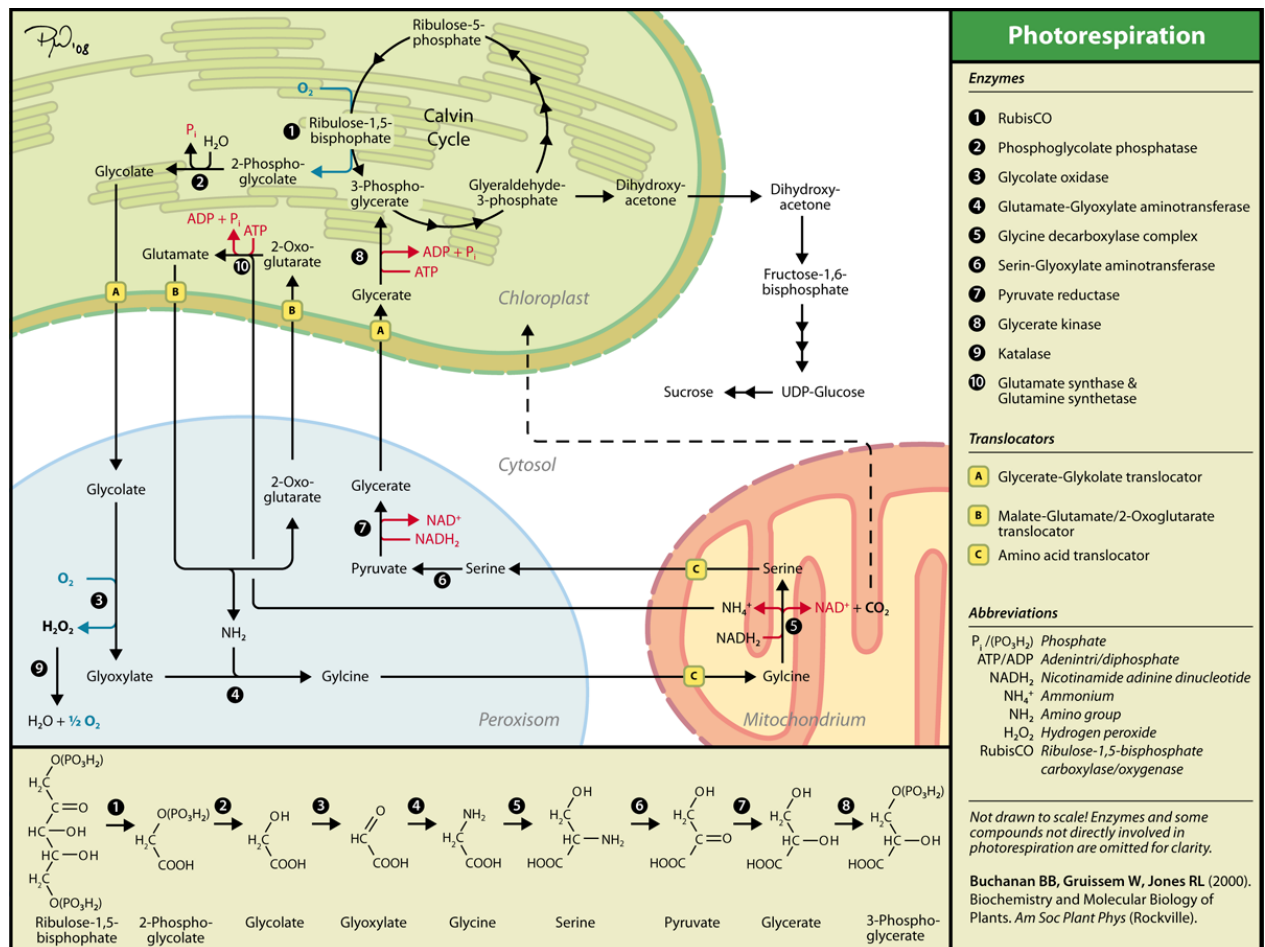


Abb.4.1.1: Photorespirationsschema

(Wikipedia GNU freie Dokumentations Lizenz)

## 4.2 Ergebnisse

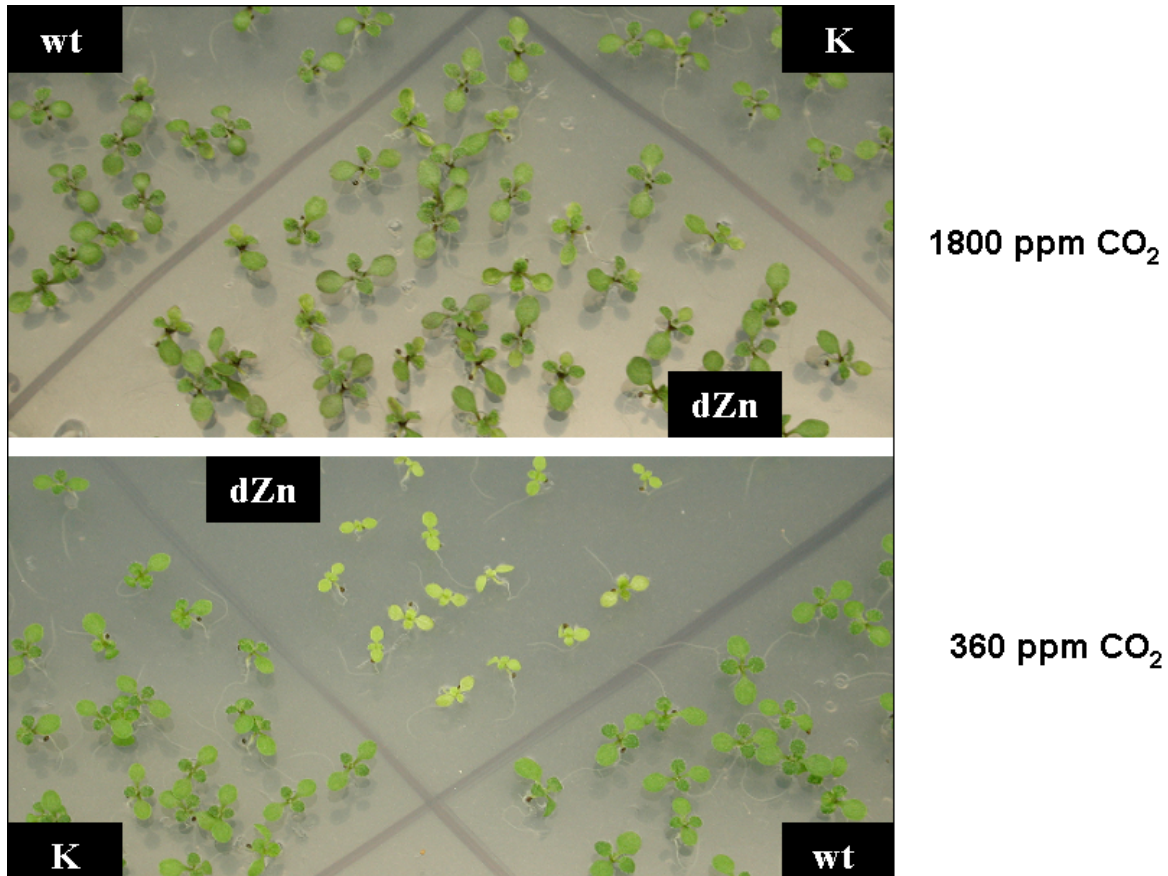
Am Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität in München wurden unter der Leitung von Frau Prof. Christine Gietl durch Überexpression im Zink RING-Finger- Motiv punktmutierter Peroxine PEX 10 und PEX 2 im Wildtyp Hintergrund von Arabidopsis Photorespirationsmutanten erzeugt (101). Diese subletalen T-DNA Insertionslinien können unter erhöhtem CO<sub>2</sub>-Partialdruck konditioniert werden. In München erfolgten morphologische und physiologische Charakterisierungen, die in verschiedenen Experimenten beschrieben wurden (101,102). Dabei sollte die Rolle der beiden E3 Ubiquitin- Ligasen PEX 10 und PEX 2 in Bezug auf Proliferation, Chloroplasten- Assoziation, Matrix-Protein- Import und Photorespiration identifiziert werden. Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche Versuche an PEX 10 Mutanten durchgeführt, die dann mittels GC-TOF-MS und Metabolite Profiling analysiert wurden. Um eine schnelle und vergleichbare Analyse zu gewährleisten, wurden mehrere Arabidopsis- Keimlinge aus einer Schale zu einer Mischprobe zusammengefasst, die dann als ein biologisches Replikat gewertet wurden. In Versuch 1 sollte die PEX 10 Mutante unter Normalatmosphäre metabolisch charakterisiert werden. Versuch 2 stellt eine Konditionierung der PEX 10 Mutante durch unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und die metabolische Charakterisierung dar.

Die Anzucht der Keimlinge für Versuch 1 erfolgte unter Standardbedingungen in Phytokammern (Conviron, Canada) in Normalatmosphäre. Dafür wurden Samen auf MS-Agar- Platten 13 Tage kultiviert und anschließend geerntet. Unter Normalatmosphäre differenzieren sich die PEX 10 Mutanten (dZn-Mutanten) in einen vom Wildtyp unterscheidbaren Phänotyp. Abb. 4.2.1 zeigt den dysfunktionalen dZn-Phänotyp von PEX 10 unter Normalatmosphäre (360 ppm CO<sub>2</sub>) im Vergleich zum Wildtyp und Empty- Vector- Kontrolle. Gut zu erkennen sind die Entwicklungsdefizite der dZn-Mutanten, die sich gegenüber dem Wildtyp manifestieren.

Der eingeschränkt entwickelte (dysfunktionale) Phänotyp der dZn-Mutanten bei Normalatmosphäre kann durch hohen CO<sub>2</sub>-Partialdruck (1800 ppm CO<sub>2</sub>) unterdrückt werden, da die Oxygenase- Reaktion der RuBisCO nicht ausgeprägt ist. Durch diese Manipulation lassen sich dZn-Mutanten entwickeln, die phänotypisch analog zum Wildtyp sind. Um allgemein oxidativen Stress als Elicitor des dysfunktionalen Phänotyps ausschließen zu können, wurden im Versuch 2 unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Partialdrücke genutzt, den nicht induzierten und induzierten dZn-Phänotyp metabolisch zu charakterisieren. Dafür wurden wie für Versuch 1 Keimlinge unter Standardbedingungen 10 Tage angezogen allerdings unter hohem CO<sub>2</sub>-Partialdruck (1800 ppm CO<sub>2</sub>). Anschließend erfolgte eine Transferierung auf Einheitserde, wo die Keimlinge weitere 6 Tage unter hohem CO<sub>2</sub>-Partialdruck (1800 ppm

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

CO<sub>2</sub>) wuchsen. Dieser Zeitpunkt mit insgesamt 16 Tagen Keimlings- Wachstum wurde mit T=0 bezeichnet, das heißt, die hier geernteten Proben zeigten keinen dZn-Phänotyp. Daraufhin wurden die Keimlinge 12 Tage (T=12) in Normalatmosphäre kultiviert und zum Zeitpunkt T=12 geerntet. In diesen Mutanten konnte sich der dysfunktionale dZn-Phänotyp manifestieren.



**Abb.4.2.1: Unterschiedliche Differenzierung von dZn-Mutanten (Keimlinge) bei 1800 ppm CO<sub>2</sub> und 360 ppm CO<sub>2</sub>. Vergleich mit Wildtyp (wt) und Empty- Vektor (K).**

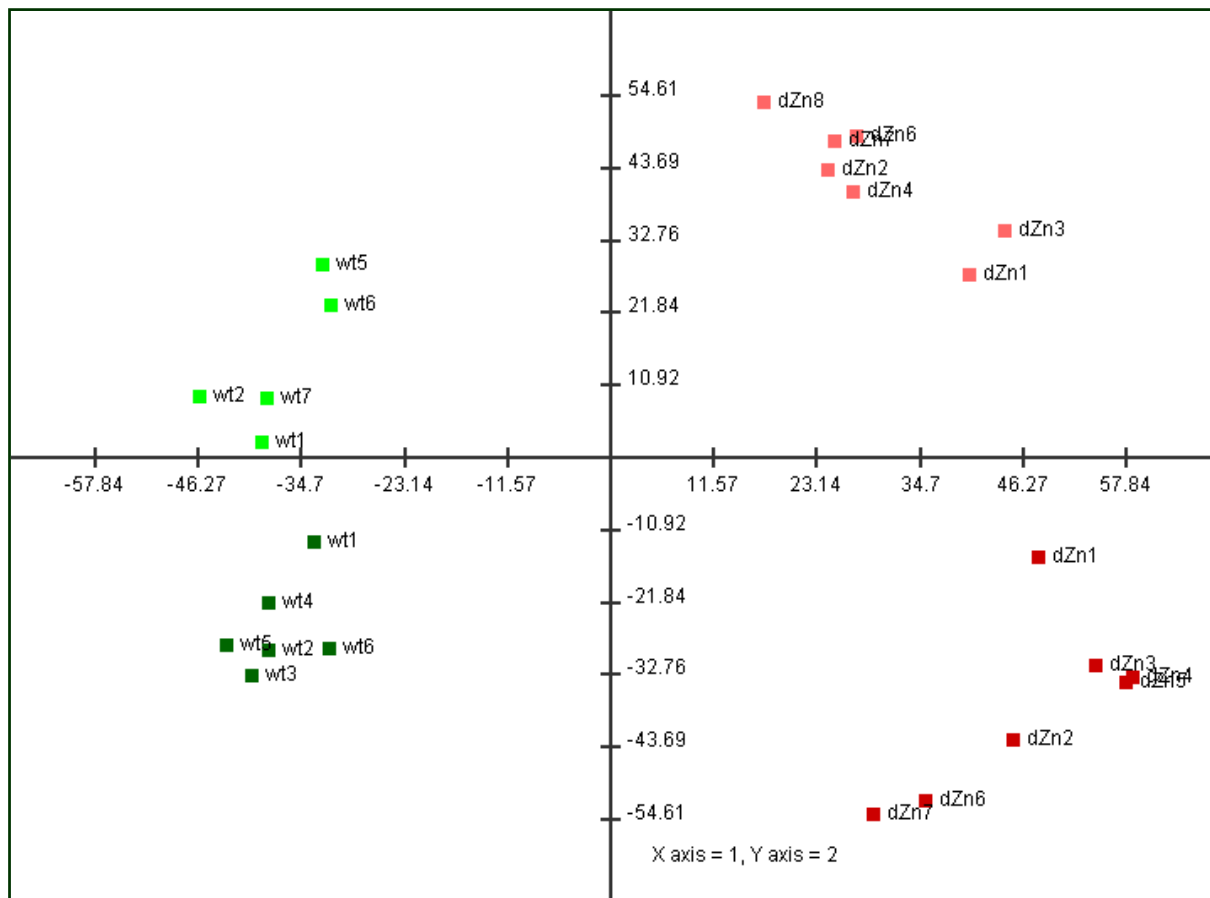
*(Bild Uwe Schumann TU München.)*

#### **4.2.1 Vergleich Wildtyp und PEX 10 Mutanten unter Normalatmosphäre**

In Versuch 1 sollten metabolische Unterschiede zwischen WT und dZn- Mutanten (PEX 10) identifiziert werden. Für diese Untersuchung wurden niedrige CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Anzucht gewählt, um den dysfunktionalen Phänotyp der Mutante zu induzieren. Die Untersuchung wurde anschließend wiederholt, so dass zwei unabhängige Experimente für die Metabolitprofil- Untersuchungen zur Verfügung standen. In Abb. 4.2.1.1 ist die Auswertung der Metabolitprofile dieser Experimente mittels PCA dargestellt. Beide

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

Experimente zeigen eine deutliche Separierung der dZn- Mutanten vom WT auf der 1. Komponente der PCA. Durch variierende Standardbedingungen zwischen den beiden Experimenten sind diese auf der 2. Komponente der PCA voneinander getrennt (Exp.1 helle Punkte; Exp. 2 dunkle Punkte). Da aber deutlich mehr Varianz auf der 1. Komponente der PCA abgebildet wird, ist die Varianz zwischen den Experimenten nicht störend für die Unterschiede zwischen dZn und WT. Die Variationen in den Bedingungen zwischen den Experimenten scheinen wesentlich mehr Einfluss auf die Mutanten zu haben, da diese sich deutlich stärker zwischen den Experimenten voneinander separieren als der WT.

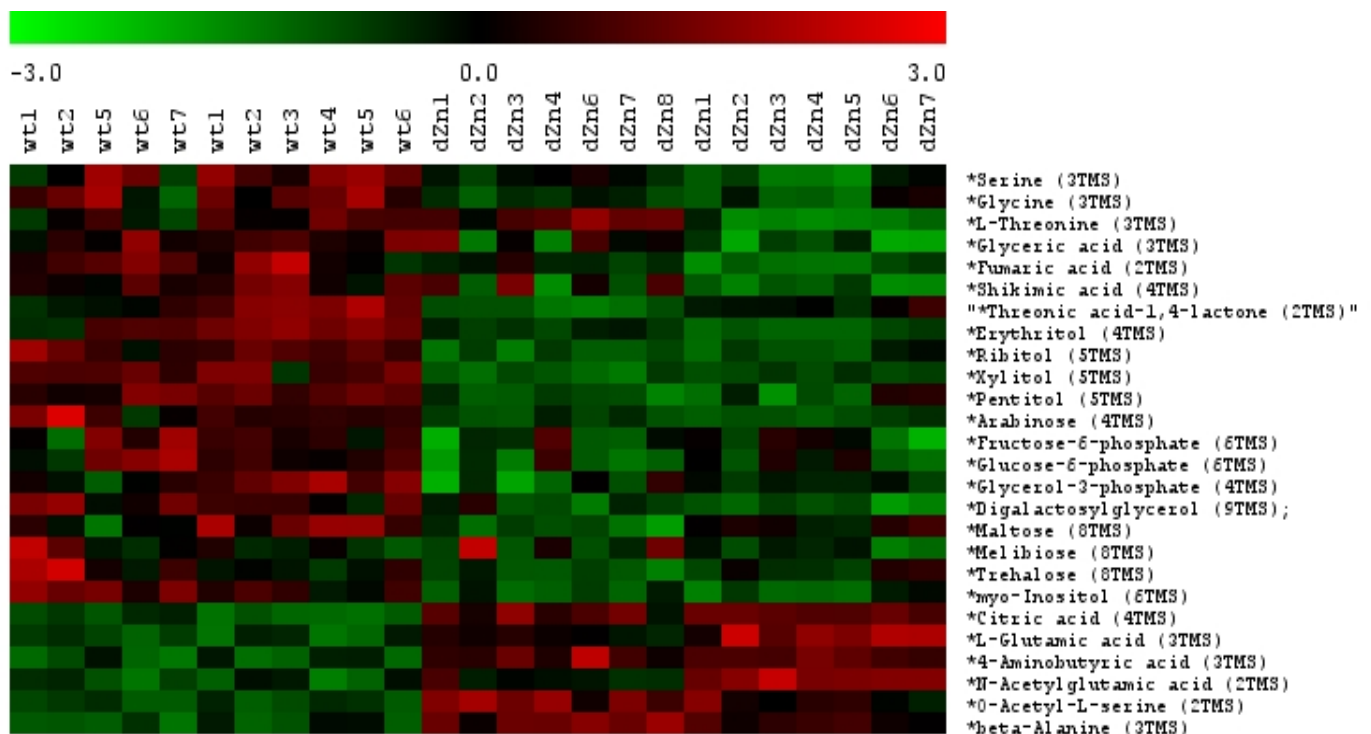


**Abb. 4.2.1.1: Integrative PCA- Darstellung zweier unabhängiger Experimente: grüne Punkte = wt - Wildtyp (hellgrün-Exp1; dunkelgrün-Exp2); rote Punkte = dZn-Mutanten (hellrot-Exp1; dunkelrot-Exp2).** PCA mit normalisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten beiden Komponenten 46% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 77 quantitativ bestimmte Metabolite.

In einer detaillierten Betrachtungsweise wurde dann versucht, die metabolischen Unterschiede zwischen WT und Mutanten mittels T-Test und integriertem Clustering herauszustellen (Abb. 4.2.1.2). In der Kombination beider Experimente ergeben sich 26 signifikant unterschiedliche Metabolite zwischen WT und dZn- Mutanten. Wie erwartet,

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

zeigen einige Intermediate der Photorespiration der dZn-Mutanten signifikante Unterschiede. So wurden in beiden Experimenten reduzierte Werte für Serin, Glycin und Glycerat gefunden, dagegen waren die Werte für Glutamat erhöht. Weitere Unterschiede konnten für einige organische Säuren (z.B.: Fumamat, Shikimat, Citrat), Zucker (z.B.: Maltose, Trehalose, Arabinose, Myo-Inositol) sowie für die Aminosäuren (z.B. beta-Alanin, Threonin) registriert werden. Aufgrund von Variationen zwischen den Experimenten zeigten weitere Intermediate wie 2-Ketoglutarat, Hydroxyglutarat, Alanine und Prolin in nur einem Experiment Auffälligkeiten, die aber nicht validiert werden konnten.

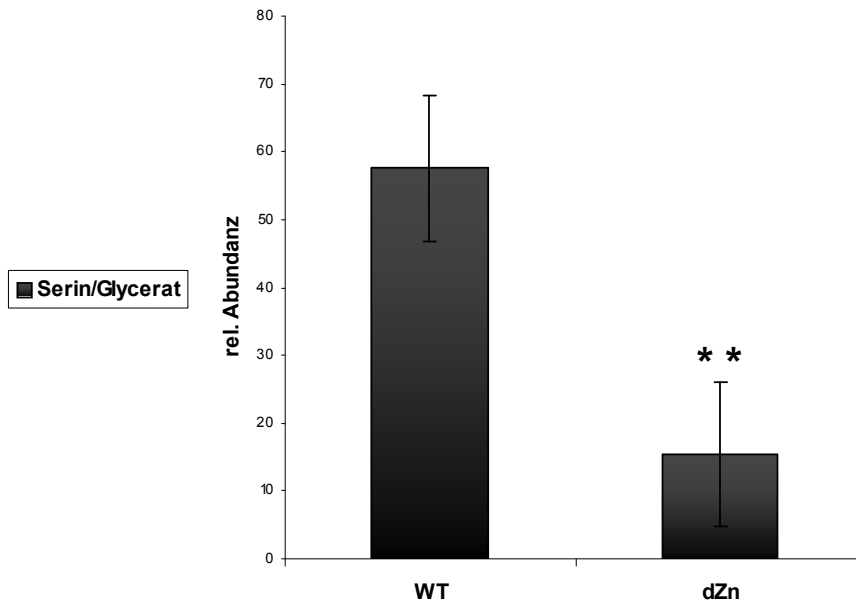


**Abb.4.2.1.2: T-Test- Clustering zwischen wt (Wildtyp) und dZn (Mutanten). Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolite- Konzentrationen.** Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte Konzentrationen und grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen der jeweiligen Metabolite. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ( $\alpha=0,01$ ) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ .

Um den Fluss der Intermediate der Photorespiration abschätzen zu können wurden relative Verhältnisse von Metabolite- Paaren bestimmt. Dabei zeigten sich insbesondere für das Verhältnis Serin/Glycerat signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und dZn-Mutante wie in Abb.4.2.1.3 dargestellt ist. In den dZn-Mutanten ist im Vergleich zum Wildtyp das Serin/Glycerat- Verhältnis etwa um das 3fache reduziert. Das bedeutet, es wurde deutlich weniger Serin gemessen, wohingegen die Menge an Glycerat annähernd gleich blieb. Aufgrund dessen, dass einige Intermediate mit Serin korrelieren, lassen sich weitere Metabolite- Paare (z.B. Glycin/Glycerat) finden, die abweichende Verhältnisse zwischen WT-

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

und dZn-Pflanzen anzeigen. Da diese Korrelationen in folgenden Untersuchungen nicht mehr stringent auftreten, wurde die Flussrate der Photorespiration ausschließlich anhand des Serin/Glycerat- Verhältnisses überprüft.



**Abb.4.2.1.3: Relative Serin/Glycerat- Verhältnisse des Wildtyps und der dZn-Mutante.** Die Mittelwerte resultieren aus zwei Experimenten mit jeweils 5 biologischen Replika; \*\*,  $P < 0,01$ .

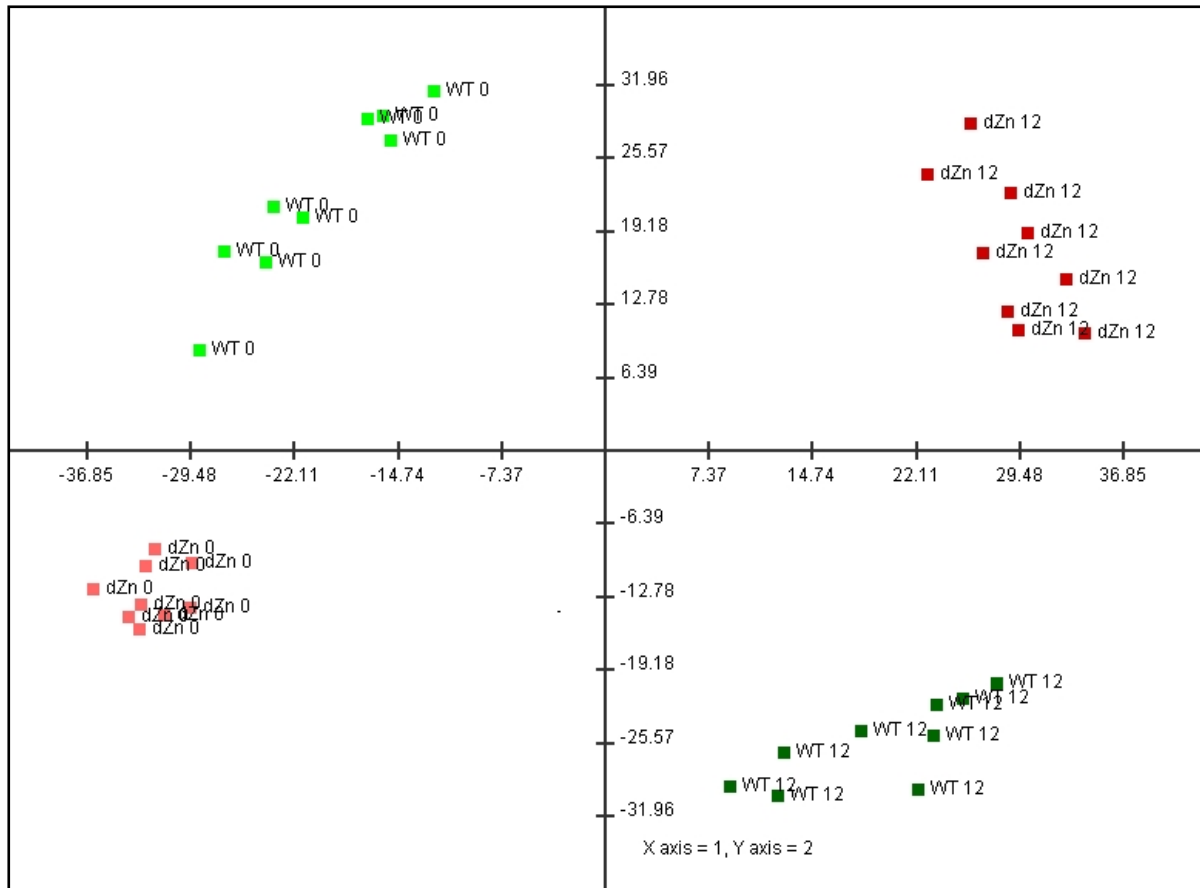
#### **4.2.2 Konditionierung des Phänotyps der PEX 10 Mutante durch unterschiedlichen CO<sub>2</sub>- Partialdruck**

In einer anschließenden Untersuchung wurde versucht, durch unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Konzentrationen den Phänotyp der PEX 10 Mutante zu konditionieren und metabolisch zu charakterisieren. Dazu wurden Arabidopsis Keimlinge unter hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (1800 ppm) 16 Tage angezogen und dann zum Zeitpunkt T=0 geerntet. Daraufhin wurden Keimlinge des gleichen Ansatzes normalen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (360 ppm) ausgesetzt und nach 12 Tagen geerntet (T=12). Durch diesen Versuchsaufbau mit anfangs hohem CO<sub>2</sub>-Partialdruck wird die Photorespiration unterdrückt, so dass Wildtyp und Mutante potentiell gleich metabolisieren und die Mutation des PEX 10 Proteins nicht ausgeprägt ist. Die anschließende Normalatmosphäre induziert dann den dysfunktionalen Phänotyp der Mutante. Die Analyse der Metabolitprofile dieser Untersuchung ist in der PCA in Abb. 4.2.2.1 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die Separierung von WT und dZn-Mutanten in der PCA



#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

zu beiden Zeitpunkten. Überraschendweise trennen sich WT und Mutante schon beim Zeitpunkt T=0 voneinander. Des Weiteren ist der Metabolite- Shift vom Zeitpunkt T=0 zu T=12 von WT und Mutante zu erkennen, die sich diametral zueinander verhalten. Die Ausprägung der metabolischen Unterschiede zwischen WT und Mutante sind bei hohen und niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen gegeben.

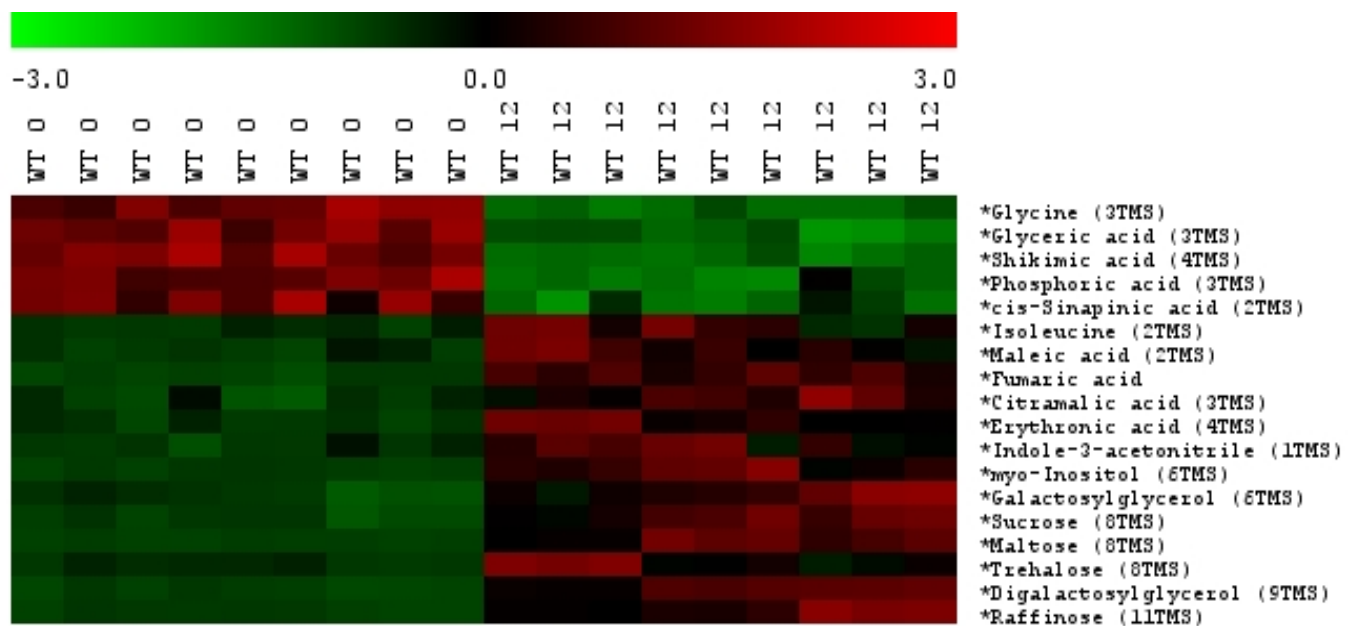


**Abb. 4.2.2.1:** PCA- Darstellung der unterschiedlich konditionierten dZn-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp bei T=0 und T=12 Tagen. Wildtyp: hellgrün - T=0; dunkelgrün - T=12; dZn-Mutanten: hellrot - T=0; dunkelrot - T=12. PCA mit normalisierten Metabolitdaten ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ), wobei die ersten beiden Komponenten 52% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 67 quantitativ bestimmte Metabolite.

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der PCA mittels T-Test und integriertem Clustering differenziert dargestellt. Zuerst werden die entwicklungsphysiologischen Veränderungen im Metabolismus, die durch die zeitliche Komponente entstanden sind, herausgearbeitet (Abb. 4.2.2.2). Anschließend wird der dysfunktionale Phänotyp der Mutante bei Normalatmosphäre aus Versuch 1 (Abb. 4.2.1.2) mit den konditionierten Phänotypen (T=0 und T=12) bei unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken verglichen (Abb.4.2.2.3).

Um die natürlichen metabolischen Veränderungen, denen die Keimlinge innerhalb von 12 Tagen Wachstum unterliegen, herausfiltern zu können, wurden in Abb. 4.2.2.2 die Metabolite des Wildtyps zum Zeitpunkt T=0 und T=12 Tagen verglichen und signifikante Veränderungen dargestellt. Entwicklungsphysiologische Veränderungen im Metabolismus von Keimlingen sind vor allem die Transportzucker, einige organische Säuren aber auch die Photorespirationsintermediate Glycin und Glycerat unterlegen.



**Abb. 4.2.2.2: T-Test- Clustering des Wildtyps zwischen T=0 und T=12. Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolite- Konzentrationen im Entwicklungsprozess von Seedlings innerhalb von 12 Tagen.** Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte Konzentrationen und grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen der jeweiligen Metabolite. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ( $\alpha=0,01$ ) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ .

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

Abb. 4.2.2.3 zeigt den Vergleich zwischen dem ausdifferenzierten dysfunktionalen Phänotyp der dZn- Mutante aus Versuch 1 (**A**), der als Referenzzustand für den Unterschied zwischen Wildtyp/Mutante herangezogen wurde, mit den konditionierten Phänotypen der dZn-Mutante (Versuch 2) zum Zeitpunkt T=0 (**B**) und T=12 (**C**).

Obwohl zum Zeitpunkt T=0 der dysfunktionale Phänotyp der Mutante nicht ausgeprägt ist, zeigen sich deutliche Unterschiede im Metabolitgehalt zwischen WT und dZn-Mutante (**B**). So sind die Photorespirationsintermediate (Serin, Glycin, Glycerat, 2-Ketoglutarat) aber auch organische Säuren und einige Zucker in der Mutante gegenüber dem Wildtyp verändert. Im Vergleich mit dem Referenzzustand (**A**), wo die dZn-Mutante mit 26 signifikant unterschiedlichen Metaboliten gegenüber dem Wildtyp hervortrat, finden sich in dem nicht differenzierten dZn-Phänotyp (**B**) 9 Metabolite, die exakt gleich konditioniert sind.

Durch die Ausdifferenzierung des dysfunktionalen Phänotyps der Mutante zum Zeitpunkt T=12 (**C**) werden teilweise ähnliche metabolische Veränderungen wie zum Zeitpunkt T=0 erreicht (Serin, Succinat, Fumarat, Succrose), teilweise sind die Veränderungen aber auch diametral (Glycerol, Shikimat, Fucose). Im Vergleich mit dem Referenzzustand (**A**) finden sich 7 Metabolite die exakt gleich und 2 Metabolite die konträr konditioniert sind.

Interessante metabolische Unterschiede zwischen Wildtyp und den konditionierten Zuständen der dZn-Mutante finden sich in Vorläufer oder Abbauprodukten von Membran-Bestandteilen wie Glycerol, Glycerol-3-P, Dia- und Galactosylglycerol.

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

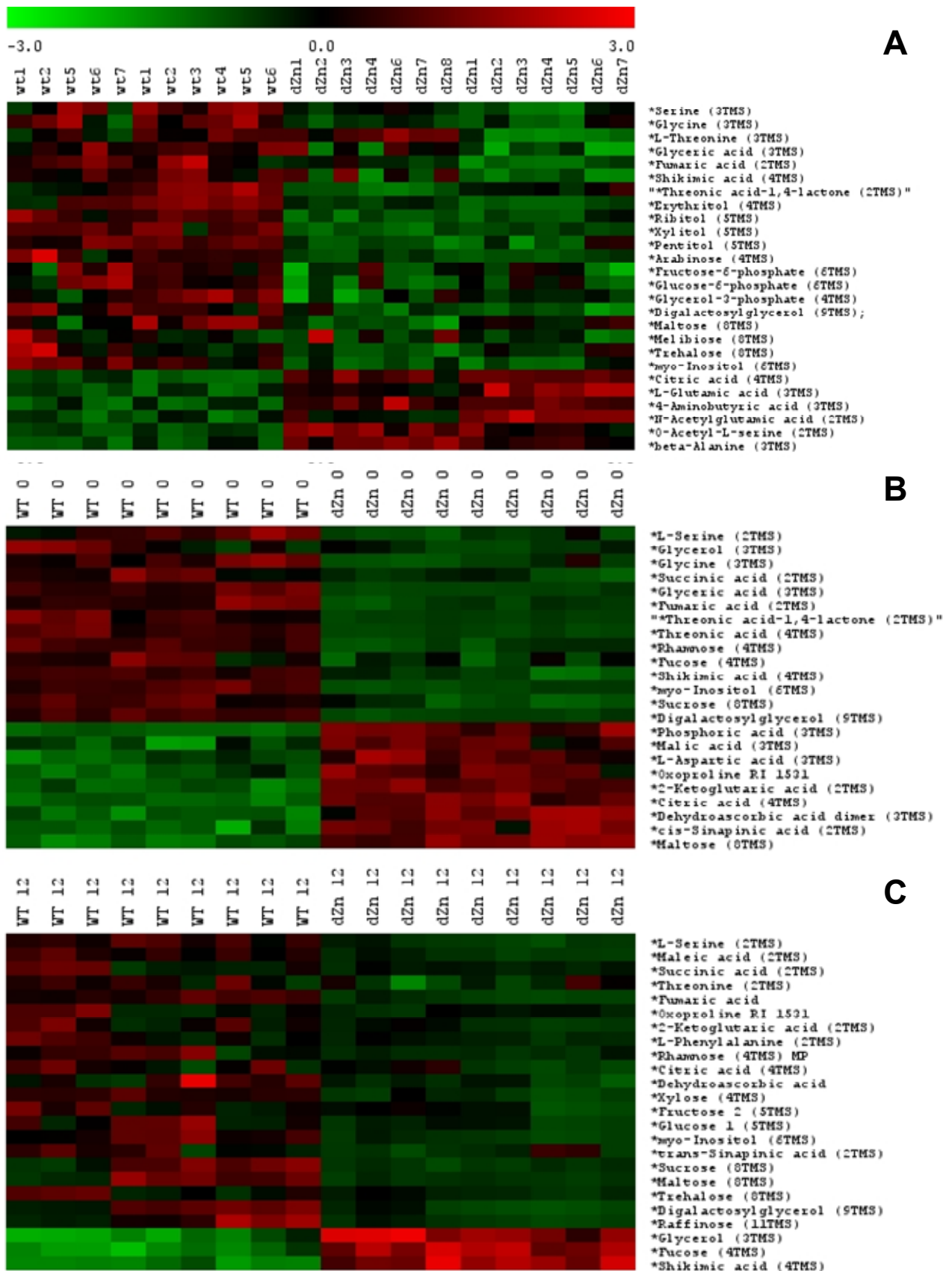
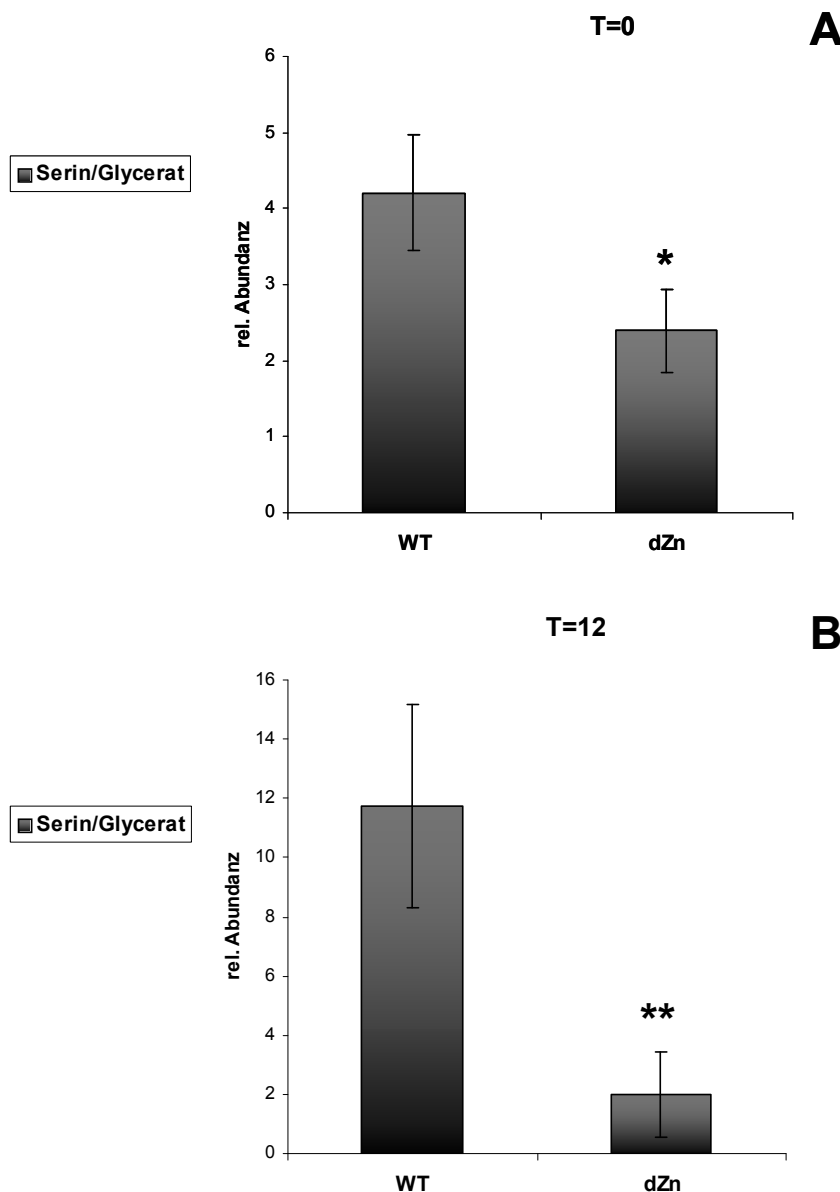


Abb.4.2.2.3: T-Test- Clustering: **A** Referenzzustand WT/dZn (Versuch1);  
**B** WT/dZn bei 1800 ppm CO<sub>2</sub> und T=0;  
**C** WT/dZn bei 360 ppm CO<sub>2</sub> und T=12.

Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolite- Konzentrationen zwischen WT/ dZn. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ( $\alpha=0,01$ ) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel:  $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ .

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

In Abb.4.2.2.4 wurden analog zu Versuch1 die Serin/Glycerat- Verhältnisse der WT- und dZn-Pflanzen bei hohen (A) und niedrigen (B) CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bestimmt. Der nicht induzierte Phänotyp der dZn- Mutanten bei 1800 ppm CO<sub>2</sub> (A) zeigt nur leicht unterschiedliche Serin/Glycerat- Verhältnisse (schwach signifikant) zwischen Wildtyp und Mutante. Im Gegensatz dazu sind beim induzierten Phänotyp der dZn-Mutanten bei 360 ppm CO<sub>2</sub> (B) deutliche Unterschiede (stark signifikant) im Serin/Glycerat- Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutante feststellbar. Im Vergleich zum Wildtyp ist das Serin/Glycerat- Verhältnis der ausdifferenzierten dZn-Mutanten um durchschnittlich das 6fache reduziert, was sich aus einem geringeren Serin- Gehalt ergibt.



**Abb.4.2.2.4: Relative Serin/Glycerat- Verhältnisse des Wildtyps und der dZn-Mutante.**

**A: T=0 bei 1800 ppm CO<sub>2</sub>; B: T=12 bei 360 ppm CO<sub>2</sub>.**

Die Mittelwerte resultieren aus jeweils 9 biologischen Replika für WT und Mutante; \*, P<0,05; \*\*, P<0,01.

### 4.3 Diskussion

In einer signifikanten Nebenreaktion katalysiert die RubisCO die Fixierung eines O<sub>2</sub>-Moleküls anstelle von CO<sub>2</sub>. Dadurch entstehen C<sub>2</sub>-Körper, die in einer zyklischen Reaktionsfolge – der Photorespiration – metabolisiert werden, um sie anschließend wieder in den Calvin- Zyklus einspeisen zu können. Aufgrund dessen, dass bei intensiver Belichtung ca. 20-30% aller Reaktionen der RubisCO als Oxygenierung ablaufen, ist die Photorespiration ein essentieller Stoffwechselweg als Schutz vor Lichtstress und zur Regenerierung von C<sub>2</sub>-Körpern (47).

Die Zink- RING- Finger- Proteine PEX 2 und PEX 10 sind essentielle Bestandteile der Peroxisomenmembran, welche in Hefe und Säugerzellen heteromere Komplexe bilden und deren RING- Domäne als Protein-Protein- Interaktionsdomäne im Cytosol fungiert (100). Schumann *et al.* (101) postulieren, dass der Chloroplasten- Peroxisomen Kontakt in der PEX 10 (dZn-) Mutante gestört ist. Entweder dadurch das PEX 10 selber direkt einen Protein Interaktionspartner im Chloroplasten Envelope hat, oder indirekt durch die Formveränderung der Peroxisomen sekundär der Kontakt zu den Chloroplasten reduziert ist. Durch die Komplexbildung der Proteine PEX 2, PEX 10 und PEX 12 wird vermutlich die E3-Ligase Funktion aktiviert und damit die Ubiquitinierung des cytosolischen Rezeptors PEX5, der Proteine in die Peroxisomenmatrix importiert (103). Die Überexpression punktmutierter Photorespirationsmutanten PEX 10 und PEX 2 führt zu dysfunktionalen C3HC4 Zink- RING- Finger- Motiven, wodurch sich anormale Oberflächenstrukturen der Peroxisome ausbilden und möglicherweise die Assoziationsfähigkeit zu Chloroplasten und Mitochondrien eingeschränkt wird (101). Knockout- Mutationen von PEX 2, PEX 10 und PEX 12 haben keine Auswirkungen auf die Enzyme des Photorespirationsapparats, führen aber zu letalen Embryonen, was die Wichtigkeit dieser Proteine für die Lebensfähigkeit der Pflanzen unterstreicht. Die Arbeiten von Bari *et al.* (104) und Timm *et al.* (105), die mitochondriale und cytosolische Bypässe der Photorespiration aufdeckten, zeigen, dass der Metabolismus der Photorespiration noch immer nicht vollständig verstanden ist und weitergehende Untersuchungen notwendig sind.

##### **4.3.1 Der „metabolische Photorespirationsphänotyp“ von PEX 10 Mutanten bei Normalatmosphäre**

Um den dysfunktionalen Phänotyp der PEX 10 Mutante metabolisch charakterisieren zu können, wurden Wildtyp und Mutante unter Normalatmosphäre in einer ersten Untersuchung mittels Metabolic Profiling klassifiziert. Dabei stellte sich ein deutlicher metabolischer Phänotyp der dZn-Mutante heraus. Analog zu anderen Photorespirationsmutanten (beispielsweise die peroxisomale Hydroxypyruvat- Reductase Mutante ( HPR1) von Timm *et al.* (105)) sind auch bei dieser Mutante typische Intermediate (Serin, Glycin, Glycerat und Glutamat) gegenüber dem Wildtyp verändert (Abb.4.2.1.2). Der Vergleich zwischen dem ausdifferenzierten dysfunktionalen Phänotyp der dZn-Mutante und dem Wildtyp unter Normalatmosphäre wurde als Referenzzustand für den Unterschied zwischen Wildtyp/Mutante herangezogen. Die Disposition des Referenzzustandes ergab 26 spezifische Metabolite, die den ausdifferenzierten Phänotyp der dZn-Mutante fundieren. Anhand von metabolischen Mustern (105) und spezifischen Metabolite- Verhältnissen (106) lassen sich metabolische Flüsse rekonstruieren bzw. deren Störung oder Reduktion innerhalb des Photorespirationszyklus determinieren. Das reduzierte Serin/Glycerat- (Abb.4.2.1.3) und das korrelierte Glycin/Glycerat- Verhältnis (nicht gezeigt) sowie das konträr dazu akkumulierende Glutamat (Abb.4.2.1.2) sind offensichtliche Indikatoren für einen signifikant gestörten Intermediatfluss. Zum einen lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Photorespiration in den dZn-Mutanten reduziert ist. Zum anderen implizieren die metabolischen Verschiebungen eine Störung des Transports von Glutamat aus den Chloroplasten in die Peroxisomen und eine Störung des Austausches von Glycin/Serin mit den Mitochondrien.

Aufgrund der unmittelbaren Kopplung von Photosynthese und Photorespiration ist in der Regel der photosynthetische Fluss bei Photorespirationsmutanten beeinträchtigt. So zeigte beispielsweise eine peroxisomale Doppel- Mutante von Timm *et al.* (105) eine deutliche Reduktion an Saccharose. Kebeish *et al.* (107) konnten in Arabidopsis Pflanzen mit einem photorespiratorischen Bypass, was eine Optimierung der Photosynthese darstellt, einen Anstieg der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose aufzeigen. Die dZn-Mutanten dieser Arbeit zeigen reduzierte Gehalte an zahlreichen Zuckern des photosynthetischen Flusses, was wahrscheinlich eine indirekte Wirkung auf das gestörte Recycling von Intermediaten aus der Photorespiration ist. Generell führt eine gesteigerte Photorespiration beispielsweise durch erhöhte O<sub>2</sub>-Konzentrationen zu einer Abnahme an Kohlenhydraten und mündet langfristig in verringertes Wachstum und Seneszenz (98), was auch am dysfunktionalen PEX 10 Phänotyp sichtbar wird.

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

Eine weitere enge Kopplung der Photorespiration besteht mit dem Citrat- Zyklus, da stellenweise die gleichen Intermediate verstoffwechselt werden. Fumarat und Malat sind die abundantesten organischen Säuren und wichtige Kohlenstoffspeicher in Arabidopsis, die zudem aus photosynthetischen Assimilaten gebildet werden und somit auch über die Photosynthese verlinkt sind (108). Daher ist eine direkte Beeinflussung der organischen Säuren durch veränderte metabolische Flüsse in den dZn-Mutanten nicht erstaunlich. Durch die Kompartimentierung der Zelle ist die Interpretation der konträren Veränderungen zwischen Fumarat und Citrat schwer zu erläutern. Trotzdem könnte der Anstieg an Citrat im Referenzzustand eine unmittelbare Folge der Akkumulation von Glutamat sein, da die Kohlenstoffkörper für Aminosäuren gewöhnlich durch den Citrat- Zyklus bereitgestellt werden und die Verlinkung über 2-Ketoglutarat direkt gegeben ist.

Der metabolische Befund der dZn-Mutanten im Referenzzustand erhärtet die morphologischen Untersuchungen von Schumann *et al.* (101), welche eine eingeschränkte Assoziationsfähigkeit der Peroxisomen mit Chloroplasten von PEX 10 Mutanten attestierten. Der daraus resultierende eingeschränkte metabolische Fluss an Photorespirationsintermediaten führt zu charakteristischen metabolischen Mustern der dZn-Mutanten - dem „metabolischen Photorespirationsphänotyp“.

#### **4.3.2 Der konditionierte „metabolische Photorespirationsphänotyp“ von PEX 10 Mutanten**

Ein entscheidender Parameter für die Photorespirationsrate ist die CO<sub>2</sub>-Konzentration der Luft. Daher wurde in einer anschließenden Untersuchung, durch die Konditionierung des Phänotyps der PEX 10 Mutante mit unterschiedlichem CO<sub>2</sub>-Partialdruck, der nicht differenzierte und der ausdifferenzierte Phänotyp der dZn-Mutante metabolisch charakterisiert. Zum Zeitpunkt T=0 wurde durch hohen CO<sub>2</sub>-Partialdruck (1800 ppm CO<sub>2</sub>) die Oxygenasereaktion und damit der dysfunktionale Phänotyp der PEX 10 Mutante unterdrückt, was einen potentiell ähnlichen Metabolismus wie beim Wildtyp implizieren sollte. Trotz dieses Versuchsaufbaus zeigt die dZn- Mutante zum Zeitpunkt T=0 einen stark zum Wildtyp abweichenden metabolischen Phänotyp (Abb.4.2.2.1). In diesem nicht differenzierten Stadium der Mutante weist ihr Metabolismus Analogien hinsichtlich des ausdifferenzierten Phänotyps des Referenzzustands auf (Abb.4.2.2.3: **A/B**).

Die Ähnlichkeit der metabolischen Ausprägung von Referenzzustand und nicht induzierter dZn-Mutante (insbesondere der Photorespirationsintermediate) ist den unterschiedlich ausgeprägten morphologischen Phänotypen konträr gegenübergestellt. Obwohl der



#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

Phänotyp der dZn-Mutante nicht induziert ist, finden sich deutliche Indikatoren einer gestörten Photorespiration. So sind 9 Metabolite und davon 3 Photorespirationsintermediate exakt gleich konditioniert wie im Referenzzustand. Im Referenzzustand akkumulieren vor allem Glutamat und dessen Abbauprodukte. Anstelle des Glutamats reichern sich in der nicht induzierten dZn- Mutante Vorläufer- und Abbauprodukte des Glutamats wie 2-Ketoglutarat und Oxoprolin (Pyroglutamat) an. Aufgrund der unmittelbaren Kopplung der Photorespiration mit der Photosynthese und dem Citrat- Zyklus ergeben sich direkte Auswirkungen auf die Intermediate dieser Stoffwechselwege, die infolge der gestörten metabolischen Flüsse in den Mutanten reduziert oder akkumuliert vorliegen können. So sind neben den Photorespirationsintermediaten, die organischen Säuren, die Assimilat- sowie die Transportzucker in ihrer Abundanz teilweise verändert. Insbesondere die Reduktion der organischen Säuren Fumarat, Succinat und Shikimat aber auch die Reduktion von Sucrose und myo-Inositol belegen die eingeschränkte Photorespirationsleistung der nicht induzierten dZn-Mutanten. Der Anstieg an Citrat (teilweise Malat) im Referenzzustand und in der nicht induzierten dZn-Mutante ist eine unmittelbare Folge der Akkumulation von Glutamat oder 2-Ketoglutarat, da hier offensichtlich ein Rückstau an Intermediaten erfolgte, die nicht verstoffwechselt werden konnten. Ähnliche Beobachtungen machten Cousins *et al.* (109) an einer peroxisomalen Malat- Dehydrogenase (PMDH) Doppelmutante, wo sie erhöhte Werte für 2-Ketoglutarat und Iso-Citrat feststellten. Im Gegensatz dazu ist das Serin/Glycerat-Verhältnis der dZn-Mutante zum Zeitpunkt T=0 nicht analog reduziert wie im Referenzzustand. Die geringe Ausprägung der Reduzierung des Serin/Glycerat-Verhältnisses lässt sich auf die Unterdrückung der Oxygenaseaktivität der RubisCO durch hohen CO<sub>2</sub>-Partialdruck zurückführen, demzufolge ist der Stoffwechselweg über die Photorespiration nicht äquivalent aktiviert wie unter Normalatmosphäre. Trotzdem zeigt der metabolische Phänotyp der nicht induzierten dZn-Mutante eine deutliche Präferenz zum Referenzzustand.

Die Interpretation der ausdifferenzierten dZn-Mutante bei niedrigem CO<sub>2</sub>-Partialdruck zum Zeitpunkt T=12 gestaltet sich komplexer. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt überlagern sich zwei Effekte: die Ausdifferenzierung des metabolischen dZn- Phänotyps (Abb.4.2.2.3 (C)) und die natürlichen physiologischen Wachstumsprozesse (Abb.4.2.2.2). In Übereinstimmung mit dem Referenzzustand (Abb.4.2.2.3 (A)) finden sich einerseits Intermediate mit gleicher Konditionierung (Serin, Fumarat, myo-Inositol und Diagalactosylglycerol), andererseits verhalten sich einige Intermediate (Shikimat, Citrat, Glycerol, Oxoprolin und 2-Ketoglutarat) konträr gegenüber dem Referenzzustand. Des Weiteren treten Verschiebungen innerhalb der Assimilate- und Transportzucker auf und die Akkumulation von Glutamat und dessen Abkömmlinge entfallen.

Nichts desto trotz lässt sich das determinierte metabolische Muster eindeutig dem „metabolischen Photorespirationsphänotyp“ des Referenzzustandes zuordnen. Aufgrund einer längeren Ausdifferenzierung der dZn-Mutante (längere Wachstumsperiode als der

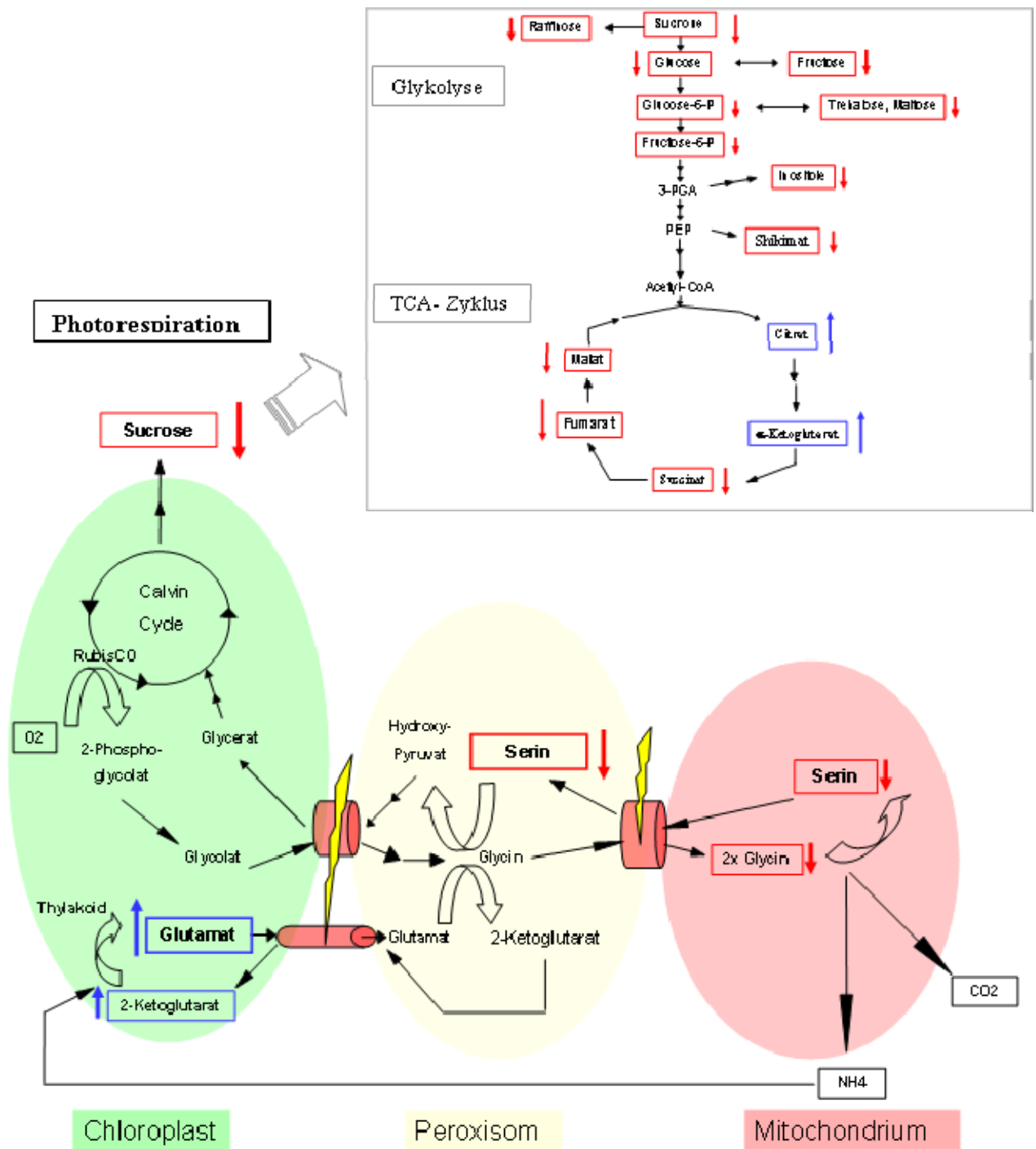
#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

Referenzzustand; +12 Tage) ist der Metabolismus gegenüber dem Referenzzustand teilweise transformiert. Durch die 12 Tage zusätzlichen Wachstums kam es zu entwicklungsphysiologischen Veränderungen im Metabolismus, die sich vor allem in den organischen Säuren und Zuckern manifestieren. Wachstumsinduzierte Verschiebungen für Assimilat- und Transportzucker sind bekannte Stoffwechselreaktionen (110,111), dennoch ist die deutliche Reduktion dieser Zucker in den ausdifferenzierten dZn-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ein Beleg für das schlechte generieren von Oxygenase- Intermediaten durch die Photorespiration. Das eingeschränkte Recycling von Kohlenstoffkörpern mündet in eine schlechtere Photosyntheseleistung, was anhand einer deutlichen Reduktion der Assimilat- und der Transportzucker bei den ausdifferenzierten dZn-Mutanten sichtbar wird. Die Akkumulation von Glutamat und seinen Abkömmlingen, die im Referenzzustand und zum Zeitpunkt T=0 auftrat, entfällt, da diese Intermediate nach 12 Tagen weiteren Wachstums wahrscheinlich zu anderen Komponenten (möglicherweise Shikimat) verstoffwechselt wurden. Eine weitere deutliche Determination des gestörten photorespiratorischen C<sub>2</sub>-Zyklus der dZn-Mutanten zum Zeitpunkt T=12 wird durch das 6fach reduzierte Serin/Glycerat-Verhältnis gegenüber dem Wildtyp sichtbar. Die Vertiefung der Reduktion im Vergleich mit dem Referenzzustand (3fach) ergründet sich aus der stärkeren Ausdifferenzierung des dZn-Phänotyps durch weitere 12 Tage Wachstum. Aus diesen Indikationen lässt sich schlussfolgern, dass die dZn-Mutante zum Zeitpunkt T=12 einen deutlichen metabolischen und morphologischen Phänotyp präsentiert, der aber wachstumsbedingte Differenzen zum Referenzzustand aufweist.

#### **4.3.3 Reduzierter photorespiratorischer Fluss in PEX 10 Mutanten mündet in eine schlechtere Performance des Primärstoffwechsels**

Die dysfunktionalen PEX 10 Mutanten sind gekennzeichnet durch gestörte metabolische Flüsse innerhalb des Photorespirationszykluses, was sich anhand zahlreicher Intermediate der Photorespiration, der Photosynthese und des Citrat- Zyklus belegen lässt. In allen Experimenten hatte die dZn-Mutante gegenüber dem Wildtyp reduzierte Serin/Glycerat-Verhältnisse, reduzierte Kohlenhydrat- Verhältnisse und veränderte Citrat-Zyklus-Intermediate. Übereinstimmend in allen Versuchen konnte Serin als eindeutiger metabolischer Marker identifiziert werden, der sowohl den nicht differenzierten als auch den ausdifferenzierten Phänotyp der dZn-Mutanten anzeigt. In einem Model in Abb.4.3.1 wurde versucht, der durch die Mutation im Peroxin 10 Zink- RING- Finger- Motiv hervorgerufenen stoffwechselphysiologischen Veränderungen in der Photorespiration und angeschlossenen Reaktionen Rechnung zu tragen und darzustellen.

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante



**Abb.4.3.1: Vereinfachtes Modell des gestörten photorespiratorischen Zyklus und angeschlossener Stoffwechselwege der PEX 10 Mutanten.** Determinierte signifikante Reduktionen bzw. Akkumulationen wurden mit roten bzw. blauen Pfeilen gekennzeichnet. Die Lokalisation der spezifischen Veränderungen von Metaboliten wurde postuliert, da die Kompartimentierung der Zelle mittels Metabolic Profiling nicht berücksichtigt werden kann.

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

An den komplexen Veränderungen im gesamten Primärmetabolismus wird ersichtlich, wie bedeutend das Recycling von Oxygenase-Produkten durch die Photorespiration für den Metabolismus der Pflanze ist. In den PEX 10 Mutanten ist wahrscheinlich die Assoziationsfähigkeit der Peroxisomen zu den Membranen anderer Organellen des Photorespirationsapparats eingeschränkt, was Elektronen mikroskopische Untersuchungen und Lokalisationsfärbungen über GFP am confocalem LSM (Laser Scanning Microscope) andeuten (Prestele et al.; unveröffentlicht). Weitere Indizien dafür finden sich an einzelnen Vorstufen von Membrankomponenten, die in den *dZn*-Mutanten in reduzierten Mengen (Di-Galactosyl-Glycerol) vorliegen. Di-Galactosyl-Glycerol ist ein Grundbaustein des Galaktolipids Digalaktosyldiacylglycerin eines der am häufigsten vorkommenden Membranbestandteile von Pflanzen. Hölzl *et al.* (112) beschreiben, dass eine Reduktion von Galaktolipiden auf verringertes Wachstum bzw. verringerte Photosyntheseleistung hinweisen, und zudem für die Stabilität von Membranen verantwortlich sind.

Aus der potentiell gestörten Konvektivität der Peroxisomen resultiert ein beeinträchtigter metabolischer Fluss der Photorespirationsintermediate zwischen den Kompartimenten, was einerseits zur Akkumulation von Glutamat und seinen Vorstufen bzw. Abbauprodukten und andererseits zur Reduktion von Serin/Glycin führt. Die reduzierte Regeneration von Kohlenstoffkörpern wirkt sich negativ auf die photosynthetische Leistung bzw. auf den photosynthetischen Fluss von Assimilaten aus. Cousins *et al.* (109) zeigten an einer peroxisomalen Malat-Dehydrogenase (PMDH) Doppelmutante anhand von CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten eine Reduktion der Photosynthese von 30%. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Murray *et al.* (113), die bei einer peroxisomalen Hydroxypyruvat-Reductase (HPR) Mutante in Gerste eine 25%ige Reduktion der Photosynthese nachweisen konnten. Die Reduktion an photosynthetischen Assimilaten, die die Kohlenstoffgerüste für alle anderen Stoffwechsel-Intermediate darstellen, führt zu systematischen Dezimierungen verschiedenster Metabolite der Glycolyse und des Citrat-Zyklus. Im Gegensatz dazu wird durch die Akkumulation von Glutamat oder 2-Ketoglutarat ein Rückstau an Intermediaten (Citrat) ausgelöst, was Wringler *et al.* (114) als allgemeine Resonanzen bei einer Störung des photorespiratorische C<sub>2</sub>-Zyklus schildern. Schneiderei *et al.* (115) manipulierten den plastidären 2-Ketoglutarat/Malat-Translokator in Tabak Pflanzen, so dass analog zu unserer PEX 10 Mutante der Zyklus an photorespiratorischen C<sub>2</sub>-Körpern gestört wurde. Das metabolische Muster der DiT1-Mutanten resultierte in einer Akkumulation von 2-Ketoglutarat, Citrat und Malat, der Reduktion der photosynthetischen Kapazität und der damit verbundenen Reduktion von Kohlenhydraten, was eine vergleichbare physiologische Resonanz mit unserer PEX 10 Mutante darstellt.

Aufgrund der hohen Kompartimentierung der Photorespiration und den verschiedensten Bypässen ist die Interpretationen von Metabolic Profiling-Daten, die in der Regel Homogenate des gesamten Blattes verwerten, schwierig und nicht eindeutig. Trotzdem

#### 4. Metabolische Charakterisierung der *A. thaliana* PEX 10 Photorespirationsmutante

zeigen die erörterten Schlussfolgerungen kausale Zusammenhänge zwischen Photorespiration, Photosynthese und Citrat- Zyklus, und manifestieren die Vergleichbarkeit mit anderen Photorespirationsmutanten. Photorespiratorische Phänotypen können einerseits durch die Reduktion der Aktivität des Enzymapparates durch RNAi- und Knockout-Mutationen (99,105,109,114) hervorgerufen werden. Andererseits können durch Mutationen der Membran- Kanäle oder Transporter (wie bei Schneiderei *et al.* (115)) oder durch begrenzte Assoziationsfähigkeit der Organellen zueinander (wie bei unserer PEX 10 Mutante) eingeschränkte Intermediateflüsse resultieren, die ebenfalls in einen photorespiratorischen Phänotyp münden. Der hier determinierte eingeschränkte Fluss an Photorespirationsintermediaten führt zu einem charakteristischen „metabolischen Photorespirationsphänotyp“ der PEX 10 Mutanten – der sich in einer schlechten Performance des Primärmetabolismus und einen dysfunktionalen Phänotyp offenbart.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien und Equipment

#### 5.1.1 Chemikalien und Referenzverbindungen

Standardchemikalien wurden, soweit nicht gesondert ausgewiesen, in analytischer Reinheit von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Penzberg, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Wasser wurde mittels hausinterner Milli-Q- Anlage (Fa. Millipore, Billerica, MA, USA) entionisiert und ausschließlich in dieser Form verwendet. Puffer und Lösungen wurden stets am Tag ihrer Verwendung frisch zubereitet.

#### 5.1.2 Analytisches Equipment

HP 6890 Gaschromatograph gekoppelt an ein	(Fa. Agilent, Waldbronn, D)
Pegasus IV TOF Massenspektrometer Einspritzung via	(LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA)
Gerstel ALEX CIS 4	(GERSTEL GmbH & Co. KG, D)
Waters Acquity UPLC system gekoppelt an ein	(Waters, Mildford, MA, USA)
LTQ FT-ICR-Ultra Einspritzung via	(Thermo-Fisher, Bremen, D)
TriVersa NanoMate	(Advion, Ithaca, NY, USA)

### 5.2 Pflanzliches Untersuchungsmaterial

#### 5.2.1 Anzucht von Endophyten- freien *in vitro*- Pappelklonen

Die Anzucht von *in vitro*- Pappelklonen erfolgte am Institut für Forstgenetik in Waldsiedersdorf (44). Explantate (Meristeme) des Pappelklons 741 (♀ (P. alba x (P. davidiana + P. simonii) x P. tomentosa), Prof. Han, Beijing, China) wurden frei von kultivierbaren Bakterien als *in vitro*- Kulturen vermehrt. Die Gewinnung von meristematischen Zellen vollzog sich aus den Knospen von Keimlingen mit Hilfe eines Binokular- Mikroskops, die anschließend auf modifiziertem LS-Medium bei 22°C und 16 h Photoperiode ( $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert wurden. Bei dem Erreichen einer Länge von 1.5 cm der Sprösslinge (nach ca. 1 Monat Wachstum), wurden Spross und Wurzel homogenisiert und anschließend auf TSA-Medium als Bakterien- freie Kontrolle plattiert.

#### 5.2.2 *Paenibacillus*- Inokulation von Endophyten- freien *in vitro*- Pappelklonen

Die Inokulation von *in vitro*- Pappelklonen erfolgte mit *Paenibacillus* P22 Isolaten. Dazu wurden 5 mm lange basale Stängel- Micro Cuttings (20 mm lang) übernacht mit TSA-Kulturmedium von P22 Isolaten (finale Konzentration ca.  $2 \times 10^7 \text{ cfu ml}^{-1}$ ) beimpft und anschließend auf BEMB<sub>200</sub>- Medium (Ewald und Suss 1993) kultiviert. 3 Wochen nach der Bakterien- Inokulation wurden die Sprösslinge für die Metabolitanalyse geerntet. Die Überprüfung der Bakterien- Kolonisation vollzog sich an fünf repräsentativen Testpflanzen, die ebenfalls auf TSA-Medium plattiert wurden. In den inokulierten Pflanzen rangierten die detektierten Bakteriendichten von  $4 \times 10^6$  bis zu  $1.2 \times 10^7 \text{ cfu g}^{-1}$ . Die dazu korrespondierenden Biomassen- Raten pro 1g Pflanzenmaterial rangieren um  $1 \times 10^{-5} \text{ g}$  Bakterien.

#### 5.2.3 Beprobung der kleinen und großen Kräuter des Jena Experiments

Die Beprobung der Pflanzen für das Jena Experiment vollzog sich auf der Versuchsfläche des Max-Planck-Instituts für Biogeochemie in Jena. In Roscher et al. (63) findet sich eine detaillierte Beschreibung über Design und Etablierung des Experiments. Für die Metabolitanalyse wurden 3m x 3m große Subplots innerhalb eines Plots gebildet. Anschließend wurden die Blätter von 3 Pflanzen pro Art und Plot als Mischprobe zusammengefasst. Zusätzlich musste auf eine möglichst zeitlich synchrone Beprobung

geachtet werden, so dass nur Blätter des gleichen Entwicklungsstandes Verwendung fanden.

### **5.2.4 Kultivierung von subletalen Arabidopsis PEX 10 Mutanten unter Normalatmosphäre**

Am Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität in München wurden unter der Leitung von Frau Prof. Christine Gietl durch Überexpression im Zink RING-Finger- Motiv punktmutierter Peroxine PEX10 im Wildtyp Hintergrund von Arabidopsis Photorespirationsmutanten erzeugt (101). Nach der Sterilisation der Samen mit 80% EtOH + 0,1% Triton-x-100 erfolgte das Ausplattieren auf MS-Agar- Platten (Murashige, Skoog, 1962), die dann bei 22°C und Dauerlicht von  $100\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  angezogen wurden. Nach 10 bis 14 Tagen folgte die Pikierung in Töpfen mit Fruhstorfer Einheitserde TypT, welche in Phytokammern (Conviron, Canada) unter Langtagbedingungen mit 16h Licht und 65% Luftfeuchte, 8h Dunkel und 75% Feuchte, bei 18°C Normalatmosphäre wuchsen. Für die Metabolitanalyse wurden mehrere Arabidopsis- Keimlinge aus einer Schale zu einer Mischprobe zusammengefasst.

### **5.2.5 Konditionierung von Arabidopsis PEX 10 Mutanten unter verschiedenen CO<sub>2</sub>- Partialdrücken**

Für die Konditionierung von PEX 10 Mutanten wurden Keimlinge unter Standardbedingungen 10 Tage unter hohem CO<sub>2</sub>- Partialdruck (1800 ppm CO<sub>2</sub>) angezogen. Anschließend erfolgte eine Transferierung auf Einheitserde, wo die Keimlinge weitere 6 Tage unter hohem CO<sub>2</sub>-Partialdruck (1800 ppm CO<sub>2</sub>) wuchsen. Die zu diesem Zeitpunkt geernteten Proben zeigten keinen dZn-Phänotyp. Daraufhin wurden die Seedlings 12 Tage lang in Normalatmosphäre kultiviert. In diesen Mutanten konnte sich der dysfunktionale dZn-Phänotyp manifestieren.



### 5.3 Software

LECO®ChromaTOF™ Version 3.32	(LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA)
Xcalibur™ Version 2.06	(Thermo-Fisher, Bremen, D)
SIEVE software Version 1.1	(Thermo-Fisher, Bremen, D)
GoBioSpace	(Hummel et al, unpublished)
MetMax (GC-GC-MS Data Matrix Creator)	(Hummel et al, unpublished)
TIGR MeV Software Version 4.1	( <a href="http://www.tm4.org/">http://www.tm4.org/</a> )
MATLAB® Version 7.0	(The Mathworks Inc., Natick, MA, USA)

### 5.4 Extraktion und Derivatisierung

#### 5.4.1 Metabolitextraktion mit CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O für GC-TOF-MS

Homogenisiertes Pflanzenmaterial (10-15 mg) wurden mit 1 mL einer eiskalten (-20°C) Extraktionslösung (CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O [v/v/v = 2.5:1:0.5]) nach Zugabe von 10 µL einer internen Standardlösung bestehend aus 200 µg D-Sorbitol-13C<sub>6</sub>/mL H<sub>2</sub>O (Fa. ISOTECH, Miamisburg, OH, USA) für 8 min unter Schütteln bei 4°C extrahiert. Nach anschließender Zentrifugation für 6 min bei 15.000 g und 4°C erfolgte eine Phasentrennung des erhaltenen Überstandes durch Zugabe von 500 µL H<sub>2</sub>O, vortexen für 1-2 min und Zentrifugation für 2 min bei 15.000 g und 4°C. Für anschließende Metabolitanalysen wurde die polare Phase komplett bis zur vollständigen Trockene im Vakuum eingengt.

#### 5.4.2 Derivatisierung für GC-TOF-MS

Eingengte Metabolitfraktionen wurden unter starkem Schütteln zunächst mit 20 µL einer frisch angesetzten Methoxyaminhydrochloridlösung (40 mg/mL Pyridin) für 90 min bei 30°C gelöst, und anschließend mit weiteren 135 µL MSTFA (Fa. Machery-Nagel, Düren, Deutschland) für 30 min bei 37°C inkubiert. Vor der Injektion wurden die derivatisierten Proben bei 14.000 g für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 1 µL Retentionsindex-Markerlösungen (n-Alkane C12-C26, je 2 µL/mL in Pyridin sowie n-Fettsäuremethylester-Standardlösung C8-C30, je 200 µg/mL CHCl<sub>3</sub>) versetzt.

### 5.4.3 Metabolitextraktion mit Methanol für LC-FT-MS

Homogenisiertes Pflanzenmaterial (100 mg) wurde mit 1 mL einer eiskalten (-20°C) Extraktionslösung (100% Methanol [v/v] + interner Standardlösung: Ampicillin und Corticosterone [1µg/ml]) für 8 min unter Schütteln bei 4°C extrahiert. Nach anschließender Zentrifugation für 6 min bei 15.000 g und 4°C erfolgte eine Einengung bis zur vollständigen Trockene im Vakuum. Für die folgende Metabolitanalyse wurde das Pellet in 100 µl Methanol (50% Methanol [v/v]) aufgenommen.

## 5.5 Metabolite Profiling

### 5.5.1 GC-TOF-MS basierte Metabolitanalyse

Die GC-TOF-MS basierte Metabolitanalyse erfolgte mit einem HP 6890 Gaschromatographen via Kaltaufgabe System von Gerstel mit deaktivierten Standard-ALEX-Linern (GERSTEL GmbH & Co. KG), gekoppelt an ein Pegasus IV TOF Massenspektrometer. Durch die splittlose Injektion von 1 µL derivatisierter Probe in das Kaltaufgabe System (60°C, 1 min isotherm, 30°C/min; 280°C, 3 min isotherm) kann eine nahezu diskriminierungsfreie Übertragung der Analyten auf die Säule garantiert werden. Als chromatographische Trennsäule wurde eine VF-5ms Kapillarsäule verwendet, 30m lang, 0.25-mm ID, 25 µm Film und eine 10m EZ-Guard Vorsäule (VARIAN, Palo Alto, USA), bei konstantem Fluss von 2 mL/min Helium mit temperaturprogrammierter Verdampfung (80°C, 2 min isotherm; 80-360°C, 15°C/min; 360°C, 5 min isotherm). Vor jeder Injektion wurde der Liner durch Injektion von 1 µL MSTFA gespült; nach ca. 80 Injektionen erfolgte ein manueller Linerwechsel. Die Datenakquisition erfolgte softwaregesteuert mit Hilfe der ChromaTOF™ Software bei einer Scanrate von 20 s<sup>-1</sup> in einem Massenbereich von m/z 71-600 nach Elektronenstoss- Ionisation bei 70 eV. Als Referenzgas für das (Auto)Tuning diente Trisperflourbutylamin (FC43) (Fa. PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, USA). Zu Beginn und am Ende jedes Probensets wurde ein Quality Control- Standardmix (QC-Mix) injiziert. Alle zu einer Probencharge gehörenden Chromatogramme wurden zunächst mit Hilfe der LECO®ChromaTOF™ Software und der [GMD@CSB.DB](http://GMD@CSB.DB) Spektrenbibliothek abgeglichen. Um einen genauen Retentionsabgleich mit der Bibliothek zu gewährleisten, müssen die systembedingten Retentions Shifts mit Hilfe von n-Alkanen und der Berechnung des Retentions Index ausgeglichen werden. Die annotierten Peaks werden daraufhin in einem Referenz- Chromatogramm markiert, welches anschließend gegen alle Chromatogramme

abgeglichen wird. Für die akkurate relative Quantifizierung wurde jede Fläche mittels isotoopenmarkierten Internen Standard und Frischgewicht normalisiert. Die von LECO<sup>®</sup>ChromaTOF<sup>™</sup> erzeugten Daten konnten dann mit Hilfe der Software GC-GC-MS Data Matrix Creator exportiert und als Matrix zur statistischen Auswertung abgelegt werden.

### 5.5.2 UPLC-FT-ICR-MS basierte Metabolitanalyse

Die UPLC-FT-ICR-MS basierte Metabolitanalyse erfolgte mit einem Waters Acquity UPLC System. Bei einer Flussrate von 400  $\mu\text{L}/\text{min}$  wurden 2  $\mu\text{L}$  Probe auf eine monolithische HSS T3 C18 reversed phase Kapillarsäule (100 x 2.1 mm ID, 1.8  $\mu\text{m}$  Particle Size, Waters) bei einer Temperatur von 40°C geladen. Nach 1-minütigem Waschen mit 99% Laufmittel **A** (0.1% [v/v] Ameisensäure in H<sub>2</sub>O) erfolgte die Elution durch eine 16-minütige lineare Gradientenelution von 35% zu 70% mit Laufmittel **B** (99.9% [v/v] ACN, 0.1% [v/v] Ameisensäure) bei einer Flussrate von 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Anschließend folgte 2.5 min lang eine Re-Äquilibration der Säule mit 99% Solvent **A**. Eluierte Komponenten wurden via TriVersa NanoMate bei einem Splitmodus von 1:1000 in die FT-ICR eingespritzt. Das heißt, 99.9% des Flusses gelangten in den Müll und nur 0.1% des Flusses wurde direkt in die FT-ICR-MS eingespritzt. Die Injektionsrate in das Massenspektrometer pro Probe betrug 400 nL/min via Nanospray Chip (Type A, Advion), dazu wurden 1.8 kV Electrospray Voltage im positiven und 1.9 kV Electrospray Voltage im negativen Ionisation Mode angewendet. Im Full-Scan-Modus der FT-ICR-MS erfolgte eine Abdeckung des Massenbereichs zwischen 200 - 2000 Dalton. Die Auflösung des Massenspektrometers wurde auf 50000 eingestellt, bei einer maximalen Ladungszeit der ICR-Zelle von 500ms. Die Transfertemperatur betrug 200°C und die Massenspektren wurden von 1 min bis 17 min UPLC- Laufzeit gesammelt.

Mit Hilfe der SIEVE Software erfolgte die Extrahierung von Molekularer Masse, Retention Time und Peak Intensitäten aus den Raw Files. Die SIEVE Software berücksichtigt alle gemessenen m/z (Massen) und integriert diese dann in eine Datenmatrize zwecks semi-quantitativer Auswertung. Biologisch relevante Massen wurden in die Software GoBioSpace geladen, welche dann anhand der exakten Masse, Summenformeln generiert und diese via Datenbank- Abgleich versucht zu annotieren. Mit Hilfe der internen Standards konnten Retentions- Shift ausgeglichen und eine akkurate relative Quantifizierung realisiert werden. Die Datenbanksuche erfolgte mit einer Genauigkeit von 2 ppm und chemische Formeln wurden mit den Elementen C, H, N, O, P oder S erstellt.

### 5.6 Chemometrische Analyse

#### 5.6.1 Dimensionsreduktion – Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Dimensionsreduktion der aus der Metabolitanalyse resultierenden hochdimensionalen Datensätze zur zweidimensionalen Darstellung der Datenmengen mittels Hauptkomponentenanalyse erfolgte nach vorangegangener Transformation ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ) in TIGR MeV, welche auf der Kovarianzmatrix gemäß des implementierten PCA-Scriptes basiert. Durch Transformation mehrdimensionaler Merkmale in einen Vektorraum mit einer geringeren Zahl aussagekräftiger Linearkombinationen (die "Hauptkomponenten") wird die Anzahl an Variablen minimiert.

#### 5.6.2 T-Test- Clustering

T-Test- Clustering und farbcodierte Darstellung relativer Änderungen der Metabolitkonzentrationen erfolgte nach vorangegangener Transformation ( $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$ ) mit Hilfe des in TIGR MeV implementierten Algorithmus. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen durchgeführt. Die zur Verwerfung der Nullhypothese, dass die  $n$  untersuchten Stichproben sich nicht unterscheiden, angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p$  sind den einzelnen Kapiteln zu entnehmen. Die Clusteranalyse erfolgte mit den Distanzfunktionen K-mean- Algorithmus und der euklidische Distanz zur Bestimmung des Abstands oder der Ähnlichkeiten von Metabolite- Gruppen.

#### 5.6.3 Varianzanalyse

Die Varianzanalyse (one-way Analysis of Variance, ANOVA) untersucht, ob sich die Erwartungswerte der abhängigen Variable zwischen den verschiedene Gruppen (kategorialen Variablen) unterscheiden. Mit dem in TIGR MeV implementierten Fisher-Verteilung- Tests wurde getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Die integrierte Clusteranalyse ordnet ähnliche Metabolite-Varianzen anhand der Distanzfunktionen K-mean und der euklidische Distanz zu Gruppen.

## 6 Zusammenfassung

Ein genereller Ansatz zur Charakterisierung von biologischen Systemen bietet die Untersuchung des Metaboloms, dessen Analyse als „Metabolomics“ bezeichnet wird (1). „Omics“- Technologien haben das Ziel, ohne Selektionskriterien möglichst alle Bestandteile einer biologischen Probe zu detektieren (identifizieren und quantifizieren), um daraus Rückschlüsse auf nicht vorhersehbare und somit neuartige Korrelationen in biologischen Systemen zu ziehen (2). Ein zentrales Dogma in der Biologie besteht in der Kausalität zwischen Gen – Enzym – Metabolite. Perturbationen auf einer Ebene rufen systemische Antworten hervor, die in einem veränderten Phänotyp münden können. Metabolite sind die Endprodukte von zellulären regulatorischen Prozessen, deren Abundanz durch die Resonanz auf genetische Modifikationen oder Umwelteinflüsse zurückzuführen ist (2). Zudem repräsentieren Metabolite ultimativ den Phänotyp eines Organismus und haben die Fähigkeit als Biomarker zu fungieren (3). Die integrale Analyse verschiedenster Stoffwechselwegen wie Krebszyklus, Pentosephosphatzyklus oder Calvinzyklus offeriert die Identifikation von metabolischen Mustern.

Die umfassende Charakterisierung aller Metabolite in einem System stellt jedoch hohe Anforderungen an die verwendeten analytischen Methoden, weil Metabolite aus stofflicher Sicht mannigfaltig sind und in einem weiten Konzentrationsbereich vorliegen. Moderne Metabolomics- Techniken sind das targeted und untargeted Profiling, die zur Charakterisierung von biologischen Systemen breite Anwendung in den Lebenswissenschaften gefunden haben. Targeted und untargeted Profiling sind zwei komplementäre Strategien zur Metabolomanalyse, wobei das targeted Profiling zielgerichtet alle bekannten Analyten und das untargeted Profiling alle potentiellen messbaren Analyten quantifiziert (5,8). Die aktuell leistungsstärksten untargeted Profiling- Methoden sind LC/MS Techniken mittels FT-ICR-, Orbitrap- oder Q-ToF- Massenanalysatoren. Der Vorteil dieser Geräte liegt in der Bestimmung exakter Masse zu Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ), wodurch mit Hilfe von MS/MS- Experimenten die strukturelle Aufklärung der unbekannt Analyten möglich wird. Aufgrund des großen Scan- Bereich der Massendetektoren können in einer Probe gleichzeitig bis zu einige tausend Metabolite detektiert werden (11,12). Die exakte Identifikation aller gemessenen unbekannt Analyten ist momentan noch illusorisch, daher liegt der Fokus auf wenigen biologisch relevanten Metaboliten. Infolge der momentan noch unvollständigen Identifikation zahlreicher Metabolite in der untargeted Analyse, ist die target Analyse weiterhin eine adäquate Profiling- Methode zur biologischen Diagnostik. Für das targeted Profiling hat es vorwiegend sich als sinnvoll erwiesen, die GC/MS sowie einige

LC/MS Anwendungen (Quadrupol, Linear Ion Trap) einzusetzen. Zusätzlich wird die NMR-Spektroskopie zur Bestimmung von Molekülstrukturen und zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen eingesetzt. Die GC/MS-Technik ist aufgrund hoher Trennleistungen, enormer Sensitivität, kurzen Analysenzeiten und standardisierten Referenz-Bibliotheken die Standard- Methode in der Metabolitanalytik (5). Das erklärte Ziel von Metabolomics- Analysen ist es, das Metabolom eines biologischen Systems vollständig zu charakterisieren. Daher erfolgt in modernen Metabolomics- Strategien ein Splitting der Proben, die dann mittels 2-3 komplementären analytischen Methoden vermessen werden, um so einen globalen chemischen Ansatz zu gewährleisten.

In dieser Arbeit wurden sowohl das targeted Profiling (GC-TOF-MS) als auch das untargeted Profiling (GC-TOF-MS und LC-FT-MS) als analytische Strategien genutzt, um biologische Systeme anhand ihrer Metabolite zu charakterisieren und um physiologische Muster als Resonanz auf endogene oder exogene Stimuli zu erkennen. Dabei standen die metabolische, phänotypische und genotypische Plastizität von Pflanzen im Fokus der Untersuchungen. Metabolische Varianzen eines Phänotyps reflektieren die genotyp-abhängige Resonanz des Organismus auf umweltbedingte Parameter (abiotischer und biotischer Stress, Entwicklung) und können mit sensitiven Metabolite Profiling Methoden determiniert werden (14). Diese Anwendungen haben unter anderem auch zum Begriff des „Environmental Metabolomics“ geführt (15).

In Kapitel 2 wurde der Einfluss biotischer Interaktionen von endophytischen Bakterien auf den Metabolismus von Pappelklonen untersucht; Kapitel 3 betrachtet die metabolische Plastizität von Pflanzen im Freiland auf veränderte biotische Interaktionsmuster (Konkurrenz/Diversität/Artenzusammensetzung); Abschließend wurde in Kapitel 4 der Einfluss von spezifischen genetischen Modifikationen an Peroxisomen und den daraus resultierenden veränderten metabolischen Fluss der Photorespiration dargestellt.

Die Inokulation mit Endophyten führte zu einem signifikant veränderten Primärmetabolismus der Pappelklone, der wahrscheinlich aus der symbiotischen Interaktion der Pappeln mit *Paenibacillus sp.* resultiert. Das determinierte metabolische Muster folgt dem Modell von Prell *et al.* (45), wonach ein Stickstoff- und Kohlenstoffaustausch zwischen den Partnern stattfand. Zudem lassen Hinweise eine N<sub>2</sub>-Fixierung von *Paenibacillus sp.* vermuten.

Die metabolische Charakterisierung von konkurrenzschwachen und konkurrenzstarken Kräutern im Jena Experiment identifizierte zwei wesentliche Einflussfaktoren: Einen Leguminosen- Effekt für kleine Kräuter und einen Diversitäts- Effekt für kleine konkurrenzschwache Arten. Demgegenüber zeigten Arten mit höherer Dominanz deutlich geringere Variationen bezüglich der analysierten Einflussfaktoren in den Metabolitprofilen. Dementsprechend konnten für fünf kleine Kräuter in der Untersuchung von 2006 artspezifische, metabolische Phänotypen aufgrund von Leguminosen- Anwesenheit charakterisiert werden. Im Untersuchungsjahr 2008 dagegen wurden artspezifische,

metabolische Phänotypen von konkurrenzschwachen Pflanzen entlang eines Diversitätsgradienten gefunden. Induziert wurde die phänotypische Plastizität bei den konkurrenzschwachen Arten durch veränderte pflanzliche Interaktionsmuster, die metabolische Adaptationen zur Folge hatten.

Die metabolische Analyse der dysfunktionalen PEX 10 Mutanten ergab einen gestörten metabolischen Fluss innerhalb des Photorespirationszykluses, was sich anhand zahlreicher Intermediate der Photorespiration, der Photosynthese und des Citrat- Zyklus belegen lässt und in einen charakteristischen „metabolischen Photorespirationsphänotyp“ mündet. An den komplexen Veränderungen im gesamten Primärmetabolismus wird ersichtlich, wie bedeutend das Recycling von Oxygenase- Produkten durch die Photorespiration für den Metabolismus der Pflanze ist. In den PEX 10 Mutanten ist wahrscheinlich die Assoziationsfähigkeit der Peroxisomen zu den Membranen anderer Organellen des Photorespirationsapparats eingeschränkt. Daraus resultiert eine reduzierte Regeneration von Kohlenstoffkörpern, eine damit verbundene reduzierte photosynthetische Leistung bzw. ein reduzierter photosynthetischer Fluss von Assimilaten. Die eingeschränkte photosynthetische Leistung der PEX 10 Mutanten offenbart sich in einer schlechten Performance des Primärmetabolismus und einen dysfunktionalen Phänotyp.

Aufgrund der sensitiven Analyse- Technik konnten metabolische Phänotypen, die nicht zwingend in einen morphologischen Phänotyp mündeten, in drei biologischen Systemen identifiziert und in einen stoffwechselphysiologischen Kontext gestellt werden. Die drei untersuchten biologischen Systeme – in *vitro*- Pappeln, Grünland- Arten (Arrhenatherion-Gesellschaft) und der Modellorganismus (*Arabidopsis*) – belegten anschaulich die Plastizität des Metabolismus der Arten, welche durch endogene oder exogene Faktoren erzeugt wurden.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., and Kell, D. B. (2004) *Trends in biotechnology* **22**(5), 245-252
2. Fiehn, O. (2002) *Plant molecular biology* **48**(1-2), 155-171
3. Willmitzer, L. (2007) *Febs J* **274**, 64-64
4. Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L., and Bino, R. (2002) *The Plant cell* **14**(7), 1437-1440
5. Fiehn, O. (2001) *Comparative and functional genomics* **2**(3), 155-168
6. Weckwerth, W., Wenzel, K., and Fiehn, O. (2004) *Proteomics* **4**(1), 78-83
7. Weckwerth, W., and Morgenthal, K. (2005) *Drug discovery today* **10**(22), 1551-1558
8. Saghatelian, A., and Cravatt, B. F. (2005) *Current opinion in chemical biology* **9**(1), 62-68
9. Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A., and Kopka, J. (2008) *Bioinformatics (Oxford, England)* **24**(5), 732-737
10. Hübschmann, H. J. (2001) *Handbook of GC/MS.*, Weinheim. ISBN 3-527-30170-4 Ed.
11. Kind, T., and Fiehn, O. (2007) *Bmc Bioinformatics* **8**, -
12. Giavalisco, P., Hummel, J., Lisec, J., Inostroza, A. C., Catchpole, G., and Willmitzer, L. (2008) *Analytical chemistry* **80**(24), 9417-9425
13. Morgenthal, K. (2007) *Protein Profiling und Metabolite Profiling in Arabidopsis thaliana im systembiologischen Kontext*, Fakultät III Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin
14. Morgenthal, K., Wienkoop, S., Wolschin, F., and Weckwerth, W. (2007) *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **358**, 57-75
15. Viant, M. R. (2009) *Metabolomics* **5**(1), 1-2
16. Chanway. (1998) *Sydowia* **50**:(149–170.)
17. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, & M. W., and JW, K. (1997) *Can J Microbiol* **43**:(895–914.)
18. Misko, A. L., Germida, J.J. (2002) *FEMS Microbiology Ecology* **42**(pp. 399–407)
19. Sturz, A. V., Nowak, J. (2000) *Appl. Soil Ecol.* **15**(pp. 183–190)
20. Van Buren, A. M. A., C.; Ishimaru, C.A. (1993) *Phytopathol* **83**.(1406.)
21. Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., and Zhou, S. (2005) *FEMS microbiology letters* **247**(2), 147-152
22. Glick, B. R., Penrose, D. M., and Li, J. (1998) *J Theor Biol* **190**(1), 63-68
23. Van Aken, B., Yoon, J. M., and Schnoor, J. L. (2004) *Applied and environmental microbiology* **70**(1), 508-517
24. Ewald, F. (2006) *Tree Transgenesis. Recent Developments.*, Springer, Berlin Heidelberg.
25. Ulrich, K., Ewald, D., and Stauber, T. (2007) *BFH-Nachrichten* **3**
26. THOMAS, P. (2006) *Journal of applied microbiology* ISSN 1364-5072
27. Ulrich, K., Becker, R., Ulrich, A., Ewald, D. (2006) *Landesamtes für Verbraucherschutz Landwirtschaft und Flurneuordnung*, (April 2006)
28. Ulrich, K., Ulrich, A., and Ewald, D. (2008) *FEMS Microbiol Ecol* **63**(2), 169-180
29. LEBUHN, M., HEULIN, T., HARTMANN, A. . (1997) *FEMS microbiology ecology* ISSN 0168-6496
30. Beatty, P. H., and Jensen, S. E. (2002) *Can J Microbiol* **48**(2), 159-169
31. Park, M. J., Kim, H. B., An, D. S., Yang, H. C., Oh, S. T., Chung, H. J., and Yang, D. C. (2007) *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **57**(Pt 1), 146-150
32. Timmusk, S., and Wagner, E. G. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* **12**(11), 951-959
33. Kiers, E. T., and van der Heijden, M. G. (2006) *Ecology* **87**(7), 1627-1636
34. Stougaard, J. (2000) *Plant physiology* **124**(2), 531-540



35. Moreau, D., Voisin, A. S., Salon, C., and Munier-Jolain, N. (2008) *Journal of experimental botany* **59**(13), 3509-3522
36. Broughton, W. J., Hanin, M., Relic, B., Kopcinska, J., Golinowski, W., Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Reuhs, B., Marie, C., Kobayashi, H., Bordogna, B., Le Quere, A., Jabbouri, S., Fellay, R., Perret, X., and Deakin, W. J. (2006) *Journal of bacteriology* **188**(10), 3654-3663
37. Lau, J. A., Puliafico, K. P., Kopshever, J. A., Steltzer, H., Jarvis, E. P., Schwarzlander, M., Strauss, S. Y., and Hufbauer, R. A. (2008) *The New phytologist* **178**(2), 412-423
38. Long, H. H., Schmidt, D. D., and Baldwin, I. T. (2008) *PLoS ONE* **3**(7), e2702
39. Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassan, F., and Luna, V. (2007) *Applied microbiology and biotechnology* **74**(4), 874-880
40. Doty, S. L., Oakley, B., Xin, G., Kang, J. W., Singleton, G., Khan, Z., Vajzovic, A., and Staley, J. T. (2009) *Symbiosis (2009)* 47:xx-xx. ISSN 0334-5114. (In press.)
41. Sakiyama, C. C., Paula, E. M., Pereira, P. C., Borges, A. C., and Silva, D. O. (2001) *Letters in applied microbiology* **33**(2), 117-121
42. Ma, Y. C., and Chen, S. F. (2008) *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **58**(Pt 2), 319-323
43. Weckwerth, W. (2003) *Annual review of plant biology* **54**, 669-689
44. Ulrich, K., Stauber, T., Ewald, D. (2008) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **93**: 347-351.
45. Prell, J., and Poole, P. (2006) *Trends in microbiology* **14**(4), 161-168
46. Meyer, R. C., Steinfath, M., Lisec, J., Becher, M., Witucka-Wall, H., Torjek, O., Fiehn, O., Eckardt, A., Willmitzer, L., Selbig, J., and Altmann, T. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(11), 4759-4764
47. Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A. F. W. (2002) *Lehrbuch der Botanik*, 35. Auflage Ed.
48. Tilman, D., Reich, P. B., and Knops, J. M. (2006) *Nature* **441**(7093), 629-632
49. Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M. C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P. G., Finn, J. A., Freitas, H., Giller, P. S., Good, J., Harris, R., Hogberg, P., Huss-Danell, K., Joshi, J., Jumpponen, A., Korner, C., Leadley, P. W., Loreau, M., Minns, A., Mulder, C. P., O'Donovan, G., Otway, S. J., Pereira, J. S., Prinz, A., Read, D. J., and et al. (1999) *Science (New York, N.Y)* **286**(5442), 1123-1127
50. Ellenberg, H. (1988) *Vegetation ecology of Central Europe*.
51. Sarr, D. A., Hibbs, D. E., and Huston, M. A. (2005) *The Quarterly review of biology* **80**(2), 187-212
52. Grime, J. P. (2001) *Plant Strategies, Vegetation Processes and Ecosystem Properties*, John Wiley, Chichester.
53. Townsend, C. R., Harper, J. L., Begon, M. E. (2003) *Ökologie*, 2. Auflage Ed.
54. Tilman, D. (1997) *Resource Competition and Community Structure*, Princeton Univ. Press, Princeton, NJ
55. REYNOLDS, H. L. (1999) *Plant interactions: competition.*, Handbook of Functional Plant Ecology
56. Brooker, R. W., Maestre, F. T., Callaway, R. M., Lortie, C. L. (2008) *Journal of Ecology* **2008**, *96*, 18–34 **ESSAY REVIEW**
57. Marschner, H. (1995) *'Mineral nutrition of higher plants.'*
58. Spehn, E., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., Hector, A., Caldeira, M. C. (2002) *Oikos* **98**: 205–218.
59. Mulder, C., Jumpponen, A., Högberg, P., Huss-Danell, K.,. (2002) *Oecologia* **Volume 133, Number 3 / November**
60. Schmid, B. (1996) *GAIA* **5**: 225-235.
61. Seidl, I., Gowdy, J. (1999) *GAIA* **8**: 102-112.
62. Kluge, G., Müller-Westermeier, G. (2000) Das Klima ausgewählter Orte der Bundesrepublik Deutschland: Jena. In., Berichte des Deutschen Wetterdienstes 213. Offenbach/Main.

63. Roscher, C., Schumacher, J., Baade, J., Wilcke, W., Gleixner, G., Weisser, W. W., Schmid, B., and Schulze, E. D. (2004) *Basic Appl Ecol* **5**(2), 107-121
64. Grime, J. P. (1977) *Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory*, Am Nat
65. Gause, G. F. (1934) *The Struggle for Existence*, Williams and Wilkins. In.
66. Harpole, W. S., and Tilman, D. (2007) *Nature* **446**(7137), 791-793
67. Questad, E. J., and Foster, B. L. (2008) *Ecology letters* **11**(7), 717-726
68. Silvertown, J. (2004) *TRENDS in Ecology and Evolution* **Vol.19 No.11**(Review)
69. Hooper, D. U., Dukes, J.S. (2004) *Ecol Lett* **7**:95–105
70. Gibon, Y., Usadel, B., Blaesing, O. E., Kamlage, B., Hoehne, M., Trethewey, R., and Stitt, M. (2006) *Genome biology* **7**(8), R76
71. Roscher, C., Schumacher, J., Weisser, W. W., Schmid, B., and Schulze, E. D. (2007) *Oecologia* **154**(3), 535-549
72. Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., and Willmitzer, L. (2000) *Nature biotechnology* **18**(11), 1157-1161
73. Davey, M. P., Burrell, M. M., Woodward, F. I., and Quick, W. P. (2008) *The New phytologist* **177**(2), 380-388
74. Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M. & Sieman, E. (1997) *Science*, **277**, 1300–1302.
75. Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., and Wardle, D. A. (2001) *Science (New York, N. Y)* **294**(5543), 804-808
76. Fritz, C., Mueller, C., Matt, P., Feil, R., and Stitt, M. (2006) *Plant, cell & environment* **29**(11), 2055-2076
77. Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., and Stitt, M. (2006) *Plant J* **46**(4), 533-548
78. Stitt, M., Muller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W. R., and Krapp, A. (2002) *Journal of experimental botany* **53**(370), 959-970
79. Marschner, H. (1995) *Ed 2. Academic Press Limited, London*
80. Crawford, N. M. (1995) *The Plant cell* **7**(7), 859-868
81. Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., and Stitt, M. (2004) *Plant physiology* **136**(1), 2483-2499
82. Stitt, M., and Krapp, A. (1999) *Plant Cell and Environment* **22**(6), 583-621
83. Dassler, A., Roscher, C., Temperton, V. M., Schumacher, J., and Schulze, E. D. (2008) *Plant Biology* **10**(5), 573-587
84. Temperton, V. M., Mwangi, P. N., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., and Buchmann, N. (2007) *Oecologia* **151**(2), 190-205
85. Tomm, G. O., Walley, F. L., vanKessel, C., and Slinkard, A. E. (1995) *Agron J* **87**(6), 1078-1085
86. Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H. R., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., Bucking, H., Lammers, P. J., and Shachar-Hill, Y. (2005) *Nature* **435**(7043), 819-823
87. Paynel, F., Murray, P. J., and Cliquet, J. B. (2001) *Plant Soil* **229**(2), 235-243
88. Palmborg, C., Scherer-Lorenzen, M., Jumpponen, A., Carlsson, G., Huss-Danell, K., and Hogberg, P. (2005) *Oikos* **110**(2), 271-282
89. Stitt, M., Gibon, Y., Lunn, J. E., and Piques, M. (2007) *Funct Plant Biol* **34**(6), 526-549
90. Grime, J. P. (1998) *J Ecol* **86**(6), 902-910
91. Werger, M. J. A., Hirose, T., During, H. J., Heil, G. W., Hikosaka, K., Ito, T., Nachinshonhor, U. G., Nagamatsu, D., Shibasaki, K., Takatsuki, S., van Rheenen, J. W., and Anten, N. P. R. (2002) *J Veg Sci* **13**(5), 615-626
92. Jumpponen, A., Mulder, C. P. H., Huss-Danell, K., and Hogberg, P. (2005) *J Ecol* **93**(6), 1136-1147
93. Bloom, A. J., Chapin, F.S., Mooney ,H.A. (1985) *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 363–392.
94. Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L. (1998) *Plant Physiological Ecology*, Springer, New York.

95. Thein, S., Roscher, C., and Schulze, E. D. (2008) *Basic Appl Ecol* **9**(5), 475-484
96. Schopfer, P., Brennicke, A. (2006) *Pflanzenphysiologie*, 6. Auflage Ed., Spektrum
97. Valladares, F., Gianoli, E., and Gomez, J. M. (2007) *New Phytologist* **176**(4), 749-763
98. Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., and Leegood, R. C. (2000) *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **355**(1402), 1517-1529
99. Somerville, C. R. (2001) *Plant physiology* **125**(1), 20-24
100. Brown, L. A., and Baker, A. (2008) *Mol Membr Biol* **25**(5), 363-375
101. Schumann, U., Prestele, J., O'Geen, H., Brueggeman, R., Wanner, G., Giet, C. (2006) *PNAS*
102. Schumann, U., Wanner, G., Veenhuis, M., Schmid, M., Gietl, C. (2003) *PNAS*
103. Eckert, J. H., and Erdmann, R. (2003) *Rev Physiol Bioch P* **147**, 75-121
104. Bari, R., Kebeish, R., Kalamajka, R., Rademacher, T., and Peterhansel, C. (2004) *Journal of experimental botany* **55**(397), 623-630
105. Timm, S., Nunes-Nesi, A., Pamik, T., Morgenthal, K., Wienkoop, S., Keerberg, O., Weckwerth, W., Kleczkowski, L. A., Fernie, A. R., and Bauwe, H. (2008) *The Plant cell* **20**(10), 2848-2859
106. Niessen, M., Thiruveedhi, K., Rosenkranz, R., Kebeish, R., Hirsch, H. J., Kreuzaler, F., and Peterhansel, C. (2007) *Journal of experimental botany* **58**(10), 2709-2715
107. Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H. J., Rosenkranz, R., Stabler, N., Schonfeld, B., Kreuzaler, F., and Peterhansel, C. (2007) *Nature biotechnology* **25**(5), 593-599
108. Chia, D. W., Yoder, T. J., Reiter, W. D., and Gibson, S. I. (2000) *Planta* **211**(5), 743-751
109. Cousins, A. B., Pracharoenwattana, I., Zhou, W. X., Smith, S. M., and Badger, M. R. (2008) *Plant physiology* **148**(2), 786-795
110. Fernie, A. R., Tauberger, E., Lytovchenko, A., Roessner, U., Willmitzer, L., and Trethewey, R. N. (2002) *Planta* **214**(4), 510-520
111. Chen, S. A., Hajirezaei, M., Peisker, M., Tschiersch, H., Sonnewald, U., and Bornke, F. (2005) *Planta* **221**(4), 479-492
112. Hoelzl, G., and Doermann, P. (2007) *Prog Lipid Res* **46**(5), 225-243
113. Murray, A. J., Blackwell, R. D., and Lea, P. J. (1989) *Plant physiology* **91**(1), 395-400
114. Wingler, A., Lea, P. J., and Leegood, R. C. (1999) *Planta* **207**(4), 518-526
115. Schneidereit, J., Hausler, R. E., Fiene, G., Kaiser, W. M., and Weber, A. P. M. (2006) *Plant Journal* **45**(2), 206-224

## 8 Anhang

**Tabelle A-1 (zu Kap. 2):**

Gezeigt sind alle (teilweise) identifizierten Metabolite aus Exp.1 und Exp.2 mit Retentions Index und einer spezifischen Masse (QM) mit der quantifiziert wurde.

Retention Index	QM	Pappel1	Pappel2
		Metabolite	Metabolite
1098.7	100	*Alanine (2TMS)	*Alanine (2TMS) MP
1117.9	99	*Glycine (2TMS)	*Glycine (2TMS)
1171.0	142	*Proline (2TMS) MP	*Proline (2TMS) MP
1204.8	144	*L-Valine (2TMS)	*L-Valine (2TMS)
1242.2	189	*Urea (2TMS)	*Urea (2TMS)
1252.4	116	*L-Serine (2TMS)	*L-Serine (2TMS)
1253.7	205	*Glycerol (3TMS)	
1258.9	130	*Leucine (2TMS)	*Leucine (2TMS)
1261.3	299	*Phosphoric acid (3TMS)	*Phosphoric acid (3TMS)
1281.2	158	*Isoleucine (2TMS)	*Isoleucine (2TMS)
1288.0	130	*L-Threonine (2TMS)	*L-Threonine (2TMS)
1293.7	102	*4-Aminobutyric acid (2TMS)	
1298.7	174	*Glycine (3TMS)	*Glycine (3TMS)
1304.7	180	*Nicotinic acid (1TMS)	*Nicotinic acid (1TMS)
1305.2	247	*Succinic acid (2TMS)	*Succinic acid (2TMS)
1312.5	189	*Glyceric acid (3TMS)	*Glyceric acid (3TMS)
1339.0	245	*Fumaric acid (2TMS)	*Fumaric acid (2TMS)
1342.8	204	*Serine (3TMS)	*L-Serine (3TMS)
1349.4	103	*Homoserine (2TMS)	
1371.3	247	*Threonic acid-1,4-lactone (2TMS)	*Threonic acid-1,4-lactone (2TMS)
1381.9	174	*Serine, O-acetyl- (2TMS)	*Serine, O-acetyl- (2TMS)
1416.0	160	*Aspartic acid (2TMS)	*Aspartic acid (2TMS)
1416.7	174	*Alanine, beta- (3TMS)	
1467.9	233	*Malic acid (3TMS)	*Malic acid (3TMS)
1477.9	217	*Threitol (4TMS)	*Erythritol (4TMS)
1491.9	179	*Nicotinamide (1TMS)	
1509.1	176	*Methionine (2TMS)	
1522.9	156	*oxo-Proline, 5-oxo-1-(3TMS)	*oxo-Proline, 5-oxo-1-(3TMS)
1532.1	292	*Threonic acid (4TMS)	*Threonic acid (4TMS)
1560.5	198	*2-Ketoglutaric acid (2TMS)	*2-Ketoglutaric acid (2TMS)
		*Ornithine (Arginine, Citrulline) (3TMS)	*Ornithine (Arginine, Citrulline) (3TMS)
1597.9	142		
1602.5	246	*Glutamic acid (3TMS)	
1623.9	218	*L-Phenylalanine (2TMS)	*L-Phenylalanine (2TMS) RI 1632
1627.9	217	*Xylose major (4TMS)	*Xylose major (4TMS)
1630.0	217	*Arabinose (4TMS)	*Arabinose (4TMS)
1657.3	116	*L-Asparagine (3TMS)	*L-Asparagine (3TMS)
1701.1	117	*Fucose (4TMS)	*Fucose (4TMS)
1725.0	174	*Putrescine (4TMS)	
1736.4	299	*L-Glycerol-3-phosphate (4TMS)	*Glycerol-3-phosphate (4TMS)
1761.3	156	*Glutamine, DL- (3TMS)	
1775.7	204	*Shikimic acid (4TMS)	*Shikimic acid (4TMS)

## 8. Anhang

1789.3	273	*Citric acid (4TMS) *Ornithine (Arginine, Citrulline)	*Citric acid (4TMS) *Ornithine (Arginine, Citrulline)
1792.5	142	(4TMS)	(4TMS)
1801.0	157	*L-Arginine (5TMS)	*Arginine (Citrulline) (3TMS)
1823.6	345	*Quinic acid (5TMS)	*D(-)-Quinic acid (5TMS)
1830.0	245	*Dehydroascorbic acid; Ascorbic acid	*Dehydroascorbic acid; Ascorbic acid
1845.0	307	*Fructose (5TMS)	*Fructose (5TMS)
1882.1	160	*Glucose (5TMS)	*Glucose (5TMS)
1902.3	154	*Histidine (3TMS)	
1917.5	218	*Tyrosine (3TMS)	*Tyrosine (3TMS)
1959.2	292	*Galactonic acid (6TMS)	
1964.8	333	*Gluconic acid (6TMS)	*Gluconic acid (6TMS)
1995.6	333	*Saccharic acid (6TMS)	*Glucaric acid (6TMS)
2009.7	333	*Galactaric acid (6TMS)	
2063.0	305	*myo-Inositol (6TMS)	*myo-Inositol (6TMS)
2149.8	143	*Phytol (1TMS)	*Phytol (1TMS)
2208.5	202	*Tryptophan, D5- (3TMS)	*L-Tryptophan (3TMS)
2264.1	315	*Fructose-6-phosphate (6TMS)	*Fructose-6-phosphate (6TMS)
2280.0	387	*Glucose-6-phosphate (6TMS)	
2485.0	361	*Salicin (5TMS)	*Salicin
2596.9	451	*Sucrose (8TMS)	*Sucrose (8TMS)
2709.0	204	*Laminaribiose (8TMS)	
2945.6	255	*3-cis-Caffeoylquinic acid (6TMS)	*3-cis-Caffeoylquinic acid (6TMS)
3051.9	204	*Digalactosylglycerol	
3073.7	255	*3-trans-Caffeoylquinic acid (6TMS)	*3-trans-Caffeoylquinic acid (6TMS)
3276.4	95	*Campesterol (1TMS)	
3346.4	129	*beta-Sitosterol (1TMS)	*Sitosterol, beta- (1TMS)?
3357.9	129	*Fucosterol (1TMS)	

**Tabelle A-2 (zu Kap. 3):**

Gezeigt sind alle (teilweise) identifizierten Metabolite der kleinen Kräuter aus der Untersuchung von 2006 mit Retentions Index und einer spezifischen Masse (QM) mit der quantifiziert wurde.

RI	QM	Analyten	Bellis	Veronica	Glechoma	Leontodon	Prunella
1088.0	152	*3-Hydroxypyridine (1TMS)	x	x	x	x	x
1105.0	116	*Alanine, (2TMS)	x	x	x	x	x
1137.0	146	*Hydroxylamine (3TMS)	x	x	x	x	x
1169.9	100	*Oxalic acid	x	x	x	x	x
1150.5	218	*L-Valine (2TMS)	x	x	x	x	x
1184.4	171	*Urea (2TMS)	x	x	x	x	x
1190.6	116	*L-Serine (2TMS)	x	x	x	x	x
1193.1	174	*Ethanolamine (3TMS)	x	x	x	x	x
1195.7	218	*Glycerol (3TMS)	x	x	x	x	x
1200.3	299	*Phosphoric acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1208.7	158	*Leucine	x	x	x	x	x
1218.2	158	*Isoleucine (2TMS)	x	x	x	x	x
1221.7	130	*L-Threonine (2TMS)	x	x	x	x	x
1226.9	142	*L-Proline (2TMS) RI 1294	x				
1229.9	245	*Maleic acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1231.1	174	*Glycine (3TMS)	x	x	x		
1232.3	180	*Nicotinic acid (1TMS)	x	x	x	x	x
1237.5	247	*Succinic acid (2TMS)	x	x	x	x	x

## 8. Anhang

1246.0	189	*Glyceric acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1268.8	245	*Fumaric acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1272.3	204	*L-Serine (3TMS)	x	x	x	x	x
1277.9	188	*L-Alanine (3TMS)				x	x
1292.7	247	*Threonic acid-1,4-lactone (2TMS)	x	x	x	x	x
1293.7	218	*L-Threonine (3TMS)	x			x	x
1370.1	205	*Erythrose (3TMS)		x	x		
1422.1	174	*beta-Alanine (3TMS) RI 1422	x				
1463.0	247	*Citramalic acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1379.6	189	*Malic acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1384.3	217	*Threitol (4TMS)	x	x	x	x	x
1391.1	217	*Erythritol (4TMS)	x	x	x	x	x
1412.9	232	*L-Aspartic acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1432.0	156	*oxo-Proline(3TMS)	x	x	x	x	x
1432.5	174	*4-Aminobutyric acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1435.7	174	*N-Acetylglutamic acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1437.0	292	*Erythronic acid (4TMS)		x	x		
1458.8	292	*Threonic acid (4TMS)	x	x	x	x	x
1486.5	247	*2-Hydroxyglutaric acid (3TMS)	x	x	x		
1491.9	198	*2-Ketoglutaric acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1550.0	246	*L-Glutamic acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1571.4	192	*Phenylalanine (2TMS)	x	x	x	x	x
1575.0	217	*Xylose minor (4TMS)		x	x	x	x
1578.5	217	*Xylose major (4TMS)	x	x	x	x	x
1587.6	103	*Arabinose (4TMS)		x	x	x	x
1597.3	103	*Ribose (4TMS)	x	x	x	x	x
1619.6	116	*L-Asparagine (3TMS)	x				
1642.9	307	*Pentitol (5TMS)		x		x	x
1678.6	217	*Xylitol (5TMS)	x	x	x	x	x
1701.2	217	*Ribitol (5TMS)	x	x	x	x	x
1710.0	160	*Fucose 1 (4TMS)	x		x	x	x
1720.0	160	*Fucose 2 (4TMS)	x	x			
1712.2	174	*Putrescine (4TMS)	x	x	x	x	x
1717.2	292	*Pentonic acid (5TMS)	x	x	x	x	x
1729.4	299	*L-Glycerol-3-phosphate (4TMS)	x	x	x	x	x
1733.5	174	*Ribonic acid (5TMS)	x	x	x	x	x
1768.0	156	*L-Glutamine (3TMS)	x	x	x	x	x
1787.9	204	*Shikimic acid (4TMS)	x	x	x	x	x
1802.3	273	*Citric acid (4TMS)	x	x	x	x	x
1839.4	173	*Dehydroascorbic acid		x		x	x
1841.0	345	*Quinic acid (5TMS)	x	x		x	x
1852.0	307	*Fructose 2 (5TMS)	x	x	x	x	x
1860.8	307	*Fructose 1 (5TMS)	x	x	x	x	x
1871.4	319	*Galactose (5TMS)	x	x	x	x	x
1878.5	319	*Glucose 1 (5TMS)	x	x	x	x	x
1897.6	319	*Glucose 2 (5TMS)	x	x	x	x	x
1916.5	323	*sorbitol-D (internal standard)	x	x	x	x	x
1920.0	218	*L-Tyrosine (3TMS)	x		x	x	x
1935.0	218	*4-O-Methyl-myo-inositol (5TMS)				x	x
1938.1	332	*Galactonic acid (6TMS)	x	x	x	x	x
1993.8	227	*Gluconic acid (6TMS)	x	x			
1977.0	219	*Caffeic acid (3TMS)	x		x	x	x
2015.0	305	*Inositol (6TMS)	x				
2080.1	129	*myo-Inositol (6TMS)	x	x	x	x	x
2136.0	396	*iso-Caffeic acid (3TMS)	x	x	x	x	x
2289.2	315	*Fructose-6-P major (6TMS)	x	x	x	x	x

## 8. Anhang

2248.2	338	*Fructose-6-P minor (6TMS)	x	x	x			
2214.0	202	*Tryptophan (2TMS)	x		x		x	x
2242.5	117	*stearic acid	x	x		x	x	x
2293.8	204	*Galactosylglycerol (6TMS)	x	x		x	x	x
2304.3	387	*Glucose-6-P major (6TMS)	x	x	x		x	x
2326.8	387	*Glucose-6-P minor (6TMS)	x	x				
2540.9	387	*Galactose-6-P (6TMS)		x				
2623.8	451	*Sucrose (8TMS)	x	x		x	x	x
2716.6	160	*Maltose (8TMS)	x	x		x	x	x
2722.6	191	*Trehalose (8TMS)	x	x		x	x	x
2735.0	361	*Isomaltose (8TMS)		x		x	x	x
2976.5	204	*Melibiose (8TMS)	x	x		x	x	x
3071.0	345	*3-cis-Caffeoylquinic acid (6TMS)	x					
3084.3	204	*Digalactosylglycerol (9TMS)	x	x		x	x	x
		*3-trans-Caffeoylquinic acid (6TMS)	x			x	x	x
3110.0	255					x	x	x
3220.0	307	*5-trans-Caffeoylquinic acid (6TMS)				x	x	x
3345.3	361	*Raffinose (11TMS)	x	x		x	x	x
3375.0	396	*1-trans-Caffeoylquinic acid (6TMS)					x	x

**Tabelle A-3 (zu Kap. 3):**

Gezeigt sind alle (teilweise) identifizierten Metabolite der kleinen Kräuter und großen Kräuter aus der Untersuchung von 2008 mit Retentions Index und einer spezifischen Masse (QM) mit der quantifiziert wurde.

RI	QM	Analyten	Bellis2	Leontodon2	Knautia	Lotus	Medicago
1091.6	177	*Glycolic acid (2TMS)		x			
1150.4	100	*Oxalic acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1155.0	116	*Alanine (2TMS)				x	
1160.0	142	*Proline (2TMS)				x	x
1166.4	156	*AS			x		
1181.0	241	*Monomethylphosphate (2TMS)	x	x	x	x	x
1190.6	86	*Leucine (1TMS)	x	x	x		x
1205.5	233	*Malonic acid (2TMS)		x		x	x
1224.5	144	*Valine (2TMS)					x
1249.0	171	*Urea (2TMS)					x
1258.6	116	*Serine (2TMS)	x	x	x	x	x
1266.5	299	*Phosphoric acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1289.0	84	*Piperidinecarboxylic acid (1TMS)					x
1294.3	130	*Threonine (2TMS)	x	x	x	x	x
1303.5	245	*Maleic acid (2TMS)	x	x	x		x
1305.6	174	*Glycine (3TMS)	x				x
1307.6	245	*S-adenosyl-L-methionine				x	
1311.5	247	*Succinic acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1319.4	189	*Glyceric acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1345.9	184	*Lumichrome (2MEOX)				x	
1345.5	245	*Fumaric acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1350.2	204	*Serine (3TMS)		x	x	x	x
1376.9	247	*Threonic acid-1,4-lactone (2TMS)		x	x	x	x
1402.3	239	*Hydroquinone (2TMS)	x	x	x		
1421.4	160	*Aspartic acid (2TMS)	x	x	x	x	x
1423.0	174	*beta-Alanine (3TMS)	x	x		x	x
1466.9	349	*Citramalic acid				x	x

## 8. Anhang

1471.3	233	*Malic acid (3TMS)	x	x	x	x	x
1481.1	156	*AS			x	x	
1483.9	217	*Erythritol (4TMS)	x	x	x	x	x
1501.4	261	*N-Acetyl-L-serine (2TMS)					x
1509.5	158	*Pyroglutamic acid (1TMS)	x	x	x	x	
1512.9	267	*Salicylic acid (2TMS)					
1520.7	292	*Erythronic acid (4TMS)	x	x	x	x	x
1526.1	156	*oxo-Proline (3TMS)					x
1525.4	174	*Glutamic acid (2TMS)	x			x	
1536.8	292	*Threonic acid (4TMS)	x	x	x	x	x
1538.6	198	*Glutaric acid, 2-oxo- (2TMS)	x				
1551.1	217	*Quercitrin				x	
1559.5	129	*2-Hydroxyglutaric acid (3TMS)	x				
1562.3	120	*Phenylalanine (1TMS)	x	x			x
1564.5	198	*2-Ketoglutaric acid (2TMS)	x	x			x
1581.1	174	*Phenethylamine (2TMS)				x	
1602.5	159	*Asparagine (2TMS)				x	x
1607.5	246	*Glutamic acid (3TMS)		x		x	x
1610.8	262	*Triethanolamine (3TMS)		x	x		x
1612.9	355	*Phenol		x			
1618.2	292	*Tartaric acid (4TMS)	x	x			
1634.1	217	*Xylose (4TMS)	x	x	x		x
1650.9	257	*Dodecanoic acid (1TMS)	x	x	x	x	x
1655.4	205	*Ribulose (4TMS)	x			x	
1677.4	103	*Pentosealcohol1	x				
1677.0	217	*Pentitol (5TMS)		x	x		x
1703.3	217	*Ribitol (5TMS)/*Xylitol (5TMS)	x	x	x	x	x
1709.2	277	*Rhamnose (4TMS)	x	x			
1724.2	160	*Fucose (4TMS)	x	x			x
1733.9	174	*Putrescine (4TMS)		x		x	x
1741.6	292	*Pentonic acid (5TMS)		x	x		
1737.3	217	*Galacturonic acid 1-P	x				
1739.1	299	*Glycerol-3-phosphate (4TMS)			x		
1768.8	134	*Shikimic acid, 3-dehydro- (3TMS)	x				
1788.8	293	*Cinnamic acid (2TMS)?				x	
1783.7	204	*Shikimic acid (4TMS)	x	x	x		x
1790.6	249	*cis-p-Coumaric acid (2TMS)	x				
1797.5	273	*Citric acid (4TMS)	x	x	x	x	x
1835.3	345	*Quinic acid (5TMS)	x	x	x		
1838.6	173	*Dehydroascorbic acid dimer		x	x	x	x
1854.8	103	*Fructose (5TMS)	x	x	x	x	x
1866.0	321	*Galactose (5TMS)	x	x	x	x	
1872.2	160	*Glucose (5TMS)	x	x	x	x	x
1901.7	244	*Ascorbic acid			x	x	x
1910.2	220	*sorbitol-D (internal standard)	x	x	x	x	x
1913.2	174	*Tyramine (3TMS)					
1935.3	318	*3-hydroxybutyric acid	x				
1935.0	179	*Hydrocaffeic acid (3TMS)			x		
1939.0	260	*4-O-Methyl-myo-inositol (5TMS)			x	x	x
1944.3	293	*trans-p-Coumaric acid (2TMS)	x		x	x	x
1975.2	219	*Caffeic acid, trans- (3TMS)	x	x	x		
1979.9	297	*Phenylglycol RI 1980			x		
1994.3	333	*Glucaric acid (6TMS)					
2008.4	217	*Inositol (6TMS)	x	x			
2017.3	355	*Phenol RI 2018		x			
2042.2	117	*Hexadecanoic acid (1TMS)	x	x	x	x	x



## 8. Anhang

2047.7	267	*QM 267			X			
2077.4	305	*myo-Inositol (6TMS)	X	X		X	X	X
2098.9	338	*Ferulic acid, trans- (2TMS)					X	X
2132.6	219	*trans-Caffeic acid (3TMS)	X	X	X			X
2159.2	357	*sugar-phosphat	X	X	X	X	X	X
2214.5	117	*Oleic acid?	X	X			X	
2227.5	202	*Tryptophan (3TMS)						X
2240.0	117	*Octadecanoic acid (1TMS)	X	X	X	X	X	X
2247.1	338	*trans-Sinapinic acid (2TMS)						X
2280.6	337	*Galactosylglycerol (6TMS)						X
2282.7	204	*Palatinitol	X				X	
2282.0	315	*Fructose-6-phosphate (6TMS)		X				
2298.1	387	*Glucose-6-phosphate (6TMS)	X	X	X	X	X	X
2412.2	129	*Vitamine?	X	X				
2475.6	259	*Uridine (3TMS)	X					
2482.8	273	Phenol					X	
2538.4	387	*Galactofuranose-6-P (7TMS)	X					X
2559.1	361	*Maltitol (9TMS)					X	X
2563.6	254	*4-Hydroxyphenyl-glucopyranoside		X				
2613.9	361	*Sucrose (8TMS)	X	X	X	X	X	
2718.3	361	*Trehalose (8TMS)	X	X			X	
2729.9	160	*Maltose		X			X	X
2833.1	345	*5-trans-p-Coumaroylquinic acid (5TMS)	X		X			
2954.0	327	*Sinapyl alcohol						
3070.2	204	*Digalactosylglycerol (9TMS)					X	
3090.4	255	*3-cis-Caffeoylquinic acid (6TMS)	X	X	X			
3144.2	324	*4-trans-Caffeoylquinic acid (6TMS)	X					
3166.1	345	*5-trans-Caffeoylquinic acid (6TMS)	X					
3325.4	437	*Raffinose (11TMS)	X	X			X	X

**Tabelle A-4 (zu Kap. 4):**

Gezeigt sind alle (teilweise) identifizierten Metabolite aus Versuch1 und Versuch2 mit Retentions Index und einer spezifischen Masse (QM) mit der quantifiziert wurde.

RI	QM	Analyten	Versuch1	Versuch2
1169.9	100	*Oxalic acid (2TMS)	X	X
1150.5	218	*L-Valine (2TMS)	X	
1184.4	171	*Urea (2TMS)	X	X
1190.6	116	*L-Serine (2TMS)	X	X
1191.1	179	*Benzoic acid (1TMS)	X	X
1193.1	174	*Ethanolamine (3TMS)	X	
1195.7	218	*Glycerol	X	X
1200.3	299	*Phosphoric acid (3TMS)	X	X
1208.7	158	*L-Leucine (2TMS)	X	X
1218.2	158	*Isoleucine (2TMS)	X	X
1221.7	130	*L-Threonine (2TMS)	X	X
1226.9	142	*L-Proline (2TMS)	X	
1229.9	245	*Maleic acid (2TMS)	X	X
1231.1	174	*Glycine (3TMS)	X	X
1232.3	180	*Nicotinic acid (1TMS)	X	
1237.5	247	*Succinic acid (2TMS)	X	X

## 8. Anhang

---

1246.0	189	*Glyceric acid (3TMS)	x	x
1268.8	245	*Fumaric acid (2TMS)	x	x
1272.3	204	*L-Serine (3TMS)	x	x
1277.9	188	*L-Alanine (3TMS)	x	x
1292.7	247	*Threonic acid-1,4-lactone (2TMS)	x	x
1293.7	218	*L-Threonine (3TMS)	x	
1304.1	174	*O-Acetyl-L-serine (2TMS)	x	
1310.0	160	*L-Alanine (3TMS)	x	
1314.6	261	*Glutaric acid (2TMS)	x	
1315.3	219	*2,4-Bishydroxybutanoic acid (3TMS)	x	
1332.9	100	*(2-Hydroxyethyl)-methanamine (2TMS)	x	
1333.7	174	*beta-Alanine (3TMS)	x	
1370.1	205	*Erythrose (3TMS)	x	
1379.6	189	*Malic acid (3TMS)	x	x
1384.3	217	*Threitol (4TMS)	x	
1391.1	217	*Erythritol (4TMS)	x	
1407.6	174	*Putrescine (3TMS)	x	x
1412.9	232	*Aspartic acid (3TMS)	x	x
1432.0	156	*oxo-Proline, 5-oxo-1-(3TMS)	x	x
1432.5	174	*4-Aminobutyric acid (3TMS)	x	
1435.7	292	*N-Acetylglutamic acid (2TMS)	x	
1458.8	292	*Threonic acid (4TMS)	x	x
1463.0	247	*Citramalic acid (3TMS)		x
1475.7	120	*L-Phenylalanine (1TMS)	x	
1486.5	247	*2-Hydroxyglutaric acid (3TMS)	x	x
1491.9	198	*2-Ketoglutaric acid (2TMS)	x	x
1510.3	142	*Proline (2TMS)	x	
1523.8	216	*L-Asparagine (4TMS)	x	
1528.5	239	*Trishydroxybenzene (3TMS)	x	
1550.0	246	*L-Glutamic acid (3TMS)	x	x
1571.4	192	*L-Phenylalanine (2TMS)	x	x
1578.5	217	*Xylose major (4TMS)	x	x
1587.6	103	*Arabinose (4TMS)	x	x
1597.3	103	*Ribose (4TMS)	x	
1619.6	116	*L-Asparagine (3TMS)	x	
1642.9	307	*Pentitol (5TMS)	x	
1678.6	217	*Xylitol (5TMS)	x	x
1701.2	217	*Ribitol (5TMS)	x	x
1720.0	277	*Fucose (4TMS)		x
1712.2	174	*Putrescine (4TMS)	x	
1717.2	292	*Pentonic acid (5TMS)	x	x
1729.4	299	*Glycerol-3-phosphate (4TMS)	x	
1733.5	174	*Ornithine (3TMS); Arginine (3TMS)	x	
1787.9	204	*Shikimic acid (4TMS)	x	x
1802.3	273	*Citric acid (4TMS)	x	x
1805.2	142	*Ornithine (4TMS)	x	
1813.3	157	*Arginine (5TMS)	x	
1839.4	173	*Dehydroascorbic acid	x	x
1860.8	103	*Fructose 1 (5TMS)	x	x
1871.4	319	*Galactose (5TMS)	x	x
1878.5	160	*Glucose 1 (5TMS)	x	x
1897.6	319	*Glucose 2 (5TMS)	x	x
1916.5	323	*sorbitol-D (internal standard)	x	x
1920.0	204	*Indole-3-acetonitrile (1TMS)	x	
1938.1	332	*Ascorbic acid (4TMS)	x	x
1993.8	227	*Glutamine (4TMS)	x	x

## 8. Anhang

---

2080.1	129	*myo-Inositol (6TMS)	x	x
2171.1	357	*sugar-P RI 2171	x	x
2289.2	315	*Fructose-6-phosphate (6TMS)	x	
2248.2	338	*trans-Sinapinic acid (2TMS)	x	x
2242.5	117	*stearic acid	x	x
2293.8	204	*Galactosylglycerol (6TMS)	x	x
2304.3	387	*Glucose-6-phosphate (6TMS)	x	
2326.8	387	*Glucose-6-phosphate minor (6TMS)	x	
2540.9	387	*Galactofuranose-6-phosphate (7TMS)	x	
2623.8	451	*Sucrose (8TMS)	x	x
2716.6	160	*Maltose (8TMS)	x	x
2722.6	191	*Trehalose (8TMS)	x	x
2976.5	204	*Melibiose 2 (8TMS)	x	x
3065.2	315	*Adenosine/Uridine-5-P (5TMS)	x	
3084.3	204	*Digalactosylglycerol (9TMS)	x	x
3345.3	361	*Raffinose (11TMS)	x	x

## 9 Publikationen

### ***In press:***

**A metabolic signature of the mutualistic interaction of the endophyte *Paenibacillus* sp. isolate and in vitro grown poplar plants revealed by gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry based metabolomics**

Christian Scherling, Kristina Ulrich, Dietrich Ewald, Wolfram Weckwerth

*Molecular Plant-Microbe Interactions* - Manuscript ID MPMI-02-09-0039; 18-Feb-2009

### ***Submitted:***

**A combined metabolomic and proteomic approach for the study of drought stress and early recovery in nitrogen-fixing *Medicago truncatula***

Estibaliz Larrainzar, Stefanie Wienkoop, Christian Scherling, Stefan Kempa, Rubén Ladrera, Cesar Arrese-Igor, Wolfram Weckwerth and Esther M. González

*Plants interacting with other Organisms*; Sep-2008

### ***Manuskript:***

**Differential role of the C3HC4 zinc RING finger peroxins PEX10 and PEX2 for peroxisome formation and matrix protein import in *Arabidopsis***

Jakob Prestele, Georg Hierl, Christian Scherling, Stefan Hetkamp, Wolfram Weckwerth, Gerhard Wanner, and Christine Gietl

*Expected in PNAS in May-2009*

### ***In preparation:***

**„Environmental Metabolomics“ for the analysis of plant biodiversity and phenotypic plasticity in a typical grassland community**

Christian Scherling, Christiane Roscher, Patrik Giavalisco, Ernst-Detlef Schulze, Wolfram Weckwerth

*Expected in Journal of Ecology in June-2009*