

Die Rolle der DGDG Synthase DGD1 bei der Galaktolipid Synthese in den Hüllmembranen von Chloroplasten

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr.rer.nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Biologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Sandra Witt

Potsdam, den 26.03.2009

Die Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam angefertigt und von Prof. Dr. Peter Dörmann betreut.

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3344/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-33447](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-33447)
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-33447>]

„Verbringe deine Zeit nicht mit der Suche nach einem Hindernis, vielleicht gibt es gar keins“
(Franz Kafka)

Inhalt

1. Einleitung	4
1.1 Pflanzenlipide	4
1.2 Fettsäurebiosynthese	8
1.3 Die Biosynthese von Glycerolipiden in Pflanzen	8
1.4 Die Biosynthese von MGDG und DGDG und deren Funktionen	10
1.5 Grundlagen des Split-Ubiquitin-Systems.....	15
1.6 Das TAPTag/StrepII Tag System als Anwendung zur Proteinaufreinigung aus Pflanzen	16
2. Zielsetzung	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Geräte, Chemikalien, Kits und Enzyme.....	20
3.2 Synthetische Oligonukleotide.....	23
3.3 Plasmide und Konstrukte	24
3.4 Bakterien- und Hefestämme	25
3.5 Pflanzenmaterial	25
3.6 Kulturmedien	25
3.7 Sequenzierungen	27
3.8 Molekularbiologische Methoden.....	27
3.8.1 Klonierungen	27
3.8.1.1 Klonierung verschiedener Konstrukte	27
3.8.2 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.8.3 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.8.4 Verdünnungsserien von <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	31
3.8.5 Expressionsstudien mit <i>Escherichia coli</i>	31
3.8.6 Northern Analysen	32
3.8.7 Western Analysen.....	33
3.8.8 Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i> Blättern (Kurzprotokoll)	33
3.8.9 Amplifizierung von Genloci und Aufreinigung des PCR Produkts.....	34
3.9 Biochemische Methoden	34
3.9.1 Tandem Affinitätsreinigung mittels TAP-Tag	34
3.9.2 Lipidanalysen.....	35
3.9.2.1 Lipidextraction	35

3.9.2.2	Dünnschichtchromatographische Auftrennung der polaren Lipide	36
3.9.2.3	Anfärben der Lipide nach Dünnschichtchromatographie	36
3.9.2.4	Gaschromatographische Analyse von Fettsäuremethylestern.....	36
3.9.2.5	Isolierung von Lipiden als Standards	37
3.9.2.6	Subzelluläre Fraktionierung von MGDG und DGDG	37
3.9.2.7	Lipidbindungstest (Lipid Binding Assay).....	38
3.9.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
3.9.4	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
4.	Ergebnisse	41
4.1	Expression des N-terminalen Bereichs von DGD1 in WT-Col2	41
4.2	Expressionsstudien in <i>E.coli</i> zur Untersuchung des Einfluss von N-DGD1 für die DGDG Synthese.....	45
4.3	Charakterisierung der transgenen Überexpressionsline N-MGD1-DGD2.....	48
4.4	Der Einfluss von N-DGD1 bei der Biosynthese von extraplastidären DGDG in <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
4.5	Bindungsstudien zur Analyse von Interaktionen polarer Lipide mit N-DGD1 und DGD1 Protein	54
4.6	Bindungsstudien zur Analyse der Interaktion verschiedener Glykosyltransferasen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
4.7	Expression des DGD1-StreptII-Tag Fusionsproteins in <i>dgd1-1</i>	62
4.8	Expression des DGD1-CTAPTag Fusionsproteins in <i>dgd1-1</i>	66
5.	Diskussion	71
5.1	Funktion des N-terminalen Bereichs von DGD1 für die Galaktolipidsynthese und Transport	71
5.2	Transitpeptide gewährleisten die korrekte Lokalisation der Glykosyltransferase in <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
5.3	Die Synthese von extraplastidären DGDG in <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
5.4	Bindungsstudien zur Interaktion des DGD1 Proteins mit polaren Lipiden.....	78
5.5	Bindungsstudien zur Interaktion verschiedener Glykosyltransferasen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
5.6	Unterschiede in der Expression von DGD1-StreptII-Tag und DGD1-CTAPTag Fusionsproteinen in <i>dgd1-1</i>	81
5.7	Ausblick.....	83
6.	Zusammenfassung	84

7. Abkürzungen	85
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	87
9. Literaturverzeichnis	89

1. Einleitung

1.1 Pflanzenlipide

Lipide sind organische, wasserunlösliche Substanzen mit unpolaren, hydrophoben Strukturen. Sie haben zwei Hauptfunktionen. Einerseits sind sie wichtige, strukturelle Komponenten von Membranen, andererseits dienen sie als Vorratsform von Energie und Kohlenstoff im Stoffwechsel. Lipide erfüllen außerdem eine Funktion als Signalmolekül, als Phytohormon oder sind in Form von Pigmenten (z.B. Chlorophyll) an der Umsetzung von Lichtenergie in chemische Energie beteiligt. Beim Schutz vor überschüssiger Lichtenergie spielen Lipide (z.B. Carotinoide) ebenfalls eine wichtige Rolle.

Es gibt verschiedene Klassen von Lipiden. Beispielsweise gehört das Galaktolipid Digalaktosyldiacylglycerin (1,2-Di-O-acyl-3-O-[α -D-Galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galaktopyranosyl]-sn-Glycerin; DGDG) zu der Gruppe der pflanzlichen Membranlipide. Zusammen mit Monogalaktosyldiacylglycerin (1,2-Di-O-acyl-3-D[[β -D-Galaktopyranosyl]-sn-Glycerin; MGDG) ist es eines der am weitesten verbreiteten Lipide der Pflanzen (Abb.1).

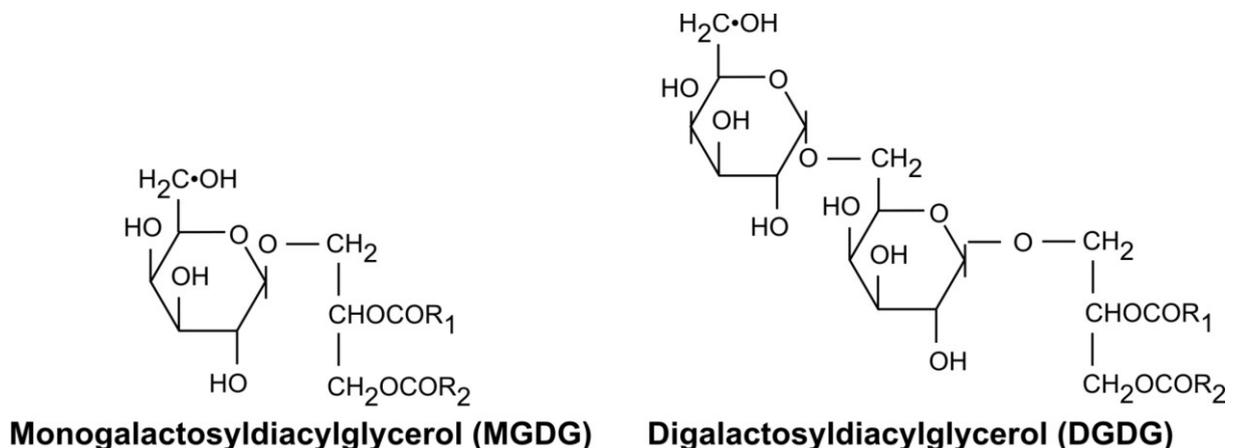


Abb.1: Strukturen der Galaktolipide MGDG und DGDG

Triacylglycerin (TAG) ist das am häufigsten vorkommende Speicherlipid und besteht aus einem Glycerinreste, welche mit drei Fettsäuren verestert ist. Somit gehört TAG zu den Neutralfetten und besitzt daher keine elektrische Nettoladung und keine polaren Gruppen wie die Phospholipide oder Glycerolipide. TAG stellt in Pflanzen

und tierischen Zellen die Hauptkomponente der Fettdepots dar. In Pflanzen wirkt es aber hauptsächlich als Kohlenstoff- und Energiespeicher in Samen. Es gibt verschiedene Typen von TAG, welche sich in Art und Position der drei Fettsäurekomponenten, die mit dem Glycerin verestert sind, unterscheiden.

Glycerolipide in Membranen sind mit zwei Fettsäuren verestert. Die dritte OH-Gruppe des Glycerins ist hier mit einer hydrophilen Gruppe verknüpft. Dies verleiht diesen Lipiden amphipatische Eigenschaften, welche die Ausbildung von Lipiddoppelschichten begünstigen. Die Kohlenwasserstoffschwänze lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkungen aneinander, während die hydrophilen Köpfe in die wässrige Phase herausragen. Die bekanntesten Vertreter der polaren Lipide sind die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) und Cardiolipin, außerdem auch die Glykolipide MGDG, DGDG und SQDG (Sulfochinovosyldiacylglycerin). Auch Stearine (z.B. Cholesterin) und Sphingolipide (z.B. Cerebroside) werden zu den polaren Lipiden gezählt.

Pflanzliche Membranen variieren in der Zusammensetzung der Lipide. Chloroplastenmembranen haben einen hohen Anteil an Galaktolipiden, während in Mitochondrienmembranen vor allem Phospholipide eine große Rolle spielen. Cardiolipin ist ausschließlich in der inneren Hüllmembran von Mitochondrien zu finden, wogegen PC in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten sowie im ER, in der Mitochondrienmembran und in der Plasmamembran lokalisiert ist. PE ist im ER, in Mitochondrien und in der Plasmamembran vertreten. Auch bei anderen Zellkompartimenten wie z.B. dem Golgi-Apparat, dem ER, den Peroxisomen, dem Kern und den Tonoplasten variiert die Lipidkomposition der Membranen stark.

Membranlipide in Pflanzen können, unabhängig von ihren Stoffklassen, auch nach anderen Kriterien eingeteilt werden. Man kann beispielsweise zwischen „bilayer-forming“ Lipiden und „non-bilayer-forming“ Lipiden unterscheiden. Membranlipide bilden in wässrigen Systemen spontan geordnete Molekülverbände. Dies konnte durch *in vitro* Experimente gezeigt werden. Die Struktur dieser Molekülverbände bestimmt, ob diese Lipide in wässrigen Systemen entweder Lipiddoppelschichten

oder Micellen ausbilden (Abb.2). Das strukturrentscheidende Glied im Molekülverband ist die polare Kopfgruppe sowie der hydrophobe Schwanz.

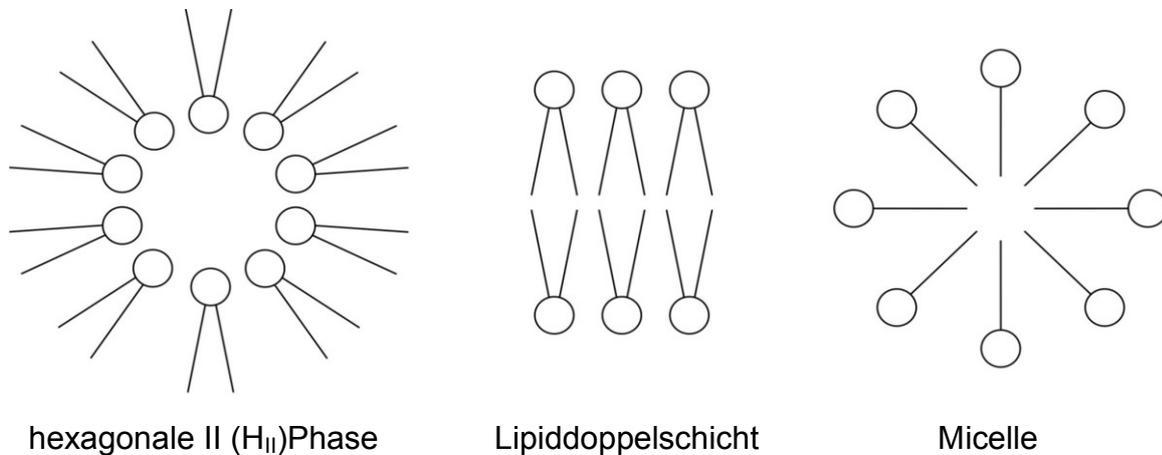


Abb.2: Schematische Darstellung möglicher Strukturen von Lipiden in wässrigen Medien

MGDG enthält nur ein Galaktosemolekül in der Kopfgruppe, wogegen DGDG zwei besitzt. Die Kopfgruppe von MGDG ist im Vergleich zum hydrophoben Anteil dieses Lipids sehr klein. Dies resultiert in einer annähernd konischen Struktur von MGDG. In vitro in einem wässrigen System bilden MGDG Moleküle deshalb anstatt einer Lipiddoppelschicht eine hexagonale II (H_{II}) Phase aus (Abb.2), in der die Kopfgruppen nach außen ragen. Außer MGDG gehört auch PE zu der Gruppe der non-bilayer-forming Lipide. DGDG besitzt nicht wie MGDG eine konische Struktur, sondern eine zylindrische Form. Die zwei Galaktose-Gruppen in der Kopfgruppe bewirken, dass in vitro die Ausbildung einer lamellaren L_α-Phase und somit die Bildung einer Lipiddoppelschicht stattfindet (Webb & Green, 1991). Neben DGDG gehören auch andere Lipide wie PG, SQDG, PC, PI und PS zu den bilayer-forming Lipiden.

Glycerolipide unterscheiden sich nicht nur in der Anzahl der Kopfgruppen, sondern auch in ihrer Fettsäurezusammensetzung. Fettsäuren bestehen aus langen Kohlenwasserstoffketten und einer Carboxy-Gruppe und bilden den hydrophoben Anteil dieser amphipathischen Moleküle. Sie gewährleisten so die Fluidität der Membranen. Einen Hinweis für die Beschaffenheit der Membran gibt hierbei die Anzahl der Doppelbindungen, d.h. der ungesättigten Bindungen. Gesättigte Fettsäuren können sich eng aneinander lagern, wogegen Doppelbindungen die

Struktur eher auflockern und so eine regelmäßige Packung stören. Dadurch kommt es u.a. zur Erniedrigung des Schmelzpunktes.

Die wichtigsten Vertreter pflanzlicher Fettsäuren sind Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1, Δ^{3t}), Hexadecatriensäure (C16:3, $\Delta^{7,10,13c}$), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1, Δ^{9c}), Linolsäure (C18:2, $\Delta^{9,12c}$) und α -Linolensäure (C18:3, $\Delta^{9,12,15c}$).

Die erste Zahl gibt die Anzahl der Kohlenstoffatome an. Die zweite Zahl steht für die Anzahl der Doppelbindungen. Die hochgestellten Zahlen stellen die Lage der Doppelbindungen dar, c steht für eine cis-Konfiguration, t steht für eine trans-Konfiguration.

Lipide erfüllen die verschiedensten Funktionen in pflanzlichen und tierischen Zellen. In Pflanzen fungieren Lipide als Signalmoleküle, als Phytohormone (z.B. Jasmonsäure) oder auch als Pigmente (z.B. Chlorophyll) und sind so an der Umsetzung von Lichtenergie in chemische Energie oder am Schutz vor überschüssiger Lichtenergie beteiligt. Des Weiteren stellen Lipide einen Kohlenstoffspeicher in Form von Triacylglycerin in den Samen dar. In tierischen Zellen fungieren Lipide als Energielieferanten. Speicherlipide tragen durch β -Oxidation der Fettsäuren in den Peroxisomen und in den Mitochondrien zum ATP-Haushalt bei.

Die Hauptfunktion der Membranlipide besteht in der Bereitstellung eines Gerüsts für Membranproteine. Die Moleküle der Membranlipide sind amphipatisch und besitzen daher einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil. Dies ermöglicht, in einer wässrigen Umgebung Lipiddoppelschichten, Micellen oder hexagonale II (H_{II}) Phasen auszubilden (Abb.2). Lipidhaltige Membranen stellen flüssig-kristalline Strukturen dar, in denen Lipide und Proteine frei in der Membranebene diffundieren können (Singer *et al.*, 1972). Je nach Organismus unterscheidet sich die Zusammensetzung biologischer Membranen. Beispielsweise findet man Sphingomyelin nur in tierischen Zellen, wogegen die Galaktolipide MGDG und DGDG ausschließlich in Pflanzen, Algen und photosynthetischen Bakterien vorkommen.

1.2 Fettsäurebiosynthese

Fettsäuren sind tragende Bestandteile der Glycerolipide. Die Fettsäuresynthese in Pflanzen erfolgt in den Chloroplasten und steht in engem Zusammenhang mit der Photosynthese. Aus der Photosynthese werden die Reduktionsäquivalente NADPH und der durch CO₂-Fixierung gewonnene Kohlenstoff für die Fettsäuresynthese bereitgestellt. In Leukoplasten von nicht grünen Zellen (z.B. in Samen) liefert der oxidative Pentosephosphatweg das erforderliche NADPH durch Oxidation von Glucose-6-phosphat. Acetyl-CoA kann aus Acetat oder Pyruvat gebildet werden und ist die Basis für die Fettsäurebiosynthese. Acetyl-CoA wird zunächst zu Malonyl-CoA carboxyliert, danach wird das CoA gegen ein Acylcarrierprotein (ACP) eingetauscht. Malonyl-ACP geht eine Kondensationsreaktion mit Acetyl-CoA ein. Daraus entsteht nach weiteren Reduktions- und Dehydratationsreaktionen Butyryl-ACP. Butyryl-ACP durchläuft weitere Kondensationsreaktionen mit Malonyl-ACP, wodurch länger-kettige Fettsäuren entstehen. Wenn die Fettsäuren eine bestimmte Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen erreicht haben, bricht die Synthese ab.

1.3 Die Biosynthese von Glycerolipiden in Pflanzen

Glycerolipide bestehen aus zwei Fettsäuren, welche an der sn-1 und an der sn-2 Position verestert sind. An der sn-3 Position sitzt eine polare Kopfgruppe. Die Glycerolipidbiosynthese erfolgt hauptsächlich in den Chloroplasten und im Endoplasmatischen Retikulum (ER). In Pflanzen existieren bis zu zwei verschiedene Stoffwechselwege der Glycerolipidbiosynthese (Roughan & Slack, 1982), der prokaryotische und der eukaryotische Syntheseweg (Abb.3).

Im Chloroplasten synthetisierte „prokaryotische“ Glycerolipide enthalten hauptsächlich C18 Fettsäuren und zu einem geringen Anteil C16 an der sn-1 Position und ausschließlich C16 an der sn-2 Position. Die „eukaryotischen“ Glycerolipide dagegen werden im ER synthetisiert (Roughan and Slack, 1982; Browse *et al.*, 1986) und enthalten C18 an der sn-1 und sn-2 Position und zu einem geringen Anteil C16 an der sn-1 Position. Die für Pflanzen typischen ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden durch Desaturasen im Chloroplasten und im ER gebildet (Browse and Somerville, 1991; Heinz, 1993).

Die Glycerolipidsynthese beginnt damit, dass Glycerol-3-Phosphat zunächst durch zwei Acylierungsschritte zu Lysophosphatidat und schließlich zu Phosphatidat umgesetzt wird. Durch die Acyltransferasen Glycerol-3 Phosphat- Acyltransferase und Lysophosphatidat Acyltransferase werden Fettsäuren auf Glycerol-3-Phosphat übertragen. Als Fettsäuredonor dient im prokaryotischen Syntheseweg das Acyl-Acyl-Carrier-Protein (Acyl-ACP), im eukaryotischen Syntheseweg fungiert Acyl-Coenzym A (-CoA) als Fettsäuredonor.

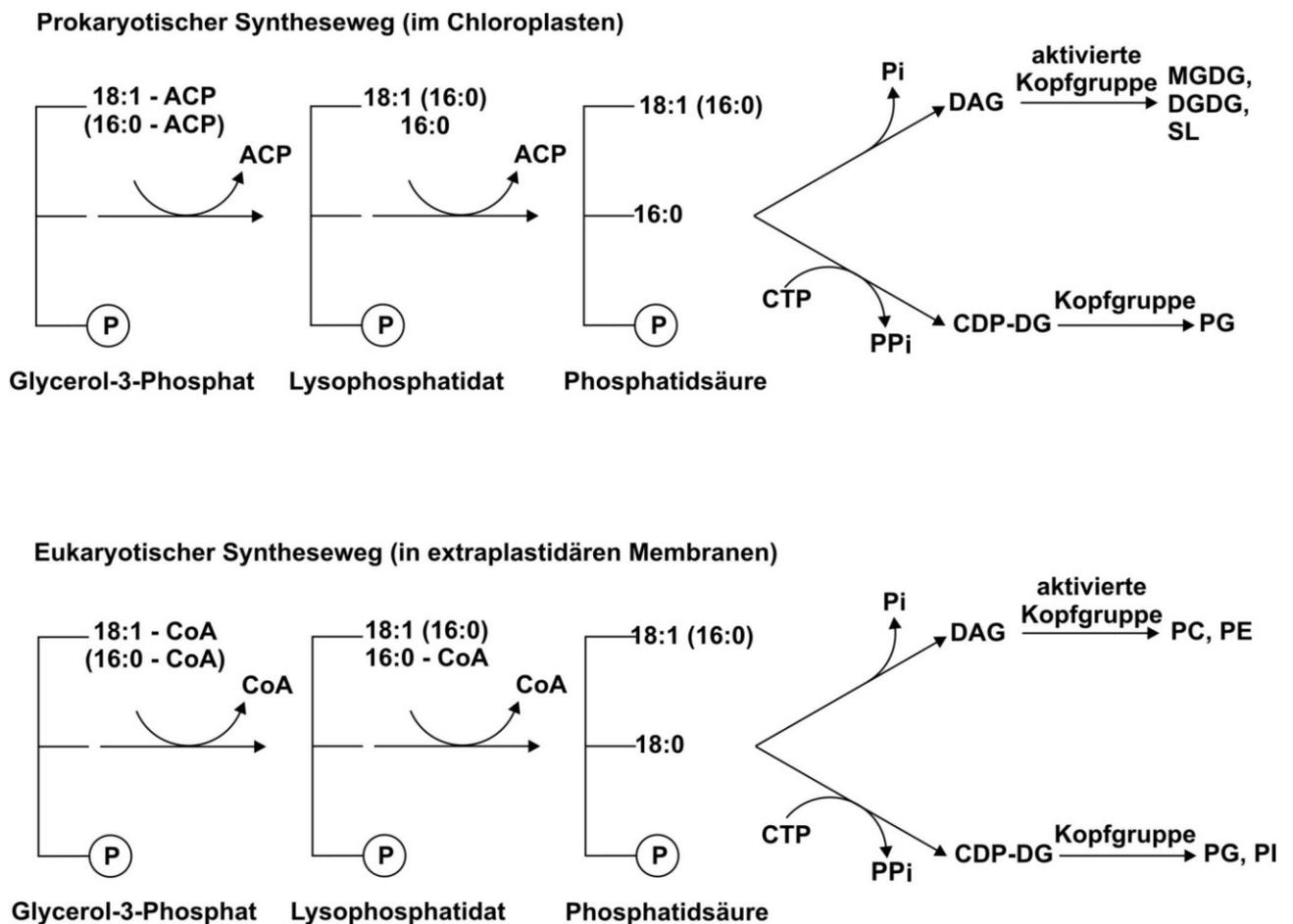


Abb.3: Eukaryotischer und prokaryotischer Biosyntheseweg der Glycerolipide (nach Ohlrogge und Browse, 1995). Glycerol-3-Phosphat wird über Lysophosphatidat zu Phosphatidat acyliert. Dabei übertragen Acyltransferasen die Fettsäuren auf das Glycerinrückgrat. Im prokaryotischen Syntheseweg ist Acyl-Acyl-Carrier-Protein (Acyl-ACP) der Fettsäuredonor, im eukaryotischen Weg ist Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA) der Donor. Die Phospholipidsynthese erfolgt über den CDP-Diacylglycerol- (CDP-DAG) Weg oder über den Diacylglycerol- (DAG) Weg. CDP, Cytidin-Diphosphat; 16:0, Palmitat; 18:0, Stearat; 18:1, Oleat.

Phosphatidsäure (PA) ist ein Ausgangsprodukt für die Glycerolipidsynthese. PA wird im Chloroplasten dephosphoryliert und steht dann für die Synthese der „prokaryotischen“ Form von MGDG, DGDG und SQDG zur Verfügung. PA kann auch

im ER zu DAG oder CDP-DAG umgesetzt werden. DAG ist für die Synthese von PC und PE notwendig, wogegen CDP-DAG für die Synthese der Phospholipide PG, PI und PS nötig ist. Lipideinheiten werden aus dem ER durch das sogenannte Lipidtrafficking in den Chloroplasten zurücktransportiert. Letztendlich werden die eukaryotischen DAG Einheiten dann zu MGDG, DGDG und SQDG umgesetzt. In 16:3 Pflanzen existieren Biosynthesewege prokaryotischen sowie eukaryotischen Ursprungs und somit auch Lipide aus beiden Synthesewegen.

1.4 Die Biosynthese von MGDG und DGDG und deren Funktionen

Bei der MGDG Synthase (UDP-Galaktose:sn 1,2 -Diacylglycerin-3- β -D-Galaktosyltransferase) handelt es sich um eine UDP-Galaktose abhängige DAG-Galaktosyltransferase. Diese wurde in den Hüllmembranen von Erbse und Spinat identifiziert und lokalisiert (Cline & Keegstra, 1982; Block *et al.*, 1983). Folgende Reaktion wird durch die MGDG Synthase katalysiert:



Nachdem erstmalig das MGDG Synthase Enzym und die zugehörige cDNA aus Gurkenkotyledonen isoliert werden konnte (MGD1; Shimojima *et al.*, 1997), war es möglich, Sequenzvergleiche durchzuführen, die ergaben, dass in *Arabidopsis thaliana* drei verschiedene MGDG-Gene existieren: MGD1, MGD2 und MGD3 (Miège *et al.*, 1999; Awai *et al.*, 2001). MGD1 aus *Arabidopsis* stellt hierbei ein Ortholog zum MGD1 aus Gurke dar. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine dieser Genfamilie Sequenzähnlichkeiten zu bakteriellen Glykosyltransferasen, die an der Zellwandbiosynthese beiteiligt sind (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1990), aufweisen. Diese Homologien unterstützen die These, dass die MGDG Synthasen im Zuge der Endosymbiose aus den bakteriellen Glykosyltransferasen entstanden sind. (Shimojima *et al.*, 1997).

Die MGD Gene aus verschiedenen Pflanzenarten können in zwei Familien eingeteilt werden. MGD1-Gene gehören zum Typ der Familie A während MGD2 und MGD3 Gene der Typ B Familie angehören. Die MGD1-Synthase ist für den Hauptanteil der MGDG-Synthese verantwortlich. Das konnte durch Analyse einer *mgd1* Mutante in

Arabidopsis thaliana nachgewiesen werden (Jarvis *et al.*, 2000). Die Aktivität der MGD1-Synthase ist in dieser *mgd1* Mutante um 75 % reduziert und somit auch der Gehalt an MGDG, welcher um 42 % reduziert ist. Neuere Untersuchungen von Kobayashi *et.al* beschreiben sogar eine MGD1 knock out Mutante welche nur noch einen MGDG Gehalt von 2 % im Vergleich zum WT aufweist. Awai *et. al.*, (2001) konnte nachweisen, dass AtMGD1 weit aus stärker transkribiert wird als AtMGD2 und AtMGD3 und dadurch die Untersuchungen von Jarvis *et al.*, (2000). bekräftigen. Alle drei Isoformen der MGDG Synthasen können sowohl prokaryotisches als auch eukaryotisches DAG nutzen. Dabei zeigt jedoch MGD2 und MGD3 eine höhere Affinität zu eukaryotischem DAG. Lokalisierungsstudien haben ergeben, dass AtMGD1 in der inneren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert ist, wogegen AtMGD2 und AtMGD3 in der äußeren Hüllmembran lokalisiert ist (Awai *et al.*, 2001).

Untersuchungen in den 1970er Jahren legten nahe, dass die DGDG-Synthase eine Galaktolipid:Galaktolipid Galaktosyltransferase (GGGT, EC 2.4.1.184, van Besouw & Wintermans, 1978; Heemsterk *et al.*, 1990) ist. Enzymatische Studien ergaben, dass die GGGT-Synthase UDP-Galaktose-unabhängig ist und folgende Reaktion katalysiert:



Bei dieser Reaktion überträgt GGGT eine Galaktoseeinheit eines MGDG Moleküls auf ein weiteres MGDG Molekül. In mit Thermolysin behandelten Chloroplasten konnte keine GGGT-Aktivität gemessen werden. Daraus konnte daraus geschlossen werden, dass die DGDG Synthase auf der cytosolischen Seite der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert ist (Dorne *et al.*, 1982; Heemsterk *et al.*, 1990). Daneben zeigten *in vitro* Studien neben der DGDG Synthase Aktivität auch eine prozessive Aktivität der isolierten Chloroplasten, die zu einer Synthese von Tri- bzw. Tetragalaktosyldiacylglycerin führt. Diese Oligogalaktolipide weisen drei bzw. vier Galaktose-Moleküle in der Kopfgruppe auf und sind in grünem Pflanzengewebe nicht vorhanden (Fujino & Miyazawa, 1979). Die Aktivität der GGGT und damit die Synthese von DGDG und dieser Oligogalaktolipide ist nur *in vitro* vorhanden und resultiert allein aus dem Vorgang der Isolierung der Chloroplastenmembranen.

Die Identifizierung der *Arabidopsis thaliana* Mutante *dgd1* (Dörmann *et al.*, 1995) führte zur erstmaligen Klonierung des ersten *DGD1*-Gens, welches an der DGDG-Synthese maßgeblich beteiligt ist (Dörmann *et al.*, 1999). Der DGDG-Gehalt in der *dgd1*-Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp (WT) um 90 % reduziert (*dgd1*: ca. 2% DGDG-Anteil an den polaren Lipiden, WT: ca. 16% DGDG-Anteil). Der Phänotyp dieser Mutante zeigt ein stark eingeschränktes Wachstum sowie eine stark beeinträchtigte photosynthetische Effizienz. Das *DGD1*-Gen konnte auf Chromosom 3 identifiziert werden (Dörmann *et al.*, 1999). Die *DGD1* cDNA besteht aus sieben Exons und codiert eine 91,8 kDa große Galaktosyltransferase. Ein Basenaustausch im Exon 6 führt im *dgd1* Allel zu einem Basenaustausch und somit zu einem frühzeitigen Stoppcodon (CAA wird zu TAA) im Bereich der Galaktosyltransferasedomäne. Dies resultiert wahrscheinlich in einer Nullmutation. *DGD1* übernimmt den Hauptanteil der DGDG-Synthese. Durch Lokalisierungsexperimente konnte herausgefunden werden, dass *DGD1* in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten sitzt (Froehlich *et al.*, 2001).

Auch wenn *DGD1* vorwiegend für die Synthese von DGDG verantwortlich ist, so gibt es noch ein zweites Gen, welches an der DGDG-Synthese beteiligt ist, *DGD2*. In der *dgd1* Mutante ist noch ein Restgehalt von DGDG detektierbar, der nicht von einer Restaktivität von *DGD1* stammen kann. Außerdem führt wie im WT auch in der *dgd1* Mutante ein Phosphatmangel zu einem Anstieg an DGDG Lipid (Essigmann *et al.*, 1998, Härtel *et al.*, 2000).

DGD2 stellt wie *DGD1* eine UDP-Galaktose abhängige Galaktosyltransferase dar und ist ebenfalls in der äußeren Hüllmembran lokalisiert (Froehlich *et al.*, 2001, Kelly *et al.*, 2003). Während die DGDG-Synthese *DGD1* für die DGDG Synthese der Chloroplasten unter normalen Bedingungen bzw. unter Phosphatmangel verantwortlich ist, synthetisiert *DGD2* nur DGDG für extraplastidäre Membranen unter Phosphatmangel. Amélie Kelly (Dissertation 2003) untersuchte in ihrer Doktorarbeit unter anderem die *in vivo* Funktion von *DGD2*. Ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Funktion von *DGD2* war die Isolierung einer *dgd2* T-DNA-Insertionsmutante.

DGDG und MGDG im WT unterscheiden sich stark in ihrer Fettsäurezusammensetzung. So besteht DGDG im WT aus 78% C18:3 und 11% C16:0 wogegen sich MGDG im WT aus 62% C18:3 und 32% C16:3 zusammensetzt.

Dies deutet darauf hin, dass DGDG eukaryotischen und MGDG prokaryotischen Ursprungs ist (Browse & Somerville, 1991). Daraus kann geschlossen werden, dass in 16:3 Pflanzen MGDG und DGDG durch zwei verschiedene Wege synthetisiert werden. In der *dgd1* Mutante ist der C18:3 Gehalt zugunsten der C16:0 und C18:1 Fettsäuren leicht erniedrigt.

In vivo Funktionen von DGDG und MGDG

Da MGDG vor allem in den Plastiden von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien gefunden wurde, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass es wie DGDG direkt an der Photosynthese beteiligt ist. MGDG ist ein Membranbaustein der Thylakoide und ein Bestandteil des Photosystem I (PSI). Durch Kristallisierungs-experimente des PSI von Cyanobakterien konnte nachgewiesen werden, dass jedes PSI Monomer ein Molekül MGDG enthält. MGDG interagiert hier mit den Proteinen PsaA und PsaB auf der Stromaseite der Thylakoide (Jordan *et al.*, 2001). Weitere Hinweise auf die Funktion von MGDG in der Photosynthese gab der Nachweis dass Interaktionen mit dem PSII existieren (Tremolières *et al.*, 1994; Murata *et al.*, 1990). Außerdem ermöglicht MGDG den Energietransfer der Chla/b-Lichtsammelkomplexe (LHC) zum PSII-Kernkomplex (Siefermann-Harms *et al.*, 1982). Weiterhin ist MGDG das einzige Lipid welches in Verbindung mit dem Xanthophyllzyklus auftritt. Durch *in vitro* Studien konnte herausgefunden werden, dass MGDG die plastidäre ATP-Synthase aktiviert (Pick *et al.*, 1987).

Die Analyse der *Arabidopsis thaliana* Mutante *mgd1* (Jarvis *et al.*, 2000) ergab nicht nur eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes, es verringerte sich auch die Anzahl der Thylakoide. Die Fettsäurezusammensetzung des restlichen MGDG in dieser Mutante ergab einen reduzierten Gehalt an Hexadecatriensäure (C16:3) im Vergleich zum WT. Dies unterstützt die Hypothese, wonach MGD1 nur prokaryotisches MGDG synthetisiert (Awai *et al.*, 2001).

Der größte Anteil des DGDG ist in den Plastiden lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle in den Lichtsammelkomplexen des PSII. Zwei Moleküle DGDG sind in LHCII enthalten. Das konnte durch Kristallisierung der LHCII eines Dinoflagellaten (*Amphidinium carterae*) herausgefunden werden (Hofmann *et al.*, 1996). Weitere Kristallisierungsexperimente ergaben, dass sowohl PG als auch DGDG eine

stabilisierende Wirkung in LHCII Komplexen zeigen (Reinsberg *et al.*, 2000). Zwei Moleküle DGDG sind in LHCII Komplexen enthalten (Hofmann *et al.*, 1996). Im direkten Vergleich ist das Wachstum der *dgd1* Mutante (Dörmann *et al.*, 1995) viel stärker reduziert als in der *mgd1* Mutante. Der stark verminderte Gehalt an DGDG in der Mutante führt zu einer Reduktion des Chlorophyllgehalts, einer gestörten Chloroplastenultrastruktur und zu einer erniedrigten Photosyntheseeffizienz. Detaillierte Fluoreszenzmessungen zeigten, dass die Quantenausbeute am PSII in der *dgd1* Mutante reduziert ist. Energie die nicht durch die Photosynthese verwertet werden kann, wird als Fluoreszenz wieder abgegeben. Weiterhin wird die Quantenausbeute durch eine höhere Aktivität des Xantophyllzyklus reduziert (Härtel *et al.*, 1998). Die Analyse der verschiedenen Photosystem Komplexe durch native Gelelektrophorese ergab, dass die Stabilität von trimeren LHCII Komplexen in der *dgd1* Mutante im Vergleich zum WT ebenfalls vermindert ist (Dörmann *et al.*, 1995). Zusätzlich ist auch das Verhältnis der PSII zu PSI Komplexe reduziert (Härtel *et al.*, 1997). Zusammenfassend kann man sagen, dass DGDG eine wichtige Rolle in der Photosynthese spielt, und ein Fehlen, wie bei der *dgd1*-Mutante, außerordentlich negative Auswirkungen auf das Funktionieren des Photosyntheseapparates hat (Reifarth *et al.*, 1997); Härtel *et al.*, 1997). Doch nicht nur die Photosynthese ist durch das Fehlen von DGDG gestört, auch die Importkapazität von *dgd1* Chloroplasten ist im Vergleich zum WT erniedrigt (Chen & Li, 1998). Dies wird auf das veränderte Verhältnis von MGDG und DGDG zurückgeführt, denn das Verhältnis von Bilayer- zu non-Bilayer-forming Lipiden ist unter anderem für den Proteintransport durch Membranen wichtig (Gounaris *et al.*, 1983; Bogdanov & Dowhan, 1999; Kusters *et al.*, 1993).

Phosphor ist ein wichtiger Bestandteil biologischer Verbindungen. Mit einer relativ hohen Konzentration von 5 mM (Buchanan *et al.*, 2000) ist Phosphor in Pflanzengewebe enthalten und gehört somit zu den Makroelementen. Allerdings liegt Phosphor im Boden nur in geringen Konzentrationen (ca. 2 μ M). Somit ist die Verfügbarkeit von Phosphor ein das Pflanzenwachstum begrenzender Faktor (Raghothama, 1999). Pflanzen haben spezielle Mechanismen entwickelt, um Phosphatmangel auszugleichen. Beispielsweise wird die Phosphataufnahme durch eine verstärkte Ausbildung von Wurzelhaaren erhöht. Teilweise geben die Pflanzen über die Wurzeln organische Säuren in den Boden ab, um P_i aus den

Bodenmineralien zu lösen. Weiterhin kann man eine Induktion spezieller Pi-Transporter beobachten sowie einen verstärkten Abbau von RNA Molekülen durch RNAsen und eine Reduktion der Phospholipide zugunsten der phosphatfreien Lipide DGDG und SQDG in den Membranen (Essigmann *et al.*, 1998).

Eine Kompensation der Reduktion des Phospholipidgehaltes durch DGDG scheint nicht nur auf die Membranen der Plastiden beschränkt zu sein, da auch in extraplastidären Membranen ein Anstieg von DGDG beobachtet werden kann (Härtel *et al.*, 2000; Härtel *et al.*, 2001). Extraplastidäres DGDG ist eukaryotischen Ursprungs, unterscheidet sich jedoch von nicht Phosphatmangel gestressten Pflanzen dadurch, dass eine C16 Fettsäure an der sn-1 und eine C18 Fettsäure an der sn-2 Position des Glycerins verestert ist.

1.5 Grundlagen des Split-Ubiquitin-Systems

Das Split-Ubiquitin-System ist eine Weiterentwicklung des Zwei-Hybrid-Systems (two hybrid system) (Fields *et al.*, 1989) und damit ein typisches Zwei-Komponenten-System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Hier tragen zwei potentielle Interaktionspartner (Köder/*bait* und Beute/*prey*) jeweils eine Komponente eines bestimmten Reportersystems. Deren Verbindung wird erst hergestellt, wenn *bait* und *prey* sich zu einem Komplex zusammenlagern und damit auch die Verbindung zwischen den beiden Reporter-Komponenten herstellen (Johnsson *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu werden beim Two-Hybrid-System an *bait* und *prey* eine DNA-Bindedomäne und eine Aktivatoromäne gekoppelt. Nach Bildung eines Komplexes formen *bait* und *prey* den Reporter, welcher einem DNA-Aktivierungsprotein entspricht. Dieses Prinzip kann aber auch einen Nachteil bedeuten da sich der Interaktions-Komplex so verhalten muss wie das Reporterprotein. Da eine DNA-Aktivierung und somit eine Lokalisation im Kern erforderlich ist, scheiden alle Proteine, die nicht in den Kern transportiert werden können, z.B. Membranproteine, aus. Dieses Problem wird beim Split-Ubiquitin-System gelöst, da der Interaktionskomplex nicht selbst als Reporter wirkt, sondern einen Reporter freisetzt, der räumlich und zeitlich unabhängig von den integrierenden Proteinen aktiv werden kann. Der entscheidende Baustein dazu ist das Molekül Ubiquitin. Ubiquitin ist ein kleines Protein (8,5 kDa), welches in der Zelle als Proteinabbausignal dient. Abzubauen Proteine werden an ein C-terminales

Gly-Gly-Segment von Ub gekoppelt. Spezifische Proteasen erkennen diesen Komplex und spalten ihn. Auf struktureller Ebene kann man Ubiquitin in zwei Abschnitte unterteilen, den N-terminalen und C-terminalen Teil (Nub und Cub). Diese beiden Hälften müssen jedoch nicht über eine Peptidbindung miteinander verbunden sein. Man kann beide Hälften getrennt exprimieren und feststellen, dass sie sich zu einem funktionellen Ub-Molekül (Split-Ub) zusammenlagern. Eine gezielte Mutation der Aminosäure Ile13 zu Gly13 im Nub-Teil (auch als NubG bezeichnet) verhindert ein spontanes Anlagern der beiden Hälften. Allerdings können sich die beiden Hälften unter bestimmten Umständen doch zusammenlagern und ein aktives Split-Ub bilden. Dies kann nur erreicht werden, wenn NubG und Cub an *bait* und *prey* eines Interaktionspartners gekoppelt sind. Nur bei Interaktion entsteht funktionelles Split-Ub. Beispielsweise kann man an zwei Membranproteine einerseits NubG, andererseits Cub und zusätzlich LexA binden, so dass durch die Interaktion das LexA-Protein freigesetzt wird, in den Kern eindringt und als Transkriptionsaktivator fungieren kann (z.B. für das Lac-Operon).

Einsatzgebiete für das Split-Ubiquitin-System sind vor allem Membranproteine (Stagljar *et al.*, 1998; Wittke *et al.*, 1999) und andere Proteine, die nicht in den Kern eindringen können. Darüber hinaus kann das System auch für Proteine eingesetzt werden die mit DNA interagieren und daher nicht mit dem 2-Hybrid-System kompatibel sind. Auch vorübergehende Interaktionen können erkannt werden, da der einmal freigesetzte Reporter weiter aktiv bleibt (Dünnwald *et al.*, 1999).

1.6 Das TAP Tag/StrepII Tag System als Anwendung zur Proteinaufreinigung aus Pflanzen

Wechselwirkungen zwischen Proteinen sind eine entscheidende Grundlage aller Lebensprozesse. Zum Verständnis dieser essenziellen Prozesse in der Zelle ist die Analyse dieser Wechselwirkungen unumgänglich. Für die Untersuchung von interagierenden Proteinen wurde ein umfangreiches Methodenspektrum entwickelt. Ein klassisches Verfahren der Affinitätsaufreinigung von Proteinen stellt die Immunopräzipitation dar. Hier nutzt man Antikörper, die zu dem jeweiligen aufzureinigenden Protein spezifisch sind. Das Protein wird zusammen mit seinem spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet an sein Zielprotein, und wird dann präzipitiert. Etwaige Interaktionspartner des Zielproteins, die an dieses

gebunden sind, werden mit dem Zielprotein kopräzipitiert, und können im Western Blot nachgewiesen werden. Um Proteine zu separieren, werden sie auch häufig mit einem Peptid, einer Domäne oder einem Protein fusioniert, und dann mittels eines einstufigen Affinitätschromatographieschritts gereinigt. Eines der ältesten Affinitäts-Tags (Tag = Markierung) stellt das Arg-Tag dar. Fünf bis sechs Arginine werden c-terminal an das Protein gehängt, und mittels Kationenaustauschchromatographie unter Verwendung eines Natriumchloridgradienten eluiert. Die gebräuchlichste Tag Technologie ist jedoch der His-Tag. Metallionen wie z. B. Zn^{2+} werden an einer Matrix immobilisiert, und interagieren über den Imidazolring des Histidins. In diesem Fall wird NTA (Nitrilotriacetic acid) als Matrix verwendet. Je länger ein Poly-His-Tag ist, desto stärker bindet es an die jeweilige Matrix. Sehr häufig wird mit einem 6x-His-Tag gearbeitet. Imidazol ist hier der Eluent. Die Tandem-Affinity-Purification-Methode (TAP-Methode) ist ein neueres Verfahren, das zur Aufreinigung von Proteinen unter nativen Bedingungen entwickelt wurde. Das Besondere dieser Methode ist die Verknüpfung von zwei hoch affinen Aufreinigungsschritten, die durch die Verwendung des TAP-Tags realisiert werden können (Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001). Der Affinitätstag besteht aus einem Calmodulin-Bindeprotein (CBP), der TEV (*tobacco etch virus*) Protease Schnittstelle sowie zwei IgG-Bindedomänen des *Staphylococcus aureus* Protein A. Die Isolierung von Proteinen mittels der TAP-Methode setzt deren Fusion mit dem TAP-Tag voraus. Im ersten Schritt der TAP-Methode kommt es zur Bindung der Protein A-Komponente an die mit IgG-Antikörpern gekoppelten Beads. Nach mehrmaligem Waschen wird das gebundene Fusionsprotein durch die TEV-Protease, die an der Erkennungssequenz zwischen den beiden Domänen schneidet, von der Matrix abgetrennt. Der Überstand der ersten Affinitätsreinigung wird mit den Calmodulin- gekoppelten Beads in Gegenwart von Calcium inkubiert. Durch erneutes Waschen werden neben der TEV-Protease auch Kontaminationen entfernt. Das an den Beads verbleibende Fusionsprotein und daran gebundene Interaktionspartner werden unter Verwendung von EGTA eluiert. Die TAP-Methode ermöglicht eine schnelle Aufreinigung von Proteinkomplexen, auch ohne vorherige Kenntnisse über deren Zusammensetzung, Aktivität oder Funktion. Durch anschließende massenspektrometrische Untersuchungen (MALDI-TOF) können Proteine identifiziert werden (Shevchenko *et al.*, 1996) und Protein-Protein Interaktionen analysiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung von Proteinkomplexen ist die StreptII-Tag-Methode. Hier findet die Proteinaufreinigung in

nur einem Schritt statt (Junttila *et al.*, 2005). Bei der Bindung des Tags an die Streptactinsäule wird die spezifische Bindung von Biotin an Streptavidin genutzt. Der Strep-Tag bindet aufgrund seiner biotinähnlicher Struktur an die aus modifiziertem Streptavidin bestehende Streptactinsäule, und kann nach einem Waschschrift durch das kompetitiv wirkende Desthiobiotin schrittweise eluiert werden (Skerra and Schmidt *et al.*, 2000). Anschließend kann auch hier eine Identifikation der mitgereinigten Proteine durch Massenspektrometrie erfolgen.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Forschungsarbeit ist die weitere Aufklärung der Biosynthese und Funktion des Galaktolipids DGDG in *Arabidopsis thaliana*. Frühere Studien bildeten die Grundlage zu dieser Arbeit, beginnend mit der Identifizierung der *dgd1* Mutante und der Klonierung des ersten an der DGDG Synthese beteiligten Gens *AtDGD1* (Dörmann et al., 1995; Dörmann et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit soll die Frage nach der Funktion des N-terminalen Bereichs von DGD1 in Bezug auf die Galaktolipid Synthese und auf den Galaktolipid Transport untersucht werden. Zur Realisierung dieses Projekts sollen verschiedene bakterielle und pflanzliche Fusionsproteine mit unterschiedlichen N-terminalen Extensionen in *E.coli* und *Arabidopsis thaliana* exprimiert werden. Diese Experimente sollen Aufschluss darüber geben, in welcher Weise der N-terminale Bereich von DGD1 für die Akkumulation von DGDG in den Thylakoid Membranen höherer Pflanzen bedeutsam ist bzw. ob dieser Bereich den Transport von DGDG von der äußeren zu inneren Thylakoid Membran beeinflusst. Die Charakterisierung verschiedener N-DGD1 Überexpressionslinien, welche durch einen stark reduzierten Wachstumsphänotyp gekennzeichnet sind, sich jedoch von der *dgd1* Mutante unterscheiden, soll die Funktion dieses Bereichs aufklären.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit ist die Durchführung von Protein-Protein-Interaktionsstudien, um zu analysieren mit welchen Proteinen DGD1 interagiert. Dies soll Aufschluss über Lokalisation und Funktion beteiligter Proteine geben. Zwei Ansätze wurden verfolgt um dieses Ziel zu erreichen. Zum einen wurden transgene Linien erzeugt die ein chimäres Konstrukt aus DGD1 und einem TAP tag (Rigaut *et al.*, 1999) exprimieren. Mit Hilfe des TAP tags ist es möglich eine Tandem Affinitätsreinigung durchzuführen, die es erlaubt, Proteine unter nativen Bedingungen in einem 2-Schrittverfahren aufzureinigen. Es sollen so Proteine identifiziert werden die nachweislich mit DGD1 Protein interagieren. Dies soll Aufschluss über weitere biochemische Funktionen von DGD1 und dessen Interaktionspartner geben. Zum anderen soll mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems das Zusammenspiel der unterschiedlichen Glykosyltransferasen DGD1, DGD2, MGD1, MGD2 und MGD3 analysiert werden. Das Split-Ubiquitin-System stellt eine moderne Methode zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern verschiedenster pflanzlicher Membranproteine im heterologen Expressionssystem Hefe dar.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien, Kits und Enzyme

Geräte

Biolistic PSD-1000/He Particle Delivery System	BioRad, München, D
Centrikon T-124	Kontron, Neufahrn, D
Dual PAM-S	Walz GmbH, Effeltrich, D
Elektroporationsgerät Gene Pulser F6500	BioRad, Richmond, VA, USA
Fluorometer	JASCO GmbH, Groß-Umstadt, D
Fastblot-B33/B34 System	Biometra, Göttingen, D
Gaschromatograph (GC) HP6890 mit Kapillarsäule Supelco SP-2380	Agilent Techn., Böblingen, D
Heizbad mit Thermostat	Gesellschaft für Labortechnik, Bergwedel, D
Flammenionisationsdetektor (FID) und Autoinjektor	Agilent Techn., Böblingen, D
Geldoku: UV-Transilluminator	Biorad, München, D
Heizblock: DRI-BLOCK® DB-3A	Techne, Oxford/Cambridge, UK
Imaging PAM Fluoreszenzmessgerät J-550	Heinz Walz, Effeltrich, D
Spektrophotometer	JASCO GmbH, Groß-Umstadt, D
Leica TCS SP2 Konfokal Fluoreszenz Mikroskop	Leica, Wetzlar, D
Midi-I-Horizontalkammer für DNA-Gelelektrophorese	Ziege, Luckenwalde, D
PCR-Thermocycler, Biometra	Biometra, Göttingen, D
pH-Meter Calimatik 671	Knick GmbH, Berlin, D
Simultan Trennkammer für Dünnschichtchromatographie	Sigma-Aldrich, München, D
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer 5355	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschallstab: Sonopuls	Bandelin, Berlin, D
Untertischzentrifuge Variofuge 3.0R	Heraeus, Hanau, D

UV-Crosslinker	Stratagene, La Jolla, USA
Vakuumentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Bender Hobein AG, Zürich, CH
Waage	Satorius, Göttingen, D
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg, D
1500 Pflanzenzucht: Phytotron für <i>Arabidopsis</i> -Keimung	York International, York, USA
1 Liter Labor Mixer	VWR International, Darmstadt, D

Materialien

Klingen mit Griffschutz	Merck, Darmstadt, D
DC-Silicaplatten Baker Si 250, PA-Konz.	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Software zur Analyse von DNA- Sequenzen: DNASTar	DNASTar Inc., Madison, USA
3MM Filterpapier	Whatman International Ltd., GB
Glasröhrchen mit Schraubkappe	Schott, Mainz, D
Kapillarröhrchen	Brand, Wertheim, D
Pipetten	Gibson, FR
Plastikröhrchen (Falcon)	BD™ Biosciences, Heidelberg, D
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Plastik-Einmalküvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich- Buchsschlag, D
GC-Röhrchen	Chromacol, Abimed Analysetechnik, Langenfeld, D
Chemstation Software	Agilent, Böblingen, D
Miracloth	Calbiochem, Darmstadt, D
Silwett L-77	Helena Chemicals, Fresno, USA
Protran® Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Elektroporationsküvette, 1mm	Peqlab, Erlangen, D
NBT/BCIP-Tabletten	Roche, Mannheim, D
Nucleospin® Plant,	Macherey-Nagel, Düren, D
Nucleospin® Plasmid,	Macherey-Nagel, Düren, D
QIAquick Gel-Extraction Kit (250)	Qiagen, Hilden, D

NUCLEOBOND AX-Purification Kit (AX 500)	Qiagen, Hilden, D
ECL Plus Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München, D
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roche, Mannheim, D
Triton X-100	Serva, Heidelberg, D
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid)	Roche, Mannheim, D
α -Naphthol	Sigma-Deisenhofen, D
Precision Plus Protein TM Standard	Biorad, München, D
DNA-Längen- und Mengenstandard	Eurogentec, Serraing, B
Agarose	Saekem, FMC, USA
MS-Salz	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
BSA (fettsäurefrei)	Sigma, Deisenhofen, D
Ethidiumbromid	CalbiochemBehring, HöchstCA, USA
HCl in Methanol	Supelco, Taufkirchen, D
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Roche, Mannheim, D
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden, D

Die gebräuchlichsten Chemikalien (z.B. Ethanol, Chloroform) für Puffer, Lösungen und Medien sind in *pro analysi* Qualität von den verschiedenen Herstellern Merck AG, Darmstadt, D; Fluka, Taufkirchen, D oder Sigma-Aldrich, München, D bezogen worden.

Enzyme

T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Beverly, USA
RNAse	Ambion Ltd., Huntington, UK
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim, D
<i>Pfu</i> -Polymerase	TAKARA BIO INC., Otsu Shiga, J
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTPs	Bioline GmbH, Luckenwalde, D
DNase (RNAse frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Antikörper

Anti-N-DGD1-Antikörper (V ¹⁵⁹ LEMSRLRRRRNSD ¹⁷²)	Biogenes, Berlin, D
Anti-Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase	Kirkegaard and Perry/Dunn Labortechnik
Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Calbiochem OR04L, San Diego, CA, USA
PAP (Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex)	Sigma, Deisenhofen, D
T7-Tag-Antibody-AP-Konjugat	Novagen, Darmstadt, D

3.2 Synthetische Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, B) hergestellt.

Primer zur Klonierung der Split-Ubiquitin Konstrukte

PD 872 5`-CTGCAGGATCCA CTCAGGCTTCACAAAATCAGTC	(N-DGD1 Reverse)
PD 819 5`-CATATGGTAAAGGAAACTCTAATTCC	(DGD1 Forward)
PD 820 5`-CTGCAGGATCCGCTTGTGAAGAGCATCGTCAGCG	(DGD1 Reverse)
PD 821 5`-CATATGACTAATCAGCAGGAGCAAC	(DGD2 Forward)
PD 822 5`-ATGCATTCCCGGGGCATCTTGCTTGCGAGTATTTGG	(DGD2 Reverse)
PD 823 5`-CATATGGTACCAATGGCGACGACG	(MGD1 Forward)
PD 824 5`-CTGCAGTCCCGGGGCAACTAACTGGCAAAGAAGAGG	(MGD1 Reverse)
PD 825 5`-CATATGCAAACCCTTCAACGGTAAC	(MGD2 Forward)
PD 826 5`-CTGCAGTCCCGGGGCGGCAGTGCAAGAGAGTTGAG	(MGD2 Reverse)
PD 827 5`-CCTAGGCCATGGTTATGATGAAAGTGGTGTACCTC	(MGD3 Forward)
PD 828 5`-CTGCAGACAGATCTGATAGGAAAATTCATTAATAAAGTGG	(MGD3 Reverse)

Primer zur Klonierung von N-MGD1-DGD2

PD 538 5`-ATCCTAGGTATGACGAATCAGCAGGAGCA	(DGD2 Forward)
PD 539 5`-CGCGGATCCTCAATCTTGCTTGCGAGTAT	(DGD2 Reverse)

Primer zur Klonierung der N-DGD1 Überexpressionslinien

PD 1 5`-CCGGATCCCATGGTAAAGGAAACTCTA	(DGD1 Forward)
PD 3 5`-GGCTGCAGCTAAGGCTTCACAAAATCAGT	(N-DGD1 Reverse)

Primer zur Klonierung von DGD1-StreplITag

PD 640 5`-CTCGAGATGGTAAAGGAAACTCTAATTCC (Strep-DGD1 Forward)
 PD 641 5`-CTGCAGCTTGTGAAGAGCATCGTCAGC (Strep-DGD1 Reverse)

Primer zur Klonierung von DGD1-CTAPTag

PD 809 5`- GGATCCATGGTAAAGGAAACTCTAATTCC (DGD1 Forward)
 PD 860 5`- GTCGACCCAGCCGAAGATTGGCTTGT (DGD1 Reverse)
 PD 635 5`- CTCGAGATGGAGAGCAGCAGATGGAAG (CTAP Forward)
 PD 636 5`- GGCGCGCCTCACTTTGGGGCTTGGGCATC (CTAP Reverse)

3.3 Plasmide und Konstrukte

pGemTeasy	Promega, Mannheim, D
px-NubG	Stagljar <i>et al.</i> (1998)
py-CubPLV	Stagljar <i>et al.</i> (1998)
pLH9000	H. Schmidt, Hamburg, D
pLH6000	H. Schmidt, Hamburg, D
p35OCS-BM	H. Schmidt, Hamburg, D
pCAMBIA	Cambia, Canberra, AU
pET43b	Novagen, Darmstadt, D
pBINAR	Höfgen & Willmitzer (1992)
pBluescript II SK(+)	Stratagene, Amsterdam, NL
pQE31	Qiagen, Hilden, D
pGEX-3X	GE Healthcare, München, D
pACYC31	Derivat des pACYC184 (Chang <i>et al.</i> , 1978), enthält das <i>Xho</i> I, <i>Pvu</i> II Fragment mit der Expressionskassette des pQE31, (Dörmann <i>et al.</i> , 1999)

Konstrukte für Lokalisierungsstudien mit Hilfe von GFP

pEZR-KLN-N-DGD1-GFP	Xu (2005)
pEZR-KLN-N-DGD2-GFP	Wendenburg (2005)
pEZR-KLN-DGD1-GFP	Kelly (2002)
pEZR-KLN-DGD2-GFP	Kelly (2002)

Donorkonstrukte für weitere Klonierungen

pQE31-DGD2	Kelly & Dörmann <i>et al.</i> (200
pCAMBIA-N-MGD1- <i>chlo2030</i>	Hoelzl
pBSKII-DGD1	(Dörmann <i>et al.</i> , 1995)

3.4 Bakterien- und Hefestämme

<i>A. tumefaciens</i> (GV 3101)	Stratagene, Amsterdam, NL
<i>E. coli</i> XL1 blue	Stratagene, Amsterdam, NL
<i>E. coli</i> EH150	Hawrot und Kennedy (1976)
<i>E. coli</i> DH10B	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>E. coli</i> BL21 Star	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>S. cerevisiae</i> L40	(Stagljar <i>et al.</i> , 1998)

3.5 Pflanzenmaterial

<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia 2	ABRC, Columbus, USA
<i>dgd1</i>	(Dörmann <i>et al.</i> , 1995)

3.6 Kulturmedien

Alle Medien und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Billerica, USA) hergestellt. Die Lösungen wurden für 25 Minuten bei 125°C sterilisiert.

Anzuchtmedium für *A.thaliana*: (2MS; Murashige und Skoog, 1962):

0,44 % (w/v) MS, 1 % (w/v) Saccharose (pH 5,8), zur Verfestigung wurde 0,8 % Select-Agar zugegeben.

Anzuchtmedium für Bakterien

E.coli wurde über Nacht bei 37°C in YT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) und *A.tumefaciens* bei 28°C in YEB-Medium angezogen (Vervliet *et al.*, 1975).

YT-Medium

0,8 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 0,5 % (w/v) NaCl
 pH 7,0

YEB-Medium

0,5 % (w/v) Rindfleischextrakt
 0,1 % (w/v) Hefeextrakt
 0,5 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Saccharose
 2 mM Magnesiumsulfat
 pH 7,0

Für festes Medium wurde 1,5 % (w/v) Bacto Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Je nach Organismus wurden dem Medium Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben.

Ampicillin:	100 µg/L Medium
Kanamycin	50 µg/L Medium
Hygromycin B	25 µg/L Medium
Rifampicin	100 µg/L Medium

Anzuchtmedium für *S. cerevisiae*

S.cerevisiae wurde 1 -5 Tage auf festem oder flüssigem Vollmedium (YPD) oder Minimalmedium (CMdum) bei 28 °C angezogen. Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180 – 200 rpm) oder Rotation belüftet.

Dropout Powder

2,5 g Adenin (Hemisulfat)
 1,2 g L-Arginin
 6,0 g L-Aspartat
 6,0 g L-Glutamat (Na-Salz)
 1,8 g L-Lysin (HCl)
 1,2 g L-Methionin
 3,0 g L-Phenylalanin
 22,5 g L-Serin
 12,0 g L-Threonin
 1,8 g L-Tyrosin
 9,0 g L-Valin

CMdum

1,6 g/l Dropout Powder
 2 % (w/v) Glukose
 0,67 % (w/v) YNB (Yeast Nitrogen Base, mit (NH₄)₂SO₄, ohne Aminosäuren)
 2 % Bacto-Agar(Difco) für Platten
 20 mg/l Uracil
 20 mg/l Histidin

Uracil, Histidin, Tryptophan und Leucin sind nicht im Dropout Powder enthalten. Die Substanzen wurden vermischt und mit einem Mörser pulverisiert. Je nach Selektion

wurden Glukose sowie die Aminosäuren und Basen als sterilfiltrierte Lösungen nach dem Autoklavieren dazugegeben.

YPD-Medium

20 g/l Pepton (Difco)

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Bacto Agar (nur für Platten)

3.7 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA GmbH – Sequenzier Service, Berlin, D, durchgeführt. Die Sequenzanalysen erfolgten mit der Lasergene Software (DNASStar Inc., Madison, USA)

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Klonierungen

Für die Klonierungen wurden Standardmethoden (Restriktionsanalysen, Ligationen, *E. coli*-Transformationen, elektrophoretische Auftrennung der DNA, Plasmidpräparation) nach Sambrook et al. (1989) oder die Protokolle der entsprechenden Kits verwendet. DNA Fragmente zur Klonierung wurden mit Pfu Polymerase amplifiziert. Für die Amplifizierung von genomischer DNA wurde ExTaq-Polymerase von TAKARA verwendet. Für die Amplifizierung von PCR-Fragmenten, welche nicht zum Klonieren eingesetzt werden sollten, wurde Taq-Polymerase eingesetzt.

3.8.1.1 Klonierung verschiedener Konstrukte

N-DGD1 in pBINAR

Zur Expression des N-terminalen Teils von DGD1 wurde zunächst der N-terminale Bereich der cDNA über PCR amplifiziert (Primer PD1/PD3). Dabei wurde am 5´ Ende eine *Bam*HI bzw. am 3´ Ende eine *Pst*I Schnittstelle eingefügt. Der N-terminale Bereich wurde dann in den *Bam*HI/*Pst*I geöffneten binären Vektor pBINAR kloniert und zur Transformation von *Arabidopsis* eingesetzt.

N-MGD1-DGD2 in pCAMBIA1200

Zur Expression des chimären N-MGD1-DGD2 Konstrukts wurde zunächst DGD2 cDNA über PCR amplifiziert (Primer PD538/PD539). Dabei wurde am 5' Ende eine *AvrII* bzw. am 3' Ende eine *BamHI* Schnittstelle eingefügt. DGD2 wurde dann in den Vektor pGEMTeasy zwischenkloniert und über dieselben Schnittstellen in den geschnittenen Vektor pCAMBIA-N-MGD1-chlo2030 hineingesetzt. Dieses chimäre Konstrukt wurde nun zur Transformation von *Arabidopsis* eingesetzt.

N-DGD1 in pX-NubG und pY-CubPLV

Zunächst wurde der N-terminale Bereich der DGD1 cDNA über PCR amplifiziert (Primer PD872/PD819). Dabei wurde am 5' Ende eine *NdeI* bzw. am 3' Ende eine *BamHI* und eine *PstI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde N-DGD1 über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den Expressionsvektor pX-NubG kloniert. Über die Schnittstellen *NdeI/PstI* wurde N-DGD1 in den Expressionsvektor pY-CubPLV eingesetzt.

DGD1 in pX-NubG und pY-CubPLV

Als erstes wurde die kodierende Region von DGD1 aus dem Vektor pBSKSKII-DGD1 mittels PCR amplifiziert (Primer PD819/PD820). Hierbei wurde am 5' Ende eine *NdeI* bzw. am 3' Ende eine *BamHI* und eine *PstI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde DGD1 über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den Expressionsvektor pX-NubG kloniert. Über die Schnittstellen *NdeI/PstI* wurde DGD1 in den Expressionsvektor pY-CubPLV eingesetzt.

DGD2 in pX-NubG und pY-CubPLV

Hier wurde die kodierende Region von DGD2 aus dem Vektor pQE31-DGD2 mittels PCR amplifiziert (Primer PD821/PD822). Hierbei wurde am 5' Ende eine *NdeI* bzw. am 3' Ende eine *XmaI* und eine *PstI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde DGD2 über die Schnittstellen *NdeI/XmaI* in den Expressionsvektor pX-NubG kloniert. Über die Schnittstellen *NdeI/PstI* wurde DGD2 in den Expressionsvektor pY-CubPLV eingesetzt.

MGD1 in pX-NubG und pY-CubPLV

Als erstes wurde MGD1 aus einer cDNA mittels PCR amplifiziert (Primer PD823/PD824). Hierbei wurde am 5' Ende eine *NdeI* bzw. am 3' Ende eine *XmaI* und eine *PstI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde MGD1 über die Schnittstellen *NdeI/XmaI* in den Expressionsvektor pX-NubG kloniert. Über die Schnittstellen *NdeI/PstI* wurde MGD1 in den Expressionsvektor pY-CubPLV eingesetzt.

MGD2 in pX-NubG und pY-CubPLV

MGD2 wurde aus einer cDNA mittels PCR amplifiziert (Primer PD825/PD826). Hierbei wurde am 5' Ende eine *NdeI* bzw. am 3' Ende eine *XmaI* und eine *PstI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde MGD2 über die Schnittstellen *NdeI/XmaI* in den Expressionsvektor pX-NubG kloniert. Über die Schnittstellen *NdeI/PstI* wurde MGD2 in den Expressionsvektor pY-CubPLV eingesetzt.

MGD3 in pX-NubG und pY-CubPLV

MGD3 wurde aus einer cDNA mittels PCR amplifiziert (Primer PD827/PD828). Hierbei wurde am 5' Ende eine *NcoI* und eine *AvrII* bzw. am 3' Ende eine *AvrII* und eine *PstI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde MGD3 über die Schnittstellen *NcoI/BglII* in den Expressionsvektor pX-NubG kloniert. Über die Schnittstellen *AvrII/PstI* wurde MGD3 in den Expressionsvektor pY-CubPLV eingesetzt.

DGD1-StrepII Tag in pLH6000

Als erstes wurde die kodierende Region von DGD1 aus dem Vektor pBSKSKII-DGD1 mittels PCR amplifiziert (Primer PD640/PD641). Hierbei wurde am 5' Ende eine *XhoI* bzw. am 3' Ende eine *PstI* Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde DGD1 über *XhoI/PstI* ausgeschnitten und in den mit *XhoI/PstI* geöffneten Vektor pXCS-HASrep hinein ligiert. DGD1-StrepII Tag wurde nun über *AscI/PmeI* in den Vektor pLH6000 kloniert und zur Transformation von *Arabidopsis* eingesetzt.

DGD1-CTAPTag in pLH6000

Die kodierende Region von DGD1 wurde aus dem Vektor pBSKII-DGD1 mittels PCR amplifiziert (Primer PD809/PD 860). Hierbei wurde am 5' Ende eine *Bam*HI bzw. am 3' Ende eine *Mlu*I Schnittstelle eingefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pGEMTeasy wurde DGD1 über *Bam*HI/*Sal*I ausgeschnitten und CTAP über *Xho*I/*Asc*I ausgeschnitten. Der mit *Bam*HI/*Mlu*I geöffnete Vektor p35OCS-BM wurde mit den beiden Fragmenten ligiert. *Sal*I konnte hier mit *Xho*I ligieren bzw. *Mlu*I mit *Asc*I. Aus dem Vektor p35D1CTAP erfolgte eine Umklonierung in den binären Vektor pLH6000 über die Schnittstelle *Sfi*I. Dieser Vektor konnte zur Transformation von *Arabidopsis* eingesetzt werden.

3.8.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Erzeugung transgener *A.thaliana* Linien erfolgte durch den *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer. Dazu wurden Übernachtskulturen der Agrobakterien zentrifugiert (5000 g, 30 min, Raumtemperatur) und die Zellen im gleichen Volumen Infiltrationsmedium (5% (w/v) Saccharose, 0,22% (w/v) MS-Salze, 2,5 mM MES-KOH pH 5,7, 44 nM Benzylaminopurin) resuspendiert. Pro Konstrukt wurden 200 ml Bakteriensuspension, 100 ml Infiltrationsmedium und 500 µl Silwett L-77 gemischt. Die Knospen von 6 Wochen alten Pflanzen wurden etwa 10 sec in diese Lösung getaucht (Clough und Bent, 1998). Zu transformierende *dgd1* Mutanten wurden mit einem in Agrobakterien getauchten Pinsel transformiert. Nach der Samenreife wurden die Samen zur Selektion auf antibiotikahaltige Medienplatten ausgebracht.

3.8.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae wurde mit leichten Abwandlungen nach der von Dohmen et.al. (1991) beschriebenen Methode transformiert. 200 ml YPD Medium wurden aus einer üN Kultur mit Hefezellen (1:100) angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 wurden die Zellen geerntet und mit 20 ml Lösung A (10 mM Bicine-NaOH (pH 8,35), 1 M Sorbitol, 3 % Ethylenglycol) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Lösung A resuspendiert und Aliquots à 200 µl wurden bei -70 °C eingefroren. Die kompetenten Zellen konnten mehrere Monate lang verwendet werden. Für die

Transformation wurden bis zu 1 µg Plasmid in 10 µl TE 50 µg denaturierte Heringssperma-DNA addiert. Diese DNA-Lösung wurde auf die gefrorenen Zellen pipettiert, die dann sofort bei 37 °C und leichtem Schütteln für 5 min inkubiert wurden. Danach wurde 1 ml Lösung B (0,2 M Bicine-NaOH (pH 8,35), 40 % PEG 1000) dazugegeben, durch invertieren des Gefäßes gemischt und der Ansatz wurde dann 1 h inkubiert. Die Zellen wurden dann geerntet, mit 1 ml Lösung C (10 mM Bicine-NaOH (pH 8,35), 0,15 M NaCl) gewaschen, in 100 µl Lösung C resuspendiert und plattiert. Alle Lösungen wurden steril filtriert.

3.8.4 Verdünnungsserien von *Saccharomyces cerevisiae*

Es wurde eine 3 ml YPD Starterkultur angelegt und üN rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µl dieser Kultur in 10 ml frisches YPD Medium transferiert und erneut 3,5 h inkubiert. Die Zellen wurden nun geerntet und einmal mit Wasser gewaschen, um alle Medienreste zu entfernen. Nach Resuspension des Hefepellets in 1 ml Wasser wurde die OD₆₀₀ gemessen und die Verdünnungsserie hergestellt. Begonnen wurde mit einer Zelldichte von 0,5 OD₆₀₀. Danach wurden 5 Verdünnungen je 1:5 angesetzt. Es wurden je 5 µl jeder Verdünnungen auf selektives bzw. nicht selektives Medium pipettiert und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.8.5 Expressionsstudien mit *Escherichia coli*

Der *E.coli* Expressionsvektor pGEX-3X, welcher die MGD1 Synthase enthält, wurde zur Verfügung gestellt von Hiroyuki Ohta (Shimajima et al., 1997). *E.coli* XL1 Blue Zellen, die diesen Vektor enthalten, wurden mit verschiedenen Glykosyltransferase Variationen transformiert. Die Proteinexpression wurde induziert mit 1 mM IPTG als die Zellen eine optische Dichte von 0,4 bei OD₆₀₀ erreicht hatten. Um Wachstumskurven zu erstellen, wurden die optischen Dichten in definierten Zeitabständen gemessen. Um Lipid aus den Kulturen zu isolieren, wurden die Zellen wie nach 3.9.1.1 behandelt.

3.8.6 Northern Analysen

Die RNA wurde aus 0,1 g Pflanzenmaterial extrahiert. Dafür wurde zu dem in flüssigem Stickstoff zerkleinerten Material 1 ml TRIzol[®]-Reagent (Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D) gegeben und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 10 min, 4°C) wurde zum Überstand 0,2 ml Chloroform/Isoamylalkohol pro 1 ml TRIzol[®] zugegeben und vermischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) wurde die RNA bei Raumtemperatur mit 0,5 Volumen Isopropanol aus dem Überstand gefällt. (12000 g, 10 min, 4°C). Das erhaltene RNA Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und in RNase freiem Wasser gelöst. Der RNA Gehalt wurde spektralphotometrisch bestimmt. 5-10 µg Total-RNA wurden in 1 x RNA Probenpuffer (0,8 x MEN [1 x MEN = 20 mM MOPS-NaOH, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH7,0] 4,44 % Formaldehyd, 40 % Formamid, 0,1 mg/ml Ethidiumbromid, 0,01 mg/ml Bromphenolblau) gelöst, denaturiert (56 °C, 10 min) und elektrophoretisch in einem 1,5 % Agarosegel (1x MEN, 6 % Formaldehyd, Elektrophoresepuffer: 1x MEN) getrennt. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) erfolgte über Nacht in 10 % SSC (1,5 M NaCl; 0,015 M Natriumcitrat) als Transferpuffer. Anschließend wurde die RNA auf der Membran fixiert (UV Stratalinker 1800, Stratagene, Amsterdam, NL) und getrocknet.

Als Sonden wurden ca. 100 ng gereinigte PCR- oder DNA-Fragmente verwendet. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit Hilfe des „rediprime TM II-random prime labelling system“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Membran wurde in 2 x SSC angefeuchtet und für 4 h bei 65 °C in Prähybridisierungspuffer (250 mM Na₂HPO₄, pH 7,4, 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) BSA, 0,1 mg/ml frisch denaturierte Heringsperma-DNA) inkubiert, bevor die Zugabe der denaturierten Sonde (5 min, 95 °C) erfolgte. Nach einer üN-Hybridisierung bei gleicher Temperatur wurde die Membran mehrmals in 2 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen und in Expositionskassetten mit Verstärkerfolie mit einem Film (Kodak, X-Omat AR Films, Kodak, Rochester, USA) bei -80°C exponiert.

3.8.7 Western Analysen

Die Proteinextraktion erfolgte mit Phenol nach Cahoon *et al.* (1992). Die Menge an Protein wurde mit der BCA-Methode bestimmt (siehe 3.9.1). Für das Gel wurden 50 µg Protein eingesetzt. Zu den Proben wurde Laemmli-Puffer (50mM Tris HCl, pH6,8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerol) gegeben, bevor sie 10 min bei 60°C denaturiert wurden. Die Proben wurden anschließend auf ein Gel (10% SDS, 30 % Acrylamid, 1,5 mM Tris, pH8,8, 10 % Ammoniumpersulfat, TEMED) aufgetragen und aufgetrennt (100 V, Raumtemperatur, Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, pH8,3, 0,1 % SDS). Als Molekulargewichtsmarker wurde Precision Plus Protein™ Standard (BioRad, München, D) verwendet. Der Transfer der gelelektrophoretisch getrennten Proteine aus SDS-PAGE Gelen auf Nitrocellulosemembranen wurde nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Die Übertragung erfolgte mit einer semi-dry Blot Maschine (Biometra GmbH, Göttingen, D) in 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol für 1 h bei 130 mA. Für die Immunodetektion spezieller Proteine auf der Nitrocellulemembran wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation mit Blockpuffer (0,3 % Milchpulver, 20 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) über Nacht bei 4 °C abgesättigt.

3.8.8 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis* Blättern (Kurzprotokoll)

Zunächst wurde Pflanzengewebe (0,5 g) in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 550 µl „Shorty“-Puffer (0,2 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1 % SDS) und 550 µl Phenol/Chloroform (1:1, pH 7,5) gut vermischt. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 20000 g erreicht. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt. Die pelletierte DNA (10 min bei 20000 g) wurde 30 min an der Luft getrocknet und in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) mit 2 µl RNase (10 mg/ml Stock) bei 37 °C für 10 min inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Phenolextraktion mit anschließender Isopropanolfällung. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE-Puffer gelöst. Für die PCR wurde 1 µl DNA verwendet.

3.8.9 Amplifizierung von Genloci und Aufreinigung des PCR Produkts

Geringe Mengen DNA können mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifisch amplifiziert werden. Dafür wurden 1 – 10 ng DNA für eine Reaktion in einem Reaktionsvolumen von 25 – 100 µl eingesetzt. Weiterhin wurden 0,25 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1 x Reaktionspuffer und 1 U *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D) hinzugefügt. Folgende Temperaturzyklen wurden verwendet:

1. Denaturierung	94 °C	3 min	} 34 Wiederholungen
2. Denaturierung	94 °C	30 min	
3. Annealing	60 °C	30 sec	
4. Elongation	72 °C	1 min / 1000 bp	
5. Elongation	72 °C	10 min	
6. Abkühlen	4 °C	∞	

Sollten Amplicons für Sequenzierungen oder Klonierungen verwendet werden, wurden die Reaktionsansätze mit dem QIAquick Purification Kit (50) (Quiagen, Hilden, D) aufgereinigt.

3.9 Biochemische Methoden

3.9.1 Tandem Affinitätsreinigung mittels TAP-Tag

Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte nach Rigaut et al. (1999). Pro Ansatz wurde mindestens 20 g Pflanzenmaterial eingesetzt. Hierzu wurde Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und in Proteinextraktionspuffer (20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 % CHAPS, 2,5 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 10 µl/ml Protease Inhibitor cocktail (Sigma)) gemörsert. Anschließend wurde der Extrakt 15 min bei 16000 g zentrifugiert um feste Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und mittels BCA Test auf seinen Proteingehalt überprüft. Dafür stellte man eine Verdünnung der Probe in 50 µl Gesamtvolumen her und versetzte diese mit 1 ml BCA Reagenz (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, München, D; 50 Teile Bicinchoninsäure (Bicinchoninic Acid) + 1 Teil CuSO₄-Lösung). Das Gemisch wurde für 15 min bei 60°C inkubiert und die Extinktion bei 560 nm

bestimmt. Die Ermittlung des Proteingehalts erfolgte über eine Eichgerade. Nun wurden je 400 µl IgG Sepharose (Amersham, Freiburg, D) und Calmodulin Beads (Amersham, Freiburg, D) in Puffer IPP 150 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 % CHAPS) bzw. in Puffer IPP 150 CBP (10 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM Mg-Acetat, 1 mM Imidazol, 2 mM CaCl₂, 0,5 % CHAPS) gewaschen. 1 mg Protein wurde mit 1 ml Puffer IPP 150 aufgefüllt und in einer Säule (Biorad, München, D) 2 h bei 4 °C rotierend mit der vorbereiteten Sepharose inkubiert. Nun wurde die Säule geöffnet und Flüssigkeit abgelassen. Es erfolgte ein Waschschriff mit 30 ml IPP 150 und darauffolgend mit 10 ml TEV Spaltungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 % CHAPS, 0,5 mM EDTA, 1 mM DDT). Nun wurde 1 ml TEC Spaltungspuffer zusammen mit 100 U TEV Enzym (Invitrogen, Karlsruhe, D) auf den Säulenboden gegeben. Die Säule wurde geschlossen und für 2 h bei 16 °C rotierend inkubiert. Die Säule wurde dann wieder geöffnet und ca. 1 ml Eluat aufgefangen. Dieses wurde mit 3 ml IPP 150 CBP aufgefüllt, mit 3 µl 1 M CaCl₂ versetzt und in die mit den gewaschenen Calmodulin Beads befüllte Säule überführt. Die Säule wurde geschlossen und für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgelassen und mit 30 ml IPP 150 CBP gewaschen. Nun wurden 5 Fraktionen von 200 µl mit IPP 150 CEP (10 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM Mg-Acetat, 1 mM Imidazol, 2 mM EGTA, 0,5 % CHAPS) eluiert. Die Eluate wurden zusammen mit Aliquots der Waschschriffe und dem Ausgangsextrakt mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.9.2 Lipidanalysen

3.9.2.1 Lipidextraction

Lipidextraktion aus *Arabidopsis* Blättern

Lipide wurden in Chloroform/Methanol nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) mit Modifizierungen extrahiert. Dazu wurde das Blattmaterial in flüssigem N₂ homogenisiert und nach Zugabe von 1 Volumenanteil 0,1 M KCl, 0,2 M H₃PO₄ und 2 Volumenanteilen CHCl₃/CH₃OH/CH₂O₂ (1:1:0,1) die Lipidphase bis zur Phasentrennung zentrifugiert (1000 g), der wässrige Überstand erneut mit CHCl₃/CH₃OH (2:1) extrahiert und die Lipidphasen vereinigt. Diese wurden dann im N₂-Strom bis zur Trockene eingeengt, in CHCl₃/CH₃OH (2:1) aufgenommen und bei

-20 °C gelagert.

Lipidextraktion aus *E.coli*

Zur Lipidextraktion aus *E.coli* wurden zu einem *E.coli* Pellet 1 Volumenanteil 0,1 M KCl, 0,2 M H_3PO_4 und 2 Volumenanteile $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1) gegeben und wie bei der Lipidextraktion aus Blättern weiter vorgegangen.

3.9.2.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der polaren Lipide

1-dimensionale Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide (ca. 50 – 100 mg Blattmaterial)

Laufmittel: Aceton/Toluol/ H_2O (91:30:8)

Dünnschichtplatten: J.T. Baker, TLC-Platten Baker Si250, PA-Konz.

Die TLC-Platten wurden kurz in 0,15 M $(NH_4)_2SO_4$ getränkt, mindestens 2 Tage getrocknet und vor Gebrauch für 2,5 h bei 120 °C aktiviert.

3.9.2.3 Anfärben der Lipide nach Dünnschichtchromatographie

Die aufgetrennten Lipide wurden mit Anilinnaphtalinsulfonsäure in Methanol (0,2% (w/v)) besprüht. Dies führt zur Fluoreszenz aller hydrophoben Komponenten unter UV-Licht (366 nm) und somit zur Visualisierung der Lipide auf der Dünnschichtplatte. Zur spezifischen Färbung der zuckerartigen Lipide wurden die Dünnschichtplatten mit einer α -Naphthol haltigen Lösung (2,4% (w/v) α -Naphthol, 10% H_2SO_4 , 80% Ethanol) besprüht und im Anschluss für 10 min bei 120 °C inkubiert. Durch die Hitze einwirkung färbten sich die zuckerhaltigen Lipide blau. Eine weitere Möglichkeit zur Färbung der Lipide war die Nutzung einer Jodkammer. Zur Dokumentation wurden die Dünnschichtplatten anschließend gescannt.

3.9.2.4 Gaschromatographische Analyse von Fettsäuremethylestern

Die Lipide wurden nach Präparation der jeweiligen Fettsäuremethylester mittels Gaschromatographie quantifiziert. Dazu wurden die Lipidbanden nach chromatographischer Auftrennung mit Hilfe einer Rasierklinge von der Glasplatte abgeschabt. Nach Zugabe von 1 ml 1 N HCl in Methanol und 5 μ g Pentadecansäure (C15:0) als internem Standard zu einem Aliquot des zu quantifizierenden Lipids bzw.

zu der isolierten Lipidbande, erfolgte die Methylierung in einem Wasserbad bei 80 °C für 30 min. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Zugabe von 1 ml 0,9 % NaCl und 1 ml Hexan, kräftiges Mischen und eine anschließende Zentrifugation (3 min, 1000 g). Die daraus resultierende obere Hexanphase wurde abgenommen, im N₂-Strom bis auf ca. 50 µl eingengt und in GC-Röhrchen überführt. Zur GC-Analyse im Gaschromatographen wurden 2 µl splitlos injiziert. Verwendet wurde eine Kapillarsäule (30 m Länge, Durchmesser 750 µm und 0,2 µm Schichtdicke; Supelco SP-2380; Sigma-Aldrich, München, D) und ein Flammenionisationsdetektor. Die Injektionstemperatur betrug 220 °C. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 11 ml/min verwendet. Die Ausgangstemperatur der Säule lag bei 100 °C und wurde 1 min lang gehalten. Anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 2,40 min auf 160 °C erhöht und in weiteren 6 min auf 220 °C gesteigert. Diese Temperatur wurde 4 min lang gehalten, bevor die Säule dann in 5 min wieder auf 100 °C abgekühlt wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Chemstation (Agilent, Böblingen, D).

3.9.2.5 Isolierung von Lipiden als Standards

Die Lipide wurden aus *Arabidopsis* Wildtyp-Blättern gewonnen. Dazu wurden die polaren Lipide über polare TLC getrennt, von der Platte durch Ausschaben isoliert und vom Kieselgel mit 2 Volumen CHCl₃/CH₃OH (2:1) und 1 Volumen 0,9 % NaCl eluiert. Die Konzentration wurde durch Gaschromatographie der Fettsäuremethylester ermittelt.

3.9.2.6 Subzelluläre Fraktionierung von MGDG und DGDG

Ungefähr 500 mg Blattmaterial wurde direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem vorgekühlten Mörser homogenisiert. Im Mörser wurde das gefrorene Pulver mit einem bei 4°C vorgekühlten Puffer (0,35 M Sorbitol, 25 mM Hepes-KOH, pH 7,8, 10 mM EDTA, 0,2 % fettfreies BSA) weiter gemörsert. Das Homogenat wurde nun durch zwei angefeuchtete Lagen Miracloth (Calbiochem, Darmstadt, D) filtriert und bei 800 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt. Das Pellet wurde nun vorsichtig in einem kleinen Volumen vorgekühlten Waschpuffer (10 mM Hepes-KOH, pH 7,8, 0,35 M Sorbitol, 10 mM EDTA)

resuspendiert und nochmals bei 800 g für 1 min zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt. Die Pellet Fraktion enthielt nun vorwiegend Chloroplastenmembranen und wurde sofort in 200 µl CHCl₃/CH₃OH/CH₂O₂ (10:10:1, v/v/v) resuspendiert. Dazu wurden 100 µl 0,2 M H₃PO₄, 1 M KCl gegeben. Alle Schritte wurden bei 4°C in der Kälte durchgeführt. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Zeit zwischen Homogenisierung und Lipid Extraktion nicht mehr als 10 min überschritt, um einen Lipidabbau durch Lipasen zu minimieren. Lipide wurden in der Chloroformphase gesammelt und unter Stickstoffstrom aufkonzentriert. Die Lipidanalyse wurde wie in 3.9.1 beschrieben, durchgeführt.

3.9.2.7 Lipidbindungstest (Lipid Binding Assay)

Expression von N-DGD1-Nus und DGD1-Nus Konstrukten in *E.coli*

Zur Expression der Proteine für den Lipidbindungstest (Lipid Binding Assay) wurden die entsprechenden Konstrukte in den Expressionsvektor pET43b kloniert und in *E. coli* (BL21 Star) exprimiert. 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 rpm, 20 min) geerntet, und mit 0,1 M HEPES pH 8 gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 0,5 M HEPES pH 8 resuspendiert. Nun erfolgte die Zugabe von Lysozym (30mg/ml) und DNase (10mg/ml). Nach 20 min bei Raumtemperatur wurde zusätzlich eine Ultraschallbehandlung durchgeführt (3 x 10 s), um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde in Solubilisierungspuffer (50 mM MOPS pH 8, 15 mM CHAPS, 20 mM MgCl₂, 20 % Glycerol (v/v), 500 mM NaCl, 1 mM DDT) aufgenommen und 60 min auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation (4500 rpm, 10 min) und Filtern des Überstandes konnte mit der Aufreinigung des Proteins begonnen werden bzw. erfolgte die Lagerung der Suspension bei -20 °C.

Aufreinigung des N-DGD1-Nus und DGD1-Nus Proteins

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Dazu wurde die zuvor gewonnene Proteinsuspension auf eine 1 ml Ni²⁺-NTA Säule gegeben, die zuvor mit Puffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 2 % Triton X-100, pH 8,0) äquilibriert worden war. Danach wurde die Säule mit je 5 ml Puffer B, 5 ml Puffer D (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 2 % Triton X-100, pH 5,9) und

wiederum 5 ml Puffer B gewaschen. Das Protein wurde dann mit 1 ml Puffer E (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 2 % Triton X-100, 300 mM Imidazol, pH 8,0) eluiert.

Lipidbindungstest (Lipid Binding Assay)

Die hier benutzten Lipide wurden entsprechend 3.9.1.5 isoliert und für den Test genutzt. 5 µg Lipid wurden punktförmig auf eine Hybond-C Membran (Amersham Pharmacia Biosciences, München, D) aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Membran wurde nun in einem Puffer (0,3 % Milchpulver, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) für 1 h geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit der proteinhaltigen Lösung (0,5 µg/ml) über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die Membran drei Mal mit TBST-Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,05% Tween 20) gewaschen und die Immunodetektion durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst die Inkubation mit einem Antikörper gegen den N-terminalen Bereich von DGD1 (1:200, Biogenes, Berlin, D) in TBST-Puffer für 2 h. Nach drei Waschschritten mit TBST-Puffer erfolgte die Markierung der spezifisch gebundenen Antikörper durch die einstündige Inkubation mit einem alkalischen Phosphatase markiertem Kaninchen Anti-IgG-AK (1:1000, Kirkegaard and Perry/Dunn Labortechnik). Nach Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper durch erneutes Waschen mit TBS-Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl) erfolgte ein Farbnachweis der Antikörper bzw. der Proteine in 10 ml Färbelösung (NBT/BCIP Tabletten, Roche, Mannheim, D)

3.9.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Arabidopsis thaliana*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen *A.thaliana* Linien wurden durch Michael Melzer am IPK Gatersleben, D angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.9.4 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana Samen wurden oberflächensterilisiert, indem die Samen 1 min in 70 % Ethanol gewaschen und für maximal 15 min in 5 % (v/v) Natriumhypochlorit, 0,1 % (v/v) Triton-X-100 inkubiert wurden. Anschließend wurden die Samen drei Mal

mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden in steriler Agarose 0,1 % (w/v) aufgenommen und gleichmäßig auf 2 MS-Medienplatten verteilt, je nach Linie mit oder ohne Antibiotikum. Diese Platten wurden über Nacht bei 4 °C vernalisiert. Die *Arabidopsis* Pflanzen wurden 10 – 14 Tage in Sterilkultur in einer Gewebekulturkammer (22°C, 16 h Tageslänge, 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 70 % Luftfeuchtigkeit) angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge auf *Arabidopsis* – Erde (Vermiculit und Gartenerde 1:1) pikiert. Das weitere Wachstum erfolgte unter *Arabidopsis thaliana* Standardbedingungen: Tag: 16 h, 20 °C, 60 % Luftfeuchte, 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Licht; Nacht: 16 °C, 75 % Luftfeuchte.

3.9.5 Anzucht von *Escherichia coli*

Von den benötigten Bakterienstämmen existierten Glycerolstocks, die bei -80 °C gelagert wurden. Für Untersuchungen wurden zunächst die gewünschten *E.coli*-Stämme aus der Glycerol-Stocksammlung auf LB-Medienplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für weitere Untersuchungen wurden Einzelkolonien von den Platten entnommen und in 3 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft (Reagenzglas mit Aluminiumkappe). Diese wurden über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln angezogen. Wurden größere Kulturen benötigt, wurde mit einer 3 ml Kultur eine 250 ml Kultur inokuliert. Die Bakterienstämme wurden gegebenenfalls mit IPTG induziert. Die Induktion erfolgte nach Erreichen der optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm. Nach ca. 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 g geerntet.

4. Ergebnisse

4.1 Expression des N-terminalen Bereichs von DGD1 in WT-Col2

DGD1 setzt sich aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne zusammen. Der C-terminale Bereich von DGD1 hat Glykosyltransferase Aktivität wohin gegen zur Funktion vom N-terminalen Bereich von DGD1 nur wenig bekannt ist. Froehlich *et. al.* (2001) zeigten, dass der N-terminale Bereich von DGD1 für die korrekte Lokalisierung des DGD1 Proteins in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten notwendig ist. Um die Funktion der N-terminalen Domäne von DGD1 weiter aufzuklären wurde N-DGD1 in *Arabidopsis thaliana* WT-Col2 überexprimiert. Dazu wurde N-DGD1 in den pflanzlichen Expressionsvektor pBINAR kloniert und zur Transformation von *Arabidopsis* WT-Col2 eingesetzt. Es erfolgte eine Auswahl transgener Linien durch Western Blot und Northern Blot Analyse (Abb.4, Abb.5).

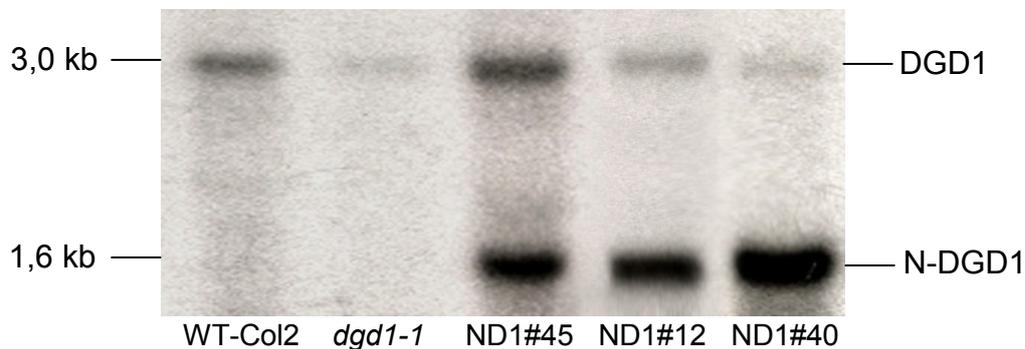


Abb.4: Die Überexpression von N-DGD1 kann durch Northern Blot Analyse nachgewiesen werden. Zwei Signale korrespondierend zur WT DGD1 mRNA (3,0 kb) und zur N-DGD1 mRNA (1,6 kb) wurden in den transgenen Linien detektiert.

Nach Northern Blot Analyse der N-DGD1 Überexpressionslinien konnten zwei verschiedene Signale detektiert werden (Abb.4). Ein ca. 3,0 kb großes RNA Fragment und ein ca. 1,6 kb großes RNA Fragment hybridisierte mit der *N-DGD1* cDNA Sonde in den N-DGD1 Überexpressionslinien. Diese Signale konnten der DGD1 mRNA bzw. der N-DGD1 mRNA zugeordnet werden. Im WT-Col2 und in der *dgd1-1* Mutante wurde nur ein Hybridisierungssignal für DGD1 detektiert. Die DGD1 Bande in der *dgd1-1* Mutante, welche eine Punktmutation im kodierenden Bereich trägt (Dörmann *et al.*, 1999), war deutlich schwächer als im WT-Col2.

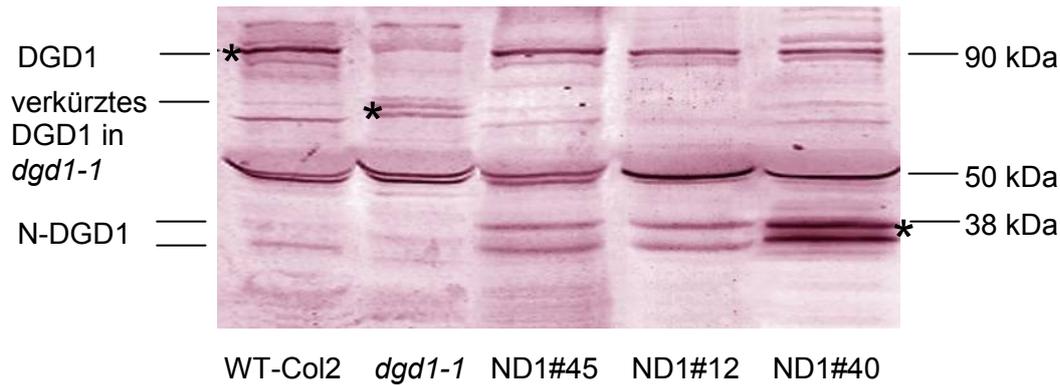


Abb.5: Die Überexpression von N-DGD1 in WT-Col2 kann durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Zwei Polypeptide mit einer Größe von ca. 38 und 36 kDa können in den Überexpressionslinien detektiert werden. Diese Signale korrespondieren mit der Größe von N-DGD1 (M^1-E^{338}). Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen Anti-N-DGD1 Antikörper. Der Blot wurde mit Hilfe der alkalischen Phosphatase Reaktion gefärbt. Die Färberreaktion wurde sehr lange durchgeführt, um schwache Banden zu erkennen. Spezifische Reaktionen sind durch Sternchen gekennzeichnet. Andere Banden, insbesondere die 55 kDa Bande (RUBISCO Große Untereinheit) stellen unspezifische Kreuzreaktionen dar.

Die Western Blot Analyse der Überexpressionslinien ergab eine verstärkte Akkumulation von zwei Polypeptiden mit einer Größe von 38 und 36 kDa (Abb.5). Die 38 kDa Bande entspricht der Größe des N-DGD1 Proteins mit einer Größe von 38,3 kDa (M^1-E^{338}). Das Protein mit einer Größe von ca. 36 kDa stellt wahrscheinlich ein Degradationsprodukt des N-DGD1 Proteins dar. Diese Polypeptide konnten im WT-Col2 und in der *dgd1-1* Mutante nicht nachgewiesen werden. Die Überexpressionslinien zeigen neben dem N-DGD1 Protein auch das vollständige DGD1 Protein mit einer Größe von 91,8 kDa (M^1-W^{808}). Dieses wurde ebenfalls im WT-Col2 detektiert jedoch nicht in der *dgd1-1* Mutante. DGD1 Protein in einer verkürzten Form akkumulierte in der *dgd1-1* Mutante mit einer Größe von 64,1 kDa (M^1-E^{563}). Ein verkürztes Protein in der *dgd1-1* Mutante resultiert aus einem vorzeitigen Stopkodon nach der Aminosäure E^{563} (Dörmann *et al.*, 1995; Dörmann *et al.*, 1999). Neben den hier beschriebenen Banden wurde weitere Banden detektiert, welche lediglich unspezifische Kreuzreaktionen darstellen.

Von den durch Northern Blot und Western Blot analysierten Linien wurden Pflanzen angezogen, deren Wachstum mit WT-Col2 Kontrollpflanzen und *dgd1-1* Mutanten verglichen wurde. Die Überexpression von N-DGD1 führt zu einem veränderten Wachstum (Abb.6).



Abb.6: Überexpression von N-DGD1 in WT-Col2 resultiert in einem veränderten Wachstum. Das Wachstum der unabhängigen Linien ND1#45, ND1#12 und ND1#40 unterscheidet sich vom WT durch ein gehemmttes Wachstum, gleicht jedoch nicht dem reduzierten *dgd1-1* Wachstum.

N-DGD1 Überexpressionspflanzen im WT-Col2 Hintergrund unterscheiden sich hinsichtlich ihres Wachstums erheblich von WT-Col2 Kontrollpflanzen. Die analysierten Linien zeigen ein eingeschränktes Gesamtwachstum sowie ein lanzettförmiges Blattwachstum. Das *dgd1-1* Wachstum, welches gekennzeichnet ist durch ein eingeschränktes Wachstum und einer gelbliche Färbung der Blätter, unterscheidet sich somit von den beschriebenen Überexpressionslinien.

Von denen transgenen Linien ND1#45, ND1#12 und ND1#40 wurden Lipide isoliert und quantifiziert (Abb.7), da ein reduziertes Wachstum Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Linien vermuten lässt. Es wurden keine Unterschiede im Phospholipidgehalt der Linien im Vergleich zum WT-Col2 gefunden.

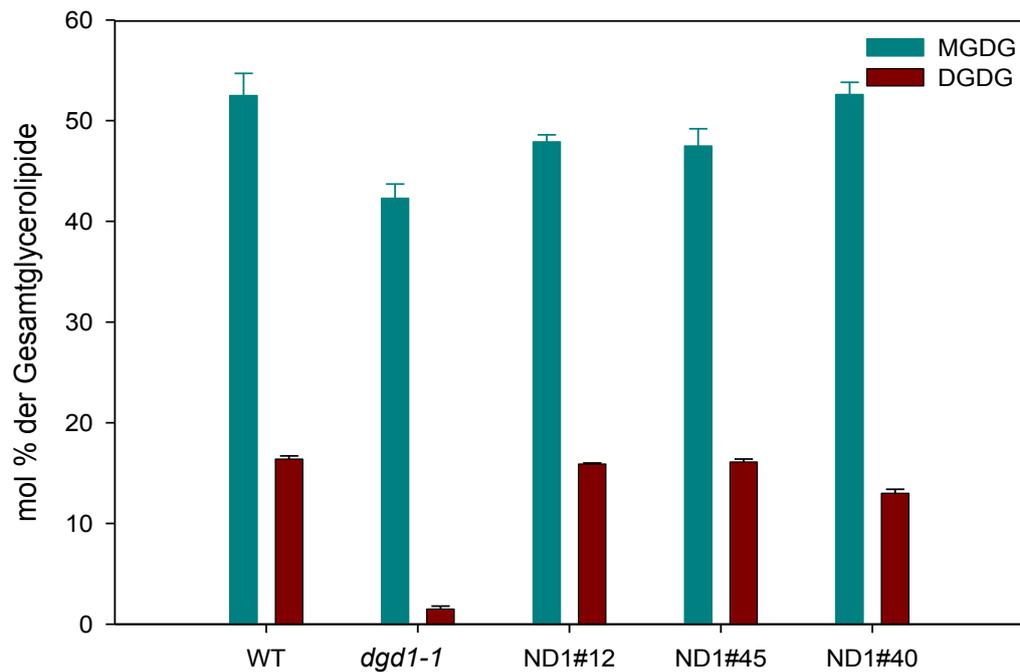


Abb.7: Quantifizierung der polaren Lipide MGDG und DGDG in transgenen ND1 Überexpressionslinien. Zur Quantifizierung der polaren Lipide wurden die Lipidextrakte durch DC getrennt, die einzelnen Lipidklassen isoliert und durch Gaschromatographie quantifiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert in mol % mit SD (Dreifachbestimmung).

Die Quantifizierung der Galaktolipide MGDG und DGDG in den drei ausgewählten Überexpressionslinien ergab, dass in den transgenen Linien der Gehalt an diesen Lipiden vergleichbar mit WT-Col2 ist. Im Gegensatz dazu steht die *dgd1-1* Mutante welche eine starke Reduktion an DGDG Lipid aufweist. Die Lipidanalyse und die durch Western Blot und Northern Blot gewonnenen Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die untersuchten Linien keinem Kosuppressionseffekt unterliegen, sondern, dass der veränderte Wachstumsphänotyp eine Folge der Überexpression von N-DGD1 in WT-Col2 ist.

Der durch ein eingeschränktes Wachstum und lanzettförmige Blätter geprägte Wachstumsphänotyp der N-DGD1 Überexpressionslinien lässt vermuten, dass es zu Veränderungen in der Ultrastruktur des Chloroplasten kommen könnte. Aus diesem Grund wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten aus WT-Col2, *dgd1-1*, ND1#45, ND1#12, ND1#40 erstellt (Abb.8).

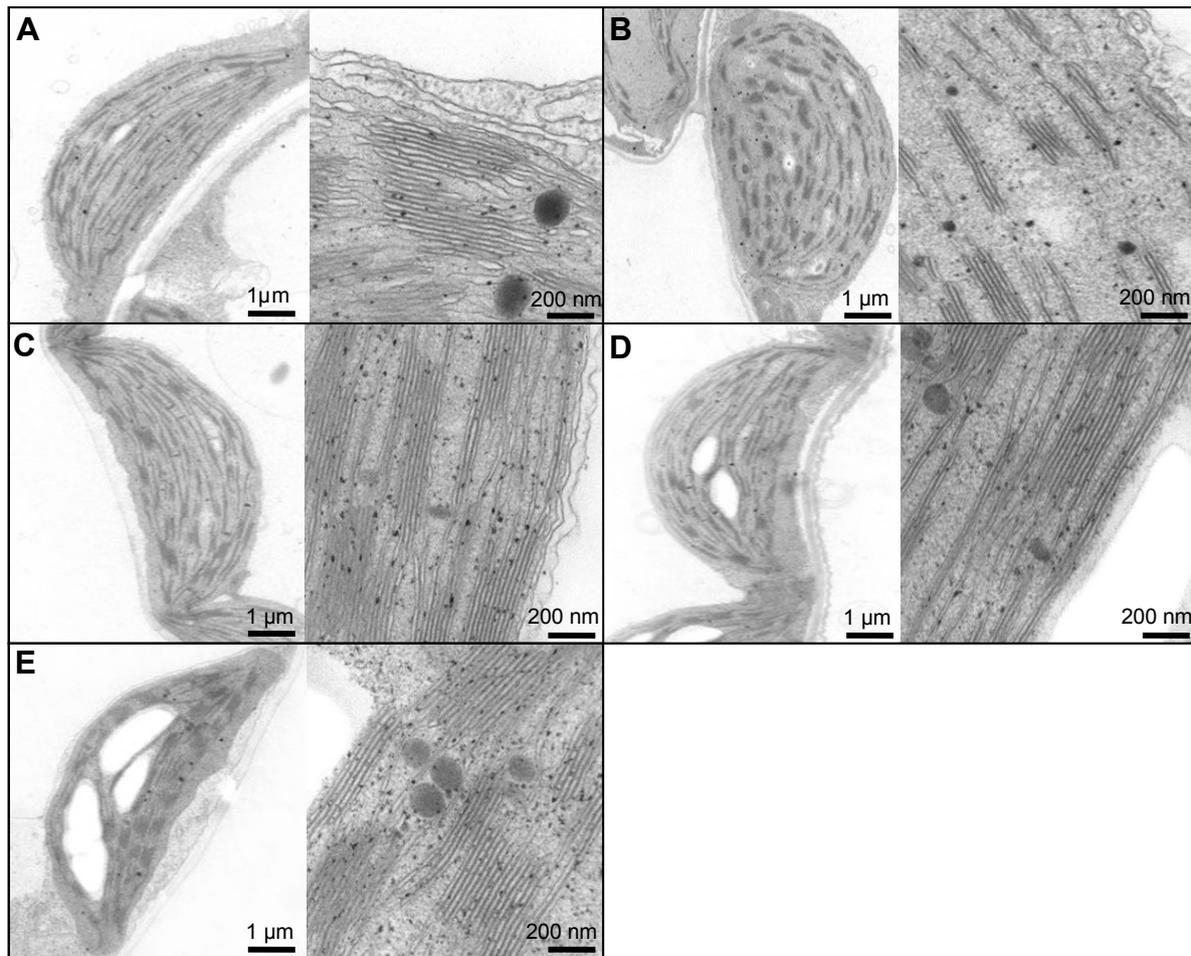


Abb.8: Ultrastruktur von Chloroplasten verschiedener N-DGD1 Überexpressionslinien (10000facher bzw. 71000facher Vergrößerung). **(A)** WT-Col2; **(B)** *dgd1-1*; **(C)** ND1#45; **(D)** ND1#12; **(E)** ND1#40

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb.8) konnte gezeigt werden, dass die Ultrastruktur der Chloroplasten unverändert ist.

4.2 Expressionsstudien in *E.coli* zur Untersuchung des Einfluss von N-DGD1 für die DGDG Synthese

Die DGDG Synthese Aktivität ist abhängig von der Anwesenheit von MGDG als Substrat (Heemskerk *et al.*, 1990). Um mehr Informationen über die Funktion des N-terminalen Bereichs von DGD1 zu erhalten, wurden Expressionsstudien in *E.coli* durchgeführt. Folgende Konstrukte mit verschiedenen Glykosyltransferase Fusionen aus *Arabidopsis* wurden zusammen mit einer MGD1 Synthase aus Gurke (Shimojima *et.al.*, 1997) in *E.coli* exprimiert (Abb.9). Es wurde die vollständige DGD1 cDNA

verwendet sowie jeweils separat der N-terminale und der C-terminale Bereich von DGD1. Weiterhin wurde eine DGD2 cDNA in *E.coli* exprimiert sowie eine chimäres Konstrukt mit dem N-terminalen Bereich von DGD1 und DGD2. Alle Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pACYC31 kloniert. Da MGDG als Substrat für die DGDG Synthese unabdingbar ist, wurde ein zweiter Expressionsvektor pGEX-3X verwendet, welcher eine MGD1 cDNA aus Gurke enthielt. Die MGDG Synthese wurde zusammen mit jeweils einem Konstrukt der Glykosyltransferase Fusionen zusammen in *E.coli* coexprimiert.

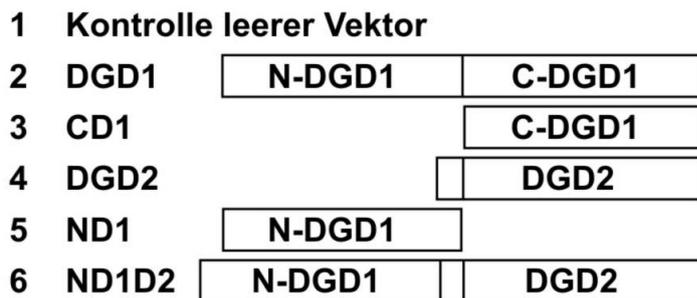


Abb.9: In *E.coli* transferierte Glykosyltransferasen mit verschiedenen N-terminalen Fusionen. (1) leerer Vektor. (2) DGD1 komplett. (3) C-terminaler Bereich von DGD1. (4) DGD2. (5) N-terminaler Bereich von DGD1. (6) chimäres Konstrukt aus dem N-terminalen Bereich von DGD1 und DGD2.

Aus diesen Kulturen wurden Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die zuckerhaltigen Lipide MGDG und DGDG wurden auf Dünnschichtplatten mit α -Naphthol gefärbt.

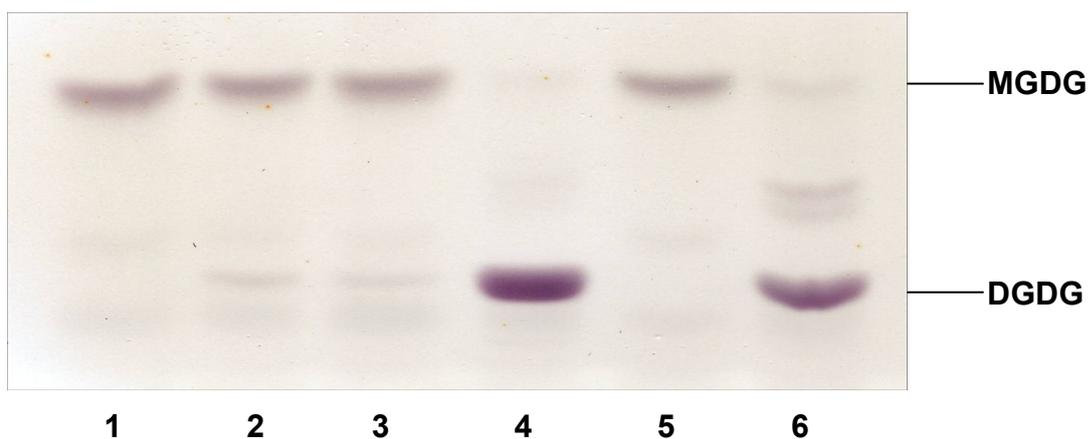


Abb.10: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der polaren Lipide MGDG und DGDG nach Koexpression von MGD1 aus Gurke und unterschiedlichen Glykosyltransferase Fusionskonstrukten aus *Arabidopsis* in *E.coli*. (1) pACYC31 leer koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (2) DGD1 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (3) C-DGD1 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (4) DGD2 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (5) N-DGD1 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (6) N-DGD1-DGD2 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*.

Nach Expression von DGD2 in Anwesenheit von MGD1 konnte eine große Menge an MGDG zur Synthese von DGDG genutzt werden und damit zu einer erheblichen Anreicherung dieses Lipids in *E.coli* führen (Kelly *et al.*, 2002). Durch eine Färbung mit α -Naphthol konnte die Präsenz von Zuckermolekülen in der Kopfgruppe nachgewiesen werden und in Verbindung mit einem DGDG Standard damit die korrekte Identität dieses Lipids (Abb.10). Es ist zu beobachten, dass die Menge an akkumulierendem DGDG in Zellen, die MGD1 und DGD2 exprimieren (Spur 4) weitaus größer ist, als in Zellen die MGD1 und DGD1 exprimieren (Spur 2) bzw. MGD1 und den C-terminalen Bereich von DGD1 (Spur 3). Nach Expression des N-terminalen Bereichs von DGD1 in Anwesenheit von MGD1 konnte keine Anreicherung von DGDG Lipid detektiert werden (Spur 5). Daraus folgt, dass der N-terminale Bereich von DGD1 wahrscheinlich keine Galaktolipid-Synthese Aktivität besitzt. Eine größere Menge an DGDG konnte jedoch in Zellen festgestellt werden die N-DGD1 fusioniert mit DGD2 in Anwesenheit von MGD1 exprimierten (Spur 6). Die Menge an DGDG war jedoch geringer, als in Zellen die nur DGD2 in Anwesenheit von MGD1 exprimieren.

Um Herauszufinden, ob der N-terminale Bereich von DGD1 das Wachstum der Zellen in positiver bzw. negativer Weise beeinflusst, wurde eine Wachstumskurve mit den zuvor beschriebenen Kulturen erstellt (Abb.11).

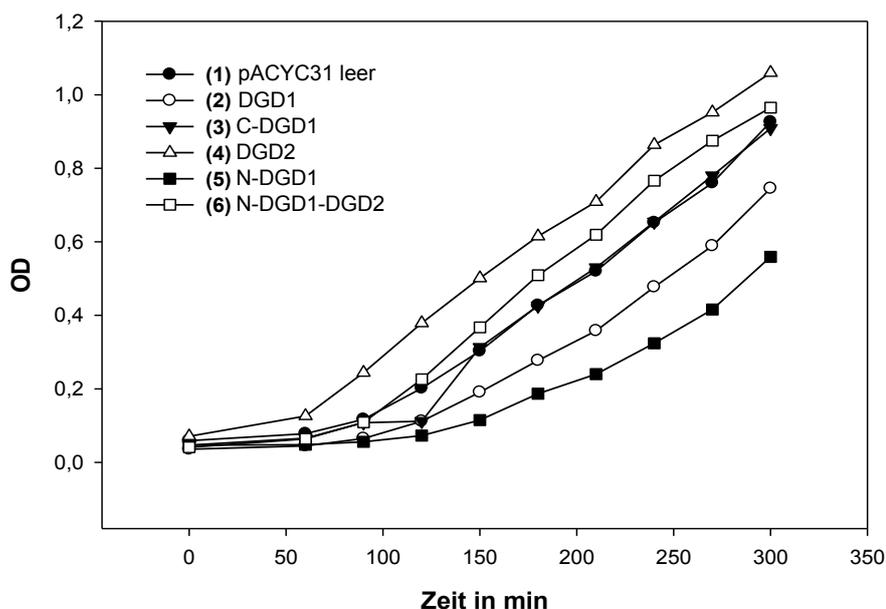


Abb.11: Wachstum von verschiedenen in *E.coli* exprimierten Glykosyltransferase Fusionenkonstrukten aus *Arabidopsis*. (1) pACYC31 leer koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (2) DGD1 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (3) C-DGD1 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (4) DGD2 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (5) N-DGD1 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*. (6) N-DGD1-DGD2 koexprimiert mit MGD1 in *E.coli*.

Die Wachstumskapazität von Zellen in denen der C-terminale Bereich von DGD1 und MGD1 coexprimiert wird entspricht der Kontrolle. Im Gegensatz dazu kann man ein gehemmtes Wachstum für Zellen beobachten, die nur den N-terminalen Bereich bzw. den gesamten DGD1 Bereich zusammen mit MGD1 coexprimieren. Dies lässt vermuten, dass der N-terminale Bereich von DGD1 toxisch für das *E.coli* Wachstum ist. Es konnte festgestellt werden, dass Zellen welche die MGD1 Synthase aus Gurke und DGD2 aus *Arabidopsis* exprimieren eine erhöhte Wachstumskapazität im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Ebenfalls zeigte das chimäre Konstrukt N-DGD1-DGD2 coexprimiert mit MGD1 ein vermehrtes Wachstum. Dies korreliert mit der verstärkten Akkumulation von DGDG nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Lipide (Abb.10). Zu berücksichtigen ist, dass die Akkumulation des non-Bilayer bildenden Lipids MGDG in *E.coli* (z.B. Kontrolle, Spur 1) bereits das Wachstum negativ beeinflusst. Die Umwandlung eines beträchtlichen Teils von MGDG in das Bilayer bildende Lipid DGDG, wie bei den beiden DGD2 enthaltenden *E.coli* Linien, führt daher möglicherweise zu einer Veränderung der Membranstruktur und daher zu einem verbesserten Wachstum.

4.3 Charakterisierung der transgenen Überexpressionsline N-MGD1-DGD2

Zur weiteren Aufklärung der Funktion der DGDG Synthesen wurde nicht nur ein Ansatz im heterologen System verfolgt (*E.coli*), sondern auch eine Analyse in der Pflanze. Dazu wurde ein chimäres Konstrukt aus dem N-terminalen Bereich von MGD1 und DGD2 in *dgd1-1* überexprimiert. So sollte geklärt werden, ob eine Überexpression dieses Konstrukts zu einer Verschiebung des Lipidverhältnisses zugunsten von DGDG führt und ob dieses Enzym in der Lage ist, den in *dgd1-1* reduzierten DGDG Gehalt und das reduzierte Wachstum zu komplementieren. Dieses Experiment könnte auch Hinweise darüber geben, ob der N-terminale Bereich von MGD1 als Transitpeptid fungieren kann und so durch DGD2 synthetisiertes DGDG in die Thylakoiden transportiert wird. Weiterhin könnten bestehende Substratspezifitäten von DGD2 analysiert werden.

Das chimäre Konstrukt N-MGD1-DGD2 wurde in den binären Vektor pCAMBIA1200 kloniert und zur Transformation in *Arabidopsis dgd1-1* Pflanzen eingesetzt. Daraus

resultierte eine Komplementation des *dgd1-1* Wachstums (Abb.12). Es konnten drei unabhängige transgene Linien generiert werden.



Abb.12: Überexpression von N-MGD1-DGD2 führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten *dgd1-1* Wachstums. Transgene NM1D2#2 Linie zeigt ein verbessertes Wachstum im Vergleich zu *dgd1-1*.

Die selektierten transgenen Linien zeigen ein wildtypähnliches Wachstum im Vergleich zur im Wachstum sehr eingeschränkten *dgd1-1* Mutante (Abb.12). Um herauszufinden ob sich ein verbesserte Wachstum in der verstärkten Akkumulation von DGDG in den transgenen Linien widerspiegelt, wurden die polaren Lipide der untersuchten Linien extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Abb.13). Die drei unabhängigen transgenen Linien zeigen trotz wildtypähnlichen Wachstums eine unterschiedlich starke Akkumulation an DGDG Lipid.

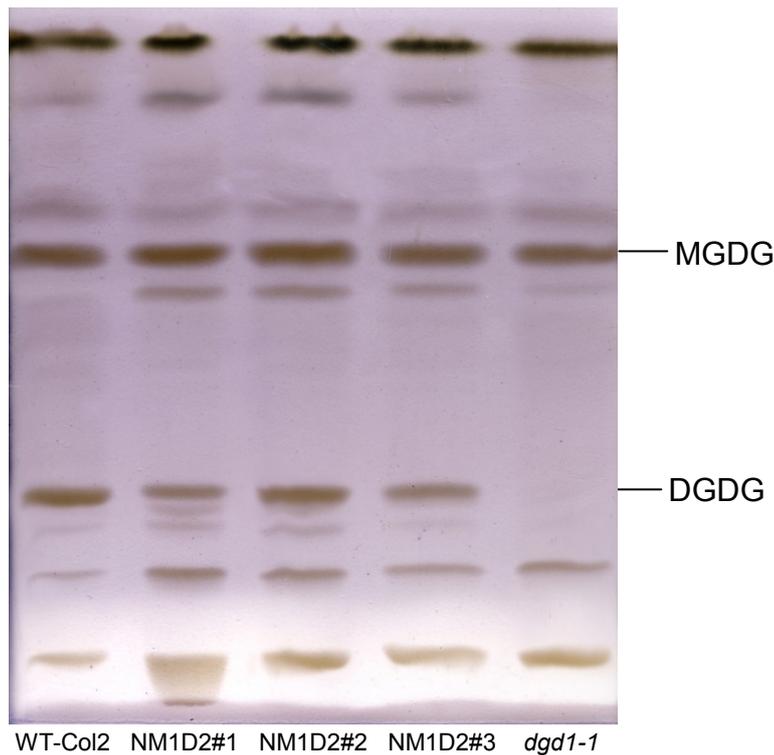


Abb.13: Überexpression von N-MGD1-DGD2 führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten *dgd1-1* Lipidgehalts. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der polaren Lipide zeigt eine erhöhte Akkumulation von DGDG Lipid bei allen untersuchten Linien im Vergleich zur *dgd1-1* Mutante.

Von der ausgewählten Linie NM1D2#2 wurden Lipide isoliert und quantifiziert, da diese am meisten DGDG akkumulierte (Tab.1). Hierbei zeigte sich, dass die Überexpression dieses chimären Konstrukts zu einer Verschiebung des Lipidmusters führt.

Tab.1: Quantifizierung der polaren Lipide in transgenen NM1#D2 Überexpressionslinien. Zur Quantifizierung der polaren Lipide wurden die Lipidextrakte durch DC getrennt, die einzelnen Lipidklassen isoliert und durch Gaschromatographie quantifiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert in mol % mit SD (Dreifachbestimmung).

Lipid in mol%	WT-Col2	<i>dgd1-1</i>	NM1D2#2
MGDG	56,6 ± 2,1	54,5 ± 0,4	49,6 ± 1,5
PG	4,6 ± 1,5	8,5 ± 0,1	11,2 ± 0,1
DGDG	17,6 ± 1,3	0,9 ± 0,3	9,5 ± 0,4
SL	0,9 ± 0,8	1,0 ± 0,0	3,7 ± 0,6
PE	6,9 ± 0,2	13,4 ± 0,7	10,1 ± 0,6
PC	13,5 ± 0,8	21,7 ± 0,9	15,9 ± 1,2

Die Quantifizierung der Galaktolipide der transformierten *dgd1-1* Linien bestätigte, dass der DGDG Gehalt wieder angestiegen ist, jedoch in dieser ausgewählten Linie nicht WT Werte erreicht (NM1D2#2: ca. 54 % DGDG vom WT Wert). Obwohl der DGDG Gehalt im Vergleich zum WT immer noch reduziert ist, können die Pflanzen optisch vom WT kaum unterschieden werden. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass der MGDG Gehalt sowohl in den Kontrollpflanzen als auch in der transgenen Linie unverändert ist. Der intermediäre DGDG Gehalt in der transgenen *dgd1-1* Linie spiegelt sich auch im Gehalt der Phospholipide wieder. Während der Anteil der Phospholipide (PG, PE, PC) and den polaren Lipiden in der *dgd1-1* Mutante im Vergleich zum WT stark erhöht ist (WT: 25 %; *dgd1-1*: 43,6 %), liegt der Anteil der Phospholipide in der transgenen *dgd1-1* Linie dazwischen (NM1D2#2: 37,2 %).

Mittels Gaschromatographie können die Lipide nicht nur quantifiziert werden, anhand der Fettsäurezusammensetzung ist es auch möglich, Auskünfte über ihre Herkunft (pro- bzw. eukaryotisch) zu gewinnen (Tab.2). Die Expression des N-MGD1-DGD2 Konstrukts im *dgd1-1* Hintergrund führt nicht nur zu einer Verschiebung der Lipidzusammensetzung, sondern auch zu einer Veränderung der Fettsäurezusammensetzung in den Galaktolipiden MGDG und DGDG.

Tab.2: Fettsäurezusammensetzung von MGDG und DGDG in einer N-MGD1-DGD2 Überexpressionslinie. Zur Quantifizierung der Fettsäuren wurden die Lipidextrakte durch DC getrennt, die einzelnen Lipidklassen isoliert und durch Gaschromatographie getrennt. Die Werte repräsentieren den Mittelwert der verschiedenen Fettsäuren in mol % mit SD (Dreifachbestimmung).

	WT-Col2	<i>dgd1-1</i>	NM1D2#2	WT-Col2	<i>dgd1-1</i>	NM1D2#2
FS	mol % MGDG			mol % DGDG		
C16:0	0,7 ± 0,0	5,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	12,1 ± 0,4	25,5 ± 1,0	4,4 ± 1,2
C16:1	0,4 ± 0,0	3,7 ± 0,6	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	4,5 ± 0,8	0,6 ± 0,1
C16:2	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,5	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,7 ± 1,2	0,5 ± 0,1
C18:0	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,8 ± 0,1	3,8 ± 0,3	0,0 ± 0,0
C16:3	42,3 ± 0,8	15,6 ± 0,6	23,1 ± 0,5	3,4 ± 0,1	3,5 ± 1,0	12,6 ± 0,6
C18:1	0,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,2	5,0 ± 1,5	0,7 ± 0,1
C18:2	1,7 ± 0,1	2,6 ± 0,5	0,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	9,0 ± 2,0	2,2 ± 0,6
C18:3	53,6 ± 0,6	70,1 ± 1,3	73,5 ± 0,5	77,8 ± 0,5	47,2 ± 3,5	79,0 ± 2,1

Wie schon zuvor beschrieben (Dörmann *et al.*, 1995) ist der Anteil verschiedener Fettsäuren sowohl in MGDG als auch in DGDG in der *dgd1-1* Mutante verändert. Obwohl der Gesamtanteil des MGDG gleich groß ist, enthält es prozentual mehr C16:0 und C18:3 Fettsäuren, jedoch sehr viel weniger C16:3 (statt ca. 42 % wie im WT nur noch ca. 16 % in *dgd1-1*). In der N-MGD1-DGD2 Überexpressionslinie im *dgd1-1* Hintergrund liegen die prozentualen Werte dieser Fettsäure (ca. 23 % C16:3) jeweils zwischen den WT und den *dgd1-1* Werten, obwohl auch hier der Gesamtanteil des MGDG an den polaren Lipiden unverändert ist.

Auch die Fettsäurezusammensetzung des DGDG Lipids in der transgenen *dgd1-1* Linie weicht sowohl vom WT- als auch vom *dgd1-1* Muster ab. Besonders auffällig ist der hohe Gehalt an C16:3 Fettsäuren, der in der transgenen *dgd1-1* Linie ca. 13 % beträgt, im WT und in *dgd1-1* jedoch nur bei ca. 4 % liegt. Dagegen ist der Anteil an C16:0 Fettsäuren in der transgenen Linie reduziert. Während der Anteil im WT bei ca. 12 % und in der *dgd1-1* Mutante bei ca. 26 % liegt, beträgt er in der transgenen Linie nur ca. 4 %.

4.4 Der Einfluss von N-DGD1 bei der Biosynthese von extraplastidären DGDG in *Arabidopsis thaliana*

DGDG ist nicht nur für die Photosynthese von äußerster Wichtigkeit, DGDG spielt ausserdem eine wichtige Rolle in der Regulation des Phosphathaushalts. Unter Phosphatmangel wird die Expression von den zwei DGDG Synthasen DGD1 und DGD2 induziert. Dabei wird DGD1 ständig exprimiert, wogegen die Expression von DGD2 nur unter Phosphatmangel induziert wird. Dies resultiert in der Akkumulation von DGDG in plastidären und extraplastidären Membranen (Härtel *et al.*, 2000; Kelly & Dörmann, 2002; Kelly *et al.*, 2003). Ziel des folgenden Experiments war es, herauszufinden, ob die Überexpression von DGD2 bzw. die Überexpression von einem chimären Konstrukt aus dem N-terminalen Bereich von DGD1 und DGD2 (Amélie Kelly, Dissertation 2003) zu einer Akkumulation von DGDG in extraplastidären Membranen führt. Blattextrakte der analysierten Linien wurden mittels Zentrifugation in eine mit Plastiden angereicherte Fraktion und in eine Fraktion, welche mit extraplastidären Membranen angereichert ist, aufgetrennt

(Härtel *et al.*, 2000). Die Lipide wurden isoliert und mittels Dünnschichtchromatographie getrennt. Die zu analysierenden Lipidklassen wurden isoliert und durch Gaschromatographie quantifiziert (Tab.3). Als ein Marker für die Reinheit nach einer Isolation extraplastidärer Membranen wurde PE (Phosphatidylethanolamin) gewählt. PE kommt ausschließlich in extraplastidären Membranen in relativ hohen Mengen vor. Um Kontaminierungen der extraplastidären Membranfraktion mit plastidären Membranfraktionen zu untersuchen, wurde als zweiter Marker MGDG eingesetzt. MGDG ist in großen Mengen in plastidären Membranen vorhanden. Durch Verunreinigung der extraplastidären Membranfraktion mit plastidären Teilen ist auch dort MGDG zu finden. Jedoch ist der Grad der Verunreinigung in allen Linien relativ konstant und die erhobenen Daten somit trotzdem aussagekräftig.

Tab.3: Anreicherung von DGDG in extraplastidären Membranenfraktionen. Es wurden Lipide aus verschiedenen subzellulären Fraktionen von verschiedenen *dgd1-1* Mutanten und WT-Col2 isoliert. Zur Quantifizierung der polaren Lipide wurden die Lipidextrakte durch DC getrennt, die einzelnen Lipidklassen isoliert und durch Gaschromatographie quantifiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert in mol % mit SD (Dreifachbestimmung).

Linie	Fraktion	DGDG	MGDG	PE
WT-Col2	Pellet	20,1 ± 4,6	52,3 ± 3,0	5,4 ± 3,3
	Überstand	8,6 ± 0,8	22,4 ± 1,5	26,3 ± 5,0
<i>dgd1-1</i>	Pellet	5,7 ± 5,7	53,6 ± 16,8	3,6 ± 0,4
	Überstand	4,7 ± 2,5	20,4 ± 3,8	21,1 ± 1,9
DGD2 in <i>dgd1-1</i>	Pellet	6,0 ± 1,1	62,9 ± 4,1	3,7 ± 0,2
	Überstand	6,0 ± 2,4	35,5 ± 3,0	18,7 ± 1,4
N-DGD1- DGD2 in <i>dgd1-1</i>	Pellet	9,9 ± 0,8	50,4 ± 3,7	3,6 ± 1,2
	Überstand	4,5 ± 1,4	21,6 ± 5,3	23,4 ± 1,6

Im Hinblick auf die Lokalisation von DGDG in plastidären und extraplastidären Membranen in den untersuchten Linien konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden. Im WT-Col2 wurde eine deutliche Anreicherung an DGDG Lipid in den plastidären Membranen festgestellt. Der Anteil an DGDG Lipid betrug hier ca. 20,1%, wogegen in den extraplastidären Membranen nur ca. 8,6 % DGDG gefunden

wurden. Dieses Ergebnis entspricht der Theorie, dass die ständig exprimierte DGDG Synthase DGD1 den größten Anteil an DGDG synthetisiert. In der *dgd1-1* Mutante ist nur noch DGD2 als Glykosyltransferase aktiv. Es wurde ein annähernd ähnlicher Anteil an DGDG in der plastidären Fraktion (ca. 5,7 mol%) sowie in der extraplastidären Membranfraktion (ca. 4,7 mol%) gefunden. In der transgenen *dgd1-1* Mutante welche DGD2 überexprimiert, konnten leichte Unterschiede im Hinblick auf *dgd1-1* festgestellt werden. Der Anteil an extraplastidärem DGDG ist in dieser Mutante leicht angestiegen (D2-*dgd1-1*: ca. 128 % vom *dgd1-1* Wert). Der Anteil an plastidärem DGDG hat sich jedoch nicht verändert (ca. 6 %). Somit spiegelt sich eine Überexpression von DGD2 klar im Anstieg an DGDG in den extraplastidären Membranen wieder. Die Expression von einem chimären Konstrukt aus dem N-terminalen Bereich von DGD1 und DGD2 in *dgd1-1* resultiert in einer vermehrten DGDG Akkumulation in der plastidären Membranfraktion im Vergleich zur *dgd1-1* Mutante (N1D2-*dgd1-1*: 173 % vom *dgd1-1* Wert). Dagegen ist in der extraplastidären Membranfraktion nur ein geringer Anteil an DGDG zu finden (N1D2-*dgd1-1*: 96 % vom *dgd1-1* Wert).

4.5 Bindungsstudien zur Analyse von Interaktionen polarer Lipide mit N-DGD1 und DGD1 Protein

Um herauszufinden in welcher Weise DGD1 Protein Einfluss auf die Funktion verschiedener polarer Lipide besitzt, wurde ein Lipidbindungstest durchgeführt. Dabei sollte auch der Einfluss des N-terminalen Bereichs von DGD1 untersucht werden, da die Funktion dieses Bereichs weitestgehend unerforscht ist. Für die vorliegende Bindungsstudie wurden zwei verschiedene Konstrukte verwendet. Zum Einen wurde ein chimäres Konstrukt verwendet, welches DGD1 in vollständiger Länge enthält und zusätzlich einen Nus-Tag und einen 6xHis-Tag. Zum Anderen wurde ein Konstrukt verwendet, welches neben den eben erwähnten Tags nur den N-terminalen Bereich von DGD1 beinhaltet (Abb.14). Der NusA-Tag wurde verwendet, da er ein natives *E.coli* Protein darstellt, welches die Löslichkeit vom Zielprotein fördert, wogegen der 6xHis-Tag erforderlich war, um eine Aufreinigung der Proteine durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie zu gewährleisten.



Abb.14: Struktur der in *E.coli* exprimierten Konstrukte für Protein-Lipid-Bindungsstudien. Die verwendeten Konstrukte wurden freundlicherweise von Amélié Kelly zur Verfügung gestellt (unveröffentlicht).

Diese Konstrukte wurden in *E.coli* exprimiert und die Synthese der jeweiligen Proteine mit IPTG induziert. Eine Aufreinigung der synthetisierten Proteine erfolgte durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Für den Lipidbindungstest wurden 5 µg des verwendeten Lipids auf eine Nylonmembran punktförmig aufgetragen. Die vorbereitete Membran wurde geblockt und dann mit 0,5 µg/ml Protein in Blockpuffer inkubiert. Die Detektion des gebundenen Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Anti-N-DGD1-Antikörper (1:200). Danach erfolgte die Markierung der spezifisch gebundenen Antikörper durch die Inkubation mit einem mit alkalischer Phosphatase markierten Kaninchen Anti-IgG-Antikörper. Die Färbung der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der alkalischen Phosphatase Reaktion.

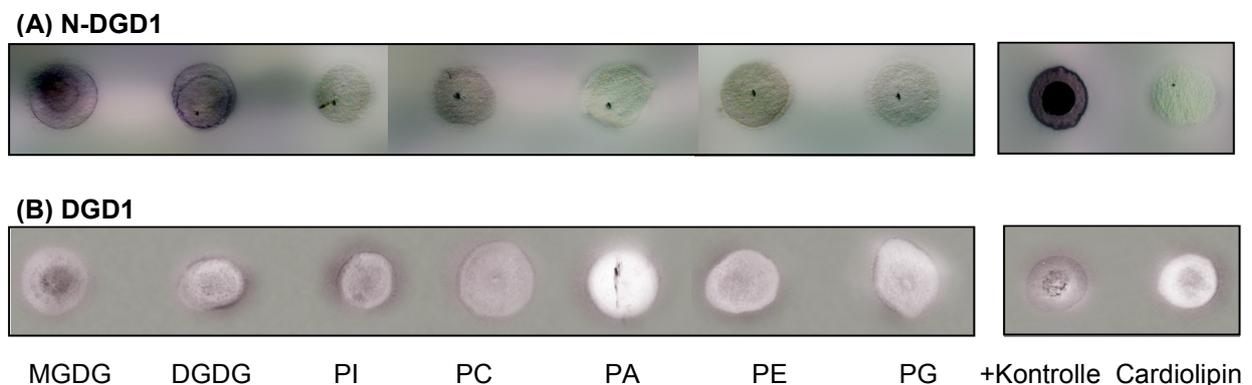


Abb.15: Lipidbindungstest von verschiedenen polaren Lipiden nach Inkubation mit gereinigtem DGD1 und N-DGD1 Protein. Es wurden je 5 µg der polaren Lipide MGDG, DGDG, PI, PC, PA, PE und PG punktförmig auf eine Nylonmembran aufgetropft und mit 0,5 µg/ml N-DGD1 Proteinlösung bzw. mit 0,5 µg/ml DGD1 Proteinlösung inkubiert. **(A)** Nach Inkubation mit gereinigtem N-DGD1 Protein und Immundetektion mit einem polyklonalen Kaninchen Anti-N-DGD1 Antikörper konnte nach Färbung des Blots eine Interaktion für MGDG und DGDG nachgewiesen werden. **(B)** Nach Inkubation mit gereinigtem DGD1 Protein und Immundetektion mit einem polyklonalen Kaninchen Anti-N-DGD1 Antikörper konnte nach Färbung des Blots eine Interaktion für MGDG und DGDG und PI nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle wurde gereinigtes N-DGD1 Protein (A) bzw. gereinigtes DGD1 Protein (B) auf die Nylonmembran appliziert. Als Negativ-Kontrolle wurde das polare Lipid Cardiolipin appliziert.

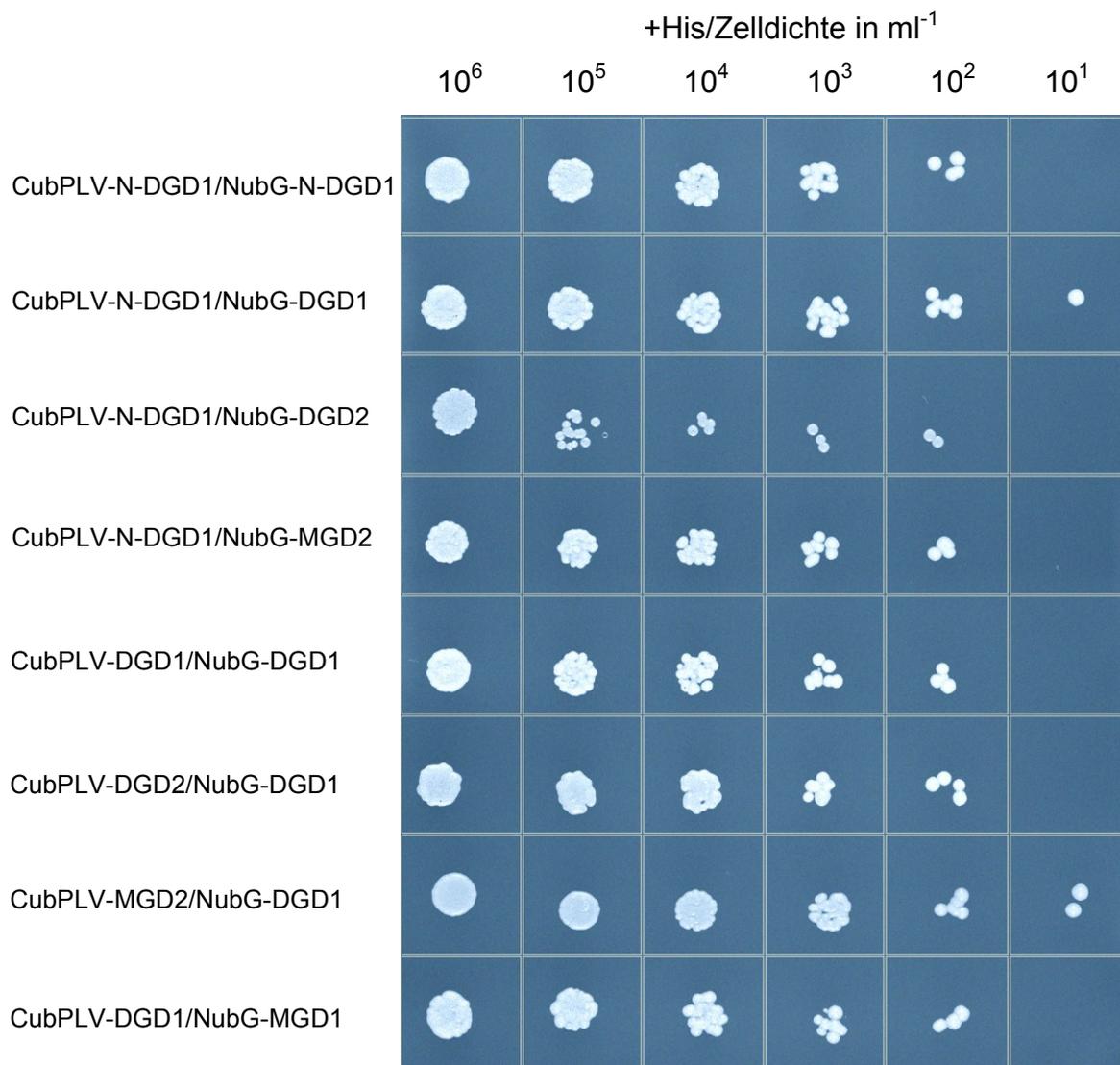
In Abb.15(A) wird das Resultat des Lipidbindungstests mit gereinigtem N-DGD1 Protein dargestellt. Für die polaren Lipide MGDG und DGDG konnte ein starkes Proteinsignal detektiert werden. Somit wurde eine Interaktion von N-DGD1 Protein

und den polaren Lipiden MGDG und DGDG nachgewiesen. Ein weitaus schwächeres Signal konnte für die polaren Lipide PC und PE nachgewiesen werden. Hier kann lediglich vermutet werden, dass eine Interaktion mit dem N-terminalen Bereich von N-DGD1 vorliegt, da im Vergleich zur Cardiolipin Kontrolle eine leichte Färbung des Blots zu erkennen ist. Jedoch ist das Signal im Vergleich zu MGDG und DGDG eher schwach. Für die ebenfalls applizierten polaren Lipide PI, PA und PG konnten keine Hinweise auf eine Interaktion mit dem N-terminalen Bereich von DGD1 gefunden werden. In Abb. 15(B) wird das Resultat des Lipidbindungstests mit gereinigtem DGD1 Protein dargestellt. Ein Proteinsignal und damit eine Interaktion konnte für die polaren Lipide MGDG, DGDG und PI nachgewiesen werden. Auch bei diesem Test wurde ein sehr schwaches Signal für die Lipide PC und PE detektiert. Hier gilt eine Interaktion mit DGD1 Protein nicht als erwiesen. Für die polaren Lipide PA und PG konnte eindeutig eine Interaktion ausgeschlossen werden. Es konnte kein Proteinsignal detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes N-DGD1 Protein bzw. gereinigtes DGD1 Protein auf die Nylonmembran aufgebracht. Cardiolipin diente als Negativkontrolle, da dieses Lipid nur in der inneren Hüllmembran der Mitochondrien vorkommt und so keinerlei Kontakt mit DGD1 Protein zu erwarten ist, da DGD1 in der äußeren Chloroplastenmembran lokalisiert ist.

4.6 Bindungsstudien zur Analyse der Interaktion verschiedener Glykosyltransferasen in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Analyse möglicher Interaktionen verschiedener Glykosyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana* wurde das hefebasierte Split-Ubiquitin-System gewählt. Als mögliche Interaktionspartner wurden N-DGD1, DGD1, DGD2, MGD1, MGD2 und MGD3 in die Split-Ubiquitin Vektoren px-NubG und pY-CubPLV kloniert (Stagljar *et al.*, 1998) und in *Saccharomyces cerevisiae* koexprimiert. Beide Vektoren tragen einen Teil eines Reporters. Bei Interaktion der beschriebenen Glykosyltransferasen kommt es zu einem Zusammenschluss beider Reporterteile, es entsteht ein funktionelles Split-Ubiquitin. Dieser Vorgang führt zur Abspaltung eines Transkriptionsfaktors, welcher aus Protein A, LexA und VP16 (PLV) besteht. Dieser Transkriptionsfaktor induziert die Transkription von Reporter genen. In dieser Studie

wurden die Reporter *LacZ* und *HIS3* verwendet. Zur Überprüfung einer Interaktion erfolgte ein Wachstum der transformierten Zellen auf nicht selektiven Medium welches X-Gal enthielt. Dies wurde eingesetzt um positive Interaktion durch Expression von β -Galaktosidase nach Induktion des *LacZ* Reporters nachzuweisen. Eine Blaufärbung der Hefezellen zeigt eine Interaktion der getesteten Proteine an, wogegen eine weiße Färbung der Kolonien keine Interaktion bedeutet. Um das Ergebnis des X-Gal Tests zu bekräftigen oder um falsch positive Interaktionen zu identifizieren wurden Verdünnungsserien der transformierten Zellen angefertigt. Das Wachstum der Zellen erfolgte auf Minimalmedium mit und ohne Histidin. Histidinreiches Medium diente als Kontrolle für ein uneingeschränktes Wachstum der Zellen. Auf Minimalmedium ohne Histidin können jedoch nur Zellen wachsen bei denen der *HIS3* Reporter aktiviert wurde. Dies kann nur durch den Transkriptionsfaktor geschehen, welcher durch die Interaktion der betreffenden Proteine freigesetzt wird.



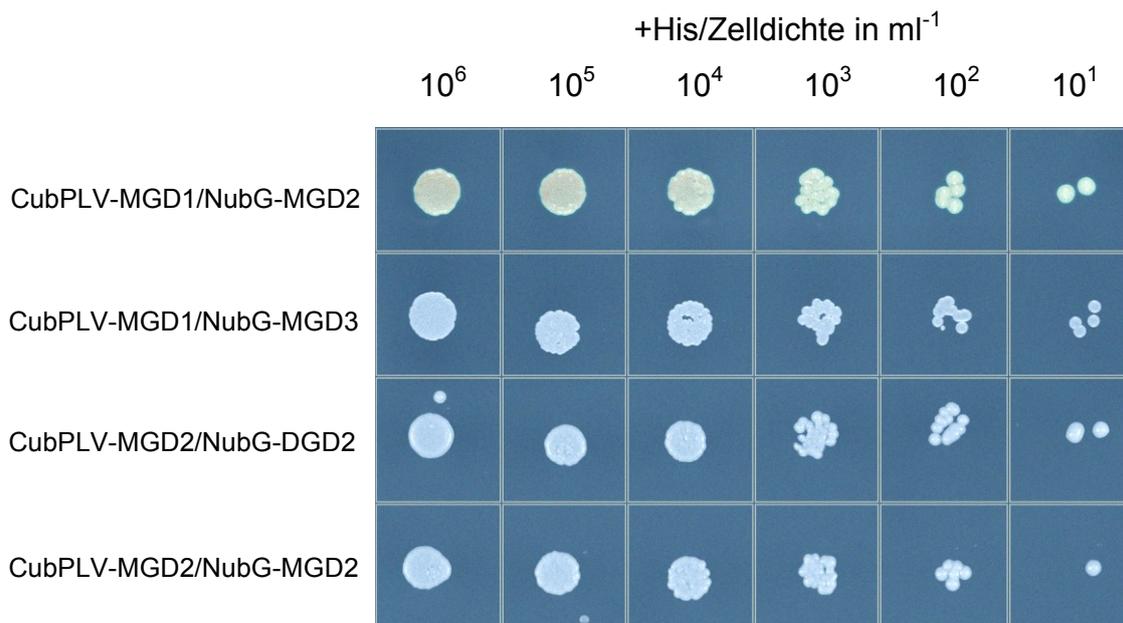


Abb.16: Das Wachstum der transformierten Hefezellen erfolgte auf Kontrollplatten mit Histidin. Interaktionsstudien wurden für die Glycosyltransferasen N-DGD1, DGD1, DGD2, MGD1, MGD2 und MGD3 durchgeführt. *HIS3* wurde dabei als Reportergen genutzt. Das Wachstum der transformierten Hefezellen erfolgte auf Kontrollplatten mit Histidin. Die Zellen wurden auf Minimalmedium mit Histidin in 10µl Einheiten und der angegebenen Zelldichte appliziert.

Von allen transformierten Hefezelllinien, die zwei zum größten Teil unterschiedliche Glykosyltransferasen in *Saccharomyces cerevisiae* koexprimieren, wurden Verdünnungsreihen erstellt, die sicher stellen sollten, dass die untersuchten Hefezelllinien auf nicht selektivem Medium mit Histidin ein normales Wachstum zeigen. Bei allen getesteten Zellen verlief das Wachstum gemäß den hergestellten Verdünnungsstufen. Um Protein-Protein-Interaktion zu demonstrieren, wurden die Reportergene *His3* und *LacZ* genutzt. Zum Einen wurden Verdünnungsreihen von den transformierten Hefezelllinien auf selektivem Medium ohne Histidin erstellt. Positive Interaktion der Proteine stellte sich durch ein Zellwachstum dar, welches mit den Kontrollen auf nicht selektivem Medium (Abb.16) vergleichbar sein sollte. Eine nicht vorhandene Protein-Protein-Interaktion zeigt sich durch ein sehr schlechtes oder nicht vorhandenes Zellwachstum. Zum Anderen wurde eine positive Interaktion der jeweiligen Proteine durch die Expression von β -Galaktosidase nachgewiesen. Eine Blaufärbung der Hefekolonien auf X-Gal haltigen Medium zeigt somit Protein-Protein-Interaktion an.

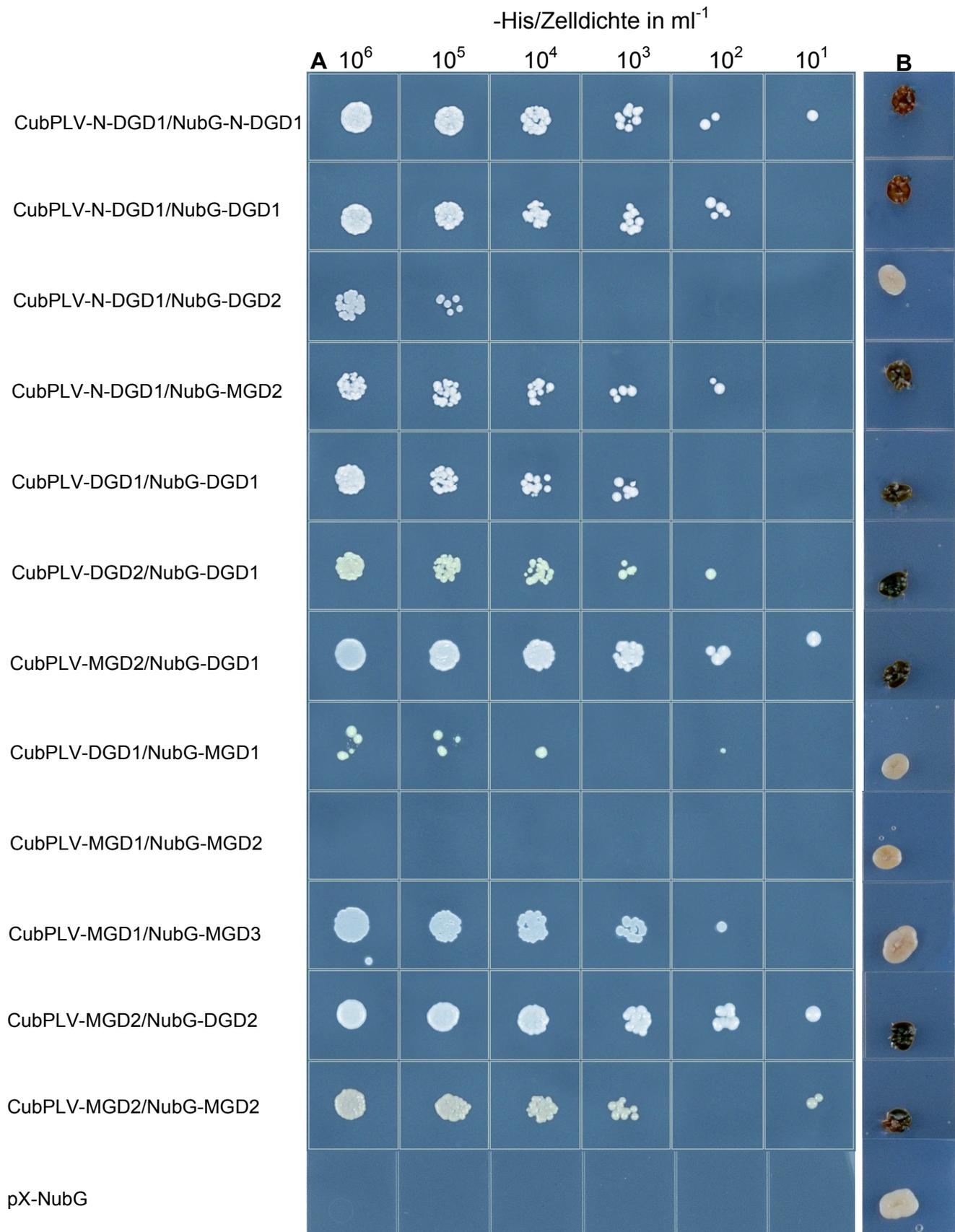


Abb.17: Protein-Protein Interaktion wurde mit dem Split-Ubiquitin-System analysiert. *HIS3* und *LacZ* wurden als Reportergene genutzt. Interaktionsstudien wurden für die Glycosyltransferasen N-DGD1, DGD1, DGD2, MGD1, MGD2 und MGD3 durchgeführt. **(A)** Die transformierten Hefezellen wurden auf Minimalmedium ohne Histidin in 10 μ l Einheiten und der angegebenen Zelldichte appliziert. **(B)** Positive Interaktion wurde visualisiert mittels β -Galactosidase Expression auf Minimalmedium mit Histidin und X-Gal.

Für verschiedene Proteinkombinationen konnte eine positive Interaktion detektiert werden. CubPLV-N-DGD1 in Kombination mit NubG-N-DGD1, NubG-DGD1 und NubG-MGD2 zeigte eine deutliche Blaufärbung im X-Gal-Test (Abb.17). Dies zeigt eine Protein-Protein-Interaktion an, welche durch den Verdünnungstest bestätigt wurde. Das Wachstum der Hefezelllinien verlief ähnlich dem Wachstum auf nicht selektiven Medium. Nub-G-DGD1 zeigte in der Kombination mit CubPLV-DGD1, CubPLV-DGD2 und CubPLV-MGD2 eine Blaufärbung im X-Gal-Test und ein normales Wachstum im Verdünnungstest. Somit konnte auch hier eine Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden. Weitere Interaktionen wurden für die Kombinationen CubPLV-MGD2/NubG-DGD2 und CubPLV-MGD2/NubG-MGD2 detektiert. Für verschiedene Proteinkombinationen konnte eindeutig eine Interaktion ausgeschlossen werden. CubPLV-N-DGD1 zeigte in Kombination mit NubG-DGD2 ein stark eingeschränktes Wachstum auf selektivem Medium. Bestätigt werden konnte dieses Ergebnis durch den X-Gal-Test, bei dem nur weiße Hefekolonien sichtbar wurden. Die Proteinkombinationen CubPLV-DGD1/NubG-MGD1 und CubPLV-MGD1/NubG-MGD2 zeigten ebenfalls ein stark gehemmtes Wachstum und weiße Kolonien im X-Gal-Test. Somit konnte auch hier eine Protein-Protein-Interaktion ausgeschlossen werden. Ein nicht eindeutiges Ergebnis wurde für die Proteinkombination CubPLV-MGD1/NubG-MGD3 erzielt. Zwar verlief das Wachstum der transformierten Hefezelllinien auf selektivem Medium ähnlich gut wie auf nicht selektivem Medium jedoch war keine Blaufärbung der Hefekolonien im X-Gal-Test zu erkennen.

Alle Glykosyltransferasen wurden jeweils in die Split-Ubiquitin-Vektoren py-CubPLV und px-NubG kloniert und miteinander in *Saccharomyces cerevisiae* koexprimiert. Es konnten nicht für alle Kombinationen Hefekolonien erhalten werden. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich darin zu finden, dass Zellen, in denen keine Interaktion der Proteine stattfindet, viel schlechter oder gar nicht auf selektivem Medium wachsen können. Abb.18 gibt einen Gesamtüberblick über alle getesteten Proteinkombinationen.

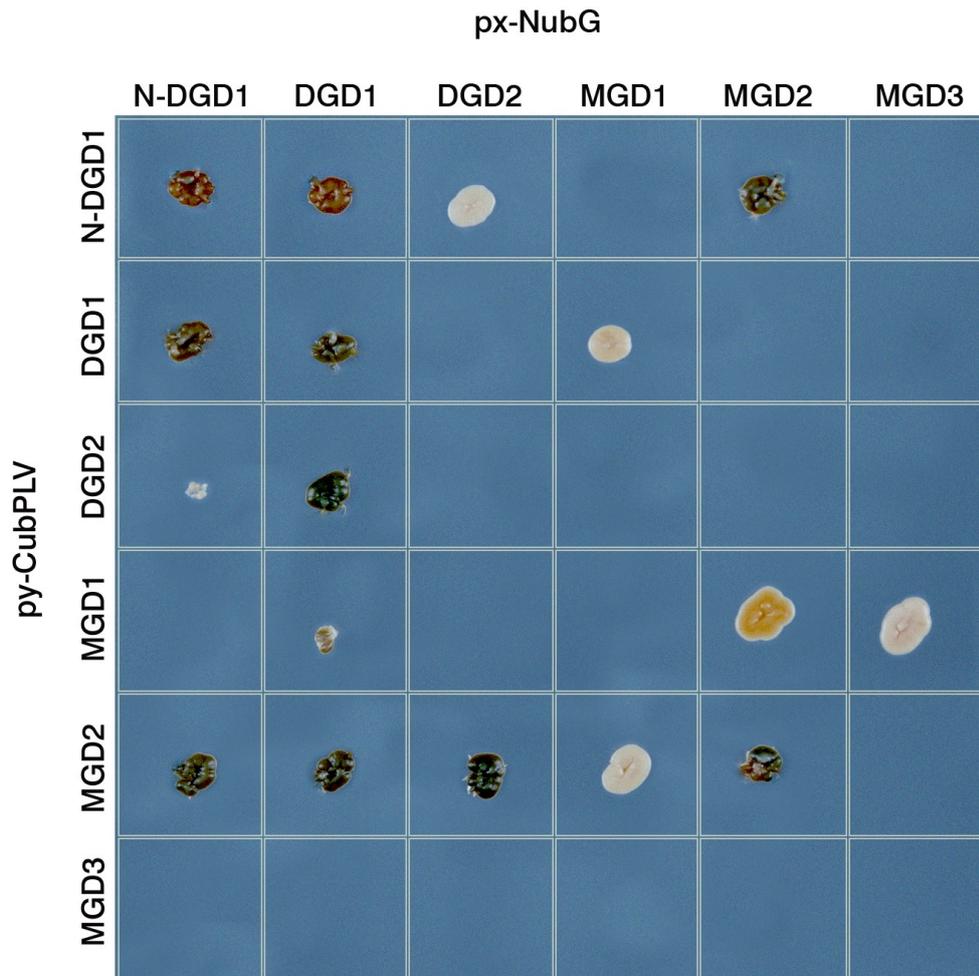


Abb.18: Gesamtüberblick über Protein-Protein-Interaktionen verschiedener Glykosyltransferasen. *LacZ* wurden als Reportergen genutzt. Interaktionsstudien wurden für die Glykosyltransferasen N-DGD1, DGD1, DGD2, MGD1, MGD2 und MGD3 durchgeführt. Positive Interaktion wurde visualisiert mittels β -Galactosidase Expression auf Minimalmedium mit Histidin und X-Gal.

Eine Interaktion von N-DGD1 und DGD1 konnte sowohl in der Kombination Cub-PLV-N-DGD1/NubG-DGD1 als auch in der Kombination CubPLV-DGD1/NubG-N-DGD1 detektiert werden. Interaktion in beide Richtungen wurde ebenfalls für N-DGD1 und MGD2 Protein festgestellt. Wechselwirkungen in einer Richtung wurde für die Proteinkombinationen DGD1 und DGD2, bzw. MGD2 und DGD2 festgestellt. Jedoch kann man eine Verlässlichkeit der Daten vermuten, da diese Interaktionen durch Verdünnungsexperimente bestätigt werden konnten.

4.7 Expression des DGD1-StrepII-Tag Fusionsproteins in *dgd1-1*

Zur Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* Linien wurde das DGD1-StrepII-Tag Konstrukt in den pflanzlichen Expressionsvektor pLH6000 kloniert und zur Transformation von *Arabidopsis dgd1-1* Mutanten eingesetzt. Ziel war es, sowohl im Wachstums-, als auch im Lipidphänotyp komplementierte Linien zu erzeugen, da dies eventuell auch einen Hinweis auf die Expressionsstärke des StrepII-Tags zulässt. Es konnten zehn unabhängige transgene Linien erzeugt werden.

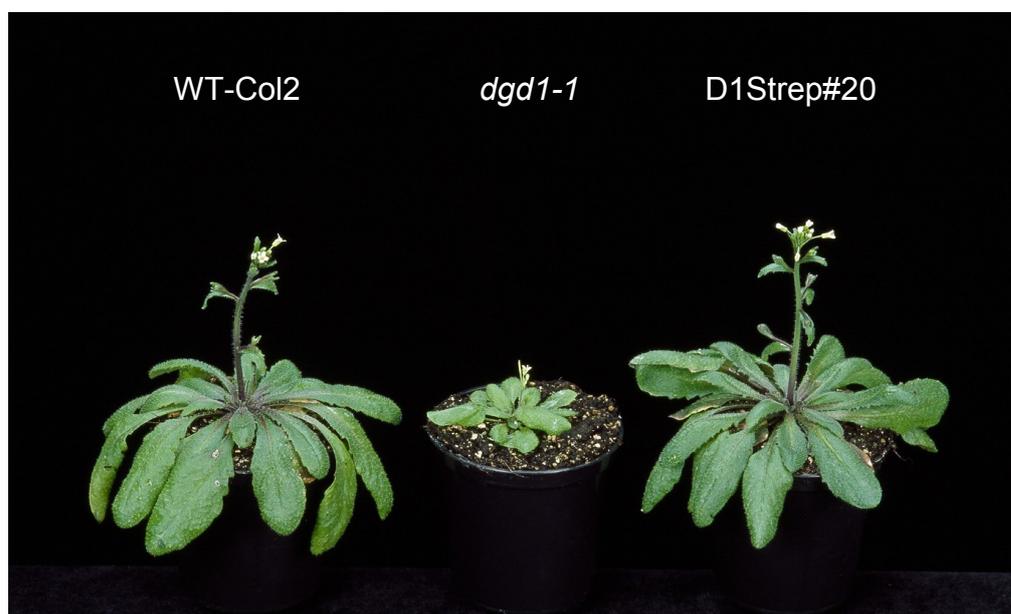


Abb.19: Die Expression von DGD1-StrepII-Tag führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten *dgd1-1* Wachstums. Transgene D1Strep#20 Linie zeigt ein wildtypähnliches Wachstum im Vergleich zu *dgd1-1*.

Die ausgewählte transgene Linie D1Strep#20 zeigt ein stark verbessertes Wachstum im Vergleich zur im Wachstum sehr eingeschränkten *dgd1-1* Mutante (Abb.19). Um herauszufinden, ob sich ein verbessertes Wachstum in der verstärkten Akkumulation von DGDG Lipid in der transgenen Linie D1Strep#20 widerspiegelt, wurden die polaren Lipide der untersuchten Linien extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Abb.20).

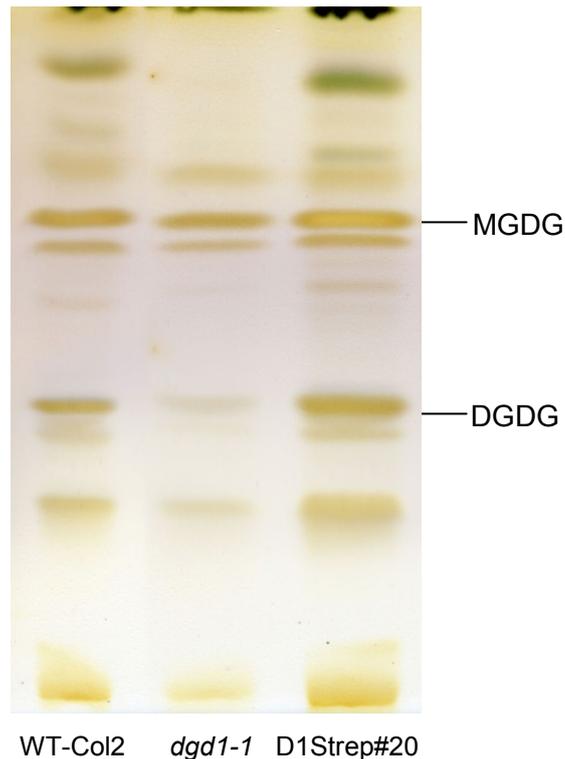


Abb.20: Die Expression von DGD1-StreptII-Tag führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten *dgd1-1* Lipidgehaltes. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der polaren Lipide in D1Strep#20 zeigt eine erhöhte Akkumulation von DGDG Lipid im Vergleich zur *dgd1-1* Mutante.

Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der polaren Lipide (Abb.20) konnte eine Korrelation des wildtypähnlichen Wachstums der transgenen Linie D1Strep#20 und einer deutlichen Erhöhung des DGDG Gehalts festgestellt werden. Von der transgenen Linie D1Strep#20 wurden Lipide isoliert und quantifiziert. Es wurden keine Unterschiede im Phospholipidgehalt in der Linie D1Strep#20 im Vergleich zum WT-Col2 gefunden.

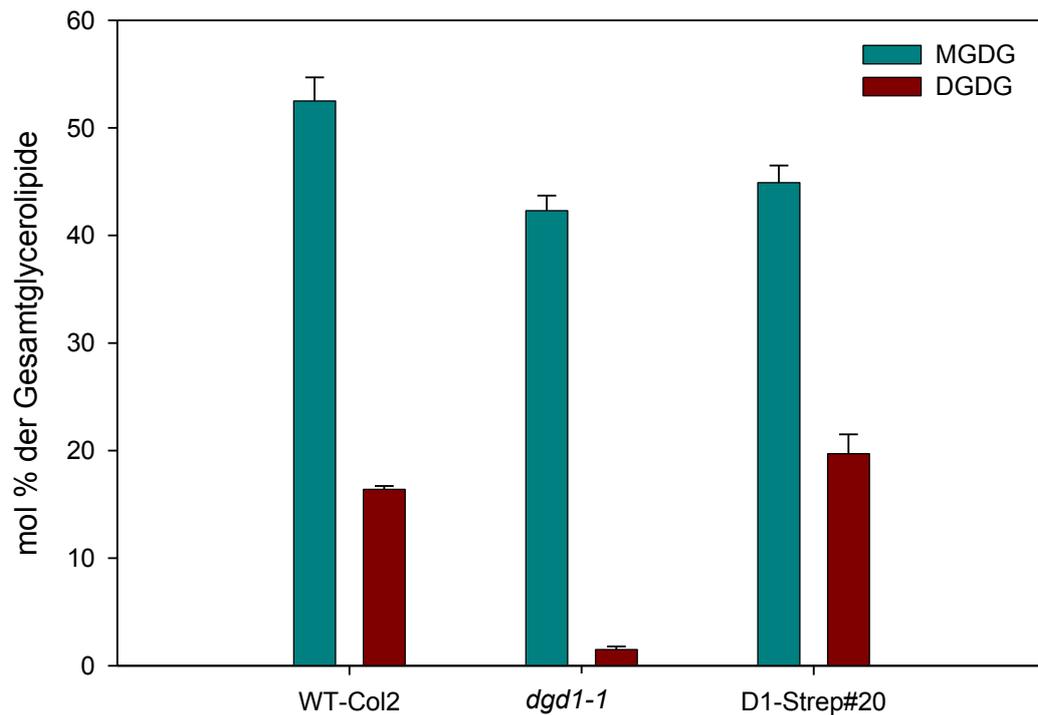


Abb.21: Quantifizierung der polaren Lipide MGDG und DGDG in der transgenen Linie D1Strep#20. Zur Quantifizierung der polaren Lipide wurden die Lipidextrakte durch DC getrennt, die einzelnen Lipidklassen isoliert und durch Gaschromatographie quantifiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert in mol % mit SD (Dreifachbestimmung).

Die Quantifizierung der polaren Lipide bestätigte die zuvor durch die Analyse des Wachstumsphänotyps vermutete Erkenntnis, dass der DGDG Gehalt in der untersuchten transgenen *dgd1-1* Linie D1Strep#20 deutlich angestiegen ist (Abb.21; D1Strep#20: 111.9 % DGDG vom WT Wert). Der MGDG Gehalt dagegen ist leicht erniedrigt (D1Strep#20: 79,3 % MGDG vom WT Wert).

Nachdem bestätigt werden konnte, dass in der ausgewählten transgenen *dgd1-1* Linie D1Strep#20 das eingeschränkte *dgd1-1* Wachstum komplementiert werden konnte und in Korrelation dazu der DGDG Gehalt deutlich angestieg, wurden weitere Analysen mit der Linie D1Strep#20 durchgeführt. Eine Western Blot Analyse sollte zeigen wie stark die Expression des DGD1Strep#20 Proteins in der Pflanze ist. Je größere Mengen an Protein in der Pflanze zu finden sind, um so höher ist die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Aufreinigung von DGD1-StrepII Tag Protein und dessen eventueller Interaktionspartner.

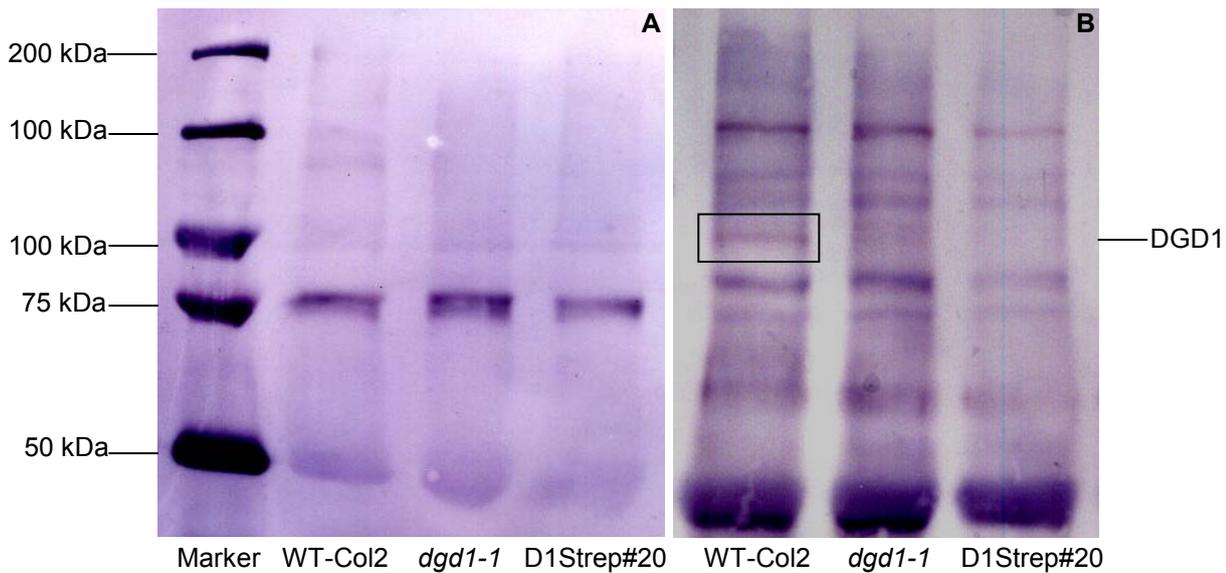


Abb.22: Western Blot Analyse zeigt keine Akkumulation von DGD1 bzw. DGD1-StreptII Tag Protein in D1Strep#20 (A) Nachweis der geblohteten Proteine mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat konnte keine spezifische Detektion des StreptII Tags zeigen **(B)** Nachweis der geblohteten Proteine mit einem N-DGD1 Antikörper konnte ausschließlich im WT DGDG Protein detektieren.

Der Nachweis von DGD1-StreptII Tag in der *dgd1-1* Mutante wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Antikörpern mittels Western Blot durchgeführt (Abb.22). Ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat wurde zum Nachweis des StreptII Tags angewendet. Für den Nachweis des DGD1 Proteins wurde ein Antikörper eingesetzt, welcher sich spezifisch gegen dieses Protein richtet. In der transgenen *dgd1-1* Linie D1Strep#20 wurde zum Nachweis des StreptII Tags eine Bande bei 92,7 kDa erwartet welche der Größe des DGD1-StreptII Tag Proteins entspricht (Abb.22(A)). Neben unspezifischen Proteinbanden konnte jedoch kein Protein der erwarteten Größe nach Inkubation mit Streptavidin-AP-Konjugat detektiert werden. Zur weiteren Überprüfung wurde in einer weiteren Western Blot Analyse ein spezifischer N-DGD1 Antikörper eingesetzt (Abb.22(B)). Im WT wurde das vollständige DGD1 Protein mit einer Größe von 91,8 kDa nachgewiesen. Eine gleichstarke oder stärkere DGD1-StreptII Tag Bande mit einer Größe von 92,7 kDa wurde für die transgene *dgd1-1* Linie D1Strep#20 erwartet. Es konnte jedoch keine Proteinbande dieser Größe detektiert werden. Das Proteinbandenmuster entsprach dem *dgd1-1* Mutanten Hintergrund. Somit zeigte die Western Blot Analyse eine unzureichende Expression von DGD1-StreptII Tag in der ausgewählten Linie. Dies wurde durch Analysen weiterer unabhängiger transgener *dgd1-1* Linie bestätigt. Die niedrige Expression von DGD1-StreptII Tag erschwert in erheblichen Maß eine erfolgreiche Aufreinigung

von DGD1-StreptII Tag Protein. Somit wurde vorerst darauf verzichtet eine Aufreinigung des Proteins vorzunehmen.

4.8 Expression des DGD1-CTAP Tag Fusionsproteins in *dgd1-1*

Um transgene *Arabidopsis thaliana* Linien zu erzeugen wurde das DGD1-CTAP Tag Konstrukt in den pflanzlichen Expressionsvektor pLH6000 kloniert und zur Transformation von *Arabidopsis dgd1-1* Mutanten eingesetzt. Es sollten transgene Linien erzeugt werden, die sowohl im Wachstums-, als auch im Lipidphänotyp komplementiert sind. Es konnten elf unabhängige transgene Linien erzeugt werden.

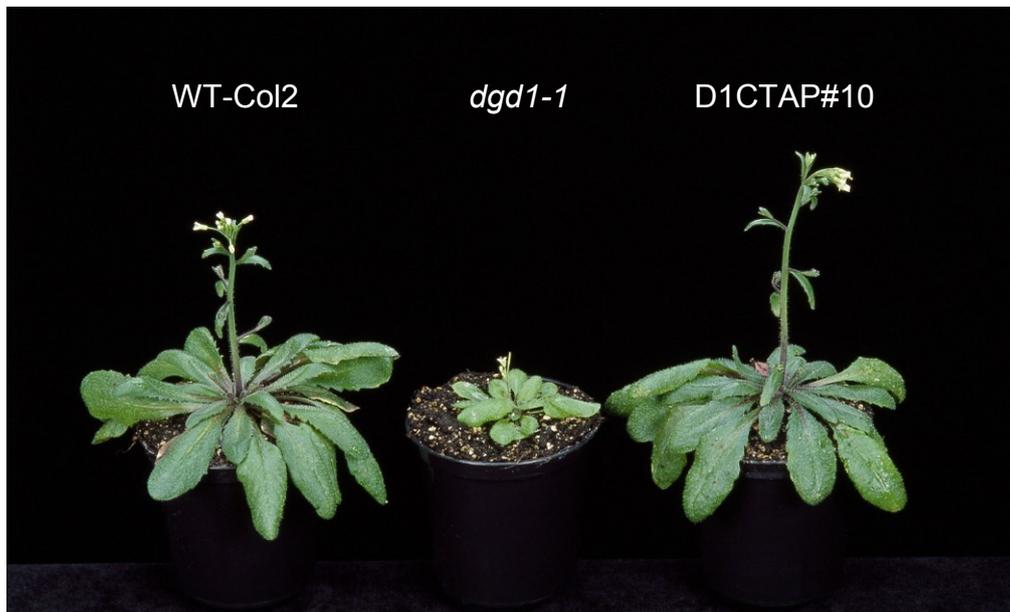


Abb.23: Die Expression von DGD1-CTAP Tag führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten *dgd1-1* Wachstums. Transgene D1CTAP#10 Linie zeigt ein wildtypähnliches Wachstum im Vergleich zu *dgd1-1*.

Die zur ausführlichen Betrachtung ausgewählte transgene D1CTAP#10 Linie zeigt ein wildtypähnliches Wachstum (Abb.23). Ein wildtypähnliches Wachstum in der transgenen Linie lässt ebenfalls einen Anstieg an DGDG Lipid vermuten. Um dies zu analysieren, wurden die polaren Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

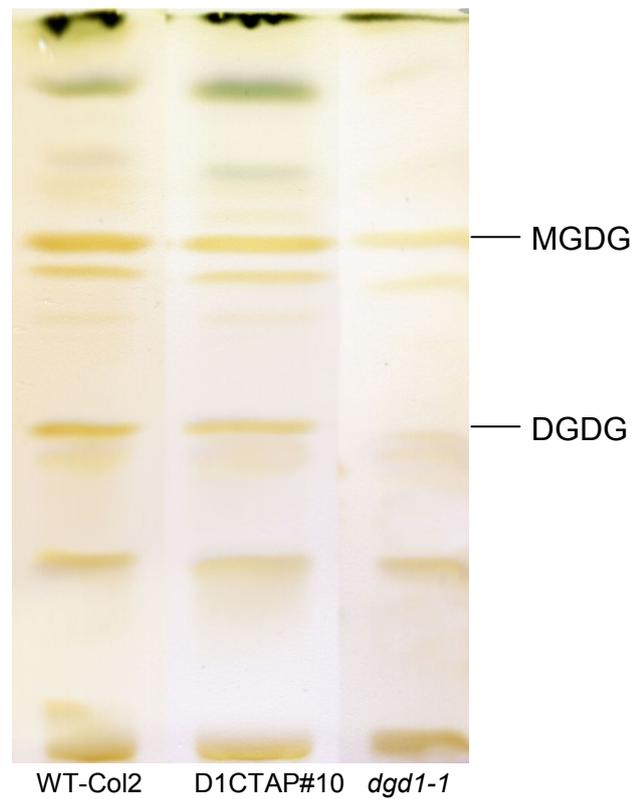


Abb.24: Die Expression von DGD1-CTAPtag führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten *dgd1-1* Lipidgehaltes. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der polaren Lipide in D1CTAP#10 zeigt eine erhöhte Akkumulation von DGDG Lipid im Vergleich zur *dgd1-1* Mutante.

Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der polaren Lipide konnte eine wildtypähnliche DGDG Lipid Akkumulation in der transgenen Linie detektiert werden (Abb.24). Von der transgenen Linie D1CTAP#10 wurden die polaren Lipide isoliert und mittels Gaschromatographie quantifiziert (Abb.25). Es wurden keine Unterschiede im Phospholipidgehalt festgestellt.

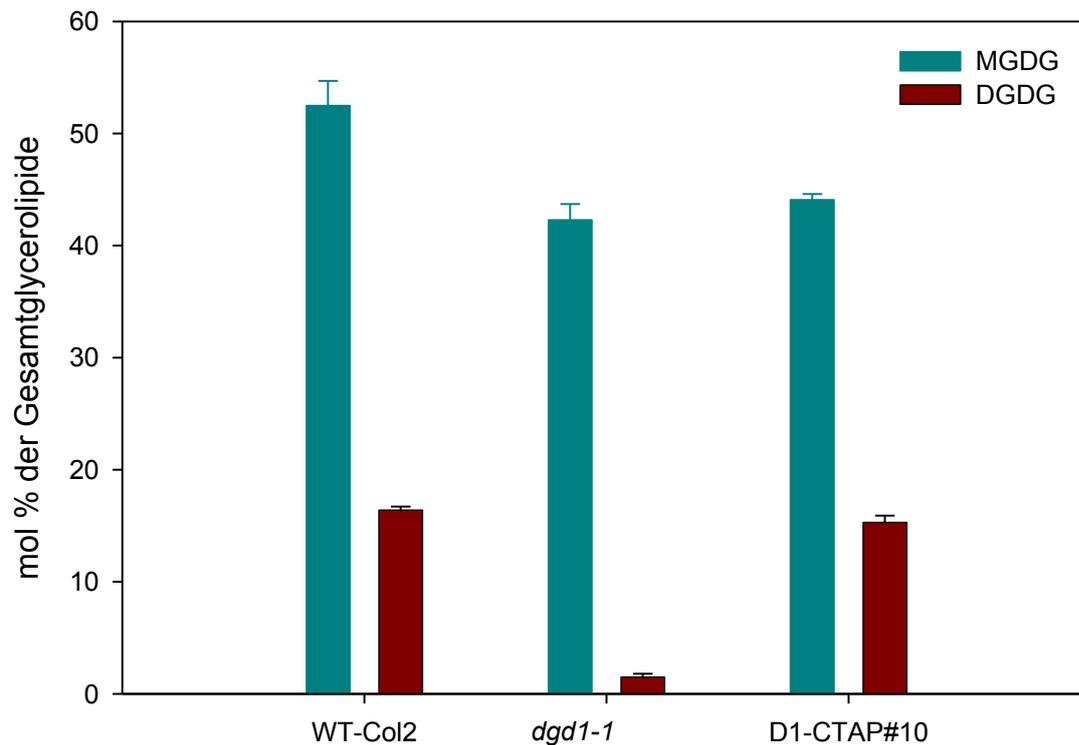


Abb.25: Quantifizierung der polaren Lipide MGDG und DGDG in der transgenen Linie D1-CTAP#10. Zur Quantifizierung der polaren Lipide wurden die Lipidextrakte durch DC getrennt, die einzelnen Lipidklassen isoliert und durch Gaschromatographie quantifiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert in mol % mit SD (Dreifachbestimmung).

Nach Quantifizierung der polaren Lipide (Abb.25) konnte bestätigt werden, dass der DGDG Gehalt in der untersuchten transgenen *dgd1-1* Linie D1CTAP#10 ungefähr WT Werte erreicht (D1CTAP#10: 93,2 % DGDG vom WT Wert). Der MGDG Gehalt ist dagegen leicht erniedrigt (D1CTAP#10: 84 % MGDG vom WT Wert).

Die Expression des chimären DGD1-CTAPTag Konstrukts in der *dgd1-1* Mutante führte zu einer Komplementation im Wachstums- und im Lipidphänotyp. Durch Western Blot Analyse mit zwei unterschiedlichen Antikörpern wurde die Expressionsstärke von DGD1-CTAPTag überprüft (Abb.26).



Abb.26: Western Blot Analyse zeigt Akkumulation von DGD1-CTAPTag Protein in transgenen Linien. Die Western Blot Analyse von vier unabhängigen transgenen *dgd1-1* Linien zeigte eine starke Expression von DGD1-CTAPTag. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen Anti-N-DGD1 Antikörper. Der Blot wurde mit Hilfe der alkalischen Phosphatase Reaktion gefärbt. Spezifische Reaktionen sind durch Sternchen gekennzeichnet. Andere Banden, insbesondere die 55 kDa Bande (RUBISCO Große Untereinheit) stellen unspezifische Kreuzreaktionen dar.

Die Western Blot Analyse der transgenen DGD1-CTAPTag Linien ergab eine verstärkte Akkumulation von einem Protein mit einer Größe von ungefähr 110 kDa (Abb.26). Dies entspricht der Größe des DGD1-CTAPTag Proteins mit einer Größe von 109,9 kDa. Dieses Protein konnte im WT-Col2 und in der *dgd1-1* Mutante nicht detektiert werden. Im WT-Col2 konnte DGD1 Protein mit einer Größe von 91,8 kDa nachgewiesen werden. DGD1 Protein in einer verkürzten Form akkumulierte in der *dgd1-1* Mutante mit einer Größe von 64,1 kDa.

Ein zweiter Ansatz zum Nachweis eines ausreichend hohen Expressionslevels von DGD1-CTAPTag in den transgenen *dgd1-1* Linien war der Einsatz eines PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase) Antikörpers. Dieser bindet an der Protein A Domäne des CTAPTags und gewährleistet so den direkten Nachweis des Tags (Abb.27).

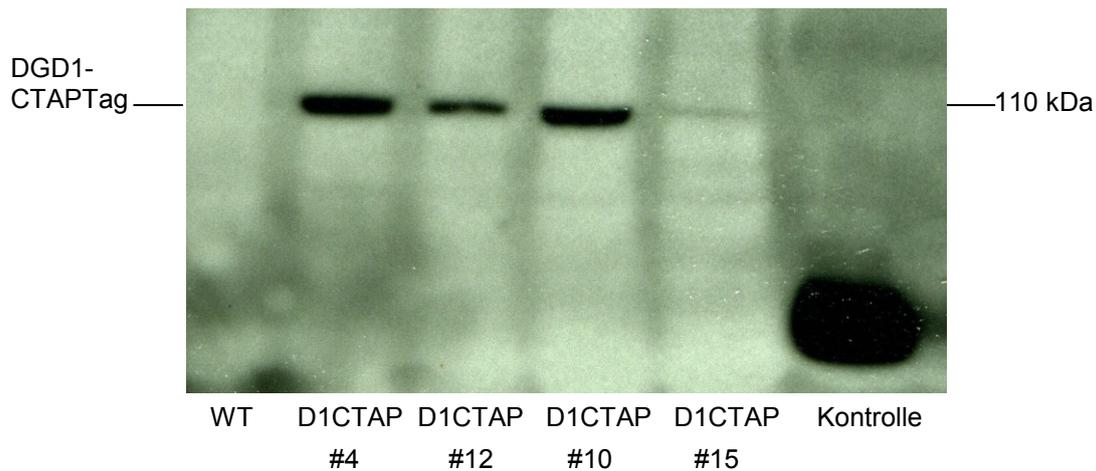


Abb.27: Die Expression von DGD1-CTAPTag in *dgd1-1* resultiert in der Akkumulation von DGD1-CTAPTag Protein. Die Western Blot Analyse von vier unabhängigen transgenen *dgd1-1* Linien zeigte eine variabel starke Expression von DGD1-CTAPTag. Die Nutzung des ECL Plus Western Blotting Detection Kit erlaubte die Detektion eines chemolumineszenten Signals von Proteinen, die eine Bindung mit dem PAP Antikörper eingegangen sind.

Die Western Blot Analyse ergab ein starkes Expressionssignal bei den transgenen Linien D1CTAP#4 und D1STAP#10 (Abb.27). Eine Expression mittlerer Stärke konnte für die transgene Linie D1CTAP#12 detektiert werden. Ein schwaches Expressionssignal wurde für die transgene Linie D1CTAP#15 festgestellt. Somit waren alle hier beschriebenen Linien im Wachstum komplementiert. Die Akkumulation von DGDG Lipid entsprach ebenfalls WT-Col2 Werten. Jedoch unterschied sich die Expressionsstärke des Tags erheblich. Wie zu erwarten war, konnte im WT-Col2 kein Signal detektiert werden. Nachdem für die Linien D1CTAP#4 und D1CTAP#10 die stärkste Expression festgestellt werden konnte, wurden diese Linien ausgewählt um später eine Aufreinigung des DGD1-CTAPTag Proteins und dessen Interaktionspartner durchzuführen.

5. Diskussion

5.1 Funktion des N-terminalen Bereichs von DGD1 für die Galaktolipidsynthese und Transport

Galaktolipide sind Moleküle, die in einer wässrigen Umgebung unlöslich sind. Somit sind Transportprozesse in der Zelle erforderlich, um Lipidmoleküle innerhalb verschiedener Membranen oder innerhalb unterschiedlicher Organellen zu transportieren. DGDG wird in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten synthetisiert und muss unter Phosphatmangelbedingungen in extraplastidäre Membranen transportiert werden (Abb.29). Des Weiteren muss DGDG von der äußeren zur inneren Hüllmembran, und weiter zusammen mit MGDG in die Thylakoiden transportiert werden. Galaktolipidtransport ist in Pflanzen nur in Ansätzen erforscht (Kelly & Dörmann, 2004; Benning & Ohta, 2005). Es wird vermutet, dass der Transport von MGDG und DGDG von der inneren Hüllmembran der Chloroplasten zu den Thylakoiden Vesikel involviert, welche in Zusammenhang mit dem VIPP1 Protein in *Arabidopsis* stehen (Morre *et al.*, 1991; Morre *et al.*, 1991; Kroll *et al.*, 2001). Weiterhin entdeckte Kobayashi *et al.*, (2007) Ausstülpungen in den Hüllmembranen von entstehenden Chloroplasten, welche ebenfalls in Zusammenhang mit einem Transport von MGDG und DGDG in die Thylakoide stehen könnten. Jedoch gibt es kaum Wissen darüber, wie der Transport von DGDG zwischen den Hüllmembranen verläuft oder auf welche Weise von DGD1 oder DGD2 synthetisiertes DGDG zur inneren Hüllmembran, den Thylakoiden oder den extraplastidären Membranen transportiert wird. Die DGD2 cDNA kodiert für eine Glykosyltransferase, die eine kurze N-terminale Sequenz enthält, welche für den zielgerichteten Transport zum Chloroplasten von Bedeutung ist (Kelly *et al.*, 2003)(Abb.28). Im Gegensatz dazu steht die Glykosyltransferase DGD1, welche eine lange N-terminale Extension enthält, die notwendig ist, um in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasts verankert zu sein (Fröhlich *et al.*, 2001).

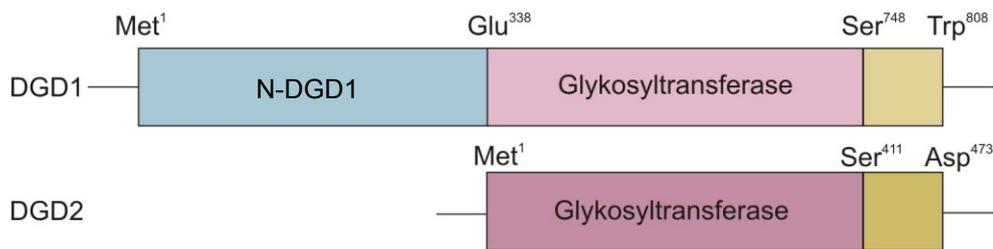


Abb.28: Strukturelle Charakteristika der DGD1 und DGD2 Sequenzen. Strukturvergleich der DGD1 und DGD2 Proteine.

In der vorliegenden Studie sollte die Frage nach der Bedeutung des N-terminalen Bereichs von DGD1 für die Galaktolipid Biosynthese und Transport analysiert werden. Ein erster Ansatz war die Erzeugung von WT-Col2 Linien, welche den N-terminalen Bereich von DGD1 überexprimieren. Die Überexpression von N-DGD1 in WT-Col2 resultierte in einem starken veränderten Wachstum im Vergleich zum WT, der sich durch ein stark eingeschränktes Wachstum und einem lanzettförmigen Blattwachstum auszeichnete (Abb.4). Interessanterweise unterscheidet sich jedoch das Wachstum von dem einer *dgd1-1* Mutante darin, dass die *dgd1-1* Mutante eine gelbgrünliche Blattfarbe aufweist, im Gegensatz zu den Überexpressionslinien welche eine dunkelgrüne Blattfarbe zeigen. Des Weiteren, ist die Blattform in der *dgd1-1* Mutante normal und nicht lanzettförmig. Somit ist dies ein Hinweis dafür, dass die *dgd1-1* Mutante und die generierten Überexpressionslinien unabhängig voneinander zu betrachten sind. Um sicher zu stellen, dass das veränderte Wachstum in Zusammenhang mit der Überexpression des N-terminalen Bereiches von DGD1 steht, wurde die Expressionsstärke mittels Western Blot und Northern Blot Analyse überprüft. Diese Experimente sollten auch klären, ob das reduzierte Wachstum der transgenen Linien aus einem Kosuppressionseffekt resultiert, welcher die Genexpression von DGD1 hemmen könnte. Die Northern Blot Analyse zeigte nach Hybridisierung mit einer *N-DGD1* cDNA Sonde in den Überexpressionslinien zwei Signale, von denen ein Signal der DGD1 mRNA mit einer Größe von ca. 3,0 kb zugeordnet werden konnte und ein weiteres starkes Signal, welches der N-DGD1 mRNA mit einer Größe von ca. 1,6 kb zugeordnet werden konnte (Abb.5). Ein Signal für N-DGD1 mRNA konnte im WT-Col2 und in der *dgd1-1* Mutante nicht detektiert werden. Die Western Blot Analyse ergab in den Überexpressionslinien eine verstärkte Akkumulation von zwei Polypeptiden mit einer Größe von 38 und 36 kDa. Die 38 kDa Bande entspricht der Größe des N-DGD1 Proteins mit einer Größe von

38,3 kDa (M^1 -E³³⁸) (Abb.6). Das Polypeptid mit der Größe von ca. 36 kDa stellt wahrscheinlich ein Abbauprodukt dar.

Die Western Blot und die Northern Blot Analyse weisen somit darauf hin, dass kein Kosuppressionseffekt vorliegt, und dass ein verändertes Wachstum im Zusammenhang mit der Überexpression des N-terminalen Bereichs von DGD1 ist. Weiterhin ist zu beachten, dass Studien, bei denen der vollständige DGD1 Bereich in *dgd1-1* Mutanten überexprimiert wurde, zeigten, dass ein wildtypähnliches Wachstum in den transgenen Linien zu beobachten war (Dörmann, unveröffentlicht). Somit ist dies ein weiteres Indiz für den Zusammenhang des veränderten Wachstums und der Überexpression von N-DGD1 in WT-Col2.

Es stellt sich nun die Frage, warum und auf welche Weise sich ein solch starker negativer Einfluss auf das Wachstum der transgenen Linien ergibt. Eine mögliche Ursache könnte ein negativer Einfluss des akkumulierten N-DGD1 Proteins auf die Glykosyltransferaseaktivität von DGD1 sein. Dies würde bedeuten, dass kein oder nur unzureichend DGDG synthetisiert werden kann. Um zu prüfen ob sich der Gehalt an MGDG und DGDG Lipid in den Überexpressionslinien verändert hat, wurden Lipidmessungen durchgeführt. Eine Analyse der Zusammensetzung der polaren Lipide ergab jedoch keine Veränderung im DGDG und MGDG Gehalt im Vergleich zum WT-Col2. Somit wurde nachgewiesen, dass die Akkumulation von N-DGD1 Protein keinen toxischen Einfluss auf die Glykosyltransferase Aktivität von DGD1 hat. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Klärung des veränderten Wachstums, ist die Frage, ob die vermehrte Ansammlung an N-DGD1 Protein zu einer Aggregatbildung in der äusseren Hüllmembran der Chloroplasten führt und dadurch die Membranstruktur negativ beeinflusst. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von den Chloroplasten der Überexpressionslinien angefertigt und mit Aufnahmen von WT-Col2 und *dgd1-1* Chloroplasten verglichen (Abb.8). Es konnten jedoch keine Auffälligkeiten in der Membranstruktur festgestellt werden. Interessant wären an dieser Stelle weiterführende Analysen der Chloroplastenmembranstruktur durch Gefrierbrüchelektronenmikroskopie. Bei dieser Methode ist es möglich, die äußere und die inneren Hüllmembran auseinander zu brechen, und jede Seite der Membran gezielt nach strukturellen Veränderungen zu untersuchen (Kline *et al.*, 1985; Morin & Soll, 1996). In früheren Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie Studien wurden Bereiche zwischen den beiden Hüllmembranen identifiziert, "Blister" genannt, die

wahrscheinlich Kontaktstellen zwischen den Membranen darstellen (Cremers *et al.*, 1988, Morin & Soll, 1996). Es wäre interessant, herauszufinden, ob die Struktur, Anzahl oder Größe dieser "Blister" in den N-DGD1 Überexpressionspflanzen oder in der *dgd1-1* Mutante verändert sind. Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der Funktion des N-terminalen Bereichs von DGD1 war die Expression von Konstrukten mit verschiedenen Glykosyltransferase Fusionen aus *Arabidopsis* zusammen mit einer MGD1 Synthase aus Gurke (Shimojima *et al.*, 1997)(Abb.9, Abb.10, Abb.11). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass *DGD1* für eine DGDG Synthase kodiert, wenn diese zusammen mit einer MGDG Synthase aus Gurke in *Escherichia coli* koexprimiert wird (Dörmann *et al.*, 1999). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass lediglich der C-terminale Bereich von *DGD1* für eine funktionelle Glykosyltransferase kodiert, wogegen der N-terminale Bereich von DGD1 keine Galaktolipid Synthase Aktivität besitzt. Diese Aussage kann dadurch belegt werden, dass es zu keiner DGDG Lipid Akkumulation in *E.coli* Zellen kommt, die nur den N-terminalen Bereich von DGDG zusammen mit der MGD1 Synthase koexprimieren. Jedoch wurde DGDG in Zellen synthetisiert, welche ausschließlich den C-terminalen Bereich von DGD1 zusammen mit der MGD1 Synthase in *E.coli* exprimieren. Interessanterweise wurde im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Zellen eine große Menge DGDG Lipid in Zellen synthetisiert, welche DGD2 oder ein chimäres Konstrukt aus dem N-terminalen Bereich von DGD1 und DGD2 zusammen mit der MGD1 Synthase in *E.coli* exprimieren. Dies wurde auch schon durch Kelly & Dörmann (2002) gezeigt. Wahrscheinlich ist dies die Folge von verschiedenen Substratspezifitäten der rekombinanten Proteine. Durchaus denkbar wäre auch, dass es zu einer unterschiedlich starken Akkumulation der rekombinanten Proteine kommt, und als Resultat dessen zu einer unterschiedlich starken Akkumulation an DGDG Lipid. Wachstumsexperimente mit Zellen welche die beschriebenen Glykosyltransferase Fusionen in *E.coli* exprimieren zeigten deutlich, dass der N-terminale Bereich von DGD1 einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum ausübt. Alle Zelllinien, welche diesen Teil des Proteins exprimierten, ob allein oder auch in einem Fusionskonstrukt, wiesen eine erniedrigte Wachstumskapazität auf im Vergleich zu Zelllinien, welche diesen Bereich nicht exprimierten. Somit kann man vermuten, dass der N-terminale Bereich von DGD1 toxisch für das *E.coli* Wachstum ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der toxische Einfluss, den die N-terminale Extension von DGD1 auf das Wachstum von *Arabidopsis* WT-Col2 Pflanzen ausübt, in Expressionsstudien mit *E.coli* bestätigt werden konnte. Aus den erhobenen Daten kann jedoch nicht entnommen werden, in welcher Weise dieser negative Einfluss besteht.

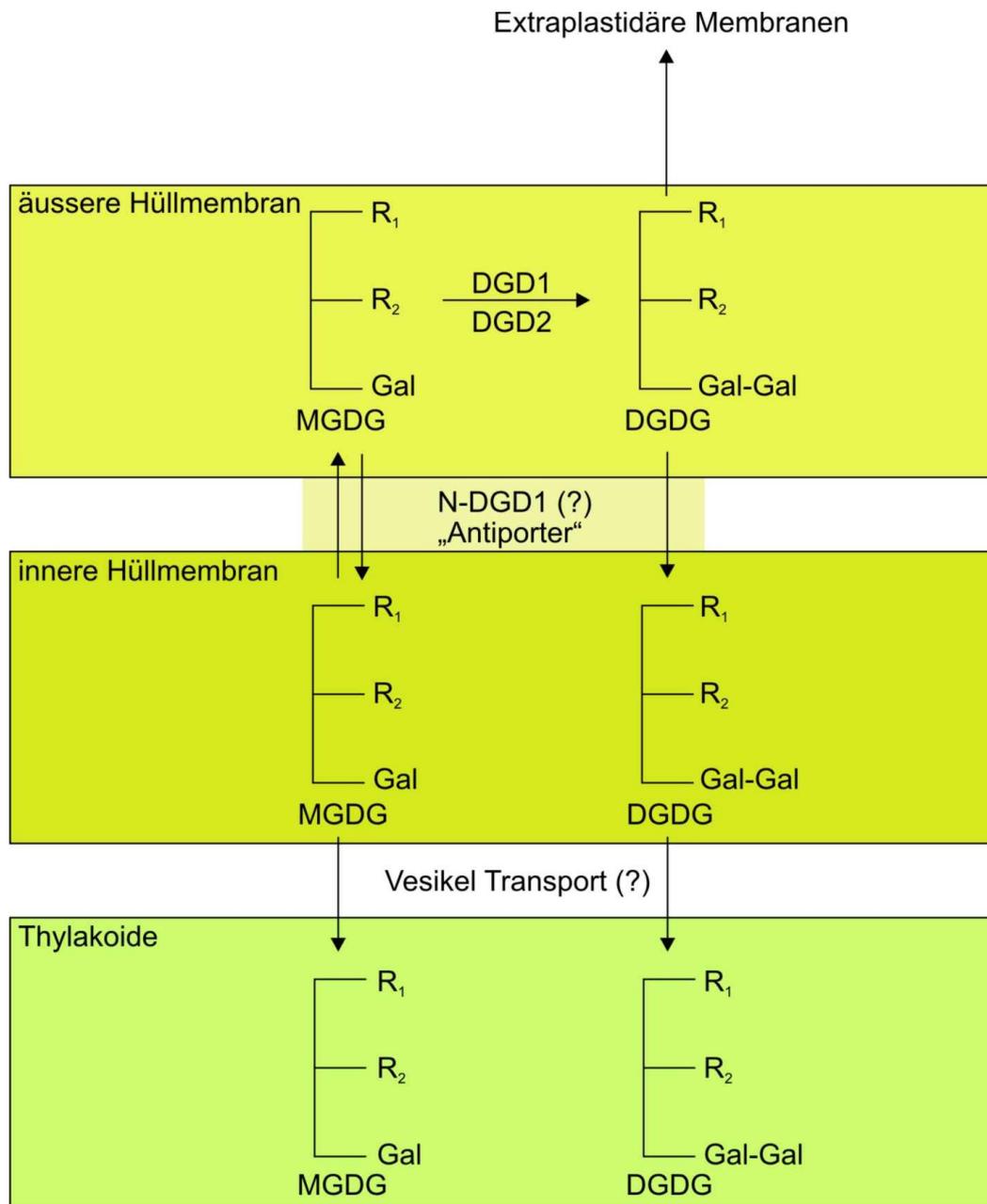


Abb.29: Schematische Darstellung der DGDG Synthese und des DGDG Transports in *Arabidopsis thaliana*.

5.2 Transitpeptide gewährleisten die korrekte Lokalisation der Glykosyltransferase in *Arabidopsis thaliana*

In Pflanzen, die ein chimäres N-MGD1-DGD2 Konstrukt im *dgd1-1* Hintergrund exprimieren, konnte ausreichend DGDG synthetisiert werden, so dass das Wachstum der *dgd1-1* Mutante teilweise komplementiert werden konnte. Ausschlaggebend für diese Komplementation scheint der N-terminale Bereich von MGD1 zu sein, welcher als Transitpeptid fungiert, und somit die korrekte Lokalisation von DGD2 in der inneren Chloroplastenhüllmembran gewährleisten kann. Komplementierungsexperimente mit *dgd1-1* Mutanten in denen DGD2 allein überexprimiert wurde, führte zu keiner Komplementation des reduzierten *dgd1-1* Wachstums (Kelly, unveröffentlicht). Jedoch wurden Studien durchgeführt, welche zeigten, dass nach Expression eines chimären N-DGD1-DGD2 Konstrukts im *dgd1-1* Hintergrund ebenfalls ein wildtypähnliches Wachstum zu beobachten war (Kelly, Dissertation, 2003). Dies weist darauf hin, dass N-MGD1 sowie N-DGD1 gleichermaßen eine Funktion als Transitpeptid tragen, und somit von großer Bedeutung für die korrekte Lokalisierung der jeweiligen Enzyme sind.

DGD1 synthetisiert vorwiegend C18 reiches DGDG, wogegen in DGDG welches durch DGD2 synthetisiert wird, der Anteil an C16 Fettsäuren besonders hoch ist (Kelly *et al.*, 2003; Härtel *et al.*, 2000). Dies deutet auf eine Substratspezifität der DGDG Synthesen in Bezug auf die Fettsäurezusammensetzung des MGDG hin. DGDG Lipid, welches in der transgenen Linie NM1D2#2 untersucht wurde, unterscheidet sich in der Fettsäurezusammensetzung vom WT-Col2. Im Vergleich zum Wildtyp ist der C16:0 Gehalt erniedrigt, jedoch der Gehalt an C16:3 erhöht. Aus diesen Daten kann nicht entnommen werden ob C16:3 ausschließlich an der *sn-2* Position verestert ist. Jedoch wurde bis jetzt noch keine C16:3 Fettsäure an einer *sn-1* Position gefunden (Heinz, 1993). Durch Positionsanalysen könnten genauere Aussagen getroffen werden. Man kann jedoch daraus schließen, dass in Linien welche N-MGD1-DGD2 in *dgd1-1* überexprimieren, vermehrt prokaryotisches MGDG zu DGDG umgesetzt wurde (Abb. 3). Ein möglicher Grund für die vermehrte Umsetzung prokaryotischen MGDG könnte die Lokalisierung der MGDG und DGDG Synthesen sein. MGD1 Protein, welches in der inneren Hüllmembran lokalisiert ist, besitzt keine Substratspezifität für eukaryotisches oder prokaryotisches DAG, dagegen bevorzugen MGD2 und MGD3 (lokalisiert in der äußeren Hüllmembran)

eukaryotisches DAG (Awai *et al.*, 2001). DGD2 scheint als N-MGD1-DGD2 Protein in der inneren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert zu sein und somit beide Synthesewege zu nutzen, jedoch mit einer Präferenz für prokaryotisches DAG.

5.3 Die Synthese von extraplastidären DGDG in *Arabidopsis thaliana*

Unter Phosphatmangel wird die Expression von den zwei DGDG Synthesen DGD1 und DGD2 induziert. DGD1 wird ständig exprimiert, wogegen die Expression von DGD2 nur unter Phosphatmangel induziert wird. Dies resultiert in der Akkumulation von DGDG in plastidären und extraplastidären Membranen (Härtel *et al.*, 2000; Kelly & Dörmann, 2002; Kelly *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, welche die Lokalisation von DGDG in plastidären und extraplastidären Membranen in verschiedenen *dgd1-1* Mutanten genauer beleuchten sollten. Zum Einen, wurde eine *dgd1-1* Mutante analysiert, welche DGD2 überexprimiert. Zum Anderen, wurde eine *dgd1-1* Mutante untersucht welche ein chimäres Konstrukt aus dem N-terminalen Bereich von DGD1 und DGD2 exprimiert. Folgende Erkenntnisse konnten aus den Untersuchungen gewonnen werden. Im WT-Col2 konnte eine DGDG Anreicherung in den plastidären Membranen festgestellt werden. Hier ist hauptsächlich die DGD1 Synthese aktiv, welche den größten Teil an DGDG für plastidäre Membranen synthetisiert. Im Gegensatz dazu steht die *dgd1-1* Mutante. Da DGDG nur durch DGD2 synthetisiert werden kann, ist die Gesamtmenge an DGDG sehr gering. Die Verteilung dieses DGDG Lipids in extraplastidären und plastidären Membranen ist jedoch ungefähr gleich. Eine leichte Veränderung konnte in einer im Wachstumsphänotyp sehr ähnlichen *dgd1-1* Mutante beobachtet werden, welche DGD2 überexprimiert. Der Anteil an extraplastidären DGDG erhöhte sich leicht im Vergleich zum *dgd1-1* Wert. Dies eine Folge der Überexpression von DGD2. Eine Verschiebung der DGDG Verteilung war ebenfalls in einer Mutante zu erkennen, welche DGD2 fusioniert mit dem N-terminalen Bereich von DGD1 exprimiert. Interessanterweise erkennt man tendenziell eine Anreicherung von DGDG in den plastidären Membranen. Folglich muss der N-terminale Bereich von DGD1 Einfluss auf den Transport des durch DGD2 synthetisierten DGDG Lipids in die Thylakoide haben und somit eine wichtige Funktion für die Lokalisierung und den Transport von DGDG in *Arabidopsis thaliana* besitzen.

5.4 Bindungsstudien zur Interaktion des DGD1 Proteins mit polaren Lipiden

Die innerere und die äußere Membran des Chloroplasten beinhalten besondere Lipide, dazu gehören unter anderem MGDG, DGDG und PG (Joyard *et al.*, 1991). Die einzigartige Lipidzusammensetzung der Chloroplastenmembranen lässt vermuten, dass damit auch spezielle Funktionen verbunden sind. Keegstra *et al.* (1989) hatte in früheren Studien vermutet, dass die besondere Lipidzusammensetzung der Chloroplastenmembranen eine direkte oder indirekte Rolle für den Protein Transport spielt. Diese These wird unterstützt durch Analysen, welche demonstrieren, dass die Protein Transport Aktivität signifikant verändert ist, wenn sich der Lipidgehalt der äußeren Hüllmembran ändert (Kerber *et al.*, 1992). Interessanterweise gab es weitere Studien, die nachweisen konnten, dass die Interaktion zwischen Transitpeptiden und künstlichen Lipiddoppelschichten, abhängig von deren Lipidkomposition ist. Die Interaktionen werden speziell dann beobachtet, wenn diese künstliche Lipiddoppelschicht MGDG enthielt (van't Hof *et al.*, 1991; Pinnaduwa *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es zu Interaktionen zwischen den polaren Lipiden MGDG, DGDG, PC, PE, PA und PI mit DGD1 Protein kommt. Genau untersucht wurde dabei auch der N-terminale Bereich von DGD1. Die Funktion von N-DGD1 ist bis heute nicht genau geklärt. Es ist bekannt, dass diese N-terminale Extension notwendig ist um DGD1 in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasts zu verankern (Fröhlich *et al.*, 2001). N-DGD1 ist strukturell auch kein typisches Transitpeptid, da es sehr lang ist (Met¹-Glu³³⁸, Abb.27). Interessanterweise konnte eine Interaktion von MGDG und DGDG mit dem N-terminalen Bereich von DGD1 nachgewiesen werden. DGDG wird in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten von den DGDG Synthasen DGD1 und unter Phosphatmangelbedingungen auch von DGD2 synthetisiert. Bis jetzt ist nicht bekannt wie der Transport dieses Lipids zur inneren Hüllmembran verläuft. Lediglich über den Transport von der inneren Hüllmembran in die Thylakoide gibt es Hinweise darauf, dass Vesikel involviert sind, die in Zusammenhang mit dem VIPP1 Protein in *Arabidopsis* stehen (Morre *et al.*, 1991; Morre *et al.*, 1991; Kroll *et al.*, 2001). Somit kann man vermuten, dass der N-terminale Bereich von DGD1 für den Transport von DGDG zur inneren Hüllmembran von großer Bedeutung ist.

Für MGDG wurde ebenfalls eine Interaktion mit N-DGD1 detektiert. Die Synthese von MGDG erfolgt durch drei verschiedene MGDG Synthasen, MGD1, MGD2 und MGD3. MGD1 ist in der inneren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert, wogegen MGD2 und MGD3 in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert sind. Der größte Teil des MGDG, das für die DGDG Synthese durch DGD1 benötigt wird, stammt aus dem MGD1 Syntheseweg (Jarvis *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007). Da von MGD1 synthetisiertes MGDG in der inneren Hüllmembran akkumuliert, DGD1 jedoch in der äußeren Membran lokalisiert ist, muss MGDG von der inneren zur äußeren Hüllmembran transportiert werden. Daher wäre es möglich, dass der N-Terminus von DGD1 MGDG als Substrat aus der inneren Membran bindet, das Lipid in der äußeren Membran von der Galaktosyltransferase-Domäne von DGD1 galaktosyliert, und das entstandene DGDG zum größten Teil wieder zurück in die innere Hüllmembran transportiert. Somit könnte man das DGD1 Protein und insbesondere den N-terminalen Bereich von DGD1 als „Antiporter“ betrachten. Es ist außerdem zu beachten, dass DGD1 nur einen bestimmten Anteil des von MGD1 synthetisierten MGDG als Substrat verwendet, nämlich den, der kein C16:0 bzw. C16:3 an sn-2 Position enthält. Dies erkennt man daran, dass DGD1-abhängiges DGDG kaum C16 Fettsäuren an sn-2 Position hat. Ein großer Teil des MGD1-abhängigen MGDG verbleibt dagegen in der inneren Membran. Dieses MGDG ist reich an C16 Fettsäuren an sn-2 Position. Die Ursache für diese selektive Galaktosylierung bestimmter molekularer Spezies von MGDG durch DGD1 ist unbekannt. Möglicherweise besitzt C-DGD1 eine Präferenz für bestimmtes MGDG. Eine andere Möglichkeit wäre, dass N-DGD1 als „Antiporter“ nur bestimmtes MGDG aus der inneren Membran herausholt. In jedem Falle kann man vermuten, dass N-DGD1 sowohl MGDG bindet, um es als Substrat aus der inneren Hüllmembran zur äußeren Hüllmembran zu transferieren, als auch DGDG bindet, um es als Produkt in die innere Hüllmembran zurück zu transportieren.

Ein Vergleich mit Interaktionen, die zwischen den beschriebenen Lipiden und dem vollständigen DGD1 Protein gefunden wurden zeigt, dass auch hier eine Interaktion von MGDG und DGDG mit DGD1 Protein detektiert wurde und bestätigt so die zuvor gewonnenen Erkenntnisse. Gleichzeitig zeigt dieser Vergleich auch, dass diese Interaktionen eindeutig von der N-terminalen Extension des DGD1 Proteins ausgehen. Interessant ist, dass zusätzlich zu den zuvor detektierten Interaktionen für

das gesamte DGD1 Protein eine Interaktion mit PI festgestellt werden konnte. Da diese Interaktion für N-DGD1 nicht festgestellt wurde, kann man schlussfolgern, dass diese Interaktion im C-terminalen Bereichs von DGD1 stattfindet. Jedoch ist fraglich, ob dies eine echte Interaktion darstellt, denn PI wird am endoplasmatischen Reticulum synthetisiert und vorwiegend zur Plasmamembran transportiert, wo es als Ausgangsstoff für Signalüberträgersubstanzen dient. Somit ist PI weder in der inneren noch in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten zu finden und somit eine Interaktion unwahrscheinlich. Eine Erklärung für diese Interaktion könnte jedoch eine Ähnlichkeit in der Struktur von PI mit MGDG und DGDG sein. Inositol ist ein Zuckeralkohol. Aus diesem Grund könnte N-DGD1 eine Affinität zu PI zeigen, welche sich ausschließlich im Lipidbindungstest zeigt, denn nur dort und nicht in der Zelle findet ein direkter Kontakt zwischen PI und DGD1 statt.

5.5 Bindungsstudien zur Interaktion verschiedener Glykosyltransferasen in *Saccharomyces cerevisiae*

Das Split-Ubiquitin-System ist eine Weiterentwicklung des Zwei-Hybrid-Systems (two hybrid system) (Fields et al., 1989) und damit ein typisches Zwei-Komponenten-System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. In dieser Bindungsstudie konnten eine Vielzahl von Hinweisen zu Interaktionen verschiedener Glykosyltransferasen gesammelt werden (Abb.17, Abb.18). Für den N-terminalen Bereich von DGD1 konnte eine Interaktion mit sich selbst und für den gesamten DGD1 Bereich detektiert werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass eine Interaktion am N-terminalen Bereich stattfinden könnte. Weiterhin gibt dies einen Hinweis darauf, dass es zu einer Dimerbildung von DGD1 in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten kommen könnte. Interessanterweise wurde keine Protein-Protein-Interaktion für den N-terminalen Bereich von DGD1 und DGD2 detektiert, wohl aber eine Interaktion für das vollständige DGD1 Protein und DGD2. Beide Glykosyltransferasen sind in der äußeren Hüllmembran lokalisiert (Fröhlich *et al.*, 2001), somit ist eine Interaktion der Proteine möglich. Wechselwirkungen finden wahrscheinlich an der C-terminalen Domäne des DGD1 Proteins statt. Aus dieser Studie ist jedoch nicht zu klären, in welchem Bereich eine Interaktion am DGD2 Protein stattfindet. Weitere Hinweise zu interagierenden Proteinen konnten für DGD2 und MGD2 Protein ermittelt werden. Beide Enzyme sind in der äußeren

Hüllmembran lokalisiert (Fröhlich *et al.*, 2001; Awai *et al.*, 2001) und somit ist eine Wechselwirkung dieser Proteine auch hier denkbar. Interessant ist, dass eine Interaktion offensichtlich am N-terminalen Bereich von DGD1 stattfindet, wogegen es in diesem Experiment nicht ermittelt werden kann, in welchem Bereich von MGD2 eine Wechselwirkung zu erwarten ist. MGD2 scheint auch in Wechselwirkung mit DGD2 zu treten. Eindeutige Hinweise dafür wurden mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems gefunden. MGD2 könnte weiterhin als Dimer in der äußeren Hüllmembran zu finden sein, da eine Interaktion zwischen den Proteinen festgestellt werden konnte. Auf welche Weise die Interaktion zwischen den getesteten Proteinen stattfindet, kann aus diesen Daten nicht erklärt werden. Jedoch liefern die hier gewonnenen Erkenntnisse Hinweise für weiterführende Experimente.

Für einen Teil der Proteinkombinationen konnten keine transformierten Hefezellen generiert werden. Wahrscheinlich ist dies ein Hinweis darauf, dass diese Proteine nicht miteinander interagieren, und somit ein Wachstum auf selektivem Medium nicht nur gehemmt, sondern teilweise sogar ausgeschlossen ist. Um falsch positive oder falsch negative Resultate offenzulegen, wurde zum X-Gal-Test zusätzlich ein Verdünnungstest der transformierten Hefezelllinien durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass in den meisten Fällen die Ergebnisse korrelierten. Für die Interaktion von MGD1 und MGD3 wurden widersprüchliche Resultate erzielt. Zwar verlief das Wachstum der Zellen auf selektivem Medium gut, jedoch zeigte der X-Gal-Test keine Blaufärbung der Zellen an, und damit keine Interaktion der beteiligten Proteine. Da MGD1 in der inneren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert, dagegen MGD3 in der äußeren Hüllmembran kann man vermuten, dass keine Interaktion zwischen den Proteinen stattfindet.

5.6 Unterschiede in der Expression von DGD1-StrepiITag und DGD1-CTAPTag Fusionsproteinen in *dgd1-1*

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Wechselwirkungen von DGD1 Protein mit anderen, bis jetzt unbekannt Proteinen zu erforschen. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde mit einem StrepiITag gearbeitet. Dieser wurde C-terminal an DGD1 fusioniert und in der *dgd1-1* Mutante exprimiert. Mit transgenen Pflanzen, die DGD1-StrepiITag Protein akkumulieren, sollten Proteinkomplexe durch

Aufreinigung über eine Streptactinsäule identifiziert werden und so DGD1 Protein und Bindungspartner offenlegen (Junttila *et al.*, 2005). Zum Anderen wurde ein TAPTag C-terminal mit DGD1 fusioniert und in der *dgd1-1* Mutante exprimiert. Auch hier sollten durch zwei aufeinander folgende, hoch affine Reinigungsschritte DGD1-CTAPTag Protein und andere interagierende Proteine identifiziert werden (Rigaut *et al.*, 1999). Transgene *dgd1-1* Pflanzen, die DGD1-StreplITag Protein akkumulierten, zeigten ein wildtypähnliches Wachstum und akkumulierten wildtypähnliche Mengen an DGDG Lipid (Abb.19;Abb.20), was zunächst nahe legte, dass größere Mengen an DGD1-StreplITag Protein in den transgenen Linien vorhanden sein müssten. Jedoch zeigte eine Western Blot Analyse, dass die Menge an DGD1-StreplITag Protein sehr gering war, bzw. durch Western Blot Analyse nicht nachgewiesen werden konnte (Abb.22). Somit scheint DGD1-StreplITag zwar so gut in der Pflanze exprimiert zu sein, dass es ausreicht, um das reduzierte *dgd1-1* Wachstum zu komplementieren, jedoch sind die Mengen an detektierbaren Protein insgesamt sehr gering. Für eine Aufreinigung von Proteinkomplexen sind möglichst große Mengen an Protein erforderlich. Aus diesem Grund wurde die Arbeit mit dem DGD1-StreplITag vorerst eingestellt. Es gab jedoch andere Studien, die zeigten, dass es möglich ist, mit dem StreplITag erfolgreich die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu studieren (Witte *et al.*, 2004). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Erfolg dieser Methode immer von dem mit dem StreplITag fusionierten Protein abhängig ist. Beeinflussende Faktoren könnten unter anderem die Größe und die Struktur des Proteins sein.

Im Vergleich mit transgenen *dgd1-1* Pflanzen, die DGD1-CTAPTag Protein akkumulierten, waren im Wachstum keine Unterschiede zu transgenen *dgd1-1* Pflanzen zu erkennen, die DGD1-StreplITag Protein synthetisierten. Die transgenen DGD1-CTAPTag Linien zeigten ebenfalls ein wildtypähnliches Wachstum (Abb.23). Weiterhin konnte auch bei diesen Linien eine wildtypähnliche Menge an DGDG detektiert werden (Abb.24). Jedoch zeigte sich durch Western Blot Analysen, dass die Expression des DGD1-CTAPTag Proteins in verschiedenen, unabhängigen Linien relativ stark war (Abb.26; Abb.27). Somit scheint der TAPTag ein besser geeigneter Tag im Vergleich zum StreplITag zu sein, um DGD1 und interagierende Proteine aufzureinigen. In dieser Arbeit konnten aus Zeitgründen keine weiterführenden Analysen zur Identifikation potentieller Interaktionspartner von DGD1 durchgeführt werden.

5.7 Ausblick

Zur Aufklärung der Funktion des N-terminalen Bereiches von DGD1 werden in naher Zukunft weitere Untersuchungen der N-DGD1 Überexpressionslinien durchgeführt. Dabei soll die Struktur der inneren und der äußeren Chloroplasten Hüllmembran durch Gefrierbruchelektronenmikroskopie genau charakterisiert werden und Veränderungen in den Hüllmembranen zum Verständnis eines veränderten Wachstums in den Überexpressionslinien beitragen.

Um die Akkumulation von extraplastidären DGDG in den transgenen Linien DGD2-*dgd1-1* und N-DGD1-DGD2-*dgd1-1* genauer zu beleuchten, sollen diese Linien unter Normalbedingungen und unter Phosphatmangel angezogen werden, Membranfraktionen präpariert und in diesen die polaren Lipide DGDG, MGDG und PE gemessen werden. Eine detaillierte Positionsanalyse der veresterten Fettsäuren des DGDG Lipids wird Auskunft über den jeweiligen Biosyntheseweg und das daran beteiligte Enzym geben.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Proteinen, welche mit DGD1 Protein interagieren, ist die Aufreinigung von Proteinkomplexen aus transgenen *dgd1-1* Linien, die DGD1-CTAPTag Protein akkumulieren. Die in dieser Arbeit generierten Linien werden bearbeitet, wobei eine Tandem Affinitätsreinigung von DGD1 Protein bzw. wechselwirkenden Proteinen erfolgen soll. Diese Proteine werden über SDS-PAGE aufgetrennt, ausgeschnitten und letztlich über die Massenspektrometrie identifiziert. Dies wird wesentlich zum Verständnis über Wechselwirkungen der verschiedenen Glykosyltransferasen, insbesondere DGD1, beitragen, jedoch lässt dieses Experiment auch Raum für die Entdeckung völlig neuer, unerwarteter Interaktionspartner.

Um die Ergebnisse des Lipidbindungstests zu bestätigen und zu erweitern, wird eine Liposomenbindungstest durchgeführt. Aus den zu untersuchenden polaren Lipiden werden Liposomen präpariert, welche dann mit N-DGD1 oder DGD1 Protein inkubiert werden. Nach SDS-PAGE und Western Blot Analyse der Liposomenfraktionen wird gebundenes N-DGD1 oder DGD1 Protein nachgewiesen.

6. Zusammenfassung

In den Chloroplasten von höheren Pflanzen sind die Galaktolipide Monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalaktosyldiacylglycerol (DGDG) die am weitesten verbreiteten Lipide. In dieser Forschungsarbeit wurde die Funktion der DGDG Synthase DGD1, und insbesondere die Funktion des N-terminalen Bereichs dieses Enzyms in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die Überexpression des N-terminalen Bereichs von DGD1 in WT-Col2 resultierte in einem reduzierten Wachstum, welches sich jedoch von der *dgd1-1* Mutante unterschied. Dies legte bereits nahe, dass die Expression von N-DGD1 einen negativen Einfluss auf das Wachstum hat. Durch Studien in einem *E.coli* Expressionssystem konnte diese These bestätigt werden. Zellen, die ausschließlich N-DGD1 zusammen mit einer MGD Synthase aus Gurke exprimierten, waren im Wachstum stark beeinträchtigt. Nicht nur der N-terminale Bereich von DGD1, auch der N-terminale Bereich von MGD1 besitzt eine Funktion als Transitpeptid und ist somit ein wichtiger Faktor zur korrekten Lokalisierung des MGD1 Proteins. In dieser Arbeit ist es gelungen, ein Fusionskonstrukt aus N-MGD1 und DGD2 in die *dgd1-1* Mutante zu transferieren und damit das reduzierte Wachstum zu komplementieren. Frühere Versuche, ein reduziertes *dgd1-1* Wachstum mit DGD2 allein zu komplementieren, scheiterten. Somit gibt dies einen Hinweis darauf, dass N-MGD1 als Transitpeptid fungieren kann.

Bindungsstudien zur Interaktion von DGD1 und N-DGD1 Protein zeigten, dass die polaren Lipide MGDG und DGDG in Wechselwirkung mit dem N-terminalen Bereich von DGD1 treten. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht erforscht, wie der Transport von DGDG und MGDG zwischen den Hüllmembranen des Chloroplasten erfolgt. Die in dieser Arbeit angefertigten Bindungsstudien konnten Hinweise darauf geben, dass N-DGD1 als eine Art „Antiporter“ fungiert, um MGDG und DGDG zwischen den Hüllmembranen zu transportieren. Weiterhin wurden Bindungsstudien zur Erforschung von Interaktionen der Glykosyltransferasen DGD1, DGD2, MGD1, MGD2 und MGD3 angefertigt. Dabei wurden Wechselwirkungen zwischen den Glykosyltransferasen DGD1, DGD2 und MGD2 detektiert. Interessant ist, dass Hinweise auf eine Dimerbildung bestimmter Enzyme gefunden wurden, so für DGD1 und MGD2. Ein weiterer Ansatz zur Erforschung von Wechselwirkungen von DGD1 Protein, mit bis jetzt unbekanntem Proteinen war die Expression von DGD1-StreplITag und DGD1-CTAPTag Fusionsproteinen in *dgd1-1* Mutanten. Es wurden für beide Tags transgene Linien generiert, die im Wachstum komplementiert waren und wildtypähnliche Mengen an DGDG akkumulierten. Die Expression der verschiedenen Tags in den Pflanzen war sehr unterschiedlich, wobei der DGD1-CTAP-Tag am stärksten exprimiert war. Mit Pflanzenmaterial dieser Linien wird eine Aufreinigung des getaggen Proteins und eine Identifizierung interagierender Proteine über Massenspektrometrie erfolgen.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetyl CoA	Acetylcoenzym A
ACP	Acyl Carrier Protein
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
16:0	Palmitinsäure
16:1, Δ^{3t}	Palmitoleinsäure
16:3, $\Delta^{7,10,13c}$	Hexadekatriensäure
8:0	Stearinsäure
18:1, Δ^{9c}	Ölsäure
18:2, $\Delta^{9,12c}$	Linolsäure
18:3, $\Delta^{9,12,15c}$	α -Linolensäure
Chla	Chlorophyll a
Chlb	Chlorophyll b
Col	Columbia
DAG	Diacylglycerin
DC	Dünnschichtchromatographie
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerin
DGlcDG	Diglukosyldiacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FS	Fettsäure
Gal	Galaktose
GC	Gaschromatographie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GGGT	Galaktolipid:Galaktolipid Galaktosyltransferase
Gluc	Glucose
GlcGalDG	Glukosylgalaktosyldiacylglycerol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo Basenpaare

kDa	Kilo Dalton
LHC	Lichtsammelkomplex (engl. Light-harvesting complex)
LHCII	Lichtsammelkomplex des Photosystem II
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerin
MGlcDG	Monoglukosyldiacylglycerin
MS	Murashige and Skoog Medium
MW	Mittelwert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
ND1D2	Chimäres N-DGD1-DGD2 Konstrukt
NM1D2	Chimäres N-MGD1-DGD2 Konstrukt
N-DGD1	N-terminaler Bereich von DGD1
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
PA	Phosphatidsäure (engl. phosphatidic acid)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PC	Phospahtidylcholin
PCR	Polymerasenkettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RNAse	Ribonuklease
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SQDG	Sulfochinovosyldiacylglycerol
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerin
TLC	Dünnschichtchromatographie (engl. thin layer chromatographie)
TriGDG	Trigalaktosyldiacylglycerin
Tris	2-Amino-2-hydroxy-methyl-3-propandiol
UDP	Uridindiphosphat
Ws	Wassilewskija
WT	Wildtyp

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb.1:	Strukturen der Galaktolipide MGDG und DGDG.....	4
Abb.2:	Schematische Darstellung möglicher Strukturen von Lipiden in wässrigen Medien.....	6
Abb.3:	Eukaryotischer und prokaryotischer Biosyntheseweg der Glycerolipide.....	9
Abb.4:	Überexpression von N-DGD1 kann durch Northern Blot Analyse nachgewiesen werden.....	41
Abb.5:	Die Überexpression von N-DGD1 in WT-Col2 kann durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden.....	42
Abb.6:	Die Überexpression von N-DGD1 in WT-Col2 führt zu einem veränderten Wachstum.....	43
Abb.7:	Quantifizierung der polaren Lipide MGDG und DGDG in transgenen N-DGD1 Überexpressionslinien.....	44
Abb.8:	Ultrastruktur von Chloroplasten verschiedener N-DGD1 Überexpressionslinien...	45
Abb.9:	In <i>E.coli</i> transferierte Glykosyltransferasen mit verschiedenen N-terminalen Fusionen.....	46
Abb.10:	Dünnschichtchromatographische Auftrennung der polaren Lipide MGDG und DGDG nach Koexpression von MGD1 aus Gurke und unterschiedlichen Glykosyltransferase Fusionskonstrukten aus <i>Arabidopsis</i> in <i>E.coli</i>	46
Abb.11:	Wachstumskurve von verschiedenen in <i>E.coli</i> exprimierten Glykosyltransferase Fusionskonstrukten aus <i>Arabidopsis</i>	47
Abb.12:	Überexpression von N-MGD1-DGD2 führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten <i>dgd1-1</i> Wachstums.....	49
Abb.13:	Überexpression von N-MGD1-DGD2 führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten <i>dgd1-1</i> Lipidgehalts.....	50
Abb.14:	Struktur der in <i>E.coli</i> exprimierten Konstrukte für Protein-Lipid-Bindungsstudien....	55
Abb.15:	Lipidbindungstest von verschiedenen polaren Lipiden nach Inkubation mit gereinigtem DGD1 und N-DGD1 Protein.....	55
Abb.16:	Das Wachstum der transformierten Hefezellen erfolgte auf Kontrollplatten mit Histidin.....	58
Abb.17:	Protein-Protein Interaktionen wurden mit dem Split-Ubiquitin-System analysiert....	59
Abb.18:	Gesamtüberblick über Protein-Protein-Interaktionen verschiedener Glykosyltransferasen.....	61

Abb.19: Die Expression von DGD1-StrepII-Tag führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten <i>dgd1-1</i> Wachstums.....	62
Abb.20: Die Expression von DGD1-StrepII-Tag führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten <i>dgd1-1</i> Lipidgehaltes.....	63
Abb.21: Quantifizierung der polaren Lipide MGDG und DGDG in der transgenen Linie D1Strep#20.....	64
Abb.22: Western Blot Analyse zeigt keine Akkumulation von DGD1 bzw. DGD1-StrepII Tag Protein in D1Strep#20.....	65
Abb.23: Die Expression von DGD1-CTAP Tag führt zu einer partiellen Komplementierung des reduzierten <i>dgd1-1</i> Wachstums.....	66
Abb.24: Die Expression von DGD1-CTAP Tag führt zu einer partiellen Komplementierung Des reduzierten <i>dgd1-1</i> Lipidgehaltes.....	67
Abb.25: Quantifizierung der polaren Lipide MGDG und DGDG in der transgenen Linie D1-CTAP#10.....	68
Abb.26: Western Blot Analyse zeigt Akkumulation von DGD1-CTAP Tag Protein in transgenen Linien.....	69
Abb.27: Die Expression von DGD1-CTAP Tag in <i>dgd1-1</i> resultiert in der Akkumulation von DGD1-CTAP Tag Protein.....	70
Abb.28: Strukturelle Charakteristika der DGD1 und DGD2 Sequenzen.....	72
Abb.29: Schematische Darstellung der DGDG Synthese und des DGDG Transports in <i>Arabidopsis thaliana</i>	75

Tabellen

Tab.1: Quantifizierung der polaren Lipide in transgenen NM1D2 Überexpressionslinien.....	50
Tab.2: Fettsäurezusammensetzung von MGDG und DGDG in einer N-MGD1-DGD2 Überexpressionslinie.....	51
Tab.3: Anreicherung von DGDG in extraplastidären Membranfraktionen.....	53

9. Literaturverzeichnis

Awai, K., Maréchal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K.I., Ohta, H. and Joyard, J. (2001) Two types of MGDG Synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana* Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98, 10960-10965

Benning, C. and Ohta, H. (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. J. Biol. Chem. 280, 2397-400

Block, M.A., Dorne, A.-J., Joyard, J. and Douce, R. (1983) Preparation and characterisation of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. I. Electrophoretic and immunochemical analysis. J. Biol. Chem. 258, 13273-1280

Bogdanov, M. and Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. J. Biol. Chem. 274, 36827-36830

Browse, J. and Somerville, C. (1991) Glycerlipid synthesis: Biochemistry and regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 467-506

Browse, J., Warwick, N., Somerville, C.R. and Slack, C.R. (1986) Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the 16:3 plant *Arabidopsis thaliana*. Biochem. J. 235, 25-31

Buchanan, B.B., Grissem, W. and Jones, R.L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA

Cline, K. and Keegstra, K. (1983) Galactosyltransferases involved in galactolipid biosynthesis are located in the outer membrane of pea chloroplast envelopes. Plant Physiol. 71, 366-372

Cline, K., Keegstra, K. and Staehelin, L.A. (1985) Freeze-fracture electron microscopic analysis of ultrarapidly frozen envelope membranes on intact chloroplasts and after purification. Protoplasma 125, 111-123

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16, 735-753

Cremers, F.F.M., Voorhout, W.F., van der Krift, T.P., Leunissen-Bijvelt, J.J.M. and Verkleij, A. J. (1988) Visualization of contact sites between outer and inner envelope membranes in isolated chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 933, 334-340

Dorne, A.J., Block, M.A., Joyard, J. and Douce, R. (1982) The galactolipid galactosyltransferase is located on the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Lett.* 145, 30-34

Dörmann, P., Hoffman-Benning, S., Balbo, I. and Benning, C. (1995) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* 7, 1801-1810

Dörmann, P., Balbo, I. and Benning, C. (1999) Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* 284, 2181-2184

Dünnwald, M., Varshavsky, A., and Johnsson, N. (1999) Detection of transient *in vivo* interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmatic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 10, 329-344

Essigmann, B., Gueler, S., Narang, R.A., Linke, D. and Benning, C. (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1950-1955

Fields, S., and Song, O.K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246

Fröhlich, J.E., Benning, C. and Dörmann P. (2001) The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 31806-31812

- Fujino, Y. and Miyazawa, T.** (1979) Chemical structures of mono-, tri- and tetraglycosyl glycerides in rice bran. *Biochim. Biophys. Acta* 572, 442-451
- Gounaris K., Mannoock D.A., Sen A., Brain A.P.R., Williams W.P. and Quinn P.J.** (1983) Polyunsaturated fatty acid residues of galactolipids are involved in the control of bilayer/non-bilayer lipid transitions in higher plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 732:229-242
- Härtel, H., Lokstein, H., Dörmann, P., Grimm, B. and Benning, C.** (1997) Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115, 1175-1184
- Härtel, H., Lockstein, H., Dörmann, P., Trethewey, R.N. and Benning, C.** (1998) Photosynthetic light utilization and xanthophyll cycle activity in the galactolipid deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 407-417
- Härtel, H., Dörmann, P. and Benning, C.** (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids following phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10649-10654
- Heemskerk, J.W.M., Storz, T., Schmidt, R.R. and Heinz, E.** (1990) Biosynthesis of digalactosyldiacylglycerol in plastids from 16:3 and 18:3 plants. *Plant Physiol.* 93, 1286-1294
- Heinz E. and Roughan P.G.** (1983) Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 plants. *Plant Physiol.* 72, 273-279
- Heinz E.** (1993) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. In: *Lipid Metabolism in Plants*. Ed: Moore T. S. J., CRC Press, Boca Raton, 33-89
- Hofmann, E., Wrench, P.M., Sharples, F.P., Hiller, R.G., Wilte, W. and Diederichs, K.** (1996) Structural basis of light harvesting by carotenoids: Peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science* 272, 1788-1744
- Jamieson, G.R. and Reid, E.H.** (1976) The sugar components of the galactosyl diglycerids from green plants. *Phytochemistry* 15, 135-136

- Jarvis P., Dörmann P., Peto C.A., Lutes J., Benning C. and Chory J.** (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD Synthase 1 mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8175-8179
- Johnsson, N., and Varshavsky, A.** (1994) Split Ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10340-10344
- Jordan, P., Fromme P., Witt H.T., Klukas O., Saenger W. and Krauss N.** (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. Nature, 411, 909-917
- Jorasch, P., Wolter, F.P., Zähringer, U. and Heinz, E.** (1998) A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1, 2-diacylglycerol: expression of *ypfP* in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products. Mol. Microbiol. 29, 419-430
- Jorasch, P., Warnecke D.C., Lindner B., Zähringer U. and Heinz E.** (2000) Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycoacylglycerolipids, glycophospholipids, glycosphingolipids and glycosylsterols. Eur. J. Biochem. 267, 3770-3783
- Joyard, J., Block, M.A., and Douce, R.** (1991) Molecular aspects of plastid envelope biochemistry. Eur. J. Biochem. 199(3), 489-509
- Juntilla, M.R., Saarinen, S., Schmidt, T., Kast, J. and Westermarck, J.** (2005) Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. Proteomics 5(5), 1199-1203
- Keegstra, K., Olsen, L., and Theg, S.** (1989) Targeting of proteins into chloroplasts. BioEssays 9, 15-19
- Kelly, A.A. and Dörmann, P.** (2002) DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol Synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. J. Biol. Chem. 277, 1166-1173
- Kelly, A.A. and Dörmann, P.** (2004) Green light for galactolipid trafficking. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 262-269

- Kelly, A.A., Froehlich, J.E. and Dörmann, P.** (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell*. 15, 2694-2706
- Kerber, B. and Soll, J.** (1992) Transfer of a chloroplast-bound precursor protein into the translocation apparatus is impaired after phospholipase C treatment. *FEBS Lett.* 306(1), 71-74
- Klaus, D., Härtel, H., Fitzpatrick, L., Foehlich, J.F., Hubert, J., Benning, C. and Dörmann, P.** (2002) Digalaktosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the *Arabidopsis thaliana* *dgd1* mutant. *Plant Physiol.* 128, 885-895
- Knudsen, E., Jantzen, E., Bryn, K., Ormerod, J.G. and Sirevåg, R.** (1982) Quantitative and structural characteristics of lipids in *Chlorobium* and *Chloroflexus*. *Arch. Microbiol.* 132, 149-154
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and Ohta, H.** (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(43), 17216-17221.
- Kojima, M., Seki, K., Ohnishi, M., Ito, S. and Fujino, Y.** (1990) Structure of novel glyceroglycolipids in Adzuki bean (*Vigna angularis*) seeds. *Biochem. Cell Biol.* 68, 59-64
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, UC, Soll, J., Westhoff, P.** (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essentiell for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4238-4242
- Kusters, R., Breukink, E., Gallusser, A., Kuhn, A. and de Kruijff, B.** (1993) A dual role for phosphatidylglycerol in protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *J. Biol. Chem.* 269, 1560-1563
- Lichtenthaler, H.K.** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments f photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148, 351-382
- Mengin-Lecreulx, D., Texier, L. and Vanheijenoort, J.** (1990) Nucleotide-sequence of the cell envelope murg gene of *Escherichia coli*. *Nucl. Acids. Res.* 18, 2810

- Miége, C., Marechal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M.A., Ohta, H., Takamiya, K-i., Douce, R. and Joyard, J.** (1999) Biochemical and topological properties of type A MGDG Synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur. J. Biochem.* 265, 990-1001
- Minnikin, D.E., Abdolrahimzadeh, H., Baddiley, J.** (1974) Replacement of acidic phosphates by acidic glycolipids in *Pseudomonas diminuta*. *Nature* 17, 249-268
- Morin, X.K. and Soll J.** (1997) Immunogold labelling of cryosectioned pea chloroplasts and initial localization of the proteins associated with the protein import machinery. *Planta* 210, 119-127
- Morre, D.J., Morre, JF, Morre, SR., Sundqvist, C., Sandelius, AS.** (1991) Chloroplast thylakoid biogenesis cell-free transfer of galactolipids from envelope membranes to thylakoids. *Plant Physiol.* 96: 140
- Morre, D.J., Sellden, G., Sundqvist, C., Sandelius, AS.** (1991) Stromal low temperature compartment derived from the inner membrane of the chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 97: 1558-1564
- Murata, N., Higashi, S.I. and Fujimura, Y.** (1990) Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1019, 261-268
- Pick, U., Gounaris, K. And Barber, J.** (1987) Dynamics of Photosystem-II and its light harvesting system in response to light changes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 85, 194-198
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Séraphin, B.** (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification 24, 218-229
- Raghothama, K.G.** (1999) Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 50, 665-693

- Reifarth, F., Christen, G., Seeliger, A.G., Dörmann, P., Benning, C. and Renger G.** (1997) Modification of the water oxidizing complex in leaves of the *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochem.* 36, 11769-11776
- Reinsberg, D., Booth, P.J., Jegerschöld, C., Khoo, B.J. and Paulsen, H.** (2000) Folding, assembly and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry* 39, 14305-14313
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Séraphin, B.** (1999) A generic protein purification method for protein complex characterisation and proteome exploration. *Nat. Biotechnology* 17, 1030-1032
- Rivas, S., Romeis, T. and Jones, J. D. G.** (2002) The Cf-9 disease resistance Protein is present in an 420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell.* 14, 689-702
- Rohila, J. S., Chen, M., Cerny, R. and Fromm, M. E.** (2004) Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant Journal* 38, 172-181
- Roughan, P.G. and Slack, C.R.** (1982) Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 97
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H. and Mann, M.** (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14440-14445
- Shimajima, M., Ohta, H., Iwamatsu, A., Masuda, T., Shioi, Y. and Takamiya, K.** (1997) Cloning of the gene for monogalactosyl diacylglycerolsynthase and its evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 333-337
- Siefermann-Harms, D., Ross, J.W., Kaneshiro, K.H. and Yamamoto, H.Y.** (1982) Reconstruction by monogalactosyldiacylglycerol of energy transfer from light-harvesting chlorophyll a/b protein complex to the photosystems in Triton X-100-solubilized thylakoids. *FEBS Lett.* 149, 191-196

Singer, S.J. and Nicolson, G. L. (1972) Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. *Science* 175, 720-725

Skerra, A and Schmidt, T.G. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326, 271-304

Schmidt, T.G. and Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protoc.* 2(6), 1528-1535

Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. And te Heesen, S. (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5187-5192

Tremolières, A., Dainese, P. and Bassi, R. (1994) Heterogenous lipid distribution among chlorophyll binding proteins of photosystem-II in maize mesophyll chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 221, 721-730

van Besouw, A. and Wintermans, J.F.G.M. (1978) Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanism in galactosylation. *Biochim. Biophys. Acta* 529, 44-53

van Leene, J., Witters, E., Inzé, D. and De Jaeger, G. (2008) Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends in Plant Science* 13, 517-520

Vikström, S., Li, L. and Wieslander Å. (2000) The nonbilayer/bilayer lipid balance in membranes. Regulatory enzyme in *Acholeplasma laidlawii* is stimulated by metabolic phosphates, activator phospholipids, and double-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 275, 9296-9302

Webb, M.S. and Green, B.R. (1991) Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 133-158

Witte, C. P., Noël, L. D., Gielbert, J., Parker, J. E. and Romeis, T. (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Molecular Biology* 55, 135-147

Wittke, S., Lewke, N., Müller, S., and Johnsson, N. (1999) Probind the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol. Biol. Cell* 10, 2519-2530

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt zu haben. Ich versichere ebenfalls, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Potsdam, Golm, den 30.03.2009

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung der Dissertation und die exzellenten Arbeitsbedingungen am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie möchte ich mich bei Prof. Dr. Lothar Willmitzer und Prof. Dr. Peter Dörmann bedanken. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Dörmann dafür, dass er meine Arbeit mit sehr viel Einsatz und großer Fachkenntnis betreute. Dies hat außerordentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Lothar Willmitzer und PD Dr. Dirk Hinchl danke ich für die Evaluierung meines Projekts.

Großer Dank gilt auch den ehemaligen Mitgliedern der AG Dörmann und weiteren Mitgliedern des Instituts für ihre Hilfe und freundliche Zusammenarbeit. Ein großer Dank gilt dabei besonders Dr. Georg Hölzl, der mich bei der Klonierung verschiedenster Konstrukte unterstützt und beraten hat, sowie Alois Schweighofer für die hervorragende Unterstützung im TAP-Tag Projekt.

Ich danke besonders Dr. Amelie Kelly für ihre fachliche Unterstützung und für ihren freundschaftlichen Rat, welcher mich durch die letzten Jahre immer wieder motivieren konnte.

Weiterhin danke ich Michael Melzer für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Josef Bergstein danke ich für die Ausführung der Fotoarbeiten.

Außerdem möchte ich mich bei den Gärtnern für die hervorragende Betreuung der *Arabidopsis* Pflanzenzucht bedanken.

An dieser Stelle sei auch den Technikern, dem IT Team und den Mitarbeitern der Medienküche gedankt, insbesondere Brigitte Amthor.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir zu jeder Zeit Kraft und Mut schenken konnten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sandra Witt
Geburtstag: 19.04.1979
Geburtsort: Eisenhüttenstadt
Familienstand: in eheähnlicher Gemeinschaft, 1 Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1985 – 1998 3. Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe,
Eisenhüttenstadt, Deutschland
Abschluss: Abitur

Studium:

1998 – 2005 Studiengang Diplom-Biologie, Universität Potsdam
2005 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare
Pflanzenphysiologie in der Gruppe von Prof. Dr. Peter
Dörmann
Thema: „Die Biosynthese von Glukolipiden in
Arabidopsis thaliana“

01/06 – 02/09 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare
Pflanzenphysiologie, Abteilung von Prof. Dr. Lothar
Willmitzer unter Betreuung von Prof. Dr. Peter Dörmann
Thema: „Die Rolle der DGDG Synthase DGD1 bei der
Galaktolipid Synthese in den Hüllmembranen von
Chloroplasten“