Die Rolle von Kanalproteinen der äußeren Chloroplastenhüllmembran in der Kälte-Akklimatisierung

Dissertation der Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Melanie Anette Barth

aus Schwalmstadt

München, März 2021



Diese Dissertation wurde angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Soll an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Nägele Tag der Abgabe: 23.03.2021 Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2021

Inhaltsverzeichnis

In	haltsverze	eichnis	I
Sı	ummary		IV
Ζı	usammenf	fassung	VI
A	bkürzungs	sverzeichnis	VIII
1	Einleitu	ung	1
	1.1 Me	etabolittransport über Membranen	2
	1.1.1	OEP40	5
	1.1.2	JASSY and OEP23	5
	1.1.3	OEP16	6
	1.2 Käl	Ite-Akklimatisierung	7
	1.3 Zie	elsetzung dieser Arbeit	10
2	Materia	al und Methoden	11
	2.1 Ma	aterial	11
	2.1.1	Chemikalien	11
	2.1.2	Größenstandards	11
	2.1.3	Enzyme und Kits	11
	2.1.4	Puffer	12
	2.1.5	Medien	14
	2.1.6	Pflanzenmaterial	15
	2.1.7	Bakterienstämme	15
	2.1.8	Konstrukte	15
	2.1.9	Oligonukleotide	16
	2.1.10	Antikörper	17
	2.2 Me	ethoden	18
	2.2.1	Wachstumsbedingungen	18
	2.2.1	.1 E. coli und A. tumefaciens	18
	2.2.1	2 A. thaliana	18
	2.2.2	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen	19
	2.2.3	Isolation von RNA aus Pflanzen	19
	2.2.4	cDNA-Synthese	19
	2.2.5	Plasmid Isolation aus <i>E. coli</i>	19

2.	2.6	PCR	20
2.	2.7	Molekulare Klonierung	20
	2.2.7.1	Klassische Klonierung	20
	2.2.7.2	Gateway [®] Klonierung	21
	2.2.7.3	Golden Gate Klonierung	21
2.	2.8	Mutagenese	22
2.	2.9	Sequenzierung	22
2.	2.10	Transformation von <i>E. coli</i>	22
2.	2.11	Transformation von A. tumefaciens	22
2.	2.12	Stabile Transformation von A. thaliana	22
2.	2.13	Proteinisolation aus A. thaliana	23
2.	2.14	SDS PAGE	23
2.	2.15	Western Blot	24
2.	2.16	Immunodetektion	24
2.	2.17	Proteinüberexpression	25
2.	2.18	Einschlusskörper-Aufreinigung	25
2.	2.19	Ionenaustauschchromatographie	26
2.	2.20	Elektrophysiologie	26
2.	2.21	Nicht-wässrige Fraktionierung	26
	2.2.21	1 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung	29
	2.2.21	2 Datenanalyse und Statistik	29
2.	2.22	Enzymtests	29
	2.2.22	1 Saure Phosphatase Enzymtest	29
	2.2.22	2 UGPase Enzymtest	30
	2.2.22	.3 Pyrophosphatase Enzymtest	31
	2.2.22	.4 Citratsynthase Enzymtest	31
	2.2.22	.5 Succinyl-CoA Synthetase Enzymtest	32
2.	2.23	Kreuzung zweier A. thalina Einzelmutanten	32
2.	2.24	Phänotypisierung	32
2.	2.25	Gefriertoleranz	33
2.	2.26	Aminosäure-Fütterungs-Experiment	33
E	rgebnis	se	34
3.1	Kreu	izung OEP40 x pSuT	34
3.2	Reg	ulation der OEP16-Kanaleigenschaften	37

3

	3	.2.2	1	Komplementation OEP16 TM	
	3.3		Die l	Rolle von OEP16 in Prozess der Kälte-Akklimatisierung	41
	3	.3.2	1	Subzelluläre Metabolom-Analyse mittels nicht-wässriger Frakt	ionierung 43
		3.	3.1.1	L Etablierung eines Markerenzyms für Mitochondrien	
		3.	3.1.2	2 Optimierung des Gradienten	
		3.	3.1.3	3 Subzelluläre Fraktionierung: Markerenzymtests	
	3	.3.2	2	Metabolomiks	51
	3.4		Amiı	nosäure-Fütterungsexperiment	58
	3.5		OEP	23	60
4	D	isk	ussio	on	62
	4.1		Die I	Bedeutung von OEP40 beim <i>in vivo</i> Transport von Zuckern	62
	4.2		OEP	16 spielt eine Rolle im Prozess der Kälte-Akklimatisierung	64
	4.3		Der	Einfluss von OEP16 auf subzellulärer Ebene	66
	4.4		In vi	ivo Funktion von OEP16	73
	4.5		OEP	23	75
	4.6		Aust	blick	76
5	Li	iter	ratur	rverzeichnis	78
6	Α	nh	ang.		89
Le	eben	sla	uf		99
Ei	dess	stat	ttlich	ne Versicherung	100
D	anks	sag	ung.		101

Summary

Chloroplasts are, like mitochondria, endosymbiotic derived organelles. A eukaryotic cell, which already contained a nucleus and mitochondria, took up an ancestor of today's cyanobacteria. The chloroplast is, like its ancestor, a Gram-negative bacterium, surrounded by two membranes. In chloroplasts the photosynthesis and biosynthesis of many metabolic intermediates takes place, like carbohydrates, amino acids and fatty acids. Since those metabolic intermediates are needed or metabolized in other compartments of the cell, they must cross the chloroplastic envelopes. Like the porins in the outer membrane of Gram-negative bacteria, which are waterfilled pores with a β -barrel structure, the outer envelope of the chloroplast harbors the so-called Outer Envelope Proteins (OEPs), which are mediating the metabolic transport over the outer envelope. So far OEP21, OEP24, OEP37 and OEP40, belonging to the β -barrel family of OEPs, have been characterized, as well as OEP16, which certainly is consisting of α -helices, and OEP23, which has a mixed structure.

Plants as sessile organisms are facing continual chancing environmental conditions and need to adapt to those. Abiotic factors, which have a great influence on crop yield, are cold and freezing temperatures. To withstand freezing temperatures, plants have evolved the process of cold acclimation: Exposure to low, non-freezing temperatures leads to the gain of freezing-tolerance. In the course of this process, changes in gen and protein expression lead to the accumulation of cryoprotectants like sugars and amino acids. OEP16 is permeable for amino acids and gets upregulated at 4 °C, while OEP40 is permeable for glucose and the loss of function mutant shows an early flowering phenotype when grown at cold temperatures. OEP23 is downregulated in the cold. In the present thesis these three OEPs were observed in terms of their role in the process of cold acclimation in Arabidopsis thaliana. For OEP40 it could be shown, that it works hand in hand with a sugar transporter at the inner envelope, because the double mutant shows a smaller phenotype in comparison to wildtype. The OEP16 loss of function mutant shows a lowered freezingtolerance by contrast with the wildtype. Furthermore, with the help of phopshomimetic substitution mutants, it could be shown *in vitro* and *in vivo* that phosphorylation has an impact on the channel activity. By using the method of non-aqueous fractionation, it could be proven that the subcellular metabolite distribution is altered in OEP16 loss of function mutants in comparison to wildtype, which could be the reason for the lowered freezingtolerance. Moreover, the specificity of the channel in terms of the amino acids being transported got narrowed down. In case of OEP23 a T-DNA insertion line in *Arabidopsis thalina* was characterized for the first time, indicating that the loss of function of OEP23 might be embryo lethal.

The results prove, that the outer envelope is not just a diffusion barrier for metabolites and that OEPs do play a role in the process of cold-acclimation.

Zusammenfassung

Chloroplasten sind, wie Mitochondrien, Organellen mit endosymbiotischem Ursprung. Eine eukaryotische Zelle, welche bereits im Besitz eines Zellkerns und Mitochondrien war, nahm ein anzestrales Cyanobakterium endosymbiotisch auf. Der Chloroplast ist, wie sein Vorfahr, ein Gram-negatives Cyanobakterium, von zwei Membranen umgeben. In den Chloroplasten finden die Photosynthese und die Biosynthese vieler wichtiger Stoffwechselprodukte, wie Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fettsäuren, statt. Da diese Stoffwechselprodukte auch in anderen Kompartimenten der Zelle benötigt werden oder dort weiter prozessiert werden, müssen sie die Membranen des Chloroplasten passieren. Ähnlich zu den wassergefüllten, aus β -Faltblättern bestehenden Porinen in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, gibt es in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten die sogenannten *outer envelope proteins* (OEP), welche den Metabolittransport vermitteln. Bislang wurden OEP21, OEP24, OEP37 und OEP40 aus der β -Faltblatt-Familie der OEPs näher charakterisiert, ebenso wie OEP16, welches allerdings aus α -Helices besteht, und OEP23, welches sowohl aus β -Faltblättern und α -Helices besteht.

Pflanzen als sessile Lebewesen sind sich ständig ändernden Umwelteinflüssen ausgesetzt und müssen sich diesen somit laufend anpassen. Ein abiotischer Faktor, der jährlich großen Einfluss auf Ernteerträge von Nutzpflanzen hat, ist Kälte und damit einhergehend Frost. Um gefrierende Temperaturen zu überleben, haben Pflanzen den Prozess der Kälte-Akklimatisierung entwickelt: Die Exposition zu kalten, nicht-frierenden Temperaturen führt zur Ausbildung einer Gefriertoleranz. Im Laufe dieses Prozesses führen Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression zur Akkumulation von Kryoprotektantien in Form von Zuckern und Aminosäuren. OEP16 ist permeabel für Aminosäuren und wird bei 4 °C hochreguliert, während OEP40 permeabel für Glukose ist und die Verlustmutante einen frühen Blühphänotyp in kalten Temperaturen zeigt. OEP23 wird in der Kälte runterreguliert. In der vorliegenden Arbeit wurden diese drei OEPs im Hinblick auf ihre Rolle im Prozess der Kälte-Akklimatisierung in Arabidopsis thaliana untersucht. Für OEP40 konnte gezeigt werden, dass es Hand in Hand mit einem Zuckertransporter in der inneren Hüllmembran zusammenarbeitet, da die Doppelmutante dieser beiden Proteine einen kleineren Phänotyp besitzt im Vergleich zum Wildtyp. OEP16 Verlustmutanten weisen eine deutlich verminderte Gefriertoleranz auf im Vergleich zum Wildtyp. Mithilfe von phosphomimetischen Substituionsmutanten von OEP16 konnte zudem *in vitro* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Kanals einen Einfluss auf dessen Aktivität zu haben scheint. Durch Einsatz der Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung konnte zudem gezeigt werden, dass es auf subzellulärer Ebene zu Änderungen in der Metabolitverteilung in OEP16 Verlustmutanten im Vergleich zum Wildtyp kommt, welche die Ursache für die verminderte Gefriertoleranz sein könnten. Zudem konnte die Spezifität des Kanals im Bezug auf die transportierten Aminosäuren näher eingegrenzt werden. Für OEP23 wurde erstmals eine T-DNA-Insertionslinie charakterisiert mit einem möglicherweise embryolethalen Phänotyp.

Die Ergebnisse zeigen, dass die äußere Hüllmembran nicht bloß eine Diffusionsbarriere für Metabolite darstellt, sondern dass die OEPs eine Rolle im Prozess der Kälte-Akklimatisierung spielen.

Abkürzungsverzeichnis

A. th.	Arabidopsis thaliana
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre (Copy-) DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECL	enhanced chemiluminescence
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DANN
h	Stunde
HCI	Salzsäure
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonacid
H₂O	Wasser
IE	innere Chloroplastenhüllmembran (inner envelope)
IM	Innere Membran (inner membrane)
IMS	Intermembranraum (inter membrane space)
КСІ	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	knock-out
ĸŪ	
КОН	Kaliumhydroxid
KOH L	Kaliumhydroxid Liter
KOH L LB	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth
KOH L LB MES	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
KO KOH L LB MES MgCl ₂	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute Milliliter
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute Milliliter Murashige-Skoog Salz
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute Milliliter Murashige-Skoog Salz Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute Milliliter Murashige-Skoog Salz Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Nicht-wässrige Fraktionierung
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF NaOH	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute Milliliter Murashige-Skoog Salz Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Nicht-wässrige Fraktionierung Natriumhydroxid
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF NaOH NTP	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute Milliliter Murashige-Skoog Salz Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Nicht-wässrige Fraktionierung Natriumhydroxid Nukleosidtriphosphat
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF NAOH NTP OD	KaliumhydroxidLiterLysogeny broth2-(N-Morpholino)ethansulfonsäureMagnesiumchloridMagnesiumsulfatMinuteMilliliterMurashige-Skoog SalzNicotinamidadenindinukleotidphosphatNicht-wässrige FraktionierungNatriumhydroxidNukleosidtriphosphatOptische Dichte
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF NAOH NTP OD OD OM	Kaliumhydroxid Liter Lysogeny broth 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Minute Milliliter Murashige-Skoog Salz Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Nicht-wässrige Fraktionierung Natriumhydroxid Nukleosidtriphosphat Optische Dichte Äußere Membran (outer membrane)
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF NAOH NTP OD OD OM PAGE	Kilour outKaliumhydroxidLiterLysogeny broth2-(N-Morpholino)ethansulfonsäureMagnesiumchloridMagnesiumsulfatMinuteMilliliterMurashige-Skoog SalzNicotinamidadenindinukleotidphosphatNicht-wässrige FraktionierungNatriumhydroxidNukleosidtriphosphatOptische DichteÄußere Membran (outer membrane)Polyacrylamidgelelektrophorese
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF NAOH NAF NAOH NTP OD OD OM PAGE PCR	KaliumhydroxidLiterLysogeny broth2-(N-Morpholino)ethansulfonsäureMagnesiumchloridMagnesiumsulfatMinuteMilliliterMurashige-Skoog SalzNicotinamidadenindinukleotidphosphatNicht-wässrige FraktionierungNatriumhydroxidNukleosidtriphosphatOptische DichteÄußere Membran (outer membrane)PolyacrylamidgelelektrophoresePolymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
KO KOH L LB MES MgCl ₂ MgSO ₄ min ml MS NADP NAF NAOH NAF NAOH NTP OD OD OM PAGE PCR PMSF	Kilour outKaliumhydroxidLiterLysogeny broth2-(N-Morpholino)ethansulfonsäureMagnesiumchloridMagnesiumsulfatMinuteMilliliterMurashige-Skoog SalzNicotinamidadenindinukleotidphosphatNicht-wässrige FraktionierungNatriumhydroxidNukleosidtriphosphatOptische DichteÄußere Membran (outer membrane)PolyacrylamidgelelektrophoresePolymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)Phenylmethylsulfonylfluorid

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SOC	super optimal broth with catabolite repression
TAE	Tris-acetate-EDTA buffer
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA buffer
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TG	Trockengewicht
TIC	Translocase of the inner chloroplast envelope
тос	Translocase of the outer chloroplast envelope
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tween	Polyethylenglykolsorbitanmonolaurat
UDP	Uridindiphosphat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Ohne Pflanzen und deren Fähigkeit, mithilfe der Photosynthese Sauerstoff zu produzieren, wäre das heutige Leben, wie wir es kennen, nicht möglich. Die oxygene Photosynthese entwickelte sich vor ca. 2,3 Milliarden Jahren in den Vorfahren der heutigen Cyanobakterien (Kirschvink und Kopp 2008), was einen drastischen Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre zur Folge hatte. Dieses Ereignis ist auch als die große Sauerstoffkatastrophe bekannt. Der nun in großen Mengen verfügbare atmosphärische Sauerstoff stellte eine neue Energiequelle dar und begünstigte somit die Evolution hin zu mehrzelligen Organismen. Die Evolution von Pflanzen begann vor ca. 1 Milliarden Jahren, als ein phagothropher Eukaryot, welcher bereits einen Zellkern und Mitochondrien besaß, ein Vorfahr der heutigen Cyanobakterien aufnahm (Ponce-Toledo et al. 2017). Die primäre Endosymbiose (Abbildung 1), wie dieses Ereignis auch genannt wird, markiert die Entstehung der Chloroplasten: Der eingeschlossene Organismus wurde zu einem Teil der Zelle, einem Endosymbiont, anstatt als reine Nahrungsquelle zu dienen. Die Chloroplasten mussten nun in den bereits bestehenden, komplexen genetischen und metabolischen Kontext der Wirtszelle integriert werden. Daraus entstand ein Netzwerk aus Kontrollmechanismen für die transkriptionelle Kontrolle zwischen Nukleus und Chloroplast, sowie die biochemische Arbeitsteilung zwischen den endosymbiontischen Organellen, den Mitochondrien und Chloroplasten, und anderen Zellkompartimenten. Die Kompartimentierung ist eine der größten Errungenschaften der Eukaryoten gegenüber den Prokaryoten. In Pflanzen ist die Kompartimentierung am komplexesten, im Vergleich zu anderen eukaryotischen Organismen, aufgrund des Vorhandenseins von Vakuole, Chloroplasten und Zellwand. Viele biochemische Stoffwechselwege sind auf verschiedene Kompartimente aufgeteilt, was einen Austausch und somit auch den Transport von Metaboliten über Membranen notwendig macht. Aufgrund ihrer Verwandtschaft zu Gramnegativen Bakterien sind Chloroplasten von zwei Membranen umgeben, dem outer envelope (OE) und dem inner envelope (IE). Die Adaption dieser Membranen an die neuen Herausforderungen im Bezug auf den Transport von Metaboliten und Proteinen war eine der größten Aufgaben des Prozesses der Endosymbiose.



Abbildung 1 Ursprung der Chloroplasten durch Endosymbiose. Eine eukaryotische Zelle, welche bereits einen Nukleus (N) und Mitochondrien (M) enthält, nahm vor ca. 1 Milliarden Jahren einen zur Photosynthese fähigen Vorfahr der heutigen Cyanobakterien auf. So entwickelte sich der Chloroplast und aus der äußeren Membran (OM) und inneren Membran (IM) des Cyanobakteriums entstanden die äußere Hüllmembran (OE) und die innere Hüllmembran (IE) der Chloroplasten. Der erste zur Photosynthese fähige Eukaryot war entstanden. Plasmamembran (PM).

1.1 Metabolittransport über Membranen

Die pflanzliche Zelle ist ein komplexes Gebilde mit zahlreichen verschiedenen Kompartimenten. Sinn dieser Kompartimentierung ist es, die optimalen Milieus für die unterschiedlichsten biochemischen Reaktionen zu schaffen. Plastiden sind der Ort der Photosynthese, sie sind in der Lage Lichtenergie in chemische Energie in Form von ATP, NADPH und Kohlenhydraten umzuwandeln. Des Weiteren findet in den Plastiden die Fettsäure-, Aminosäure-, Häm- und Porphyrinbiosynthese als auch die Reduktion von Sulfat und Nitrit statt. All diese Prozesse sind stark abhängig von den sich ständig ändernden Umweltbedingungen, was einen permanenten Austausch von Metaboliten und Ionen zwischen der Zelle und den Plastiden notwendig macht. Aus diesem Grund finden sich in der äußeren Membran der Plastiden eine Vielzahl an Kanalproteinen, die outer envelope proteins (OEPs): Sie sind nur in den Plastiden zu finden und besitzen verschiedene Substratspezifitäten. Sie sind nach ihrer molekularen Größe in Kilo Dalton (kDa) benannt (Abbildung 2). Aufgrund des endosymbiotischen Ursprungs der Chloroplasten zeigen viele dieser Kanalproteine eine ähnliche Struktur wie die Porine, die in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien zu finden sind. Wie auch die Chloroplasten sind die Gramnegativen Bakterien von zwei Membranen umgeben, einer inneren und einer äußeren Membran. Die äußere Membran fungiert hierbei als Schutzwall gegenüber der Umgebung und schirmt das Bakterium so z.B. gegen Toxine wie Antibiotika ab (Pagès et al. 2008). Da

aber auch Nährstoffe über die Membran aufgenommen werden müssen, ist sie mit Ionenkanälen, den sogenannten Porinen, ausgestattet. Ein Porin besteht üblicherweise aus 8-24 transmembranen, amphipathischen β-Faltblättern, welche ein β-Fass und somit die Pore bilden. Porine werden in drei Klassen unterteilt (Klebba und Newton 1998): 1. Allgemeine Porine, welche als größen-selektive Diffusionsporen agieren, ohne dabei spezifische Stoffe zu binden, 2. Stoff-spezifische Porine, welche nur bestimmte Stoffe mit geringer Affinität binden und passieren lassen und 3. Liganden-gesteuerte und energieabhängige Porine mit einer hohen Affinität für bestimmte Stoffe. Porine sind wassergefüllt und sanduhrförmig aufgebaut. Oft sind sie als Trimere angeordnet, was zu ihrer Stabilität beitragen kann. In Escherichia coli (E. coli) bestehen die outer membrane *proteins* (OMP), wie z.B. OmpF, OmpC und OmpE (auch als PhoE bezeichnet), aus 16 β-Faltblättern, welche das β-Fass formen (Cowan et al. 1992; Kefala et al. 2010). Diese Porine besitzen keine Substratspezifität, Moleküle bis zu einer Größe von 600 Da können mittels Diffusion passieren (Nikaido und Rosenberg 1981). Stoff-spezifische Porine, wie LamB, sind hingegen nur für bestimmte Stoffe durchlässig. LamB besteht aus 18 β-Faltblättern und ist durchlässig für Maltooligosaccheride (Benson et al. 1988; Dutzler et al. 1996). Das Ligandgesteuerte und energieabhängige FepA besteht aus 22 β-Faltblättern und zeigt eine hohe Affinität gegenüber Enterobactin (Buchanan et al. 1999; Ecker et al. 1986). Die Energie, die für den aktiven Transport über die äußere Membran benötigt wird, wird durch den Protonengradienten über die innere Membran und durch transiente Interaktion mit TonB, einem Protein, welches in der inneren Membran sitzt, bereitgestellt (Buchanan et al. 1999). Die OEPs in der äußeren Membran der Chloroplasten lassen sich in zwei Gruppen einteilen, zu der den Porinen-ähnelnden, aus β-Faltblättern bestehenden OEPs zählen OEP21, OEP24, OEP37 und OEP40. Ausnahmen bilden das aus α-Helices aufgebaute OEP16 und die kürzlich entdeckten Proteine OEP23 und JASSY, welche sowohl aus β -Faltblättern als auch aus α -Helices zu bestehen scheinen. Alle OEPs wurden zuerst in Pisum sativum charakterisiert, wo sie aus der aufgereinigten äußeren Chloroplastenmembran isoliert wurden. In elektrophysiologischen Messungen, bei denen die heterolog exprimierten OEPs in Lipiddoppelschichten integriert wurden, zeigten sie alle ähnliche Eigenschaften. Alle OEPs formen hier Kanäle mit hoher Leitfähigkeit, wobei die höchste Öffnungswahrscheinlichkeit bei 0 mV liegt. Da keines der OEPs ein Transitpeptid besitzt, muss die Sortierung hin zum

Chloroplasten von anderen intrinsischen Faktoren der Proteine abhängen, welche bislang unbekannter Natur sind.

OEP21 ist ein aus zwölf β-Faltblättern bestehender, für Triophosphate permeabler Kanal und ATP-reguliert (Hagn und Soll, persönliche Mitteilung; Hemmler et al. 2006). Photosynthetisch fixierter Kohlenstoff wird untertags hauptsächlich in Form von Triosephosphaten aus dem Chloroplasten ins Cytosol exportiert. Abhängig vom Verhältnis von Triosephosphat zu ATP ist OEP21 entweder einwärts oder auswärts rektifizierend (Bölter et al. 1999). Steigt das Verhältnis von Triosephosphat zu ATP an, wie es tagsüber der Fall ist, wird Triosephosphat vom Chloroplasten ins Cytosol exportiert. Ein Homodimer aus insgesamt 14 β-Faltblättern formt OEP24 (Pohlmeyer et al. 1998). In Hefe kann OEP24 das mitochondriale VDAC funktional ersetzen (Röhl et al. 1999), es fungiert somit als allgemeines Porin, was auch die Permeabilität für verschiedenste Metabolite, wie Triosephosphate, Aminosäuren, Zucker und ATP, bestätigt (Pohlmeyer et al. 1998). Ein weiteres Mitglied der β-Faß OEP-Familie ist OEP37, es besteht aus 12 β-Faltblättern. Die Substratspezifität von OEP37 ist bislang unbekannt (Goetze et al. 2006).



Abbildung 2 Metabolittransport über die Chloroplastenmembranen. In der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten (OE) befinden sich die *outer envelope proteins* (OEPs). Sie sind nach ihrer Größe in kDa benannt und für den Transport von einer Vielzahl von Metaboliten (z.B. Zucker und Aminosäuren (AS)) über das OE verantwortlich. Während OEP40, OEP37, OEP24 und OEP21 β -Fässer bilden und somit zur β -Faß Familie der OEPs zählen, weißt OEP16 eine α -helikale Struktur auf. OEP23 besteht aus einer Mischung aus α -Helices und β -Faltblättern. Die Metabolite gelangen durch den Intermembranraum (IMS) zur inneren Chloroplastenhüllmembran (IE). Hier befinden sich unter anderem der *plastidal sugar transporter* (pSuT) und der *triose phosphate (TP)/phosphate translocator* (TPT), welche Metabolite zwischen dem IMS und dem Stroma über das IE transportieren.

1.1.1 OEP40

Der im Laufe des Tages photosynthetisch fixierte Kohlenstoff wird zunächst in Form von Stärke gespeichert, in der Nacht dient diese als Energiequelle für den Metabolismus. Maltose und Glukose sowie deren Derivate sind die Hauptabbauprodukte von Stärke in der Nacht. OEP40 ist ein 40 kDa großes Protein, welches laut Vorhersage ein β-Fass aus 10 β-Faltblättern formt (Harsman et al. 2016). Der so gebildete Kanal ist leicht selektiv für Kationen und ist permeabel für Glukose und deren phosphorylierten Derivate, Glukose-1-P und Glukose-6-P, aber nicht für Maltose, wie in einer elektrophysiologischen Messung gezeigt werden konnte (Harsman et al. 2016). Verlustmutanten zeigen eine verfrühte Blüte im Vergleich zum Wildtyp bei Kultivierung in kalten Temperaturen (Harsman et al. 2016). Dies deutet auf ein Ungleichgewicht im Kohlenhydratmetabolismus hin, da die Initiierung der Blüte auch durch Kohlenhydrate im floralen Meristem reguliert wird (Corbesier et al. 1998).

1.1.2 JASSY and OEP23

Chloroplasten sind ein Ort der Biosynthese verschiedenster Metabolite. So wird neben Zuckern und Aminosäuren, wie bereits erwähnt, die Vorstufe von Jasmonat, einem Phytohormon, synthetisiert. Jasmonate sind von Bedeutung bei der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress und bei der Entwicklung. Die Biosynthese des Jasmonats beginnt in den Chloroplasten durch die Umwandlung der Fettsäure α-Linolensäure in 12-Oxophytodienoatsäure (OPDA). Diese muss aus den Chloroplasten in das Cytosol transportiert werden. Kürzlich wurde ein Protein namens JASSY beschrieben, welches OPDA über die äußere Hüllmembran der Chloroplasten transferiert. Verlustmutanten dieses Proteins sind nicht in der Lage Jasmonat unter Stresseinfluss anzureichern (Guan et al. 2019). In silico Strukturvorhersagen zeigen, dass JASSY sowohl aus α-Helices, als auch aus β -Faltblättern, welche ein unvollständiges β -Fass formen, aufgebaut ist. Interessanterweise zeigt OEP23, ein 23 kDa großes Protein, welches anhand von Proteomik-Daten identifiziert wurde, eine ähnliche Struktur. Wie auch die anderen OEPs verfügt auch OEP23 über keine chloroplastidäre Signalsequenz (Goetze et al. 2015). Anhand von elektrophysiologischen Messungen konnte festgestellt werden, dass OEP23 einen Kanal mit hoher Leitfähigkeit und Selektivität für Kationen formt (Goetze et al. 2015). Zudem wird OEP23 in der Kälte runterreguliert (Trentmann et al. 2020). Bislang ist keine Verlustmutante in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) verfügbar, weshalb die physiologische Funktion von OEP23 noch unklar ist.

1.1.3 OEP16

OEP16 ist ein 16 kDa großes, α -helikales Transmembranprotein in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten. Es formt einen Kanal, bestehend aus vier α-Helices, mit hoher Leitfähigkeit und leichter Selektivität für Kationen. Mittels elektrophysiologischer Messungen konnte eine Affinität für Aminosäuren im Allgemeinen, jedoch nicht für eine bestimmte Klasse, nachgewiesen werden. Andere Moleküle, wie z.B. ungeladene Zucker keine Affinität (Pohlmeyer et al. 1997). Anhand von zeigten in situ Kreuzvernetzungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass OEP16 Homodimere bildet (Pohlmeyer et al. 1997). Verantwortlich für die Bildung der Pore sind vor allem Helix I und Helix II, wobei gezeigt werden konnte, dass Helix II und Helix IV ausgetauscht werden können, ohne dabei die Kanaleigenschaften zu beeinflussen (Linke et al. 2004; Steinkamp et al. 2000). Mittels NMR-Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass jede der vier Helices einen Bruch besitzt, welche für die Substratspezifität eine Rolle spielen könnten (Zook et al. 2013). OEP16 ist vertreten in den Charophyten, den Bryophyten und in allen höheren Landpflanzen. In A. thaliana existieren drei Isoformen: OEP16.1, OEP16.2 und OEP16.4. Sie gehören der sogenannten Preprotein- und Aminosäuretransporter Familie, kurz PRAT-Familie, an (Rassow et al. 1999). Ein viertes Homolog, OEP16.3, ist in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert und gehört der Tim17/Tim22/Tim23 Proteinfamilie an (Murcha et al. 2007; Murcha et al. 2016; Rassow et al. 1999). OEP16.1 ist die abundanteste Isoform und wird hauptsächlich in Blättern exprimiert. Im Gegensatz dazu wird OEP16.2 vor allem während der späten Samenentwicklung und der frühen Keimung exprimiert. Die Expression von OEP16.2 unterliegt der Kontrolle des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) und führt so zu einem ABA-hypersensitiven Phänotyp in keimenden OEP16 Verlustmutanten (Pudelski et al. 2012). OEP16.2 verfügt über zusätzliche Aminosäuren in der Schleife, die die membranüberspannenden Helices I und II miteinander verbindet, diese könnten für die von den anderen Isoformen abweichende Funktion verantwortlich sein.

Der Hauptort der Aminosäure-Biosynthese in Pflanzen ist der Chloroplast (Hildebrandt et al. 2015). Daher ist ein Austausch von Aminosäuren zwischen den Chloroplasten und dem Rest der Zelle unabdingbar. Es konnte gezeigt werden, dass OEP16 dem Einfluss verschiedener abiotischer Stressfaktoren wie z.B. Hitze, Trockenheit oder Kälte unterliegt.

Einleitung

In Weizen konnte gezeigt werden, dass OEP16.2 hochreguliert wird nach einer Behandlung mit ABA, ebenso unter Einfluss von Hitze- und Trockenstress (Zang et al. 2017). Wird das Gen für OEP16.2 aus Weizen in *A. thaliana* exprimiert, sind diese Pflanzen hitzetoleranter (Zang et al. 2017). Zudem konnte in *A. thaliana* gezeigt werden, dass OEP16.1 bei Kältebehandlung der Pflanzen hochreguliert wird (Drea et al. 2006; Fowler und Thomashow 2002). Derselbe Effekt konnte für das OEP16.1 Ortholog in Gerste gezeigt werden (Baldi et al. 1999). Die kälteinduzierte Expression von OEP16.1 wird vom sogenannten CBF-Regulon gesteuert (Fowler und Thomashow 2002). Dieses Regulon ist maßgeblich am Prozess der Kälte-Akklimatisierung beteiligt, deren Ziel es ist, Kryoprotektantien wie Zucker und Aminosäuren anzureichern, um so die Eiskristallbildung zu kontrollieren. Dies könnte ein Grund für die Hochregulierung von OEP16 unter Einfluss von Kälte sein.

1.2 Kälte-Akklimatisierung

Pflanzen als sessile Lebewesen sind einer Vielzahl von Stressfaktoren ausgesetzt. Neben biotischen Stressfaktoren, wie zum Bespiel Pathogen- oder Schädlingsbefall, sind sie vielen abiotischen Stressfaktoren ausgeliefert. Hierzu zählen z.B. Dürre, Überschwemmungen, Salzstress, extreme Hitze und auch Kälte. Kältestress hat einen großen Einfluss auf die globale Verbreitung von Pflanzen und auf deren Wachstum sowie Entwicklung und ist somit von großer Bedeutung für die Produktion von Nutzpflanzen (Weiser 1970). Aufgrund des Klimawandels kommt es zu einem Anstieg der Temperaturen, vor allem das Frühjahr und der Herbst werden milder. Da die Kälte-Akklimatisierung einerseits von fallenden Temperaturen, aber andererseits auch von der Photoperiode abhängig ist, kann es durch mildere Temperaturen im Herbst zu einer Störung dieser kombinierten Effekte kommen (Liu et al. 2019). Mildere Temperaturen im Frühjahr führen zu Deakklimatisierung und einem verfrühten Start der Wachstums- und Blühphase (Fitter und Fitter 2002). Da neben steigenden Temperaturen auch sprunghafte Temperaturänderungen eine Folge des Klimawandels sind, erhöht sich das Risiko für Gewebeschädigung durch plötzlich auftretenden Frost im späten Frühjahr (Vitasse et al. 2018). Pflanzen in den gemäßigten

7



Abbildung 3 Modell des CBF-Regulons bei der Kälte-Akklimatisierung. Kalte Temperaturen führen zu einer Veränderung der Membranfluidität, somit kommt es zu einem Einstrom Ca²⁺-Ionen über die Plasmamembran (PM) ins Zellinnere. Der Ca²⁺-Einstrom aktiviert die *calcium-responsive protein kinases* (CPK) und die nachgeschaltete *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Kaskade. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *inducer of CBF expression 1* (ICE1), welcher wiederum eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren aktiviert, die sogenannten *C-repeat-binding factors 1-3* (CBF1-3) des CBF-Regulons. Diese sind für die Regulation der *cold-responsive* (COR) Gene verantwortlich, welche für verschiedene Proteine, die eine Rolle in der Kälte-Akklimatisierung spielen, kodieren.

Breiten haben, um sich vor den Folgen des Gefrierstresses zu schützen, die Fähigkeit zur Kälte-Akklimatisierung entwickelt. Kälte-Akklimatisierung wird erreicht durch die Exposition gegenüber kalten, nicht frierenden Temperaturen (Thomashow 1999). Wird von Kältestress gesprochen, muss zwischen zwei Formen unterschieden werden: Moderat kalte Temperaturen zwischen 0-15 °C führen zu einer verminderten Fluidität der Membranen, Proteinkomplexe werden destabilisiert und die Photosyntheseleistung nimmt ab (Yadav 2010). Bei gefrierenden Temperaturen unter 0 °C kommt es zu gravierenden Schäden des Pflanzengewebes aufgrund von Eiskristallen, welche sich im Apoplasten bilden (Shi et al. 2018). Diese zerstören die Zellmembranen, die Zelle verliert Wasser und dehydriert (Steponkus 1984). Um sich dagegen zu schützen, haben Pflanzen in der gemäßigten und

borealen Zone die Fähigkeit der Kälte-Akklimatisierung entwickelt (Abbildung 3). Bei sinkenden Temperaturen kommt es zu Veränderungen der Membranfluidität und Ca²⁺-Ionen gelangen über die Plasmamembran ins Zellinnere (Sangwan et al. 2002). Der Influx von Ca²⁺-Ionen führt unter anderem zur Aktivierung von *calcium-responsive protein kinases* (CPKs, CIPKs und CLRK1) und der Mitogen-activated protein kinase (MAPK) Kaskade (Zhu 2016). Diese Signalkaskaden aktivieren den nachgelagerten Transkriptionsfaktor inducer of CBF expression 1 (ICE1), welcher wiederum eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren aktiviert, die sogenannten C-repeat-binding factors 1-3 (CBF1-3) des CBF-Regulons (Kim et al. 2015). Das CBF-Regulon ist einer der zentralen Signalwege der Kälte-Akklimatisierung und reguliert teilweise die Expression der *cold-responsive* (COR) Gene (Thomashow 1999). Die COR-Gene werden innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach Exposition der Pflanze zu kalten Temperaturen aktiviert und kodieren für eine Vielzahl verschiedener Proteine (Thomashow 1999). Darunter befinden sich Gene, die für Enzyme, welche Kryoprotektantien synthetisieren, kodieren, sowie weitere Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Proteine, welche von Relevanz für den Lipidmetabolismus, Hormonantworten und die Zellwand sind (Liu et al. 2019). So kommt es zu transkriptionellen, biochemischen und physiologischen Veränderungen innerhalb der Zelle und somit zur Akkumulation von Kryoprotektantien. Dabei handelt es sich um Aminosäuren und lösliche Zucker, welche die Formierung, beziehungsweise das Wachstum von Eiskristallen verhindern, die verfestigten Membranen stabilisieren und reparieren und das osmotische Potential der Zelle aufrecht halten, um einer Dehydrierung entgegenzuwirken (Chinnusamy et al. 2007).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen Lebensweise gezwungen, sich ständig ändernden Umweltbedingungen anzupassen. Der Chloroplast spielt dabei eine zentrale Rolle. In dieser Arbeit soll die Rolle von OEPs im Prozess der Kälte-Akklimatisierung untersucht werden (Abbildung 4). Im Laufe dieser kommt es zu Veränderungen der Gen- und Proteinexpression, welche zum Ziel haben, Kryoprotektantien in der Zelle zu akkumulieren, um so die Zelle widerstandsfähiger gegen Gefrierschäden zu machen. OEP16 wird bei 4 °C runterreguliert, da es zu den COR-Genen gehört, die durch das CBF-Regulon reguliert werden (Thomashow 1999). Da OEP16 zudem permeable für Aminosäuren ist (Pohlmeyer et al. 1997), könnte es eine Rolle beim Aufbau der Gefriertoleranz im Zuge der Kälte-Akklimatisierung spielen. OEP40 hingegen ist permeable für Glukose und die OEP40-Verlustmutante zeigt in der Kälte einen verfrühten Blühphänotyp (Harsman et al. 2016), somit könnte OEP40 ein wichtiges Bindeglied beim Transport von Zuckern über die Hüllmembranen des Chloroplasten im Laufe der Kälte-Akklimatisierung darstellen. Für OEP23 soll erstmals eine T-DNA Insertionslinie charakterisiert werden.



Abbildung 4 Rolle von OEP16 und OEP40 im Prozess der Kälte-Akklimatisierung. Sobald Pflanzen der gemäßigten und borealen Zone Kälte ausgesetzt sind, beginnt der Prozess der Kälte-Akklimatisierung. Eine zentrale Rolle dabei spielt das CBF-Regulon, welches Auswirkung auf die Expression vieler Proteine hat, dazu zählt auch OEP16. OEP16 ist permeabel für Aminosäuren und könnte somit eine Rolle bei der Bereitstellung von Aminosäuren für die Synthese von Proteinen zum Zweck der Kälte-Akklimatisierung spielen. OEP40 ist permeabel für Zucker, welche gebraucht werden, um die Zelle vor Frostschäden zu schützen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle für die folgenden Experimente verwendeten Chemikalien wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) Merck (Darmstadt, Deutschland), New England BioLabs (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) oder ThermoFisher Scientific (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Größenstandards

Für die SDS-Page wurde der peqGOLD protein marker I (VWR, Ismaning, Deutschland) verwendet. Als Größenstandard für Agarose-Gelelektrophorese wurde mittels PstI verdaute lamda-Phage DNA (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet.

2.1.3 Enzyme und Kits

Restriktionsendonukelasen wurden von New England BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. T4 DNA Ligase wurde bei Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland) erworben, Q5 DNA Polymerase stammt von New England BioLabs und Taq DNA Polymerase von Bioron (Ludwigshafen, Deutschland).

Für die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde das NucleoSpin Plasmid Mini Kit von Macherey and Nagel (Düren, Deutschland) genutzt. Zur Aufreinigung von PCR Produkten und Gel-Extraktion wurde das NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey and Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Genomische DNA aus *A. thaliana* wurde mithilfe des innuPREP Plant DNA Kit von Analytik Jena (Jena, Deutschland) gewonnen. Zur Isolation von pflanzlicher RNA wurde das RNeasy Plant Mini Kit 50 von Qiagen (Hilden, Deutschland) und das Turbo DNA-free Kit von Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Für die cDNA-Synthese zur Klonierung wurde das iScriptTM cDNA Synthese Kit von Biorad (Feldkirchen, Deutschland) genutzt.

Die enzymatische Aktivität von Succinyl-CoA-Synthetase wurde mithilfe des Succinyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit Abcam (Berlin, Deutschland) bestimmt.

2.1.4 Puffer

Die für die Experimente verwendeten Puffer sind in Tabelle 1 aufgelistet, nebst ihrer Zusammensetzung und dem Einsatzgebiet.

Name	Zusammensetzung	Verwendung
50 x TAE-Puffer	2 M Tris	Gelelektrophorese
	50 mM EDTA pH 8,0	-
	5,71 % (v/v) Essigsäure	-
Citratsynthase-Puffer	1 mM DNTB	NAF-Enzymassays
	1 mM Acetyl CoA	-
	1 mM Oxalacetat	-
	50 mM Tris-HCl pH 8	-
Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Methanol	SDS-Page
	9 % (v/v) Essigsäure	-
	0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250	-
dNTP-Mix	10 mM dATP	PCR
	10 mM dCTP	-
	10 mM dGTP	-
	10 mM dTTP	-
ECL 1	100 mM Tris-HCl pH 8,5	Immunodetektion
	1 % (w/v) Luminol	-
	0,44 % (w/v) Coomaric Acid	-
ECL2	100 mM Tris-HCl pH 8,5	Immunodetektion
	0,018 % H ₂ O ₂	-
Entfärber	45 % (v/v) Methanol	SDS-Page
	9 % (v/v) Essigsäure	-
Entwickler	2,5 N H ₂ SO ₄	NAF-Enzymassays
	7,7 mM NH ₄ -Molybdat	-
	30 mM Ascorbinsäure	-
	0,1 mg Sb /ml (K-Antimonyl- Tartrat	-
Enzym-Extraktionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,3	NAF-Enzymassays
	5 mM MgCl ₂	-
Extraktionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0	Proteinextraktion
	2 % (w/v) Lithium Dodecyl Sulfat	-
	0,1 mM PMSF	-
Detergens-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5	Einschlusskörper-Aufreinigung
	0,2 M NaCl	-
	1 % (w/v) Desoxycholsäure	-
	1 % (v/v) Nonidet P-40	-
	10 mM β-Mercaptoethanol	-

Tabelle 1 Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

Inkubationspuffer	125 mM Natriumacetat	NAF-Enzymassays
·	0,125 % (v/v) Triton X-100	
Laemmli Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8	SDS-Page
	2 % (w/v) SDS	
	10 % (v/v) Glycerin	-
	5 % (v/v) β -Mercaptoethanol	-
	0,004 % (w/v)	-
	Bromphenolblau	
P1-Puffer	50 mM Trsi-HCl pH 8,0	DNA-Isolation
	10 mM EDTA	_
	100 μg/ml Rnase A	_
P2-Puffer	200 mM NaOH	DNA-Isolation
	1 % (w/v) SDS	_
P3-Puffer	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1	DNA-Isolation
Puffer A	8 M Urea	Ionenaustauschchromatographie
	20 mM Hepes-KOH pH 7,6	_
	1 mM EDTA	_
Puffer B	8 M Urea	Ionenaustauschchromatographie
	1 M NaCl	_
	20 mM Hepes-KOH pH 7,6	_
	1 mM EDTA	_
Pyrophosphatase-	50 mM Tris-HCl pH 8,0	NAF-Enzymassays
Assaypuffer	10 mM MgCl ₂	_
	1,3 mM NaPPi	_
Resuspendierungs-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0	Einschlusskörper-Aufreinigung
	0,2 M NaCl	_
	5 mM β-Mercaptoethanol	_
Sammelgelpuffer	0,25 M Tris-HCl pH 6,8	SDS-Page
	0,4 % (w/v) SDS	_
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3	SDS-Page
	192 mM Glycin	_
	0,1 % (w/v) SDS	_
Shorty Buffer	0,2 M Tris-HCl pH 9,0	DNA-Isolation
	0,4 M LiCl	_
	25 mM EDTA	_
	1 % (w/v) SDS	_
TBS-T-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,6	Immunodetektion
	150 mM NaCl	_
	1 % (v/v) Tween-20	_
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0	DNA-Isolation
	1 mM EDTA	_
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	SDS-Page
	0,8 % (w/v) SDS	_
Towbin-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 8,6	Western Blot
	192 mM Glycin	_

	20 % (v/v) Methanol	
Tris-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0	Einschlusskörper-Aufreinigung
	10 mM DTT	_
Triton-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5	Einschlusskörper-Aufreinigung
	0,5 % (v/v) Triton X-100	
	5 mM β-Mercaptoethanol	_
UGPase-Assaypuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,5	NAF-Enzymassays
	2 mM MgCl ₂	
	2 mM NaF	_
	0,25 mM NADP	_
	2 mM UDP-Glukose	_
	20 μM Glucose-1,6-	_
	bisphosphat	
	3 U/ml Phosphoglucomutase	_
	1 U/ml Glucose-6-phosphat-	_
	Dehydrogenase	

2.1.5 Medien

Für die Anzucht von Bakterienkulturen wurde LB-Medium verwendet, um festes LB-Medium herzustellen wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zum Medium hinzugegeben. Für die *in vitro* Kultivierung von *A. thaliana* wurde ½ MS-Medium verwendet.

Tabelle 2 Verwendete	Medien und deren	Zusammensetzung.
----------------------	------------------	------------------

Medium	Zusammensetzung	
1/2 MS	1 % (w/v) Saccharose	pH 5,7
	0,238 % (w/v) MS Salze mit Vitaminen	
	0.05% (w/v) MES	
	0,6 % (w/v) Agar-Agar	
LB	1 % (w/v) Pepton	рН 7,0
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt	
	0,5 % (w/v) NaCl	
	1,5 % (w/v) Agar-Agar	
SOC	0,5 % (w/v) Hefeextrakt	рН 7,0
	2,2 % Trypton	
	10 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	10 mM MgCl ₂	
	10 mM MgSO ₄	
	20 mM Glukose	

2.1.6 Pflanzenmaterial

Der Ökotyp Columbio (Col-0) wurde als Wildtyp (WT) verwendet. In Tabelle 3 sind die in den Experimenten genutzten T-DNA Linien aufgelistet.

	Linie
	SAIL_266_D10
	SALK_021796
OEP16.1	SALK_024018
OEP16.2	SAIL#1377_1225_B03
OEP16.4	SALK_109275
	Gabi_279G04
	OEP16.1 OEP16.2 OEP16.4

Tabelle 3 Verwendete T-DNA Linien.

2.1.7 Bakterienstämme

Alle zur Transformation verwendeten Bakterien waren chemisch kompetent. *E. coli* Top10 Zellen wurden für DNA Vermehrung und molekulare Klonierung verwendet, *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden zur Überexpression von heterologen Proteinen genutzt. Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* wurden *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) GV3101 Zellen genutzt. Alle relevanten Genotypen sind in Tabelle 4 gelistet.

Tabelle 4 Verwendete Bakterienstämme und deren	Genotypen.
--	------------

Stamm	Bakterium	Genotyp
Top10	E. coli	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG
		recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻
BL21(DE3)	E. coli	E. coli str. B F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3
		[lacl lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)
GV3101	A. tumefaciens	C58 (RifR) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (GentR) Nopaline

2.1.8 Konstrukte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden entweder klassisch kloniert oder mit dem Gateway-System beziehungsweise mit dem Golden Gate System erstellt (Tabelle 5). Für Letzteres dienten folgende Konstrukte als Backbones: LI+Bpi, pUC57 und LIIß F 1-2, Xpre2-S (pCAMBIA) (Binder et al. 2014). Des Weiteren wurden folgende LI-Vektoren verwendet, um die LII-Vektoren zu kreieren: LI_p35S_A-B, LI_dummy_B-C, LI_dummy_D-E, LI_35Sterminator_E-F und LI_BASTA_F-G (Binder et al. 2014).
 Tabelle 5 Liste der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte.

Bezeichnung	Beschreibung	Verwendung
pET21_OEP16.1+Stop	mit Stoppcodon	Überexpression
pET21_OEP16.1 S4A+Stop	mit Stoppcodon	Überexpression
pET21_OEP16.1 S4D+Stop	mit Stoppcodon	Überexpression
pDONR207_OEP16.1		Gateway Entry Clone
pDONR207_pOEP16.1_OEP16.1	endogener Promotor	Gateway Entry Clone
pH2GW7_OEP16.1	p35S	pflanzlicher Expressionsvektor
pHGW_pOEP16.1_OEP16.1	endogener Promotor	pflanzlicher Expressionsvektor
pHGW_pOEP16.1_OEP16.1 S4A	endogener Promotor	pflanzlicher Expressionsvektor
pHGW_pOEP16.1_OEP16.1 S4D	endogener Promotor	pflanzlicher Expressionsvektor
LI_pOEP23_A-C	endogener Promotor	Golden Gate LI
LI_OEP23_C-D		Golden Gate Ll
LII_pOEP23_OEP23	Komplementation	pflanzlicher Expressionsvektor

2.1.9 Oligonukleotide

Alle zur Vervielfältigung von DNA genutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden bei Metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt.

 Tabelle 6 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Name	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
LB SAIL	GAAATGGATAAATAGCTTTGCTTCC	Genotyping
OEP40_KO_fw	TTTCGTGAAGAGCAAAAGCC	Genotyping
OEP40_KO_rv	TATCCACCACCTCAATCGAAG	Genotyping
pSuT_KO_LP	TTCAGTCACATTTCGCAATCAGAG	Genotyping
pSuT_KO_RP	AAAGCCATAGAGAAGCCTTCC	Genotyping
Lbb1.3_SALK	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	Genotyping
OEP23 for	GGTGTTCAAGCTAGATGATGGTAG	Genotyping
OEP23 rev	GGAAATGGTGAGGTATGGTATGAG	Genotyping
LB GABI	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT	Genotyping
OEP16.1_BamHI_fw	GGAAGGATCCATGGCTTCAAGCACATTCTC	Klonierung
OEP16.1_XhoI+st_rv	GGAACTCGAGTCAGTAGAAATAATGATTGTTA ACGAAC	Klonierung
pET21_OEP16_S4D_fw	CATGGCTTCAGACACATTCTCCG	Mutagenese
pET21_OEP16_S4A/D_rv	GTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC	Mutagenese
pET21_OEP16_S4A_fw	CATGGCTTCAGCCACATTCTCCG	Mutagenese
pDONR_p+OEP16_S4D_fw	GATGCCTTCAGACACATTCTCCG	Mutagenese
pDONR_p+OEP16_S4A/D_rv	тттсттсттсттсттсстс	Mutagenese
pDONR_p+OEP16_S4D_rv	CATGCCTTCAGCCACATTCTCCG	Mutagenese
pDONR_OEP16_S4A_rv	CGGAGAATGTGGCTGAAGGCATC	Mutagenese

pDONR_OEP16_S4D_rv	CGGAGAATGTGTCTGAAGGCATC	Mutagenese
pDONR_OEP16_S4A/D_fw	GGACTGTTAGCACGCCGAAG	Mutagenese
OFP_OEP23	CTGAAGACCTTACGGGTCTCCCACCATGGTGTT CTTGAGTTGGGG	Golden Gate Klonierung
ORP_OEP23	CTGAAGACCTCAGAGGTCTCCCCTTCGAAGCAT TGACATGTTTCAGC	Golden Gate Klonierung
OFP_pOEP23	CTGAAGACCTTACGGGTCTCTGCGGAACCCTCT GTATAGTGACTGG	Golden Gate Klonierung
IRMP_pOEP23	CTGAAGACCTTCTTTGTTCGTGGTCTTGATGC	Golden Gate Klonierung
IFMP_pOEP23	CTGAAGACCTAAGACCACTGTTTGAGGAAATC	Golden Gate Klonierung
ORP_pOEP23	CTGAAGACCTCAGAGGTCTCTGGTGAACTCTTC CACTGCAATTGAAGC	Golden Gate Klonierung

2.1.10 Antikörper

Der primäre Antikörper gegen *A. th.* OEP16.1 wurde gegen heterolog exprimiertes Protein in Kaninchen generiert (Pineda Antibody Service, Berlin, Deutschland) und in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt (Philippar et al. 2007). Der sekundäre Antikörper, anti-Kaninchen-HRP, wurde bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) gekauft.

2.2 Methoden

2.2.1 Wachstumsbedingungen

2.2.1.1 E. coli und A. tumefaciens

Für die Kultivierung von Bakterien wurde LB Medium verwendet, Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm inkubiert. *E. coli* wurde bei 37 °C angezogen, *A. tumefaciens* wurde bei 28 °C kultiviert. Die zur Selektion verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Antibiotikum	Lösemittel	Konzentration (µg/ml)
Ampicillin	ddH ₂ O	100
Carbenicillin	ddH ₂ O	100
Chloramphenicol	100 % Ethanol	25
Gentamycin	ddH ₂ O	20
Kanamycin	ddH ₂ O	50
Rifampicin	DMSO	100
Spectinomycin	ddH ₂ O	100

 Tabelle 7 Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien.

2.2.1.2 A. thaliana

Die Pflanzen wurden entweder auf Erde angezogen oder *in vitro* auf ½ MS-Medium. Zur Stratifizierung wurden alles Samen zunächst für 48 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, bevor der Transfer in die Klimakammer erfolgte. Aus Tabelle 8 können die unterschiedlichen Anzuchtbedingungen in den Klimakammern entnommen werden.

	Lichtstärke	Tageslänge/Temperatur	Nachtlänge/Temperatur
Langtag (LT)	100 μE m ⁻² s ⁻¹	16 h/ 22 °C	8 h/ 18 °C
Langtag 10 °C (LT 10 °C)	100 μE m ⁻² s ⁻¹	16 h/ 22 °C	8 h/ 18 °C
Kurztag (KT)	100 μE m ⁻² s ⁻¹	10 h/ 22 °C	14 h/ 18 °C

Die Pflanzen für die nicht-wässrige Fraktionierung wurden unter LED-Licht (100 % 395 nm, 11 % 440 nm, 100 % 3K, 15 % 660 nm, 100 % 740 nm) bei einer Lichtstärke von 200 μE m⁻² s⁻¹ und 16 h Licht/ 8 h Dunkelheit angezogen, wobei die Temperatur im Licht 21 °C und in der Dunkelheit 18 °C betrug. Nach drei Wochen wurde die Temperatur für 24 h auf 4 °C herabgesetzt.

2.2.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

Genomische DNA in hoher Qualität für die Next-Generation Sequenzierung wurde mithilfe des innuPREP Plant DNA Kit von Analytik Jena (Jena, Deutschland) isoliert.

Genomische DNA für die Genotypisierung wurde wie folgt isoliert: Zunächst wurde ein kleines Blatt in 400 μ l Shorty Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mittels einer Mikropistille zerkleinert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert, um Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 μ l eiskaltem Isopropanol gemischt. Zur DNA-Präzipitation wurde das Reaktionsgefäß fünf Mal invertiert und für mindestens 20 min bei -20 °C inkubiert. Um die DNA zu pelletieren wurde im Anschluss für 10 min bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet mit 500 μ l 70 % Ethanol für 10 min bei 4 °C und 13000 g gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das DNA Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Resuspendierung der DNA wurden 200 μ l TE-Buffer hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.3 Isolation von RNA aus Pflanzen

Zur Isolation von RNA aus *A. thaliana* wurde das RNeasy Plant Mini Kit 50 (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Im Anschluss erfolgte eine DNase Behandlung mit dem TURBO DNA-free Kit von ThermoFisher Scientific (Braunschweig, Deutschland).

2.2.4 cDNA-Synthese

Zum Zweck der molekularen Subklonierung wurde aus isolierter WT-RNA mithilfe des iScript cDNA Synthese Kit von Biorad (Hercules, USA) cDNA erstellt.

2.2.5 Plasmid Isolation aus E. coli

Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde entweder mithilfe des NucleoSpin Plasmid Mini Kit von Macherey and Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt oder aber nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979). Zunächst wurden 2 ml einer über Nacht angezogenen *E. coli*-Kultur bei 13000 g für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl P2-Puffer. Das Reaktionsgefäß wurde zehn Mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Membranen aufzubrechen und die DNA zu

Material & Methoden

denaturieren. Anschließend wurden 200 μ l P3-Puffer zur Neutralisation hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden erneut zehn Mal invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Um Proteine und Zelltrümmer zu pelletieren, wurde bei 13000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 μ l Isopropanol versetzt. Durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 13000 g wurde die Plasmid-DNA gefällt. Der Überstand wurde verworfen. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 μ l 70 % Ethanol bei 13000 g und 4 °C für 5 min gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 μ l TE-Buffer resuspendiert.

2.2.6 PCR

DNA wurde mithilfe von DFS-Taq DNA-Polymerase oder Phusion[®] High Fidelity DNA-Polymerase basierend auf den Herstellerangaben amplifiziert, wobei erstere für das Genotyping genutzt wurde und die zweite für die Klonierung. Die Temperatur zur Primerhybridisierung war abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden und wurde entsprechend angepasst, ebenso wie die Elongationszeit an die zu amplifizierende Fragmentlänge angepasst wurde. Zur Visualisierung wurden die PCR-Produkte auf ein 1 % Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und in TAE-Puffer bei 100 V für 30 min aufgetrennt. Zur Verwendung der PCR-Produkte zur Klonierung, wurden diese mithilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kits aufgereinigt.

2.2.7 Molekulare Klonierung

Um neue pflanzliche und bakterielle Expressionsvektoren zu generieren, wurden drei verschiedene Klonierungstechniken angewandt: klassische Klonierung mittels Restriktionsenzymen, die Gateway[®] Technologie und das Golden Gate Klonierungssystem. Alle erstellten Vektoren wurden zunächst in *E. coli* Top10 Zellen transformiert. Aus einzelnen Kolonien wurde dann Plasmid-DNA isoliert und auf eine korrekte Klonierung mittels PCR und Sequenzierung überprüft.

2.2.7.1 Klassische Klonierung

Mittels PCR wurde zunächst die gewünschte CDS amplifiziert. Über die Primer wurden Restrikitonsschnittstellen an das PCR-Produkt angefügt. Nachdem das PCR-Produkt mithilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kits aufgereinigt worden war, erfolgte die Restriktionsspaltung für 1 h bei 37 °C mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben (New England Biolabs). Der Zielvektor wurde mit denselben Restriktionsendonukleasen gespalten. Anschließend erfolgte die Ligation mittels T4 Ligase für 3 h bei RT nach Herstellerangaben (New England Biolabs).

2.2.7.2 Gateway® Klonierung

Die Gateway[®] Technologie beruht auf dem System der Rekombination. So wurden zunächst mittels PCR die erforderlichen Rekombinase-Stellen (attB) an das zu klonierende Gen angehangen. Über diese konnte das Gen in der BP-Reaktion in einen Entry-Vektor eingebracht werden, welcher die entsprechenden attP-Sites besaß; es entstehen aus dieser Rekombination attL-Sites. Diese attL-Sites rekombinieren in einer LR-Reaktion mit den attR-Sites des Zielvektors. Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen, Braunschweig, Deutschland).

2.2.7.3 Golden Gate Klonierung

Die Golden Gate Assemblierung ist eine Art Baukastensystem, bei der verschiedene DNA-Bauteile, wie Promotoren, Gene oder Tags, einfach miteinander kombiniert werden können. Durch die Verwendung von Typ IIS Restriktionsendonukleasen (hier Bpil und Bsal), welche außerhalb ihrer Erkennungssequenz die DNA schneiden, werden artifizielle Basen an den Überhängen vermieden, sodass die einzelnen Bausteine lückenlos aneinander angefügt werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass das entstehende Restriktionsprodukt nicht mehr über die Erkennungssequenz verfügt. Somit ist Restriktionsspaltung irreversibel und kann deshalb zeitgleich mit der Ligation erfolgen. Zunächst wird das gewünschte Gen in einen Level 1 Vektor eingebracht, bei diesem Schritt können parallel interne Bpil/Bsal Schnittstellen entfernt werden. Im nächsten Schritt können beliebige Level 1 Vektoren zu einem Level 2 Expressionsvektor kombiniert werden.



Abbildung 5 Schematischer Aufbau eines Golden Gate Level II Expressionsvektors. Die einzelnen Level I Bausteine werden so konstruiert, dass durch Schneiden mit Bsal spezifische Überhänge mit einer Länge von vier Basenpaaren entstehen.

2.2.8 Mutagenese

Punktmutationen wurden mithilfe des Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kits (New England Biolabs) beruhend auf den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.9 Sequenzierung

Zur Überprüfung wurden die erstellten Konstrukte durch den Sequenzierungsservice der Genomics Service Unit (GSU, LMU München) sequenziert. Hierfür wurden 150 ng des jeweiligen Konstrukts mit 10 mM des entsprechenden Oligonukleotides versehen.

2.2.10 Transformation von E. coli

Alle zur Transformation verwendeten *E. coli* Stämme waren chemisch kompetent. Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurden 1-100 ng Plasmid-DNA hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert, anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden hiernach sofort zurück auf Eis gestellt und mit 250 µl vorgewärmten SOC-Medium versehen. Nun wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert, um die Antibiotikaresistenz auszubilden. Abschließend wurden die Zellen auf LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.11 Transformation von A. tumefaciens

Für die Transformation von *A. tumefaciens* wurden chemisch kompetente GV31.01 Zellen verwendet. Sobald die Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurde 1 μl Plasmid-DNA hinzugefügt. Sofort wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37 °C für 5 min aufgetaut. Nach der Zugabe von 500 μl SOC-Medium wurden die Zellen für 3 h bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurden die Zellen pelletiert, in 100 μl SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 48 h bei 28 °C inkubiert.

2.2.12 Stabile Transformation von A. thaliana

Zur stabilen Transformtion von A. *thaliana* wurde die Methode des 'floral dip' angewandt. Hierfür wurden die zu transformierenden Pflanzen zunächst unter LT Bedingungen bis zur Blüte angezogen. A. *tumefaciens* mit dem entsprechenden Konstrukt wurden dann über Nacht bei 28 °C und 180 rpm in LB-Medium mit 100 μg/ml Rifampicin, 25 μg/ml Gentamycin und 100 μg/ml Spectinomycin zur Selektion angezogen. Die Zellen wurden für 15 min bei 4 °C und 6000 g pelletiert und dann in Dipping-Medium (5 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (v/v) Silwet L-77) resuspendiert. Die blühenden Pflanzen wurden kopfüber für 30 sec in das Dipping-Medium eingetaucht. Dieses Protokoll wurde eine Woche später wiederholt, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Die ausgereiften Samen wurden eingesammelt und entsprechend ihres Selektionsmarkers (15 μg/ml Hygromycin oder 5 μg/ml BASTA) selektiert.

2.2.13 Proteinisolation aus A. thaliana

Zur Extraktion von löslichen Proteinen als auch Membranproteinen wurde zunächst ca. 200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Pflanzenpulver wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Extraktionspuffer versehen. Die Probe wurde gründlich durchmischt und für 30 min auf Eis inkubiert, um die Membranproteine zu isolieren. Im Anschluss wurde für 15 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert, um Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 50 mM EDTA und 10 mM DTT wurden hinzugefügt.

2.2.14 SDS PAGE

Proteine wurden mittels SDS-PAGE auf 10-15 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Tabelle 9). Die Proben wurden zur Vorbereitung mit SDS-Ladepuffer versehen und für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf das Gel geladen. Als Laufpuffer wurde SDS-Laufpuffer verwendet. Im Anschluss wurden die Gele entweder in Coomassie-Färbelösung angefärbt und mit Entfärber entfärbt oder für einen Western Blot verwendet.

Tabelle 9 Zusammensetzung	g des Trenn- 🤉	und Sammelgels fü	ir die SDS-PAGE.
	,		

Trenngel (in ml)			
	10 %	12,75 %	15 %
Acrylamid	3,3	4,25	5
Trenngelpuffer	2,5	2,5	2,5
ddH ₂ O	4,2	3,25	2,5
	+ 1 % (v/v) TEMED		

^{+ 0,1 % (}w/v) APS

Sammelgel (in ml)	
	5 %
Acrylamid	0,65
Sammelgelpuffer	2,5
ddH₂O	1,85
	+ 1 % (v/v) TEMED
	+ 0,1 % (w/v) APS

2.2.15 Western Blot

Zum Transfer von Proteinen von Polyacrylamidgelen auf eine PVDF Membran mittels Western Blot, wurde die Nass-Blot Methode verwendet. Hierfür wurden zunächst sechs Filterpapiere in Towbin-Puffer getränkt, sowie die PVDF Membran in Methanol für einige Sekunden aktiviert. Anschließend erfolgte der Schichtaufbau wie in Abbildung 6 abgebildet. Das Blotsandwich wurde in die mit Towbin-Puffer gefüllte Blotkammer eingehängt. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 1,5 h.



Abbildung 6 Western Blot – Schichtaufbau für den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF Membran mittels Nass-Blot Methode.

2.2.16 Immunodetektion

Im Anschluss an den Western Blot erfolgte die Immunodetektion. Hierfür wurde die Membran zunächst mithilfe von Ponceau angefärbt, um den Marker zu visualisieren. Anschließend wurde die Membran in TBS-T mit 3 % Milch für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Um überschüssige Milch zu entfernen wurde die Membran anschließend drei Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-OEP16.1 1:2000 in TBS-T mit 1 % Milch) für 1 h bei RT. Anschließend wurde abermals drei Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Hase-HRP 1:10000 in TBS-T mit 1 % Milch) für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran wieder drei Mal 5 min mit TBS-T gewaschen. Zur Visualisierung wurden je 1 ml ECL1 und ECL2 vermischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Die Visualisierung erfolgte in einem ECL-Lesegerät.

2.2.17 Proteinüberexpression

Zur Überexpression von rekombinantem Protein in *E. coli* wurde zunächst der Expressionsvektor, welcher für das gewünschte Protein kodiert, in kompetente BL21 Zellen transformiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Eine Kolonie wurde dann verwendet um eine 30 ml Vorkultur anzuimpfen. Diese wurde über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 1 L frisches LB Medium überführt und so die Hauptkultur gestartet. Bei einer OD₆₀₀ 0,4-0,6 wurden die heterologe Proteinexpression mit der Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Überexpression erfolgte für 3 h bei 37 °C und 180 rpm. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C und 3300 g für 15 min pelletiert.

2.2.18 Einschlusskörper-Aufreinigung

Bei den in dieser Arbeit überexprimierten Proteine handelt es sich um Membranproteine. Diese neigen dazu, sich bei heterologer Überexpression in *E. coli* in sogenannten Einschlusskörpern anzusammeln. Um reines, rekombinantes Protein zu erhalten, müssen also zunächst die Einschlusskörper isoliert und aufgereinigt werden. Hierfür wurden zunächst die pelletierten Zellen aus der Überexpression in 20 ml Resuspendierungs-Puffer resuspendiert und mittels French Press zwei Mal aufgeschlossen. Anschließend wurde für 30 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Detergens-Puffer aufgenommen, gründlich durchmischt und für 10 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis das Pellet gräulichweiß wurde. Danach wurde das Pellet zwei Mal in 10 ml Triton-Puffer für 10 min bei 4 °C und 10000 g gewaschen. Zum Entfernen der Detergenzien wurde das Pellet anschließend mehrmals mit Tris-Puffer für 10 min bei 4 °C und 10000 g gewaschen. Die aufgereinigten Einschlusskörper konnten nun in 5 ml Tris-Puffer resuspendiert werden und wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.
2.2.19 Ionenaustauschchromatographie

Da sich in den Einschlusskörpern neben dem gewünschten Protein auch Verunreinigungen durch bakterielle Proteine befinden, muss eine weitere Aufreinigung, hier mittels lonenaustauschchromatographie, erfolgen. Bei der Ionenaustauschchromatographie werden Proteine aufgrund ihrer Ladung aufgetrennt. Zur Vorbereitung für die Chromatographie wurden 2 ml der zuvor isolierten Einschlusskörper pelletiert und in 1 ml Puffer A über Nacht bei RT resuspendiert. Nicht gelöste Bestandteile wurden am nächsten Tag bei RT und 20000 g für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde auf eine HiTrap Q FF 1 ml Säule, welche an ein Äkta Purifier System (GE Healthcare, München) angeschlossen war, geladen, nachdem die Säule mit fünf Säulenvolumen Puffer A äquilibriert worden war. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Nach dem Anbinden der Probe an die Säule wurde ein Gradient angelegt, bei dem die Konzentration von Puffer B von 0 % auf final 100 % erhöht wurde. Puffer B enthält 1 M NaCl. Der Durchfluss sowie die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe eines Fraktionensammlers aufgefangen.

2.2.20 Elektrophysiologie

Mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigtes Protein wurde in Liposomen rekonstituiert. Das Protein wurde hierfür zunächst in 80 mM Mega-9 aufgenommen und dann mit vorgeformten Liposomen gemischt, wobei die finale Lipidkonzentration 4 mM betrug mit einem Protein zu Lipid Verhältnis von 1:500. Das Detergens Mega-9 wurde mittels Dialyse gegen 150 mM und 20 mM HEPES pH 7 entfernt. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurde die Stromstärke unter symmetrischen Pufferkonzentrationen (250 mM/250 mM KCI) gemessen, Spannungsrampen wurden unter asymmetrischen Pufferkonzentrationen (250 mM/20 mM KCI) gemessen. Die Daten wurden anschließend mit OriginPro 8.5 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) analysiert. Die elektrophysiologischen Messungen wurden in der Gruppe von Prof. Dr. Meinecke (Institut für Zellbiochemie, Universität Göttingen) durchgeführt.

2.2.21 Nicht-wässrige Fraktionierung

Die nicht-wässrige Fraktionierung (NAF) ist eine Methode, mit deren Hilfe es ermöglicht wird, einen Einblick in das Metabolom und Proteom der Pflanze auf subzellulärer Ebene zu erhalten, da sie es ermöglicht, Proteine und Metabolite in den einzelnen Kompartimenten getrennt voneinander zu analysieren. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gemörsert. Anschließend wurde es für mindestens fünf Tage lyophilisiert. Alle für den weiteren Verlauf des Experiments verwendeten Lösungen wurden auf 4 °C vorgekühlt. Aus den organischen Lösemitteln Heptan (7H, ρ = 0,69 g cm⁻³) und Tetrachlorethylen (TCE, ρ = 1,62 g cm⁻³) wurde eine Mixtur mit einer Dichte von ρ = 1,3 g cm⁻³ erstellt. In 10 ml dieser Lösung wurden 15 mg des gefriergetrockneten Materials in einem Reagenzglas resuspendiert und für 15 min in Eiswasser in einem Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die Probe durch ein Nylongaze mit einer Porengröße von 22–25 µm gefiltert. Das Reagenzglas wurde mit 10 ml Heptan gespült, diese 10 ml wurden ebenfalls filtriert und mit der Probe vereinigt. Die Suspension wurde bei 4 °C und 4400 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml TCE resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses Reaktionsgefäß repräsentierte den ersten Dichteschritt des Gradienten mit einer Dichte von $\rho > 1,55$ g cm⁻³. Ab diesem Punkt startete ein iterativer Arbeitsablauf: Durch Zugabe von Heptan wurde die Dichte auf ρ > 1,5 g cm⁻³ im Reaktionsgefäß eingestellt (Abbildung 7 Punkt 6), dann wurde die Probe für 10 min in Eiswasser im Ultraschallbad inkubiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 21100 g zentrifugiert. Dies resultierte im Erhalt eines Pellets und eines Überstands. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von Heptan wurde der zweite Dichteschritt des Gradienten, $\rho > 1,45$ g cm⁻³, generiert. Die nächste Runde des iterativen Arbeitsablaufes wurde somit gestartet. Dieser wurde so lange wiederholt, bis der finale Dichteschritt von $\rho > 1,32$ g cm⁻³ erreicht wurde. Die jeweiligen Pellets wurden in 900 µl eines Gemisches aus 7H-TCE resuspendiert, dessen Dichte der Dichte der jeweiligen Fraktion entsprach, also z.B. $\rho > 1,5$ g cm⁻³ für die erste Fraktion. Die Suspension wurde in drei Subfraktionen à 300 µl aufgeteilt und mit je 1 ml Heptan gewaschen und anschließend für 3 min bei 4 °C und 21100 g zentrifugiert. Hiernach wurde 1 ml des Überstands verworfen, davon ausgenommen die letzte Fraktion. Die Pellets wurden in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.



Abbildung 7 Schematischer Versuchsablauf der nicht-wässrigen Fraktionierung. Mithilfe der nichtwässrigen Fraktionierung wird ein Einblick in das Metabolom und Proteom auf sub-zellulärer Ebene ermöglicht. Der Versuchsablauf startet mit der Ernte des Pflanzenmaterials, dieses wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gemörsert (1). Anschließend erfolgt die Gefriertrocknung, um das Material vom Wasser zu befreien (3). Das gefriergetrocknete Material wird in einem Gemisch aus Heptan (7H) und Tetrachlorethylen (TCE) der Dichte $\rho = 1.3$ g cm⁻³ resuspendiert und im Eisbad sonifiziert (3). Die Suspension wird anschließend filtriert und zentrifugiert (4). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml TCE resuspendiert (5). Durch Zugabe von 7H wird die erste gewünschte Dichte des Gradienten $\rho > 1.5$ g cm⁻³ eingestellt (6). Wieder wird die Suspension im Eisbad sonifiziert und anschließend zentrifugiert (7). Die Probe wird nun aufgeteilt in Pellet und Überstand (8). Durch Zugabe von 7H wird die nächste Dichtestufe eingestellt (9). Die Probe wird abermals im Eisbad sonifiziert und anschließend zentrifugiert (10). So entsteht wieder ein Pellet mit Überstand (11), welche wiederum voneinander getrennt werden (12), der Kreislauf beginnt von vorne bei Punkt 8 und wird solange wiederholt, bis die finale Dichte von $\rho > 1.32$ g cm⁻³ eingestellt ist. Das abgetrennte Pellet (13) wird in 900 μ l 7H-TCE mit der entsprechenden Dichte, beginnend bei $\rho > 1.5$ g cm⁻³, resuspendiert und auf drei Reaktionsgefäße aufgeteilt (14). Zum Waschen der Suspension wird je 1 ml 7H hinzugefügt und anschließend zentrifugiert. Nun wird 1 ml des Überstandes wieder abgenommen und verworfen, der restliche Überstand wird in einem Vakuum-Konzentrator eingedampft, sodass nur das Pellet zurückbleibt. Beim letzten Durchgang bei $\rho < 1.32$ g cm⁻³ wird das zum Waschen hinzugefügte 7H nach der Zentrifugation nicht entfernt, sondern komplett eingedampft. Nach Beendigung des Versuchsablauf stehen pro gewählter Fraktion drei Subfraktionen zur Verfügung, eine wird für die Markerenzymtests verwendet, die beiden anderen Subfraktionen können für die Metabolom- und/oder Proteomanalyse verwendet werden.

2.2.21.1 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

Die gaschromatographische Analyse (GC-MS Analyse) der subzellulären Metabolitverteilung wurde in Kooperation mit Dr. Lehmann (Metabolomics Service, LMU München) durchgeführt.

2.2.21.2 Datenanalyse und Statistik

Die Analyse der Daten aus der GC-MS Analyse wurde in Kooperation mit Dr. Fürtauer und Prof. Dr. Nägele (LMU München), wie von Fürtauer und Kollegen beschrieben (Fürtauer et al. 2016), durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden folgende Programme verwendet: Microsoft Excel (www.microsoft.com), Matlab (www.mathworks.com) und R (*The R Project for Statistical Computing*; www.r-project.org).

2.2.22 Enzymtests

Im Anschluss an die nicht-wässrige Fraktionierung wurden Enzymtests durchgeführt. Für jedes Kompartiment wurde die Enzymaktivität eines Markerenzyms in jeder der Fraktionen gemessen. Anhand dieser kann die relative Verteilung der Kompartimente über den Gradienten bestimmt werden. Mithilfe von Korrelation kann so eine Aussage über die kompartimentspezifischen Metabolitkonzentrationen gemacht werden.

Zunächst wurden aus einer der drei Subfraktionen aus der nicht-wässrigen Fraktionierung Enzyme extrahiert. Hierfür wurden die Pellets in 500 μl Enzym-Extraktionspuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei 4 °C 15700 g zentrifugiert. Der Überstand, welcher die gelösten Enzyme enthielt, wurde für die Enzymtests verwendet.

2.2.22.1 Saure Phosphatase Enzymtest

Die saure Phosphatase war das Markerenzym für die Vakuole (Abbildung 8). Zunächst wurden 150 µl des Enzymextrakts mit 450 µl Inkubationspuffer vermengt, für die Nullprobe wurden 150 µl Enzym-Extraktionspuffer verwendet. Danach wurde die Probe auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße gleichmäßig aufgeteilt. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min

p-Nitrophenylphosphat + $H_2O \longrightarrow p$ -Nitrophenol + Phosphat

Abbildung 8 Der saure Phosphatase-Enzymtest. Die saure Phosphatase (SP) wird als Markerenzym für die Vakuole verwendet. Im Enzymtest setzt die SP p-Nitrophenylphosphat und Wasser zu Nitrophenol und Phosphat um. Das pH-Optimum der SP liegt bei pH 4,5-5,5. Durch Zugabe des Stopp-Puffers steigt der pH, das zuvor farblose p-Nitrophenol erscheint nun gelb und kann bei einem Absorptionsmaximum von 410 nm gemessen werden.

bei 37 °C und 700 rpm in einem Thermomix inkubiert. Die Hälfte der Proben wurde mit 100 µl Substrat (1 mg/ml 4-Nitrophenyl-phosphat Dinatriumsalz Hexahydrat gelöst in Inkubationspuffer) versehen und nochmals für 25 min bei 37 °C und 700 rpm im Dunkeln inkubiert. Die andere Hälfte der Proben wurde zunächst mit je 400 µl Stopp-Puffer (1 M Na₂CO₃) versehen, dann erfolgte die Zugabe von je 100 µl Substrat, ausgenommen die Nullprobe, diese wurde mit 100 µl Inkubationspuffer versehen. Nach der 25-minütigen Inkubation der ersten Hälfte der Proben, wurde auch hier die Reaktion durch Zugabe von 400 μ l Stopp-Puffer beendet. Je Probe wurden nun 200 μ l in eine 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen) pipettiert und in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät die Absorption bei 410 nm gemessen. Zur Auswertung wurde zunächst der Nullwert von der jeweiligen Messreihe abgezogen und dann der Messwert ohne Inkubationszeit von dem Messwert mit Inkubationszeit des Substrats abgezogen. Um die relative Verteilung zu bestimmen, wurde zunächst die Summe aus allen Messwerten gebildet und dann der Quotient aus dieser Summe und den einzelnen Messwerten.

2.2.22.2 UGPase Enzymtest

Als Markerenzym für das Cytosol wurde die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (UGPase) verwendet (Abbildung 9). Für dieses Assay wurden zunächst 140 µl UGPase-Assaypuffer und je 70 µl Enzymextrakt in eine weiße 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen) pipettiert. Die Nullprobe wurde mit 70 µl Enzym-Extraktionspuffer versehen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl 100 mM Natriumpyrophosphat gestartet. Nach 2 min Inkubation bei RT wurde die Enzymkinetik für 6 min bei 334 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde zunächst der Nullwert von allen Messwerten abgezogen und dann die Steigung über alle Messungen berechnet. Anhand der Steigungen wurde die relative Verteilung berechnet.



Abbildung 9 Der UGPase-Enzymtest. Die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase) wird als Markerenzym für das Cytosol verwendet. Die UGPase setzt UDP-Glukose und NAPPi zu UTP und Glukose-1-phosphat um. Glukose-1-phosphat wird dann von der Phosphoglucomutase zu Glukose-6-phosphat umgewandelt. Zuletzt wird Glukose-6-phosphat und NADP⁺ von der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH/H⁺ umgesetzt. Die maximale Absorption von NADPH kann bei 340 nm gemessen werden.

2.2.22.3 Pyrophosphatase Enzymtest

Als Markerenzym für die Plastiden wurde die Pyrophosphatase gewählt (Abbildung 10). Zu 800 µl Pyrophosphatase-Assaypuffer wurden 15 µl Enzymextrakt gegeben, in die Nullprobe 15 µl Enzym-Extraktionspuffer. Die Proben wurden zunächst für 10 min bei RT inkubiert, anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 95 °C und 500 rpm. Sobald die Proben auf RT abgekühlt waren, wurden je 150 µl Probe in eine 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen) transferiert und mit 50 µl Entwickler versehen. Nach 4 min Inkubationszeit bei RT erfolgte die Messung der Absorption in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 882 nm. Zur Auswertung wurde der Nullwert von den restlichen Messwerten abgezogen und aus diesen die relative Verteilung berechnet.



Abbildung 10 Der Pyrophosphatase-Enzymtest. Die Pyrophosphatase (PP) wird als Markerenzym für den Plastiden verwendet. Zunächst spaltet die PP ein Phosphat von Natriumpyrophosphat ab, welches dann mit Ammoniummolybdat zu Ammonium-Phosphomolybdat reagiert. Durch Reduktion mittels Ascorbinsäure entsteht das blaue β-Keggin-Ion, welches ein Absorptionsmaximum bei 882 nm besitzt.

2.2.22.4 Citratsynthase Enzymtest

Die Citratsynthase sollte zunächst als Markerenzym für die Mitochondrien verwendet werden (Abbildung 11). Zu 150 µl Citratsynthase-Puffer werden 50 µl Enzymextrakt in eine 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gegeben. Die Messung der Enzymkinetik wurde mit einem Intervall von 10 sec für mindestens 10 min bei 412 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät durchgeführt. Zur Auswertung wurde zunächst der Nullwert von allen Messwerten abgezogen und dann die Steigung über alle Messungen berechnet. Anhand der Steigungen wurde die relative Verteilung berechnet.

Abbildung 11 Der Citratsynthase-Enzymtest. Die Citratsynthase (CS) sollte zunächst als Markerenzym für die Mitochondrien verwendet werden. Die CS katalysiert die erste Reaktion im Citratzyklus, bei der Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat, CoA-SH und Wasser umgesetzt werden. Zur Reaktion zugegebenes DTNB reagiert mit der Thiolgruppe von CoA-SH zu TNB, dessen Absorptionsmaximum bei 412 nm gemessen werden kann.

2.2.22.5 Succinyl-CoA Synthetase Enzymtest

Die Succinyl-CoA Synthetase diente als Markerenzym für die Mitochondrien (Abbildung 12). Das Assay wurde nach Herstellerangaben mithilfe des Succinyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit Abcam (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Messung wurde in einer 96-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm durchgeführt. Zur Auswertung wurde zunächst der Nullwert von allen Messwerten abgezogen und dann die Steigung über alle Messungen berechnet. Anhand der Steigungen wurde die relative Verteilung berechnet.

Succinat + CoA + ATP \longrightarrow Succinyl-CoA + ADP

Abbildung 12 Der Succinyl-CoA Synthetase-Enzymtest. Die Succinyl-CoA Synthetase (SCS) wird als Markerenzym für die Mitochondrien verwendet. Der Enzymtest wird mit dem Succinyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit von Abcam (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die SCS wandelt Succinat und CoA unter Verbrauch von ATP in Succinyl-CoA um, welches mit dem im Kit mitgelieferten Entwickler einen farbigen Komplex bildet, dessen Absorptionsmaximum bei 450 nm gemessen werden kann.

2.2.23 Kreuzung zweier A. thalina Einzelmutanten

Zur Erzeugung einer Doppelmutante oep40 x psut wurden zunächst die Einzelmutanten unter Langtagsbedingungen angezogen und zur Blüte gebracht. Nun wurden von einer der beiden Mutanten die Petalen einer noch nicht geöffneten Blüte entfernt, sodass das Gynözeum frei lag. Die Verwendung einer ungeöffneten Blüte soll das Risiko einer Selbstung verringern. Von der zweiten Mutante wurde eine bereits geöffnete Blüte genommen und mit den Staubblättern über das Gynözeum gestrichen, sodass der Pollen übertragen wurde. Nach erfolgreicher Bestäubung entwickelte sich eine Schote, nach deren Abreifung wurden die Samen geerntet und einzeln ausgelegt. Mittels PCR wurde der Erfolg der Kreuzung überprüft, eine Doppelmutante sollte homozygot für beide T-DNA Insertionen sein.

2.2.24 Phänotypisierung

Um Unterschiede im Wachstum verschiedener Genotypen von *A. thaliana* festzustellen, wurde eine Phänotypisierung durchgeführt (Boyes et al. 2001). Pro Wachstumsbedingung und Genotyp wurden 20 Einzelpflanzen untersucht. Es wurden folgende Wachstumsstadien aufgezeichnet: Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.04), Länge von zehn Rosettenblättern > 1 mm (Stadium 1.10), Sichtbarkeit der ersten Blütenknospe (Stadium 5.10), Öffnen der ersten Blüte (Stadium 6.00) und das Stadium der vollständigen Blüte (Stadium 6.90).

2.2.25 Gefriertoleranz

Zur Überprüfung der Gefriertoleranz wurden WT und OEP16 TM Pflanzen angezogen und für drei Wochen unter LT Bedingungen kultiviert. Hiernach wurden die Pflanzen in drei Gruppen aufgeteilt: eine Kontrollgruppe, eine nicht-akklimatisierte Gruppe und eine akklimatisierte Gruppe. Die Kontrollgruppe wurde weiterhin unter LT Bedingungen kultiviert. Die nicht-akklimatisierte Gruppe wurde von LT Bedingungen direkt zu -6 °C für 3 h transferiert. Die akklimatisierte Gruppe wurde zunächst für 24 h bei 4 °C akklimatisiert und erst dann für 3 h bei -6 °C inkubiert. Im Anschluss an den Kälteschock wurden beide Gruppen für 24 h bei 4 °C inkubiert und dann für weitere sieben Tage unter LT Bedingungen kultiviert.

2.2.26 Aminosäure-Fütterungs-Experiment

Um Wachstumseffekte von Aminosäuren auf Wildtyp und OEP 16 TM zu untersuchen, wurde das Aminosäure-Fütterungs-Experiment durchgeführt. Hierfür wurden zunächst ½ MS-Medium Platten gegossen, welche mit den 20 proteinogenen Aminosäuren in verschiedenen Konzentrationen supplementiert waren. Dann wurden Wildtyp- und OEP16 TM-Samen oberflächensterilisiert. Hierfür wurden ca. 100 µl Samen in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml 70 % Ethanol und 0,05 % Trition-X-100 für 10 min bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Samen drei Mal mit 96 % Ethanol gewaschen und auf einem sterilen Filterpapier unter der Sterilbank getrocknet. Pro Platte wurden jeweils 20 Samen pro Genotyp ausgelegt. Die Platten wurden für zwei Tage bei 4 °C vernalisiert und anschließend unter LT Bedingungen kultiviert. Als Negativkontrolle wurden ½ MS-Platten ohne zusätzliche Aminosäure verwendet.

3 Ergebnisse

In Chloroplasten finden neben der Photosynthese vielfältige andere biochemische Reaktionen statt, aus denen die verschiedensten Metabolite hervorgehen. Diese Metabolite werden in der gesamten Pflanzenzelle benötigt. Da Chloroplasten von zwei Membranen umhüllt sind, sind Kanäle in diesen erforderlich, so dass die Metabolite zwischen Cytosol und Chloroplast ausgetauscht werden können.

3.1 Kreuzung OEP40 x pSuT

OEP40 ist ein Kanalprotein in der äußeren Chloroplastenmembran. Mithilfe von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Kanal permeabel für Glukose und dessen phosphorylierte Derivate ist. Kürzlich wurde ein Zuckertransporter in der inneren Chloroplastenmembran charakterisiert: pSuT (*plastidic sugar transporter*). Um ein mögliches Zusammenspiel der beiden Proteine beim Transport von Zuckern über die Chloroplastenmembranen zu untersuchen, wurde eine Doppelmutante erstellt. Zur Erzeugung einer Doppelmutante *oep40 x psut* wurden die beiden Einzelmutanten miteinander gekreuzt. Die aus der Kreuzung entstandenen Samen wurden einzeln ausgelegt. Aus zwei Wochen alten Pflanzen wurde DNA isoliert und mittels Genotypisierung wurde überprüft, ob die Pflanzen beide T-DNA Insertionen tragen. Bei einer Pflanze war dies der Fall, nur die Verwendung des T-DNA spezifischen Primers (LB) in Kombination mit dem jeweiligen genspezifischen Primem (RP) führte zum Erhalt eines PCR Produktes. Die Samen der entsprechenden Pflanze wurden gesammelt und vermehrt, um



Abbildung 13 Genotyping-PCR der OEP40 x pSuT Doppelmutante. Zur Überprüfung der Kreuzung wurden vier PCRs durchgeführt, um das Vorhandensein beider T-DNA Insertionen zu überprüfen. Hierfür wurden einmal die genspezifischen Primer von OEP40 und pSuT miteinander kombiniert (LP+RP) und einmal ein genspezifischer Primer mit einem T-DNA spezifischen Primer (LB+RP).



Abbildung 14 Phänotypisierung OEP40 x pSuT. Abgebildet sind Pflanzen am Tag 54 der Phänotypisierung, links WT (weiß), Mitte links OEP40 KO (blau), Mitte rechts pSuT KO (rot) und rechts Doppelmutante OEP40 x pSut (gelb). A) LT-Bedingungen 21 °C B) LT-Bedingungen 10 °C C) KT-Bedingungen.

eine Phänotypisierung durchführen zu können. Hierfür wurden parallel WT, OEP40 KO, pSuT KO und OEP40 x pSuT KO unter drei verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen: LT, KT und LT 10 °C. Unter LT Bedingungen war zu erkennen, dass die Doppelmutante deutlich kleinere Rosetten ausbildete (Abbildung 14). Insgesamt ist die Entwicklung der Doppelmutante zeitverzögert, so startete die Blüte der Doppelmutante drei Tage später im Vergleich zum WT (Abbildung 15). Bei der zweiten Anzuchtvariante wurden die Pflanzen zunächst für sieben Tage unter LT Bedingungen zum Keimen gebracht, dann wurde die Temperatur auf 10 °C abgesenkt. Die Pflanzen wuchsen hier deutlich langsamer, so benötigte der WT von der Keimung bis zur Öffnung der ersten Blüte in etwa doppelt so lange wie unter LT Bedingungen. Alle Mutanten fingen deutlich früher an zu blühen als der WT. Unter KT Bedingungen war erneut zu beobachten, dass die Doppelmutante eine deutlich kleinere Rosette ausbildet als der WT und die beiden Einzelmutanten. Die pSuT KO Mutante begann deutlich später mit der Blüte als der WT, die OEP40 KO Mutante und die Doppelmutante zeigten einen intermediären Blühphänotyp (Abbildung 14). Es wurden zunächst keine weiteren Experimente mit der Doppelmutante durchgeführt, da diese den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschritten hätten.



Abbildung 15 Auswertung der Phänotypisierung OEP40 x pSuT nach Entwicklungsstufen: Länge von vier Rosettenblättern > 1 mm, Länge von zehn Rosettenblättern > 1 mm, Sichtbarkeit der ersten Blütenknospe, dem Öffnen der ersten Blüte in Tagen.

3.2 Regulation der OEP16-Kanaleigenschaften

Die vierte Aminosäure im N-Terminus von OEP16 ist ein Serin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Serin phosphoryliert werden kann (Pohlmeyer 1997). Allgemein kann eine Phosphorylierung die Selektivität bzw. die Aktivität eines Kanals beeinflussen. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Phosphorylierung des vierten Serins einen Einfluss Kanaleigenschaften auf die von OEP16 hat, wurden phosphomimetische Substitutionsmutanten des Proteins für elektrophysiologische Messungen erstellt. Hierfür wurde zunächst durch Einführung einer Punktmutation mittels Mutagenese die cDNA von OEP16 so verändert, dass das Serin an Position vier der Aminosäuresequenz einmal durch Alanin (A) und einmal durch Asparaginsäure (D) ersetzt wurde. Die Konstrukte wurden in E. coli BL21 Zellen transformiert und überexprimiert (Abbildung 16). Die Überexpression erfolgte für 3 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Einschlusskörper aufgereinigt, in denen das überexprimierte Protein vorlag (Abbildung 17, am Beispiel von OEP16 WT, Daten für OEP16 S4A und OEP16 S4D nicht gezeigt). Hierfür wurde das Zelllysat nach dem Aufschluss zentrifugiert und das Pellet, welches die Einschlusskörper enthält, in Detergens-Puffer resuspendiert. Das Pellet wurde mehrmals in Detergens-, Triton- und Tris-Puffer gewaschen, um die Einschlusskörper anzureichern. Um Protein weiter aufzureinigen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie das



Abbildung 16 Überexpression von OEP16_WT, OEP16_S4A und OEP16_S4D. Als Expressionsvektor diente pET21d, wobei alle Konstrukte über ein Stoppcodon verfügten, sodass kein Tag angehängt wurde. Die Überexpression wurde in *E. coli* BL21 Zellen für 3 h bei 37 °C durchgeführt. vl: *E. coli* BL21 Zellen vor Induktion. nl: *E coli* BL21 Zellen nach Induktion und 3 h Überexpression.



Abbildung 17 OEP16_WT-Einschlusskörper Aufreinigung. Um das überexprimierte Protein aufzureinigen, wurden die Zellen zunächst aufgeschlossen und das Zelllysat abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Detergens-Puffer aufgenommen und mehrmals gewaschen. Dasselbe erfolgte mit Triton- und Tris-Puffer. So konnte ein Großteil der nicht gewünschten *E. coli* Proteine entfernt werden und die OEP16_WT Einschlusskörper angereichert werden.

durchgeführt. Diese Methode ermöglichte es, das Protein, auch ohne Tag, in ausreichender Reinheit für die Elektrophysiologie bereitzustellen. Hierfür wurden die Einschlusskörper in Puffer A, welcher 8 M Urea enthielt, solubilisiert. Die Ionenaustauschchromatographie wurde mithilfe eines Äkta Purifier Systems (GE Healthcare, München) durchgeführt. Das solubilisierte Protein wurde auf eine zuvor mit Puffer A equilibrierte HiTrap Q FF 1 mL Säule geladen. Abhängig vom pH und der Ladung der einzelnen Aminosäuren hat jedes Protein eine bestimmte Nettoladung, so kann das Protein gegebenenfalls an die Säule anbinden. Durch Zugabe von Puffer B, welcher NaCl enthält, kommt es zu einem Konkurrieren der Proteine und der Ionen um die Bindestellen an der Säulenmatrix. Durch dieses Prinzip können Proteine mittels Ionenaustauschchromatographie aufgrund ihrer spezifischen Nettoladung voneinander getrennt werden. OEP16_WT, OEP16_S4A und OEP16_S4D konnten in Fraktion A3 in der größten Reinheit gefunden werden (Abbildung 18). Diese Fraktion wurde für die Elektrophysiologie verwendet.



Abbildung 18 Ionenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von OEP16_WT, OEP16_S4A und OEP16_S4D. L: Ladung, auf die HiTrap Q FF 1 mL Säule geladenes, in Puffer A solubilisiertes Protein. A3-B6: ausgewählte Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie. Für die Elektrophysiologie wurde jeweils Fraktion A3 ausgewählt, da hier die Proteine in der größten Reinheit vorlagen.

Die Elektrophysiologie wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Meinecke an der Universität Göttingen mithilfe der planaren Bilayer-Technik durchgeführt. Die Messergebnisse zeigten, dass OEP16 WT einen Kanal mit hoher Leitfähigkeit und Selektivität für Kationen bildet mit einer Ionenselektivität von P+/P- = 6,4. Der Leitwert des Kanals beträgt 1,2 nS und unter asymmetrischen Pufferkonditionen (250 mM/20 mM KCl) ergibt sich ein Umkehrpotential von E= +36,8 mV. Der Kanal bleibt auch bei hoher Spannung bis zu ±160 mV stabil in einem geöffneten Zustand, bei einem hohem Membranpotential von ±80 mV bis ±160 mV erhöht sich die Öffnungsfrequenz. Für die phosphomimetische Mutante OEP16_S4D betrug der Leitwert 629,3 pS bei einer leichten Abnahme der Kationenselektivität (P+/P- = 4,53). Auch das Umkehrpotential nahm im Vergleich zu OEP16_WT ab, es betrug E= +30 mV. Bei angelegter Spannung konnte ein Flimmern beobachtet werden, dies deutet auf eine geringe Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals hin. OEP16_S4D besitzt somit eine geringere Öffnungswahrscheinlichkeit als OEP16_WT. OEP16_S4A konnte zwar in Proteoliposomen rekonstituiert werden, jedoch konnte keine Kanalaktivität nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde das Protein degradiert, der Versuch muss wiederholt werden.

3.2.1 Komplementation OEP16 TM

Zusätzlich zur in vitro Untersuchung der phosphomimetischen OEP16 Mutanten wurde auch in vivo die Rolle der Phosphorylierung von OEP16 untersucht. Hierfür wurden pflanzliche Expressionsvektoren erstellt, welche die phosphomimetischen Substitutionen S4A und S4D in OEP16.1 tragen. Als Promotor wurde der intrinsische Promotor von OEP16.1 verwendet. Mithilfe dieser Vektoren wurde die OEP16 TM komplementiert und A. tumefaciens-Transformation mittels stabile Linien erzeugt: OEP16 TΜ OEP16.1pro:OEP16.1 (nachfolgend OEP16 TM KWT), OEP16 TM + OEP16.1pro:OEP16.1S4A (nachfolgend OEP16 TM KS4A) und OEP16 TM + OEP16.1pro:OEP16.1S4D (nachfolgend OEP16 TM KS4D). Die Komplementanten wurden mittels Western Blot auf Expression von OEP16 überprüft. Alle Komplementanten exprimieren OEP16 (Abbildung 19). Die so erzeugten Linien wurden für nachfolgende nicht-wässrige Fraktionierung verwendet.



Abbildung 19 Komplementation der OEP16 TM mit phosphomimetischen Substitutionen. Die OEP16 TM wurde mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation mit den Konstrukten OEP16 TM + OEP16.1pro:OEP16.1 (nachfolgend OEP16 TM KWT), OEP16 TM + OEP16.1pro:OEP16.1S4A (nachfolgend OEP16 TM KS4A) und OEP16 TM + OEP16.1pro:OEP16.1S4D (nachfolgend OEP16 TM KS4D) komplementiert. Die Expression der Konstrukte wurde mittels Western Blot und anschließender Immunodetektion mit α -A.th. OEP16.1 nachgewiesen. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt aus WT und OEP16 TM aufgetragen.

3.3 Die Rolle von OEP16 in Prozess der Kälte-Akklimatisierung

OEP16 ist permeabel für Aminosäuren (Pohlmeyer et al. 1997) und wird in der Kälte hochreguliert (Drea et al. 2006; Fowler und Thomashow 2002). Aus diesem Grund wurde die Gefriertoleranz von WT und OEP16 TM miteinander verglichen. Um die Gefriertoleranz von OEP16 TM im Vergleich zum WT zu untersuchen, wurden die Pflanzen zunächst für drei Wochen unter LT Bedingungen angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen in drei Gruppen aufgeteilt, jede Gruppe bestand aus 20 Einzelpflanzen. Die Kontrollgruppe wurde weiter unter LT Bedingungen kultiviert. Eine Gruppe wurde direkt von 21 °C auf -6 °C für 3 h transferiert und die dritte Gruppe wurde zunächst für 24 h bei 4 °C akklimatisiert und erst danach für 3 h bei -6 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation bei -6 °C wurden die Pflanzen dieser beiden Gruppen für 24 h bei 4 °C inkubiert, bevor sie für eine weitere Woche unter LT Bedingungen gehalten wurden. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Die gefrierbehandelten Pflanzen hatten insgesamt kleinere Rosetten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 20). Die OEP16 TM ist von der Gefrierbehandlung deutlich stärker betroffen als der WT: Die nicht akklimatisierten OEP16 TM Pflanzen waren zu 48 % stark von der Inkubation bei -6 °C betroffen, die Pflanzen waren entweder abgestorben oder zeigten deutliche Nekrosen. Nur 21 % der WT Pflanzen zeigten ähnliche Symptome. In der Gruppe der akklimatisierten Pflanzen war derselbe Trend zu erkennen, die OEP16 TM war wesentlich stärker von der Gefrierbehandlung betroffen (Abbildung 20). In einem weiteren Experiment wurden auch die Komplementationslinien OEP16 TM KWT, OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D auf ihre Gefriertoleranz getestet. Hierfür wurden pro Genotyp und Versuchsgruppe 12 Pflanzen (zwei pro Topf) äquivalent zum vorangegangenen Experiment angezogen, die Versuchsdurchführung erfolgte ebenfalls wie zuvor beschrieben. Unter Kontrollbedingungen konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Dasselbe gilt für die Gruppe der akklimatisierten Pflanzen, einzig die OEP16 TM wies geringfügige Nekrosen auf (Abbildung 21). Die nichtakklimatisierten Pflanzen verhielten sich wie im vorangegangenen Experiment, die OEP16 TM wies starke Nekrosen bis hin zu einigen toten Pflanzen auf, während beim WT alle Pflanzen überlebten mit einigen wenigen Nekrosen. Zudem sind die Rosetten der nichtakklimatisierten WT Pflanzen größer als die der OEP16 TM. Die Komplementationslinien OEP16 TM KWT und OEP16 TM KS4A verhalten sich ähnlich dem WT in der Gruppe der nicht-akklimatisierten Pflanzen. Die Komplementationslinie OEP16 TM KS4D hingegen

weist einige Nekrosen und eine tote Pflanze auf. Dies deutet darauf hin, dass der Phosphorylierungszustand von OEP16 eine Rolle im Prozess der Kälte-Akklimatisierung spielt und sich somit auch auf die Gefriertoleranz der Pflanzen auswirkt.



Abbildung 20 Gefriertoleranz von WT und OEP16 TM. Zur Überprüfung der Gefriertoleranz von OEP16 TM im Vergleich zu WT, wurden 60 Pflanzen je Genotyp für drei Wochen unter LT-Bedingungen angezogen und anschließend in drei Gruppen aufgeteilt: Kontrolle, akklimatisierte und nicht-akklimatisierte Pflanzen. Die Kontrollgruppe verblieb unter Standard-LT-Bedingungen, die nicht-akklimatisierten Pflanzen wurden direkt dem Gefrierschock von 3 h bei -6 °C unterzogen, wohingegen die akklimatisierten Pflanzen vor dem Gefrierschock für 24 h bei 4 °C inkubiert wurden. Im Anschluss an den Gefrierschock wurden beide Gruppen für zunächst 24 h bei 4 °C inkubiert und dann eine weitere Woche unter LT-Bedingungen gehalten. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung. **Obere Abbildung:** Representative Pflanzen pro Genotyp und Behandlung. **Untere Abbildung:** Beeinträchtigte Pflanzen in %. Als beeinträchtigt wurden solche Pflanzen gewertet, welche nach der Behandlung entweder tot waren oder Nekrosen aufwiesen.



Abbildung 21 Gefriertoleranz von WT, OEP16 TM und den Komplementationslinien OEP16 TM KWT, OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D. Ergänzend zu dem vorangegangenen Gefriertoleranz-Experiment wurden in diesem Versuch auch die Komplementanten auf ihre Gefriertoleranz getestet. Pro Versuchsgruppe (Kontrolle, akklimatisiert und nicht-akklimatisiert) wurden 12 Pflanzen (zwei pro Topf) drei Wochen unter LT-Bedingungen angezogen und anschließend in die drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Kontrollgruppe verblieb unter Standard-LT-Bedingungen, die nicht-akklimatisierten Pflanzen wurden direkt dem Gefrierschock von 3 h bei -6 °C unterzogen, wohingegen die akklimatisierten Pflanzen vor dem Gefrierschock für 24 h bei 4 °C inkubiert wurden. Im Anschluss an den Gefrierschock wurden beide Gruppen für zunächst 24 h bei 4 °C inkubiert und dann eine weitere Woche unter LT-Bedingungen gehalten. Im Anschluss erfolgte die Auswertung.

3.3.1 Subzelluläre Metabolom-Analyse mittels nicht-wässriger Fraktionierung

Um Aufschluss über die subzelluäre Metabolitverteilungen zu erhalten, wurde die Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung verwendet. So konnte zwischen den folgenden Kompartimenten unterschieden werden: Cytosol, Vakuole, Chloroplasten und Mitochondrien. Es wurde nach dem Protokoll von Fürtauer und Kollegen gearbeitet, dieses sieht allerdings nur die subzelluläre Auftrennung von Cytosol, Vakuole und Chloroplasten vor (Fürtauer et al. 2016). Um zudem Mitochondrien auftrennen zu können, wurde einerseits ein Enzymtest für ein mitochondriales Markerenzym etabliert und zum anderen der Gradient entsprechend angepasst.

3.3.1.1 Etablierung eines Markerenzyms für Mitochondrien

Optimal geeignet als Markerenzym sind solche Enzyme, welche ausschließlich in einem Kompartiment vorkommen, in diesem Fall in den Mitochondrien. Zunächst wurde die Citratsynthase als mögliches Markerenzym ausgewählt. Die Citratsynthase ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und katalysiert die erste Reaktion im Citratzyklus, bei der Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat, CoA-SH und Wasser umgesetzt werden. Zur Reaktion zugegebenes DTNB reagiert mit der Thiolgruppe von CoA-SH zu TNB, dessen Absorptionsmaximum bei 412 nm gemessen werden kann (Anoop et al. 2003). Zunächst wurde der Enzymtest für die Messung in einer 96-Mikrotiterplatte optimiert. Hierfür wurde eine Kinetik mit einem Intervall von 10 sec mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,0005 U, 0,001 U und 0,005 U) von gekaufter Citratsynthase gemessen (Abbildung 22 A).



Abbildung 22 Etablierung des Citratsynthase-Enzymtests. Die Citratsynthase setzt Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrate, CoA-SH und Wasser um, die Thiolgruppe von CoA-SH reagiert mit dem der Reaktion beigesetzen DTNB zu TNB, welches sein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat. Es wurden Enzymkinetiken bei einer Absorption von OD 412 nm mit einem Intervall von 10 sec gemessen. A) Gekaufte Citratsynthase wurde als Positivkontrolle in den Konzentrationen 0,0005 U, 0,001 U und 0,005 U eingesetzt. Für alle Konzentrationen kann ein linearer Anstieg der Enzymaktivität beobachtet werden. B) Aus den NAF-Fraktionen <1,35 und >1,35 wurde Enzym extrahiert und 5 μ l für den Enzymtest eingesetzt. D) Aus den NAF-Fraktionen <1,35 und >1,35 wurde Enzym extrahiert und 50 μ l für den Enzymtest eingesetzt.



Abbildung 23 Etablierung des Succinyl-CoA-Synthetase-Enzymtests. Verwendet wurde das Succinyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit Abcam (Berlin, Deutschland). Bei der Reaktion entsteht ein gelber Komplex, das Absorptionsmaximum liegt bei 450 nm, die Enzymkinetik wurde mit einem Intervall von 30 sec gemessen. A) Es wurden 1 μ l, 5 μ l und 10 μ l isolierte Mitochondrien aus *A. thaliana* eingesetzt. **B)** Es wurden 1 μ l, 5 μ l und 10 μ l der im Kit mitgeliferten Positivkontrolle eingesetzt.

Für alle Konzentrationen kann ein linearer Anstieg der Enzymaktivität über den gesamten Verlauf der Kinetik gemessen werden. Im nächsten Schritt wurde der Test anstatt mit gekaufter Citratsynthase mit Enzymextrakt durchgeführt, welches aus den Fraktionen <1,35 und >1,35 der NAF gewonnen wurde. Es wurden 5 µl, 25 µl und 50 µl dieses Enzymextrakts eingesetzt. Bei 5 μl Enzymextrakt ist der Bereich, in dem die Enzymaktivität linear ansteigt, sehr kurz (Abbildung 22 B). Bei 25 µl Enzymextrakt war in der Probe <1,35 ein linearer Anstieg der Enzymaktivität über den gesamten Verlauf der Kinetik zu beobachten (Abbildung 22 C), ebenso wie bei 50 μl Enzymextrakt (Abbildung 22 D). Dieser Enzymtest wurde jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit verworfen, da auch in den Peroxisomen eine Citratsynthase existiert (Pracharoenwattana et al. 2005). Diese könnte die Messergebnisse verfälschen. Deshalb wurde ein neues mitochondriales Enzym ausgewählt: die Succinyl-CoA-Synthetase. Die Succinyl-CoA-Synthetase ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Für den Enzymtest wurde ein Kit der Firma Abcam verwendet. Da dieses Kit für die Verwendung in Säugern vorgesehen ist, wurden zunächst einige Vorversuche durchgeführt, um sicherzustellen, dass der Test ebenso für pflanzliche Proben verwendet werden kann. Als erstes wurde der Test mit der im Kit vorhandenen Positivkontrolle und aus A. thaliana isolierten Mitochondrien durchgeführt. Sowohl für die Positivkontrolle als auch für die eingesetzten isolierten Mitochondrien wurde nach kurzer Zeit eine Sättigung der Reaktion erreicht, der lineare Bereich war sehr kurz (Abbildung 23). Deshalb wurden die Positivkontrolle und die isolierten Mitochondrien für die nächste Messung 1:100 verdünnt. Dies führte dazu, dass eine Enzymaktivität im linearen Bereich gemessen werden konnte, sowohl für die isolierten Mitochondrien als auch für die



Abbildung 24 Optimierung des Succinyl-CoA-Synthetase-Enzymtests. Verwendet wurde das Succinyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit Abcam (Berlin, Deutschland). Bei der Reaktion entsteht ein gelber Komplex, das Absorptionsmaximum liegt bei 450 nm, die Enzymkinetik wurde mit einem Intervall von 30 sec gemessen. Im vorangegangenen Versuch wurde schnell eine Sättigung der Reaktion erreicht, deshalb wurde die Positivkontrolle sowie die isolierten Mitochondrien aus *A. thaliana* 1:100 verdünnt. **A)** Es wurden 1 µl, 5 µl und 10 µl der verdünnten, isolierte Mitochondrien aus *A. thaliana* eingesetzt. **B)** Es wurden 1 µl, 5 µl und 10 µl der im Kit mitgelieferten, verdünnten Positivkontrolle eingesetzt. **C)** Es wurden die Steigungen aus den linearen Bereichen der Enzymkinetiken aus A) berechnet, aufgetragen (1 entspricht 1 µl, 2 entspricht 5 µl und 3 entspricht 10 µl) und eine Trendlinie angelegt. Das Bestimmtheitsmaß der Trendlinie beträgt R²= 0,9964. **D)** Es wurden die Steigungen aus den linearen Bereichen der Enzymkinetiken aus A) berechnet der Enzymkinetiken aus A) berechnet, aufgetragen (1 entspricht 1 µl, 2 entspricht 5 µl und 3 entspricht 10 µl) und eine Trendlinie angelegt. Das Bestimmtheitsmaß der Trendlinie beträgt R²= 0,9964. **D)** Es wurden die Steigungen aus den linearen Bereichen der Enzymkinetiken aus A) berechnet, aufgetragen (1 entspricht 1 µl, 2 entspricht 5 µl und 3 entspricht 10 µl) und eine Trendlinie angelegt. Das Bestimmtheitsmaß der Trendlinie beträgt R²= 0,9789.

Positivkontrolle (Abbildung 24 A und B). So konnte die Steigung für den linearen Bereich ermittelt werden: Die Trendlinien mit einem Bestimmtheitsmaß von R² > 0,9 zeigen, dass für beide Ansätze und unterschiedliche Konzentrationen zuverlässige Daten gemessen wurden und die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge linear zunimmt (Abbildung 24 C und D). Das Kit kann somit auch für pflanzliche Proben verwendet werden. Im nächsten Schritt konnten nun Enzymextrakte, gewonnen aus der NAF, getestet werden. Hierfür wurden zunächst die Fraktionen >1,32 und >1,35 in nur 100 µl Extraktionspuffer extrahiert und davon 50 µl für den Enzymtest eingesetzt. Dies sind die Fraktionen, in denen die höchste Konzentration an Mitochondrien erwartet wird und somit auch die höchste Konzentration an Succinyl-CoA-Synthetase. Das Ergebnis der Messung zeigte, dass der Enzymtest auch mit aus den Fraktionen der NAF isoliertem Enzym funktioniert und die eingesetzte Menge an Enzymextrakt reduziert werden kann, da eine



Abbildung 25 Optimierung des Succinyl-CoA-Synthetase-Enzymtests für die nicht-wässrige Fraktionierung. Die Enzyme der Fraktionen >1,32 und >1,35 aus der NAF wurden in 100 µl Extraktionspuffer extrahiert, wovon jeweils 50 µl für die Messung mit dem Succinyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit von Abcam (Berlin, Deutschland) verwendet wurden. Bei der Reaktion entsteht ein gelber Komplex, das Absorptionsmaximum liegt bei 450 nm, die Enzymkinetik wurde mit einem Intervall von 30 sec gemessen. Darstellung der Messergebnisse mit Nullprobe. Zu Beginn der Messung stiegen die Enzymaktivitäten linear an.

Sättigung der Reaktion zu erkennen war (Abbildung 25). Deshalb wurde erneut die Fraktion >1,32 in 100 μ l Extraktionspuffer extrahiert und 10 μ l, 25 μ l und 50 μ l für den Enzymtest eingesetzt. Für alle drei Ansätze konnte ein linearer Anstieg der Enzymaktivität gemessen werden (Abbildung 26 A). Die ermittelten Steigungen und deren zugehörige Trendlinie mit einem Bestimmtheitsmaß von R² > 0,9 zeigte, dass 10 μ l Enzymextrakt ausreichend sind, um verlässliche Messdaten zu generieren. Pro Test kann 1/10 des Enzymextrakts eingesetzt werden. Das Succinyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit von Abcam (Berlin, Deutschland) kann somit als Markerenzymtest für die NAF verwendet werden.



Abbildung 26 Succinyl-CoA-Synthetase als Markerenzym für Mitochondrien für die nicht-wässrige Fraktionierung. Es wurden Enzyme der Fraktion >1,32 in 100 µl Extraktionspuffer extrahiert und davon 0 µl, 10 µl, 25 µl und 50 µl für den Enzymtest eingesetzt. Es wurde eine Enzymkinetik mit einem Intervall von 30 sec gemessen, das Absorptionsmaximum liegt bei 450 nm. A) Enzymkintetik B) Es wurden die Steigungen aus den linearen Bereichen der Enzymkinetiken aus A) berechnet, aufgetragen (1 entspricht 10 µl, 2 entspricht 25 µl und 3 entspricht 50 µl) und eine Trendlinie angelegt. Das Bestimmtheitsmaß der Trendlinie beträgt R^2 = 0,9978.

3.3.1.2 Optimierung des Gradienten

Nachdem erfolgreich ein Markerenzymtest für die Mitochondrien etabliert werden konnte, mussten als nächstes die einzelnen Dichteschritte der Fraktionen des Gradienten so angepasst werden, dass sie eine Abtrennung der vier Kompartimente Cytosol, Vakuole, Plastid und Mitochondrium zulassen. Je nach Pflanzenmaterial kann sich die Dichte der einzelnen Kompartimente unterscheiden, sodass die Dichten der einzelnen Fraktionen des Gradienten immer individuell angepasst werden müssen. Da vier Kompartimente getrennt voneinander betrachtet werden sollten, muss der Gradient mindestens in 5-6 einzelne Fraktionen unterschiedlicher Dichte aufgeteilt werden, dies spielt eine Rolle bei der nachfolgenden mathematischen Auswertung. Begonnen wurde mit einem Gradienten, welcher aus sieben Fraktionen bestand, beginnend mit einer Fraktion der Dichte $\rho > 1,5$ g cm⁻³ und endend mit einer Fraktion der Dichte $\rho < 1,34$ g cm⁻³ (Abbildung 27 A). Die Vakuole wurde in den Fraktionen mit hoher Dichte angereichert, Plastiden und Mitochondrien befanden sich zu einem großen Teil in der Fraktion mit der geringsten





Dichte ($\rho < 1,34$ g cm⁻³), während in den mittleren Fraktionen des Gradienten kaum Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte. Somit war diese Unterteilung des Gradienten nicht geeignet, um die vier Kompartimente voneinander abzutrennen. Im unteren Dichtebereich des Gradienten werden mehr Fraktionen benötigt, um Mitochondrien und Plastiden voneinander zu trennen, wohingegen im oberen Dichtebereich des Gradienten nicht so viele Fraktionen benötigt werden, um Cytosol und Vakuole voneinander zu trennen. So ergab sich schlussendlich ein Gradient mit sechs Fraktionen mit folgenden Dichten: $\rho < 1,32$ g cm⁻³, $\rho > 1,32$ g cm⁻³, $\rho > 1,34$ g cm⁻³, $\rho >$ 1,4 g cm⁻³, $\rho > 1,45$ g cm⁻³ und $\rho > 1,5$ g cm⁻³ (Abbildung 27 B). In diesem Gradienten konnten unterschiedliche Trends der Markerenzymaktivität der vier Kompartimente über den Gradienten hinweg festgestellt werden: Die Markerenzymaktivität des Cytosols ist in der Fraktion $\rho > 1,34$ g cm⁻³ maximal, die mitochondriale Markerenzymaktivität ist in der Fraktion $\rho > 1,34$ g cm⁻³ maximal und die Plastiden konnten in den beiden leichtesten Fraktionen $\rho < 1,32$ g cm⁻³ und $\rho > 1,32$ g cm⁻³ angereichert werden.

3.3.1.3 Subzelluläre Fraktionierung: Markerenzymtests

Zunächst wurden Pflanzen folgender Genotypen angezogen: WT, OEP16 TM, OEP16 TM_KWT, OEP16 TM_KS4A und OEP16 TM_KS4D. Die Pflanzen wurden unter LT Bedingungen für drei Wochen angezogen (2.2.1.2), danach wurde eine Hälfte der Pflanzen geerntet und die andere Hälfte der Pflanzen für weitere 24 h bei 4 °C inkubiert. Bei der Ernte wurden je drei Rosetten pro Genotyp zu einer Probe vereinigt. Im Anschluss an die Gefriertrocknung und Fraktionierung der Proben wurden die Markerenzymtests mit einer der drei Subfraktionen durchgeführt. Die relative Verteilung der Markerenzyme wird benötigt, um später die Metabolite den einzelnen Kompartimenten per Korrelation zuordnen zu können. Für die Plastiden wurde die Pyrophosphatase als Markerenzym

Mitochondrien die Succinyl-CoA-Synthethase. Während Plastiden und Mitochondrien eher in den Fraktionen mit geringer Dichte zu finden sind, reichert sich die Vakuole in den Fraktionen mit hoher Dichte an. Das Cytosol wird im mittleren Bereich des Gradienten angereichert (Abbildung 28 und Abbildung 29). Pro Genotyp wurden je drei Gradienten von drei unterschiedlichen Replikaten ausgewählt, welche diese Muster am besten erfüllten und somit die Voraussetzung für die spätere Korrelation mit den Metabolitkonzentrationen besaßen.



Abbildung 28 Relative Verteilung der Kompartiment-spezifischen Markerenzymaktivität der bei 21 °C geernteten Pflanzen aller Genotypen: WT, OEP16 TM, OEP16 KWT, OEP16 KS4A und OEP16 KS4D (n= 3, Mittelwert ± SD).





Abbildung 29 Relative Verteilung der Kompartiment-spezifischen Markerenzymaktivität der bei 4 °C geernteten Pflanzen aller Genotypen: WT, OEP16 TM, OEP16 KWT, OEP16 KS4A und OEP16 KS4D (n= 3, Mittelwert ± SD).

3.3.2 Metabolomiks

Zur weiteren Analyse wurden die drei Replikate der außerwählten Gradienten der jeweiligen Genotypen mittels GC-MS Analyse analysiert. Pro Replikat wurden zudem 5 mg nicht-fraktioniertes Material gemessen, um so die absoluten Metabolitmengen bestimmen zu können.



Abbildung 30 Clusteranalyse der relativen, subzellulären Metabolitlevel basierend auf euklidischer Distanz der akklimatisierten und nicht-akklimatisierten Genotypen (WT, OEP16 TM, OEP16 KWT, OEP16 KS4A und OEP16 KS4D).

Anhand der hierarchischen Clusteranalyse basierend auf euklidischer Distanz der relativen, subzellulären Metabolitlevel (Abbildung 30) konnte gezeigt werden, dass sich die bei 4 °C für 24 h inkubierten Pflanzen aller Genotypen von den 21 °C-Pflanzen deutlich in zwei

Cluster abtrennen, Metabolite wurden vermehrt in den bei 4 °C inkubierten Pflanzen angereichert. Für die bei 4 °C inkubierten Pflanzen konnten die Mitochondrien gut vom Cytosol abgetrennt werden, die Mitochondrien bilden einen Cluster mit den Plastiden und das Cytosol bildet ein Cluster mit der Vakuole.

Bei Betrachtung der relativen Verteilungen der Metabolite zwischen den bei 21 °C geernteten Pflanzen und den bei 4 °C geernteten Pflanzen ist zu erkennen, dass im WT bei 4 °C nahezu alle Metabolite in der Vakuole signifikant angereichert wurden (Anhang, Tabelle 15). Hingegen konnten, außer für Fruktose, keine signifikanten Unterschiede für OEP16 TM in der Vakuole zwischen den bei 21 °C und bei 4 °C geernteten Pflanzen festgestellt werden (Tabelle 10). Tendenziell kann im WT eine Abnahme von Metaboliten in Cytosol und Mitochondrium in den bei 4 °C inkubierten Pflanzen im Vergleich zu den bei 21 °C inkubierten Pflanzen festgestellt werden. Im Cytosol nehmen sowohl das Polyamin Ornithin und Tryptophan signifikant ab, als auch Galactinol und Raffinose. Im Mitochondrium kommt es ebenfalls zu einer Abnahme von Ornithin und Tryptophan, darüber hinaus nehmen sowohl die Polyamine Putrescin und Spermidin ab, als auch myo-Inositol und Trehalose. In den Plastiden der bei 4 °C geernteten WT-Pflanzen kommt es hingegen tendenziell zu einer Zunahme der Metabolite, signifikant angereichert werden Threonsäure und Saccharose. Bei Threonsäure handelt es sich um ein Metabolit des Ascorbinsäure-Metabolismus (Debolt et al. 2007). Für das Cytosol und das Mitochondrium der OEP16 TM können, bis auf eine signifikante Abnahme von Maltose im Cytosol, keine Unterschiede zwischen den bei 21 °C und 4 °C inkubierten Pflanzen gefunden werden. In den Plastiden hingegen kommt es zu einigen Veränderungen: Ornithin, Spermidin, Tryptophan, Glucon- und Glutarsäure sowie Fruktose und Trehalose nehmen signifikant ab. Dies steht im Kontrast zu den WT-Plastiden, wo eine tendenzielle Zunahme dieser Metabolite in den bei 4 °C inkubierten Pflanzen im Vergleich zu den bei 21 °C inkubierten Pflanzen zu erkennen ist. Die Komplementante OEP16 TM KWT verhält sich anders als der WT, schon in der Clusteranalyse ist zu erkennen, dass die Kompartimente dieser beiden Genotypen fast immer weit auseinander liegen. Bei Blick auf Tabelle 11 ist zudem zu erkennen, dass bei OEP16 TM KWT die Veränderungen in Vakuole nicht so stark sind wie im WT, nur wenige Metabolite unterscheiden sich signifikant, nämlich Ornithin, Serin, Threonin und Threonsäure. In den Plastiden des WT wird Ornithin in den bei 4 °C inkubierten Pflanzen signifikant angereichert, in der Komplementante nimmt es signifikant ab. In den phosphomimetischen Substitutions-Komplementanten OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D kommt es bei den organischen Säuren zu signifikanten Verschiebungen (Tabelle 11). Besonders für Apfelsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Zitronensäure **Tabelle 10 Signifikante Unterschiede in der relativen Metabolitverteilung zwischen bei 21 °C und bei 4 °C geernteten Pflanzen von WT und OEP16 TM** (Mittelwerte ± SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile deuten eine Zu- oder Abnahme an).

				Cy	tosol			Mite	ochon	drium				Pla	stid				Va	kuole		
	Met	abolite	Nich	ıt-Akk	Ak	:k. p	N	icht-Akl	k.	Ak	k. p		Nicht	Akk.	А	kk.	р	Nicht	-Akk.	A	kk.	р
WT	Aminosäuren	Asparaginsäure	0,37 ±	0,18	0,25 ±	0,02	0,3	9±0,1	.2 (0,24 ±	0,06	0,	18 ±	0,08	0,27 ±	0,06		0,06 ±	0,03	0,25 ±	0,0	0 个***
	& Polyamine	Ornithin	0,37 ±	0,03	0,34 ±	0,08 ↓*	0,2	9±0,0	6 (0,11 ±	0,07 ↓*	0,	20 ±	0,12	0,27 ±	0,05		0,14 ±	0,04	0,29 ±	0,0	5 个*
		Putrescin	0,38 ±	0,11	0,22 ±	0,02	0,3	7±0,0	6 (0,20 ±	0,06 ↓*	0,	19 ±	0,07	0,32 ±	0,06		0,06 ±	0,03	0,25 ±	0,0	4 个**
		Spermidin	0,34 ±	0,09	0,30 ±	0,11	0,3	5±0,0	6 (0,13 ±	0,07 ↓*	0,	21 ±	0,09	0,32 ±	0,08		0,09 ±	0,03	0,26 ±	0,0	6 个*
		Tryptophan	0,37 ±	0,03	0,31 ±	0,06 ↓*	0,2	9±0,0	6 (0,12 ±	0,05 ↓*	0,	20 ±	0,12	0,28 ±	0,04		0,14 ±	0,04	0,28 ±	0,0	4 个*
	Organische	Gluconsäure	0,37 ±	0,04	0,34 ±	0,08	0,2	5±0,0	17 (0,09 ±	0,07	0,	22 ±	0,13	0,28 ±	0,04		0,15 ±	0,04	0,29 ±	0,0	4 个*
	Säuren	Glutarsäure	0,37 ±	0,03	0,33 ±	0,08	0,2	B± 0,0	17 (0,11 ±	0,07	0,	21 ±	0,12	0,27 ±	0,03		0,14 ±	0,03	0,28 ±	0,0	4 个*
		Oxaloacetat	0,43 ±	0,06	0,33 ±	0,09	0,3	3±0,0	3 (0,16 ±	0,06 ↓*	0,	18 ±	0,09	0,24 ±	0,00		0,06 ±	0,03	0,27 ±	0,0	3 个**
		Threonsäure	0,32 ±	0,07	0,21 ±	0,03	0,4	5±0,0	9 (0,26 ±	0,06	0,	18 ±	0,04	0,37 ±	0,08	\uparrow^*	0,04 ±	0,06	0,16 ±	0,0	5
	Zucker	Fruktose	0,39 ±	0,03	0,35 ±	0,06	0,2	5±0,0	9 (0,13 ±	0,08	0,	19 ±	0,11	0,19 ±	0,05		0,18 ±	0,01	0,33 ±	0,0	2 个***
		Galactinol	0,39 ±	0,02	0,26 ±	0,06 ↓*	0,3	1± 0,0	4 (0,19 ±	0,06	0,	20 ±	0,10	0,25 ±	0,09		0,09 ±	0,04	0,30 ±	0,0	6 个*
		Inositol, myo-	0,32 ±	0,07	0,21 ±	0,04	0,4	7±0,0	6 (0,26 ±	0,05 ↓*	0,	18 ±	0,08	0,35 ±	0,05		0,04 ±	0,05	0,18 ±	0,0	4 个*
		Maltose	0,40 ±	0,02	0,27 ±	0,03	0,2	5±0,0	17 (0,15 ±	0,05	0,	19 ±	0,07	0,27 ±	0,05		0,16 ±	0,02	0,31 ±	0,0	3 个**
		Raffinose	0,36 ±	0,03	0,19 ±	0,04 ↓*	0,3	1± 0,0	17 (0,24 ±	0,03	0,	20 ±	0,12	0,34 ±	0,06		0,13 ±	0,03	0,22 ±	0,0	2 个*
		Saccharose	0,41 ±	0,14	0,21 ±	0,01	0,4	0±0,1	.2 (0,28 ±	0,06	0,	14 ±	0,05	0,29 ±	0,05	\uparrow^*	0,05 ±	0,03	0,21 ±	0,0	2 个**
		Trehalose	0,37 ±	0,02	0,33 ±	0,08	0,2	9±0,0	6 (0,11 ±	0,07 ↓*	0,	20 ±	0,12	0,27 ±	0,03		0,14 ±	0,04	0,28 ±	0,0	4 个*
OEP16 TM	Aminosäuren	Asparaginsäure	0,29 ±	0,06	0,26 ±	0,06	0,3	3±0,0	9 (0,20 ±	0,07	0,	28 ±	0,04	0,26 ±	: 0,14		0,10 ±	0,06	0,28 ±	0,1	4
	& Polyamine	Ornithin	0,29 ±	0,03	0,30 ±	0,02	0,1	5±0,0	8 (0,12 ±	0,04	0,	37 ±	0,04	0,23 ±	0,03	\downarrow^*	0,18 ±	0,08	0,35 ±	0,0	7
		Putrescin	0,34 ±	0,11	0,24 ±	0,07	0,2	4± 0,0	3 (0,20 ±	0,05	0,	29 ±	0,08	0,29 ±	0,16		0,13 ±	0,08	0,27 ±	0,1	4
		Spermidin	0,26 ±	0,05	0,29 ±	0,01	0,2	0 ± 0,0	3 (0,13 ±	0,04	0,	39 ±	0,02	0,26 ±	0,06	\downarrow^*	0,14 ±	0,04	0,33 ±	0,0	9
		Tryptophan	0,29 ±	0,03	0,30 ±	0,02	0,1	5±0,0	18 (0,12 ±	0,04	0,	37 ±	0,04	0,23 ±	: 0,03	\downarrow^*	0,18 ±	0,08	0,35 ±	0,0	7
	Organische	Gluconsäure	0,29 ±	0,04	0,31 ±	0,02	0,1	8± 0,0	4 (0,12 ±	0,04	0,	36 ±	0,06	0,23 ±	0,03	\downarrow^*	0,17 ±	0,07	0,35 ±	0,0	7
	Säuren	Glutarsäure	0,29 ±	0,04	0,31 ±	0,02	0,1	7±0,0	5 (0,12 ±	0,04	0,	37 ±	0,04	0,22 ±	0,03	\downarrow^*	0,18 ±	0,07	0,35 ±	0,0	7
		Oxaloacetat	0,33 ±	0,06	0,28 ±	0,05	0,2	1± 0,0	6 (0,15 ±	0,05	0,	28 ±	0,12	0,29 ±	0,05		0,17 ±	0,13	0,28 ±	0,0	6
		Threonsäure	0,24 ±	0,11	0,21 ±	0,06	0,3	1±0,1	.2 (0,21 ±	0,04	0,	38 ±	0,11	0,36 ±	: 0,12		0,07 ±	0,03	0,22 ±	0,1	1
	Zucker	Fruktose	0,35 ±	0,03	0,36 ±	0,02	0,1	8± 0,0	4 (0,10 ±	0,00	0,	26 ±	0,05	0,13 ±	0,03	\downarrow^*	0,21 ±	0,07	0,40 ±	0,0	5 个*
		Galactinol	0,27 ±	0,04	0,27 ±	0,05	0,2	5±0,0	3 (0,19 ±	0,05	0,	31 ±	0,02	0,23 ±	: 0,13		0,17 ±	0,07	0,31 ±	0,1	3
		Inositol, myo-	0,24 ±	0,06	0,19 ±	0,04	0,2	7±0,0	5 (0,23 ±	0,02	0,	43 ±	0,08	0,37 ±	: 0,11		0,06 ±	0,05	0,21 ±	0,0	9
		Maltose	0,36 ±	0,02	0,28 ±	0,03 ↓*	0,1	9±0,0	4 (0,16 ±	0,05	0,	24 ±	0,06	0,25 ±	0,08		0,21 ±	0,10	0,31 ±	0,0	9
		Raffinose	0,27 ±	0,04	0,26 ±	0,07	0,2	4 ± 0,0	0 0	0,21 ±	0,09	0,	33 ±	0,04	0,23 ±	0,13		0,17 ±	0,07	0,30 ±	0,1	4
		Saccharose	0,30 ±	0,07	0,24 ±	0,03	0,3	1± 0,0	5 (0,32 ±	0,06	0,	28 ±	0,07	0,26 ±	0,05		0,12 ±	0,09	0,18 ±	0,0	4
		Trehalose	0,29 ±	0,03	0,31 ±	0,02	0,1	5±0,0	17 (0,12 ±	0,04	0,	38 ±	0,04	0,22 ±	0,03	\downarrow^*	0,18 ±	0,08	0,35 ±	0,0	7

Tabelle 11 Signifikante Unterschiede in der relativen Metabolitverteilung zwischen bei 21 °C und bei 4 °Cgeernteten Pflanzen von OEP16 TM KWT, OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D (Mittelwerte ± SD, ANOVAund Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile deuten eine Zu-</td>oder Abnahme an).

		_	Cytosol		Mitoch	nondrium	Pl	astid	Vakuole		
	Metabolite		21 °C	2	4°C p	21 °C	4°C p	21 °C	4°C p	21 °C	4°C p
OEP16 TM	Aminosäuren	Ornithin	0,28 ±	0,05	0,35 ± 0,07	0,17 ± 0,04	0,15 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,21 ± 0,03 ↓*	0,18 ± 0,03	0,29 ± 0,03 ↑*
KWT	& Polyamine	Serin	0,27 ±	0,07	0,33 ± 0,04	0,26 ± 0,10	0,15 ± 0,05	0,34 ± 0,06	0,21 ± 0,01 ↓*	0,13 ± 0,02	0,31 ± 0,00 ↑***
		Tryptophan	0,28 ±	0,05	0,33 ± 0,08	0,17 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,37 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,28 ± 0,04 ↑*
	Organische	Glutarsäure	0,29 ±	0,06	0,30 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,06	0,36 ± 0,06	0,19 ± 0,05 ↓*	0,18 ± 0,04	0,36 ± 0,12
	Säuren	Oxaloacetat	0,27 ±	0,11	0,27 ± 0,02	0,19 ± 0,07	0,20 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,29 ± 0,01 ↓**	0,14 ± 0,05	0,25 ± 0,01
		Threonsäure	0,24 ±	0,11	0,23 ± 0,09	0,34 ± 0,11	0,32 ± 0,10	0,37 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,15 ± 0,02 ↑**
	Zucker	Raffinose	0,32 ±	0,06	0,18 ± 0,02 ↓*	0,16 ± 0,04	0,30 ± 0,06 个*	0,34 ± 0,08	0,41 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,11 ± 0,02
		Trehalose	0,28 ±	0,04	0,30 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,06	0,37 ± 0,06	0,19 ± 0,05 ↓*	0,18 ± 0,03	0,36 ± 0,12
OEP16 TM	Aminosäuren	Glycin	0,30 ±	0,04	0,23 ± 0,05	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,40 ± 0,02	0,54 ± 0,05 个*
KS4A	Organische	Apfelsäure	0,30 ±	0,04	0,25 ± 0,04	0,13 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,56 ± 0,05 个*
	Säuren	Bernsteinsäure	0,30 ±	0,03	0,21 ± 0,05	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,39 ± 0,00	0,53 ± 0,03 个**
		Fumarsäure	0,31 ±	0,02	0,26 ± 0,05	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,10 ± 0,03 ↓*	0,33 ± 0,02	0,51 ± 0,07 ↑*
		Oxaloacetat	0,26 ±	0,04	0,25 ± 0,07	0,18 ± 0,02	0,28 ± 0,05	0,27 ± 0,06	0,32 ± 0,06	0,29 ± 0,01	0,16 ± 0,05 ↓*
		Zitronensäure	0,33 ±	0,06	0,26 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,06	0,07 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,56 ± 0,06 个*
	Zucker	Fruktose	0,29 ±	0,04	0,28 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,09 ± 0,04 ↓*	0,36 ± 0,04	0,52 ± 0,09
		Galactinol	0,27 ±	0,03	0,29 ± 0,09	0,16 ± 0,02	0,23 ± 0,03 ↑*	0,28 ± 0,07	0,32 ± 0,19	0,28 ± 0,04	0,16 ± 0,07
		Glukose	0,31 ±	0,03	0,28 ± 0,06	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,07 ± 0,01 ↓*	0,42 ± 0,03	0,54 ± 0,10
		Raffinose	0,25 ±	0,04	0,26 ± 0,08	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,05	0,29 ± 0,07	0,35 ± 0,14	0,32 ± 0,03	0,15 ± 0,06 ↓*
OEP16 TM	Aminosäuren	Alanin	0,27 ±	0,09	0,25 ± 0,10	0,20 ± 0,04	0,27 ± 0,09	0,20 ± 0,09	0,33 ± 0,10	0,34 ± 0,03	0,15 ± 0,08 ↓*
KS4D		Asparagin	0,19 ±	0,03	0,20 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,33 ± 0,01 ↑**	0,35 ± 0,05	0,28 ± 0,04	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,05
		Glutamin	0,17 ±	0,06	0,38 ± 0,05 个*	0,37 ± 0,03	0,23 ± 0,06	0,25 ± 0,09	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,07	0,22 ± 0,04
		Glycin	0,36 ±	0,03	0,32 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,08 ± 0,01 ↓*	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,03 ↓*	0,30 ± 0,01	0,53 ± 0,03 ↑***
		Phenylalanin	0,15 ±	0,05	0,33 ± 0,09	0,37 ± 0,07	0,18 ± 0,06 ↓*	0,29 ± 0,04	0,19 ± 0,10	0,20 ± 0,06	0,30 ± 0,07
		Prolin	0,23 ±	0,02	0,25 ± 0,04	0,28 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,06	0,29 ± 0,06	0,14 ± 0,03 ↓*
	Organische	Apfelsäure	0,36 ±	0,00	0,31 ± 0,02 ↓*	0,18 ± 0,02	0,08 ± 0,01 ↓**	0,15 ± 0,02	0,06 ± 0,02 ↓**	0,32 ± 0,00	0,56 ± 0,01 个*
	Säuren	Bernsteinsäure	0,33 ±	0,01	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,09 ± 0,02 ↓*	0,16 ± 0,02	0,07 ± 0,01 ↓**	0,32 ± 0,02	0,52 ± 0,04 ↑**
		Fumarsäure	0,37 ±	0,01	0,31 ± 0,02 ↓*	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,02 ↓*	0,17 ± 0,02	0,08 ± 0,01 ↓**	0,30 ± 0,03	0,51 ± 0,02 ↑**
		Zitronensäure	0,37 ±	0,02	0,32 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,07 ± 0,00 ↓**	0,15 ± 0,02	0,04 ± 0,02 ↓**	0,32 ± 0,01	0,57 ± 0,04 个**
	Zucker	Fruktose	0,37 ±	0,02	0,31 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,02 ↓*	0,17 ± 0,02	0,06 ± 0,01 ↓**	0,28 ± 0,03	0,53 ± 0,01 个***
		Galactinol	0,29 ±	0,03	0,25 ± 0,06	0,19 ± 0,06	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,24 ± 0,02	0,15 ± 0,01 ↓**
		Glukose	0,38 ±	0,01	0,32 ± 0,02 ↓*	0,17 ± 0,02	0,09 ± 0,01 ↓**	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,01 ↓*	0,33 ± 0,02	0,52 ± 0,02 ↑***
		Inositol, myo-	0,10 ±	0,02	0,13 ± 0,05	0,32 ± 0,07	0,42 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,41 ± 0,08	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,01 ↓*
		Raffinose	0,31 ±	0,03	0,20 ± 0,02 ↓*	0,17 ± 0,05	0,32 ± 0,02 ↑*	0,27 ± 0,02	0,34 ± 0,05	0,25 ± 0,02	0,14 ± 0,02 ↓**
		Saccharose	0,19 ±	0,03	0,21 ± 0,08	0,33 ± 0,07	0,40 ± 0,06	0,27 ± 0,04	0,32 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,07 ± 0,01 ↓*

konnten in OEP16 TM KS4D große Dynamiken zwischen den bei 4 °C und den bei 21 °C geernteten Pflanzen festgestellt werden.

Beim Vergleich der Kompartimente bei 21 °C fällt auf, dass es kaum signifikante Änderungen zwischen WT und OEP16 TM gibt, lediglich in den Plastiden der OEP16 TM nehmen die Metabolite Spermidin und myo-Inositol signifikant zu, während Spermidin im Mitochondrium von OEP16 TM signifikant abnimmt (Tabelle 12). Am stärksten unterscheiden sich die Kompartimente von WT und OEP16 TM KS4A bei 21 °C. Bei 4 °C gibt es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen WT und OEP16 TM im Bezug auf die

Tabelle12SignifikanteUnterschiedeinderrelativenMetabolitenverteilungzwischendenKompartimenten(Vakuole, Cytosol, Plastid und Mitochondrium)aller Genotypen bei 21 °C (Mittelwerte ±SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile</td>deuten eine Zu- oder Abnahme an).

		Val	cuole, 21	°C				Су	tosol, 21 °C
		WT	OEP16	KS4A				WT	OEP16 KS4A
Aminosäuren	Glycin	0,16 ± 0,01	0,40 ±	0,02 个*		Zucker	Inositol, myo-	0,32 ± 0,07	′0,19 ± 0,01 ↓
& Polyamine	Ornithin	0,14 ± 0,04	0,32 ±	0,03 个*					
	Prolin	0,08 ± 0,02	0,31 ±	0,05 个*				WT	OEP16 KS4D
	Putrescin	0,06 ± 0,03	0,28 ±	0,05 个*		Organische	Apfelsäure	0,44 ± 0,07	0,36 ± 0,00 ↓
	Spermidin	0,09 ± 0,03	0,27 ±	0,03 个*	*	Säuren			
	Threonin	0,08 ± 0,05	0,33 ±	0,08 个*					
Organische	Apfelsäure	0,16 ± 0,02	0,41 ±	0,01 个*	*				
Säuren	Bernsteinsäure	0,14 ± 0,05	0,39 ±	0,00 个*	*			Pla	astid, 21 °C
	Fumarsäure	0,16 ± 0,03	0,33 ±	0,02 个*				WT	OEP16 TM
	Gluconsäure	0,15 ± 0,04	0,32 ±	0,03 个*		Polyamine	Spermidin	0,21 ± 0,09	0,39 ± 0,02 1
	Glutarsäure	0,05 ± 0,02	0,32 ±	0,02 个*		Zucker	Inositol, myo-	0,18 ± 0,08	0,43 ± 0,08 1
	Oxaloacetat	0,06 ± 0,03	0,29 ±	0,01 个*					
	Zitronensäure	0,16 ± 0,02	0,42 ±	0,02 个*	*			WT	OEP16 KWT
Zucker	Fruktose	0,18 ± 0,01	0,36 ±	0,04 个*	*	Polyamine	Spermidin	0,21 ± 0,09	0,38 ± 0,04 1
	Galactinol	0,09 ± 0,04	0,28 ±	0,04 个*					
	Rattinose	0,13 ± 0,03	0,32 ±	0,03 个*	×			WT	OEP16 KS4D
	Irehalose	0,14 ± 0,04	0,32 ±	0,03 个*		Organische	Ihreonsaure	0,18 ± 0,04	0,45 ± 0,04 1
						Säuren			
	AL :	WT	OEP16	KS4D	*	Zucker	Inositol, myo-	0,18 ± 0,08	0,48 ± 0,03 1
Aminosauren	Alanın	0,07 ± 0,02	0,34 ±	0,03 1**	Ŧ				
& Polyamine	Prolin	0,08 ± 0,02	0,29 ±	0,06 1**	**			8 4 k + + k	
	Spermidin	0,09 ± 0,03	0,28 ±	0,01 1**	τ τ			Mitoch	ondrium, 21 °C
			05016			Delvemine	Coorneidin		
Polyamina	Spormidin	0.14 + 0.04	0 27 +	N 02 小*		Poryamine	spermiain	0,35 ± 0,00	0,20 ± 0,03 ↓
Organische	Anfelsäure	0,14 1 0,04	0,27 ±	0,03 T				W/T	OFP16 KWT
Säuren	Bernsteinsäure	0,22 ± 0,10	0,41 ±	0,01 1		Polyamine	Spermidin	0.35 + 0.06	0.18 + 0.05 .1
Jauren	Zitronensäure	$0,13 \pm 0,10$ 0.22 ± 0.10	0.42 +	0,00 1		Zucker	Inositol myo-	0,33 ± 0,00	0,10 ± 0,05 1
Zucker	Fruktose	0,22 ± 0,10	0.36 +	0.04 个*		Lucker	Raffinose	$0, 4, \pm 0, 00$	$0,20 \pm 0,00$
Lucker	Glukose	$0,21 \pm 0,07$ 0.23 ± 0.11	0.42 +	0,07 个*			Rannose	0,01 ± 0,01	0,10 1 0,04 4
	Raffinose	$0,23 \pm 0,11$ 0 17 + 0 07	0 32 +	0.03 个*				WT	OFP16 KS4A
	Karrinose	0,17 ± 0,07	0,52 ±	0,00 1		Polyamine	Putrescin	0.37 + 0.06	0 18 + 0 03
		OFP16 TM	OFP16	KS4D		. orjannic	Spermidin	035 + 0.06	0.18 ± 0.05
Polvamine	Spermidin	0 14 + 0.04	0 28 +	0.01 个*	*	Organische	Galactinol	0 31 + 0 04	0 16 + 0 02
. orjanne	opennani	0,21 = 0,01	0,20 =	0,01 1		Säuren	Galactino	0,01 = 0,0	0,10 = 0,02 4
						Zucker	Raffinose	031 + 007	0 15 + 0 02 J
		OEP16 KWT	OEP16	KS4A			Harribbe	0,01 - 0,07	0,10 = 0,02 4
Aminosäuren	Glycin	0,19 ± 0.06	0,40 ±	0,02 个*				wт	OEP16 KS4D
& Polvamine	Spermidin	0.17 ± 0.03	0.27 ±	0.03 个*		Polvamine	Spermidin	0.35 ± 0.06	0.17 ± 0.04 J
Organische	Apfelsäure	0,20 ± 0.06	0,41 ±	0,01 个*		Zucker	Raffinose	0,31 ± 0.07	0,17 ± 0.05 J
Säuren	Bernsteinsäure	0,19 ± 0.04	0,39 ±	0,00 个*				.,	
	Zitronensäure	0.19 ± 0.07	0.42 ±	0.02 个*					
Zucker	Fruktose	0.18 ± 0.03	0.36 ±	0.04 个*					
	Glukose	0,20 ± 0.06	0,42 ±	0,03 个*					
	Raffinose	0,17 ± 0.04	0,32 ±	0,03 个*					
		,,,,		, 1					
		OEP16 KWT	OEP16	KS4D					
Aminosäuren	Alanin	0.10 ± 0.07	0.34 ±	0.03 个*					
		-,,-	- / -						

einzelnen Kompartimente (Tabelle 13). Das Mitochondrium weist über alle Genotypen hinweg keine signifikanten Änderungen in der Metabolitverteilung auf in den bei 4 °C geernteten Pflanzen. Am häufigsten unterscheidet sich bei 4 °C der WT von den phosphomimetischen Substitutions-Komplementanten OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D.

Tabelle 13 Signifikante Unterschiede in der relativen Metabolitenverteilung zwischen den Kompartimenten (Vakuole, Cytosol und Plastid, für das Mitochondrium konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden) aller Genotypen bei 4 °C (Mittelwerte ± SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile deuten eine Zu- oder Abnahme an).

		Vakuole, 4 °C					
		WT	OEP16 KS4A				
Aminosäuren	Glycin	0,33 ± 0,04	0,54 ± 0,05 个*				
Organische	Apfelsäure	0,34 ± 0,02	0,56 ± 0,05 个**				
Säuren	Bernsteinsäure	0,32 ± 0,04	0,53 ± 0,03 个*				
		WT	OEP16 KS4D				
Aminosäuren	Glycin	0,33 ± 0,04	0,53 ± 0,03 个*				
Organische	Apfelsäure	0,34 ± 0,02	0,56 ± 0,01 个*				
Säuren	Zitronensäure	0,35 ± 0,03	0,57±0,04个*				
Zucker	Saccharose	0,21 ± 0,02	0,07 ± 0,01 个*				
		OEP16 KWT	OEP16 KS4A				
Organische	Apfelsäure	0,38 ± 0,09	0,56± 0,05 个*				
Säuren							
		OEP16 TM	OEP16 KS4D				
Organische	Apfelsäure	0,37 ± 0,01	0,56 ± 0,01 个*				
Säuren							
Zucker	Saccharose	0,18 ± 0,04	0,07 ± 0,01 ↓*				
		OEP16 TM	OEP16 KS4A				
Organische	Apfelsäure	0,37 ± 0,01	0,56 ± 0,05 个*				
Säuren							
		OEP16 KWT	OEP16 KS4D				
Organische	Apfelsäure	0,38 ± 0,09	0,56 ± 0,01 个*				
Säuren							
		OEP16 KS4D	OEP16 KS4A				
Aminosäuren	Tyrosin	0,28 ± 0,05	0,48 ± 0,04 个*				

		Cytosol, 4 °C					
		OEP16 TM	OEP16 KS4A				
Aminosäuren	Glycin	0,38 ± 0,01	0,23 ± 0,05 ↓*				
Organische	Apfelsäure	0,37 ± 0,02	0,25 ± 0,04 ↓*				
Säuren							
		WT	OEP16 KS4A				
Aminosäuren	Glycin	0,35 ± 0,06	0,23 ± 0,05 ↓*				
Organische	Bernsteinsäure	0,35 ± 0,06	0,21 ± 0,05 ↓*				
		Plastid, 4 °C					
		WT	OEP16 KS4D				
a : .	F	0.00 . 0.04	0.00 + 0.01 + *				

		Plastid, 4 °C						
		WT OEP16 KS4D						
Organische	Fumarsäure	0,22 ± 0,04 0,08 ± 0,01 ↓*						
Säuren								

Wie anhand der relativen Verteilung der Metabolite erkennbar war, kommt es vor allem in der Vakuole des WT zu großen Veränderungen bei 4 °C. Dies zeigt sich auch in der absoluten Verteilung der Metabolite in nmol/g Trockengewicht: Die Aufsummierung aller Metabolitgehalte pro Stoffklasse zeigt, dass der Gehalt an Zuckern in der Vakuole der bei 4 °C geernteten Pflanzen 17-fach zunimmt, der Gehalt an Aminosäuren nimmt 10-fach zu und der Gehalt an organischen Säuren 3-fach (Tabelle 14). In der OEP16 TM hingegen kommt es nur zu einer 7-fachen Anreicherung der Zucker in der Vakuole bei 4 °C, auch die Aminosäuren werden nur 5,5-fach angereichert. In den Plastiden des WT liegen in den bei 4 °C geernteten Pflanzen 7-mal so viele Zucker vor wie in den bei 21 °C geernteten Pflanzen, die Menge an Aminosäuren nimmt 3,5-fach zu und bei den organischen Säuren gab es eine 1,5-fache Anreicherung. In der OEP16 TM nahmen die Zucker nur 3-fach zu in den Plastiden bei 4 °C, Aminosäuren nur 2,5-fach und organische Säuren blieben unverändert. Das Cytosol und die Mitochondrien von WT und OEP16 TM reicherten in ähnlichem Maß Metabolite bei 4 °C an. Die Komplementante OEP16 TM KWT akkumuliert in einem ähnlichen Maß Metabolite wie der WT im Zuge der Inkubation bei 4 °C. Die phosphomimetischen Komplementanten OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D zeigten eine deutlich reduzierte Akkumulierung von Zuckern und Aminosäuren in den Plastiden und der Vakuole. In den Plastiden nahmen Zucker nur 3-fach zu, in der Vakuole nahmen Zucker und Aminosäuren ebenfalls nur 3-fach zu. Die Metabolite akkumulieren in diesen Mutanten vermehrt im Cytosol und den Mitochondrien, beispielsweise kommt es im Cytosol zu einer 4-fachen Anreicherung von Aminosäuren, wohingegen diese im WT nur 2-fach angereichert wurden.

Tabelle 14 Summe der Mittelwerte pro Stoffklasse in nmol/g Trockengewicht. Aufgelistet sind die aufsummierten Mittelwerte der Absolutmengen für die Stoffklassen Zucker, organische Säuren und Aminosäuren und Polyamine pro Genotyp und Kompartiment.

			Cytosol	Mitochondrium	Plastid	Vakuole
WT	21 °C	Zucker	15176,1	14431,1	5225,8	2141,8
		Organische Säuren	7112,6	3516,6	2450,7	1996,5
		Aminosäuren & Polyamine	22646,3	19871,0	9768,9	5215,0
	4°C	Zucker	34534,8	36195,6	38912,8	34541,4
		Organische Säuren	7061,0	2523,4	3937,9	5900,0
		Aminosäuren & Polyamine	49567,4	27334,5	37723,6	50109,3
OEP16 TM	21 °C	Zucker	10821,8	10741,6	9850,2	4286,7
		Organische Säuren	5063,6	2440,5	2979,5	2421,5
		Aminosäuren & Polyamine	18907,1	14353,2	12256,4	8471,5
	4°C	Zucker	35225,6	36166,7	30341,2	30401,9
		Organische Säuren	8726,8	2905,7	4192,8	7884,4
		Aminosäuren & Polyamine	45925,1	27940,2	32985,7	47667,9
OEP16 TM KWT	21 °C	Zucker	8970,2	12692,7	7950,6	2147,6
		Organische Säuren	4282,4	2406,7	3169,7	2089,1
		Aminosäuren & Polyamine	16707,9	15247,6	15976,4	5775,5
	4°C	Zucker	32783,6	51884,2	48460,4	30196,0
		Organische Säuren	8149,4	3530,8	4205,8	8534,6
		Aminosäuren & Polyamine	53127,6	35751,7	34880,6	52605,4
OEP16 TM KS4A	21 °C	Zucker	15025,8	16796,8	12130,9	10439,8
		Organische Säuren	4687,0	2241,8	2754,7	4828,5
		Aminosäuren & Polyamine	14677,4	12079,4	11632,8	14643,0
	4 °C	Zucker	44093,8	30898,3	39280,2	30637,2
		Organische Säuren	6044,0	2900,2	2536,4	9883,4
		Aminosäuren & Polyamine	63445,0	37245,9	34661,8	46505,0
OEP16 TM KS4D	21 °C	Zucker	7802,5	12615,3	10402,0	8814,4
		Organische Säuren	5044,4	2433,5	2557,4	4034,2
		Aminosäuren & Polyamine	9907,7	14852,9	11377,4	10684,0
	4°C	Zucker	23224,9	33275,2	26403,9	16788,2
		Organische Säuren	5492,9	1925,5	1779,3	8767,0
		Aminosäuren & Polyamine	45088,2	28138,6	22304,6	35314,1

3.4 Aminosäure-Fütterungsexperiment

Um Aufschluss darüber zu erhalten, für welche Aminosäuren OEP16 beim Transport über die Chloroplastenmembranen eine relevante Rolle spielt, wurde ein in vivo Aminosäure-Fütterungsexperiment durchgeführt. Hierfür wurde das Wachstum von WT- und OEP16 TM-Pflanzen auf ½ MS Platten, welche mit den 20 proteinogenen Aminosäuren in verschiedenen Konzentrationen angereichert waren, miteinander verglichen. Als Kontrolle wurden Samen auf ½ MS Platten ohne zusätzlich zugefügte Aminosäure verwendet, es konnte kein Wachstumsunterschied zwischen WT und OEP16 TM auf diesen Platten festgestellt werden (Abbildung 31). Dies galt auch für folgende zum Medium hinzugefügte Aminosäuren: Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glycin, Histidin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin und Tyrosin (Daten nicht gezeigt, außer beispielhaft für Glutamin, siehe Abbildung 31). Für folgende Aminosäuren konnten Unterschiede im Wachstum festgestellt werden: Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Tryptophan und Valin. Bei Lysin und Tryptophan reichte bereits eine Konzentration von 0,5 mM aus, um das Wachstum zu beeinflussen, besonders Tryptophan zeigte einen großen Einfluss auf die Entwicklung beider Genotypen und ist die einzige Aminosäure, welche den WT stärker beeinflusst als die Mutante. Die Entwicklung der Pflanzen unter Einfluss von Tryptophan ist deutlich zeitverzögert im Vergleich zur Kontrolle. Unter Einfluss der verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin ist die Entwicklung der Mutante im Vergleich zum WT deutlich verzögert, beziehungsweise kommt es teilweise sogar zu einer Keimhemmung. Dasselbe gilt für Lysin und Alanin. Der Einfluss von Methionin auf die Mutante machte sich erst nach vier Wochen bemerkbar, die Pflanzen entwickelten hier Chlorosen.



Abbildung 31 Aminosäure-Fütterungsexperiment: Der Einfluss der proteinogenen Aminosäuren auf WT und OEP16 TM. Samen von WT und OEP16 TM wurden auf ½ MS-Medium ausgelegt, welches mit unterschiedlichen Konzentrationen der 20 proteinogenen Aminosäuren angereichert war. Als Kontrolle dienten ½ MS-Platten ohne zusätzliche Aminosäure. Für folgende Aminosäuren konnte kein Unterschied im Wachstum zwischen WT und OEP16 TM festgestellt werden: Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glycin, Histidin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin und Tyrosin (Daten nicht gezeigt, außer beispielhaft für Glutamin).

3.5 OEP23

Zur phänotypischen Charakterisierung von OEP23 wurde die T-DNA Insertionslinie Gabi_279G04 verwendet. Die Pflanzen wurden geselbstet, um homozygote Pflanzen für die T-DNA Insertion zu erhalten. Die Genotypisierung der potenziell homozygoten Generation ergab, dass keine der Pflanzen homozygot für die T-DNA Insertion war. Erwartet worden wäre ein Verhältnis von 1:3:1 von homozygoten Pflanzen zu heterozygoten und WT Pflanzen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die T-DNA Insertion embryolethal sein könnte. Eine Analyse der Schoten der heterozygoten OEP23 KO Pflanzen ergab, dass ca. ¼ der Embryos nicht entwickelt waren.



Abbildung 32 Die OEP23 Verlustmutante ist embryolethal. Gezeigt sind geöffnete Schoten von WT und der heterozygoten OEP23 T-DNA Linie Gabi_279G04. Im WT sind alle Embryos voll entwickelt, während in der heterozygoten Mutante ¼ der Samenanlagen fehlen.



Abbildung 33 Genomische DNA der heterozygoten OEP23 T-DNA Linie Gabi_279G04 für die Genomsequenzierung.

Um auszuschließen, dass die Embryolethalität nicht auf einer anderen, zufälligen T-DNA Insertion beruht, wurde gDNA aus einer heterozygoten Pflanze extrahiert zum Zweck einer Genomsequenzierung. Die gDNA lag in ausreichender Konzentration und Reinheit vor und konnte so für das Next-Generation-Sequencing verwendet werden (Abbildung 33). Die Genomsequenzierung ergab, dass neben der T-DNA Insertion in OEP23, drei weitere T-DNA Insertionen in der Linie Gabi_279G04 existieren. Zwei der Insertionen sind in der gDNA zu finden, eine in Chromosom 1 und eine in Chromosom 4, beide in intergenischen Regionen. Die dritte zusätzliche Insertion ist im plastidären Genom zu finden, sie betrifft das Gen ATCG00170.1, welches für RPOC2 codiert, die RNA-Polymerase Untereinheit beta 2. Verlustmutanten anderer Untereinheiten dieser RNA-Polymerase sind embryolethal, möglicherweise ist dies also der Grund für den vorliegenden Phänotyp. Um dies auszuschließen, wurde die heterozygote OEP23-Verlustmutante mit der OEP23-Kodierungssequenz komplementiert, einmal unter Kontrolle des nativen Promotors und einmal unter Kontrolle des 35S-Promotors. Jedoch konnten auch im Hintergrund der Komplementanten keine für die T-DNA Insertion homozygoten Mutanten mittels Genotypisierung gefunden werden (Daten nicht gezeigt), weshalb davon auszugehen ist, dass der embryolethale Phänotyp nicht auf die T-DNA Insertion in OEP23 zurückzuführen ist.



Abbildung 34 Die OEP23 T-DNA Insertionslinie Gabi_279G04 besitzt drei zusätzliche T-DNA Insertionen. Die Genomsequenzierung der OEP23 T-DNA Insertionslinie Gabi_279G04 ergab, dass neben der T-DNA Insertion im Gen für OEP23 drei weitere T-DNA Insertionen vorhanden sind. Zwei davon befinden sich auf Chromosom 1 und 4 im intergenischen Bereich und eine weitere befindet sich im plastidären Genom (ChrC) im Gen ATCG00170.1. Die Abbildungen zeigen die Position der T-DNA Insertionen, sie wurden aus dem Genombrowser Phytozome v12.1 vom Joint Genome Institute entnommen.
4 Diskussion

Der Chloroplast ist ein wichtiger Sensor für Umweltveränderungen innerhalb der Pflanzenzelle (Yang et al. 2019). Aufgrund des endoplasmatischen Ursprungs der Chloroplasten mussten Transportwege etabliert werden, um den Endosymbionten in das bereits bestehende Netzwerk der Zelle einzubinden. Nach einem massiven Gentransfer sind ein Großteil der im Chloroplasten benötigten Proteine nun im Wirtsgenom codiert, nur noch wenige Proteine sind im Chloroplasten selbst codiert (Stegemann et al. 2003). Die im Wirtsgenom codierten Gene werden im Cytosol translatiert und müssen dann über die beiden, den Chloroplasten umgebenden, Membranen transportiert werden, um an ihren Bestimmungsort zu gelangen. Die hieran beteiligte Transportmaschinerie im OE und IE ist gut studiert: Für den Transport über das OE ist der translocon on the outer chloroplast membrane-Komplex (TOC-Komplex) verantwortlich, im IE ist der translocon on the inner chloroplast membrane-Komplex (TIC-Komplex) für den Transport zuständig (Sjuts et al. 2017). Aber nicht nur Proteine müssen die Hüllmembranen des Chloroplasten überqueren, auch der Austausch von Metaboliten und Ionen über die Membranen ist notwendig. Im IE gibt es einige gut charakterisierte Metabolittransporter und Ionenkanäle, wie z.B. KEA (Bölter et al. 2020; Tsujii et al. 2019). Dem OE wurde lange Zeit keine große Bedeutung beim Transport von Metaboliten und Ionen zugeschrieben, es wurde als reine Diffusionsbarriere angesehen. Die Charakterisierung der OEPs widerlegt diese Hypothese (Harsman et al. 2016; Hemmler et al. 2006; Bölter et al. 1999; Pohlmeyer et al. 1998; Pohlmeyer et al. 1997; Pudelski et al. 2012; Röhl et al. 1999). Um die Rolle der OEPs beim Metabolittransport über das OE besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit drei OEPs näher betrachtet: OEP16, OEP40 und OEP23. Für diese drei Kanäle konnte gezeigt werden, dass sie durch Kälte beeinflusst werden: Während OEP16 hochreguliert wird (Drea et al. 2006; Fowler und Thomashow 2002), wird OEP23 auf Proteinebene runterreguliert (Trentmann et al. 2020) und OEP40 Verlustmutanten zeigen einen frühen Blühphänotyp bei kalten Temperaturen (Harsman et al. 2016).

4.1 Die Bedeutung von OEP40 beim *in vivo* Transport von Zuckern

Kürzlich wurde ein Zuckertransporter im IE näher charakterisiert: pSuT (Patzke et al. 2019). Die Expression von pSuT wird in der Kälte hochreguliert, sodass eine Funktion im Prozess der Kälte-Akklimatisierung naheliegt. Des Weiteren zeigen die pSuT Verlustmutanten einen verspäteten Blühphänotyp. OEP40 im OE zeigt einen verfrühten Blühphänotyp bei kalten Temperaturen. Durch die Kreuzung oep40 x psut sollte eine mögliche Zusammenarbeit der beiden Proteine beim Transport von Zuckern über die Hüllmembranen der Chloroplasten analysiert werden. Nach erfolgreicher Generierung einer Doppelmutante, wurde diese nebst WT und den beiden Singlemutanten unter drei verschiedenen Bedingungen angezogen. Bereits unter LT-Bedingungen ist zu erkennen, dass die Doppelmutante deutlich kleinere Rosetten bildet und auch die Infloreszenz weniger stark ausgeprägt ist als beim WT und den Singlemutanten. Auch unter KT-Bedingungen und bei 10 °C bildet die Doppelmutante deutlich kleinere Rosetten. Unter KT-Bedingungen zeigt die pSuT-Einzelmutante einen verzögerten Blühphänotyp (Patzke et al. 2019), die Blüten werden im Schnitt nach 57 Tagen geöffnet. Der WT hingegen öffnet seine Blüten unter diesen Bedingungen bereits an Tag 53, die OEP40-Einzelmutante und die Doppelmutante öffneten ihre erste Blüte kurz nach dem WT. Unter 10 °C zeigt die OEP40 Einzelmutante den bereits bekannten frühen Blühphänotyp (Harsman et al. 2016): Die Blüte beginnt bereits an Tag 58, der WT blühte ab Tag 63. Die pSuT-Einzelmutante sowie die Doppelmutante beginnen ihre Blüte kurz nach der OEP40-Einzelmutante. Die generell kleineren Rosetten der Doppelmutante deuten darauf hin, dass der Transport von Zuckern über beide Hüllmembranen der Chloroplasten durch das Fehlen von OEP40 im OE und pSuT im IE nachhaltig gestört ist. Im Tagesverlauf wird in den Chloroplasten durch die Photosynthese assimilierter Kohlenstoff in Form von Stärke gespeichert. Diese wird in der Nacht degradiert, ins Cytosol transportiert und dort zu Saccharose konvertiert, welches die Haupttransportform von Zuckern innerhalb der Pflanze ist (Julius et al. 2017). Wird dieser Transportweg nun schon zu Beginn im Chloroplasten eingeschränkt, können die Sink-Organe nicht mehr ausreichend mit Kohlenstoffen versorgt werden und das Wachstum wird inhibiert (Lemoine et al. 2013). Auch die Mutante des Zuckertransporters maltose excess1 (MEX1), welcher für den Export von Maltose aus den Chloroplasten in der Nacht verantwortlich ist, zeigt eine deutliche Wachstumsinhibierung im Vergleich zum WT (Niittylä et al. 2004). Je nach Tageszeit vermitteln unterschiedliche Transportwege den Export von Kohlenhydraten aus dem Chloroplasten: Bei Tag werden hauptsächlich Triosephosphate exportiert mittels des triose phosphate transporter (TPT), bei Nacht werden vorwiegend Hexosen und deren Polymere exportiert (Lu und Sharkey 2006). Da weder die OEP40-Einzelmutante, noch die pSuT-Einzelmutante ein reduziertes Wachstum

zeigen, deutet dies darauf hin, dass andere Transportproteine den Ausfall kompensieren. Erst die Doppelmutante zeigt ein deutlich reduziertes Wachstum. Der Transportweg von Hexosen aus den Chloroplasten in das Cytosol scheint in diesen Pflanzen durch das Fehlen beider Proteine behindert zu sein. Somit stellt OEP40 ein wichtiges Element im Export von Hexosen über die äußere Membran von Chloroplasten dar.

Um Aufschluss über die subzelluläre Verteilung von Zuckern in der Doppelmutante zu erhalten, könnte eine nicht-wässrige Fraktionierung durchgeführt werden. Zudem könnte mittels Gefriertoleranz-Experimenten ermittelt werden, ob die Doppelmutante aufgrund einer Ungleichverteilung von Zuckern im Vergleich zum WT anfälliger für gefrierende Temperaturen ist.

4.2 OEP16 spielt eine Rolle im Prozess der Kälte-Akklimatisierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass OEP16 auf transkriptioneller Ebene unter Kälteeinfluss innerhalb des CBF-Regulons hochreguliert wird (Fowler und Thomashow 2002). Um zu untersuchen, ob OEP16 einen Einfluss auf die Kälte-Akklimatisierung und die damit verbundene Gefriertoleranz besitzt, wurde diese experimentell untersucht. Hierfür wurden WT und OEP16 TM miteinander verglichen, einmal mit und einmal ohne 24stündige Akklimatisierung bei 4 °C und anschließender Inkubation bei -6 °C. So konnte gezeigt werden, dass OEP16 TM, sowohl mit als auch besonders ohne die an den Gefrierschock vorangegangene Akklimatisierung bei 4 °C, deutlich stärker von den Folgen des Gefrierschocks betroffen ist als der WT. OEP16 TM zeigen sowohl eine höhere Mortalität als auch stärker ausgeprägte Nekrosen und damit einhergehend eine schlechtere Regeneration im Vergleich zum WT. Viele Aminosäuren werden im Chloroplasten synthetisiert (Hildebrandt et al. 2015; Reyes-Prieto und Moustafa 2012). Während der Kälte-Akklimatisierung versucht die Pflanze Kryoprotektantien einzulagern, unter anderem in Form von Proteinen, um sich vor Gefrierschäden zu schützen (Shi et al. 2018). So konnte z.B. in einjährigem Rispengras, Spinat und Brassica campestris gezeigt werden, dass der Gehalt an freien Aminosäuren unter Einfluss von kalten Temperaturen zunimmt (Shin et al. 2018; Dionne et al. 2001; Yuan et al. 2019). Die schlechtere Gefriertoleranz von OEP16 TM im Vergleich zum WT deutet daraufhin, dass OEP16 eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Aminosäuren zur Proteinsynthese während der Kälte-Akklimatisierung spielt.

Kanalproteine können durch eine Vielzahl von Faktoren in ihrer Funktion beeinflusst werden, wie z.B. durch das Binden von Liganden oder Ionen an den Kanal oder den pH-Wert (Levitan 1994). Eine weitere Form der Regulation der Kanaleigenschaften stellt die Phosphorylierung dar, wobei die Aminosäuren Serien, Threonin und Tyrosin das Ziel der Proteinkinasen sind (Cousin et al. 2013). Für den humanen Kanal transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung die Konformation des Kanals verändert und so zu einer Inaktivierung der Kanaleigenschaften führt (Barvikova et al. 2020). Auch der mechano-sensitive Ionenkanal MSL10 aus A. thaliana wird durch Phosphorylierung reguliert (Basu und Haswell 2020). Für OEP16 konnte bereits gezeigt werden, dass das Serien an Position vier im N-Terminus, welcher zum Cytosol ausgerichtet ist, phosphoryliert werden kann (Pohlmeyer et al. 1997; Pohlmeyer 1997). Um zu untersuchen, ob diese Phosphorylierung die Kanaleigenschaften von OEP16 beeinflusst, wurden phosphomimetische Substitutionsmutanten erstellt. Hierfür wurde das Serin an vierter Position der Aminosäuresequenz mittels Mutagenese durch Alanin und Asparaginsäure ersetzt. Alanin als kleine, ungeladene Aminosäure, welche nicht phosphoryliert werden kann, repräsentiert hierbei einen permanent nichtphosphorylierten Zustand des Proteins, während Asparaginsäure eine negativ geladene Aminosäure ist und somit einen dauerhaft phosphorylierten Zustand des Proteins nachahmt (Dissmeyer und Schnittger 2011). Mithilfe dieser phosphomimetischen Substitutionsmutanten wurden sowohl in vitro als auch in vivo Experimente durchgeführt. So wurden Komplementationslinien in A. thaliana erstellt: OEP16 TM KWT, OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D. Diese Linien wurden ebenfalls auf ihre Gefriertoleranz hin getestet. Die nicht-akklimatisierten Pflanzen von OEP16 TM KWT und OEP16 TM KS4D verhielten sich wie der WT, für die Linie OEP16 TM KS4D konnte eine leicht verminderte Gefriertoleranz festgestellt werden. Dies deutet auf eine Rolle des Phosphorylierungszustands von OEP16 bei dessen Regulation hin.

In vivo wurden OEP16_WT, OEP16_S4A und OEP16_S4D in *E. coli* überexprimiert und die Einschlusskörper, in denen das überexprimierte Protein vorlag, isoliert und solubilisiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proteine mittels Ionenaustauschchromatographie, um bakterielle Verunreinigungen zu entfernen. Die aufgereinigten Proteine konnten dann für elektrophysiologische Messungen verwendet werden, um so die Kanaleigenschaften *in vitro* zu untersuchen. Die Elektrophysiologie

65

erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Meinecke an der Universität Göttingen. Die Messergebnisse für OEP16_WT bestätigten, dass *A. th.* OEP16.1 einen Kanal mit hoher Leitfähigkeit und Selektivität für Kationen bildet, ebenso wie das Homolog aus Erbse (Pohlmeyer et al. 1997). Die phosphomimetische Substitutionsmutante OEP16_S4D zeigte eine Abnahme im Umkehrpotential als auch in der Kationenselektivität im Vergleich zu OEP16_WT. Während OEP16_WT auch im hohen Spannungsbereich geöffnet vorliegt, konnten für OEP16_S4D selbst bei niedriger Spannung nur kurze Öffnungen im Millisekunden-Bereich nachgewiesen werden. Somit besitzt OEP16_S4D eine geringere Öffnungswahrscheinlichkeit als OEP16_WT. Für die Mutante OEP16_S4A konnten bislang keine auswertbaren Daten generiert werden. Die bisherigen Ergebnisse der Elektrophysiologie deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Kanalaktivität von OEP16 hat und stützen die Ergebnisse des Gefriertoleranz-Experiments.

4.3 Der Einfluss von OEP16 auf subzellulärer Ebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass OEP16 einen Einfluss auf die Kälte-Akklimatisierung und somit auf die Fitness der Pflanzen bei gefrierenden Temperaturen hat, sollte nun untersucht werden, inwieweit OEP16 einen Einfluss auf die subzelluläre Metabolitenverteilung hat. Hierfür wurde die Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung angewandt. Diese Methode wurde entwickelt, um Einblicke in kompartimentspezifische Metabolitkonzentrationen zu erhalten, da sie es ermöglicht einzelne Kompartimente, wie die Vakuole, die Plastiden und das Cytosol, voneinander abzutrennen (Gerhardt und Heldt 1984). Pflanzliches Material wird hierfür schockgefroren, zerkleinert und gefriergetrocknet. Durch den Entzug von Wasser werden biochemische Reaktionen gestoppt und die einzelnen Kompartimente können in einem Gradienten bestehend aus organischen Lösemitteln entsprechend ihrer Dichte angereichert werden. So können kompartimentspezifische Konzentrationen von Metaboliten und Proteinen ermittelt werden. Die ursprüngliche Methode galt jedoch als zeitaufwendig und technisch herausfordernd (Stitt et al. 1989; Geigenberger et al. 2011). Aufgrund dessen wurde die Methode weiter entwickelt, um die Reproduzierbarkeit zu verbessern sowie den Durchsatz zu erhöhen (Fürtauer et al. 2016). Bislang war die Methode limitiert auf die Abtrennung von Cytosol, Vakuole und Plastiden. Die zusätzliche Abtrennung von Mitochondrien erwies sich bislang als kompliziert, da Plastiden und Mitochondrien recht ähnliche Dichten besitzen: ρ=1,09-1,11 und ρ=1,05-1,07, respektive (Neuburger et al. 1982; Nobel 1969). Somit war zu erwarten, dass sich Plastiden und Mitochondrien in den Fraktionen mit geringer Dichte anreichern. In einer Studie, die die klassische NAF mit einer Proteom-Analyse kombinierte, konnte dies bestätigt werden (Fürtauer et al. 2019a). Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die Abtrennung der Mitochondrien in die von Fürtauer und Kollegen weiter entwickelte Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung zu integrieren (Fürtauer et al. 2016). Für die Kompartimente Cytosol, Vakuole und die Plastiden gibt es bereits gut etablierte Enzymtests anhand derer die Markerenzymaktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt werden kann. Für die Mitochondrien fehlte bislang ein entsprechender Test, der jedoch für die Durchführung der nicht-wässrigen Fraktionierung unerlässlich ist. Die Herausforderung war es, einen Enzymtest für ein mitochondriales Markerenzym zu etablieren, welcher sensitiv genug ist, um ihn parallel zu den anderen Markerenzymtests durchführen zu können (Fürtauer et al. 2019a). Zunächst fiel die Wahl auf die Citratsynthase, ein Enzym der mitochondrialen Matrix, welches den ersten Schritt des Citratzyklus katalysiert (Schmidtmann et al. 2014). Die Citratsynthase setzt Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat, CoA-SH und Wasser um. Wird zur Reaktion zusätzlich DTNB hinzugegeben, reagiert dies mit der Thiolgruppe von CoA-SH zu TNB, dessen Absorptionsmaximum bei 412 nm gemessen werden kann (Anoop et al. 2003). Die Sensitivität dieses Tests wurde zunächst mit gekaufter Citratsynthase als Positivkontrolle überprüft. Schon geringe Konzentrationen (0,0005 U) genügten, um einen linearen Anstieg der Enzymaktivität zu messen. Im nächsten Schritt wurde die Positivkontrolle durch Enzymextrakt in unterschiedlichen Mengen aus den Fraktionen <1,35 und >1,35 aus der nicht-wässrigen Fraktionierung verwendet. Bei der Verwendung von 50 µl Enzymextrakt konnte ein linearer Anstieg der Enzymaktivität beobachtet werden, der Enzymtest eignet sich somit auch für den Einsatz in der nicht-wässrigen Fraktionierung. Allerdings gibt es auch in den Peroxisomen eine Citratsynthase (Pracharoenwattana et al. 2005). Insgesamt gibt es fünf putative Gene in A. thaliana, welche für eine Citratsynthase codieren, wovon drei den Peroxisomen zugeordnet werden (Tilbrook et al. 2014). Da so nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine peroxisomale Citratsynthase die Messergebnisse der Enzymtests verfälscht, wurde ein weiteres mitochondriales Enzym als Markerenzym-Kandidat ausgewählt. Die Succinyl-CoA Synthetase ist ebenfalls ein Enzym des Citratzyklus, welche die Reaktion von Succinat und CoA zu Succinyl-CoA katalysiert. Für den Enzymtest wurde ein Kit der Firma Abcam (Berlin, Deutschland) gewählt. Da dieses allerdings nicht für die Anwendung in Pflanzen vorgesehen ist, musste die Kompatibilität zunächst getestet werden. Hierfür wurde der Enzymtest zunächst mit aus *A. thaliana* isolierten Mitochondrien durchgeführt. Wie aus Abbildung 23 und Abbildung 24 hervorgeht, funktioniert der Test genauso effizient für die isolierten pflanzlichen Mitochondrien wie für die im Kit mitgelieferte Positivkontrolle. Somit eignet sich der Test auch für pflanzliche Mitochondrien. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob der Test sensitiv genug für den Einsatz in der nicht-wässrigen Fraktionierung ist. Statt isolierter Mitochondrien wurde nun Enzymextrakt aus den Fraktionen >1,32 und >1,35 für den Test eingesetzt. Aus Abbildung 25 und Abbildung 26 geht hervor, dass auch dies problemlos möglich ist. 1/10 des Enzymextrakts sind ausreichend, um einen linearen Anstieg der Enzymaktivität zu messen. Die Succinyl-CoA Synthetase kann somit als Markerenzym für die nicht-wässrige Fraktionierung verwendet werden.

Fraktioniert wurden nun Proben der Genotypen WT, OEP16 TM, OEP16 TM KWT, OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D, welche bei 21 °C oder nach 24 h Inkubation bei 4 °C geerntet wurden. Die Ergebnisse der Markerenzymtests zeigen, dass unabhängig von Genotyp und Erntetemperatur eine gleichbleibende Auftrennung der Kompartimente Cytosol, Vakuole, Plastid und Mitochondrium erreicht werden konnte (Abbildung 28 und Abbildung 29). Die entsprechenden Proben wurden anschließend an den Metabolomics Service der Fakultät für Biologie der LMU weitergeleitet und dort mittels GC-MS analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels des von Fürtauer und Kollegen erstellten Algorithmus (Fürtauer et al. 2016).

Im Zuge der Kälte-Akklimatisierung werden innerhalb der Pflanzenzelle Zucker und Aminosäuren bereitgestellt, um sie so vor Schäden von Gefrierung zu schützen, da diese Kryoprotektantien die Formierung von Eiskristallen negativ beeinflussen können (Sakai und Larcher 1987; Shi et al. 2018). Anhand des Clustergramms (Abbildung 30) ist zu erkennen, dass sich die kältebehandelten Pflanzen von den bei 21 °C geernteten Pflanzen auf Metabolitebene klar voneinander abtrennen. Somit kommt es bereits nach 24 h unter 4 °C zu großen Veränderungen auf subzellulärer Ebene, unabhängig vom Genotyp und Kompartiment. Für einen Großteil der Metabolite ist ein Anstieg in der relativen Verteilung in den bei 4 °C inkubierten Pflanzen zu beobachten. Vor allem in der Vakuole des WT kommt es zu weitreichenden, signifikanten Änderungen zwischen den beiden Behandlungen. Die Vakuole dient als zentrales Speicherorgan in der Pflanzenzelle und

nimmt mit ca. 80 % den Großteil des Zellvolumens ein (Wink 1993; Winter et al. 1994). Bereits vorangegangene Studien konnten zeigen, dass der Vakuole im Prozess der Kälte-Akklimatisierung eine besondere Rolle zukommt. So konnten Fürtauer und Kollegen ebenfalls zeigen, dass es im akklimatisierten WT zu einer Verschiebung von Zuckern und Aminosäuren vom Cytosol hin zur Vakuole kommt (Fürtauer et al. 2016). Dieser Trend ist in den vorliegenden Daten auch zu beobachten: Während in der Vakuole des WT bei 4 °C nahezu alle Metabolite signifikant angereichert werden, ist für das Cytosol und das Mitochondrium ein abnehmender Trend zu beobachten. In einer weiteren Studie, welche die Rolle des Proteoms des Tonoplasten in der Kälte-Akklimatisierung untersuchte, konnte gezeigt werden, dass zum einen die Abundanz einiger Membranproteine verändert wird und dass es zum anderen zu einer Zunahme von Dicarbonsäuren und Zuckern innerhalb der Vakuole kommt (Schulze et al. 2012). Darüber hinaus zeigte sich, dass ein Protonengekoppelter, vakuolärer Zuckertransporter Einfluss auf den Prozess der Kälte-Akklimatisierung besitzt und somit der Import von Zuckern in die Vakuole während der Kälte-Akklimatisierung diese maßgeblich beeinflusst (Klemens et al. 2014). Im Mitochondrium kommt es zu einer signifikanten Abnahme von Ornithin und den Polyaminen Putrescin und Spermidin nach Inkubation bei 4 °C. Ornithin ist eine nichtproteinogene Aminosäure, sie wird von Arginin abgeleitet und bildet die Vorstufe der Polyamine Putrescin und Spermidin (Proietti et al. 2020). Polyamine nehmen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen, aber auch bei der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress sind sie von Bedeutung (Chen et al. 2018), da sie einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies entgegen wirken können und den Stickstoffhaushalt ausgleichen (Minocha et al. 2014). Generell kann eine positive Korrelation zwischen der Anreicherung von Polyaminen und der Ausbildung von Gefriertoleranz in Pflanzen festgestellt werden (Alcázar et al. 2011). In den Plastiden kann ein signifikanter Anstieg von Threonsäure beobachtet werden nach Inkubation bei 4 °C für 24 h. Threonsäure ist ein Abbauprodukt von Ascorbinsäure (Smirnoff 2018), welche wiederum als Antioxidationsmittel benötigt wird, um reaktive Sauerstoffspezies abzufangen unter Einfluss von abiotischem Stress, wie z.B. Kältestress (Kka et al. 2017; Xiang et al. 2020). Die Akkumulation von Threonsäure im Plastid kann eine Folge von oxidativem Stress im Zuge der Exposition in kalten Temperaturen darstellen. Eine zentrale Rolle im Prozess der Kälte-Akklimatisierung spielt der Kohlenhydrathaushalt und somit auch die Regulation der

Photosynthese, um die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies so gering wie möglich zu halten (Huner et al. 1998). Zudem dienen lösliche Zucker als Osmoprotektantien, Raffinose wird im Cytosol synthetisiert und in den Plastiden importiert, um dort die Membranen der Thylakoiden zu stabilisieren (Schneider und Keller 2009; Knaupp et al. 2011). Im WT ist nach 24 h Inkubation bei 4 °C zu beobachten, dass Raffinose und deren Vorstufen Galactinol und Saccharose im Cytosol abnehmen und in den Plastiden zunehmen. In der Vakuole kommt es ebenfalls zu einer Zunahme der löslichen Zucker. Der Vakuole kommt also nicht nur eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung der Zelle zu (Martinoia et al. 2007), sondern auch in der Speicherung von osmotischen Substanzen und Metaboliten im Zuge der Kälte-Akklimatisierung. Die Vakuole ist das voluminöseste Kompartiment innerhalb der Zelle, jedoch weist sie im WT bei 21 °C die geringsten Mengen an Metaboliten auf, etwa 2000 nmol/g TG Zucker und organische Säuren und ca. 5000 nmol/g TG Aminosäuren. Die höchsten Konzentrationen lassen sich im Cytosol finden (~15000 nmol/g TG Zucker, ~7000 nmol/g TG organische Säuren und ~ 23000 nmol/g TG Aminosäuren), obwohl es nur ca. 2-10 % des gesamten Zellvolumens einnimmt (Peyronnet et al. 2014). Während sich im Cytosol die Konzentrationen der Zucker und der Aminosäuren nach 24 h bei 4 °C lediglich verdoppelten und die organischen Säuren unverändert in ihrer Konzentration vorlagen, nahmen letztere in der Vakuole 3-fach zu, Aminosäuren 10-fach und Zucker sogar 17-fach. Die Anreicherung der Vakuole mit Metaboliten scheint somit von zentraler Bedeutung bei der Anpassung an kalte Temperaturen zu sein.

Bei Betrachtung der entsprechenden Daten für OEP16 TM fällt auf, dass es im Vergleich zum WT zu deutlich weniger signifikanten Änderungen in der subzellulären Verteilung der Metabolite zwischen den bei 21 °C und bei 4 °C geernteten Pflanzen kommt. So kommt es im Mitochondrium zu keinerlei signifikanten Änderungen, im Cytosol nimmt nur Maltose signifikant ab und in der Vakuole nimmt nur Fruktose signifikant zu. In den Plastiden nehmen Ornithin, Spermidin, Tryptophan, Gluconsäure, Glutarsäure, Fruktose und Trehalose signifikant ab, in den Plastiden des WT war tendenziell eine Zunahme aller Metabolite beobachtet worden. Diese Metabolite konnten bereits in anderen Studien in Zusammenhang mit Temperaturstress gebracht werden (Cook et al. 2004; Kaplan et al.



Abbildung 35 Die Rolle von OEP16 im Prozess der Kälte-Akklimatisierung. Im Zuge der Kälte-Akklimatisierung kommt es zu Veränderungen des subzellulären Metaboloms, zum Zweck der Ausbildung von Gefriertoleranz. Aminosäuren, organische Säuren und vor allem Zucker werden aus den Mitochondrien und dem Cytosol in die Plastiden und die Vakuole umgelagert. OEP16, als Kanal permeable für Aminosäuren, wird benötigt, mediiert den Austausch von Aminosäuren zwischen Plastid und Cytosol und sorgt so für ein metabolische Gleichgewicht in der Aminosäuresynthese, welche hauptsächlich in den Plastiden stattfindet. In der OEP16 TM kommt es durch das Fehlen von OEP16 im OE zu einem Ungleichgewicht im subzellulären Metabolom. Dies hat zur Folge, dass OEP16 TM nicht in der Lage ist, eine Gefriertoleranz auszubauen im selben Maße wie der WT.

2004). Das Fehlen von OEP16 scheint somit eine Ungleichverteilung von Metaboliten im Zuge der Inkubation bei 4 °C nach sich zu ziehen. Während sich beim Vergleich der einzelnen Kompartimente von WT und OEP16 TM bei 21 °C in den Plastiden nur Spermidin und myo-Inositol und im Mitochondrium Spermidin signifikant unterscheiden, gibt es zwischen den beiden Genotypen bei 4 °C keinerlei signifikante Unterschiede in der Metabolitverteilung auf Kompartimentebene. Vielmehr scheinen die Dynamiken in der subzellulären Verteilung der Metabolite, ausgelöst durch die 24 h Inkubation bei 4 °C, einen Unterschied zu verursachen. Dies wird ersichtlich aus den aufsummierten, absoluten Werten pro Stoffklasse: Während die Zunahme der Metabolitmengen bei 4 °C für Cytosol und Mitochondrium bei WT und OEP16 TM in etwa gleich sind, akkumulieren in den Plastiden und der Vakuole von OEP16 TM zucker und Aminosäuren in deutlich geringerem Umfang. In den Plastiden von OEP16 TM nehmen Zucker nur 3-fach zu, im WT 7-fach. In der Vakuole von OEP16 TM nehmen Zucker 7-fach zu, im WT 17-fach. Aminosäuren akkumulieren in der Vakuole von OEP16 TM nur 5,5-fach, im WT hingegen 10-fach. Die Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen des Gefriertoleranz-Experiments, bei dem OEP16 TM im Vergleich zu WT eine deutlich schlechtere Toleranz gegenüber gefrierenden Temperaturen aufwies. Die subzelluläre Verteilung der Metabolite, wie Zucker und Aminosäuren, welche von Relevanz für die Ausbildung der Gefriertoleranz ist, ist in der OEP16 TM gestört, sodass diese nicht in der Lage ist, eine Gefriertoleranz im selben Maß wie der WT zu entwickeln (Abbildung 35).

Die Komplementationslinie OEP16 TM KWT sollte sich erwartungsgemäß wie der WT verhalten. Bezogen auf die aufsummierten, absoluten Metabolitmengen akkumuliert OEP16 TM KWT in ähnlichen Maßen Metabolite wie der WT, bei der relativen Verteilung kommt es allerdings bei einigen Metaboliten zu Veränderungen. So kann in OEP16 TM KWT in den Plastiden für Ornithin, Serin, Glutarsäure, Oxalacetat und Trehalose eine signifikante Abnahme verzeichnet werden, im WT hingegen ist eine Zunahme dieser Metabolite zu beobachten bei 4 °C. Raffinose nimmt im Cytosol von OEP16 TM KWT wie im WT bei 4 °C signifikant ab. In den Mitochondrien nimmt es signifikant zu und in der Vakuole ab, was gegenläufig zur Verteilung von Raffinose im WT bei 4 °C ist. Die Akkumulation von Raffinose trägt zum Schutz der Membranen bei Kältestress bei und ist somit von Bedeutung beim Aufbau der Gefriertoleranz (Fürtauer et al. 2019b).

Da die Komplementation mittels *A. tumefaciens*-Transformation durchgeführt wurde, können der genaue Ort der Insertion und auch die Anzahl der Insertionen der T-DNA in das Genom nicht vorausgesagt werden. So könnte eine Insertion die Expression eines beliebigen Gens stören und je nach Funktion dieses Gens auch das Metabolom stören. Um dies zu vermeiden, könnten andere Transformationsverfahren verwendet werden, bei denen Einfluss auf den Ort der Insertion genommen werden kann, wie z.B. CRISPR-Cas9 oder TALEN (Qiu et al. 2021; Forsyth et al. 2016). In den phosphomimetischen Komplementationslinien OEP16 TM KS4A und OEP16 TM KS4D kommt es vor allem bei den Stoffwechselintermediaten des Citratzyklus wie Apfelsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Zitronensäure zu signifikanten Veränderungen. Die vorangegangenen Ergebnisse der Elektrophysiologie und des Gefriertoleranz-Experiments deuteten darauf hin, dass die Phosphorylierung die Kanalaktivität von OEP16 TM verhalten. Dies ist nicht zutreffend. Abiotischer Stress kann das pflanzliche Metabolom innerhalb von Sekunden beeinflussen (Kollist et al. 2019), sodass kurzfristige Änderungen des Metaboloms mithilfe des vorliegenden experimentellen Aufbaus, mit der Ernte nach 24 h bei 4 °C, möglicherweise nicht erfasst werden konnten.

4.4 *In vivo* Funktion von OEP16

In in vitro Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass OEP16 permeabel für verschiedene Aminosäuren ist, es konnte keine Präferenz für eine bestimmte Gruppe von Aminosäuren, z.B. polar oder unpolar, nachgewiesen werden. Um einen Einblick zu erhalten, für welchen Transport welcher Aminosäuren OEP16 in vivo von Relevanz ist, wurde ein Aminosäuren-Fütterungsexperiment durchgeführt. Hierfür wurde ½ MS-Medium mit den 20 proteinogenen Aminosäuren in verschiedenen Konzentrationen supplementiert und die Genotypen WT und OEP16 TM parallel darauf angezogen. Auf den Kontrollplatten, welche ½ MS-Medium ohne zusätzliche Aminosäure enthielten, zeigte die OEP16 TM im Vergleich zum WT keine Abweichungen im Phänotyp. Dies galt ebenso für die Aminosäuren Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glycin, Histidin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin und Tyrosin. Für den Transport dieser Aminosäuren über die äußere Hüllmembran der Chloroplasten scheint OEP16 somit ersetzbar zu sein. Für die Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Tryptophan und Valin konnte ein unterschiedlicher Effekt auf das Wachstum von WT und OEP16 TM festgestellt werden. Diese Aminosäuren, mit Ausnahme von Tryptophan, zeigten einen hemmenden Wachstumseffekt auf OEP16 TM im Vergleich zum WT. Im Fall von Tryptophan wurde das Wachstum der OEP16 TM im Vergleich zum WT nicht so stark gehemmt. Tryptophan dient als Vorläufer für die Biosynthese von Auxin, welche im Cytosol stattfindet (Olatunji et al. 2017). Auxin ist ein Pflanzenhormon, welches von Bedeutung bei der Gewebedifferenzierung und Tropismus ist (Wu et al. 2020). Zudem konnte gezeigt werden, dass Auxin, neben dem Phytohormon Abscisinsäure (ABA), eine keimhemmende Wirkung hat, indem es dem Transkriptionsfactor abscisic acid insensitive 3 (ABI3) vorgeschaltet ist, dessen Expression durch Auxin-Reaktionsfaktoren gesteuert wird (Liu et al. 2013). Die Expression von OEP16.2 wird durch ABI3 reguliert und exogene Zugabe von ABA löst in OEP16.2 Verlustmutanten eine verzögerte Keimung aus (Pudelski et al. 2012). Die exogene Zugabe von Tryptophan im Aminosäure-Fütterungsexperiment könnte zu einer vermehrten Bildung von Auxin im Cytosol führen und somit die Keimhemmung begünstigen. Durch das Fehlen von OEP16 in der OEP16 TM kann endogen gebildetes Tryptophan nicht ins Cytosol gelangen, sodass möglicherweise in der OEP16 TM weniger Auxin gebildet wird als im WT,

wodurch der keimungshemmende Effekt in der OEP16 TM geringer ist als im WT. Die Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Tryptophan und Valin besitzen apolare Seitenketten, Lysin besitzt eine basische Seitenkette. Die Synthese der Aminosäuren findet in den Chloroplasten statt. Grundlage hierfür ist einerseits die Nitratassimilation, bei der zunächst Nitrat im Cytosol zu Nitrit reduziert wird, welches dann in den Chloroplasten zu Ammonium reduziert wird und mittels Glutamin-Synthase auf Glutamat übertragen wird. So entsteht Glutamin, welches durch die Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT), zusammen mit α -Ketoglutarat wiederum zu 2x Glutamat umgesetzt wird. Aufgrund der zentralen Rolle in der Nitratassimilation bilden Glutamin und Glutamat einen großen Anteil am gesamten Aminosäuregehalt (Coruzzi 2003). Andererseits werden in den Chloroplasten durch die CO₂-Assimilation die für die Aminosäuresynthese benötigten Kohlenstoffgerüste bereitgestellt. Die wichtigste Kohlenstoffquelle stellt hier 3-Phosphoglycerat da, welches im Cytosol zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt wird. PEP und Erythorse-4-phosphat bilden mitunter die Grundlage für die Synthese von Tryptophan. PEP kann aber auch zu Pyruvat und Oxalacetat umgesetzt werden und somit als Ausgangsprodukt für die Synthese von Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin und Valin dienen. Der Aminosäure-Katabolismus beginnt mit einer Desaminierung und resultiert so im Erhalt von Stoffwechselintermediaten des TCA-Zyklus und Ammonium bzw. anderen stickstoffhaltigen Verbindungen, wie z.B. Glutamat (Hildebrandt et al. 2015). Der Anabolismus und Katabolismus von Aminosäuren muss streng reguliert werden, um die Akkumulation von für die Pflanzenzelle toxischen Intermediaten, wie Nitrit und Ammoniak, zu vermeiden (Davenport et al. 2015; Li et al. 2014). Die externe Zugabe der Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin und Valin hat einen wachstumshemmenden Effekt auf OEP16 TM im Vergleich zum WT. Dies deutet darauf hin, dass es durch das Fehlen von OEP16 als Aminosäuretransporter im OE zu einer Ungleichverteilung von Aminosäuren und deren Stoffwechselintermediaten in der Pflanzenzelle kommt. So kommt es möglicherweise zur Akkumulation von toxischen Stoffwechselintermediaten, wie z.B. Ammoniak, welche sich wachstumshemmend auswirkt. Die Daten deuten darauf hin, dass OEP16 nicht spezifisch für einzelne Aminosäuren ist, wie auch schon in in vitro Experimenten gezeigt werden konnte (Pohlmeyer et al. 1997), sondern permeabel für verschiedene Aminosäuren mit Tendenz zu apolaren Aminosäuren ist. Auch andere pflanzliche Aminosäuretransporter zeigen ein ähnliches Verhalten ihre Selektivität betreffend (Su et al. 2004).

4.5 OEP23

Das neuste Mitglied der OEP-Familie stellt OEP23 dar, es formt einen Kanal mit hoher Leitfähigkeit und Selektivität für Kationen im OE (Goetze et al. 2015). Interessanterweise besitzt OEP23 auf struktureller Ebene einen ähnlichen Aufbau wie das kürzlich charakterisierte JASSY, ein OPDA-Transporter im OE (Guan et al. 2019). Beide Proteine bestehen sowohl aus α -Helices als auch aus β -Faltblättern, welche ein unvollständiges β -Faß formen. Beide Proteine besitzen eine SPRBCC-Domäne. Da bislang keine T-DNA Insertionsmutante für OEP23 existierte, konnten keine in vivo Studien zur Funktion von OEP23 durchgeführt werden. Nun aber existiert eine solche Linie, welche in der vorliegenden Arbeit erstmals näher charakterisiert wurde. Da die T-DNA Insertionslinien als heterozygote Linien geliefert werden, sollte zunächst eine Selbstung durchgeführt werden, um so homozygot Linien zu erhalten. Jedoch konnte mittels Genotyping der F1-Generation keine homozygote OEP23 Verlustmutante gefunden werden. Bei der Untersuchung von Schoten von WT und der heterozygoten OEP23 T-DNA Insertionslinie stellte sich heraus, dass ¼ der Embryonen in der Mutante nicht ausgebildet sind. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust von OEP23 für Pflanzen embryolethal ist und es sich somit um ein essenzielles Protein handelt. Das einzige bislang bekannte embryolethale Gen im OE ist Toc75-III (Baldwin et al. 2005).

Um auszuschließen, dass dieser Phänotyp nicht durch eine weitere T-DNA Insertion in der vorliegenden Linie erzeugt wird, wurde mittels Next-Generation-Sequencing das Genom der Linie Gabi_279G04 sequenziert. So konnte festgestellt werden, dass diese Linie drei zusätzliche T-DNA Insertionen besitzt. Zwei davon befinden sich auf Chromosom 1 und 4 im intergenischen Bereich, somit ist auszuschließen, dass diese zusätzlichen Insertionen für die Embryolethalität verantwortlich sind. Die dritte Insertion befindet sich im plastidären Genom, im Gen ATCG00170.1, welches für RPOC2 codiert, die RNA-Polymerase Untereinheit beta 2. Eine Insertion von T-DNA in das plastidäre Genom ist eher unüblich, die Transformation vom plastidären Genom in *A. thaliana* stellt eine Herausforderung dar (Yu et al. 2019). Für RPOC2 sind keine Daten über eine Verlustmutante verfügbar, andere Untereinheiten der RNA-Polymerase weisen einen Albino-Phänotyp auf und sind somit nur auf zuckerhaltigem Medium überlebensfähig (Börner et al. 2015). Somit könnte der

Diskussion

embryolethale Phänotyp auf diese Insertion zurückgehen. Um dies auszuschließen, wurden Komplementanten erzeugt. Sollte OEP23 für die Embryolethalität verantwortlich sein, so könnten sich durch Komplementation der heterozygoten Linien homozygote Linien im Hintergrund der Komplementation nachweisen lassen. Dies gelang jedoch nicht, was dafür spricht, dass der Phänotyp nicht durch das Fehlen von OEP23 verursacht wird. Um die *in vivo* Funktion von OEP23 weiter zu untersuchen, könnte beispielsweise mittels amiRNA (*artificial micro RNA*) eine *knock-down*-Linie etabliert werden. Dieses Verfahren eignet sich besonders für essenzielle Gene, für welche keine komplette *knock-down*-Linie erstellt werden kann (Zhang et al. 2018).

4.6 Ausblick

Lange Zeit wurde angenommen, dass die äußere Membran der Chloroplasten nur eine Diffusionsbarriere darstellt (Pick und Weber 2014). Diese Annahme wurde durch die Entdeckung der OEPs widerlegt. Phänotypische Veränderungen zeigen, dass Kanäle wie OEP16, OEP40 und JASSY mit ihren Substratspezifitäten eine wichtige Rolle im Metabolittransport über das OE spielen und somit maßgebend für die erfolgreiche endosymbiontische Integration des Plastiden in die pflanzliche Zelle waren (Pudelski et al. 2012; Harsman et al. 2016; Guan et al. 2019).

Im IE sind bislang zwei Aminosäuretransporter charakterisiert worden (Widhalm et al. 2015; Renné et al. 2003). Die vorliegenden Daten zeigen, dass OEP16 auch *in vivo* eine Funktion im Aminosäuretransport über das OE besitzt. Bislang ungeklärt ist, ob OEP16 mit anderen Proteinen interagiert. Um Interaktionspartner zu finden, könnte Turbo-ID verwendet werden: Proteine, welche sich für kurze Zeit in räumlicher Nähe zum Zielprotein befinden, werden mit Biotin markiert und können so extrahiert und analysiert werden (Arora et al. 2020). Mittels radioaktiv markierter Aminosäuren könnte in einem *in vitro* Transport-Experiment die Spezifität von OEP16 weiter untersucht werden (Widhalm et al. 2015). Da die Doppelmutante OEP40 x pSuT einen kleineren Phänotyp im Vergleich zum WT besitzt, scheint der Zuckertransport über die Hüllmembranen des Chloroplasten maßgeblich eingeschränkt zu sein. Um besser zu verstehen, inwieweit es auf subzellulärer Ebene zu Verschiebungen im Zuckergehalt kommt, sollte eine nicht-wässrige Fraktionierung durchgeführt werden. Zudem könnte mittels eines Gefriertoleranz-Experiments getestet werden, ob die Doppelmutante, aufgrund des möglicherweise unterbrochenen Zuckertransports über das OE und IE, in der Lage ist, eine Gefriertoleranz

aufzubauen. Da unklar ist, ob OEP23 in der untersuchten T-DNA Insertionslinie wirklich verantwortlich für den embryolethalen Phänotyp ist, könnte mittels amiRNA (*artificial microRNA*) die Expression von OEP23 post-transkriptionell reguliert werden (Zhang et al. 2018). Mithilfe dieses Verfahrens könnte zudem versucht werden, mehrere OEPs gleichzeitig auszuschalten, um zu untersuchen, welchen phänotypischen Effekt dies hätte.

5 Literaturverzeichnis

- Alcázar, R.; Cuevas, J. C.; Planas, J.; Zarza, X.; Bortolotti, C.; Carrasco, P.; Salinas, J.;
 Tiburcio, A. F.; Altabella, T. (2011): Integration of polyamines in the cold acclimation response. In: *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 180 (1), S. 31–38. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.07.022.
- Anoop, V. M.; Basu, U.; McCammon, M. T.; McAlister-Henn, L.; Taylor, G. J. (2003): Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. In: *Plant physiology* 132 (4), S. 2205–2217. DOI: 10.1104/pp.103.023903.
- Arora, D.; Abel, N. B.; Liu, C.; van Damme, P.; Yperman, K.; Eeckhout, D.; Lam Dai Vu, L. V.;
 Wang, J.; Tornkvist, A.; Impens, F.; Korbei, B.; Van Leene, J.; Goossens, A.; De Jaeger,
 G.; Ott, T.; Moschou, P. N.; Van Damme, D. (2020): Establishment of ProximityDependent Biotinylation Approaches in Different Plant Model Systems. In: *The Plant Cell* 32 (11), S. 3388–3407. DOI: 10.1105/tpc.20.00235.
- Baldi, P.; Grossi, M.; Pechhioni, N.; Valè, G.; Cattivelli, L. (1999): High expression level of a gene coding for a chloroplastic amino acid selective channel protein is correlated to cold acclimation in cereals. In: *Plant molecular biology* 41, S. 233–243. DOI: 10.1023/a:1006375332677.
- Baldwin, A.; Wardle, A.; Patel, R.; Dudley, P.; Park, S. K.; Twell, D.; Inoue, K.; Paul Jarvis, P. (2005): A molecular-genetic study of the Arabidopsis Toc75 gene family. In: *Plant physiology* 138 (2), S. 715–733. DOI: 10.1104/pp.105.063289.
- Barvikova, K.; Barvik, I.; Sinica, V.; Zimova, L.; Vlachova, V. (2020): Phospho-Mimetic Mutation at Ser602 Inactivates Human TRPA1 Channel. In: *International journal of molecular sciences* 21 (21). DOI: 10.3390/ijms21217995.
- Basu, D.; Haswell, E. S. (2020): The Mechanosensitive Ion Channel MSL10 Potentiates Responses to Cell Swelling in Arabidopsis Seedlings. In: *Current biology: CB* 30 (14), 2716-2728.e6. DOI: 10.1016/j.cub.2020.05.015.
- Benson, S. A.; Occi, J. L. L.; Sampson, B. A. (1988): Mutations that Alter the Pore Function of the OmpF Porin of Escherichia cob K12. In: *Journal of Molecular Biology* 203, S. 961–970. DOI: 10.1016/0022-2836(88)90121-0.
- Binder, A.; Lambert, J.; Morbitzer, R.; Popp, C.; Ott, T.; Lahaye, T.; Parniske, M. (2014): A modular plasmid assembly kit for multigene expression, gene silencing and silencing rescue in plants. In: *PloS one* 9 (2), e88218. DOI: 10.1371/journal.pone.0088218.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Research* 7 (6), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
- Bölter, B.; Mitterreiter, M. J.; Schwenkert, S.; Finkemeier, I.; Kunz, H.-H. (2020): The topology of plastid inner envelope potassium cation efflux antiporter KEA1 provides new insights into its regulatory features. In: *Photosynthesis research*, S. 43–54. DOI: 10.1007/s11120-019-00700-2.

- Bölter, B.; Soll, J.; Hill, K.; Hemmler, R.; Wagner, R. (1999): A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. In: *The EMBO Journal* 18 (20), S. 5505–5516. DOI:10.1093/emboj/18.20.5505.
- Börner, T.; Aleynikova, A. Y.; Zubo, Y. O.; Kusnetsov, V. V. (2015): Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1847 (9), S. 761–769. DOI: 10.1016/j.bbabio.2015.02.004.
- Boyes, D. C.; Zayed, A. M.; Ascenzi, R.; McCaskill, A. J.; Hoffman, N. E.; Davis, K. R.;
 Görlach, J. (2001): Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. In: *The Plant Cell* 13, S. 1499–1510. DOI: 10.1105/tpc.010011.
- Buchanan, S. K.; Smith, B. S.; Venkatramani, L.; Xia, D.; Esser, L.; Palnitkar, M.;
 Chakraborty, R.; van der Helm, D.; Deisenhofer, J. (1999): Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. In: *Nature* 6 (1), S. 56–63.
 DOI: 10.1038/4931.
- Chen, D.; Shao, Q.; Yin, L.; Younis, A.; Zheng, B. (2018): Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 1945. DOI: 10.3389/fpls.2018.01945.
- Chinnusamy, V.; Zhu, J.; Zhu, J.-K. (2007): Cold stress regulation of gene expression in plants. In: *Trends in plant science* 12 (10), S. 444–451. DOI: 10.1016/j.tplants.2007.07.002.
- Cook, D.; Fowler, S.; Fiehn, O.; Thomashow, M. F. (2004): A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (42), S. 15243–15248. DOI: 10.1073/pnas.0406069101.
- Corbesier, L.; Lejeune, P.; Bernier, G. (1998): The role of carbohydrates in the induction of Flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. In: *Planta* 206, S. 131–137. DOI: 10.1007/s004250050383.
- Coruzzi, G. M. (2003): Primary N-assimilation into Amino Acids in Arabidopsis. In: *The arabidopsis book* 2, e0010. DOI: 10.1199/tab.0010.
- Cousin, C.; Derouiche, A.; Shi, L.; Pagot, Y.; Poncet, S.; Mijakovic, I. (2013): Proteinserine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. In: *FEMS microbiology letters* 346 (1), S. 11–19. DOI: 10.1111/1574-6968.12189.
- Cowan, S. W.; Schirmer, T.; Rummel, G.; Steiert, M.; Ghosh, R.; Paupit, R. A.; Jansonius, J. N.; Rosenbusch, J.P. (1992): Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. In: *Nature* 358, S. 727–733. DOI: 10.1038/358727a0.
- Davenport, S.; Le Lay, P.; Sanchez-Tamburrrino, J. P. (2015): Nitrate metabolism in tobacco leaves overexpressing Arabidopsis nitrite reductase. In: *Plant physiology and biochemistry : PPB* 97, S. 96–107. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.09.013.
- Debolt, S.; Melino, V.; Ford, C. M. (2007): Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. In: Annals of botany 99 (1), S. 3–8. DOI: 10.1093/aob/mcl236.

- Dionne, J.; Castonguay, Y.; Nadeau, P.; Desjardins, Y. (2001): Amino Acid and Protein Changes during Cold Acclimation of Green-Type Annual Bluegrass (*Poa annua* L.)
 Ecotypes. In: *Crop Science* 41, S. 1862–1870. DOI: 10.2135/cropsci2001.1862.
- Dissmeyer, N.; Schnittger, A. (2011): Use of phospho-site substitutions to analyze the biological relevance of phosphorylation events in regulatory networks. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 779, S. 93–138. DOI: 10.1007/978-1-61779-264-9_6.
- Drea, S. C.; Lao, N. T.; Wolfe, K. H.; Kavanagh, T. A. (2006): Gene duplication, exon gain and neofunctionalization of OEP16-related genes in land plants. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46 (5), S. 723–735. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02741.x.
- Dutzler, R.; Wang, Y.-F.; Rizkallah, P. J.; Rosenbusch, J. P.; Schirmer, T. (1996): Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. In: *Current biology* 4, S. 127–134. DOI: 10.1016/s0969-2126(96)00016-0.
- Ecker, D. J.; Matzanke, B. F.; Raymond, K. N. (1986): Recognition and Transport of Ferric Enterobactin in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 167 (2), S. 666–673. DOI: 10.1128/jb.167.2.666-673.1986.
- Fitter, A. H.; Fitter, R. S. R. (2002): Rapid changes in flowering time in British plants. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573), S. 1689–1691. DOI: 10.1126/science.1071617.
- Forsyth, A.; Weeks, T.; Richael, C.; Duan, H. (2016): Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)-Mediated Targeted DNA Insertion in Potato Plants. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 1572. DOI: 10.3389/fpls.2016.01572.
- Fowler, S.; Thomashow, M. F. (2002): Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. In: *The Plant Cell* 14 (8), S. 1675–1690. DOI: 10.1105/tpc.003483.
- Fürtauer, L.; Küstner, L.; Weckwerth, W.; Heyer, A. G.; Nägele, T. (2019a): Resolving subcellular plant metabolism. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 100 (3), S. 438–455. DOI: 10.1111/tpj.14472.
- Fürtauer, L.; Weckwerth, W.; Nägele, T. (2016): A Benchtop Fractionation Procedure for Subcellular Analysis of the Plant Metabolome. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 1912. DOI: 10.3389/fpls.2016.01912.
- Fürtauer, L.; Weiszmann, J.; Weckwerth, W.; Nägele, T. (2019b): Dynamics of Plant Metabolism during Cold Acclimation. In: *International journal of molecular sciences* 20 (21). DOI: 10.3390/ijms20215411.
- Geigenberger, P.; Tiessen, A.; Meurer, J. (2011): Use of non-aqueous fractionation and metabolomics to study chloroplast function in Arabidopsis. In: *Methods in molecular biology* 775, S. 135–160. DOI: 10.1007/978-1-61779-237-3_8.

- Gerhardt, R.; Heldt, H. W. (1984): Measurement of Subcellular Metabolite Levels in Leaves by Fractionation of Freeze-Stopped Material in Nonaqueous Media. In: *Plant physiology* 75, S. 542–547. DOI: 10.1104/pp.75.3.542.
- Goetze, T. A.; Patil, M.; Jeshen, I.; Bölter, B.; Grahl, S.; Soll, J. (2015): Oep23 forms an ion channel in the chloroplast outer envelope. In: *BMC plant biology* 15, S. 47. DOI: 10.1186/s12870-015-0445-1.
- Goetze, T. A.; Philippar, K.; Ilkavets, I.; Soll, J.; Wagner, R. (2006): OEP37 is a new member of the chloroplast outer membrane ion channels. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (26), S. 17989–17998. DOI: 10.1074/jbc.M600700200.
- Guan, L.; Denkert, N.; Eisa, A.; Lehmann, M.; Sjuts, I.; Weiberg, A.; Soll, J.; Meinecke, M.;
 Schwenkert, S. (2019): JASSY, a chloroplast outer membrane protein required for
 jasmonate biosynthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* United States of America 116 (21), S. 10568–10575. DOI: 10.1073/pnas.1900482116.
- Harsman, A.; Schock, A.; Hemmis, B.; Wahl, V.; Jeshen, I.; Bartsch, P.; Schlereth, A.; Pertl-Obermeyer, H.; Goetze, T. A.; Soll, J.; Philippar, K.; Wagner, R. (2016): OEP40, a Regulated Glucose-permeable β-Barrel Solute Channel in the Chloroplast Outer Envelope Membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (34), S. 17848–17860. DOI: 10.1074/jbc.M115.712398.
- Hemmler, R.; Becker, T.; Schleiff, E.; Bölter, B.; Stahl, T.; Soll, J.; Götze, T. A.; Braams, S.;
 Wagner, R. (2006): Molecular properties of Oep21, an ATP-regulated anion-selective solute channel from the outer chloroplast membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (17), S. 12020–12029. DOI: 10.1074/jbc.M513586200.
- Hildebrandt, T. M.; Nunes Nesi, A.; Araújo, W. L.; Braun, H.-P. (2015): Amino Acid
 Catabolism in Plants. In: *Molecular plant* 8 (11), S. 1563–1579. DOI:
 10.1016/j.molp.2015.09.005.
- Huner, N. P. A.; Öquist, G.; Sarhan, F. (1998): Energy balance and acclimation to light and cold. In: *Trends in plant science* 3 (6), S. 224–230. DOI: 10.1016/S1360-1385(98)01248-5.
- Julius, B. T.; Leach, K. A.; Tran, T. M.; Mertz, R. A.; Braun, D. M. (2017): Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. In: *Plant & cell physiology* 58 (9), S. 1442–1460. DOI: 10.1093/pcp/pcx090.
- Kaplan, F.; Kopka, J.; Haskell, D. W.; Zhao, W.; Schiller, K. C.; Gatzke, N.; Sung, D. Y.; Guy, C. H. (2004): Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. In: *Plant physiology* 136 (4), S. 4159–4168. DOI: 10.1104/pp.104.052142.
- Kefala, G.; Ahn, C.; Krupa, M.; Esquivies, L.; Maslennikov, I.; Kwiatkowski, W.; Choe, S. (2010): Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12. In: *Protein science: a publication of the Protein Society* 19 (5), S. 1117–1125. DOI: 10.1002/pro.369.
- Kim, Y. S.; Lee, M.; Lee, J.-H.; Lee, H.-J.; Park, C.-M. (2015): The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold

acclimation in Arabidopsis. In: *Plant molecular biology* 89 (1-2), S. 187–201. DOI: 10.1007/s11103-015-0365-3.

- Kirschvink, J. L.; Kopp, R. E. (2008): Palaeoproterozoic ice houses and the evolution of oxygen-mediating enzymes: the case for a late origin of photosystem II. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363 (1504), S. 2755–2765. DOI: 10.1098/rstb.2008.0024.
- Kka, N.; Rookes, J.; Cahill, D. (2017): Quantitation of ascorbic acid in Arabidopsis thaliana reveals distinct differences between organs and growth phases. In: *Plant Growth Regulation* 81 (2), S. 283–292. DOI: 10.1007/s10725-016-0205-8.
- Klebba, P. E.; Newton, S. M. C. (1998): Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. In: *Current Opinion in Microbiology* 1, S. 238–248. DOI: 10.1016/s1369-5274(98)80017-9.
- Klemens, P. A. W.; Patzke, K.; Trentmann, O.; Poschet, G.; Büttner, M.; Schulz, A.; Marten, I.; Hedrich, R.; Neuhaus; H. E. (2014): Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. In: *The New phytologist* 202 (1), S. 188–197. DOI: 10.1111/nph.12642.
- Knaupp, M.; Mishra, K. B.; Nedbal, L.; Heyer, A. G. (2011): Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. In: *Planta* 234 (3), S. 477–486.
 DOI: 10.1007/s00425-011-1413-0.
- Kollist, H.; Zandalinas, S. I.; Sengupta, S.; Nuhkat, M.; Kangasjärvi, J.; Mittler, R. (2019): Rapid Responses to Abiotic Stress: Priming the Landscape for the Signal Transduction Network. In: *Trends in plant science* 24 (1), S. 25–37. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.10.003.
- Lemoine, R.; La Camera, S.; Atanassova, R.; Dédaldéchamp, F.; Allario, T.; Pourtau, N.; Jean-Louis Bonnemain, J.-L.; Laloi, M.; Coutos-Thévenot, P.; Maurousset, L.; Faucher, M.; Girousse, C.; Lemonnier, P.; Parrilla, J.; Durand, M. (2013): Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. In: *Frontiers in plant science* 4, S. 272. DOI: 10.3389/fpls.2013.00272.
- Levitan, I. B. (1994): Modulation of Ion Channels by Protein Phosphorylation and Dephosphorylation. In: Annual Review of Physiology 56, S. 193–212. DOI: 10.1146/annurev.ph.56.030194.001205.
- Li, B.; Li, G.; Kronzucker, H. J.; Baluška, F.; Shi, W. (2014): Ammonium stress in Arabidopsis: signaling, genetic loci, and physiological targets. In: *Trends in plant science* 19 (2), S. 107–114. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.09.004.
- Linke, D.; Frank, J.; Pope, M. S.; Soll, J.; Ilkavets, I.; Fromme, P.; Burstein, E. A.;
 Reshetnyak, Y. K.; Emelyanenko, Vi. I. (2004): Folding Kinetics and Structure of OEP16.
 In: *Biophysical Journal* 86, S. 1479–1487. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74216-2.
- Liu, X.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Feng, Z.; Li, Q.; Yang, H.-Q.; Luan, S.; Li, J.; He, Z.-H-. (2013): Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. In: *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 110 (38), S. 15485–15490. DOI: 10.1073/pnas.1304651110.

- Liu, Y.; Dang, P.; Liu, L.; He, C. (2019): Cold acclimation by the CBF-COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant cell reports* 38 (5), S. 511–519. DOI: 10.1007/s00299-019-02376-3.
- Lu, Y.; Sharkey, T. D. (2006): The importance of maltose in transitory starch breakdown. In: *Plant, cell & environment* 29 (3), S. 353–366. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01480.x.
- Martinoia, E.; Maeshima, M.; Neuhaus, H. E. (2007): Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. In: *Journal of experimental botany* 58 (1), S. 83–102. DOI: 10.1093/jxb/erl183.
- Minocha, R.; Majumdar, R.; Minocha, S. C. (2014): Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 175. DOI: 10.3389/fpls.2014.00175.
- Murcha, M. W.; Elhafez, D.; Lister, R.; Tonti-Filippini, J.; Baumgartner, M.; Philippar, K.;
 Carrie, C.; Mokranjac, D.; Soll, J.; Whelan, J. (2007): Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 143 (1), S. 199–212. DOI: 10.1104/pp.106.090688.
- Murcha, M. W.; Kubiszewski-Jakubiak, S.; Teixeira, P. F.; Gügel, I. L.; Kmiec, B.; Narsai, R.; Ivanova, A.; Megel, C.; Schock, A.; Kraus, S.; Berkowitz, O.; Glaser, E.; Philippar, K.; Maréchal-Drouard, L.; Soll, J.; Whelan, J. (2016): Plant-Specific Preprotein and Amino Acid Transporter Proteins Are Required for tRNA Import into Mitochondria. In: *Plant physiology* 172 (4), S. 2471–2490. DOI: 10.1104/pp.16.01519.
- Neuburger, M.; Journet, E.-P.; Bligny, R.; Carde, J.-P.; Douce, R. (1982): Purification of Plant Mitochondria by Isopycnic Centrifugation Density Gradients of Percoll. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 217 (1), S. 312–323. DOI: 10.1016/0003-9861(82)90507-0.
- Niittylä, T.; Messerli, G.; Trevisan, M.; Chen, J.; Smith, A. M.; Zeeman, S. C. (2004): A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5654), S. 87–89. DOI: 10.1126/science.1091811.
- Nikaido, H.; Rosenberg, E. Y. (1981): Effect of Solute Size on Diffusion Rates through the Transmembrane Pores of the Outer Membrane of *Escherichia coli*. In: *Journal of General Physiology* 77, S. 121–135. DOI: 10.1085/jgp.77.2.121.
- Nobel, P. S. (1969): Density of pea chloroplasts determined by four different methods. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 189 (3), S. 452–454. DOI: 10.1016/0005-2728(69)90177-7.
- Olatunji, D.; Geelen, D.; Verstraeten, I. (2017): Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. In: *International journal of molecular sciences* 18 (12). DOI: 10.3390/ijms18122587.

- Pagès, J.-M.; James, C. E.; Winterhalter, M. (2008): The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. In: *Nature reviews*. *Microbiology* 6 (12), S. 893–903. DOI: 10.1038/nrmicro1994.
- Patzke, K.; Prananingrum, P.; Klemens, P. A. W.; Trentmann, O.; Rodrigues Martins, C.; Keller, I.; Fernie, A. R.; Geigenberger, P.; Bölter, B.; Lehmann, M.; Schmitz-Esser, S.; Pommerrenig, B.; Haferkamp, I.; Neuhaus, H. E. (2019): The Plastidic Sugar Transporter pSuT Influences Flowering and Affects Cold Responses. In: *Plant physiology* 179 (2), S. 569–587. DOI: 10.1104/pp.18.01036.
- Peyronnet, R.; Tran, D.; Girault, T.; Frachisse, J.-M. (2014): Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 558. DOI: 10.3389/fpls.2014.00558.
- Philippar, K.; Geis, T.; Ilkavets, I.; Oster, U.; Schwenkert, S.; Meurer, J.; Soll, J. (2007): Chloroplast biogenesis: The use of mutants to study the etioplast–chloroplast transition. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2), S. 678–683. DOI: 10.1073/pnas.0610062104.
- Pick, T. R.; Weber, A. P. M. (2014): Unknown components of the plastidial permeome. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 410. DOI: 10.3389/fpls.2014.00410.
- Pohlmeyer, K.; Soll, J.; Grimm, R.; Hill, K.; Wagner, R. (1998): A high-conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from Pea. In: *The Plant Cell* 10 (7), S. 1207–1216. DOI: 10.1105/tpc.10.7.1207.
- Pohlmeyer, K. (1997): Porenbildende Proteine in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten aus Erbse (Pisum sativum L.). Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Pohlmeyer, K.; Soll, J.; Steinkamp, T.; Hinnah, S.; Wagner, R. (1997): Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Ameria* (94), S. 9504–9509. DOI: 10.1073/pnas.94.17.9504.
- Ponce-Toledo, R. I.; Deschamps, P.; López-García, P.; Zivanovic, Y.; Benzerara, K.; Moreira, D. (2017): An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids. In: *Current biology : CB* 27 (3), S. 386–391. DOI: 10.1016/j.cub.2016.11.056.
- Pracharoenwattana, I.; Cornah, J. E.; Smith, S. M. (2005): Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. In: *The Plant Cell* 17 (7), S. 2037–2048. DOI: 10.1105/tpc.105.031856.
- Proietti, E.; Rossini, S.; Grohmann, U.; Mondanelli, G. (2020): Polyamines and Kynurenines at the Intersection of Immune Modulation. In: *Trends in immunology* 41 (11), S. 1037–1050. DOI: 10.1016/j.it.2020.09.007.
- Pudelski, B.; Schock, A.; Hoth, S.; Radchuk, R.; Weber, H.; Hofmann, J.; Sonnewald, U.; Soll, J.; Philippar, K. (2012): The plastid outer envelope protein OEP16 affects metabolic fluxes during ABA-controlled seed development and germination. In: *Journal* of experimental botany 63 (5), S. 1919–1936. DOI: 10.1093/jxb/err375.

- Qiu, M.; Li, Y.; Ye, W.; Zheng, X.; Wang, Y. (2021): A CRISPR/Cas9-mediated in situ complementation method for Phytophthora sojae mutants. In: *Molecular plant pathology* 22 (3), S. 373–381. DOI: 10.1111/mpp.13028.
- Rassow, J., Dekker, P. J. T.; van Wilpe, S.; Meijer, M.; Soll, J. (1999): The Preprotein Translocase of the Mitochondrial Inner Membrane: Function and Evolution. In: *Journal of Molecular Biology* (286), S. 105–120. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2455.
- Renné, P.; Dressen, U.; Hebbeker, U.; Hille, D.; Flügge, U.-I.; Westhoff, P.; Weber, A. P. M. (2003): The Arabidopsis mutant dct is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. In: *The Plant journal: for cell and molecular biology* 35 (3), S. 316–331. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2003.01806.x.
- Reyes-Prieto, A.; Moustafa, A. (2012): Plastid-localized amino acid biosynthetic pathways of Plantae are predominantly composed of non-cyanobacterial enzymes. In: *Scientific reports* 2, S. 955. DOI: 10.1038/srep00955.
- Röhl, T.; Motzkus, M.; Soll, J. (1999): The outer envelope protein OEP24 from pea chloroplasts can functionally replace the mitochondrial VDAC in yeast. In: *FEBS letters* 460, S. 491–494. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)01399-x.
- Sakai A.; Larcher W. (1987): The Freezing Process in Plants. In: *Frost Survival of Plants. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* 62, S. 21–38. DOI: 10.1007/978-3-642-71745-1_2.
- Sangwan, V.; Örvar, B. L.; Beyerly, J.; Hirt, H.; Dhindsa, R. S. (2002): Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. In: *The Plant journal: for cell and molecular biology* 31 (5), S. 629–638. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01384.x.
- Schmidtmann, E.; König, A.-C.; Orwat, A.; Leister, D.; Hartl, M.; Finkemeier, I. (2014):
 Redox regulation of Arabidopsis mitochondrial citrate synthase. In: *Molecular plant* 7 (1), S. 156–169. DOI: 10.1093/mp/sst144.
- Schneider, T.; Keller, F. (2009): Raffinose in chloroplasts is synthesized in the cytosol and transported across the chloroplast envelope. In: *Plant & cell physiology* 50 (12), S. 2174–2182. DOI: 10.1093/pcp/pcp151.
- Schulze, W. X.; Schneider, T.; Starck, S.; Martinoia, E.; Trentmann, O. (2012): Cold acclimation induces changes in Arabidopsis tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters. In: *The Plant journal: for cell and molecular biology* 69 (3), S. 529–541. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04812.x.
- Shi, Y.; Ding, Y.; Yang, S. (2018): Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation. In: *Trends in plant science* 23 (7), S. 623–637. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.04.002.
- Shin, H.; Oh, S.; Kim, D.; Hong, J. K.; Yun, J. G.; Lee, S. W.; Son, K.-H. (2018): Induced freezing tolerance and free amino acids perturbation of spinach by exogenous proline.
 In: *Journal of Plant Biotechnology* 45 (4), S. 357–363. DOI: 10.5010/JPB.2018.45.4.357.

- Sjuts, I.; Soll, J.; Bölter, B. (2017): Import of Soluble Proteins into Chloroplasts and Potential Regulatory Mechanisms. In: *Frontiers in plant science* 8 (168), S. 1–15. DOI: 10.3389/fpls.2017.00168.
- Smirnoff, N. (2018): Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. In: *Free radical biology & medicine* 122, S. 116–129. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
- Stegemann, S.; Hartmann, S.; Ruf, S.; Bock, R. (2003): High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15), S. 8828–8833. DOI: 10.1073/pnas.1430924100.
- Steinkamp, T.; Hill, K.; Hinnah, S. C.; Wagner, R.; Röhl, T.; Pohlmeyer, K.; Soll, J. (2000): Identification of the Pore-forming Region of the Outer Chloroplast Envelope Protein OEP16. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (16), S. 11758–11764. DOI: 10.1074/jbc.275.16.11758.
- Steponkus, P. L. (1984): Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. In: Annual Review of Plant Physiology 35, S. 543–584. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.002551.
- Stitt, M.; Lilley, R. McC.; Gerhardt, R.; Heldt, H. W. (1989): Metabolite Levels in Specific
 Cells and Subcellular Compartments of Plant Leaves. In: *Methods in enzymology* 174, S.
 518–582. DOI: 10.1016/0076-6879(89)74035-0.
- Su, Y.-H.; Frommer, W. B.; Ludewig, U. (2004): Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from Arabidopsis. In: *Plant physiology* 136 (2), S. 3104–3113. DOI: 10.1104/pp.104.045278.
- Thomashow, M. F. (1999): PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 50, S. 571–599. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.571.
- Tilbrook, K.; Poirier, Y.; Gebbie, L.; Schenk, P. M.; McQualter, R. B.; Brumbley, S. M. (2014): Reduced peroxisomal citrate synthase activity increases substrate availability for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in plant peroxisomes. In: *Plant biotechnology journal* 12 (8), S. 1044–1052. DOI: 10.1111/pbi.12211.
- Trentmann, O.; Mühlhaus, T.; Zimmer, D.; Sommer, F.; Schroda, M.; Haferkamp, I.; Keller,
 I.; Pommerrenig, B.; Neuhaus, H. E. (2020): Identification of Chloroplast Envelope
 Proteins with Critical Importance for Cold Acclimation. In: *Plant physiology* 182, S.
 1239–1255. DOI: 10.1104/pp.19.00947.
- Tsujii, M.; Kera, K.; Hamamoto, S.; Kuromori, T.; Shikanai, T.; Uozumi, N. (2019): Evidence for potassium transport activity of Arabidopsis KEA1-KEA6. In: *Scientific reports*, S. 10040. DOI: 10.1038/s41598-019-46463-7.
- Vitasse, Y.; Schneider, L.; Rixen, C.; Christen, D.; Rebetez, M. (2018): Increase in the risk of exposure of forest and fruit trees to spring frosts at higher elevations in Switzerland

over the last four decades. In: *Agricultural and Forest Meteorology* 248, S. 60–69. DOI: 10.1016/j.agrformet.2017.09.005.

- Weiser, C. J. (1970): Cold Resistance and Injury in Woody Plants. In: *Science (New York, N.Y.)* 169 (3952), S. 1269–1278. DOI: 10.1126/science.169.3952.1269.
- Widhalm, J. R.; Gutensohn, M.; Yoo, H.; Adebesin, F.; Qian, Y.; Guo, L.; Rohit Jaini, R.;
 Lynch, J. H.; McCoy, R. M.; Shreve, J. T.; Thimmapuram, J.; Rhodes, D.; Morgan, J. A.;
 Dudareva, N. (2015): Identification of a plastidial phenylalanine exporter that
 influences flux distribution through the phenylalanine biosynthetic network. In: *Nature communications* 6, S. 8142. DOI: 10.1038/ncomms9142.
- Wink, M. (1993): The Plant Vacuole: A Multifunctional Compartment. In: *Journal of experimental botany* 44, S. 231–246.
- Winter, H.; Robinson, D. G.; Heldt, H. W. (1994): Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. In: *Planta* 193 (4), S. 530–535. DOI: 10.1007/BF02411558.
- Wu, M.; Wu, J.; Gan, Y. (2020): The new insight of auxin functions: transition from seed dormancy to germination and floral opening in plants. In: *Plant Growth Regulation* 91 (2), S. 169–174. DOI: 10.1007/s10725-020-00608-1.
- Xiang, N.; Hu, J.; Wen, T.; Brennan, M. A.; Brennan, C. S.; Guo, X. (2020): Effects of temperature stress on the accumulation of ascorbic acid and folates in sweet corn (Zea mays L.) seedlings. In: *Journal of the science of food and agriculture* 100 (4), S. 1694– 1701. DOI: 10.1002/jsfa.10184.
- Yadav, S. K. (2010): Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. In: Agronomy for Sustainable Development 30 (3), S. 515–527. DOI: 10.1051/agro/2009050.
- Yang, X.; Li, Y.; Qi, M.; Liu, Y.; Li, T. (2019): Targeted Control of Chloroplast Quality to Improve Plant Acclimation: From Protein Import to Degradation. In: *Frontiers in plant science* 10, S. 958. DOI: 10.3389/fpls.2019.00958.
- Yu, Q.; LaManna, L. M.; Kelly, M. E.; Lutz, K. A.; Maliga, P. (2019): New Tools for Engineering the Arabidopsis Plastid Genome. In: *Plant physiology* 181 (2), S. 394–398.
 DOI: 10.1104/pp.19.00761.
- Yuan, L.; Xie, S.; Nie, L.; Zheng, Y.; Wang, J.; Huang, J.; Zhao, M.; Zhu, S.; Hou, J.; Chen, G.;
 Wang, C. (2019): Comparative Proteomics Reveals Cold Acclimation Machinery
 Through Enhanced Carbohydrate and Amino Acid Metabolism in Wucai (Brassica
 Campestris L.). In: *Plants* 8, S. 474. DOI: 10.3390/plants8110474.
- Zang, X.; Geng, X.; Liu, K.; Wang, F.; Liu, Z.; Zhang, L.; Zhao, Y.; Tian, X.; Hu, Z.; Yao, Y.; Ni, Z.; Xin, M.; Sun, Q.; Peng, H. (2017): Ectopic expression of TaOEP16-2-5B, a wheat plastid outer envelope protein gene, enhances heat and drought stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. In: *Plant science: an international journal of experimental plant biology* 258, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.01.011.

Zhang, N.; Zhang, D.; Chen, S. L.; Gong, B.-Q.; Guo, Y.; Xu, L.; Zhang, X.-N.; Li, J.-F. (2018): Engineering Artificial MicroRNAs for Multiplex Gene Silencing and Simplified Transgenic Screen. In: *Plant physiology* 178 (3), S. 989–1001. DOI: 10.1104/pp.18.00828.

- Zhu, J.-K. (2016): Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. In: *Cell* 167 (2), S. 313–324. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.029.
- Zook, J. D.; Molugu, T. R.; Jacobsen, N. E.; Lin, G.; Soll, J.; Cherry, B. R.; Brown, M. F.;
 Fromme, P. (2013): High-resolution NMR reveals secondary structure and folding of amino acid transporter from outer chloroplast membrane. In: *PloS one* 8 (10), e78116.
 DOI: 10.1371/journal.pone.0078116.

6 Anhang

Tabelle 15 Relative Metabolitverteilung des Genotyps WT bei 21 °C und nach 24 h 4 °C. (Mittelwerte ± SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile deuten eine Zu- oder Abnahme an).

							WT,	relative Verte	ilung, Mittelwer	t±sD				
			Cytosol			Ξ	tochondrium			Plastid		Vaku	ole	
Me	tabolite	21°C		4 °C	d	21 °C	4°	c p	21 °C		4°C p	21 °C	4°C p	
Aminosäuren	Alanin	0,38 ±	0,20	0,24 ±	0,02	0,33 ± 0,	11 0,1	3 ± 0,04	0,22 ± 0	0,12	0,28 ± 0,10	0,07 ± 0,02	0,30 ± 0,06 ↑**	
& Polyamine	Asparagin	0,34 ±	0,12	0,25 ±	0,04	0,37 ± 0,	12 0,2	1 ± 0,05	0,21 ± 0	60'(0,27 ± 0,03	0,08 ± 0,06	0,26 ± 0,00 ↑*	
	Asparaginsäure	0,37 ±	0,18	0,25 ±	0,02	0,39 ± 0,	12 0,2	4 ± 0,06	0,18 ± 0	3,08	0,27 ± 0,06	0,06 ± 0,03	0,25 ± 0,00 ↑***	¥
	Glutaminsäure	0,37 ±	0,17	0,22 ±	0,02	0,42 ± 0,	12 0,2	9±0,01	0,16±0	70,0	0,28 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,21 ± 0,03 ↑**	
	Glutamin	0,37 ±	0,20	0,30 ±	0,05	0,37 ± 0,	17 0,1	5±0,01	0,17 ± 0	3,08	0,23 ± 0,06	0,09 ± 0,05	0,31 ± 0,02 ↑**	
	Glycin	0,45 ±	0,06	0,35 ±	0,06	0,24 ± 0,	0,1.	3 ± 0,07	0,15 ± 0	70,0	0,20 ± 0,05	0,16 ± 0,01	0,33 ± 0,04 ↑**	
	Isoleucin	0,45 ±	0,15	0,30 ±	0,07	0,31±0,	10 0,2	0.± 0,04	0,13 ± 0	60'(0,21 ± 0,11	0,10 ± 0,07	0,29 ± 0,06	
	Leucin	0,44 ±	0,14	0,27 ±	0,08	0,31 ± 0,	0,2	3 ± 0,06	0,15 ± 0	0,12	0,20 ± 0,10	0,10 ± 0,07	0,29 ± 0,06 ↑*	
	Lysin	0,43 ±	0,18	0,23 ±	0,01	0,34 ± 0,	13 0,2	2 ± 0,04	0,17 ± 0	3,08	0,28 ± 0,08	0,06 ± 0,03	0,27 ± 0,04 ↑**	
	Methionin	0,38 ±	0,17	0,23 ±	0,07	0,31±0,	18 0,2	5 ± 0,01	0,21 ± 0),13	0,24 ± 0,13	0,09 ± 0,05	0,29 ± 0,07 ↑*	
	Ornithin	0,37 ±	0,03	0,34 ±	* 🛧 80,0	0,29 ± 0,	0,1	1± 0,07 ↓*	0,20 ± 0	0,12	0,27 ± 0,05	0,14 ± 0,04	0,29 ± 0,05 ↑*	
	Phenylalanin	0,40 ±	0,16	0,28 ±	0,04	0,37 ± 0,	12 0,1	5 ± 0,05	0,17 ± 0	3,08	0,23 ± 0,10	0,06 ± 0,05	0,33 ± 0,04 ↑**	
	Prolin	0,52 ±	0,14	0,28 ±	0,10	0,30 ± 0,	12 0,2	5 ± 0,09	0,10 ± 0	0,05	0,20 ± 0,08	0,08 ± 0,02	0,28 ± 0,05 ↑**	
	Putrescin	0,38 ±	0,11	0,22 ±	0,02	0,37 ± 0,	DG 0,21	0,06 ± 0	0, 19 ± 0	70,0	0,32 ± 0,06	0,06 ± 0,03	0,25 ± 0,04 ↑**	
	Serin	0,38 ±	0,13	0,33 ±	0,07	0,24 ± 0,	1,0 70	1±0,09	0,24 ± 0	0,12	0,23 ± 0,04	0,13 ± 0,06	0,33 ± 0,03 ↑*	
	Spermidin	0,34 ±	0,09	0,30 ±	0,11	0,35 ± 0,	0,1.	3± 0,07 ↓*	0,21 ± 0	60'(0,32 ± 0,08	0,09 ± 0,03	0,26 ± 0,06 ↑*	
	Threonin	0,44 ±	0,17	0,26 ±	0,03	0,33 ± 0,	16 0,2	2 ± 0,06	0,15 ± 0	0,06	0,24 ± 0,11	0,08 ± 0,05	0,28 ± 0,06 ↑*	
	Tryptophan	0,37 ±	0,03	0,31 ±	。,06	0,29 ± 0,	0,1	2 ± 0,05 ↓*	0,20 ± 0	0,12	0,28 ± 0,04	$0,14 \pm 0,04$	0,28 ± 0,04 ↑*	
	Tyrosin	0,42 ±	0,11	0,28 ±	0,04	0,26 ± 0,	12 0,1	5 ± 0,04	0,20 ± 0),13	0,27 ± 0,09	0,12 ± 0,01	0,30 ± 0,04 ↑**	
	Valin	0,48 ±	0,12	0,27 ±	0,04	0,31 ± 0,	D9 0,2	1±0,04	0,11 ± 0	,07	0,21 ± 0,09	0,10 ± 0,04	0,30 ± 0,04 ↑**	
Organische	Apfelsäure	0,44 ±	0,07	0,35 ±	0,05	0,23 ± 0,	1,0 0,1	3 ± 0,08	0,17 ± 0	60'(0,18 ± 0,05	0,16 ± 0,02	0,34 ± 0,02 ↑**	
Säuren	Bernsteinsäure	0,43 ±	0,06	0,35 ±	0,06	0,26 ± 0,	0,1	3 ± 0,08	0,16±0	60'(0,20 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,32 ± 0,04 ↑*	
	Fumarsäure	0,41 ±	0,03	0,34 ±	0,06	0,24 ± 0,	1,0 1,1	3 ± 0,07	0,18±0	3,08	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,31 ± 0,03 ↑**	
	Gluconsäure	0,37 ±	0,04	0,34 ±	0,08	0,26 ± 0,	0'0 20	9±0,07	0,22 ± 0),13	0,28 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,29 ± 0,04 ↑*	
	Glutarsäure	0,37 ±	0,03	0,33 ±	0,08	0,28 ± 0,	0,1	1 ± 0,07	0,21 ± 0	0,12	0,27 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,28 ± 0,04 ↑*	
	Oxaloacetat	0,43 ±	0,06	0,33 ±	0,09	0,33 ± 0,	0,1	5± 0,06 ↓*	0,18 ± 0	60'(0,24 ± 0,00	0,06 ± 0,03	0,27 ± 0,03 ↑**	
	Threonsäure	0,32 ±	0,07	0,21 ±	0,03	0,46 ± 0,	0,2	5±0,06	0,18 ± 0	0,04	0,37 ± 0,08 ↑*	0,04 ± 0,06	0,16 ± 0,05	
	Zitronensäure	0,43 ±	0,05	0,35 ±	0,06	0,24 ± 0,	0,1	3 ± 0,07	0,17 ± 0	3,08	0,17 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,35 ± 0,03 ↑**	1
Zucker	Fruktose	0,39 ±	0,03	0,35 ±	0,06	0,25 ± 0,	0,1.	3 ± 0,08	0,19±0),11	0,19 ± 0,05	0,18 ± 0,01	0,33 ± 0,02 ↑***	¥
	Galactinol	0,39 ±	0,02	0,26 ±	o,06 V *	0,31 ± 0,	0,1	9 ± 0,06	0,20 ± 0	0,10	0,25 ± 0,09	0,09 ± 0,04	0,30 ± 0,06 ↑*	
	Glukose	0,43 ±	0,07	0,35 ±	0,06	0,22 ± 0,	10 0,1	3 ± 0,08	0,18 ± 0	0,10	0,19 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,33 ± 0,03 ↑**	
	Inositol, myo-	0,32 ±	0,07	0,21 ±	0,04	0,47 ± 0,	JG 0,2	5 ± 0,05 ↓*	0,18 ± 0	3,08	0,35 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,18 ± 0,04 ↑*	
	Maltose	0,40 ±	0,02	0,27 ±	0,03	0,25 ± 0,	0,1	5 ± 0,05	0,19±0	70/0	0,27 ± 0,05	0,16 ± 0,02	0,31 ± 0,03 ↑**	
	Raffinose	0,36 ±	0,03	0,19 ±	0,04 🕹 *	0,31 ± 0,	0,2,	4 ± 0,03	0,20 ± 0	0,12	0,34 ± 0,06	0,13 ± 0,03	0,22 ± 0,02 ↑*	
	Saccharose	0,41 ±	0,14	0,21 ±	0,01	0,40 ± 0,	12 0,2	3 ± 0,06	0,14 ± 0	0,05	0,29 ± 0,05 ↑*	0,05 ± 0,03	0,21 ± 0,02 ↑**	
	Trehalose	0,37 ±	0,02	0,33 ±	0,08	0,29 ± 0,	0,1	1 ± 0,07 ↓*	0,20 ± 0	0,12	0,27 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,28 ± 0,04 ↑*	1

I																																						
alo	1015	4 °C p	0,30 ± 0,13	0,26 ± 0,13	$0,28 \pm 0,14$	0,23 ± 0,13	0,30 ± 0,15	0,37 ± 0,03	0,29 ± 0,14	0,28 ± 0,14	0,28 ± 0,14	0,33 ± 0,11	0,35 ± 0,07	0,27 ± 0,15	0,31 ± 0,13	$0,27 \pm 0,14$	0,30 ± 0,02	0,33 ± 0,09	0,29 ± 0,14	0,35 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,28 ± 0,14	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,06	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,28 ± 0,06	0,22 ± 0,11	0,37 ± 0,01	0,40 ± 0,05 ↑*	$0,31 \pm 0,13$	0,41 ± 0,05	0,21 ± 0,09	0,31 ± 0,09	$0,30 \pm 0,14$	0,18 ± 0,04	0,35 ± 0,07
ideV.		21 °C	0,17 ± 0,09	0,12 ± 0,08	0,10 ± 0,06	0,10 ± 0,07	0,16 ± 0,11	0,22 ± 0,11	$0,19 \pm 0,10$	0,18 ± 0,08	0,13 ± 0,07	0,18 ± 0,15	0,18 ± 0,08	0,13 ± 0,06	0,17 ± 0,10	0,13 ± 0,08	0,21 ± 0,08	$0, 14 \pm 0, 04$	0,17 ± 0,06	0,18 ± 0,08	0,16 ± 0,11	0,20 ± 0,10	0,22 ± 0,10	$0,19 \pm 0,10$	0,20 ± 0,08	0,17 ± 0,07	0,18 ± 0,07	$0,17 \pm 0,13$	0,07 ± 0,03	0,22 ± 0,10	0,21 ± 0,07	0,17 ± 0,07	0,23 ± 0,11	0,06 ± 0,05	0,21 ± 0,10	0,17 ± 0,07	0,12 ± 0,09	0,18 ± 0,08
τ		4°C p	0,21 ± 0,09	0,31 ± 0,13	0,26 ± 0,14	0,33 ± 0,14	0,23 ± 0,14	0,14 ± 0,00	0,25 ± 0,15	0,23 ± 0,13	0,29 ± 0,17	$0,19 \pm 0,11$	0,23 ± 0,03 ↓*	0,28 ± 0,16	0,18 ± 0,11	0,29 ± 0,16	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,06 ↓*	0,23 ± 0,14	0,23 ± 0,03 ↓*	0,21 ± 0,05	$0,27 \pm 0,14$	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,03 ↓*	0,22 ± 0,03 ↓*	0,29 ± 0,05	0,36 ± 0,12	0,14 ± 0,02	0,13±0,03↓*	0,23 ± 0,13	0,13 ± 0,03	0,37 ± 0,11	0,25 ± 0,08	0,23 ± 0,13	0,26 ± 0,05	0,22 ± 0,03 ↓*
ilung, Mittelwert ± sD placti		21 °C	0,22 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,06	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,37 ± 0,04	0,24 ± 0,05	0,18 ± 0,01	0,29 ± 0,08	0,36 ± 0,06	0,39 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,37 ± 0,04	0,29 ± 0,07	0,19 ± 0,00	0,20 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,26 ± 0,05	0,36 ± 0,06	0,37 ± 0,04	0,28 ± 0,12	0,38 ± 0,11	0,20 ± 0,08	0,26 ± 0,05	0,31 ± 0,02	0,18 ± 0,08	0,43 ± 0,08	0,24 ± 0,06	0,33 ± 0,04	0,28 ± 0,07	0,38 ± 0,04
DEP16 TM, relative Verte		4 °C p	0,21 ± 0,09	0,20 ± 0,06	0,20 ± 0,07	0,23 ± 0,03	0,19 ± 0,07	0,12 ± 0,03	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,20 ± 0,07	0,24 ± 0,07	0,20 ± 0,05	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,20 ± 0,06	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,07	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,15 ± 0,05	0,21 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,19 ± 0,05	0,10 ± 0,00	0,23 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,21 ± 0,09	0,32 ± 0,06	0,12 ± 0,04
Mitochol		21 °C	0,20 ± 0,03	0,26 ± 0,06	0,33 ± 0,09	$0,32 \pm 0,11$	0,28 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,25 ± 0,09	0,27 ± 0,08	0,29 ± 0,10	$0,24 \pm 0,13$	0,16 ± 0,08	0,27 ± 0,06	0,27 ± 0,09	0,24 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,28 ± 0,10	0,16 ± 0,08	0,20 ± 0,03	0,26 ± 0,09	0,20 ± 0,05	0,22 ± 0,07	0,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,05	0,21 ± 0,06	0,31 ± 0,12	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,18 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,24 ± 0,00	0,31 ± 0,05	0,15 ± 0,07
-		4 °C p	0,28 ± 0,06	0,24 ± 0,06	0,26 ± 0,06	0,21 ± 0,05	0,28 ± 0,06	0,38 ± 0,01	0,26 ± 0,06	0,27 ± 0,05	0,25 ± 0,07	0,31 ± 0,05	0,30 ± 0,02	0,25 ± 0,07	0,28 ± 0,04	0,24 ± 0,07	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,06	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,25 ± 0,07	0,37 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,28 ± 0,05	0,21 ± 0,06	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,27 ± 0,05	0,36 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,28 ± 0,03 ↓*	0,26 ± 0,07	0,24 ± 0,03	0,31 ± 0,02
Cutos	51 85 21 85	21 °C	0,42 ± 0,10	0,27 ± 0,03	0,29 ± 0,06	0,29 ± 0,08	0,36 ± 0,07	0,39 ± 0,05	0,35 ± 0,09	0,34 ± 0,09	0,33 ± 0,13	0,35 ± 0,09	0,29 ± 0,03	$0,36 \pm 0,14$	0,39 ± 0,11	$0,34 \pm 0,11$	0,32 ± 0,08	0,26 ± 0,05	0,35 ± 0,11	0,29 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,09	0,38 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,33 ± 0,06	$0,24 \pm 0,11$	0,39 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,24 ± 0,06	0,36 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,30 ± 0,07	0,29 ± 0,03
Ι		stabolite	Alanin	Asparagin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Glutamin	Glycin	Isoleucin	Leucin	Lysin	Methionin	Ornithin	Phenylalanin	Prolin	Putrescin	Serin	Spermidin	Threonin	Tryptophan	Tyrosin	Valin	Apfelsäure	Bernsteinsäure	Fumarsäure	Gluconsäure	Glutarsäure	Oxaloacetat	Thre onsäure	Zitronensäure	Fruktose	Galactinol	Glukose	Inositol, myo-	Maltose	Raffinose	Saccharose	Trehalose
	:	Me	Aminosäuren	& Polyamine																			Organische	Säuren							Zucker							

Tabelle 16 Relative Metabolitverteilung des Genotyps OEP16 TM bei 21 °C und nach 24 h 4 °C.(Mittelwerte ± SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p <</td>0.001, Pfeile deuten eine Zu- oder Abnahme an).

Pfe	eile	e c	deu	ute	n	ei	ne	Zı	J-	od	er	AŁ	y, ona	hr	ne	a	ຮຸ ເ າ).	De		Jas	5 5	igi		ĸa	112	IIIV	Ca	lu		1		0.	.02	,	ŀ		0.	01
aloin	1°C 5	4 C	0,21 ± 0,06	0,20 ± 0,07	10'N I OT 'N	0,13 ± 0,02	0,30 ± 0,08	0,38 ± 0,09	0,25 ± 0,07	0,22 ± 0,05	0,16 ± 0,04	0,20 ± 0,10	0,29 ± 0,03 ↑*	0,32 ± 0,16	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,07	0,31 ± 0,00	0,28 ± 0,17	0,24 ± 0,07	0,28 ± 0,04 ↑*	$0,30 \pm 0,14$	0,24 ± 0,04	0,38 ± 0,09	0,38 ± 0,11	0,37 ± 0,12	0,37 ± 0,13	0,36 ± 0,12	0,25 ± 0,01	0,15 ± 0,02 ↑**	0,39 ± 0,13	0,40 ± 0,12	0,19 ± 0,06	0,39 ± 0,10	0,11 ± 0,04	0,29 ± 0,18	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,05	0,36 ± 0,12
4eV	21 °C	21 C	0,10 ± 0,07	/ 0/0 ∓ 71/0	αηίη Ξ ιηίη	0,07 ± 0,06	0,09 ± 0,08	0,19 ± 0,06	0,14 ± 0,07	0,15 ± 0,08	0,09 ± 0,06	0,12 ± 0,09	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,08	0,17 ± 0,06	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,06	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,08	0,16 ± 0,09	0,20 ± 0,06	0,19 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,19 ± 0,07	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,06	0,08 ± 0,07	0,20 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,06 ± 0,06	0,18 ± 0,03
SD	, , ,	4 C	$0,30 \pm 0,10$	0,32 ± 0,06	0,23 I 0,04	0,35 ± 0,03	0,19 ± 0,07	0,14 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,25 ± 0,06	0,34 ± 0,05	0,26 ± 0,09	0,21±0,03 ↓*	0,22 ± 0,12	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,11	0,21±0,01↓*	0,29 ± 0,12	0,24 ± 0,10	0,23 ± 0,05	0,24 ± 0,14	0,25 ± 0,07	0,15 ± 0,06	0,15 ± 0,06	0,17 ± 0,07	0,19 ± 0,07	0,19 ± 0,05 ↓*	0,29 ± 0,01 ↓**	0,31 ± 0,05	0,14 ± 0,08	0,13 ± 0,06	0,26 ± 0,11	0,14 ± 0,06	0,37 ± 0,08	0,30 ± 0,14	0,41 ± 0,04	0,35 ± 0,08	0,19 ± 0,05 ↓*
rteilung, Mittelwert ± Plasti	31 °C	21 C	0,31 ± 0,11	01,0 ± 05.0	4T'N I NC'N	0,32 ± 0,15	0,30 ± 0,13	0,26 ± 0,12	0,25 ± 0,09	0,25 ± 0,09	0,28 ± 0,12	0,24 ± 0,11	0,37 ± 0,05	$0,31 \pm 0,14$	0,22 ± 0,10	0,24 ± 0,09	0,34 ± 0,06	0,38 ± 0,04	0,29 ± 0,16	0,37 ± 0,05	0,28 ± 0,11	0,26 ± 0,09	0,23 ± 0,09	0,26 ± 0,09	0,27 ± 0,10	0,35 ± 0,06	0,36 ± 0,06	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,05	0,25 ± 0,11	0,30 ± 0,10	0,32 ± 0,07	0,20 ± 0,06	0,41 ± 0,09	0,26 ± 0,12	0,34 ± 0,08	0,25 ± 0,06	0,37 ± 0,06
<u>16 IMKWI, relative Ve</u> drium	7 °C	4 C p	0,26 ± 0,06	0,25 ± 0,04	0,20 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,20 ± 0,12	0,16 ± 0,03	0,23 ± 0,09	0,25 ± 0,07	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,08	0,15 ± 0,05	0,19 ± 0,08	0,27 ± 0,08	0,22 ± 0,07	0,15 ± 0,05	0,21 ± 0,08	0,23 ± 0,08	0,16 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,22 ± 0,06	$0,14 \pm 0,04$	0,14 ± 0,06	0,14 ± 0,06	$0,14 \pm 0,06$	0,14 ± 0,06	0,20 ± 0,02	0,32 ± 0,10	0,13 ± 0,06	0,14 ± 0,06	0,27 ± 0,08	0,14 ± 0,05	0,34 ± 0,06	0,19 ± 0,09	0,30 ± 0,06 ↑*	0,37 ± 0,05	0,14 ± 0,06
Nitochon	21 °C	21 C	0,25 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,0 I +C,0	0,33 ± 0,05	0,31 ± 0,09	0,23 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,27 ± 0,07	0,28 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,26 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,31 ± 0,06	0,26 ± 0,10	0,18 ± 0,05	0,28 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,19 ± 0,07	$0,34 \pm 0,11$	0,21 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,06	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,04	$0,41 \pm 0,01$	0,17 ± 0,04
	2°7	4 C p	0,23 ± 0,09	0,22 ± 0,02		0,20 ± 0,01	0,31 ± 0,09	0,32 ± 0,02	0,29 ± 0,05	0,28 ± 0,06	0,25 ± 0,05	0,30 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,03	0,29 ± 0,11	0,33 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,29 ± 0,07	0,33 ± 0,08	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,08	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,30 ± 0,05	0,27 ± 0,02	0,23 ± 0,09	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,28 ± 0,13	0,33 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,18 ± 0,02 ↓*	0,16 ± 0,04	0,30 ± 0,05
	21 °C	57 C	$0,33 \pm 0,13$	90'0 ∓ 67'0	0,23 I U,UG	0,28 ± 0,09	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,38 ± 0,09	0,37 ± 0,11	0,35 ± 0,10	0,36 ± 0,08	0,28 ± 0,05	$0,34 \pm 0,11$	0,39 ± 0,07	0,36 ± 0,11	0,27 ± 0,07	0,26 ± 0,09	0,32 ± 0,09	0,28 ± 0,05	0,37 ± 0,05	0,38 ± 0,09	0,34 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,30 ± 0,07	0,29 ± 0,06	$0,27 \pm 0,11$	$0,24 \pm 0,11$	0,34 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,31 ± 0,08	0,35 ± 0,03	0,26 ± 0,06	0,33 ± 0,06	0,32 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,28 ± 0,04
I			Alanın	Asparagin	a inbellige ibden	Glutaminsäure	Glutamin	Glycin	Isoleucin	Leucin	Lysin	Methionin	Ornithin	Phenylalanin	Prolin	Putrescin	Serin	Spermidin	Threonin	Tryptophan	Tyrosin	Valin	Apfelsäure	Bernsteinsäure	Fumarsäure	Gluconsäure	Glutarsäure	Oxaloacetat	Threonsäure	Zitronensäure	Fruktose	Galactinol	Glukose	Inositol, myo-	Maltose	Raffinose	Saccharose	Trehalose
		- IVIE	Aminosauren	& Ројуатие																			Organische	Säuren							Zucker							

Tabelle 17 Relative Metabolitverteilung des Genotyps OEP16 TM KWT bei 21 °C und nach 24 h 4 °C. (Mittelwerte ± SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile deuten eine Zu- oder Abnahme an).

		d	5		2	1	4	*		~	1	10	2	, +	1		1		5	- -	,	1	*	3 →**	*↓ 2	2	C 1	* ~	~	÷ + €	6	2	C	2	, +	*	
		° C	17 ± 0,06	23 ± 0,06	14 ± 0,02	12 ± 0,01	19 ± 0,02	54 ± 0,05	17 ± 0,06	23 ± 0,13	22 ± 0,11	17 ± 0,05	27 ± 0,12	37 ± 0,14	22 ± 0,11	17 ± 0,06	25 ± 0,11	25 ± 0,10	21 ± 0,06	26 ± 0,10	18 ± 0,02	23 ± 0,11	56 ± 0,05	53 ± 0,03	51 ± 0,07	t3 ± 0,07	36 ± 0,12	16 ± 0,05	0'0 ∓ 60	56 ± 0,06	52 ± 0,09	16 ± 0,07	54 ± 0,10	10 ± 0,02	32 ± 0,14	15 ± 0,06	12 ± 0,02
	/akuole	4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	7'0	0,2	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,1	0'0	0,5	0,5	0,1	0,5	0,1	0,3	0,1	0,1
		c	0 ± 0,07	3 ± 0,06	1 ± 0,09	9 ± 0,07	5 ± 0,09	0 ± 0,02	2 ± 0,09	1 ± 0,08	5 ± 0,08	5±0,10	2 ± 0,03	5 ± 0,10	1 ± 0,05	8 ± 0,05	9 ± 0,04	7 ± 0,03	3 ± 0,08	2 ± 0,03	9 ± 0,05	0,0 ± 0,06	1 ± 0,01	00 ′ 0 ∓ 6	3 ± 0,02	2 ± 0,03	2 ± 0,02	9 ± 0,01	3 ± 0,03	2 ± 0,02	5±0,04	8 ± 0,04	2 ± 0,03	3 ± 0,01	2 ± 0,07	2 ± 0,03	8 ± 0,04
		21,	0,2(0,23	0,2;	0, 19	0,25	0,4(0,32	0,3:	0,2(0,2(0,3	0,25	0,3:	0,28	0,29	0,2	0,33	0,32	0,29	0,3(0,4:	0,35	0,33	0,32	0,32	0,29	0,13	0,42	0,3(0,28	0,42	0,13	0,3	0,32	0, 18
		d	0,12	60 <i>°</i> C	0,10	0,08	0,12	0,04), 18	0,17), 19	0,08),06), 13	0,17	0,17	0,03),07	0,17	60 <i>°</i> (0,04	0,17	<u></u> ,02	0,03	y,03 ↓*	0,04	0,08),06	0,10	0,02),04 ↓*), 19),01 ↓*	0,08), 15), 14), 10
0		4 °C	0,30 ± (0,27 ± (0,39±(0,37 ± (0,19±(0,10 ± (0,27 ± (0,25 ± (0,22 ± (0,26 ± (0,28± (0,19±(0,25 ± (0,26± (0,29± (0,23±0	0,23±0	0,28± (0,13±(0,25 ± (0,07 ± (0,12 ± (0,10±(0,16± (0,20 ± (0,32 ± (0,45 ± (0,07 ± (0,09 ± 00,0	0,32 ± (0,07 ± (0,44 ± (0,22 ± (0,35 ± (0,32 ± (
elwert ± si	Plastid		,12	60	,06	,06	,06	04	08	,05	,10	,08	,07	,14	,07	,02	,05	,06	,06	,07	60'	,08	,04	,03	,03	,08	,07	,06	,01	,06	,02	,07	,03	,07	,08	,07	,02
ung, Mitte		21 °C	0,30 ± 0	0,27 ± 0	0,24 ± 0	0,25 ± 0	0,23 ± 0	0,16 ± 0	0,16 ± 0	0,19 ± 0	0,27 ± 0	0,17 ± 0	0,27 ± 0	0,25 ± 0	0,14 ± 0	0,23 ± 0	0,25 ± 0	0,31 ± 0	0,22 ± 0	0,27 ± 0	0,24 ± 0	0,20 ± 0	0,15 ± 0	0,15 ± 0	0,21 ± 0	0,27 ± 0	0,27 ± 0	0,27 ± 0	0,31 ± 0	0,15 ± 0	0,20 ± 0	0,28 ± 0	0,15 ± 0	0,38 ± 0	0,22 ± 0	0,29 ± 0	0,22 ± 0
ve Verteil																																*					
4A, relativ		7	: 0,05	: 0,03	: 0,05	: 0,07	0,01	: 0,01	: 0,05	: 0,07	: 0,03	: 0,03	: 0,07	: 0,03	: 0,08	: 0,04	0,04	: 0,10	: 0,02	: 0,11	: 0,01	: 0,02	: 0,01	: 0,02	: 0,02	: 0,03	: 0,06	: 0,05	0,04	: 0,01	: 0,02	: 0,03 ↑	: 0,03	60'0	: 0,01	: 0,05	: 0,03
P 16 TM KS	ndrium	4 °C	0,26 ±	0,23 ±	0,22 ±	0,25 ±	0,22 ±	0,13 ±	0,23 ±	0,21 ±	0,20 ±	0,27 ±	0,17 ±	0,18 ±	0,23 ±	0,22 ±	0,16 ±	0,25 ±	0,20 ±	0,22 ±	0,16 ±	0,22 ±	0,11 ±	0,14 ±	0,12 ±	0,15 ±	0,15 ±	0,28 ±	0,26 ±	0,11 ±	0,11 ±	0,23 ±	0,11 ±	0,26 ±	0,17 ±	0,24 ±	0,24 ±
OE	Mitocho		0,05	0,03	0,07	0,03	0,08	00'0	0,08	0,07	0,06	0,11	0,03	0,03	0,06	0,03	0,02	0,05	0,05	0,03	0,02	0,04	0,00	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,06	0,02	0,02	0,02	0,03	0,08	0,03	0,02	0,04
		21 °C	0,24 ±	0,25 ±	0,32 ±	0,33±	0,26 ±	0,13 ±	0,19 ±	0,20 ±	0,20 ±	0,26±	0,15 ±	0,22 ±	0,19 ±	0,18 ±	0,18 ±	0,18 ±	0,16 ±	0,15 ±	0,18 ±	0,20 ±	0,13 ±	0,16 ±	0,16 ±	0,15 ±	0,15 ±	0,18 ±	0,39 ±	0,11 ±	0,15 ±	0,16 ±	0,12 ±	0,30 ±	0,16 ±	0,15 ±	0,32 ±
		d	0	5	9	ß	1	5	1	9	6	4	5	3	0	8	5	8	6	6	0	6	4	Ð	Ð	2	4	2	4	5	4	6	9	2	ß	8	5
		° C	27 ± 0,1	27 ± 0,C	25 ± 0,0	26 ± 0,C	40 ± 0,1	23 ± 0,0	33 ± 0,1	31 ± 0,C	36 ± 0,C	30 ± 0,C	28 ± 0,C	26 ± 0,C	31 ± 0,C	34 ± 0,C	30 ± 0,C	27 ± 0,0	37 ± 0,C	24 ± 0,0	23 ± 0,0	30 ± 0,C	25 ± 0,0	21 ± 0,C	26 ± 0,C	26 ± 0,C	29 ± 0,C	25 ± 0,C	19±0,C	26 ± 0,C	28 ± 0,C	29 ± 0,0	28 ± 0,C	19 ± 0,0	28 ± 0,C	26 ± 0,C	31 ± 0,0
	ytosol	4	0	0	0	0	°'0	0	0	Ő	Ő	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0,0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0,	0	0	Ő
	0		± 0,09	± 0,05	± 0,04	± 0,02	± 0,04	± 0,04	± 0,06	± 0,04	± 0,04	± 0,10	± 0,04	± 0,06	± 0,07	± 0,02	± 0,04	± 0,04	± 0,03	± 0,04	± 0,05	± 0,05	± 0,04	± 0,03	± 0,02	± 0,04	± 0,04	± 0,04	± 0,05	± 0,06	± 0,04	± 0,03	± 0,03	± 0,01	± 0,02	± 0,04	± 0,03
		21 °C	0,26	0,25	0,23	0,23	0,26	0,30	0,33	0,30	0,27	0,31	0,26	0,28	0,37	0,32	0,29	0,24	0,29	0,26	0,28	0,30	0,30	0,30	0,31	0,25	0,26	0,26	0,17	0,33	0,29	0,27	0,31	0,19	0,30	0,25	0,28
I					säure	säure						Ę		nin				~		ц			ē	säure	re	ıre	re	at	ıre	äure		_		-oyn			e
		bolite	Alanin	Asparagin	Asparagin	Glutamins	Glutamin	Glycin	Isoleucin	Leucin	Lysin	Methionir	Ornithin	Phenylala	Prolin	Putrescin	Serin	Spermidir	Threonin	Tryptoph	Tyrosin	Valin	Apfelsäur	Bernstein	Fumarsäu	Gluconsät	Glutarsäu.	Oxaloacet	Threonsät	Zitronens.	Fruktose	Galactino	Glukose	Inositol, n	Maltose	Raffinose	Saccharos
		Meta	ninosäuren	olyamine																			ganische	uren							cker						

Tabelle 18 Relative Metabolitverteilung des Genotyps OEP16 TM KS4A bei 21 °C und nach 24 h 4 °C.(Mittelwerte ± SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile deuten eine Zu- oder Abnahme an).</td>

Pfeil	e d	leu	ter	n e	in	e Z	'u-	00	der	۰A	bn	ah	me	e a	n).																						
	4 °C p	0,15 ± 0,08 ↓*	0,19 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,10 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,53 ± 0,03 ↑***	0,16 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,07	0,13 ± 0,07	0,16 ± 0,03	0,30 ± 0,07	0,14 ± 0,03 ↓*	0,14 ± 0,04	0,20 ± 0,06	0,28 ± 0,09	0,20 ± 0,02	0,24 ± 0,15	0,28 ± 0,05	0,16 ± 0,03 ↓*	0,56 ± 0,01	0,52 ± 0,04 ↑**	0,51 ± 0,02 ↑**	0,35 ± 0,09	0,30 ± 0,10	0,16 ± 0,08	0,07 ± 0,03	0,57 ± 0,04 ↑**	0,53 ± 0,01 ↑***	0,15 ± 0,01 \ **	0,52 ± 0,02 ↑***	0,04 ± 0,01 ↓ *	0,23 ± 0,08	0,14 ± 0,02 ↓**	0,07 ± 0,01 ↓*	0,27 ± 0,13
Inv	21 °C	0,34 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,20 ± 0,06	0,18 ± 0,05	0,20 ± 0,07	0,30 ± 0,01	0,25 ± 0,07	0,22 ± 0,07	0,21 ± 0,08	0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,20 ± 0,06	0,29 ± 0,06	0,23 ± 0,08	0,24 ± 0,06	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,10	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,32 ± 0,00	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,05	0,25 ± 0,03
± SD Hid	4 °C p	0,33 ± 0,10	0,28 ± 0,04	0,33 ± 0,08	0,33 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,07 ± 0,03 ↓*	0,24 ± 0,07	0,27 ± 0,06	0,32 ± 0,04	0,27 ± 0,07	0,33 ± 0,07	0,19 ± 0,10	0,26 ± 0,06	0,32 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,27 ± 0,09	0,24 ± 0,02	0,28 ± 0,11	0,22 ± 0,09	0,25 ± 0,04	0,06 ± 0,02 ↓**	0,07 ± 0,01 ↓**	0,08 ± 0,01 ↓**	0,16 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,37 ± 0,07	0,35 ± 0,12	0,04 ± 0,02 ↓**	0,06 ± 0,01 ↓**	0,32 ± 0,06	0,07 ± 0,01 ↓*	0,41 ± 0,08	0,28 ± 0,09	0,34 ± 0,05	0,32 ± 0,05	0,24 ± 0,05
teilung, Mittelwert : Plact	21 °C	0,20 ± 0,09	0,35 ± 0,05	0,28 ± 0,09	0,32 ± 0,08	0,25 ± 0,09	0,15 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,35 ± 0,08	0,18 ± 0,07	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,35 ± 0,07	0,32 ± 0,12	0,27 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,10	0,21 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	$0,27 \pm 0,10$	0,45 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,28 ± 0,02
P16 TM KS4D, relative Ver	4°C p	0,27 ± 0,09	0,33 ± 0,01 ↑**	0,36 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,23 ± 0,06	0,08 ± 0,01 ↓*	0,33 ± 0,06	0,33 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,34 ± 0,07	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,06 ↓ *	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,06	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,07	0,29 ± 0,05	0,22 ± 0,08	0,18 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,08 ± 0,01 ↓**	0,09 ± 0,02 ↓*	0,10 ± 0,02 ↓*	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,26 ± 0,02	0,40 ± 0,04	0,07 ± 0,00 ↓ **	0,09 ± 0,02 ↓*	0,28 ± 0,01	0,09 ± 0,01 ↓**	0,42 ± 0,02	0,21 ± 0,09	0,32 ± 0,02 ↑*	0,40 ± 0,06	0,17 ± 0,04
Mitocho	21 °C	0,20 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,29 ± 0,09	0,31 ± 0,11	0,29 ± 0,07	0,28 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,37 ± 0,07	0,28 ± 0,06	0,28 ± 0,06	0,20 ± 0,06	0,17 ± 0,04	0,30 ± 0,10	0,15 ± 0,04	0,21 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,20 ± 0,12	0,28 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,17 ± 0,02	0,32 ± 0,07	0,18 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,15 ± 0,03
	4°C p	0,25 ± 0,10	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,06	0,18 ± 0,07	0,38 ± 0,05 ↑*	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,26 ± 0,06	0,29 ± 0,06	0,33 ± 0,09	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,08	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,10	0,28 ± 0,06	0,26 ± 0,07	0,33 ± 0,12	0,29 ± 0,04	0,31 ± 0,02 ↓*	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,02 ↓*	0,35 ± 0,05	0,33 ± 0,10	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,11	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,25 ± 0,06	0,32 ± 0,02 ↓*	0,13 ± 0,05	0,27 ± 0,11	0,20 ± 0,02 ↓*	0,21 ± 0,08	0,31 ± 0,06
Cto	21 °C	0,27 ± 0,09	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,07	0,15 ± 0,05	0,17 ± 0,06	0,36 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,24 ± 0,07	0,32 ± 0,03	0,15 ± 0,05	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,04	$0,24 \pm 0,10$	0,28 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,08	0,24 ± 0,05	0,36 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,33 ± 0,03	$0,29 \pm 0,10$	0,12 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,32 ± 0,03
	tabolite —	Alanin	Asparagin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	Glutamin	Glycin	Isoleucin	Leucin	Lysin	Methionin	Ornithin	Phenylalanin	Prolin	Putrescin	Serin	Spermidin	Threonin	Tryptophan	Tyrosin	Valin	Apfelsäure	Bernsteinsäure	Fumarsäure	Gluconsäure	Glutarsäure	Oxaloacetat	Threonsäure	Zitronensäure	Fruktose	Galactinol	Glukose	Inositol, myo-	Maltose	Raffinose	Saccharose	Trehalose
	Me	Aminosäuren	& Polyamine																			Organische	Säuren							Zucker							

Tabelle 19 Relative Metabolitverteilung des Genotyps OEP16 TM KS4D bei 21 °C und nach 24 h 4 °C. (Mittelwerte ± SD, ANOVA und Tukey, Sterne geben das Signifikanzniveau an *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Pfeile deuten eine Zu- oder Abnahme an).

	I						τw	, Absolutmen	gen (nmol/g	gTG), Mittelw	ert±sD						
	I		Cytoso				Mitochond	'ium			Plastid				Vakuole		
Σ	1etabolite	21 °C		4 °C		21 °C		4 °C		21 °C		4 ° C		21 °C		4 °C	
Aminosäuren	& Alanin	616,8 ±	323,8	1518,6 ±	150,4	541,2 ±	172,9	1156,9 ±	231,5	368,5 ±	197,5	1730,9 ±	603,3	116,5 ±	30,8	1866,1 ±	377,2
Polyamine	Asparagin	714,2 ±	191,8	827,7 ±	155,1	813,0±	211,4	645,4 ±	190,3	489,5 ±	197,1	855,6 ±	71,6	178,8 ±	137,9	830,0 ±	27,6
	Asparaginsäure	1648,4 ±	792,5	1142,7 ±	93,0	1733,9 ±	531,4	1095,3 ±	289,4	808,1 ±	377,9	1247,0 ±	296,4	276,8 ±	127,5	1167,9 ±	22,1
	Glutaminsäure	1875,7 ±	869,5	1157,6 ±	92,2	2121,9 ±	630,3	1534,4 ±	55,6	821,0±	354,6	1507,8 ±	235,1	250,1 ±	116,5	1145,7 ±	135,3
	Glutamin	10809,1 ±	5913,2	29960,4 ±	4815,4	10586,8 ±	4907,9	16544,1 ±	974,7	5013,4 ±	2249,9	23205,8 ±	6409,9	2531,1 ±	1315,5	31123,2 ±	2318,9
	Glycin	3359,7 ±	429,9	11467,1 ±	1992,8	1813,6±	649,0	4115,4 ±	2419,7	1107,4 ±	543,4	6559,6±	1730,6	1229,3 ±	107,6	10744,8 ±	1444,2
	Isoleucin	31,2 ±	10,3	22,0 ±	5,4	21,5 ±	7,1	14,7 ±	3,2	9,0 ±	6,4	15,7 ±	7,8	7,1 ±	5,0	21,1 ±	4,5
	Leucin	38,0 ±	12,5	39,8 ±	11,3	26,6±	7,1	33,4 ±	8,8	12,7 ±	10,1	29,8 ±	15,0	8,9 ±	6,3	42,7 ±	8,8
	Lysin	31,4 ±	13,1	20,8 ±	1,3	25,1±	9'6	19,9 ±	4,1	12,2 ±	5,9	25,5 ±	6'9	4,2 ±	2,3	24,7 ±	4,0
	Methionin	14,9 ±	6,7	13,0 ±	4,0	12,2 ±	7,0	14,3 ±	0,7	8,1±	4,9	13,4 ±	7,3	3,7 ±	1,8	16,4 ±	4,1
	Ornithin	44,6 ±	3,3	52,5 ±	12,9	34,8 ±	7,2	16,4 ±	11,1	24,6±	14,3	42,2 ±	7,9	16,6 ±	4,8	44,9 ±	7,3
	Phenylalanin	57,9 ±	22,9	120,0 ±	18,4	54,5±	18,0	70,0 ±	22,2	25,2 ±	11,7	1 9,9±	44,0	8,0 ±	6,6	141,0 ±	16,5
	Prolin	705,7 ±	193,7	957,2 ±	335,1	417,0 ±	167,2	844,3 ±	295,2	135,9 ±	66,2	681,5 ±	290,7	110,8 ±	27,5	947,4 ±	177,3
	Putrescin	204,1 ±	56,9	175,6 ±	13,8	195,9 ±	32,0	160,8 ±	45,7	100,5 ±	39,6	258,7 ±	44,3	31,2 ±	17,1	201,8 ±	34,6
	Serin	409,4 ±	137,4	645,1 ±	145,7	260,8 ±	76,9	216,2 ±	172,6	260,1 ±	129,0	458,5 ±	81,4	143,3 ±	64,8	645,4 ±	59,5
	Spermidin	238,4 ±	60,7	127,3 ±	46,4	247,2 ±	39,8	53,9 ±	30,4	147,1 ±	62,5	135,3 ±	33,9	64,4 ±	24,4	110,8 ±	24,1
	Threonin	1101,7 ±	437,7	713,4 ±	88,6	833,7 ±	394,1	611,2 ±	151,4	376,4 ±	144,6	656,4 ±	288,0	191,3 ±	120,4	757,7 ±	163,5
	Tryptophan	2,7 ±	0,2	7,8 ±	1,5	2,1 ±	0,4	3,1 ±	1,3	1,5±	6'0	7,2 ±	1,1	1,0 ±	0,3	7,2 ±	6'0
	Tyrosin	8,2 ±	2,2	19,3 ±	2,7	5,2 ±	2,4	10,1 ±	3,0	4,0 ±	2,6	18,0 ±	6,0	2,4 ±	0,3	20,4 ±	2,7
	Valin	189,7 ±	47,2	220,5 ±	36,5	123,8 ±	36,8	174,7 ±	35,1	43,7 ±	27,8	174,9 ±	72,5	39,5 ±	14,7	250,0 ±	35,6
Organische	Apfelsäure	1568,6 ±	244,4	1938,5 ±	303,5	809,4 ±	326,7	726,2 ±	442,2	603,3 ±	307,8	994,3 ±	301,2	573,5 ±	60,3	1899,4 ±	138,3
Säuren	Bernsteinsäure	485,0 ±	68,5	293,3 ±	50,9	289,4 ±	94,7	110,1 ±	63,8	182,9 ±	101,5	166,9 ±	47,7	161,1 ±	52,6	271,8 ±	32,5
	Fumarsäure	2525,0 ±	209,6	2628,0 ±	2628,0	1511,0±	463,5	959,3 ±	509,6	1140,5 ±	507,1	1708,7 ±	286,1	1018,3 ±	160,2	2372,9 ±	246,5
	Gluconsäure	13,8 ±	1,6	15,8 ±	3,8	9,9±	2,5	4,4 ±	3,3	8,1±	5,0	12,8 ±	1,7	5,6 ±	1,6	13,2 ±	2,0
	Glutarsäure	12,7 ±	1,0	8,1 ±	2,1	9,5±	2,2	2,6 ±	1,6	7,0 ±	4,1	6,6 ±	0,8	4,8 ±	1,2	6,9 ±	1,0
	Oxaloacetat	787,2 ±	109,6	986,9 ±	265,6	601,1 ±	58,1	468,1 ±	176,1	330,9 ±	160,0	716,4 ±	9,3	101,6 ±	57,1	794,6 ±	101,8
	Threonsäure	71,8 ±	15,8	47,6 ±	7,1	101,9 ±	20,8	61,3 ±	13,8	40,9 ±	9,5	85,2 ±	18,4	8,9 ±	12,7	37,7 ±	10,5
	Zitronensäure	339,4 ±	339,4	510,9 ±	86,8	184,4 ±	63,6	191,4 ±	104,9	137,1 ±	61,2	247,1 ±	95,4	122,7 ±	18,0	503,5 ±	49,2
Zucker	Fruktose	261,3 ±	20,2	3145,5 ±	504,7	169,4 ±	63,0	1187,4 ±	708,5	125,2 ±	74,9	1702,5 ±	446,2	119,8 ±	9,2	3037,9 ±	188,7
	Galactinol	5,2 ±	0,3	14,8 ±	3,3	4,1 ±	0,5	10,7 ±	3,6	2,6±	1,3	14,0 ±	5,4	1,2 ±	0,6	17,3 ±	3,5
	Glukose	480,7 ±	77,1	7495,4 ±	1211,9	239,6±	115,4	2821,1 ±	1694,2	199,4 ±	116,4	3978,4 ±	1160,2	193,7 ±	19,3	7142,0 ±	663,8
	Inositol, myo-	278,4 ±	61,7	222,5 ±	45,8	414,8±	54,0	278,7 ±	58,1	157,5 ±	66'69	373,3 ±	48,1	31,7 ±	44,9	187,8 ±	44,4
	Maltose	28,7 ±	1,2	33,6 ±	3,2	18,1 ±	4,9	19,1 ±	6,8	13,8 ±	5,0	33,4 ±	5,8	11,7 ±	1,3	38,5 ±	3,2
	Raffinose	4,6 ±	0,3	11,7 ±	2,3	3,9 ±	0,8	14,7 ±	2,0	2,6±	1,5	20,7 ±	3,3	1,7 ±	0,4	13,4 ±	1,2
	Saccharose	14117,2 ±	4945,2	23611,5 ±	1111,7	13581,1 ±	4161,4	31864,0 ±	6421,1	4724,7 ±	1754,0	32790,6 ±	5447,5	1782,0 ±	1035,2	24104,6 ±	1762,6

Tabelle 20 Absolutmengen der Metabolite des Genotyps WT bei 21 °C und nach 24 h 4 °C in nmol/g Trockengewicht. (Mittelwerte ± SD).

							0EP1	6 TM, Absolut	nengen (nn	nol/gTG), Mit	elwert ± si	0					
			Cytosc	_			Mitochond	rium			Plastic	T			Vakuol	e	
Σ	letabolite	21 °C		4 °C		21 °C		4 °C		21 °C		4 °C		21 °C		4 °C	
Aminosäuren a	& Alanin	600,2 ±	137,4	1429,2 ±	307,3	281,9 ±	48,3	1069,5 ±	475,9	312,5 ±	45,1	1041,4 ±	475,8	250,7 ±	123,5	1523,3 ±	650,0
Polyamine	Asparagin	636,2 ±	54,8	641,0 ±	159,9	589,4 ±	137,8	510,0 ±	160,4	857,8 ±	130,1	800,0 ±	321,1	318,5 ±	206,8	680,0 ±	326,0
	Asparaginsäure	1029,4 ±	213,8	1524,5 ±	348,5	1157,1 ±	309,1	1159,4 ±	394,4	988,9 ±	149,7	1536,6±	798,6	354,7 ±	208,3	1641,1 ±	844,8
	Glutaminsäure	1258,2 ±	369,3	1105,1 ±	276,3	1424,0 ±	468,5	1196,3 ±	177,2	1281,4 ±	167,4	1703,3 ±	755,5	430,4 ±	320,0	1223,8 ±	655,1
	Glutamin	10343,5 ±	2168,9	26922,8 ±	5403,9	8027,6 ±	1485,8	18467,2 ±	7098,7	5958,3 ±	535,9	21513,4 ±	12910,3	4648,5 ±	3292,3	28693,9 ±	13949,7
	Glycin	2340,6 ±	308,0	11169,0 ±	252,1	1184,0 ±	296,1	3416,7 ±	823,1	1201,5 ±	355,4	4107,5 ±	81,3	1318,3 ±	640,3	10862,8 ±	747,9
	Isoleucin	24,8±	6,5	20,6 ±	4,6	17,9 ±	6,5	15,6 ±	3,7	14,9 ±	0,8	19,2 ±	11,7	13,4 ±	6,9	22,4 ±	10,7
	Leucin	28,4 ±	7,6	44,8 ±	8,9	22,4 ±	6'9	34,9 ±	8,9	17,9 ±	1,3	38,6±	22,0	15,4 ±	6,6	46,4 ±	22,2
	Lysin	27,0±	10,8	22,4 ±	5,8	23,5 ±	8,0	15,6 ±	3,1	19,8 ±	1,1	25,6±	14,9	10,7 ±	5,4	24,8 ±	12,1
	Methionin	12,3 ±	3,0	20,4 ±	3,2	8,5 ±	4,5	10,6 ±	2,8	8,1 ±	1,2	12,3 ±	7,0	6,5 ±	5,2	21,7 ±	7,1
	Ornithin	29,3 ±	2,6	47,4 ±	3,0	15,5 ±	7,7	18,8 ±	5,6	36,9 ±	3,5	35,7 ±	5,1	18,1 ±	8,3	53,8 ±	11,6
	Phenylalanin	49,4 ±	18,5	101,6 ±	27,2	36,6 ±	8,1	78,6 ±	27,0	32,9 ±	6,3	110,5 ±	62,5	18,1 ±	7,6	109,2 ±	61,7
	Prolin	646,1 ±	191,7	1028,2 ±	165,5	444,7 ±	149,6	885,6±	256,7	309,0 ±	23,3	647,9 ±	403,7	277,8 ±	160,7	1124,2 ±	481,1
	Putrescin	149,9 ±	47,7	170,7 ±	48,1	106,2 ±	15,5	143,9 ±	34,2	128,7 ±	36,8	203,4 ±	113,9	58,9 ±	33,5	188,6 ±	100,5
	Serin	200,3 ±	49,8	284,1 ±	13,4	70,0 ±	25,6	155,7 ±	40,8	221,6±	38,0	230,8 ±	11,9	130,6 ±	49,6	288,0 ±	19,7
	Spermidin	198,4 ±	39,0	117,6 ±	2,6	153,2 ±	22,1	53,3 ±	16,7	292,3 ±	13,0	105,3 ±	23,1	108,3 ±	27,3	134,4 ±	36,6
	Threonin	838,0±	264,2	689,7 ±	140,6	682,0 ±	234,0	521,3±	154,1	490,6 ±	67,0	595,2 ±	355,4	409,1 ±	134,8	739,5 ±	359,1
	Tryptophan	± 0,9 ±	0,1	24,8 ±	1,6	0,5 ±	0,2	9,9 ±	3,0	1,2 ±	0,1	18,7 ±	2,7	0,6 ±	0,3	28,2 ±	6,1
	Tyrosin	6,5±	0,3	25,0 ±	1,0	3,6 ±	0,5	10,1 ±	1,7	5,3 ±	1,3	16,6 ±	3,7	2,9 ±	2,0	27,5 ±	5,3
	Valin	139,9 ±	37,4	210,0 ±	55,5	104,5 ±	37,2	167,3 ±	60,4	77,0 ±	1,7	223,9 ±	115,7	80,1 ±	41,3	234,2 ±	119,9
Organische	Apfelsäure	1331,5 ±	125,9	2416,5 ±	96,8	682,6 ±	167,7	736,9 ±	37,1	711,4 ±	224,8	943,6 ±	75,5	749,5 ±	330,9	2440,0 ±	63,2
Säuren	Bernsteinsäure	306,0 ±	27,7	258,4 ±	8,0	189,2 ±	61,6	100,5 ±	22,7	193,3 ±	47,6	152,1 ±	24,0	162,3 ±	88,9	282,1 ±	46,3
	Fumarsäure	1708,6±	202,7	3737,9 ±	219,1	956,3 ±	258,0	1335,6 ±	129,4	1294,9 ±	265,4	1854,5 ±	236,8	1015,1 ±	388,2	3312,8 ±	82,0
	Gluconsäure	11,2 ±	1,4	16,7 ±	1,2	6,7 ±	1,7	6,5 ±	2,0	13,6 ±	2,2	12,4 ±	1,7	6,6 ±	2,7	18,9 ±	4,0
	Glutarsäure	3,2 ±	0,4	8,5 ±	0,7	1,9 ±	0,6	3,3 ±	1,0	4,1 ±	0,5	6,2 ±	6'0	2,0 ±	0,8	9,7 ±	2,0
	Oxaloacetat	597,6 ±	103,3	726,6 ±	122,1	380,7 ±	110,1	376,9 ±	133,0	511,3±	220,8	745,0 ±	140,7	315,4 ±	229,8	718,6 ±	145,3
	Threonsäure	76,0 ±	33,7	37,6 ±	10,1	97,4 ±	37,6	38,8 ±	8,2	119,0 ±	35,9	65,5 ±	22,1	22,2 ±	10,8	40,7 ±	20,2
	Zitronensäure	254,6 ±	20,4	1075,5 ±	59,1	125,7 ±	28,5	307,3 ±	67,2	132,1 ±	54,2	413,5 ±	46,5	148,4 ±	66,4	1061,6±	37,3
Zucker	Fruktose	206,8 ±	15,7	3195,4 ±	168,6	109,9 ±	25,0	923,1 ±	24,7	154,3 ±	29,5	1173,0 ±	298,7	123,3 ±	43,2	3584,7 ±	464,2
	Galactinol	4,6±	0,6	22,0 ±	3,9	4,2 ±	0,4	15,1 ±	3,8	5,1±	0,4	19,0 ±	11,0	2,8 ±	1,2	25,0 ±	10,8
	Glukose	471,7 ±	49,5	7119,3 ±	424,6	195,4 ±	53,3	2006,5 ±	59,4	195,4 ±	83,9	2516,3 ±	627,9	251,5 ±	119,8	8100,1 ±	908,9
	Inositol, myo-	210,4 ±	54,5	203,4 ±	37,3	229,9 ±	43,9	244,6 ±	23,6	372,8 ±	70,1	391,8 ±	115,9	53,9 ±	39,6	219,8 ±	99,5
	Maltose	26,7 ±	1,5	37,3 ±	4,6	14,5 ±	3,2	21,6±	6,7	17,8 ±	4,2	33,7 ±	10,4	15,6 ±	7,2	40,8 ±	12,5
	Raffinose	6,3 ±	0,9	17,1 ±	4,8	5,5 ±	0,1	14,1 ±	5,9	7,7 ±	0,9	15,5 ±	8,4	3,9 ±	1,7	19,9 ±	9,2
	Saccharose	9895,3 ±	2421,6	24631,1 ±	3081,5	10182,1 ±	1687,6	32941,6 ±	6062,9	± 0,790	2175,3	26191,9 ±	4667,2	3835,6 ±	3056,7	18411,6 ±	3651,3

Tabelle 21 Absolutmengen der Metabolite des Genotyps OEP16 TM bei 21 °C und nach 24 h 4 °C in nmol/gTrockengewicht. (Mittelwerte ± SD).

			315,1	275,3	78,3	147,2	7887,0	3237,2	5,7	9,2	4,3	6,7	3,3	80,0	169,0	49,2	4,5	103,6	206,4	1,6	11,3	42,5	660,3	92,3	1180,7	8,8	3,0	41,9	6,2	315,2	1429,0	5,6	2704,4	52,1	28,4	1,4	
	le	4 °C	1176,1 ±	697,7 ±	1163,3 ±	846,6 ±	31673,2 ±	14274,9 ±	21,3 ±	42,3 ±	17,1 ±	13,3 ±	28,5 ±	157,2 ±	781,1 ±	162,8 ±	428,4 ±	174,1 ±	670,5 ±	11,9 ±	24,4 ±	240,9 ±	2687,4 ±	330,0 ±	3702,5 ±	24,5 ±	9,1 ±	755,9 ±	39,4 ±	985,7 ±	4972,6 ±	18,3 ±	10149,4 ±	141,6 ±	46,3 ±	10,2 ±	
	Vakuo		166,1	182,1	212,1	293,5	2187,9	378,8	5,4	6'9	5,0	4,4	4,4	13,1	106,2	12,4	11,9	32,0	140,0	0,1	1,6	40,1	182,9	39,4	212,6	1,8	0,7	106,6	1,1	29,4	17,9	0,7	52,6	75,9	2,9	0,8	
		21 °C	247,3 ±	319,5 ±	246,3 ±	339,9 ±	2363,4 ±	1192,7 ±	10,9 ±	13,8 ±	7,4 ±	5,4 ±	24,5 ±	15,4 ±	307,8 ±	39,2 ±	101,2 ±	162,1 ±	300,6 ±	0,5 ±	2,8 ±	74,8 ±	580,1 ±	170,5 ±	947,2 ±	7,3 ±	3,0 ±	288,3 ±	11,6 ±	81,0 ±	105,4 ±	2,8 ±	181,6 ±	85,0 ±	17,0 ±	3,9 ±	
			537,5	187,8	272,7	211,1	7788,8	1709,9	3,8	12,2	4,9	5,8	3,3	58,6	111,7	82,1	16,4	73,2	262,9	2,2	11,0	67,9	424,1	49,8	718,0	4,8	1,4	31,9	12,2	195,5	791,6	10,5	1634,0	104,2	22,0	3,9	
D		4 °C	1627,0 ±	963,1 ±	1897,1 ±	2242,9 ±	19702,4 ±	5430,1 ±	20,0 ±	48,6 ±	36,7 ±	17,3 ±	21,2 ±	109,8 ±	1153,3 ±	200,5 ±	290,6 ±	183,1 ±	654,5 ±	9,8 ±	19,7 ±	252,9 ±	1048,1 ±	131,5 ±	1704,9 ±	12,4 ±	4,9 ±	878,5 ±	80,7 ±	344,7 ±	1551,8 ±	24,3 ±	3581,9 ±	458,4 ±	48,2 ±	36,3 ±	
ttelwert ±9	Plastic		264,3	204,3	447,0	694,0	3577,3	726,5	7,3	8,6	9,3	4,9	7,3	22,5	187,2	37,6	50,2	34,1	402,4	0,2	2,3	41,5	252,9	78,0	469,3	2,5	1,0	31,1	13,0	47,0	55,0	1,0	54,7	98,3	10,0	1,8	
mol/gTG), Mi		21 °C	746,0 ±	880,6±	987,6 ±	1478,9 ±	8071,5 ±	1634,0 ±	19,5 ±	22,9 ±	22,2 ±	10,9 ±	51,7 ±	51,4 ±	400,8 ±	103,9 ±	271,2 ±	365,4 ±	732,7 ±	$1,1 \pm$	5,9 ±	118,2 ±	667,1 ±	236,6 ±	1252,7 ±	14,4 ±	6,1 ±	797,1 ±	88,7 ±	107,0 ±	170,9 ±	4,7 ±	180,9 ±	438,8 ±	22,0 ±	7,6 ±	
utmengen (r			348,7	152,9	394,9	69,4	12665,1	1197,7	7,8	13,7	3,9	5,2	5,2	41,4	336,9	53,0	72,0	50,0	219,2	1,7	3,2	64,5	299,0	48,7	592,1	4,2	1,6	67,8	27,2	147,8	783,2	7,5	1199,4	78,6	14,1	5,0	
M KWT, Absol	rium	4 °C	1420,6 ±	744,2 ±	1781,6±	2016,4 ±	21229,1 ±	5857,3 ±	19,9 ±	48,0 ±	26,8 ±	15,4 ±	15,0 ±	91,0±	1093,2 ±	166,1 ±	202,8 ±	132,2 ±	643,5 ±	6,6 ±	16,7 ±	225,2 ±	1007,7 ±	123,6 ±	1380,5 ±	9,3 ±	3,5 ±	597,9 ±	82,9 ±	325,4 ±	1751,8 ±	25,3 ±	3714,6 ±	427,7 ±	30,7 ±	26,7 ±	
OEP16T	Mitochonc		99,5	64,3	192,3	234,7	2394,8	343,6	4,1	4,2	5,2	2,4	5,6	7,9	82,8	24,5	77,0	46,3	112,5	0,1	1,0	11,0	128,7	35,4	164,9	1,2	0,7	148,0	25,5	15,4	21,9	0,3	50,6	62,3	3,3	0,8	
		21 °C	604,8 ±	481,8 ±	1115,3 ±	1510,8 ±	8270,6 ±	1421,6 ±	18,2 ±	21,0 ±	21,0 ±	13,1 ±	23,8 ±	42,9 ±	387,5 ±	132,1 ±	208,0 ±	172,7 ±	703,6 ±	0,5 ±	4,7 ±	93,8 ±	642,5 ±	209,0 ±	988,0 ±	7,2 ±	2,8 ±	388,8 ±	81,0 ±	87,4 ±	123,4 ±	2,8 ±	238,4 ±	275,6 ±	18,5 ±	3,6 ±	
			476,8	63,5	303,5	92,3	9847,0	587,8	4,0	12,5	5,7	4,7	6,5	19,5	139,6	81,0	58,4	20,8	205,0	3,2	3,0	86,9	148,7	24,1	337,3	3,2	1,2	71,2	22,4	58,8	270,2	12,4	433,5	42,0	8,6	1,5	
	_	4 °C	1260,7 ±	£ 9,66	1626,5 ±	1284,6 ±	32550,2 ±	12071,5 ±	24,8 ±	53,9 ±	27,5 ±	19,9 ±	34,8 ±	130,3 ±	1068,9 ±	218,0 ±	456,8 ±	137,6 ±	790,1 ±	13,8 ±	20,1 ±	306,0 ±	2248,7 ±	277,3 ±	3094,3 ±	20,6 ±	7,7 ±	815,0 ±	59,5±	851,6±	4045,0 ±	26,7 ±	8512,7 ±	213,8 ±	35,1 ±	15,8 ±	
	Cytoso		312,6	144,6	193,5	405,7	485,7	361,0	6,7	9,8	7,8	3,7	6,3	18,0	126,5	49,1	58,4	84,1	235,3	0,1	1,1	43,7	92,9	42,6	233,7	2,9	1,0	213,8	26,0	30,7	36,4	1,2	26,9	64,4	5,0	1,4	
		21 °C	784,9 ±	733,2 ±	943,8 ±	1298,3 ±	8071,5 ±	2023,1 ±	30,0 ±	33,7 ±	27,4 ±	16,8 ±	38,1 ±	56,0 ±	692,4 ±	156,6 ±	216,0 ±	250,8 ±	807,4 ±	0,8 ±	7,9 ±	174,5 ±	975,2 ±	290,2 ±	1450,2 ±	12,2 ±	4,9 ±	548,8 ±	57,2 ±	144,4 ±	172,4 ±	4,6 ±	324,4 ±	276,6 ±	27,8 ±	7,2 ±	
		lite	Alanin	Asparagin	Asparaginsät	Glutaminsäu	Glutamin	Glycin	Isoleucin	Leucin	Lysin	Methionin	Ornithin	Phenylalanir	Prolin	Putrescin	Serin	Spermidin	Threonin	Tryptophan	Tyrosin	Valin	Apfelsäure	Bernsteinsät	Fumarsäure	Gluconsäure	Glutarsäure	Oxaloacetat	Threonsäure	Zitronensäur	Fruktose	Galactinol	Glukose	Inositol, myc	Maltose	Raffinose	
		Metabo	Aminosäuren &	Polyamine																			Organische	Säuren							Zucker						

Tabelle 22 Absolutmengen der Metabolite des Genotyps OEP16 TM KWT bei 21 °C und nach 24 h 4 °C innmol/g Trockengewicht. (Mittelwerte ± SD).

		0000	_							10010	-			14-14-14		
		LYT0SC	_			IVIITOCNONG	unu			Plasti	0			Vakuo	e	
	21 °C		4 °C		21 °C		4 °C		21 °C		4 °C		21 °C		4 °C	
	485,7 ±	170,9	1379,5 ±	494,8	433,6 ±	92,2	1290,4 ±	265,5	556,1 ±	220,5	1494,4 ±	595,8	359,5 ±	121,6	863,9 ±	282,2
	534,0 ±	123,5	709,3 ±	140,5	437,6 ±	58,7	578,1 ±	83,2	541,3 ±	207,2	680,2 ±	215,9	495,7 ±	132,2	602,9 ±	174,0
_	715,4 ±	112,6	1403,1 ±	174,5	989,6 ±	217,9	1254,5 ±	295,7	731,5 ±	177,6	2165,7 ±	563,9	643,1 ±	278,7	763,4 ±	106,2
п	854,7 ±	85,5	1336,9 ±	164,7	1238,7 ±	124,0	1276,1 ±	346,0	910,4 ±	235,4	1900,0 ±	417,4	712,2 ±	249,7	639,7 ±	64,7
	6602,2 ±	1073,0	46752,0 ±	13136,2	6430,2 ±	2135,3	25732,0 ±	1200,4	5820,1 ±	1398,4	22254,5 ±	14233,9	6341,5 ±	2150,8	21532,8 ±	4161,8
	3053,5 ±	386,6	8380,4 ±	1749,4	1353,9 ±	41,5	4920,5 ±	448,7	1627,4 ±	451,3	3656,9 ±	1551,2	4041,6 ±	231,8	19771,3 ±	1812,4
	24,4 ±	4,3	26,7 ±	8,6	14,4 ±	5,7	18,2 ±	4,4	11,9 ±	5,9	21,3 ±	14,6	24,4 ±	6,9	13,5 ±	4,7
	26,4 ±	3,4	52,7 ±	10,5	17,8±	6,1	35,3 ±	12,3	16,2 ±	4,3	42,8 ±	29,4	27,2 ±	6,6	38,5 ±	22,1
	18,7 ±	3,0	19,5 ±	5,0	13,6 ±	4,3	10,9 ±	1,6	18,6 ±	6,7	12,1 ±	10,4	17,9 ±	5,3	12,3 ±	6,0
	3,2 ±	1,1	20,1 ±	2,5	2,7 ±	1,1	18,3 ±	1,8	1,7 ±	0,9	17,4 ±	5,4	2,7 ±	1,1	11,6 ±	3,3
	17,5 ±	2,7	27,9 ±	5,5	9,8 ±	1,8	17,3 ±	7,1	18,3 ±	4,8	27,8 ±	5,9	21,7 ±	2,1	27,6±	12,1
ir	47,1 ±	9,3	104,6 ±	11,7	36,5 ±	4,6	72,2 ±	11,8	41,6 ±	22,8	75,3 ±	52,1	41,7 ±	17,2	151,3 ±	56,3
	545,0 ±	106,4	1194,3 ±	340,3	279,4 ±	90,5	876,9 ±	308,9	210,3 ±	104,4	962,7 ±	645,2	455,9 ±	81,5	851,8 ±	428,5
	150,5 ±	7,6	240,9 ±	57,9	87,1±	13,6	157,2 ±	27,4	107,5 ±	10,1	182,0 ±	120,6	131,6 ±	23,4	120,1 ±	42,7
	159,4 ±	24,3	232,1 ±	36,8	97,1 ±	6'6	127,0 ±	32,3	135,3 ±	29,3	229,3 ±	20,5	159,4 ±	22,2	195,9 ±	84,4
	208,4 ±	31,7	120,8 ±	34,8	159,7 ±	42,0	115,2 ±	47,4	274,4 ±	51,1	104,2 ±	33,8	241,6 ±	28,4	113,5 ±	45,4
	697,5 ±	60,0	927,6±	224,8	382,3 ±	118,6	510,8 ±	45,6	515,5 ±	150,1	574,7 ±	429,0	781,2 ±	190,4	525,9 ±	161,4
_	0,6 ±	0,1	10,4 ±	3,8	0,3±	0,1	9,7 ±	4,8	0,6 ±	0,2	12,1 ±	3,8	0,7 ±	0,1	$11,1 \pm$	4,4
	5,4 ±	1,0	16,0 ±	6,4	3,6±	0,3	11,3 ±	0,9	4,7 ±	1,7	9,3 ±	3,0	5,6 ±	0,9	33,2 ±	2,8
	135,1 ±	22,6	287,7 ±	87,8	91,6 ±	16,7	214,3 ±	21,1	89,4 ±	34,2	239,1 ±	162,1	137,7 ±	29,0	224,6 ±	104,6
	1013,9 ±	130,8	1460,9 ±	205,0	453,9 ±	10,7	664,4 ±	87,3	523,2 ±	149,5	423,0 ±	113,2	1398,9 ±	32,9	3288,0 ±	295,3
äı	371,9 ±	42,7	154,5 ±	34,8	197,7 ±	20,2	106,1 ±	16,1	182,9 ±	32,3	87,4 ±	24,6	476,2 ±	0,4	385,4 ±	24,9
0	2061,2 ±	145,5	2329,4 ±	460,3	1037,5 ±	128,4	1118,2 ±	199,0	1372,2 ±	218,1	930,5 ±	271,3	2209,0 ±	108,3	4609,1 ±	661,0
e,	7,6 ±	1,1	12,7 ±	0,8	4,6±	6'0	7,6 ±	1,4	8,2 ±	2,2	7,7 ±	2,0	9,5 ±	0,9	21,3 ±	3,4
a 1	2,7 ±	0,4	4,9 ±	0,6	1,5 ±	0,3	2,6 ±	1,0	2,8 ±	0,7	3,5 ±	1,3	3,2 ±	0,2	6,2 ±	2,1
at	432,6 ±	67,0	628,6±	177,0	310,7 ±	41,9	707,8 ±	124,8	452,0 ±	109,4	815,7 ±	145,1	490,4 ±	17,4	405,4 ±	135,8
é	81,8±	22,6	49,9 ±	9,5	189,0±	29,5	68,7 ±	11,3	148,8 ±	6,0	$118,1 \pm$	26,0	€0,9 ±	16,2	24,0 ±	6'9
ıı	141,9 ±	25,8	532,1 ±	97,8	46,8 ±	7,5	224,7 ±	27,5	64,8 ±	25,6	150,5 ±	31,6	180,4 ±	8,8	1143,9 ±	128,3
	347,4 ±	43,7	2656,5 ±	379,5	177,7 ±	24,3	1063,6 ±	185,9	241,2 ±	25,1	824,9 ±	354,7	426,3 ±	42,9	4982,0 ±	842,6
	3,0 ±	0,4	20,2 ±	6,4	1,8±	0,2	16,1 ±	2,0	3,1 ±	0,7	22,5 ±	13,2	3,1 ±	0,4	11,6 ±	4,9
	712,7 ±	76,6	6072,8 ±	1336,6	288,1±	61,5	2431,9 ±	614,8	350,7 ±	79,5	1564,5 ±	297,3	962,8 ±	58,1	11794,3 ±	2115,0
ž	164,7 ±	6'9	203,7 ±	21,8	262,5 ±	65,4	277,1 ±	100,8	328,6 ±	59,3	471,3 ±	86,8	111,4 ±	10,0	108,9 ±	18,9
	22,4 ±	1,3	39,0 ±	4,8	12,1 ±	2,6	24,0 ±	1,9	16,5 ±	6,3	30,7 ±	20,9	24,1 ±	5,2	44,8 ±	19,5
	4,1 ±	0,6	16,4 ±	5,1	2,4 ±	0,4	14,8 ±	3,0	4,8 ±	1,2	21,9 ±	8,5	5,3 ±	0,6	9,0±	3,4
	13771,5 ±	1655,7	35085,2 ±	5724,6	16052,2 ±	1821,0	27070,9 ±	3552,1	11186,0 ±	1114,2	36344,3 ±	11178,2	8906,8 ±	1840,9	13686,6±	4895,0

Tabelle 23 Absolutmengen der Metabolite des Genotyps OEP16 TM KS4A bei 21 °C und nach 24 h 4 °C innmol/g Trockengewicht. (Mittelwerte ± SD).
lite 21°C 4°C 21°C																	
:	lite	21 °C		4 °C		21 °C		4 °C		21 °C		4 °C		21 °C		4 °C	
nosäuren &	Alanin	447,8 ±	158,8	1123,5 ±	459,8	329,5 ±	70,2	1211,0 ±	388,5	335,2 ±	142,5	1492,8 ±	427,9	561,7 ±	55,5	653,3 ±	352,(
amine ,	Asparagin	367,1 ±	64,0	685,5 ±	52,2	377,6 ±	31,2	921,6 ±	116,3	582,1 ±	87,5	853,1 ±	113,1	392,8 ±	43,9	706,3 ±	253,
	Asparaginsäı	653,7 ±	281,9	833,8 ±	271,7	1508,0 ±	137,7	1534,6 ±	182,4	1144,8 ±	366,7	1427,0 ±	322,9	811,3 ±	250,1	493,9 ±	196,8
	Glutaminsäu	588,7 ±	189,5	745,9 ±	287,1	1316,9 ±	148,4	1523,3 ±	210,2	1220,3 ±	306,6	1353,9 ±	290,8	681,6±	191,9	422,7 ±	173,5
-	Glutamin	3833,5 ±	1365,5	30782,4 ±	4031,5	8499,9 ±	770,4	18802,8 ±	5188,1	5742,4 ±	1972,1	13312,8 ±	2290,3	4643,8 ±	1496,9	17389,4 ±	3355,4
-	Glycin	2422,0 ±	172,1	8761,4 ±	298,0	1303,9 ±	255,9	2123,4 ±	340,5	1017,7 ±	67,4	1975,3 ±	898,0	2028,0 ±	75,8	14363,8 ±	899,1
-	Isoleucin	14,3 ±	1,6	14,2 ±	2,4	19,2 ±	5,7	16,7 ±	3,0	15,3 ±	0,7	12,3 ±	3,4	16,4 ±	4,8	8,1 ±	1,8
_	Leucin	15,3 ±	4,1	21,9 ±	2,0	22,5 ±	7,9	35,3 ±	2,1	18,2 ±	1,2	28,5 ±	6,8	16,0 ±	4,9	21,5 ±	4,2
_	Lysin	8,1±	2,7	13,6 ±	2,0	15,6 ±	3,9	17,2 ±	2,2	18,5 ±	4,1	20,5 ±	2,8	11,3 ±	4,3	11,6 ±	4,5
-	Methionin	2,7 ±	0,8	$11,1 \pm$	2,5	3,2 ±	0,5	14,0 ±	2,8	2,0 ±	0,7	11,3 ±	3,1	3,4 ±	0,6	5,5 ±	2,7
-	Ornithin	26,3 ±	2,5	25,9 ±	5,3	12,4 ±	2,9	19,2 ±	2,0	22,6 ±	1,4	29,5 ±	6,6	19,9 ±	3,0	14,2 ±	3,0
_	Phenylalanir	19,3 ±	6,8	96,2 ±	25,8	48,5 ±	8,8	53,7 ±	16,9	38,1 ±	5,7	55,8 ±	28,5	26,2 ±	8,3	86,8 ±	20,4
_	Prolin	316,9 ±	29,0	587,4 ±	85,1	380,2 ±	87,7	809,4 ±	60,3	263,3 ±	24,7	622,7 ±	148,9	393,0 ±	75,1	339,5 ±	72,3
-	Putrescin	59,7 ±	14,3	101,7 ±	37,7	109,9 ±	24,3	141,6 ±	25,7	137,1 ±	26,4	143,4 ±	24,3	90,8 ±	33,1	64,8 ±	16,:
	Serin	90,5 ±	37,7	261,9 ±	38,8	73,3 ±	21,4	178,5 ±	14,3	117,9 ±	45,6	304,3 ±	68,9	89,6 ±	23,4	190,7 ±	51,6
	Spermidin	192,9 ±	30,0	84,7 ±	29,8	118,2 ±	25,9	44,7 ±	19,5	187,9 ±	16,6	79,0 ±	26,6	198,7 ±	6,6	81,5 ±	27,:
-	Threonin	381,0 ±	86,7	489,1 ±	101,4	593,4 ±	207,1	501,6±	80,0	427,8 ±	69,7	418,7 ±	39,5	601,3 ±	199,3	344,9 ±	29,7
	Tryptophan	0,7 ±	0,1	6,7 ±	1,9	0,3 ±	0,1	5,8 ±	2,1	0,6 ±	0'0	7,4 ±	2,9	0,5 ±	0,1	6,3 ±	с, С
	Tyrosin	4,0 ±	1,1	17,0 ±	6,0	3,1 ±	1,1	9,3 ±	0,6	3,8 ±	1,4	11,3 ±	4,8	3,7 ±	0,7	14,3 ±	2,6
	Valin	93,8 ±	21,1	172,6 ±	23,6	117,3 ±	21,7	174,8 ±	17,6	81,7 ±	10,0	145,3 ±	23,2	94,0 ±	10,8	95,0 ±	16,4
anische	Apfelsäure	1306,3 ±	10,9	1542,4 ±	96,7	638,1 ±	84,8	389,4 ±	65,2	541,6 ±	71,2	294,4 ±	83,4	1146,9 ±	5,6	2795,8 ±	71,(
ren	Bernsteinsät	340,7 ±	12,2	214,8 ±	9,0	196,4 ±	31,4	62,6±	16,5	168,2 ±	17,7	50,1 ±	9'6	324,5 ±	20,5	357,3 ±	25,(
-	Fumarsäure	2189,2 ±	42,8	2476,4 ±	181,9	946,3 ±	132,2	784,8 ±	147,1	1004,1 ±	132,1	636,9 ±	79,3	1769,8 ±	194,7	4051,2 ±	184,3
	Gluconsäure	9,8 ±	1,0	14,8 ±	2,2	5,1 ±	1,1	5,9 ±	2,5	8,9 ±	0,8	7,0 ±	2,1	8,9 ±	0,4	15,0 ±	с,
	Glutarsäure	3,5 ±	0,3	5,8 ±	1,7	1,6 ±	0,3	2,6±	0,8	2,9 ±	0,2	3,8 ±	0,9	2,7 ±	0,2	5,3 ±	1,8
	Oxaloacetat	477,3 ±	167,1	371,7 ±	15,5	331,3 ±	191,1	455,3 ±	41,3	450,7 ±	169,1	632,8 ±	119,9	387,8 ±	79,3	273,0 ±	137,5
	Threonsäure	64,0 ±	13,1	33,3 ±	20,1	147,4 ±	20,8	75,2 ±	8,2	235,1 ±	20,7	66,8 ±	23,5	76,2 ±	25,7	14,1 ±	4,8
	Zitronensäur	371,0 ±	22,22	705,9 ±	82,0	167,4 ±	28,9	149,6 ±	10,5	145,9 ±	20,4	87,5 ±	40,5	317,5 ±	8,8	1255,4 ±	93,3
ker	Fruktose	379,5 ±	20,7	2208,0 ±	123,7	185,0 ±	34,2	615,2 ±	125,1	181,5 ±	25,9	450,2 ±	62,5	293,4 ±	28,2	3748,1 ±	76,5
	Galactinol	2,9 ±	0,3	12,9 ±	3,3	1,9 ±	0,6	14,8 ±	0,7	2,7 ±	0,2	16,8 ±	3,0	2,4 ±	0,2	8,0±	0
	Glukose	624,8 ±	24,2	4843,9 ±	324,1	277,2 ±	27,0	1411,1 ±	167,2	202,7 ±	25,9	1053,3 ±	166,0	542,4 ±	32,8	7920,8 ±	231,:
-	Inositol, myc	92,9 ±	22,5	100,9 ±	40,8	304,4 ±	63,4	328,1 ±	15,8	457,5 ±	27,7	321,6 ±	62,6	92,6±	28,0	29,1 ±	6,1
-	Maltose	22,3 ±	2,9	26,0 ±	10,5	12,8 ±	4,2	20,3 ±	8,3	16,5 ±	1,6	27,0 ±	8,5	19,8 ±	1,7	22,2 ±	2,5
-	Raffinose	4,8 ±	0,5	10,6 ±	0,9	2,6 ±	0,7	16,7 ±	1,1	4,2 ±	0,3	17,6 ±	2,6	3,8 ±	0,3	7,3 ±	1.
	Saccharose	6675,3 ±	999,1	16022,6±	6129,6	11831,4 ±	2490,4	30869,0 ±	4372,7	9536,9 ±	1570,2	24517,4 ±	3999,2	7859,9 ±	1851,3	5052,6 ±	1102,6

Tabelle 24 Absolutmengen der Metabolite des Genotyps OEP16 TM KS4D bei 21 °C und nach 24 h 4 °C in nmol/g Trockengewicht. (Mittelwerte ± SD).

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Nachname: Vornamen: Geburtstag: Geburtsort: Staatsangehörigkeit:	Barth Melanie Anette 29.03.1991 Schwalmstadt, Deutschland Deutsch
Aushildung:	
Ausbildung.	
11/2016 - 06/2021	Doktorandin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) Promotion Life Science im Rahmen des Programms der LSM Graduate School Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland "Die Rolle von Kanalproteinen der äußeren Chloro- plastenhüllmembran in der Kälte-Akklimatisierung"
10/2014 - 10/2016	Master of Science in Molecular and Cellular Biology Philipps-Universität, Marburg, Deutschland Masterarbeit: "Etablierung von Modellorganismen zur Erforschung der frühen Landpflanzenevolution"
10/2011 - 09/2014	Bachelor of Science in Pflanzenbiotechnologie Leibnitz-Universität, Hannover, Deutschland Bachelorarbeit: "Expression von humanem Interleukin-8 in Pflanzen"
09/2001 - 06/2010	allgemeine Hochschulreife (Abitur) Schwalm-Gymnasium, Schwalmstadt, Deutschland

Poster

Barth, M.; Bölter, B.; Soll, J. (2017) The Role of OEP16 and OEP40 in Cold Acclimation.

Molecular Biology of Plants – 18.-21.2.2019 Dabringhausen, Deutschland

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

Melanie Anette Barth

München, den 23.09.2021

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich zuvor nicht versucht habe, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Die vorliegende Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt.

Melanie Anette Barth

München, den 23.09.2021

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben. Als erstes möchte ich Prof. Dr. Jürgen Soll danken für die Aufnahme in seine Gruppe und die damit verbundene Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Betreuung anzufertigen. Vielen Dank auch für Ihre immer offenstehende Tür! Mein Dank gilt auch Dr. Bettina Bölter, welche mir mit ihrer ausgezeichneten wissenschaftlichen Expertise immer mit Rat und Tat beiseite stand.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Nägele und Dr. Lisa Fürtauer für die Einführung in die spannende Welt der nicht-wässrigen Fraktionierung und die Unterstützung in den letzten Jahren.

Für die vielen schönen Stunden im und außerhalb des Labors möchte ich mich bei meinen Kollegen, insbesondere bei Julia, Annabel, Kerstin, Petra, Melanie 2, Carina, Tamy, Ahmed, Roberto, Li, Manali, Sebnem, Renuka, Inga, Moritz, Lorenz und Laura bedanken – ohne euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht!

Der größte Dank gebührt meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mich immer in allem bedingungslos unterstützen. Für die konstante seelische und moralische Unterstützung möchte ich mich bei meinen Freundinnen Lisa, Helena, Manuela, Johanna, Anne, Elisabeth, Kathi und den Marburger Mädels bedanken, ihr seid mein Fels in der Brandung!