

**Versuche zur intrazellulären
Lokalisierung der
Sterol-Glucosyltransferase
und der
Glucosylceramid-Synthase
in Zellen von *Allium fistulosum* L.**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Oleg V. Kusmakow
aus Sankt Petersburg**

Hamburg, 2005

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua dem.</i>	<i>Aqua demineralisata</i>
AS	Aminosäure(-n)
ASG	Acylsterylglucosid
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
GCS	Glucosylceramid-Synthase
ca.	ungefähr
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus (promoter)</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CIP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CLB	<i>cholesterol like behaviour</i>
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
DOXP	1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
Fragm.	Fragment
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylceramid
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
konz.	konzentriert
L	Liter
Lsg.	Lösung
λ	Wellenlänge
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEP	Methyl-Erythritol-Phosphat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NBT	Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
NC	Nitrocellulose
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
o.ä.	oder ähnlich
OCS	<i>octopine synthase (terminator)</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered-Saline</i>
PBST	<i>Phosphate-Buffered-Saline-Tween</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q.s.	<i>quantum satis</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SG	Sterolglucosid
SGT	Sterol-Glucosyltransferase
TBS	<i>Tris-Buffered-Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered-Saline-Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	Uridindiphosphat-Glucose
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf
ÜN	über Nacht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1. EINLEITUNG	2
1.1. Struktur, Vorkommen und Biosynthese der Sterole und Sterolglycoside	3
1.1.1. Struktur der Sterole und Sterolglycoside.....	3
1.1.2. Vorkommen der Sterole und Sterolglycoside	4
1.1.2.1. Sterole und Sterolglycoside in Prokaryoten	5
1.1.2.2. Ergosterol ist das Hauptsterol der Hefen und Pilze.....	5
1.1.2.3. Pflanzen besitzen charakteristische Sterolgemische.....	6
1.1.3. Pflanzen synthetisieren eine Vielzahl von Sterolen und Sterolderivaten	8
1.1.4. UDP-Glucose:Sterol-Glucosyltransferase überträgt Glucose auf Sterole	10
1.2. Struktur, Vorkommen und Biosynthese der Sphingolipide	13
1.2.1. Struktur der Sphingolipide	13
1.2.2. Vorkommen und Diversität der Sphingolipide.....	15
1.2.2.1. Sphingolipide sind bei Prokaryoten selten.....	15
1.2.2.2. Pilze enthalten Phytosphingolipide und Cerebroside.....	16
1.2.2.3. Tiere enthalten komplexe Sphingolipide	17
1.2.2.4. Ceramidgrundgerüste der pflanzlichen Sphingolipide sind sehr variabel ...	18
1.2.3. Biosynthese von Ceramid und Glucosylceramid	19
1.2.3.1. Biosynthese von Ceramid	19
1.2.3.2. Die Glucosylceramid-Synthase. Viele Fragen sind noch offen	21
1.3. Funktionen und intrazelluläre Verteilung von Sterolen und Sphingolipiden	25
1.3.1. Sphingolipide und Sterole erfüllen vielfältige Funktionen in Biomembranen....	25
1.3.1.1. „Bulk functions“ und „signaling functions“ der Sterole.....	25
1.3.1.2. Sphingolipide sind wichtige strukturelle und funktionelle Einheiten von Biomembranen	27
1.3.1.3. Die Zusammensetzung pflanzlicher Membranlipide ändert sich bei Stress ..	28
1.3.2. Sterole sind Vorläufer für Hormone und andere Sekundärstoffe.....	29
1.3.3. Sterole und Sphingolipide übernehmen wichtige regulatorische Funktionen	31
1.3.4. Sitosterolglucosid könnte als Vorstufe bei der Cellulosebiosynthese dienen	32
1.3.5. Sterole und Ceramide wurden in diversen Membranen der Pflanzenzelle gefunden	33
1.3.5.1. Intrazelluläre Verteilung von Sterolen, Ceramiden und ihren glycosylierten Derivaten	33
1.3.5.2. Altes und Neues zur Lokalisation von SGT und GCS.....	35
1.4. Transportprozesse in einer eukaryotischen Zelle.....	37
1.4.1. Die zentrale Rolle des ER.....	37
1.4.2. Der Sekretorische Transportweg	39
1.4.3. Der nicht-vesikuläre Lipidtransport	40
1.5. Zielsetzung und Strategie.....	42
2. MATERIAL UND METHODEN	44
2.1. Geräte	44

2.2.	Chemikalien, Enzyme und anderes Verbrauchsmaterial	46
2.3.	Biologisches Material	47
2.3.1.	Mikroorganismen	47
2.3.2.	Vektoren	48
2.4.	Mikrobiologische Techniken	50
2.4.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	50
2.4.2.	Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i>	51
2.4.3.	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
2.4.4.	Abschätzung der Konzentration von Mikro-organismen	53
2.5.	Molekularbiologische Techniken	54
2.5.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	54
2.5.1.1.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	54
2.5.1.2.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
2.5.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	56
2.5.2.1.	Mini-Plasmid-DNA-Präparation nach Riggs & McLachlan	56
2.5.2.2.	Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA	57
2.5.2.3.	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	58
2.5.3.	Enzymatische Modifikation von DNA	58
2.5.3.1.	DNA-Restriktionsanalyse	58
2.5.3.2.	Dephosphorylierung von DNA-Enden	59
2.5.3.3.	Phosphorylierung von freien DNA-5'-Enden.	59
2.5.3.4.	Ligation	59
2.5.4.	Polymerase-Kettenreaktion und Klonierungen	60
2.5.4.1.	Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	60
2.5.4.2.	Klonierung von PCR-Produkten in pBAD-TOPO- und pCR2.1-Vektoren....	62
2.5.4.3.	Klonierung in Expressionsvektoren	63
2.5.5.	Sequenzierung von Plasmid-DNA	65
2.5.6.	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>Pichia pastoris</i>	66
2.5.6.1.	Integration einer Fremdsequenz ins <i>P. pastoris</i> -Genom durch die homologe Rekombination	66
2.5.6.2.	Herstellung kompetenter <i>P. pastoris</i> -Zellen und Transformation mittels Elektroporation	67
2.5.6.3.	Mut ⁺ /Mut ^S -Screening auf positiv transformierte <i>P. pastoris</i> -Kolonien	68
2.6.	Biochemische Techniken	69
2.6.1.	Proteinreinigung und -aufbereitung	69
2.6.1.1.	Aufschluß durch Erhitzung mit SDS-Probenpuffer	69
2.6.1.2.	Schatz'scher Aufschluß	69
2.6.1.3.	Präparation der Gesamtmembranen aus Hefe	70
2.6.1.4.	Reinigung eines Expressionsprodukts mit His-tag	71
2.6.1.5.	Reinigung eines His-tag-Proteins unter nativen Bedingungen	72
2.6.1.6.	Reinigung eines His-tag-Proteins unter denaturierenden Bedingungen im Batch-Verfahren	74
2.6.1.7.	Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford	75
2.6.1.8.	Fällung mit TCA	76
2.6.2.	Gelelektrophoresen	76
2.6.2.1.	Auftrennung der Nucleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese.	76
2.6.2.2.	Elution von Nucleinsäuren aus Agarosegelen	77
2.6.2.3.	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.	78
2.6.2.4.	Färbung der Polyacrylamidgele	80
2.6.3.	Western-Blot: Protein-Transfer auf eine Membran	82
2.6.4.	Visualisierung der transferierten Proteine	83
2.6.4.1.	Färbung mit Ponceau S	83
2.6.4.2.	Immunodetektion	83
2.6.4.3.	Herstellung der Antisera	84

2.6.4.4.	Immunochemische Nachweisreaktion	84
2.6.4.5.	Visualisierung der His-tag-Proteine.....	87
2.6.5.	Enzymtests	88
2.6.6.	Lipidanalysen	91
2.6.6.1.	Isolierung von Gesamtlipiden	91
2.6.6.2.	Dünnschichtchromatographie.....	91
2.6.7.	GUS-Färbung	92
2.6.8.	Das grün-fluoreszierende Protein und seine Abkömmlinge	93
2.7.	Transformation von Pflanzen	96
2.7.1.	Transiente Transformation pflanzlicher Gewebe	96
2.7.1.1.	Beschichtung von Goldpartikeln mit DNA.....	97
2.7.1.2.	Transformation von epidermalen Zwiebelzellen	97
2.7.2.	Analyse transformierter Zellen mittels Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie	98
2.7.3.	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
2.7.3.1.	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99
2.7.3.2.	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
2.7.3.3.	Selektionierung potentiell transgener Samen.....	101
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	103
3.1.	Entwicklung eines immunochemischen Detektionssystems für die GCS und die SGT aus <i>Pichia pastoris</i>	104
3.1.1.	Klonierung in pBAD-TOPO-Vektoren und Expression in <i>E. coli</i> -TOP-10-Zellen	104
3.1.1.1.	Rekombinante Expressionsprodukte zeigten <i>in vitro</i> Sterol- Glucosyltransferase-Aktivität.....	105
3.1.1.2.	Versuch einer affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Expressionsprodukten der <i>E. coli</i> -TOP-10-Zellen.....	107
3.1.2.	Expression der rekombinanten GCS- und SGT-Gene mit dem pET-System führte nicht zum Erfolg.....	109
3.1.3.	Expression der Teilsequenzen aus GCS und SGT in <i>E. coli</i>	110
3.1.3.1.	Klonierung in pET-Vektoren. Expression in <i>E. coli</i> -C41(DE3)	112
3.1.3.2.	SGT- und GCS-Fragmente aus <i>P. pastoris</i> konnten affinitätschromatographisch gereinigt werden.....	112
3.1.4.	Herstellung der Antiseren gegen die rekombinanten GCS- und SGT-Fragmente...	115
3.1.4.1.	Präparative Reinigung der GCS- und der SGT-Fragmente. Immunisierung	115
3.1.4.2.	Testen der Antiseren.....	116
3.2.	Die intrazelluläre Lokalisierung der pflanzlichen GCS und SGT mittels Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie.....	118
3.2.1.	Weitere Untersuchungen werden mit pflanzlichen Glucosyltransferasen fortgeführt	118
3.2.2.	Expression und Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine in epidermalen Zwiebelzellen	119
3.2.2.1.	Herstellung der EGFP-Fusionskonstrukte.....	119
3.2.2.2.	Die Fluoreszenz des SGT-EGFP-Fusionsproteins wurde im Cytosol und im Zellkern beobachtet	122
3.2.2.3.	Das GCS-EGFP-Fusionsprotein wird im ER vermutet	124
3.2.3.	Verifizierung der bisherigen Ergebnisse mit gelb-fluoreszierenden Fusionsproteinen.....	126
3.2.3.1.	Herstellung der EYFP-Konstrukte	126
3.2.3.2.	Lokalisierung der SGT von <i>A. thaliana</i> (Ugt80A2) im Zellkern und im Cytosol wurde mit YFP bestätigt.....	130
3.2.3.3.	Die Glucosylceramid-Synthase von <i>G. arboreum</i> ist im ER lokalisiert	132
3.2.4.	Austausch des potentiellen NLS in der Ugt80A2-Sequenz.....	134

3.2.5.	Charakterisierung und intrazelluläre Lokalisierung von Ugt80B1 – einer Isoform der SGT	135
3.2.5.1.	Untersuchung der Ugt80B1 auf <i>in vitro</i> UDP-Glucose:Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität.....	136
3.2.5.2.	Bei der Expression der rekombinanten Ugt80B1 in eukaryotischen Zellen bildet sich Sterolglucosid	138
3.2.5.3.	Die beiden Isoformen der SGT von <i>A. thaliana</i> unterscheiden sich in ihrer intrazellulären Lokalisation	139
3.2.6.	Expression und intrazelluläre Lokalisierung von verkürzten Glucosyltransferasen-Fragmenten.....	142
3.3.	Expressionsanalyse der SGT in Pflanzen.....	144
3.3.1.	Herstellung von GUS-Fusionskonstrukten mit dem <i>ugt80A2</i> -Promotor	145
3.3.2.	Das Sterol-Glucosyltransferase-Gen wird in der gesamten Pflanze exprimiert .	145
3.4.	Diskussion	148
3.5.	Zusammenfassung.....	153
	Literaturverzeichnis.....	154
Anhang	169
A1.	Primer	169
A2.	ORF-Sequenz von UGT51B1.....	172
A3.	ORF-Sequenz der GCS von <i>P. pastoris</i>	173

1. Einleitung

Glucosylceramid (GlcCer) und Sterolglucosid (SG) sind Lipide, die in den meisten eukaryotischen Organismen vorkommen. Zusammen mit anderen Membranlipiden sind sie am strukturellen Aufbau der biologischen Membranen beteiligt. Darüber hinaus scheinen sie weitere wichtige regulatorische und Signal-Funktionen in der Zelle zu erfüllen. Viele dieser „metabolischen“ Funktionen konnten in Tieren bereits aufgeklärt werden. Dennoch liefern die bisherigen Untersuchungen noch nicht viel Information über die spezifischen Funktionen von Glucosylceramid und Sterolglucosid in Pflanzen und Pilzen.

Die Glucosylceramid-Synthase (GCS) und die Sterol-Glucosyltransferase (SGT) sind Enzyme, die den letzten Schritt in der Biosynthese von GlcCer und SG katalysieren. Die Lokalisierung dieser Enzyme in pflanzlichen Zellen steht noch aus, obwohl sie zur Aufklärung von Funktionen der entsprechenden Glucolipide von Interesse wäre. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit versucht werden, die intrazelluläre Lokalisation der Glucosylceramid-Synthase und der Sterol-Glucosyltransferase in Pflanzenzellen zu bestimmen.

In der Einleitung werden zunächst die Strukturen, die Biosynthesewege und das Vorkommen der für diese Arbeit relevanten Verbindungsklassen erläutert. Die bisherigen Kenntnisse über die Funktionen und die intrazelluläre Lokalisierung von SG und GlcCer sowie von entsprechenden Glucosyltransferasen werden zusammengefaßt. Außerdem wird hier kurz auf die Transportvorgänge in einer eukaryotischen Zelle eingegangen.

1.1. Struktur, Vorkommen und Biosynthese der Sterole und Sterolglycoside

1.1.1. Struktur der Sterole und Sterolglycoside

Sterole sind tetracyclische Triterpene. Die drei in der Sesselform aneinander kondensierten Cyclohexanringe werden als A, B und C bezeichnet. Der vierte kondensierte Ring mit der Bezeichnung D ist ein Cyclopentan. In den für diese Arbeit relevanten, natürlich vorkommenden Sterolen der α -Cholestan-Reihe sind alle vier Ringe *trans*-verknüpft. Die *trans*-Verknüpfung der Ringe ermöglicht eine weitgehend spannungsfreie All-Sessel-Konformation, in der die Methylgruppen und Wasserstoffatome an den Verbindungsstellen der Ringe axiale Positionen einnehmen. Die Numerierung der Kohlenstoff-Atome nach der IUPAC-Empfehlung von 1989 [1, 2] ist in der Abbildung 1.1. beispielhaft dargestellt:

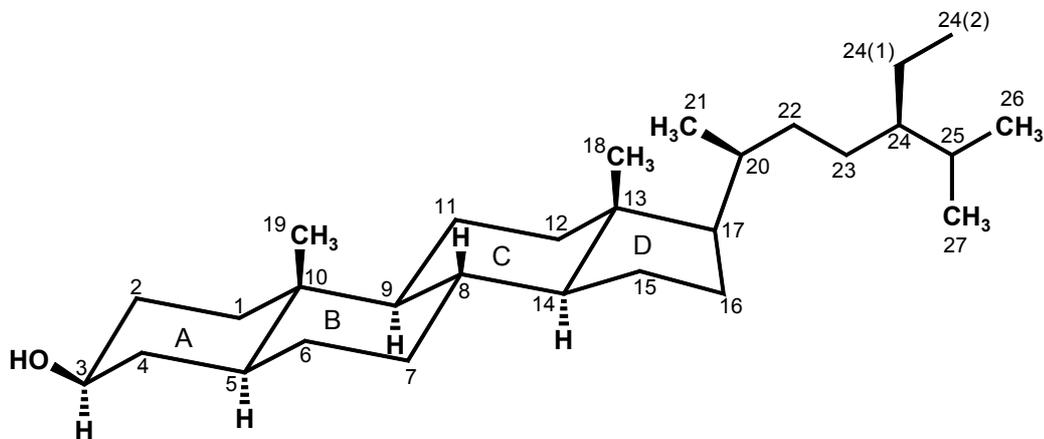


Abb. 1.1: Numerierung der C-Atome und Bezeichnung der Ringe in Sterolen nach IUPAC

Die Position von Doppelbindungen wird durch die Nummer des C-Atoms angegeben, das der Doppelbindung vorsteht. Gibt es für dieses Atom mehrere Möglichkeiten eine Doppelbindung einzugehen (wie z.B. für das C-24-Atom), so wird die Position der realisierten Doppelbindung zusätzlich durch die Nummer des nachfolgenden C-Atoms angegeben.

Bei den freien Sterolen liegt am C-3-Atom eine β -Hydroxy-Gruppe vor. Am C-17 befindet sich eine variable, verzweigte Seitenkette. Die Sterolglycoside

sind an der 3-OH-Gruppe über eine glycosidische Bindung mit dem C-1-Atom eines Zuckers verbunden. Bei der Zuckerkomponente handelt es sich meistens um β -D-Glucose. Sterolglycoside, die Galactose, Mannose, Xylose oder Arabinose enthalten, kommen weit seltener vor [3, 4]. Mit wenigen Ausnahmen bei Prokaryoten [5] sind die Zucker β -glycosidisch mit dem Sterolmolekül verbunden. Beispielhaft ist in der Abbildung 1.2. das hauptsächlich in Pflanzen vorkommende Sitosterolglucosid aufgeführt:

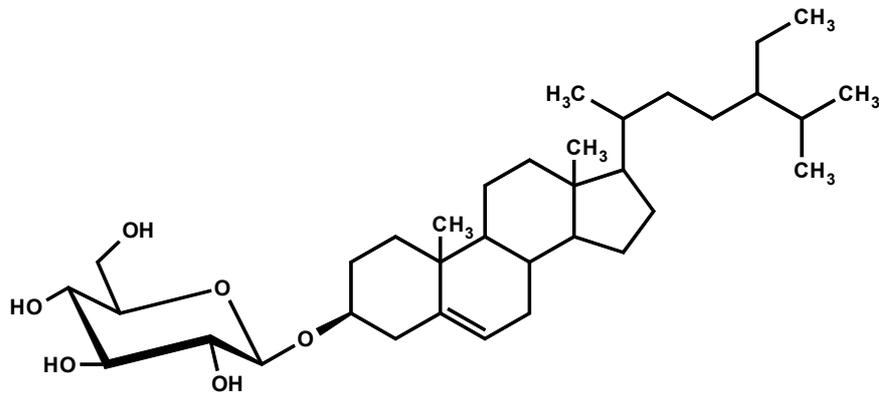


Abb. 1.2: Sitosterolglucosid

Sterolglycoside und ihre Derivate können auch mehrere, zum Teil unterschiedliche Zuckerreste tragen (siehe hierzu Abschnitt 1.2.2.4.).

1.1.2. Vorkommen der Sterole und Sterolglycoside

Während freie Sterole von den meisten Eukaryoten außer Insekten synthetisiert werden und als essentielle Membranlipide eine wichtige Rolle spielen, sind Sterolglycoside nicht so weit verbreitet. Sie sind typisch für Gefäßpflanzen, kommen aber auch in niederen Pflanzen vor [3]. Außerdem sind sie bei Hefen und Pilzen [4, 6-9] sowie Schleimpilzen [10] und einigen Prokaryoten [5, 11, 12] beschrieben worden. In Tieren konnten dagegen Sterolglycoside nur vereinzelt nachgewiesen werden. Gefunden wurden sie u.a. in der Epidermis von Hühnern, in der Haut von Schlangen [3], im Hirn von Ratten [13] und, erst vor kurzem, in humanen Fibroblasten [14].

1.1.2.1. Sterole und Sterolglycoside in Prokaryoten

Sterole kommen im prokaryotischen Reich sehr selten vor. Sie sind lediglich für die stabile L-Form von *Staphylococcus aureus* [15] und bei *Methylococcus capsulatus* [16] beschrieben worden. Im Gegensatz zu diesen beiden Arten, die Sterole selbst synthetisieren können, sind die Arten der Gattung *Mycoplasma* sterol-auxotroph [16]. Sie nehmen Sterole aus ihren Wirtsorganismen auf. Dennoch können Prokaryoten die Sterolvorstufe Squalen synthetisieren, welches sie jedoch direkt zu pentacyclischen Triterpenen – den Hopanoiden – umbauen [16].

Sterolglycoside finden sich bei Prokaryoten selten. Sie konnten bisher nur in einzelnen Organismen wie *Acholeplasma* ssp. [17], *Mycoplasma gallinarum* [11], *Borrelia hermsii* [18], *Spiroplasma citri* [19] und *Nostoc commune* [20] nachgewiesen werden. Erst vor kurzem (2003) wurde bei *Borrelia burgdorferi* das Cholesterolgalactosid entdeckt [12].

In allen beschriebenen Organismen ist das Monosaccharid β -glycosidisch mit der 3-Hydroxy-Gruppe des Sterols verknüpft. Eine Ausnahme hiervon stellt das humanpathogene Bakterium *Helicobacter pylori* dar. In dieser Spezies ist die D-Glucose α -glycosidisch mit Cholesterol verknüpft [5].

1.1.2.2. Ergosterol ist das Hauptsterol der Hefen und Pilze

Das Hauptsterol der Hefen und Pilze ist das Ergosterol (Abb. 1.3.). Bei höheren Pilzen wurden auch vereinzelt Sterole mit einer Ethylgruppe am C-24 beschrieben, die die Methylgruppe im Ergosterol ersetzt [21].

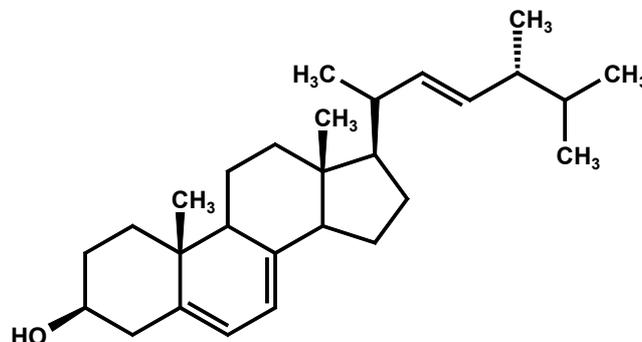


Abb. 1.3: Ergosterol, das Hauptsterol der Hefen und Pilze

Grundsätzlich können alle Hefen und Pilze Sterole synthetisieren. Bei dem *Saccharomyces*-Stamm GL 7 wurde allerdings eine Sterol-Auxotrophie nachgewiesen [22].

Die Synthese von Sterolglycosiden bei Hefen konnte u.a. für *Saccharomyces cerevisiae* [7], *Candida albicans* [4], *Candida bogoriensis* [6] und *Pichia pastoris* [23] nachgewiesen werden. In unserem Laboratorium wurden die Gene für Sterol-Glucosyltransferasen aus *C. albicans*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* kloniert [8, 23, 24].

Interessant ist die Entdeckung von Ghannoum *et al.*, die zeigen konnten, daß verschiedene morphologische Formen von *C. albicans* unterschiedlich zusammengesetzte Lipidgemische haben. Dieser humanpathogene Pilz kommt in einer Hefe- und in einer Mycelform vor. Es wurde festgestellt, daß das freie Sterol bei der Hefeform 10 - 15% der Gesamtlipide ausmacht, während es in der Mycelform nur in Spuren vorhanden ist. Der Anteil des Sterolglucosids beträgt in der Mycelform 9 - 16%, wo hingegen es sich in der Hefeform nur in Spuren findet [4]. Das Sterolglycosid von *C. albicans* wurde als Cholesterol- β -D-mannosid identifiziert [4]. Zank stellte mit *in-vitro*-Enzymtests jedoch fest, daß SGT aus *C. albicans* nur Glucose, aber nicht Mannose auf Sterole zu übertragen vermochte [24]. Eine Sterol-Glucosyltransferase aus *P. pastoris* übertrug dagegen nicht nur Glucose, sondern auch (in geringerem Maße) Xylose auf Sterole [23].

Im Gegensatz zu Hefen und Pilzen kann den Schleimpilzen kein gemeinsames Hauptsterol zugewiesen werden. So enthält *Dictyostelium discoideum* Δ^{22} -Stigmasterol [25], wohingegen in *Physarum polycephalum* Poriferasterol als Hauptanteil der Sterole auftritt [26]. Aus *D. discoideum* konnte eine cDNA isoliert werden, für die *in vitro* eine Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität nachgewiesen wurde [8, 24].

1.1.2.3. Pflanzen besitzen charakteristische Sterolgemische

Im Gegensatz zu Tieren oder Pilzen, denen je ein Hauptsterol zugeordnet werden kann, besitzen Pflanzen arttypische und charakteristische Sterolgemische, die in der Regel eine sehr komplexe Zusammensetzung aufweisen [2]. So wurden in ausgekeimten Mais-Karyopsen 61 verschiedene Sterole und pentazyklische Triterpene identifiziert [27], wenngleich die meisten dieser Komponenten in nur sehr geringen Mengen auftraten. Die in

Pflanzen am häufigsten vorkommenden Sterole sind das β -Sitosterol und das Stigmasterol. Die beiden tragen am C-24 eine Ethylgruppe und unterscheiden sich voneinander nur durch eine zusätzliche Doppelbindung zwischen C-22 und C-23 bei Stigmasterol (Abb. 1.4.).

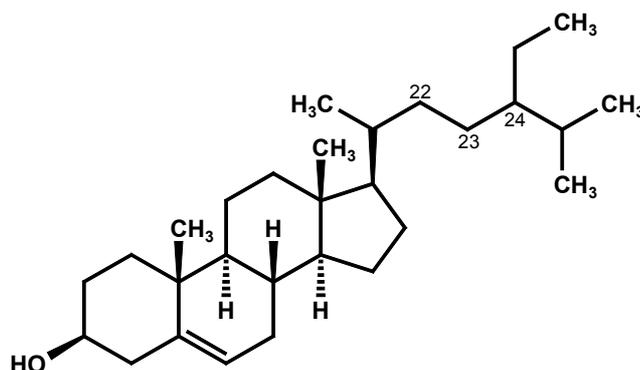


Abb. 1.4: β -Sitosterol. Stigmasterol besitzt zusätzlich eine Doppelbindung am C-22. β -Sitosterol und Stigmasterol sind die in Pflanzen am häufigsten vorkommenden Sterole

Neben diesen beiden Sterolen kommen in den meisten Pflanzen noch Campesterol, Fucosterol und auch Cholesterol vor [2, 28]. Während Sitosterol und Stigmasterol zusammen oft mehr als 70% der Gesamtsterole einer Pflanze repräsentieren [29], kommt das Cholesterol in der Regel in nur sehr geringen Mengen vor. Allerdings gibt es hier auch Ausnahmen. So kann das Cholesterol als eines der Hauptsterole von Rotalgen angesehen werden [30] und macht bei manchen Vertretern der *Solanaceae* bis zu 20% der Gesamtsterole aus [31].

In den meisten höheren Pflanzen stellen Sterole mit einer freien 3- β -Hydroxylgruppe die wichtigsten Endprodukte der Sterolbiosynthese dar. Neben diesen freien Sterole enthalten Pflanzen noch zahlreiche Sterol-derivate. Bei den sogenannten Sterolkonjugaten ist die Hydroxylgruppe am C-3 mit einer langkettigen Fettsäure verestert (Sterylester) oder mit einem Monosaccharid β -glycosidisch verknüpft (Sterolglycoside). Unter Sterol-derivaten finden sich Brassinosteroide, die als Phytohormone von Bedeutung sind [32], sowie sehr viele pflanzliche Sekundärstoffe wie Steroidalkaloide, Saponine und Cardenolide, deren pharmakologische Eigenschaften in verschiedenen Phyto- und Chemopharmaka ausgenutzt werden.

In allen auf Sterolglycoside untersuchten Pflanzen sind diese auch gefunden worden. Als Zucker tritt meistens Glucose auf. Seltener sind auch andere

Monosaccharide wie Galactose oder Mannose nachgewiesen worden [3]. Bei den im Pflanzenreich ebenfalls häufig vorkommenden acylierten Sterolglycosiden ist der Zucker in der Position 6 mit einer Fettsäure verestert. Sterolglycoside und ihre Derivate können auch mehrere, zum Teil unterschiedliche Zuckerreste tragen. Erwähnenswert sind die höher glycosylierten Sterole aus Reis und die durch ihre pharmakologische Wirkung bekannten herzwirksamen Glycoside aus Pflanzen der Gattung *Digitalis*. Die letzteren besitzen die sonst in der Natur sehr selten vorkommenden Monosaccharide wie z.B. β -D-Digitalose und β -D-Digitoxose (Abb. 1.5.):

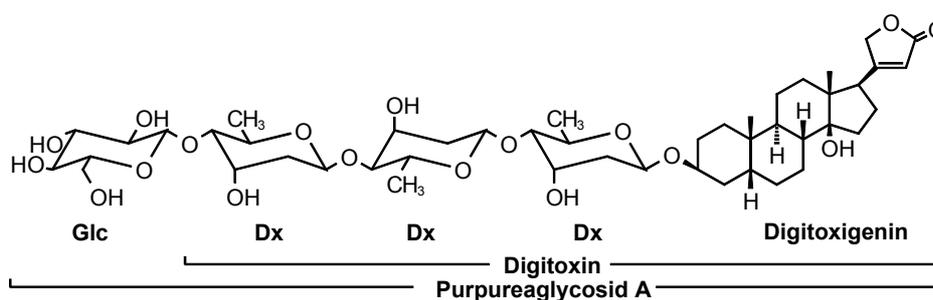


Abb. 1.5: Purpureaglycosid A. Dieses Sterolderivat besteht aus einem Aglykon, dem Cardenolid Digitoxigenin, und vier β -1,4-glycosidisch verknüpften Monosacchariden. Glc: β -D-Glucose; Dx: β -D-Digitoxose

1.1.3. Pflanzen synthetisieren eine Vielzahl von Sterolen und Sterolderivaten

Der Biosyntheseweg von Sterolen, ausgehend von zwei Acetyl-CoA-Einheiten über Mevalonsäure – Isopentenylpyrophosphat – Farnesylpyrophosphat und Squalen, ist schon seit etwa 1958 bekannt und sehr ausführlich in der Literatur beschrieben (siehe hierzu z.B. „*Sterol Metabolism*“, 2002 von Pierre Benveniste [33]). Deshalb wird hier nur der abschließende Part der pflanzlichen Sterolbiosynthese, ausgehend vom Cycloartenol, kurz erläutert. Cycloartenol ist das erste zyklische Sterol in Pflanzen. Die Sterolbiosynthese bei nicht-photosynthetischen Organismen, wie Tieren und Pilzen, läuft über eine andere Verbindung – das Lanosterol. Cycloartenol ist das Schlüsselintermediat für alle anderen pflanzlichen Sterole und Sterolderivate. Die enzymatischen Modifikationen am Cycloartenol führen zu Sterolen mit 8, 9 oder 10 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (Abb. 1.6).

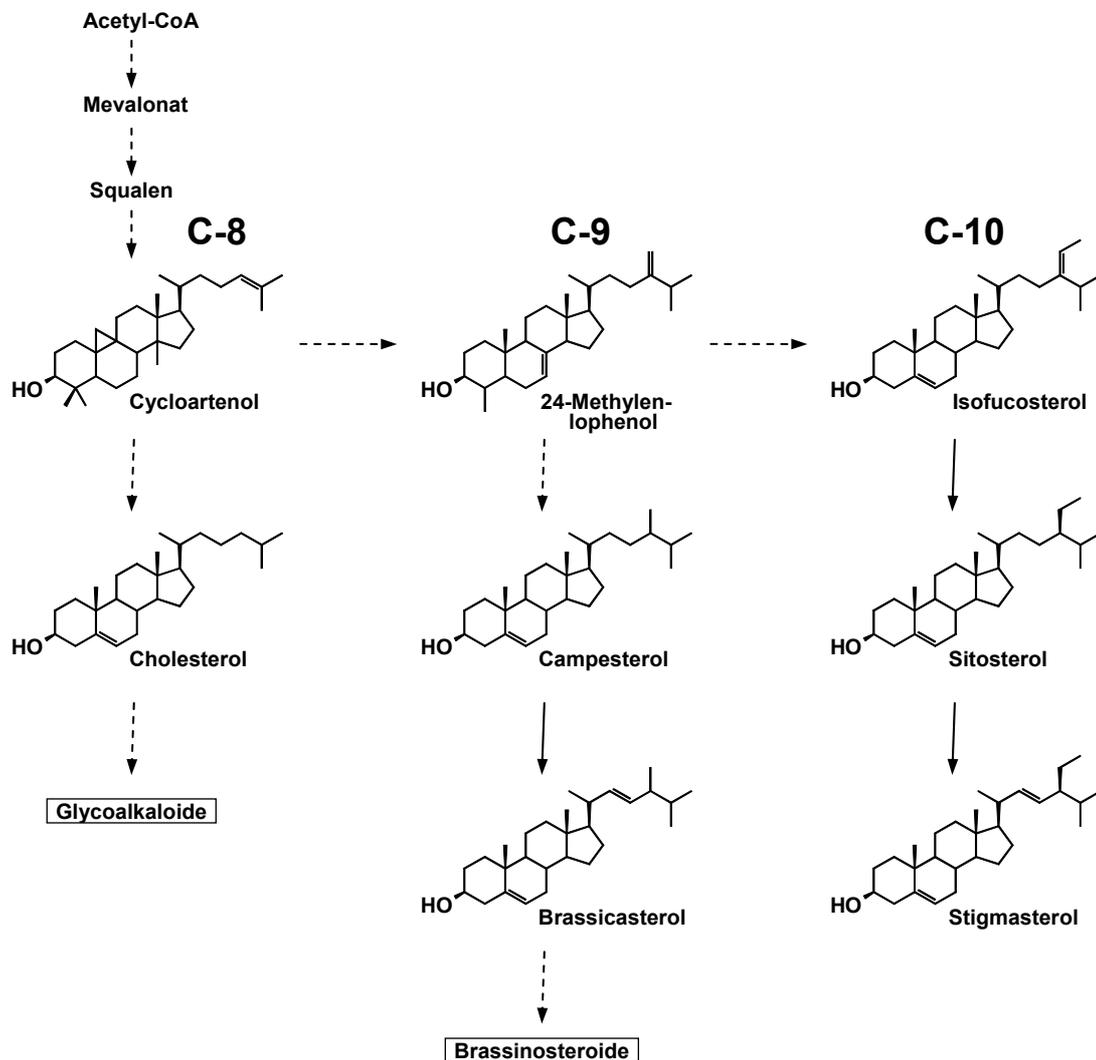


Abb. 1.6: Biosynthese der pflanzlichen Sterole. Gemessen an der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette, sind die C-8-, C-9- und C-10-Synthesewege zu unterscheiden. Der C-8-Weg führt bei vielen Pflanzen über Cholesterin zu Glycoalkaloiden. Cholesterin selbst ist bei den meisten Pflanzen in nur sehr geringen Mengen vorhanden. Der C-9-Weg führt über Campesterin zu Brassinosteroiden, einer Gruppe wichtiger pflanzlicher Hormone. Auf dem C-10-Weg entstehen die in Pflanzen am häufigsten vorkommenden Sterole: das Sitosterin und das Stigmasterin.

Der C-8-Weg führt zu Cholesterin, welches in vielen höheren Pflanzen zu einer Reihe von Sekundärstoffwechselprodukten weitermetabolisiert wird. Dabei entstehen beispielsweise Glycoalkaloide, die in Kartoffeln bei niedrigen Konzentrationen den Geschmack verstärken, bei höheren Konzentration jedoch für Insekten und Tiere toxisch sind. Glycoalkaloide dienen folglich dem Fraßschutz [34]. Andererseits führt der C-9-Weg über

24-Methylen-lophenol zum Campesterol und schließlich zum Brassicasterol, das ein Vorläufer für Brassinosteroide ist. Brassinosteroide gehören zu einer Klasse pflanzlicher Stoffwechselhormone, die einige wichtige Prozesse wie Zellteilung und -Elongation, vasculare Differenzierung und streßinduzierte Wechselwirkungen steuern [35]. Der C-10-Weg führt über Isofucosterol zu den in Pflanzen am häufigsten vorkommenden Sterolen Sitosterol und Stigmasterol.

Die in der Abbildung 1.6. dargestellten pflanzlichen Sterolendprodukte Cholesterol, Campesterol, Sitosterol, Stigmasterol und Brassicasterol unterscheiden sich zwar in der Seitenkette am C-17, haben aber ansonsten ein identisches Molekülgrundgerüst aus vier *trans*-verknüpften aneinander kondensierten Ringen. Dieses Sterolgerüst ist planar, trägt am C-3 eine β -OH-Gruppe und ist auf der α -Seite vollständig demethyliert. Die identische räumliche Struktur vieler Endprodukte ist ein Grund dafür, warum die pflanzlichen Sterol-Glucosyltransferasen unterschiedliche Sterole akzeptieren.

Alle pflanzlichen Gewebe sind in der Lage Sterole zu synthetisieren [2]. Die meisten Enzyme der Sterolbiosynthese, ausgehend vom Squalen, sind mit Membranen des Endoplasmatischen Reticulums assoziiert [36]. Dennoch kann die Beteiligung der Plasmamembran bei den abschließenden Syntheseschritten (beispielsweise bei der Synthese vom Stigmasterol) nicht völlig ausgeschlossen werden [2].

1.1.4. UDP-Glucose:Sterol-Glucosyltransferase überträgt Glucose auf Sterole

Die Biosynthese von Sterolglycosiden wird durch membrangebundene Enzyme – Sterolglycosyltransferasen – katalysiert. Die Zucker, die auf verschiedene Sterole übertragen werden, liegen dabei in der aktivierten Form als Zuckernucleotide vor. Ende der 60-er Jahre gelang Hou *et al.* erstmals die *in-vitro*-Glucosylierung von Sterolen mit UDP-Glucose an zellfreien Extrakten unreifer Samen der Sojabohne [37]. 1994 haben Warnecke und Heinz erstmals eine pflanzliche Sterol-Glucosyltransferase isoliert [38]. Diese SGT aus Hafer (*Avena sativa*; Ugt80A1) sowie die SGT

von *A. thaliana* (Ugt80A2) wurden anschließend kloniert und charakterisiert [39].

Pflanzliche Sterol-Glucosyltransferasen besitzen eine hohe Spezifität gegenüber der Zuckerkomponente. Die SGT von *A. sativa* wie die von *A. thaliana* können *in vitro* nur die UDP-Glucose als Glycosyldonor verwerten. UDP-Galactose sowie UDP-Mannose werden nicht akzeptiert [38, 39]. Die für die SGT aus verschiedenen Spezies zuvor beschriebene Verwertung von UDP-Galactose kann mit einer Präsenz der Glucose-4-Epimerase in den untersuchten Zellextrakten erklärt werden [3]. Andere Nucleosidphosphat-Derivate von Glucose (ADP-Glc, GDP-Glc, CDP-Glc, TDP-Glc oder UMP-Glc) sind viel schlechtere Substrate für das Enzym und werden, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Mengen verwertet [3, 38].

Gegenüber der Sterolkomponente ist die Spezifität dagegen weniger stark ausgeprägt. Sterol-Glucosyltransferasen aus *A. thaliana* und *A. sativa* akzeptieren *in vitro* β -Sitosterol, Stigmasterol, Cholesterol und auch das in Pilzen vorkommende Ergosterol [38, 39]. Sterol-Glucosyltransferasen aus *P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *D. discoideum* akzeptieren *in vitro* Cholesterol, Sitosterol und Ergosterol [8]. Im allgemeinen werden Sterole mit einer 3- β -OH-Gruppe, einem planaren Grundgerüst und einem demethylierten C-4-Atom umgesetzt [3, 40]. Dies bedeutet, daß die SGT viele Sterolendprodukte als Substrat akzeptieren kann, alle Zwischenprodukte der Sterolbiosynthese sowie andere, den genannten Kriterien nicht entsprechende, Sterole und Steroide jedoch nicht umsetzt.

Die funktionelle Expression von Sterol-Glucosyltransferasen aus *Arabidopsis* und Hafer in *E. coli* [39] zeigt, daß zur Entfaltung von *in-vitro*-Enzymaktivität keine eukaryotische, posttranslatorische Prozessierung für dieses Enzym notwendig ist. Die Regulation des Enzyms ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei Pilzen deutet Vieles darauf hin, daß die Sterolglycoside vermehrt nur in bestimmten Entwicklungsstadien des Organismus auftreten [4, 10].

Der von Warnecke *et al.* durchgeführte Sequenzvergleich von zwei pflanzlichen und vier pilzlichen Sterol-Glucosyltransferasen zeigt, daß alle sechs Enzyme nur in ihrer C-terminalen Region eine signifikante Sequenzähnlichkeit besitzen [8]. Die N-terminalen Bereiche sind nicht konserviert; im Vergleich zu den pilzlichen Enzymen fehlen die ersten 820 Aminosäuren bei Sterol-Glucosyltransferasen aus Hafer und *Arabidopsis*. Untersuchungen mit N-terminal-verkürzten Fragmenten der SGT aus

S. cerevisiae (Ugt51p) bestätigen, daß die enzymatische Aktivität dieses Enzyms mit der C-terminalen Region assoziiert ist. Alle sechs untersuchten Sterol-Glucosyltransferasen besitzen zudem eine putative Steroid-Bindungsdomäne in der konservierten Region am C-Terminus [8].

Die schon im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte computergestützte Analyse[★] der Aminosäuresequenz der SGT aus *A. thaliana* (Ugt80A2) ergab zum Teil widersprüchliche Resultate. So wurde dieses Enzym mit PSORT- und TargetP-Programmen als Chloroplasten-Protein gedeutet. Eine solche Vorhersage erscheint jedoch als sehr unwahrscheinlich. Bei bisherigen Untersuchungen konnten in den Chloroplasten keine signifikanten Mengen von freien Sterolen und keine Sterolglycoside detektiert werden [3, 39]. Mit dem HMMTOP-Programm wurde eine Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 234-257 detektiert. Mit dem TMHMM-Programm wurde dagegen keine TMD gefunden. Die Existenz einer Transmembrandomäne bei Ugt80A2 mag fraglich erscheinen, und die endgültige Antwort kann nur durch weitere Untersuchungen gegeben werden. Fakt ist jedoch, daß sich dieses Enzym bei allen biochemischen Untersuchungen wie ein Membranprotein verhielt (siehe die in diesem Abschnitt zitierte Literatur).

Bei der Sequenzanalyse mit PSORT-, iPSORT- und TargetP-Programmen wurden keine Signalpeptide detektiert, die für eine bestimmte intrazelluläre Lokalisierung des Proteins verantwortlich sein könnten. Bei der Analyse in der NLS-Datenbank wurde jedoch ein potentiell Kern-Lokalisierungssignal *KKKLLLRP* zwischen den Aminosäuren 374 – 383 entdeckt. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Untersuchungen werden im Abschnitt 3.2.4. ausführlich behandelt.

★ Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe folgender, öffentlich zugänglicher Internet-Programme und -Datenbanken durchgeführt: **PSORT** – Program for the prediction of protein localization sites in cells (i**PSORT** – Detection of N-terminal sorting signals) von Kenta Nakai, Human Genome Center, Institute for Medical Science, University of Tokyo, Japan (<http://psort.nibb.ac.jp>); **TargetP** – Prediction of the subcellular location of eukaryotic protein sequences von Emanuelsson *et al.* [41] und **TMHMM** – Prediction of transmembrane helices in proteins, The Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk/services>); **HMMTOP** – Predictions of transmembrane helices and topology of proteins von Gabor Tusnady, Institute of Enzymology, Biological Research Center, Budapest, Ungarn (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html>); **NLS-Datenbank** – Database of nuclear localization signals von Rajesh Nair & Phil Carter, Columbia University, New York, USA (<http://cubic.bioc.columbia.edu/db/NLSdb>)

1.2. Struktur, Vorkommen und Biosynthese der Sphingolipide

1.2.1. Struktur der Sphingolipide

Glycosylceramide gehören zur großen Verbindungsklasse der Sphingolipide, deren Grundmolekül aus einer Sphingobase und einer amidgebundenen langkettigen Fettsäure aufgebaut ist. Durch Modifikationen dieser Grundstruktur, die sowohl bei der Sphingobase als auch beim Fettsäurerest auftreten können, entstehen Ceramide, Cerebroside, Sphingomyeline, Sulfatide, Ganglioside und viele andere Sphingolipide.

Das Rückgrat aller Sphingolipide – die Sphingobase – variiert in Kettenlänge, Struktur und Position der Kettenverzweigungen sowie in ihrem Sättigungs- und Hydroxylierungsgrad. In der Abbildung 1.7. ist die typische Sphingobase vieler Hefen und Pilze dargestellt:

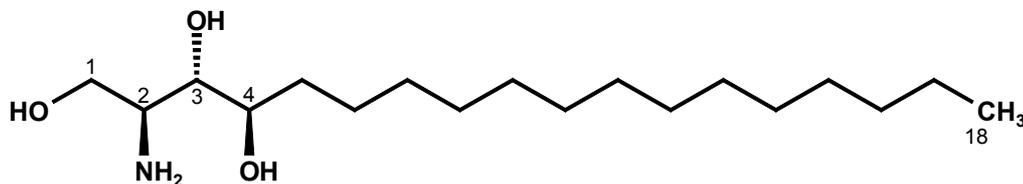


Abb. 1.7: 4-Hydroxysphinginin ((2S,3S,4R)-D-Ribo-2-Aminooctadecan-1,3,4-triol), die typische Sphingobase vieler Hefen und Pilze.

Phytosphingosin besitzt drei chirale Kohlenstoff-Atome, deren Konfiguration stets (2S, 3S, 4R) ist. Die Kettenlänge umfaßt 18 C-Atome, die bei Phytosphinginin alle gesättigt sind. Bei den anderen in der Natur vorkommenden Sphingobasen kann die Kettenlänge zwischen 14 und 22 Kohlenstoffen variieren. Bei ungesättigten Sphingobasen treten die Doppelbindungen typischerweise an C-4 und C-8 auf. Die methylierten Sphingobasen tragen eine CH₃-Gruppe üblicherweise in der ω-1-Position.

Durch die N-Acylierung der Sphingobase mit einer langkettigen Fettsäure entstehen Ceramide. Die Kettenlänge der Fettsäure variiert zwischen 14 und 26 C-Atomen. Bei dem in Hefen vorkommenden Phytoceramid ist das Phytosphinginin über eine Amidbindung mit einer C26-α-Hydroxyfettsäure verknüpft (Abb. 1.8.):

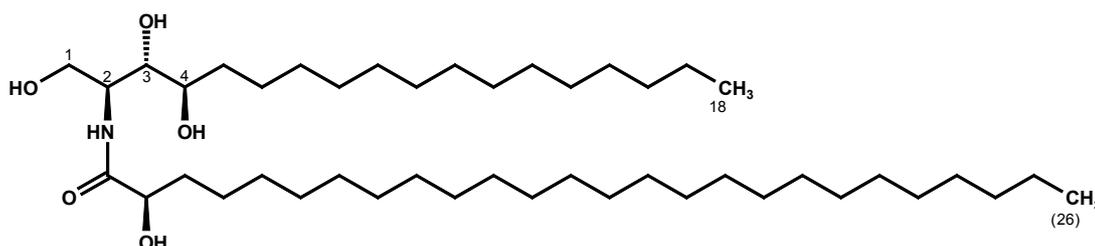


Abb. 1.8: Phytoceramid ((R)-N-(2-Hydroxyhexacosanoyl)-4-hydroxysphinganine). Das Molekül setzt sich aus Phytosphinganine und einem C26- α -Hydroxyfettsäurerest zusammen.

Außer den α -hydroxylierten Fettsäuren kommen bei Ceramiden auch α,β -Dihydroxyfettsäuren vor. Die Sphingobase kann auch mit einer gesättigten oder einer ungesättigten Fettsäure acyliert sein.

Durch die Derivatisierung der Ceramide an der primären OH-Gruppe der Sphingobase entstehen verschiedenartige Sphingolipide. Die wichtigsten dabei auftretenden Verbindungen sind beispielhaft in Tabelle 1.1. dargestellt:

Tabelle 1.1: Die durch Derivatisierung der Ceramide an der primären OH-Gruppe der Sphingobase entstehende Verbindungen

Verbindungsklasse	Verbindung	Ausgangsverbindungen
Glycosphingolipide	Cerebroside	Ceramid + Monosaccharid
	Globoside	Glucosylceramid + Zucker
	Ganglioside	Glucosylceramid + Zucker + Sialinsäure
	Sulfatide	Galactosylceramid + Sulfat
Phosphosphingolipide	Sphingomyeline	Ceramid + Phosphocholin
	Phytosphingolipide	Ceramid + Phosphoinositol + Zucker
Acylierte Sphingolipide	1-O-Acylceramide	Ceramid + Fettsäure

Bei Glycosylceramiden, die auch als Cerebroside bezeichnet werden, ist die primäre Hydroxylgruppe der Sphingobase glycosidisch mit einem Monosaccharid verknüpft. Bei dem Zucker, der die polare Kopfgruppe des

Cerebrosid-Moleküls darstellt, handelt es sich meist um Glucose oder Galactose.

Generell kann festgestellt werden, daß die Sphingolipide der Tiere durch den strukturellen Reichtum von polaren Kopfgruppen auffallen, wohingegen Pflanzen größere strukturelle Vielfalt der lipophilen Sphingolipidgrundgerüste aufweisen. Pilze haben dagegen ein charakteristisches Ceramidgrundgerüst, das nur wenig variiert.

1.2.2. Vorkommen und Diversität der Sphingolipide

Sphingolipide sind typische Membranlipide der eukaryotischen Zellen. Sie existieren daher in allen eukaryotischen Organismen und kommen bei Prokaryoten nur sehr selten vor. Obwohl die Sphingolipide aller Organismen ein generell ähnliches Ceramidgrundgerüst enthalten, weisen sie durch Derivatisierung der Sphingobase sowie der Fettsäure zum Teil erhebliche Unterschiede auf. Diese werden nachfolgend kurz erläutert.

1.2.2.1. Sphingolipide sind bei Prokaryoten selten

Bei Prokaryoten kommen Sphingolipide ebenso wie Glycosphingolipide nur vereinzelt vor. Ceramide sind bei *Bacteroides* und *Sphingobacterium* nachgewiesen worden [42, 43]. *Chlorobium limicola* enthält mit Sialinsäure derivatisierte Ceramide [44]. Einige Arten der Gattung *Mycoplasma* sind Sphingomyelin-auxotroph und somit auf die Sphingomyelinsynthese ihres Wirtsorganismus angewiesen [45].

Bei einigen *Sphingomonas*-Arten sind Glycosphingolipide nachgewiesen worden. So enthält *Sphingomonas paucimobilis* Glucuronosyl-Ceramid, bei dem die primäre Hydroxylgruppe der Sphingobase über eine α -glycosidische Bindung mit Glucuronsäure und weiteren Monosacchariden verknüpft ist [46]. Bei anderen *Sphingomonas*-Arten sind Galacturonosyl-Ceramide nachgewiesen worden [47].

1.2.2.2. Pilze enthalten Phytosphingolipide und Cerebroside

Die meisten Hefen und Pilze enthalten die Inositol-haltigen Sphingolipide und Cerebroside. Alle Phytosphingolipide enthalten als Sphingobase 4-Hydroxysphinganin (Abb. 1.7.). Die an der Sphingobase amidgebundenen Fettsäuren sind ungewöhnlich lang und enthalten 24 bis 26 Kohlenstoffatome. Es kommen sowohl α -hydroxylierte als auch nicht-hydroxylierte Fettsäuren vor. Die polaren Kopfgruppen enthalten immer *myo*-Inositol und können zusätzlich Monosaccharide tragen. Die inositolhaltigen Sphingolipide von *S. cerevisiae* finden sich in hohen Konzentrationen in der Plasmamembran [48].

Die Glycosylceramide der Pilze besitzen als charakteristische Sphingobase (4E,8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin. Die α -hydroxylierten Fettsäuren der Cerebroside liegen gesättigt oder einfach ungesättigt (C-3) vor und enthalten 16 oder 18 Kohlenstoffatome [49]. β -D-Glucose ist der Zucker, der bei den meisten Cerebroside der Pilze die polare Kopfgruppe darstellt. Daneben enthalten Cerebroside aus *Aspergillus fumigatus* [50], *Candida utilis* [51], *Neurospora crassa* [52] und der Hefeform von *Sporothrix schenckii* [53] β -D-Galactose. In der Abbildung 1.9. ist das für Pilze typische β -Glucosylceramid dargestellt:

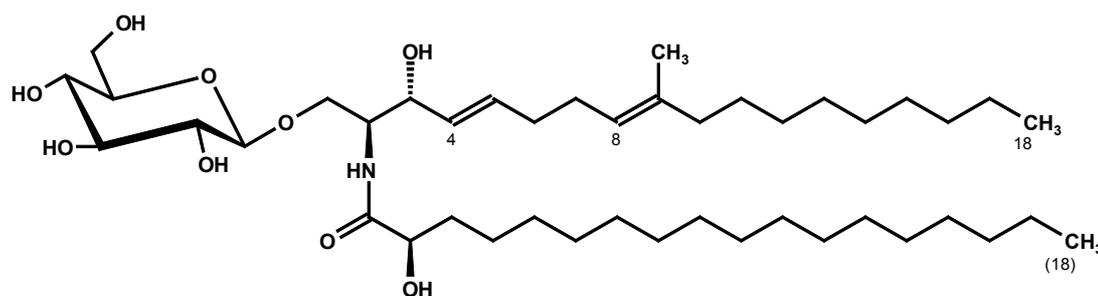


Abb. 1.9: β -D-Glucosyl-(1,1)-Ceramid. Die α -hydroxylierte Stearinsäure (C18) ist durch eine Amidbindung mit der Sphingobase (4E, 8E)-9-Methylsphinga-4,8-dienin verknüpft. An die primäre OH-Gruppe der Sphingobase ist β -glycosidisch eine Glucose gebunden

Nach bisherigen Untersuchungen enthalten nur die Hefen *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* kein Glucosylceramid [49, 54]. Die Sphingolipide dieser Organismen bestehen anscheinend ausschließlich aus Phytosphingolipiden mit dem 4-Hydroxysphinganin als Sphingobase.

1.2.2.3. Tiere enthalten komplexe Sphingolipide

Freie Ceramide kommen in tierischem Gewebe nur in geringen Mengen vor, bilden aber die Ausgangssubstanz für komplexe Sphingolipide. Die häufigsten Sphingolipide in Säugetieren sind die Sphingomyeline [55]. Es handelt sich dabei um Ceramide mit einer polaren Phosphocholin- oder Phosphoethanolamin-Kopfgruppe. Sie machen je nach Zelltyp bis zu 25% der Masse der Gesamtmembranlipide aus [56]. Besonders viel Sphingomyelin befindet sich in der Myelinscheide, die die Axonen der Nervenzellen umgibt.

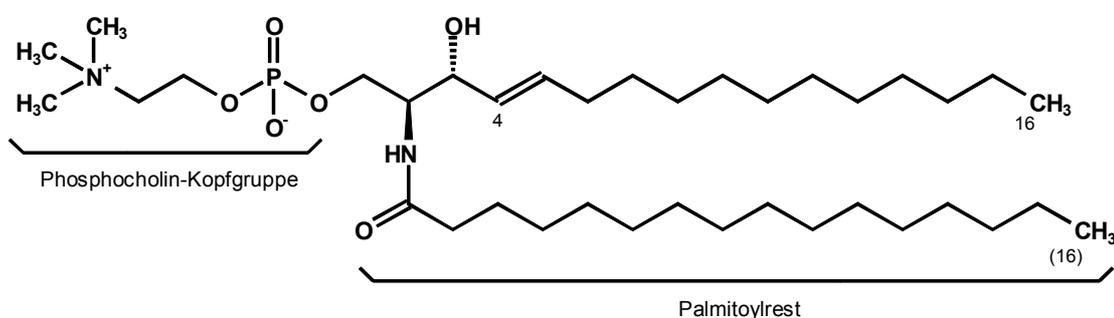


Abb. 1.10: Sphingomyelin. Eine C16-Sphingobase ist durch eine Amidbindung mit dem Palmitinsäurerest verknüpft. Eine Phosphocholin-Gruppe sitzt am Kopf des Moleküls.

Neben Phosphosphingolipiden spielen in tierischen Zellen die Glycosphingolipide eine bedeutende Rolle. Die einfachsten Vertreter der Glycosphingolipide sind die Cerebroside. Galactocerebroside, die als polaren Molekülkopf eine β -D-Galactose tragen, sind essentiell für die Zellmembran der Nervenzellen im Gehirn. Glucocerebroside, mit β -D-Glucose als Kopfgruppe, befinden sich vorwiegend in Zellmembranen anderer Gewebe [55]. Bei den in tierischen Zellen ebenfalls oft vorkommenden Sulfatiden ist die Kopfgruppe der Galactocerebroside zusätzlich sulfatiert.

Ganglioside, die ca. 6% der Gehirnlipide ausmachen [55], sind saure Ceramid-Oligosaccharide, die in ihrer Kopfgruppe mindestens einen Sialinsäurerest enthalten. Die komplexen Glycosphingolipide der Tiere wie Ganglioside und Globoside können durch weitere Glycosylierungen komplizierte Strukturen aufweisen. Neben Galactose und Glucose können bei diesen Lipiden u.a. Mannose und Inositol auftreten.

1.2.2.4. Ceramidgrundgerüste der pflanzlichen Sphingolipide sind sehr variabel

Im Vergleich zu den Sphingolipiden von Tieren und Pilzen ist die strukturelle Vielfalt der pflanzlichen Ceramidgrundgerüste wesentlich größer. Ähnlich wie bei Phytosterolen gibt es im Pflanzenreich keine durchgehend charakteristischen Sphingolipide. Sie variieren von Art zu Art und ergeben vielmehr für jede Art typische Sphingolipid-Gemische, deren Zusammensetzung sich wiederum in Abhängigkeit von der Jahreszeit und den Umweltbedingungen verändert. Freie Ceramide kommen in Pflanzen nur in geringen Mengen vor, viel häufiger sind Glycosylceramide und phosphoinositolhaltige Sphingolipide [57]. Die letzteren Verbindungen, die als GIPCs bezeichnet werden (*glycosyl inositol phosphoryl ceramides*), existieren als freie Membranlipide, übernehmen aber in modifizierter Form auch eine wichtige Rolle als Membran-Anker von kovalent-gebundenen Proteinen der Plasmamembran [49].

Die Grundgerüste von Glycosylceramiden höherer Pflanzen können aus sechs unterschiedlichen C-18-Sphingobasen und mehr als zehn verschiedenen α -Hydroxyfettsäuren aufgebaut sein (Abb. 1.11.). Dies ergibt eine Vielzahl möglicher Kombinationen, die auch tatsächlich fast alle im Pflanzenreich vorkommen [49]. Die Sphingobase kann am C-4 hydroxyliert sein oder eine *trans*-Doppelbindung enthalten; am C-8 kann sie *cis* oder *trans* desaturiert vorliegen.

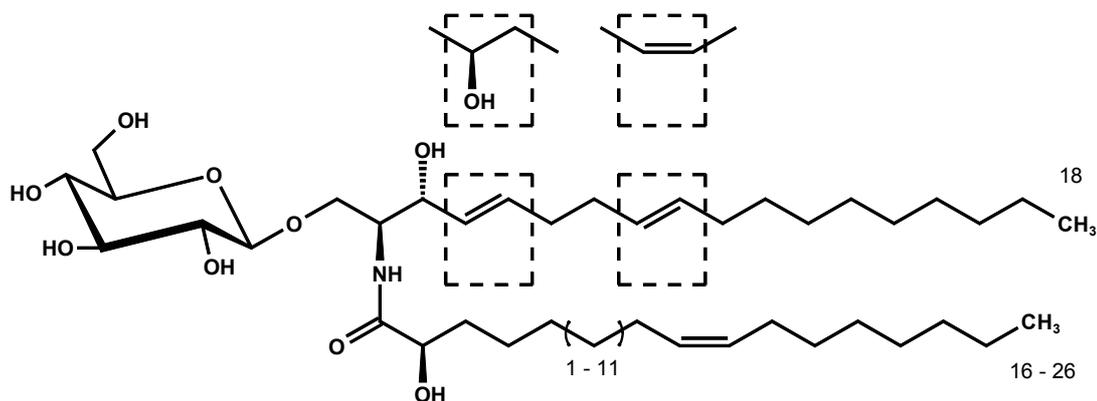


Abb. 1.11: Die Grundgerüststruktur der pflanzlichen Cerebroside (hier ein Glucosylceramid) ist sehr variabel. Ihre Sphingobasen können eine Hydroxylierung oder eine *trans*-Desaturierung am C-4 sowie eine *cis*- oder *trans*-Desaturierung am C-8 aufweisen. Die 14 bis 26 C-Atome langen, zumeist α -hydroxylierten Fettsäuren können eine *cis*-Doppelbindung in der Position n-9 haben (nach Warnecke & Heinz, 2003 [49])

Die Sphingobase 4-Hydroxysphingonin wurde bisher in nur sehr geringen Mengen bei pflanzlichen Cerebrosiden gefunden. Allerdings wurde sie in einer Studie von Uemura *et al.* als Hauptkomponente in *A. thaliana* identifiziert [58]. Die Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäuren variiert bei pflanzlichen Cerebrosiden zwischen 14 und 26 C-Atomen, wobei C₁₆-, C₂₀-, C₂₂- und C₂₄-Fettsäuren häufiger vorkommen. Diese Fettsäuren sind stets in der α -Position hydroxyliert und können eine n-9-cis-Doppelbindung tragen [49, 59]. Bei anderen pflanzlichen Sphingolipiden kommen außerdem die nicht-hydroxylierten Fettsäuren vor [60]. Bei den in Pflanzen gefundenen Glucosylceramiden dominieren die gesättigten Fettsäuren, wohingegen die einfach-ungesättigten Fettsäuren in viel geringeren Mengen auftreten [61].

Unter den pflanzlichen Glycosphingolipiden dominieren Glucose und Mannose als polare Kopfgruppen-Bausteine. In der Plasmamembran und dem Tonoplast finden sich u.a. β -D-Glucosylceramid und β -D-Mannosylceramid, wobei die erstgenannte Verbindung in höherer Quantität vorliegt [60]. Höher glycosidierte Cerebrosid-Derivate wurden ebenfalls gefunden. Insbesondere bei Getreide-Arten können in der Glycosidkette bis zu vier Zucker auftreten [60]. Algen und Flechten unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Sphingolipide von den höheren Pflanzen. So enthalten beispielsweise Flechten β -D-Galactosylceramide [62].

1.2.3. Biosynthese von Ceramid und Glucosylceramid

1.2.3.1. Biosynthese von Ceramid

Bis zur Bildung von Sphingobasen und Ceramiden verläuft die Sphingolipidbiosynthese in allen Eukaryoten über die gleichen Mechanismen [63] (Abb. 1.12.). Erst die Synthese komplexer Sphingolipide aus Ceramid zeigt spezies- und gewebespezifische Unterschiede.

Der erste und zugleich geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ceramidsynthese ist die Kondensation von Serin mit Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphingonin. Diese Reaktion wird von der Serin-Palmitoyltransferase mit Pyridoxalphosphat als Coenzym katalysiert. Anschließend wird 3-

Ketosphingalin in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch die 3-Ketosphingalin-Reduktase zu Sphingalin reduziert. In der nachfolgenden Reaktion acyliert die Ceramid-Synthase (Sphingalin-N-Acyltransferase) Sphingalin zu Dihydroceramid. Schließlich wird Dihydroceramid NAD(P)H-abhängig zum Ceramid desaturiert.

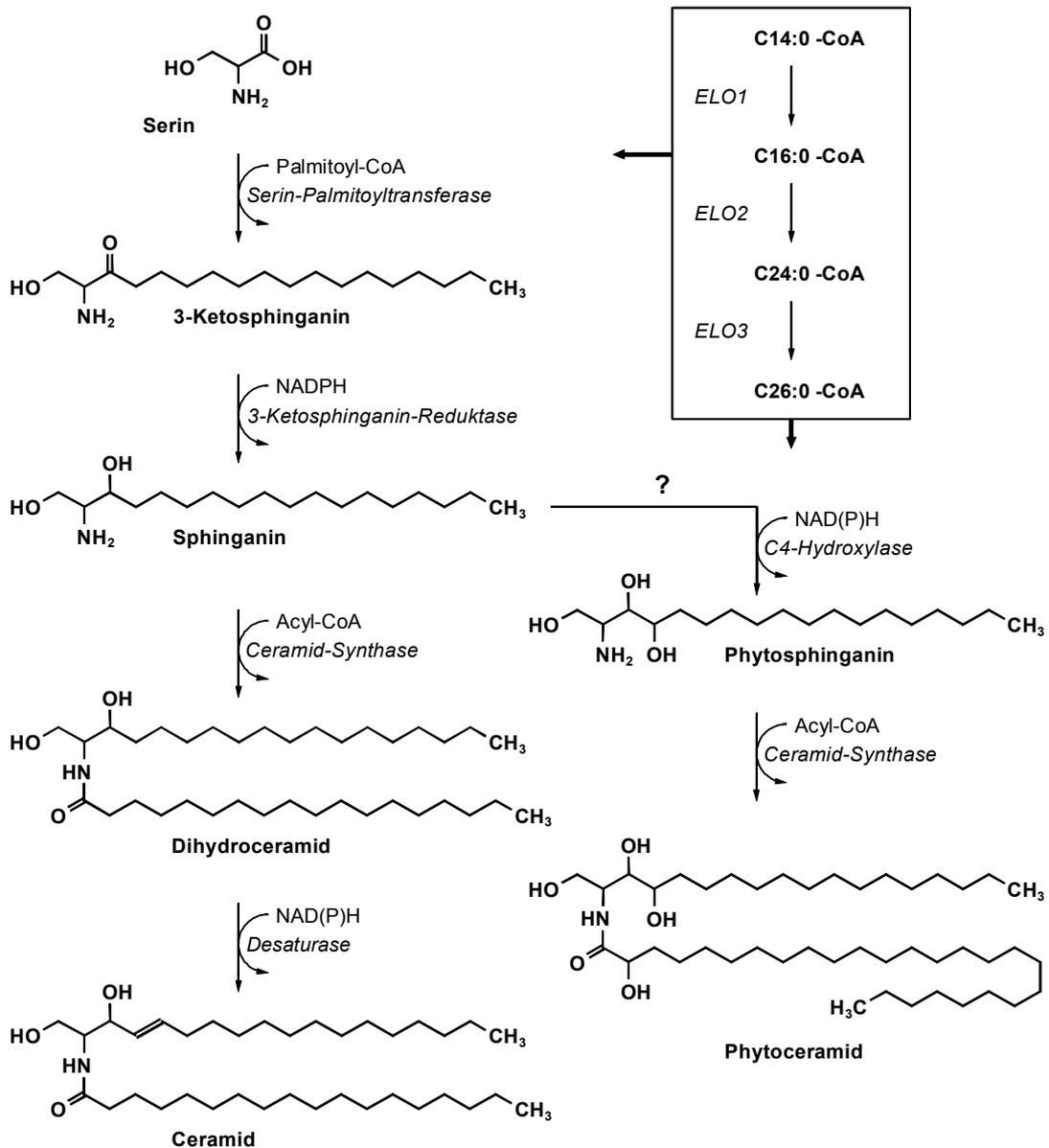


Abb. 1.12: Die Ceramidbiosynthese verläuft bei allen Eukaryoten nach dem gleichen Schema (siehe hierzu die Erläuterungen im Text). Es ist noch unbekannt, ob bei der Biosynthese von Phytoceramid in Pilzen die C4-Hydroxylierung des Sphingalins bei der freien Sphingobase oder erst auf der Stufe des Ceramids erfolgt (nach Holthuis *et al.*, 2001 [63])

Die Ceramidsynthese findet an der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Reticulums statt [63, 64]. Die Biosynthese von langkettigen Fettsäuren der Ceramide erfolgt ebenfalls im ER und wird durch Fettsäure-Synthase und durch Elongasen katalysiert. Zunächst kondensiert das Acyl-Substrat mit Malonyl-CoA zu β -Ketoacyl-CoA. In der anschließenden Reaktionsabfolge wird β -Ketoacyl-CoA zum β -Hydroxyacyl-CoA reduziert, zum Enoyl-CoA dehydratisiert und schließlich zum elongierten Acyl-CoA reduziert. In *S. cerevisiae* konnten drei Elongase-Gene identifiziert werden. ELO1-kodierte Proteine katalysieren die Elongation von mittelkettigen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren [65]. ELO2- und ELO3-Enzyme sind für die Elongation zu gesättigten sehr langkettigen (24 - 26 C-Atome) Fettsäuren verantwortlich [66]. Die membrangebundenen Elongationssysteme der Fettsäuren, deren Kohlenstoffkette aus 20 und mehr C-Atomen besteht, befinden sich ebenfalls im ER [66].

Es ist noch nicht geklärt, in welcher genauen Reihenfolge diverse funktionelle Gruppen (Methyl- und Hydroxylgruppen, Doppelbindungen) in das Ceramidgrundgerüst eingebaut werden. So ist es beispielsweise noch nicht bekannt, ob die C-4-Hydroxylierung von Sphingonin, die in Hefen und Pilzen stattfindet, bereits an der freien Sphingobase oder erst am Ceramid erfolgt. Ebenfalls ist es noch unklar, ob die polare Kopfgruppe des Glucosylceramids immer erst nach der vollständigen Derivatisierung des Ceramidgrundgerüsts fertiggestellt wird, oder – möglicherweise bei Pflanzen – schon davor. In Tieren wurde die Glucosylceramid-Synthase jedenfalls in den Golgi-Membranen lokalisiert [67]. Das unterstützt die Hypothese, daß die vollständig derivatisierten Ceramide aus dem ER in den Golgi-Apparat transportiert werden, wo die Biosynthese komplexerer Sphingolipide durch die Verknüpfung polarer Kopfgruppen erfolgt.

1.2.3.2. Die Glucosylceramid-Synthase. Viele Fragen sind noch offen

Die UDP-Glucose:Ceramidglucosyltransferase (Glucosylceramid-Synthase, GCS) überträgt aktivierte Glucose auf das Ceramid und katalysiert somit den letzten Schritt der Glucosylceramidbiosynthese. Mitte der 90-er Jahre klonierten Ichikawa *et al.* erstmals eine GCS aus *Homo sapiens* [68]. Etwas später konnten verschiedene Arbeitsgruppen feststellen, daß die GCS der

Säuger ein integrales Membranprotein darstellt, deren aktives Zentrum an der cytosolischen Seite von Golgi-Membran liegt [67, 69, 70]. Im Jahre 2000 klonierten und charakterisierten Leipelt *et al.* eine Reihe neuer Glucosylceramid-Synthasen aus Pflanzen und Pilzen [71]. Die Tatsache, daß dabei u.a. auch eine cDNA für die GCS aus Baumwolle isoliert werden konnte, machte erst die für diese Arbeit geplanten Untersuchungen möglich.

Die GCS aus Säugern akzeptiert UDP-Glucose und das natürlich vorkommende Ceramid N-Acyl-D-*erythro*-sphingarin. Sein L-*erythro*-Enantiomer und das L-*threo*-Diastereomer werden nicht angenommen [72]. Über die Substratspezifität der Glucosylceramid-Synthase aus Pflanzen und Pilzen ist bis heute noch wenig bekannt. Dies hängt unter anderem mit der Tatsache zusammen, daß es für dieses Enzym noch bis vor kurzem keine verlässlichen *in-vitro*-Enzymtests gab. Die vor wenigen Jahren durchgeführten Versuche mit etiolierten Hypocotylen der Bohne führten zu einer überraschenden Hypothese. Lynch *et al.* nahmen an, daß bei der Glucosylierung der freien Ceramide Sterolglucosid – und nicht UDP-Glucose – als Glucosyldonor in Frage käme [73]. Andere Untersuchungen konnten diese Hypothese jedoch nicht unterstützen. Hillig *et al.* exprimierten die GCS aus Baumwolle in einer Sterolglucosid/Glucosylceramid-defizienten Doppelmutante von *P. pastoris*. Da die rekombinante Hefe nach der Komplementierung wieder die Fähigkeit zur Glucosylceramid-Synthese erlangte, kann davon ausgegangen werden, daß die Ceramid-Glucosylierung Sterolglucosid-unabhängig verläuft [74]. In den ebenfalls durchgeführten *in-vitro*-Enzymtests akzeptierten die Glucosylceramid-Synthasen aus *G. arboreum*, *H. sapiens* und *P. pastoris* die radioaktiv markierte UDP-Glucose [74].

Wie bereits erwähnt, ist die GCS der Säuger ein integrales Membranprotein mit dem aktiven Zentrum sowie dem C-Terminus an der cytosolischen Seite der Golgi-Membran. Sie enthält eine putative N-terminale Transmembrandomäne und ein aus mehreren hydrophoben Aminosäuren bestehendes C-terminales Segment [49, 67]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde eine computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz der GCS aus *G. arboreum* durchgeführt[★]. Bei der Analyse auf putative

★ Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe von öffentlich zugänglichen Internet-Datenbanken durchgeführt (siehe hierzu die Fußnote im Abschnitt 1.1.4.)

Transmembrandomänen mit HMMTOP- und TMHMM-Programmen wurden bei diesem Enzym in beiden Fällen jeweils vier putative Transmembranhelices gefunden. Die Daten dieser Analysen sind wie folgt:

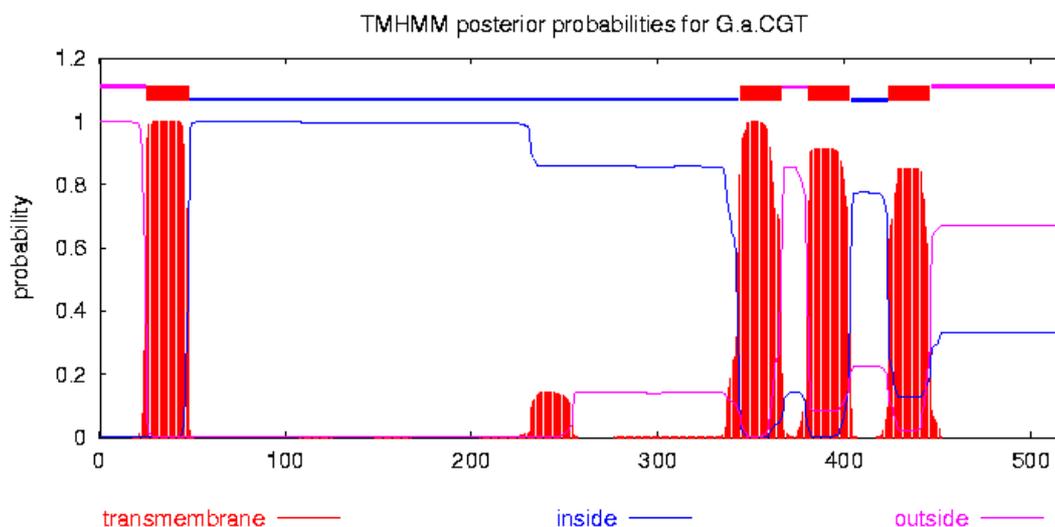


Abb. 1.15: Graphische Darstellung der mit dem TMHMM-Programm ermittelten putativen Transmembranhelices von GCS aus *G. arboreum* (Graphik von der TMHMM-Internet-Seite <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)

Tabelle 1.2: Daten der Sequenzanalyse von GCS aus *G. arboreum*, durchgeführt mittels HMMTOP- und TMHMM-Programmen

	Ergebnisse von	
	TMHMM	HMMTOP
putative Transmembranhelices (Aminosäuren von - bis)	26 - 48	31 - 48
	344 - 366	344 - 363
	381 - 403	376 - 400
	424 - 446	427 - 446

Beide Programme sagten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit voraus, daß die GCS von *G. arboreum* eine putative N-terminale Transmembrandomäne und drei putativen Transmembranhelices am C-Terminus besitzt. Diese Vorhersage ist gut vereinbar mit der Situation, die hinsichtlich der Transmembranregionen der GCS von Säugertieren vorliegt (siehe oben).

PSORT-, SignalP- und TargetP-Programme deuteten GCS als sekretorisches Protein ((die Wahrscheinlichkeiten in %) PSORT: PM-Lokalisierung – 60%, Golgi – 40%; SignalP: Signal-Anker – 75%; TargetP: sekretorischer Transportweg – 68%).

Bei genauer Durchsicht der GCS-Sequenz wurde außerdem an ihrem C-Terminus ein putatives ER-Rückhaltesignal entdeckt. In einer erst 2004 veröffentlichten Publikation beschreiben McCartney *et al.* die Entdeckung einer neuartigen ER-Rückhaltesequenz mit der allgemeinen Formel **Φ-X-X-K/R/D/E-Φ-(COOH)**. **Φ** ist in dieser Formel eine große hydrophobe Aminosäure, **X** – irgendeine Aminosäure, **K** – Lysin, **R** – Arginin, **D** – Asparaginsäure, **E** – Glutaminsäure und **COOH** – die letzte C-terminale Carboxylgruppe des Polypeptids [75]. Die letzten fünf Aminosäuren der GCS – **K-K-Y-E-V-(COOH)** – entsprechen dieser Formel. Dieses neuartige ER-Rückhaltesignal wurde in vielen bekannten ER-Membranproteinen wie z.B. Fettsäuredesaturase FAD2 und Cytochrom P450 entdeckt [75].

1.3. Funktionen und intrazelluläre Verteilung von Sterolen und Sphingolipiden

1.3.1. Sphingolipide und Sterole erfüllen vielfältige Funktionen in Biomembranen

Glycerophospholipide, Glyceroglycolipide, Phospholipide, Sphingolipide und Sterole zählen zusammen mit Membranproteinen zu den wichtigsten Bestandteilen der biologischen Membranen. Es gilt als sicher, daß Membranlipide nicht nur strukturelle Membranbausteine darstellen, sondern bei zahlreichen biologischen Vorgängen mitwirken oder sie gar bestimmen.

1.3.1.1. „Bulk functions“ und „sparking functions“ der Sterole

Die kondensierte Ring-Struktur der Sterole ist weit weniger flexibel als die langen Kohlenwasserstoffketten der Fettsäurereste anderer Membranlipide. Deshalb verleihen die Sterole den Biomembranen insgesamt eine höhere Starrheit [76]. Cholesterol in den Tierzellen, Ergosterol in Pilzen, β -Sitosterol und – mit Einschränkungen – Stigmasterol in Pflanzen erfüllen den Bedarf von Zellmembranen an Sterolen, der als „*bulk requirement*“ bezeichnet wird. Hierzu müssen die Sterole folgende Eigenschaften erfüllen:

- die α -Seite des Moleküls muß vollständig demethyliert sein;
- am C-3 muß eine polare OH-Gruppe und
- am C-17 eine aliphatische Isooktylseitenkette vorhanden sein [16, 77].

Sterole, die die oben genannten Anforderungen eines „*bulk requirements*“ erfüllen, beeinflussen den physikalischen Zustand eines Lipid-Bilayers und zeigen ein sogenanntes „*cholesterol like behaviour*“ (CLB). Nach den Untersuchungen zur Cholesterol-Wirkung in künstlichen Membranen läßt sich für CLB folgendes zusammenfassen:

- Cholesterol besitzt einen kondensierenden Effekt auf Phosphatidylcholin-Monolayer [77]. Ein Gemisch aus Cholesterol und

- Phosphatidylcholin beansprucht einen geringeren Platz als der theoretisch berechnete additive Platzbedarf;
- Cholesterol kann Membranen verdicken (wenn entsprechend kurze Fettsäuren (C14/C16) am Aufbau vom Bilayer beteiligt sind), indem es die Acylketten der Phospholipide in eine gestreckte Konformation zwingt [16]. In flüssig-kristallinen Bilayern hat dies einen ordnenden Effekt [77]. Sterolmoleküle füllen hier die Freiräume zwischen den Fettsäuren aus. Im kristallinen Zustand eines Bilayers bewirkt die Integration von Cholesterol einen entgegengesetzten Effekt. Hier haben die Fettsäuren bereits einen sehr hohen Ordnungsgrad, der von Sterolen erniedrigt wird;
 - Cholesterol reduziert in bestimmten Liposomen-Membranen die Permeabilität für Glucose [77]. Durch die Füllung der Zwischenräume eines Bilayers wird die Membran verdichtet und ihre Durchlässigkeit verringert.

Mit ihren „*bulk functions*“ regulieren die Sterole demnach die Fluidität und die passive Permeabilität von biologischen Membranen.

Außer diesen „*bulk functions*“, wofür Sterole in größeren Mengen benötigt werden, haben geringe Mengen eines bestimmten Sterols auch sogenannte „*sparking functions*“. Die letzteren Funktionen beruhen auf sehr spezifischen Sterolwirkungen auf Enzyme, Rezeptoren oder bei der Genregulation [78]. Eine Reihe von Sterol-auxotrophen Organismen benötigen bestimmte, exogen zugeführte Sterole zum Wachstum. Zum Beispiel wird das Wachstum von verschiedenen *Mycoplasma*-Kulturen neben sonst gleichgroßen Mengen an Lanosterol durch kleine Mengen Cholesterol positiv beeinflusst. Eine ähnliche Beobachtung wurde mit dem Sterol-auxotrophen *Saccharomyces*-Stamm GL7 gemacht [22].

Die „*bulk functions*“ können daher durch eine ganze Reihe von Sterolen ausgeübt werden, die die CLB-Kriterien erfüllen. Die „*sparking functions*“ hingegen können in einem bestimmten Organismus nur von spezifischen Sterolen erfüllt werden.

1.3.1.2. Sphingolipide sind wichtige strukturelle und funktionelle Einheiten von Biomembranen

Als strukturelle Einheiten von Biomembranen haben Sphingolipide die Fähigkeit sich sowohl untereinander als auch mit anderen Membranlipiden und -Proteinen zu assoziieren. So können sie mit ihren Hydroxylgruppenreichen polaren Kopfgruppen hochflexible Netzwerke bilden, die über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden [79]. In Membranen, die bestimmten physikalischen oder chemischen Streßfaktoren ausgesetzt werden, führt die Erhöhung der Anzahl von Hydroxylgruppen im Allgemeinen zur Erhöhung der Stabilität und zur Verminderung der Permeabilität der betroffenen Membranen [80] (siehe das nächste Kapitel).

Die lipophilen Fettsäurereste der Sphingolipide können in der Membran dichter gepackt werden als die flexiblen, ungesättigten „Molekülschwänze“ von Phosphoglycerolipiden, beispielsweise von Phosphatidylcholin. Dadurch können die insgesamt „dünnen“ und „längeren“ Sphingolipide bis zu 30% dickere Membranen als die ungesättigten Phospholipide erzeugen [63]. Durch die größeren und glatteren Kontaktflächen erhöhen sich die Van-der-Waals-Kräfte zwischen Sphingolipiden und anderen benachbarten Membrankomponenten.

Die Bindung von glycosylierten, Inositolphosphat-haltigen Sphingolipiden oder Diacylglycerolen an bestimmte Membranproteine führt zur Bildung von sogenannten GPI-Anker [81, 82]. In diesen ist Ceramid bzw. Diacylglycerol mit Inositolphosphat verestert [83]. Das Inositolphosphat trägt eine aus mehreren Monosacchariden bestehende Glucankette (Glycosylphosphatidylinositol = GPI), die durch das Ethanolaminphosphat kovalent an den C-Terminus eines Proteins gebunden ist. Durch derartige GPI-Anker können Membranproteine an der Membranoberfläche verankert werden. Ihre Struktur ist mit wenigen Variationen bei allen Eukaryoten konserviert: **Protein-CO-NH-(CH₂)₂-PO₄-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6myo-Inositol-PO₄-Ceramid/Diacylglycerol**, wobei die GPI-Anker der Tiere nur Diacylglycerol und kein Ceramid enthalten [49]. Es gibt Hinweise, daß GPI-Anker neben ihrer Funktion als stabile Anker auch eine wichtige Rolle in der Übertragung von Signalen und in der Sortierung von Proteinen spielen [84].

1.3.1.3. Die Zusammensetzung pflanzlicher Membranlipide ändert sich bei Streß

Wie bereits erwähnt wurde, hängen die physikalischen Eigenschaften der Biomembranen, wie Bilayer-Stabilität und passive Membranpermeabilität, in starkem Maße von der Beschaffenheit der membranbildenden Lipide ab. In diesem Zusammenhang wird bei Pflanzen eine Beteiligung von Glucosylceramiden und Sterolglucosiden an regulatorischen Prozessen bei umweltbedingtem Streß diskutiert.

Bei Temperaturen unter 0°C besteht die Gefahr der intrazellulären Eisbildung, die für die Zelle letal wäre. Solange aber die Plasmamembran (PM) intakt bleibt, können sich innerhalb der Zelle keine Eiskristalle bilden [49]. Die extrazelluläre Eisbildung bewirkt ein negatives Wasserpotential, wodurch eine Wasserpotentialdifferenz zwischen dem extrazellulären Raum und dem Inneren der Zelle entsteht. Um diese Potentialdifferenz auszugleichen tritt das Wasser aus dem Inneren der Zelle aus. Der Froststreß besteht also hauptsächlich in der Zelldehydratisierung, wobei die Vitalität einer Zelle eng mit der Fähigkeit der Plasmamembran verbunden ist, einer Schrumpfung während der Dehydratisierung und einer erneuten Ausdehnung während des Tauens standzuhalten. Als die am wenigsten hydratisierten Lipide in der pflanzlichen PM erhöhen Glucosylceramide die Neigung der Membranlipide zur Ausbildung solcher Strukturen und Phasen, die den Membranbilayer zerstören. Eine Verminderung des Anteils an GlcCer in der Plasmamembran würde deshalb die Bilayer-Stabilität und somit die Frosttoleranz fördern. In der Tat wurden bei mehreren Untersuchungen während des Prozesses der Kälteakklimatisierung sinkende Anteile des Glucosylceramids in der Plasmamembran festgestellt. Der GlcCer-Anteil in der PM von frosttoleranten Pflanzen war geringer im Vergleich zu dem von frostsensitiven Pflanzen [85-87].

Auch Sterolderivate beteiligen sich an der streßinduzierten Änderung der Zusammensetzung von Membranlipiden. So zeigten Lynch und Steponkus, daß der Anteil von Sterolglucosid in frostakklimatisierten Roggenkeimlingen geringer als in nichtakklimatisierten Keimlingen ist [87]. Die Ergebnisse aus mehreren Studien belegen zudem, daß bei der Akklimatisierung verschiedener Pflanzenarten an Frost der Anteil freier Sterole in der Plasmamembran zunimmt und der von glucosylierten Sterolen (SG & ASG) abnimmt [85, 87]. Bei der Anpassung an Trockenheit steigt der Anteil von

freien Sterolen in der Plasmamembran ebenfalls, der Anteil der Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin sinkt [88]. Bei einigen Arten konnte allerdings keine positive Korrelation zwischen dem Anteil freier Sterole und der Kälteakklimatisierung nachgewiesen werden [89, 90]. Dies könnte damit zusammenhängen, daß sich nicht alle Arten gleichermaßen gut an die Umweltstreßfaktoren wie Frost anpassen können.

Bei dieser kurzen Darstellung der wichtigsten Funktionen von Sterolen und Sphingolipiden in Biomembranen darf nicht vergessen werden, daß Biomembranen neben Sterolen und Sphingolipiden noch viele andere unterschiedliche Lipide enthalten. Daher ist die Funktion eines bestimmten Membranlipids immer im Zusammenhang mit seiner Umgebung zu betrachten. Die Wechselwirkungen der Membranlipide untereinander und ihre Wechselwirkungen mit den Membranproteinen ergeben in einem sehr komplexen Zusammenspiel das, was als Membranfunktionalität verstanden wird. Die separate Betrachtung eines einzelnen Lipids bezüglich seiner Funktion in einer Biomembran wird dieser komplexen Situation nicht gerecht.

1.3.2. Sterole sind Vorläufer für Hormone und andere Sekundärstoffe

Neben der Beteiligung von Sterolen an dem Aufbau und der Funktionalität von Biomembranen dienen diese Verbindungen als Vorläufer für viele tierische und pflanzliche Hormone.

In Tieren entstehen aus Cholesterol verschiedene Hormone sowie die für Verdauung wichtigen Gallensäuren.

In Pflanzen werden aus Sterol-Vorstufen Brassinosteroide synthetisiert, die als Pflanzenhormone essentielle Funktionen beim Pflanzenwachstum und bei der Pflanzenentwicklung übernehmen. Über 40 verschiedene Brassinosteroide sind bekannt [91], der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Brassinolid (Abb. 1.13.).

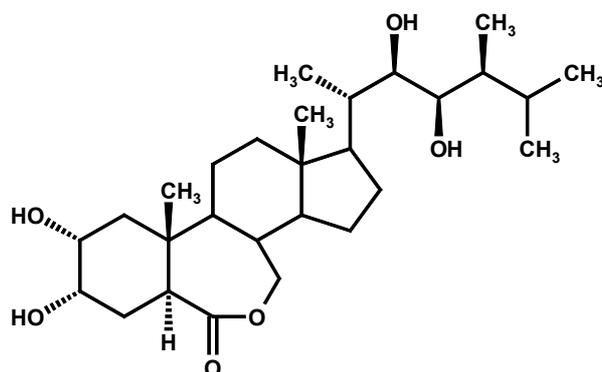


Abb. 1.13: Brassinolid ist einer der wichtigsten Vertreter der pflanzlichen Brassinosteroid-Hormone

Brassinosteroide nehmen Einfluß auf die Elongation und die Proliferation von Zellen [92]. Ihre Funktion wurde u.a. bei *Arabidopsis*-Mutanten mit defekter Steroidbiosynthese erforscht. Diese Mutanten wiesen Zwergwachstum auf, das bei Behandlung mit exogenen Brassinosteroiden teilweise oder in manchen Fällen vollständig aufgehoben werden konnte [32, 93].

Außerdem dienen Sterole im Pflanzenreich als Vorläufer für die Synthese vieler anderen Sekundärstoffe. Diese pflanzlichen Triterpene, zu den beispielsweise Steroidalkaloide, herzwirksame Glycoside, Saponine und viele Bestandteile von Harzen gehören, sind nicht ubiquitär und überwiegend nicht essentiell. Ihr Vorkommen ist jeweils auf bestimmte Arten von Pflanzen beschränkt. Lösliche Vertreter der Triterpene werden vielfach in der Zellvakuole akkumuliert, für die Speicherung lipophiler Sekundärstoffe sind spezielle Exkretträume charakteristisch.

Obwohl diese Naturstoffe von der Pflanze gespeichert werden, tragen sie nur in sehr untergeordnetem Ausmaße zur Energiebereitstellung im Organismus bei. Allerdings können manche Sekundärstoffe in bestimmten Wachstumsphasen mobilisiert werden. So kann z.B. ein Abbau von Alkaloiden und Saponinen in Samen bei der Keimung erfolgen [94]. Für die meisten Organismen ist der Nutzen von Sekundärstoffen jedoch nicht ohne weiteres erkennbar. Diskutiert werden mögliche Aufgaben als Fraß- und Infektionsschutz sowie ihre Rolle bei der Entgiftung im pflanzlichen Stoffwechsel [94].

1.3.3. Sterole und Sphingolipide übernehmen wichtige regulatorische Funktionen

Neben den bereits beschriebenen Aufgaben von Sterolen und Sphingolipiden müssen auch ihre regulatorische Funktionen bei Eukaryoten erwähnt werden. Aufgrund der stärkeren Finanzierung biomedizinischer Forschung sind diese Funktionen bei Tieren zur Zeit weit besser untersucht. So konnte vor kurzem gezeigt werden, daß die kovalente Bindung des Cholesterols an das Hedgehog-Protein die embryonale Entwicklung von Vertebraten beeinflußt [95]. Interaktionen des Cholesterols mit Caveolin induzieren die Bildung von Membran-Microdomänen (*Caveolae*), die als Signalübertragungszenter für viele Signalwege in Frage kommen [96]. Dem Ceramid wird seit längerer Zeit eine Funktion als *second messenger* bei Tieren zugeschrieben [97]. Es ist dabei u.a. in die wichtigen Prozesse von Zellwachstum und Apoptose involviert. Ferner konnte in *in-vitro*-Versuchen gezeigt werden, daß das humanpathogene Bakterium *Helicobacter pylori* an Gluco- und Galactosylceramide bindet [98].

Bei Pflanzen sind die Kenntnisse über die regulatorische Funktionen von Sterolen und Sphingolipiden nach wie vor rudimentär, so daß weitere Arbeiten notwendig sind, zumal daran vielfältiges Interesse besteht.

Es gibt Hinweise dafür, daß Sphingolipide phytopathogener Pilze als Elicitoren wirken. Elicitoren sind im weitesten Sinne Substanzen, die in Pflanzen eine Abwehrreaktion auslösen. So können bestimmte Elicitoren die Bildung pflanzlicher antimikrobieller Substanzen – Phytoalexine – hervorrufen. Die Elicitor-Wirkung der Cerebroside des phytopathogenen Pilzes *Magnaporthe grisea* wurde in Reis-Pflanzen beschrieben [99]. Koga *et al.* berichteten, daß das Glucosylceramid eine Phytoalexin-Akkumulation in Reis bewirkt [100]. Die Methylgruppe am C-9 sowie die *trans*- Δ^4 -Doppelbindung der Sphingobase sind dabei für die Elicitor-Aktivität essentiell [49]. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß Cerebroside aus *Pachybasium* die fungizide Wirkung von Aculeacin gegen *Candida albicans* verstärken [101].

Auch Sterole wurden kürzlich als mögliche Partner bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen diskutiert. Sie stehen im Verdacht mit Elicitoren der *Phytophthora* ssp. zu interagieren, was eine Abwehrreaktion bei Tabak auslöst [102]. Ergosterol, das typische Sterol der Pilze, induziert zudem bei

Tabak die Synthese von reaktiven Sauerstoff-Verbindungen nach einem noch nicht befriedigend geklärten Mechanismus [103].

1.3.4. Sitosterolglucosid könnte als Vorstufe bei der Cellulosebiosynthese dienen

Über die Funktion des Sterolglucosids in Pflanzen ist bis jetzt noch sehr wenig bekannt. Neue Untersuchungen zeigen jedoch, daß diese Verbindung eine sehr wichtige Funktion bei der pflanzlichen Cellulosebiosynthese haben könnte. Es wurde herausgefunden, daß Sitosterol- β -Glucosid bei der Polymerisation einer neuen Glucankette als Glucosedonor dienen kann [104].

Die strukturelle Grundlage der pflanzlichen Zellwand – Cellulose – ist ein lineares Polymer aus bis zu 15 000 Glucoseeinheiten, die über β -1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind [55]. Jede kristalline Cellulose-Microfaser besteht aus 36 Glucanketten [105]. Die Cellulosesynthese kann in drei Stufen gegliedert werden: die Initiierung der Zucker-Kette, die Elongation und die Termination. Der rosettenförmige Enzymkomplex Cellulosesynthase ist in der Plasmamembran lokalisiert, seine Untereinheiten werden von den sogenannten *CesA*-Genen kodiert [106, 107]. Elbein *et al.* fanden eine Plasmamembran-assoziierte UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase in verschiedenen Pflanzen [108]. Peng *et al.* stellten transgene Hefe mit einem *GhCesA1*-Gen aus Baumwolle her. Die *in-vitro*-Untersuchungen zeigten, daß in einem Gemisch aus aufgebrochenen transgenen Hefe-Zellen, Sitosterolglucosid und UDP-Glucose Sitosterol-Cellodextrine synthetisiert wurden [104]. Nach weiteren metabolischen Studien wurde folgender Cellulosebiosyntheseweg postuliert. Die Synthese beginnt mit dem Glucose-Transfer von UDP-Glucose auf Sitosterol. Sitosterolglucosid initiiert dann als Primer die Verlängerung zu kurzen Glucanketten. Als Ergebnis dieser von *CesA*-Proteinen katalysierten Reaktion entstehen Sitosterol-Oligodextrine. Peng *et al.* vermuten weiterhin, daß die Korrigan-Cellulase, ein Enzym, das an der Außenseite der Plasmamembran sitzt, die Cellodextrine von dem Sitosterolglucosid-Primer abspaltet und auf die Cellulose-Synthase-Komplexe überträgt, wo dann die eigentliche Verlängerung stattfindet [104]. Auf diese Weise entstehen

schließlich die Cellulose-Glucan-Ketten, die sich in Pflanzen zu Microfibrillen zusammenlagern.

Dieses neue Modell der Cellulosesynthese in Pflanzen läßt noch viele Fragen offen. Unklar ist beispielsweise, wie das Sitosterolglucosid von seinem Synthesort an der Innenseite der Plasmamembran durch die Lipid-Bilayer-Barriere an die Außenseite zur Korrigan-Cellulase gelangen könnte. An dieser Stelle wird jedenfalls deutlich, wie wichtig die genaue Kenntnis der intrazellulären Lokalisation der Sterolglucosidtransferase in Pflanzen ist.

1.3.5. Sterole und Ceramide wurden in diversen Membranen der Pflanzenzelle gefunden

Die Verteilung von Sterolen und Ceramiden sowie ihrer glycosylierten Derivate in pflanzlichen Biomembranen ist bereits in den 70-er und 80-er Jahren des letzten Jahrhunderts in vielen Studien untersucht worden. Fast alle diese Studien sowie die älteren Untersuchungen zur Lokalisierung der entsprechenden glycosylierenden Enzyme bedienen sich der Technik der mikrosomalen Fraktionierung. Diese Technik basiert im wesentlichen auf einer Zentrifugation im Sucrose-Gradienten oder auf einer PEG/Dextran-Phasenverteilung [3] und erlaubt eine mehr oder weniger gute Trennung der subzellulären Membranfraktionen.

1.3.5.1. Intrazelluläre Verteilung von Sterolen, Ceramiden und ihren glycosylierten Derivaten

Sterole, Ceramide und ihre glycosylierten Derivate sind in fast allen Membranen einer Pflanzenzelle gefunden worden. So wurden sie in der Plasmamembran (PM), in der Tonoplastenmembran (TP) sowie in Membransystemen des Endoplasmatischen Reticulum (ER) und des Golgi-Apparates detektiert [3, 49]. Jedoch ist die subzelluläre Verteilung dieser Lipide zwischen den unterschiedlichen Membranen auffallend ungleich.

Die höchsten Konzentrationen von freien Sterolen (FS) wurden in den Fraktionen von Plasma- und Tonoplastenmembran beobachtet. So wurden

die FS mit zum Teil mehr als 30 mol% der Gesamtlipide in der Plasmamembran von *Arabidopsis*- [58], Weizen- [86] und Gerste-Blättern [109] sowie in der PM von Haferwurzeln [110], Gerste [111] und Weizen [86] detektiert. Mit sogar mehr als 40 mol% der Gesamtlipide wurden die FS in der Plasmamembran aus Wurzeln von Mais [112] und aus Blättern von kälteakklimatisierten Weizen [86] und Roggen [85, 87] gefunden. In der Tonoplastenmembran wurden die FS in etwas niedrigeren Konzentrationen (~20 mol%) bei *Vigna radiata* [113], *Kalanchoe diagraphemontiana* und *Mesembryanthemum crystallinum* [114] beobachtet. Geringere Sterolmengen wurden bei verschiedenen Pflanzen in den Membranen von Golgi und ER detektiert [111, 115, 116].

In fast allen Studien, in denen freie Sterole in aufgereinigten Membranfraktionen gefunden wurden, konnten in denselben Membranfraktionen auch glycosylierte Sterolderivate – hauptsächlich Sterolglucosid (SG) und acyliertes Sterolglucosid (ASG) – in signifikanten Mengen detektiert werden [3, 36]. In diesen Membranfraktionen waren die Anteile von SG und ASG zumeist um den Faktor 3 bis 8 geringer als die der freien Sterole [49]. Bei kälte- und frostakklimatisierten Pflanzen ist dieses Verhältnis noch zugunsten der nicht-glycosylierten Lipide verschoben, was sich auch bei Ceramiden beobachten läßt (1.4.1.3.).

In sehr geringen Mengen wurden die Sterole auch in den Membranen von Mitochondrien und von manchen Plastiden detektiert [3], wobei es sich zumindest bei Plastiden um eine Kontamination mit anderen Membranen handeln könnte.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Betrachtung der subzellulären Verteilung von Glucosylceramiden (GlcCer). Die höchsten Mengen von GlcCer wurden in gereinigten Fraktionen von Plasma- und Tonoplastenmembranen gefunden (6 - 27 mol% des Gesamtlipids); niedrigere Mengen in den Membranen von Golgi und ER [49, 111]. So wurde GlcCer mit über 20 mol% der Gesamtlipide in der Plasmamembran von Gerste- [109] und Hafer-Blättern [85] gefunden. In den Protoplasten aus Gerste und Hafer wurde GlcCer in hohen Konzentrationen in TP-Membranen entdeckt (entsprechend 23 und 21 mol% der Gesamtlipide) [114, 117]. In der Plasmamembran ist GlcCer hauptsächlich in der äußeren Schicht des Bilayer präsent, wo die GlcCer-Moleküle nach der Hypothese von Lynch *et al.* mit ihren polaren Köpfen herausragen [118].

1.3.5.2. Altes und Neues zur Lokalisation von SGT und GCS

Die Aktivität der pflanzlichen Sterol-Glucosyltransferase wurde bereits in einer Reihe subzellulärer Fraktionen detektiert. Ältere Studien berichten über SGT-Aktivität in Golgi-angereicherten Membranfraktionen, die aus Zwiebeln, aus ausgekeimten Calendula-Samen und aus Hypocotylen der Mungbohne (*Vigna radiata*) isoliert wurden [119, 120]. Die in etiolierten Mais-Koleoptilen detektierte SGT-Aktivität befand sich in angereicherten Fraktionen der Plasmamembran [40, 121]. Der gleiche Lokalisationsort (PM) wurde auch für Mais-Wurzeln [122], Keimblätter der Mungbohne [123] sowie für einige andere Gewebe von Gefäßpflanzen [3] vorgeschlagen. Andererseits wurde die SGT-Aktivität von Mais-Koleoptilen [36, 121] und Gurken [124] im ER vermutet. In einer anderen Untersuchung wurde diese Enzymaktivität auch im Tonoplasten [117] gemessen. Diese zum Teil sehr widersprüchliche Daten könnten durch ungenügende Reinheit oder möglicherweise durch falsche Identifizierung der subzellulären Membranfraktionen erklärt werden. Die andere Möglichkeit wäre, daß die SGT sich tatsächlich in allen diesen Membranen, wenn auch in unterschiedlicher Aktivität, befinden könnte.

Über den intrazellulären Lokalisationsort der pflanzlichen Glucosylceramid-Synthase gibt es bis heute nur wenige Hinweise. Wie bereits erwähnt wurde, vermuteten Lynch und Mitarbeiter, daß das Sterolglucosid auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran synthetisiert wird [73, 125]. Entsprechend diesem Modell sollte sich die GCS auf der apoplasmatischen Seite der PM befinden, um die Glucose von dem SG-Donor auf das Ceramid zu übertragen [126]. Neue Untersuchungen konnten diese Hypothese jedoch nicht unterstützen (siehe hierzu Abschnitt 1.2.3.2.). Es wurde festgestellt, daß die Ceramid-Glucosylierung SG-unabhängig verläuft [74].

Die Glucosylceramid-Synthase der Säuger konnte an der cytosolischen Seite der Golgi-Membran lokalisiert werden. [67, 69, 70]. Die GCS aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde hingegen nicht nur in Golgi-Membranen, sondern auch im perinucleären ER detektiert [127].

In letzter Zeit wurden mehrere Proteom-weite Studien zur subzellulären Protein-Lokalisierung durchgeführt [128-132]. Diese neuen Studien benutzen kaum noch die Technik der subzellulären Fraktionierung, sondern

bedienen sich moderner Analysemethoden wie Protein-Massenspektrometrie oder Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie.

In einer Studie von Carter *et al.* wurde eine Vielzahl von Tonoplasten-Proteinen chromatographisch aufgetrennt und insgesamt 420 Proteine mit Massenspektrometrie identifiziert [131]. Bei dieser Studie wurde Ugt80B1, eine putative Isoform der Sterol-Glucosyltransferase von *Arabidopsis thaliana*, als Protein der Tonoplastenmembran detektiert.

In einer anderen Studie, die ebenfalls mit massenspektrometrischer Technik durchgeführt wurde, konnten 238 putative Plasmamembran-Proteine identifiziert werden [132]. Die in der vorliegenden Arbeit interessierenden SGT und GCS befanden sich jedoch nicht in dieser Gruppe.

Außerdem wurden neuerdings mehrere Studien zur subzellulären Lokalisierung des Proteoms von *Saccharomyces cerevisiae* unternommen [129, 130]. In einer dieser Studien wurde die Sterol-Glucosyltransferase (Ugt51p) mit GFP-Technik im Cytosol detektiert [129].

1.4. Transportprozesse in einer eukaryotischen Zelle

Die biochemische Reaktionsmaschinerie einer eukaryotischen Zelle ist auf eine Vielzahl von Kompartimenten und membranumgrenzten Reaktionsräumen (Organellen) aufgeteilt. Diese Kompartimentierung ermöglicht einen ungestörten, parallelen Ablauf von zum Teil gegenläufigen Reaktionen. Oftmals sind aber der Synthese- und der Funktionsort eines Reaktionsprodukts nicht identisch. In einem solchen Fall muß das Reaktionsprodukt, beispielsweise eine Glucosyltransferase, nach der Biosynthese zunächst an seinen Funktionsort transportiert werden. Der intrazelluläre Transport von Enzymen, ihren Vorstufen, Membranlipiden, sekundären Metaboliten und zahlreichen anderen Verbindungen sowie das Ausscheiden dieser Stoffe aus der Zelle sind lebensnotwendige Vorgänge, die in jedem Organismus stattfinden. Eine ausführliche Beschreibung aller bekannten, am intrazellulären Transport beteiligten Mechanismen würde den Rahmen dieser Arbeit jedoch sprengen. Deswegen wird hier nur auf die „Signal“-Aspekte des intrazellulären Transports eingegangen.

1.4.1. Die zentrale Rolle des ER

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) spielt eine herausragende Rolle bei der Biosynthese und dem Transport von Proteinen. Die ER-Membran bildet ein engmaschiges Netz aus verzweigten Röhren und flachen Zisternen, das sich über das ganze Cytoplasma erstreckt (kortikales oder peripheres ER). Außerdem umgibt das ER den Zellkern (kernnahes oder perinucleäres ER) und geht in die äußere Kernmembran über. Viele Membranproteine und sekretorische Proteine werden an diesem mit Ribosomen besetzten ER-Bereich synthetisiert, der als rauhes ER bezeichnet wird. Alle anderen, im Kern codierten Proteine werden an den freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert. ER-Bereiche ohne gebundene Ribosomen werden als glattes ER bezeichnet. Dort findet überwiegend die Synthese von Lipiden statt. Proteine, die zu anderen Organellen gelangen müssen, werden in den meisten Fällen in die ER-Membran eingebettet. Die ER-Membran

umschließt einen einzigen Innenraum, der ER-Lumen genannt wird. Die löslichen, sekretorischen Proteine werden häufig bereits während der Synthese (cotranslational) aus dem Cytosol in das ER-Lumen aufgenommen. Proteine, die zunächst an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und cotranslational in das ER importiert werden, besitzen eine N-terminale Signalsequenz. Diese besteht aus einer hydrophoben Region, die an beiden Seiten von basischen Aminosäuren flankiert ist. Ein spezifischer Protein-Komplex, das Signalerkennungspartikel (*Signal Recognition Particle*, SRP) bindet an diese Signalsequenz, wodurch die Elongation der Polypeptidkette zunächst gestoppt wird [133]. Das an das SRP gebundene Ribosom mit dem unvollständigen Polypeptid wird zu einem SRP-Rezeptor an der cytosolischen Seite des ER transportiert, wo das SRP an das kanalbildende Protein des Peptidtranslokationskomplexes bindet. Das SRP dissoziiert vom Ribosom ab, und die Proteinsynthese wird fortgesetzt [134]. Der Translokationskomplex transportiert das wachsende Polypeptid durch eine ATP-abhängige Reaktion in das ER-Lumen. Dort wird bei den meisten Proteinen die Signalsequenz abgespalten. Sobald das Protein zu Ende synthetisiert worden ist, dissoziiert das Ribosom vom ER ab.

Für einige Proteine wurde auch ein posttranslationaler Import in das Endoplasmatische Reticulum nachgewiesen [135, 136]. Diese sogenannten *tail-anchored*-Proteine besitzen an ihrem C-Terminus eine hydrophobe Signalsequenz, die vom SRP erst nach der vollständigen Synthese der Polypeptidkette erkannt werden kann. Jedoch folgen die meisten Proteine dem cotranslationalen Weg.

Die Insertion eines Membranproteins in die ER-Membran erfolgt zumeist ebenfalls cotranslational. Bei Membranproteinen wird der Translokationsprozeß durch eine hydrophobe Signalsequenz – das Stop-Transfer-Peptid – unterbrochen. Die Polypeptidkette wird an einem oder mehreren hydrophoben Sequenzabschnitten, die als Transmembrandomänen (TMD) bezeichnet werden, in die Membran eingelagert. Transmembranproteine, die eine Membran mehrmals durchqueren, besitzen mehrere alternierende Transmembrandomänen (*multi-pass*-Proteine).

1.4.2. Der Sekretorische Transportweg

Proteine, die im ER verbleiben sollen, tragen an ihrem C-Terminus ein aus vier Aminosäuren bestehendes ER-Retentionssignal **KDEL** oder **HDEL**. Andere Proteine werden gewöhnlich über den Golgi-Apparat auf sekretorische Vesikel, Vakuolen oder Plasmamembran verteilt. Der Golgi-Apparat besteht aus einer Vielzahl flacher, zisternenartiger Vesikel, von denen jeweils 3 bis 10 einen sogenannten Golgi-Stapel bilden [137]. Jeder Golgi-Stapel ist von seiner Bildungsseite an das *cis*-Golgi-Netzwerk und von seiner Reifungsseite an das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) angeschlossen [138]. Das gesamte Golgi-Netzwerk stellt eine komplex aufgebaute Ansammlung von untereinander verbundenen Röhren und Zisternen dar.

Transportvesikel, die zum Golgi-Apparat weitergeleitet werden sollen, schnüren sich vom Übergangs-ER ab – einem ER-Bereich, der frei von Ribosomen ist – und verschmelzen mit dem *cis*-Golgi-Netzwerk. Solche Proteine, die ein ER-Rückhaltessignal besitzen, werden durch ein spezifisches Rezeptorprotein erkannt und in bestimmten Vesikeln ins ER zurückgeführt. Proteine, die das *trans*-Golgi-Netzwerk erreichen, werden wiederum in Vesikel eingelagert und zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten wie Vakuole oder Plasmamembran transportiert [139].

Die Transportvesikel, in denen Proteine ihre Wanderung von Organelle zu Organelle durchmachen, sind von unterschiedlichen Hüllproteinen umhüllt. Beispielsweise erfolgt der anterograde Transport vom ER zum Golgi-Apparat über COP-II-umhüllte Vesikel. Diese sind etwa 90 nm im Durchmesser und besitzen eine Proteinhülle aus mehreren Untereinheiten, den sogenannten Coatomeren. Die Bildung des Coatomer-Komplexes erfolgt unter Vermittlung des GTP-regulierten Proteins ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) und führt zur Abknospung des Vesikels [140]. Die anschließende Fusion des Transportvesikels mit der Golgi-Membran wird über zwei Faktoren – das *N-ethylmaleimid sensitive fusion protein* (NSF) und das *soluble NSF attachment protein* (SNAP) – vermittelt. SNAP bindet hierzu an seinen Rezeptor (SNARE) an der Golgi-Membran. Die nachfolgende Erhöhung der GTPase Aktivität und die Freisetzung des NSF führt zur Fusion des Transportvesikels mit der Golgi-Membran [141].

COP-I-umhüllte Vesikel sind unter anderem am Transport innerhalb des Golgi-Netzwerks sowie am retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER beteiligt [142].

Eine andere Art von Transportvesikeln sind die Clathrin-umhüllten Vesikel. Ihre Hülle besteht aus Clathrin und einer Vielzahl von anderen, Clathrin-assoziierten Proteinen [143]. Sie besitzen einen Durchmesser von 80-100 nm und sind unter anderem am Transport vom TGN zur Plasmamembran und an der Rezeptor-vermittelten Endocytose extrazellulärer Liganden beteiligt.

1.4.3. Der nicht-vesikuläre Lipidtransport

Membranlipide, die am glatten ER synthetisiert werden, werden überwiegend über den Sekretorischen Transportweg auf ihre Bestimmungsmembranen verteilt. Neben diesem, schon lange bekannten vesikulären Lipidtransport wird neuerdings ein direkter Transport von Lipiden diskutiert. Bei diesem nicht-vesikulären Transportweg, der in den Zellen von Säugern und Hefen untersucht wurde [144, 145], werden Lipide an ein spezifisches Protein gebunden, das sie zielgerichtet zu einer anderen Organelle transferiert. So charakterisierten Hanada *et al.* ein cytosolisches Protein CERT, das Ceramide an der cytosolischen Seite der ER-Membran bindet und sie spezifisch zum Golgi-Apparat transportiert. Nach neuesten Erkenntnissen enthält CERT 3 Domänen [146]. Die noch nicht-charakterisierte Domäne im mittleren Bereich dieses Proteines wird als ER-Erkennungsdomäne vermutet, die C-terminale START-Domäne dient der Erkennung und der Bindung von Ceramid, die *Pleckstrin-Homology*-Domäne am N-Terminus bindet an das Phosphatidylinositol-4-phosphat in der Golgi-Membran. Nach erfolgtem Transport in den Golgi-Apparat wird Ceramid vom CERT abgespalten und zur Synthese von Sphingomyelin verwendet [147]. Eines der Nebenprodukte dieser Synthese ist das Diacylglycerol. Es wurde festgestellt, daß CERT mit etwas geringerer Effizienz auch an das Diacylglycerol binden kann, das strukturelle Ähnlichkeit mit Ceramid aufweist [147]. Vermutlich wird Diacylglycerol vom CERT zum ER transportiert, wo dieses Lipid als Substrat bei der Synthese von Glycerophospholipiden dient.

Zum Abschluß soll darauf hingewiesen werden, daß im Gegensatz zum Protein-targeting der subzelluläre Lipidtransport in viel geringerem Maße untersucht ist, obwohl er zur Identität der verschiedenen Organellmembranen genau so viel beiträgt wie die entsprechenden Proteinprofile. Eine interessante Arbeit zu diesem Thema, die Lipidchemie in beispielhafter Weise mit der Molekularbiologie verknüpft, zeigt die verwirrende Vielfalt von Lipidtransportprozessen in Hefezellen auf [148].

1.5. Zielsetzung und Strategie

Im Gegensatz zur relativ klaren Situation hinsichtlich der subzellulären Verteilung der glucosylierten Sterole und Ceramide (siehe oben) gibt es zur Zeit noch keine umfassenden Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der entsprechenden Glucosyltransferasen. Alle bisherigen Lokalisierungsversuche wurden mit isolierten Membransystemen durchgeführt. Die pflanzliche SGT wurde aufgrund eines einfachen Enzymtests bereits in verschiedenen subzellulären Fraktionen wie Plasmamembran, Tonoplast, Golgi und Endoplasmatischem Retikulum nachgewiesen (siehe oben). Zur pflanzlichen GCS, deren Enzymaktivität nur schwierig zu messen ist, lag bis jetzt nur eine einzige Lokalisierungsstudie vor [126]. Angesichts dieser Situation und aufgrund des Interesses an der Lokalisierung der pflanzlichen Glucosyltransferasen sollte in der vorliegenden Arbeit durch Einsatz alternativer und voneinander unabhängiger Methoden geklärt werden, in welchen Membranen der Pflanzelle die Glucosylceramid-Synthase und die Sterol-Glucosyltransferase lokalisiert sind.

Die Lokalisierung von spezifischen Proteinen in intakten oder fixierten Zellen bzw. in zuvor aufgetrennten Zellorganellen kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen.

Zum einen könnte versucht werden, die interessierenden Glucosyltransferasen indirekt mit immunologischen Methoden zu detektieren. Um die hierzu notwendigen Antiseren herzustellen, müssten die genannten Enzyme zuerst in einem geeigneten System überexprimiert und bis zu einem hohen Reinheitsgrad aufgereinigt werden. Mit derart aufgereinigten Proteinen werden Kaninchen, Mäuse oder Hühner immunisiert. Die hergestellten Antiseren würden anschließend in einer immunochemischen Reaktion zum Nachweis der interessierenden Proteine in Gewebeschnitten bzw. in aufgetrennten Zellorganellen dienen und damit den Lokalisationsort dieser Proteine in der Zelle abbilden.

Zum anderen könnten die Glucosyltransferasen als Fusionsproteine mit einem Reporter-Protein als Fusionspartner in Pflanzen exprimiert werden. Ein solches Reporter-Protein müsste durch gängige analytische Verfahren leicht nachweisbar sein. Mit der Detektion des Aufenthaltsorts des Reporter-

Proteins in der Zelle würde auch die intrazelluläre Lokalisation der jeweiligen Glucosyltransferase bekannt werden. Bei dieser Strategie wird durch gentechnologische Manipulation die Reporter-Sequenz mit dem ORF des interessierenden Glucosyltransferase-Gens verknüpft. Die hier interessierenden Glucosyltransferasen könnten dann zum Beispiel als grün- oder gelb-fluoreszierende Fusionsproteine exprimiert werden, die anschließend mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Techniken direkt in der Zelle der transgenen Pflanze nachgewiesen werden könnten. Diese Strategie führt natürlich nur dann zu verlässlichen Ergebnissen, wenn die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine nicht von der der nativen Enzyme abweicht.

In der vorliegenden Arbeit sollten beide Strategien zur Anwendung kommen, wobei nur ein Ansatz schließlich zum Erfolg führte.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Neben der Standardausstattung eines molekularbiologischen Laboratoriums (Glasgeräte, Pipetten u.ä.) wurden folgende Geräte verwendet:

- Blotting-Apparatur Biorad
- Brutschrank Binder
- Brutschrank Heraeus Instruments
- Cleanbench „DLF/BSS4“ Clean Air
- Digitalkamera „Camedia 2500L“ Olympus
- Elektrischer Heizblock Eppendorf
- Elektroporator „5810“ Eppendorf
- Elektrophoresekammer:
 - „Horizon 11-14“ (Agarosegelelektrophorese) Gibco BRL
 - „Mini-Protean II“ (SDS-PAGE) Biorad
 - „Mighty Small II“ (SDS-PAGE) Pharmacia Biotech
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35 M Carl Zeiss
- Flüssigkeitsszintillationszähler „LC 6000 IC“ Beckman
- Inkubations-Rotor „CMV-E“ Fröbel Labortechnik
- Inkubations-Schüttler „Multitron“ Infors
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP2 Leica
- Magnetrührer „IKAMAG RH“ Jahnke & Kunkel
- Netzgeräte:
 - „Power Pac 300“ Biorad
 - „Phero-Stab 500“ Biotec-Fischer
- Partikelkanone
„Biolistik® Particle Delivery System PDS-1000/HE“ Biorad
- pH-Meter „761 Calimatic“ Knick
- Phosphorimager
„BAS 1000 Bio-Imaging Analyzer“ Fuji/Raytest
- Photometer:

-
- „GeneQuant II“ Pharmacia Biotech
 - „Spectronic 20“ Genesys Instruments
 - Rotationsverdampfer „Rotavapor RE 120“ Büchi
 - Systeme zur Dokumentierung von Agarosegelen:
 - Kamera Herolab
 - Digitalkamera „DC290 Zoom“ Kodak
 - Printer „Spectronic video copy processor“ Mitsubishi
 - Printer „Deskjet 950C“ HP
 - UV-Transilluminator „UVT-28M“ Herolab
 - Thermocycler:
 - „Primus“ MWG Biotech
 - „T Gradient Thermoblock“ Biometra
 - Ultraschallbad „Bransonic 220“ Bransonic
 - Ultraschallstab „Labsonic 2000“ Braun
 - Wasseraufbereitungsanlage „Milli-Q-Watersystem“ Millipore
 - Zentrifugen:
 - Kühlzentrifuge „5810 R“ Eppendorf
 - Kühlzentrifuge „RC-5B“ Sorvall
 - Kühlzentrifuge „Centrikon 324“ Kontron-Hermle
 - Tischzentrifuge „Biofuge 13“ Heraeus Instruments
 - Tischzentrifuge „Biofuge pico“ Heraeus Instruments
 - Tischzentrifuge „Microfuge E“ Beckman
 - Tischzentrifuge „Rotanta“ Hettich
 - Ultrazentrifuge „Centrikon T-1075“ Kontron Instruments

2.2. Chemikalien, Enzyme und anderes Verbrauchsmaterial

Soweit es in der Arbeit nicht besonders vermerkt wird, stammten die verwendeten Verbrauchsmaterialien von den folgenden Herstellern

- Laborchemikalien in p.a.-Qualität, Lösungsmittel, Nährmediengrundstoffe, Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika von *AppliChem (Darmstadt)*, *BD Biocience (Heidelberg)*, *Biomol (Hamburg)*, *Boehringer Mannheim (Mannheim)*, *Carl Roth (Karlsruhe)*, *Duchefa (Haarlem, Niederlande)*, *Fluka (Neu-Ulm)*, *Merck (Darmstadt)*, *Serva (Heidelberg)* sowie *Sigma-Aldrich (Deisenhofen)*;
- Radiochemikalien von *Amersham Buchler (Braunschweig)*;
- Restriktionsendonucleasen und DNA-modifizierende Enzyme sowie DNA-Größenstandards und Nucleotide von *Boehringer Mannheim (Mannheim)*, *Gibco-BRL (Neu Isenburg)*, *MBI-Fermentas (Vilnius, Litauen)* und *New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)*;
- Blottingmembranen und Blottingpapier von *Schleicher & Schüll (Dassel)*, *Qiagen (Hilden)* und *Whatman (Springfield Mill, Großbritannien)*;
- Zweit-Antikörper-Reagenz-Konjugate von *Sigma-Aldrich (Deisenhofen)* und *Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, USA)*;
- DC-Platten (Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,25 mm, 20x20 cm) von *Merck (Darmstadt)*;
- Sterilfilter „Stericup™“ von *Millipore*;
- Elektroporationsküvetten von *BioRad (München)*;
- Verbrauchsmaterialien für die biolistische Pflanzentransformation von *BioRad (München)*.

2.3. Biologisches Material

2.3.1. Mikroorganismen

Tabelle 2.1: Die in dieser Arbeit kultivierten Mikroorganismen

(die in der Tabelle aufgezeichneten Genotypen der verwendeten *E. coli*-Stämme entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli* [149])

Organismus	Stamm	Genotyp/Bemerkungen	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATHV C58C1	ein Derivat des Stammes EHA 101	Hood <i>et al.</i> , 1986 [150]
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ Δ[lac-proAB]</i> (F- <i>traD36 proAB, lacI^q, lacZ⁻ ΔM15</i>) (<i>λclts857, ind1, Sam7, nin5 lacUV5-T7 gene1</i>)	Novagen
	C41 (DE3)	unbekannt	Miroux & Walker, 1996 [151]
	TOP 10	F ⁻ <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZ ΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG</i>	Invitrogen
	XL1-Blue MRF' Tet	<i>Δ(mrcA)183, Δ(mrcCB-hsdSMR-mrr)173, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI^q, lacZ⁻ ΔM15, Tn10 (tet^f)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987 [152]
<i>Pichia pastoris</i>	GS115	<i>his4</i>	Invitrogen
	JC308 <i>Δugt51</i>	<i>AOX1, ade1, arg4, his4, Δugt51::URA3</i>	Hillig <i>et al.</i> , 2003 [74]

2.3.2. Vektoren

Tabelle 2.2a: Die verwendeten Ursprungs- und Klonierungsvektoren

(Selektionsmarker: amp^r = Ampicillin-Resistenz, hyg^r = Hygromycin-Resistenz, kan^r = Kanamycin-Resistenz)

Ursprungs- und Klonierungsvektoren	Selektionsmarker	Referenz
pCR2.1	amp^r , kan^r	Invitrogen
pBAD-TOPO	amp^r	Invitrogen
pET19b	amp^r	Novagen
pET24c	kan^r	Novagen
pPIC3.5	amp^r , kan^r	Invitrogen
pUC18	amp^r	Yanish-Perron <i>et. al.</i> , 1985 [153]
pUC19-35S2	amp^r	A. Abbadi (nicht publiziert)
pEGFP	amp^r	Clontech
pEYFP	amp^r	Clontech
pCAMBIA1305.1	kan^r (Bakterien) kan^r (Pflanzen)	CAMBIA
pCAMBIA1391Z	kan^r (Bakterien) hyg^r (Pflanzen)	CAMBIA

Tabelle 2.2b: Die in dieser Arbeit erzeugten rekombinanten Plasmide (die Benennung der Sterol-Glucosyltransferase-Gene erfolgte nach anerkannten Nomenklaturregeln des UGT-Nomenklatur-Komitees [154]. Demgemäß bedeuten *ugt80A2* – SGT von *A. thaliana*; *UGT51* – SGT von *S. cerevisiae* und *UGT51B1* – SGT von *P. pastoris*)

Plasmide	Ursprung [Insert]
pBPSG11	pBAD-TOPO [<i>UGT51B1</i>]
pBSSG31	pBAD-TOPO [<i>UGT51</i>]
pBASG51	pBAD-TOPO [<i>ugt80A2</i>]
pBPCG61	pBAD-TOPO [GCS (<i>P. pastoris</i>)]
pBCCG71	pBAD-TOPO [GCS (<i>C. albicans</i>)]
pEPSG11	pET24c [<i>UGT51B1</i>]
pEPCG61	pET19b [GCS (<i>P. pastoris</i>)]
pECGTfr6	pET19b [288-AS-Fragment aus GCS (<i>P. pastoris</i>)]
pESGTfr11	pET19b [378-AS-Fragment aus <i>UGT51B1</i>]
pGCEpcr2	pCR2.1 [GCS (<i>G. arboreum</i>) + EGFP]
pSEpcr6	pCR2.1 [<i>ugt80A2</i> + EGFP]
pUC35SE	pUC19-35S2 [<i>ugt80A2</i> + EGFP]
pUC35GCE	pUC19-35S2 [GCS (<i>G. arboreum</i>) + EGFP]
p19-2x35	pUC19-35S2 ["doppelter" 35S-Promotor + OCS-Terminator]
p2xYFP-N	p19-2x35 [MCS (<i>Bam</i> HI, <i>Xma</i> I, <i>Spe</i> I, <i>Sac</i> II) + EYFP]
p2xYFP-C	p19-2x35 [EYFP + MCS (<i>Xma</i> I, <i>Spe</i> I, <i>Sac</i> II, <i>Nhe</i> I)]
pS1-YFP-C	pUC19 ["doppelter" 35S-Promotor + <i>ugt80A2</i> + EYFP + OCS-Terminator]
pC-YFP-C	pUC19 ["doppelter" 35S-Promotor + GCS (<i>G. arboreum</i>) + EYFP + OCS-Terminator]
pS1-YFP-N	pUC19 ["doppelter" 35S-Promotor + EYFP + <i>ugt80A2</i> + OCS-Terminator]
pC-YFP-N	pUC19 ["doppelter" 35S-Promotor + EYFP + GCS (<i>G. arboreum</i>) + OCS-Terminator]
pGUS1	pCAMBIA1391Z [Promotor von <i>ugt80A2</i>]
pS1-Y-NX	<i>ugt80A2</i> N-terminal verkürzt + EYFP
pS1-Y-CX	EYFP + <i>ugt80A2</i> C-terminal verkürzt
pS2-Y-NX	<i>ugt80B1</i> N-terminal verkürzt + EYFP
pS2-Y-CX	EYFP + <i>ugt80B1</i> C-terminal verkürzt
pC-Y-NX	GCS N-terminal verkürzt + EYFP

2.4. Mikrobiologische Techniken

2.4.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte nach den Standardmethoden bei 37°C. Die Bakterien wurden in Flüssigkultur und auf Agarplatten aus Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) [155] kultiviert.

LB-Medium

Trypton (Gibco BRL)	10,0 g
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
NaCl	5,0 g
<i>Aqua dem.</i>	ad 1000 ml

Die Festmedien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar. Die Medien wurden mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.

Zur Selektion wurden den Medien in Abhängigkeit vom Selektionsmarker der verwendeten Vektoren Antibiotika zugesetzt. Hierzu wurden die wässrigen, sterilfiltrierten Stammlösungen der Antibiotika auf ihre Endkonzentration im Medium verdünnt.

Tabelle 2.3: Die bei der Kultivierung von *E. coli* verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml	30 µg/ml

Für die β -Galactosidase-Selektion zur Unterscheidung von rekombinanten und nicht-rekombinanten Klonen (Blau-Weiß-Screening) wurden den Festmedien Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) zugesetzt.

Tabelle 2.4: Reagenzien für Blau-Weiß-Screening

Reagenz	Stammlösung	Endkonzentration
IPTG	100 mM in <i>Aqua dem.</i>	200 μ M
X-Gal	2% (w/v) in DMF	80 μ g/ml

Um eine optimale Belüftung zu gewährleisten, wurde bei der Flüssigkultur maximal 10% des Kolbenvolumens für das Medium genutzt.

Zur Herstellung einer Dauerkultur wurde eine exponentiell gewachsene Bakterienkultur mit 70%-igem (w/v), sterilfiltriertem Glycerol im Verhältnis 1:2 vermischt und bei -70°C gelagert.

2.4.2. Kultivierung von *Pichia pastoris*

Die Anzucht der Hefe *P. pastoris* des Stammes GS115 erfolgte in Flüssigkultur in YPD-Vollmedium oder auf YPD-Agarplatten bei einer Inkubationstemperatur von 30°C und einer Inkubationsdauer von 24 – 48 Stunden.

Um eine optimale Belüftung zu gewährleisten, wurde bei der Flüssigkultur maximal 10% des Kolbenvolumens für das Medium genutzt.

Zur Herstellung einer Dauerkultur wurde eine angewachsene Flüssigkultur mit 70%-igem (w/v), sterilfiltriertem Glycerol im Verhältnis 1:1 vermischt und bei -70°C gelagert.

YPD-Vollmedium

Bacto-Pepton (Difco)	2% (w/v)
Hefeextrakt (Difco)	1% (w/v)
Glucose	2% (w/v)

Die Glucose wurde nach dem Autoklavieren des Mediums aus einer 40%-igen (w/v), sterilfiltrierten Stammlösung zugesetzt. Die Festmedien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar.

Die Anzucht des *P. pastoris*-Stammes JC308 erfolgte bei 30°C im Minimalglucosemedium, die Anzucht der transformierten Hefe dieses

Stammes zur Expression des rekombinanten Proteins im Minimal-Methanolmedium; in beiden Fällen erfolgte eine Zugabe von 0,2 % (w/v) Arginin, 0,1 % (w/v) Adenin und 0,2 % (w/v) Uracil. Die fakultativ methylotrophe Hefe *P. pastoris* verwendet im letzteren Fall Methanol als Kohlenstoffquelle. Das Histidin dient als Selektionsmarker.

Minimalglucosemedium (MD) +/- Histidin

YNB; 134 g/L Aminosäuren (Difco)	100 ml
0,02 % (w/v) Biotin in <i>Aqua dem.</i>	2 ml
2 % (w/v) Histidin in <i>Aqua dem.</i>	2 ml
40 % (w/v) Glucose in <i>Aqua dem.</i>	50 ml
<i>Aqua dem.</i>	846 ml

Nach Autoklavierung des entmineralisierten Wassers erfolgte die Zugabe von sterilfiltrierten Aminosäuren, YNB und Glucose.

Die Zusammensetzung von Minimalmethanolmedium (MM) +/- Histidin ist identisch mit Minimalglucosemedium mit der Ausnahme, daß statt Glucose 0,5 % (v/v) Methanol verwendet wird.

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Zur Ausübung des Selektionsdrucks wurde auf die Zugabe von Histidin verzichtet.

2.4.3. Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* des Stammes ATHV C58C1 erfolgte in Flüssigkultur und auf Agarplatten aus YEB-Medium bei 28°C. Zur Selektion wurde dem Medium Rifampicin zugesetzt, das aus einer wässrigen, sterilfiltrierten Stammlösung (40 mg/ml) auf eine Endkonzentration von 80 µg/ml verdünnt wurde. Um eine optimale Belüftung zu gewährleisten, wurde bei der Flüssigkultur maximal 10% des Kolbenvolumens für das Medium genutzt.

YEB-Medium

Trypton	0,5% (w/v)
Hefeextrakt (Difco)	0,5% (w/v)
NaCl	50 mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,8 eingestellt.

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem YEB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Micro-Agar zugesetzt.

2.4.4. Abschätzung der Konzentration von Mikroorganismen

Eine grobe Abschätzung der Konzentration von Bakterien und Hefe erfolgte mit Hilfe eines Photometers durch die Trübungsmessung. Unter Trübung versteht man die Ablenkung von Licht an in dem im Medium suspendierten kleinen Teilchen. Die Trübungsmessung kann zur Konzentrationsabschätzung eingesetzt werden, wenn die Organismenzahl größer als 10^6 pro cm^3 ist. Die Trübung einer Kultur wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm durch die Bestimmung der scheinbaren Extinktion gemessen. Für $\text{OD}_{600}=1$ wurde für *E. coli* ein Wert von 8×10^8 Zellen pro cm^3 zugrundegelegt.

2.5. Molekularbiologische Techniken

2.5.1. Transformation von *E. coli*

2.5.1.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen „The QIAexpressionist“ [156].

Eine LB-Vorkultur wurde mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde mit 100 ml des raumtemperierten LB-Selektivmediums versetzt und bis zu einer OD₆₀₀=0,5 bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurde das Zellwachstum durch 5 min Inkubation in Eis gestoppt, und die Zellen wurden durch die Zentrifugation bei 4000 × g, 5 min, 4°C absedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden 90 min in Eis inkubiert und anschließend unter identischen Bedingungen wie zuvor sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder in 200 µl-Aliquots in Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

TFB1-Puffer

RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
CH ₃ COOK	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerol	15% (w/v)
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Der TFB1-Puffer wird – falls erforderlich – auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

TFB2-Puffer

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerol	15% (w/v)
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Der TFB2-Puffer wird mit KOH auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt und sterilfiltriert.

2.5.1.2. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die kompetenten Zellen wurden langsam in Eis aufgetaut. Den 100 µl kompetenten Zellen wurden ca. 10 ng der DNA aus einem Ligationsansatz bzw. 0,1-1 ng superhelikaler DNA in weniger als 10 µl Volumen hinzugegeben. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig gemischt und 30 min in Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 40 s und eine erneute, kurze Inkubation in Eis (2 min). Zur Regeneration der Zellen und zur Etablierung der Plasmide wurde der Transformationsansatz mit 400 µl SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C und 200 rpm ohne Selektionsdruck inkubiert. Anschließend wurden 250 µl vom Transformationsansatz auf LB-Selektivmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet.

SOB-Medium

Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	2,5 g
KCl	0,09 g
NaCl	0,3 g
<i>Aqua dem.</i>	ad 498 ml

Diese Lösung wird mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, autoklaviert und mit jeweils 0,5 ml sterilfiltrierter 1 M MgCl₂-Lsg. und 1 M MgSO₄-Lsg. versetzt.

SOC-Medium

Das SOB-Medium wird mit der 40%-igen, sterilfiltrierten Glucose-Stammlösung auf 20 mM Glucose eingestellt.

2.5.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Je nach benötigter Reinheit und Menge von Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Plasmidpräparationsmethoden angewandt. Zur schnellen Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA wurde die modifizierte Methode nach Riggs & McLachlan angewendet [157]. Sie ist kostengünstig und liefert DNA, die ohne weitere Reinigungsschritte für die Restriktionsanalyse geeignet ist. Um Plasmid-DNA in Sequenzierqualität oder in größeren Mengen zu erhalten, wurden säulenchromatographische Verfahren mit dem Material und nach den Angaben verschiedener Hersteller genutzt.

2.5.2.1. Mini-Plasmid-DNA-Präparation nach Riggs & McLachlan

Ein Aliquot (1,5 ml) einer ÜN-Kultur wurde 30 s absedimentiert, dekantiert, das Sediment in 200 µl BF-Puffer mit Lysozym (1 mg/ml BF) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellyse erfolgte 1 min lang im siedenden Wasserbad, gefolgt von 5 min Inkubation in Eis. Anschließend wurden Zelltrümmer und genomische DNA 30 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 480 µl Isopropanol-Mix gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde kurz gemischt, für die Fällung der Nucleinsäuren 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Nucleinsäure-Sediment mit 500 µl eiskaltem, 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und je nach gewünschter DNA-Konzentration in 30 bis 100 µl RNaseA-haltigem *Aqua dem.* aufgenommen (1 µl RNaseA-Stammlösung auf 100 µl *Aqua dem.*). 1 bis 3 µl von dieser Plasmid-DNA-Lösung wurden für die Restriktionsanalyse eingesetzt.

Alle Zentrifugationsschritte bei der Mini-Plasmid-DNA-Präparation wurden in einer Biofuge 13 (Heraeus) bei Raumtemperatur und 13000 rpm durchgeführt.

BF-Puffer

Sucrose	8% (w/v)
Triton X-100	0,5% (w/v)
EDTA, pH = 8,0	50 mM
Tris-HCl, pH = 8,0	10 mM

Isopropanol-Mix

pro 1 Probe, stets frisch angesetzt

Isopropanol	400 µl
5 M CH ₃ COONH ₄	80 µl

RNaseA-Stammlösung

RnaseA	100 mg
<i>Aqua dem.</i>	1 ml

Lysozym-Stammlösung

Lysozym	20 mg
<i>Aqua dem.</i>	1 ml

2.5.2.2. Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA in größeren Mengen oder in Sequenzierqualität wurden säulenchromatographische Verfahren der Firmen Qiagen (Hilden), Sigma-Aldrich (Darmstadt) und Macherey-Nagel (Düren) angewendet. Das gemeinsame Prinzip dieser Verfahren beruht auf einer selektiven Bindung der Plasmid-DNA an das Säulenmaterial unter hohen Salzkonzentrationen und einer Elution der DNA unter Niedrigsalzbedingungen. Im allgemeinen wurden zu diesem Zweck Bakterienkulturen in einem Volumen von 100 bis 250 ml mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht kultiviert und nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Bei dieser Methode wurde die Qualität der Plasmid-DNA durch genau aufeinander abgestimmte Pufferbedingungen und Protokollschritte reproduzierbar sichergestellt.

2.5.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren wurde photometrisch durchgeführt. Die Absorptionmessungen erfolgten im Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Bei $A_{260} = 1$ (Absorption bei 260 nm) wurde für Oligonucleotide eine Konzentration von 33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zugrunde gelegt [155].

Da das Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt, wurde der Reinheitsgrad der Nucleinsäurelösungen (Verunreinigung mit Proteinen) aus dem Verhältnis A_{260}/A_{280} abgeschätzt. A_{260}/A_{280} sollte bei DNA zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

2.5.3. Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.3.1. DNA-Restriktionsanalyse

Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen wurde DNA spezifisch an bestimmten Stellen gespalten. Die Restriktionen erfolgten nach Angaben der Enzym-Hersteller. Ein Restriktionsansatz enthielt im einzelnen:

- zu spaltende DNA
- 1/10 Volumen von der entsprechenden 10 × Puffer-Lösung
- ca. 1 Unit Restriktionsendonuclease pro 1 μg eingesetzter DNA
- gegebenenfalls 1/100 Volumen von der 100 × BSA-Lösung

und wurde auf ein Volumen von 8 – 10 μl mit *Aqua dem.* aufgefüllt. Die Dauer der enzymatischen Reaktion wurde durch die eingesetzte Menge der zu spaltenden DNA sowie des Restriktionsenzym bestimmt und betrug im Normalfall ca. 1 Stunde.

Nach DNA-Spaltung wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.2.1.) und über einen Vergleich mit DNA-Größenstandards (Tabelle 2.5.) hinsichtlich ihrer Größe überprüft.

Tabelle 2.5: DNA-Größenstandards

DNA-Größenstandard	Fragmentgrößen (bp)
<i>Lambda-DNA / BstEII</i> (New England Biolabs)	1410; 850; 720; 640; 570; 480; 430; 370; 230; 190; 140; 130; 70; 20; 10
<i>pBR322-DNA / BglIII / HinfI</i> (Boehringer)	2176; 1766; 1230; 1033; 653; 517; 453; 394; 298; 234; 154
<i>pBR322-DNA / Alw44I / MvaI</i> (MBI-Fermentas)	2619; 1857; 1246; 1058; 929; 498; 383; 121; 13

2.5.3.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Verhinderung der Religation einer linearisierten Vektor-DNA wurden deren Enden dephosphoryliert. Dies wurde insbesondere dann durchgeführt, wenn der Vektor mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, so daß seine Enden kompatibel zueinander waren. Die Entfernung der Phosphatgruppen an 5'-DNA-Enden erfolgte enzymatisch mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). Hierzu wurde ca. 1 Unit CIP pro 1 µg Vektor-DNA 30 min nach Beginn einer Restriktion direkt zum Restriktionsansatz zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert.

2.5.3.3. Phosphorylierung von freien DNA-5'-Enden.

Die durch Polymerase-Kettenreaktion erzeugten DNA-Fragmente sind an ihren 5'-Enden nicht phosphoryliert. Um die Ligation mit dephosphorylierter Vektor-DNA (2.5.3.2.) zu ermöglichen, wurden sie zuvor mit Hilfe einer T4-Polynucleotidkinase nach Angaben der Enzym-Hersteller phosphoryliert.

2.5.3.4. Ligation

Die Ligation der DNA-Fragmente (Inserts) mit entsprechend vorbehandelten Vektoren (2.5.3.2; 2.5.3.3.) wurde durch das Enzym T4-DNA-Ligase

katalysiert. In einer ATP-abhängigen Reaktion bildet diese einen Phosphodiester aus der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-OH-Gruppe von DNA-Molekülen und ligiert somit Vektor- und Insert-DNA mit glatten Enden (*blunt ends*) oder komplementären Überhängen (*sticky ends*).

Für eine optimale Ligationseffizienz wurden in einem möglichst kleinen Volumen (10 – 20 µl) Insert-DNA und linearisierter Vektor in einem molaren Verhältnis von 2:1 bis 3:1 eingesetzt und mit T4-DNA-Ligase in einem ATP-haltigen T4-DNA-Ligase-Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Menge des Enzyms richtete sich nach der eingesetzten DNA-Menge und betrug für einen Ligationsansatz 0,5 bis 0,7 Weiss Units. Zur Ligationskontrolle wurde ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA durchgeführt. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden schließlich mit Ligationsansätzen transformiert.

2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion und Klonierungen

2.5.4.1. Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion [158] ist es möglich, aus sehr geringen Mengen von DNA größere Mengen *in vitro* zu amplifizieren und die DNA dadurch für weitere Experimente zugänglich zu machen. In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifizierung von Glucosyltransferase- und anderen DNA-Sequenzen aus verschiedenen Organismen verwendet. Die Amplifizierung erfolgte mit Primern, deren Enden in bestimmten Fällen noch durch die spezifischen Sequenzen für Restriktionsendonucleasen ergänzt waren, um eine Klonierung der Amplifikate in entsprechende Vektoren zu ermöglichen. Die Primer wurden von den Firmen Sigma Genosys (ehemals Sigma-ARK, Darmstadt) und MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Als Template dienten genomische DNA aus verschiedenen Organismen sowie andere DNA-Matrizen[★]. Die PCR wurde – der jeweiligen Fragestellung angepaßt – nach unterschiedlichen Programmen und mit verschiedenen DNA-Polymerasen durchgeführt. An dieser Stelle wird das

★ nähere Angaben zu den in dieser Arbeit verwendeten Templates werden bei der Beschreibung der jeweiligen Versuche im Abschnitt 3 gemacht

Standardprotokoll erläutert, nach dem die meisten Amplifizierungen durchgeführt wurden.

PCR-Standardansatz

DNA-Matrize	100 ng
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
dNTP-Mix (2,5 mM je Nucleotid)	50 µM
MgCl ₂	1,5 mM
PCR-Puffer	q.s.
Vent-Polymerase	5 Units
<i>Aqua dem.</i>	ad 50 µl

Anstelle der Vent-Polymerase wurden unter entsprechender Anpassung der Reaktionsparameter auch die Pfu-Polymerase, die Turbo-Pfu-Polymerase, die Taq-Polymerase und die Proof-Start-Polymerase verwendet (welche Polymerase bei den einzelnen Experimenten verwendet wurde, wird in Abschnitt 3 beschrieben).

PCR-Standardprogramm

1. Denaturierung 95°C / 4 min
2. Denaturierung 95°C / 30 s
3. Primer-Hybridisierung 50 – 64°C / 35 s (Primer-abhängig)
4. Polymerisation 72°C / 2 min
(die Abfolge 2. → 3. → 4. wurde je nach Fragestellung 20 bis 40 Mal wiederholt)
5. Polymerisation 72°C / 10 min
6. Termination 4°C

Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1,0%-igen Agarosegel aufgetrennt (2.6.2.1.) und geeignete Banden aus dem Gel eluiert (2.6.2.2.). Anschließend erfolgte die Klonierung der Amplifikate in ausgewählten Vektoren.

Außer zu der präparativen Anwendung bei der PCR wurde diese Technik auch zu analytischen Zwecken eingesetzt. Hierbei wurde eine sehr hohe Spezifität ausgenutzt, mit der eine bestimmte DNA-Sequenz mittels PCR „erkannt“ wird. Aus diesem Grund wurde die PCR-Technik in dieser Arbeit zur schnellen Durchmusterung von Bakterienkolonien verwendet (Kolonie-PCR). Mit einer sterilen Spitze wurde eine Kolonie gepickt und damit eine Replikaplatte angeimpft. Die an der Spitze verbliebenen Bakterien wurden in ein PCR-Reaktionsgemisch überführt und die PCR gestartet. Beim ersten Denaturierungsschritt der PCR wurde mit dem Aufschluß der Bakterien die Plasmid-DNA freigesetzt. Bei dieser Anwendung wurde die Dauer des ersten Programmschrittes auf 6 min erhöht und die Polymerase erst während des zweiten Denaturierungsschrittes hinzugegeben. Die anschließende Gel-elektrophorese der PCR-Produkte zeigte anhand der Anwesenheit eines Produkts der erwarteten Größe, ob die entsprechende Kolonie positiv war. In anderen Experimenten wurde auf die gleiche Weise der Nachweis eines bestimmten Sequenzabschnittes in einem Plasmid erbracht.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit die PCR-Technik zur gerichteten DNA-Mutagenese eingesetzt. Diese Anwendung wird eingehend im Abschnitt 3.2.5. beschrieben.

2.5.4.2. Klonierung von PCR-Produkten in pBAD-TOPO- und pCR2.1-Vektoren

Zur direkten Klonierung der PCR-Amplifikate wurden in dieser Arbeit die zeitsparenden pBAD-TOPO- und pCR2.1-Vektorsystemen der Firma Invitrogen benutzt. Dabei handelt es sich um linearisierte Vektoren mit 3'-Desoxythymidin-Überhängen. Für die Ligation mit diesen Vektoren muß das PCR-Produkt am 3'-Ende Desoxyadenosin tragen. Bei der Behandlung mit Taq-Polymerase sind die Amplifikate an ihren Enden bereits adenyliert. PCR-Produkte, die mit einer Polymerase ohne Template-unabhängige Transferase-Aktivität amplifiziert wurden (dazu gehören z.B. die Pfu- und die Vent-Polymerase), wurden nach Beendigung der PCR 10 min bei 72°C mit der Taq-Polymerase adenyliert. Die adenylierten PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel gereinigt (2.6.2.1.) und aus dem Gel eluiert (2.6.2.2.). Die anschließende „Ligation“ im pBAD-TOPO- / pCR2.1-

System erfolgte nicht mittels einer DNA-Ligase, sondern durch eine kovalent gebundene Topoisomerase [159].

Folgender Reaktionsansatz wurde für die Klonierung hergestellt:

PCR-Produkt	5-10 ng
pBAD-TOPO- oder pCR2.1-Vektor (nur bei pCR2.1)	5 ng
1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl ₂	1 µl
<i>Aqua dem.</i>	ad 5 µl

Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die kompetenten *E. coli*-TOP-10-Zellen direkt mit dem Reaktionsansatz transformiert.

2.5.4.3. Klonierung in Expressionsvektoren

Zur Expression der Zielproteine wurden in dieser Arbeit verschiedene Expressionssysteme eingesetzt. Zur bakteriellen Expression eines Zielproteins wurde die entsprechende kodierende Sequenz (CDS) in einem pBAD-TOPO-Vektor bzw. in einem der pET-Vektoren kloniert.

Die Expression des offenen Leserahmens in einem pBAD-TOPO-Vektor steht unter der Kontrolle des *araBAD*-Promotors (P_{BAD}) [160]. Der P_{BAD} wird durch das Genprodukt von AraC reguliert [161], welches ebenfalls auf dem pBAD-TOPO kodiert ist und unter Kontrolle des Promotors P_C steht. Die Induktion dieses Promotors wird durch den Zusatz von L(+)-Arabinose ausgelöst.

Die Funktionsweise des pET-Expressionssystems (Novagen) beruht auf der Transkription der klonierten DNA durch die Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase. Dazu ist in allen pET-Vektoren dem Polylinker ein T7-Promotor vorgeschaltet, von dem aus die Transkription in Richtung Insert startet. Die Expression der klonierten DNA kann daher nur in Gegenwart von T7-RNA-Polymerase erfolgen. Den für die Expression verwendeten *E. coli*-Stämmen (wie z.B. BL21(DE3)) wurde das Gen für die T7-RNA-Polymerase in das Genom integriert. Dieses Gen steht unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und ist deshalb mit IPTG induzierbar. Die Klonierung des Konstruktes

erfolgt in einem Stamm ohne T7-RNA-Polymerase (wie z.B. XL1-Blue). So kann in dieser Phase die unerwünschte Produktion des für *E. coli* möglicherweise toxischen Proteins unterbunden werden. Ein Expressionsstamm mit T7-RNA-Polymerase wird dann mit dem fertigen Konstrukt transformiert. Die Expressionskultur wird zunächst in Abwesenheit von IPTG angezogen. Sobald sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, kann die Induktion durch die Zugabe von IPTG erfolgen und die Transkription der Zielsequenz beginnen. Das System aus T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors führt zur Synthese größerer Mengen von mRNA. Unter günstigen Umständen kann dies zur Akkumulation des gewünschten Proteins im Bereich von 40-50% des Gesamtzellproteins führen [162]. Außerdem stehen in pET-Vektoren eine N-terminale (pET19b) bzw. eine C-terminale (pET24a-d) His-tag-Sequenz für die affinitätschromatographische Aufreinigung zur Verfügung. Zur Expression in der Hefe *P. pastoris* wurden die pPIC-Vektoren (Invitrogen) und zur Expression in Pflanzen die binären Vektoren aus der CAMBIA-Vektor-Familie eingesetzt (CAMBIA – *Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture*, Canberra, Australien). Die Funktionsweisen dieser Vektoren werden in den nachfolgenden Kapiteln erläutert.

Die Klonierungen erfolgten im Allgemeinen nach zwei verschiedenen Strategien.

In den meisten Fällen wurde die CDS mittels PCR amplifiziert und zunächst in einem dafür geeignetem Vektor (z.B. pCR2.1-TOPO) subkloniert (2.5.4.2.). Die PCR-Primer waren dabei so konzipiert, daß das Amplifikat vor dem ersten ATG und nach dem STOP-Codon spezifische Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsendonucleasen enthielt, die auch in dem ausgewählten Expressionsvektor vorhanden waren. Anschließend wurde das Insert mit Restriktionsenzymen herausgeschnitten und in einen mit den gleichen Endonucleasen linearisierten Expressionsvektor umkloniert.

Zum anderen wurde das PCR-Produkt ohne Subklonierung gleich in den zuvor linearisierten Expressionsvektor eingesetzt. Auch in diesem Fall enthielt das Amplifikat an seinen beiden Enden die mittels Primer-Engineering eingeführten spezifischen Endonuclease-Erkennungssequenzen. Direkt an diese Erkennungssequenzen wurde außerdem noch jeweils eine aus 3 bis 7 Nucleotiden bestehende Nonsense-Sequenz angefügt,

die dazu diente, die Restriktion kurz vor dem Ende eines DNA-Stranges zu ermöglichen (verschiedene Restriktionsenzyme brauchen unterschiedlich viele Anhang-Nucleotide, um den DNA-Strang an seinem Ende zu spalten). Das PCR-Produkt und der Expressionsvektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt (2.5.3.1.). Die anschließende Ligation erfolgte nach dem im Abschnitt 2.5.3.4. beschriebenen Protokoll.

In jedem Fall wurden sowohl die PCR-Amplifikate als auch die Expressionsvektoren vor jeder Klonierung elektrophoretisch in Agarosegelen gereinigt (2.6.2.1.) und die Expressionsvektoren nach der Linearisierung gegebenenfalls dephosphoryliert (2.5.3.2.).

2.5.5. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Bei der Amplifizierung eines DNA-Abschnitts mittels PCR können insbesondere bei Verwendung einer Polymerase ohne *proof-reading*-Aktivität Sequenzfehler auftreten. Um die Richtigkeit der Sequenz zu überprüfen, wurde bei wichtigen Plasmiden eine Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurde aus dem jeweiligen positiven Klon die Plasmid-DNA isoliert (2.5.2.2.) und der interessierende Insert von beiden Seiten durchsequenziert.

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach einer modifizierten Methode von Sanger *et al.* durchgeführt [163]. Die von einem Oligonucleotid ausgehende DNA-Synthese wird durch Didesoxynucleosid-Triphosphate (ddNTPs) zum Abbruch gebracht. ddNTPs besitzen keine 3'-OH-Gruppe, so daß keine Phosphodiester-Brücke zum nächsten Nucleotid ausgebildet werden kann. Die beim Synthese-Abbruch entstehenden DNA-Fragmente werden in einem Hochleistungs-Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die endständigen ddNTPs sind mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, was eine schnelle, automatisierte Sequenzerfassung möglich macht.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe von Computerprogrammen CHROMAS 1.4.3.* und CLUSTAL [164].

* zu finden im Internet unter: <http://trishil.sci.gu.edu.au/conor/chromas.html>

2.5.6. Expression von rekombinanten Proteinen in *Pichia pastoris*

Zur funktionellen Expression einer pflanzlichen CDS wurde in dieser Arbeit das bewährte Expressionssystem der fakultativ methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* verwendet. Viele eukaryotische Proteine benötigen für korrekte Faltung, Glycosylierungen, Phosphorylierungen etc. eine eukaryotische Umgebung (ER, Golgi-Apparat) und können deswegen in *E. coli* oft nicht in funktionstüchtiger Form produziert werden. Somit besitzt *P. pastoris* gegenüber einem bakteriellen Wirtsorganismus den Vorteil, daß eukaryotische ko- und posttranslationale Modifikationen am Zielprotein durchgeführt werden.

Der für die heterologe Expression benutzte pPIC3.5-Vektor von Invitrogen besitzt einen sehr effizienten *AOX1*-Promotor. Er ist durch Glucose sowie andere nichtmethanolische Kohlenstoffquellen reprimierbar und wird durch Methanol induziert, was eine kontrollierte Expression der interessierenden CDS erlaubt. Die Alkoholoxidase I (*AOX1*), die unter der Kontrolle des *AOX1*-Promotors transkribiert wird, akkumuliert nach methanolischer Induktion in den Peroxisomen der Hefe und stellt bis zu 30% des Gesamtzellproteins dar [165].

2.5.6.1. Integration einer Fremdsequenz ins *P. pastoris*-Genom durch homologe Rekombination

P. pastoris besitzt im Gegensatz zu vielen anderen Mikroorganismen, wie beispielsweise der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, keine eigenen stabilen Plasmide, so daß die Fremd-DNA nicht episomal repliziert werden kann. Stattdessen werden die Vektoren, die eine Fremdsequenz enthalten, ins *Pichia*-Genom integriert. Eine solche Integration kann durch die homologe Rekombination bewerkstelligt werden. Bei der homologen Rekombination lagern sich die homologen Bereiche des in die Zelle eingeschleußten Vektors und des Hefe-Chromosoms aneinander. Durch Enzyme des DNA-Reparatursystems der Hefe wird die Vektorsequenz komplett in das Hefe-Genom integriert. Die Effizienz einer homologen Rekombination ist mit ca. 1 bis 10 Transformanten pro µg Plasmid-DNA nicht besonderes hoch [166]. Durch die Restriktion des zu integrierenden Plasmids in dem Bereich, über den die

homologe Rekombination stattfinden soll, läßt sich die Rekombinationsfrequenz allerdings um den Faktor 10 bis 1000 beträchtlich steigern [166].

In der vorliegenden Arbeit wurde die homologe Rekombination über die im pPIC3.5-Vektor wie in dem Genom des *P. pastoris*-Empfängerstamms JC308 vorhandenen Bereiche des *AOX1*-Promotors durchgeführt. Hierzu wurde der pPIC3.5-Vektor, in den die interessierende Fremdsequenz kloniert wurde, vor der Transformation im Sequenzabschnitt des *AOX1*-Promotors mit *Bgl*III Enzym restringiert.

2.5.6.2. Herstellung kompetenter *P. pastoris*-Zellen und Transformation mittels Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompenter *P. pastoris*-Zellen wurden 100 ml YPD-Vollmedium (2.4.2.) mit 0,1 ml einer *P. pastoris*-Übernachtkultur angeimpft und unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 1,3 bis 1,5 wurde die Zellkultur abzentrifugiert, das Sediment in 500 ml eiskaltem, sterilem *Aqua dem.* vorsichtig resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt (hier, wie auch im weiteren Verlauf, wurde die Zentrifugation 5 min bei 1500 × g und 4°C durchgeführt). Nach Aufnahme des Sediments in 50ml *Aqua dem.* wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 10 ml eiskaltem, sterilem 1 M Sorbitol aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die nun kompetenten Zellen in 200 µl 1 M Sorbitol vorsichtig resuspendiert.

Zur Transformation wurden 80 µl kompetenter Zellen in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, Biorad) mit etwa 10 µg linearisierter, salzfreier Plasmid-DNA (maximales Volumen 10 µl) vermischt. Nach einer 5 minütigen Inkubation in Eis wurde die Küvette in den Elektroporator eingesetzt, und die Zellen wurden durch einen Spannungsimpuls von 1500 V transformiert. Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen der zu transformierenden Zellen durch kurze (10 µs) elektrische Impulse hoher Feldstärke (ca. 12,5 kV/ cm) für die Plasmid-DNA durchlässig gemacht.

Nach der Elektroporation wurde der Transformationsansatz sofort mit 1 ml 1 M Sorbitol vermischt, 2 h bei 30°C inkubiert und anschließend auf

mehreren Histidin-Selektivplatten ausplattiert (100 µl Zellen pro Agarplatte). Die transgenen *P. pastoris*-Kolonien wuchsen in etwa 3-4 Tagen heran.

2.5.6.3. Mut⁺/Mut^S-Screening auf positiv transformierte *P. pastoris*-Kolonien

Während der homologen Rekombination wird das *AOX1*-Wildtypgen im *Pichia*-Genom durch die pPIC3.5-Expressionskassete ersetzt. Nach dieser Rekombination, der nach verschiedenen Angaben bei 2 bis 20% aller Transformanten auftritt [165, 167], zeigen die Kolonien einen sogenannten Mut^S-Phänotyp. Zur Methanol-Utilisierung steht den Zellen dieses Phänotyps nur noch die wesentlich weniger aktive Alkoholoxidase II zur Verfügung^{*}. Die Mut^S-Kolonien wachsen daher nur sehr langsam auf methanolhaltigen Medien.

Neben dem oben beschriebenen erwünschten Rekombinationsereignis kann der in der Vektorsequenz enthaltene *HIS4*-Selektionsmarker mit homologen Bereichen im Hefe-Genom rekombinieren. Die dabei entstehenden Kolonien haben einen Mut⁺-Phänotyp. Da diese Kolonien nach wie vor ein intaktes *AOX1*-Wildtypgen besitzen, wachsen sie auf methanolhaltigen Medien mit normaler Geschwindigkeit.

Die Organismen mit Mut^S- und Mut⁺-Phänotypen haben auf der integrierten Vektorsequenz jeweils ein Histidin-Gen (His⁺-Phänotyp). Das bedeutet, daß sowohl Mut^S- als auch Mut⁺-Stamm auf histidindefizienten Medien normal wachsen. Auf methanolhaltigen Medien lassen sie sich aber sehr gut durch ihre Wachstumsgeschwindigkeit unterscheiden.

Zum Mut⁺/Mut^S-Screening wurden deshalb 100 bis 200 Einzelkolonien, die bereits auf histidindefizienten Agar-Platten wuchsen, mit einem sterilen Zahnstocher jeweils auf MM- und MD-Platten (2.4.2.) ausgestrichen. Nach 24 h Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien auf ihr Wachstumsverhalten überprüft. Aufgrund ihres langsameren Wachstums waren die Kolonien mit Mut^S-Phänotyp deutlich von den Mut⁺-Kolonien zu unterscheiden.

^{*} 95% des Methanolumsatzes bei *P. pastoris* werden von der Alkoholoxidase I bewerkstelligt

2.6. Biochemische Techniken

2.6.1. Proteinreinigung und -aufbereitung

2.6.1.1. Aufschluß durch Erhitzung mit SDS-Probenpuffer

Die einfachste Methode der Probenvorbereitung, um möglichst alle Proteine einer Probe elektrophoretisch zu trennen und das Gesamtproteinmuster zu analysieren, ist die Mischung der Zellen einer Expressionskultur mit 2 × SDS-Probenpuffer. Dabei wird ein Teil der Zellprobe mit einem Teil 2 × SDS-Probenpuffers gemischt und 5 min bei 96°C inkubiert. Die Proteine werden dabei denaturiert und im Probenpuffer gelöst. Die Nichtprotein-Komponenten der Probe werden 5 min bei 13000 rpm (Biofuge 13, Heraeus Instruments) abzentrifugiert. Allerdings können abhängig von der Probenzusammensetzung die Banden unscharf werden und die Nichtprotein-Komponenten der Probe bei der Gelfärbung ebenfalls angefärbt werden. Diese Methode wurde demnach nur zum schnellen *Screening* verwendet.

3 × SDS-Probenpuffer

Sammelgelpuffer	1,75 ml
Glycerin	1,5 ml
10% (w/v) SDS-Lsg.	5,0 ml
β-Mercaptoethanol	0,5 ml
0,1% Bromphenolblau-Lsg. in Ethanol	1,25 ml

Zur Herstellung des 1 × oder 2 × SDS-Probenpuffers wurde der 3 × Puffer entsprechend mit *Aqua dem.* verdünnt. Die Herstellung des Sammelgelpuffers wird im Abschnitt 2.6.2.3. beschrieben.

2.6.1.2. Schatz'scher Aufschluß

Die Extraktion von Proteinen aus Hefezellen erfolgte u.a. durch den Schatz'schen Aufschluß. Hierzu wurden etwa 30 mg Zellen mit 1 ml *Aqua*

dem., 148 μl 2 M NaOH und 12 μl β -Mercaptoethanol versetzt und 10 min in Eis belassen. Danach wurden 160 μl 50% (v/v) Trichloressigsäure hinzugegeben, die Probe wurde gemischt und erneut 10 min in Eis inkubiert. Es folgten 2 min Zentrifugation (13000 rpm; Biofuge 13, Heraeus Instruments), der Überstand wurde verworfen und das Sediment für eine Minute mit 500 μl 1 M Tris-Puffer (pH = 8,0) überschichtet. Der Tris-Puffer wurde wieder abgenommen; das Sediment anschließend in 100 – 200 μl SDS-Probenpuffer (2.6.1.1.) resuspendiert und 5 min bei 96°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (5 – 15 min bei 13000 rpm; Biofuge 13, Heraeus Instruments) und der Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

2.6.1.3. Präparation der Gesamtmembranen aus Hefe

Um Membranproteine für weitere Analysen zu konzentrieren, wurde die Gesamtmembranfraktion von anderen Zellfraktionen abgetrennt.

Die Zellen einer 100 ml-Hefekultur ($\text{OD}_{600} = 4 - 6$) wurden durch 5 min Zentrifugation bei $2000 \times g$ und 4°C sedimentiert und das Sediment wurde mit Membranpuffer gewaschen. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter Kühlung oder in Eis durchgeführt. Das Zellsediment wurde in 6 ml eiskaltem Aufschlußpuffer resuspendiert. Es wurden 10 ml Glasperlen (500 μm Durchmesser, in Säure gewaschen) und 120 μl 100 \times PMSF zugegeben. Anschließend wurde die Probe 10 \times 30 s heftig auf einem Vibromischer gemixt (mit jeweils 30 s Pause in Eis). Nach nochmaliger Zugabe von 10 ml eiskaltem Aufschlußpuffer und 100 μl 100 \times PMSF wurde die Probe erneut für 30 s auf einem Vibromischer gemixt. Mittels Zentrifugation ($1800 \times g$, 4°C für 5 min) wurden die Zelltrümmer und die noch intakten Zellen abzentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert. Nach dem Zellaufschluß wurden nun die Membranen durch einen Ultrazentrifugationsschritt ($100000 \times g$, 4°C, 60 min) sedimentiert und anschließend mit Hilfe eines Potter-Homogenisators in 3 – 4 ml Membranpuffer (mit entsprechend 30 bis 40 μl 100 \times PMSF) resuspendiert. Die so präparierte Gesamtmembranfraktion konnte portionsweise in 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäßen eingefroren und bei -70°C gelagert werden.

Aufschlußpuffer

Kaliumphosphat	50 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	5% (v/v)

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt.

Membranpuffer

Tris	50 mM
NaCl	150 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

100 × PMSF

100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid wurde in Dimethylsulfoxid gelöst. Bei Lagerung bei -20°C konnte die Lösung ca. 1 Jahr benutzt werden.

2.6.1.4. Reinigung eines Expressionsprodukts mit His-tag

Die Reinigung der His-tag-Proteine erfolgte mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Diese Methode versprach hohe Reinigungseffizienz bei relativ niedrigem Zeitaufwand. Das Prinzip der Methode wird nachfolgend kurz erläutert.

Bei der IMAC wird die Eigenschaft einiger Aminosäuren ausgenutzt, als Elektronendonoren reversibel an die auf festen Oberflächen immobilisierten Metall-Kationen zu binden [168]. Aminosäuren mit diesen Eigenschaften sind Histidin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Gegenüber Histidin besitzen Kupfer und Nickel die höchste Bindungsaffinität [169].

Der in dieser Arbeit verwendete Nickel-Nitrilotriessigsäure-Komplex (Ni-NTA-Komplex) ist das gebräuchlichste Material für die affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mit einem His-tag [170, 171]. Die NTA ist über einen „Spacer-Arm“ an das Träger-Material – üblicherweise an Agarose – gebunden und somit immobilisiert.

Die His-tag-Proteine tragen an ihrem Amino- oder Carboxyl-Terminus mehrere Histidine hintereinander (üblicherweise 6 bis 10) und bilden mit Ni-NTA-Agarose einen stabilen Chelatkomplex mit dem Ni²⁺-Kation als

Zentralatom (Abb. 2.1.). Die Bindungsaffinität von einem 6×His-tag-Protein an Ni-NTA-Agarose ist stärker als bei einer Antigen-Antikörper-Interaktion [156].

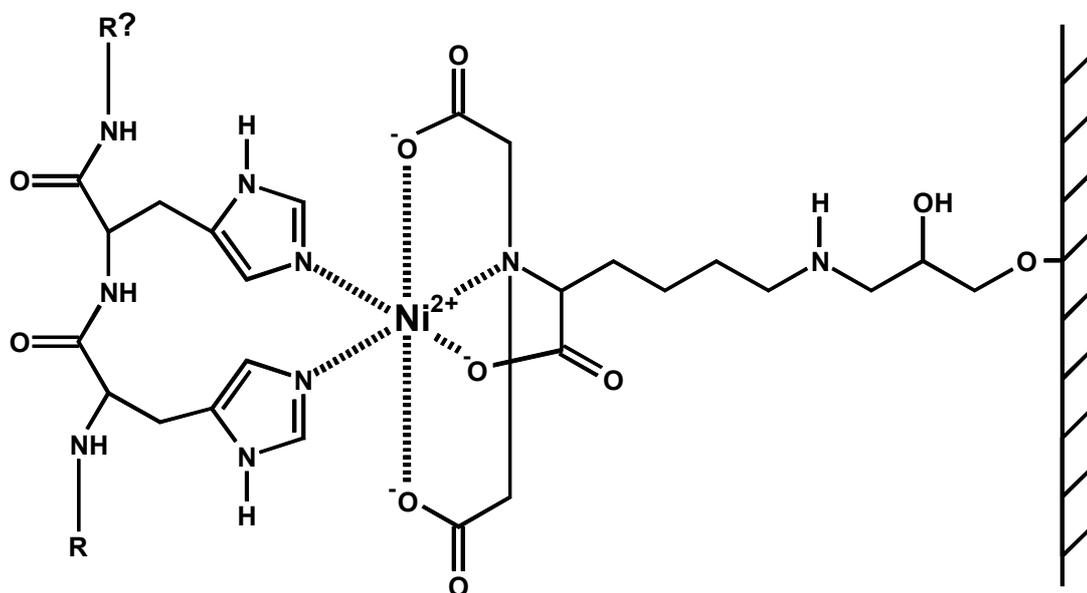


Abb. 2.1: Wechselwirkungen zwischen Ni-NTA-Agarose und einem His-tag-Polypeptid

Die Stabilität eines solchen Chelatkomplexes hängt u.a. vom pH-Wert in der umgebenden Lösung und von der Konzentration fremder ligandenfähiger Teilchen ab. Durch Erniedrigung des pH-Wertes auf $\text{pH} = 7,0$ werden die Imidazol-Seitenketten der Histidine protoniert und können nicht mehr mit Ni-NTA interagieren. Andererseits können die His-tag-Proteine durch die Erhöhung der Konzentration von Imidazol von ihrer Bindestelle am Zentralatom verdrängt werden. Beide Möglichkeiten werden bei der Elution des an Trägermaterial gebundenen Proteins ausgenutzt.

2.6.1.5. Reinigung eines His-tag-Proteins unter nativen Bedingungen

Im einfachsten Fall könnte das Expressionsprodukt in löslicher Form vorliegen. Es würde dann im schwach basischen pH-Bereich an die Ni-NTA-Agarose binden, und die Elution könnte sehr schonend über die Erhöhung der Imidazol-Konzentration durchgeführt werden.

Die Reinigung nach dieser Methode wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll und mit Ni-NTA-Minisäulen der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt [172]. Hierzu wurden die Zellen aus einer 100 ml-Kultur in 2 ml Lysispuffer A resuspendiert und 30 min in Eis inkubiert. Die geringe Imidazol-Konzentration im Lysispuffer (10 mM) verringert die unspezifische Bindung von Proteinen an die Ni-NTA-Minisäule. Die Zellen wurden mittels Ultraschallstab aufgebrochen (6 Zyklen je 10 Sekunden mit jeweils 10 Sekunden Pause dazwischen) und die Zelltrümmer 20 min bei 4°C und 4000 rpm (Kühlzentrifuge 5810 R, Eppendorf) abzentrifugiert. Eine kleine Menge vom Zellysat wurde für die SDS-PAGE-Analyse aufbewahrt. Eine Ni-NTA-Minisäule wurde mit 600 µl Lysispuffer A equilibriert. Das Zellysat wurde in 600 µl – Portionen mittels Zentrifugation bei 2000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge pico, Heraeus Instruments) durch die Ni-NTA-Minisäule gegeben. Dabei band das His-Tag-Protein an die Ni-NTA-Agarose. Der Durchlauf wurde für die SDS-PAGE-Analyse aufbewahrt. Die Minisäule wurde anschließend 2 mal mit 600 µl Waschpuffer A gewaschen und das His-tag-Protein mit 200 bis 400 µl Elutionspuffer A eluiert. Eluat und Waschfraktion wurden für die Analysen gesammelt. Bevor die so gewonnenen Proben für die SDS-PAGE-Analyse vorbereitet wurden (5 min Inkubation mit SDS-Probenpuffer bei 96°C), mußten sie oftmals durch TCA-Fällung (2.6.1.6.) aufkonzentriert werden.

Lysispuffer A (pH = 8,0)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Unmittelbar vor Verwendung wurden pro 20 ml Lysispuffer noch 1 mg Pefabloc und 10 mg Lysozym zugegeben.

Waschpuffer A (pH = 8,0)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Elutionspuffer A (pH = 8,0)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

2.6.1.6. Reinigung eines His-tag-Proteins unter denaturierenden Bedingungen im Batch-Verfahren

Oftmals liegt das Expressionsprodukt in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* vor. In diesem Fall muß die Stringenz des Lysispuffers erheblich erhöht werden, um das His-tag-Protein in eine lösliche Form zu überführen. Dazu stehen verschiedene Lysispuffer-Zusätze zur Auswahl. In dieser Arbeit wurde Harnstoff verwendet. Durch eine hohe Harnstoff-Konzentration von 8 M werden *Inclusion Bodies* aufgelöst, und das His-tag-Protein liegt dann in denaturierter Form vor. Die Elution des Expressionsproduktes wird durch die Änderung des pH-Wertes von schwach basisch (pH = 8,0) nach sauer (pH = 4,5) erreicht.

Die Reinigung wurde im Batch-Verfahren mit Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) durchgeführt. 600 – 700 mg Zellen einer Expressionskultur wurden in 5 ml Lysispuffer B resuspendiert. Durch den hohen Gehalt an Harnstoff wurden die Zellen lysiert. Die Zelltrümmer wurden 45 min bei 10000 × g sedimentiert. Anschließend folgte die Inkubation des Zellysats mit der Ni-NTA-Agarose 1 h unter Schütteln bei 200 rpm. Dabei wurde das His-tag-Protein an die Ni-NTA-Agarose gebunden. Das Trägermaterial wurde mittels Zentrifugation 5 min bei 4000 rpm (Kühlzentrifuge 5810 R, Eppendorf) absedimentiert und der Überstand entfernt. Eine kleine Menge des Überstands wurde für die SDS-PAGE-Analyse aufgehoben. Die Ni-NTA-Agarose wurde mit Waschpuffer B resuspendiert und 2 × 30 min mit 5 ml Waschpuffer B und 1 × 30 min mit 5 ml Waschpuffer C unter Schütteln bei 200 rpm gewaschen. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose wieder absedimentiert (Zentrifugation 2 min bei 4000 rpm, Kühlzentrifuge 5810 R, Eppendorf), der Überstand entfernt und das His-tag-Protein 30 min bei 200 rpm mit dem Elutionspuffer B eluiert. Eluat und Waschfraktionen wurden für die nachfolgenden Analysen aufgehoben.

Oft war der Reinheitsgrad des so gereinigten His-tag-Proteins aber nicht ausreichend. In einem solchen Fall wurde anschließend ein zweiter Reinigungsgang im Batch-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde das Eluat des ersten Reinigungsganges mit NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und nochmals nach dem gleichen Protokoll wie oben beschrieben behandelt. Da die Proteinkonzentration im Eluat oft nicht ausreichend war, wurde vor der SDS-PAGE-Analyse eine TCA-Fällung durchgeführt (2.6.1.6.).

Lysispuffer B (pH = 8,0) / Waschpuffer B (pH = 6,3) / Waschpuffer C (pH = 5,9) / Elutionspuffer B (pH = 4,5)

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris-HCl	10 mM
Harnstoff	8 M
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Aufgrund der Hydrolyse des Harnstoffs mußte der pH-Wert aller Pufferlösungen immer kurz vor Verwendung neu eingestellt werden.

2.6.1.7. Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde die schnelle und einfache Methodik nach Bradford angewendet [173]. Hierzu wurden 100 µl einer Probe, die 10 – 100 µg Protein pro ml enthielt, mit 900 µl Bradford-Reagenz vermischt (Endkonzentration 1 – 10 µg Protein). Nach 10 min Inkubation wurde die Absorption bei $\lambda=595$ nm bestimmt. Zur Kalibrierung wurden die A₅₉₅-Werte von BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen ermittelt und eine Kalibriergerade erstellt. Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden wurde mittels linearer Regression aus dem gemessenen A₅₉₅-Wert ein Schätzwert für die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

BSA-Lösungen zur Kalibrierung

Es wurden Lösungen von 0, 10, 25, 50, 75 und 100 µg BSA pro ml *Aqua dem.* verwendet.

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue	100 mg
Ethanol 95% (v/v)	50 ml
H ₃ PO ₄ 85% (w/v)	100 ml
<i>Aqua dem.</i>	ad 1000 ml

Coomassie Brilliant Blue wurde in Ethanol gelöst, Phosphorsäure dazugegeben und mit *Aqua dem.* auf 1000 ml verdünnt.

2.6.1.8. Fällung mit TCA

Durch die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) wurden die aufgereinigten Protein-Proben konzentriert. Vier Teile der Probe wurden mit einem Teil 40%-iger (w/v) TCA-Lösung versetzt und 30 bis 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte die Zentrifugation bei 4000 rpm (Tischzentrifuge Rotanta, Hettich). Der Überstand wurde restlos entfernt. Zur pH-Wert-Korrektur wurden 2 µl einer 1,5 M Tris-HCl-Lösung (pH = 9) auf das Sediment gegeben. Anschließend wurde das Sediment in einer vorher berechneten Menge 1 × SDS-Probenpuffer (2.6.1.1.) durch Erhitzung auf 96°C (5 min) und, wenn nötig, durch Behandlung im Ultraschallbad (5 – 15 min) aufgelöst.

2.6.2. Gelelektrophoresen

2.6.2.1. Auftrennung der Nucleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese.

Agarosegelelektrophorese ist die Standardmethode zur analytischen und präparativen Auftrennung von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA und RNA-Proben. Die Trennung erfolgt sowohl nach der elektrophoretischen Beweglichkeit der Moleküle als auch nach ihrer Größe. Das aufgekochte und nach der Abkühlung gelierte Polysaccharid Agarose übt auf die DNA-Moleküle einen netzartigen Siebeffekt aus, wobei die Beweglichkeit großer Moleküle relativ zu den kleineren verringert wird.

Die in dieser Arbeit in der Regel verwendeten 1%-igen (w/v) Agarosegele in TBE-Puffer entsprachen in etwa Porengrößen von 150 nm. Den Gelen wurde nach dem Aufkochen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 3 µg/100 ml zugesetzt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 0,1 Volumen 10 × DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophoresen wurden bei 50 bis 100 Volt in horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Zur Detektion wurde die Fluoreszenz des Ethidiumbromids, das sich während der Trennung in die DNA-Moleküle einlagert, im UV-Licht ausgenutzt. Die Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen erfolgte über einen Vergleich mit unterschiedlichen DNA-Größenstandards (2.5.3.1.).

10 × TBE-Puffer

Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA, pH = 8,3	20 mM

10 × DNA-Probenpuffer

EDTA (pH = 8,0)	250 mM
Ficoll	10% (v/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylolcyanol	0,25% (w/v)

Ethidiumbromid-Stammlösung

Ethidiumbromid	10 mg
<i>Aqua dem.</i>	1 ml

2.6.2.2. Elution von Nucleinsäuren aus Agarosegelen

Die Elution von linearen DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe von QIAquick-Kits der Firma Qiagen. Das ausgeschnittene Gelfragment wurde 10 min bei 50°C mit NaClO₄-enthaltendem Puffer inkubiert. Dabei lösten sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckern des Agarose-Polymers; das Gelfragment

wurde auf diese Weise schonend aufgelöst. Die DNA wurde bei hoher Salzkonzentration und einem pH-Wert $\leq 7,5$ an die Silica-Gel-Matrix gebunden. Es folgten mehrere Waschschriffe nach Herstellerangaben [174]. Letztlich konnte die DNA mit 30 bis 50 μl *Aqua dem.* oder TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 8,0) in reiner Form eluiert werden. Im TE-Puffer ist die DNA im Vergleich zur Lagerung im Wasser besser vor Degradation geschützt, jedoch kann sich die Anwesenheit von EDTA in diesem Puffer für die nachfolgenden enzymatischen Reaktionen als nachteilig erweisen.

2.6.2.3. Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine durch Natriumdodecylsulfat solubilisiert und denaturiert. Damit wird den Polypeptiden auch eine negative Gesamtladung zugeführt, was ihnen ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse verleiht. Dadurch hängt die elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels ab. Die Proteine können so nach ihrer Molmasse getrennt werden. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration des Acrylamids bestimmt. In dieser Arbeit wurden 10%-ige und 12%-ige Gele verwendet, die in etwa eine Porengröße von entsprechend 0,4 und 0,3 nm Durchmesser aufweisen.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Laemmli [175] in einem diskontinuierlichen Gelsystem in vertikalen Gelkammern verschiedener Hersteller. Es wurden 68×86 mm Gele verwendet, die bei analytischen Trennungen 0,75 mm und bei präparativen Trennungen 1,0 mm dick waren. Die Stromstärke wurde pro 0,75-mm-Gel anfangs auf 15 mA eingestellt; nachdem die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreichte, wurde diese auf 25 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Front aus dem unteren Gelrand in den Puffer herausgetreten war.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung von Gelen unterschiedlicher Acrylamidkonzentration für die diskontinuierliche SDS-PAGE

(die angegebenen Mengen sind für 2 Minigele der Dimension 68 × 86 × 0,75 mm berechnet)

Gelzusammensetzung	Acrylamidkonzentration		
	Sammelgel 5%	Trenngel 10%	Trenngel 12%
30% Acrylamid [ml]	0,75	2,66	3,20
Lower Tris [ml]	-	2,0	2,0
Upper Tris [ml]	1,25	-	-
<i>Aqua dem.</i> [ml]	2,96	3,24	2,70
20% (w/v) SDS-Lsg. [μ l]	25	40	40
10% (w/v) APS-Lsg. [μ l]	25	64	64
TEMED [μ l]	5	5	5

Die 10%-ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung wurde vor dem Gießen der Gele stets frisch angesetzt. Um einen möglichst geraden Übergang zwischen dem Sammel- und dem Trenngel zu bekommen, wurden die Trenngele unmittelbar nach dem Gießen mit einer kleinen Menge Isobutanol überschichtet. Das Isobutanol wurde vor dem Gießen des Sammelgels entfernt.

10 × Elektrophorese-Puffer (pH = 8,9)

Glycin	144,0 g
Tris	30,0 g
SDS	10,0 g
<i>Aqua dem.</i>	ad 1000 ml

30%-ige (w/v) Acrylamid-Stammlösung

Acrylamid	29,2 g
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,8 g
<i>Aqua dem.</i>	ad 100 ml

(Es wurde eine Fertiglösung der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet)

Gelpuffer

Upper-Tris (Sammelgelpuffer): 0,5 M Tris-HCl; pH = 6,8

Lower-Tris (Trenngelpuffer): 1,5 M Tris-HCl; pH = 8,8

2.6.2.4. Färbung der Polyacrylamidgele

Nach einer elektrophoretischen Trennung im Polyacrylamidgel mußten die Proteine sichtbar gemacht werden. Die Gelfärbung wurde entweder mit der Fertiglösung SimplyBlue Stain von der Firma Invitrogen nach den Herstellerangaben vorgenommen oder nach der klassischen Methode mit Coomassie-Brilliant-Blue-Reagenz durchgeführt. Im zweiten Fall wurden die Gele nach 60 min Inkubation in der Farbstofflösung weitere 60 bis 120 min entfärbt. Der Entfärber wurde nach 15 min Inkubation einmal gewechselt.

Farbstofflösung

Eisessig	10% (v/v)
Methanol	40% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G250	0,1% (w/v)
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Entfärber

Eisessig	10% (v/v)
Methanol	40% (v/v)
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Die Bestimmung der Molmassen der aufgetrennten Proteine erfolgte über einen Vergleich mit den Molekulargewichtsstandards verschiedener Hersteller.

verwendete Molekulargewichtsstandards:Low Molecular Weight (Pharmacia Biotech)

Phosphorylase b	94 kDa
Rinderserumalbumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsin-Inhibitor	20 kDa
α -Lactalbumin	14,4 kDa

Low Range (Biorad)

Phosphorylase b	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	31 kDa
Trypsin-Inhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,4 kDa

Broad Range (Biorad)

Myosin	200 kDa
β -Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase b	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	31 kDa
Trypsin-Inhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,4 kDa

BOA Protein Marker (Biomol)

20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 110; 120 kDa
(Markerproteine wurden vom Hersteller nicht definiert)

Prestained, Low Range (Biorad)

21; 29; 36; 51; 83; 101 kDa
(Markerproteine wurden vom Hersteller nicht definiert)

2.6.3. Western-Blot: Protein-Transfer auf eine Membran

Nach der Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine proteinbindende Membran überführt und dort immunochemischen Nachweisreaktionen unterzogen. Der Transfer der getrennten Proteine auf eine Membran (das Blotting) bietet dabei den Vorteil, daß die Membran als Träger viel einfacher zu handhaben ist als ein Gel. Die Proteine sind an der Oberfläche der Membran immobilisiert und für Reagenzien leicht zugänglich. Zudem kann die Membran im Vergleich zu einem Polyacrylamidgel viel länger gelagert werden.

Alle Western-Blot-Experimente dieser Arbeit wurden nach dem Semi-Dry-Verfahren in der Blotting-Apparatur der Firma Biorad durchgeführt. Als Träger dienten hauptsächlich Membranen aus Nitrocellulose (NC); einige Experimente wurden jedoch mit Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) durchgeführt.

Vor dem Blotting wurden die zurechtgeschnittenen Filterpapiere und die Trägermembran in den entsprechenden Transferpuffern equilibriert. Danach wurde auf der Blotting-Apparatur das Blotting-Sandwich aufgebaut, wobei das Gel blasenfrei auf die Membran aufgelegt wurde. Der Proteintransfer erfolgte 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA pro Gel ($\cong 2 \text{ mA/cm}^2$).

Blotting-Sandwich

KATHODE (oben)

dickes Filterpapier, equilibriert in Kathodenpuffer

dünnes Filterpapier, equilibriert in Kathodenpuffer

Polyacrylamidgel

Trägermembran, equilibriert in Anodenpuffer 2

dünnes Filterpapier, equilibriert in Anodenpuffer 2

dickes Filterpapier, equilibriert in Anodenpuffer 1

ANODE (unten)

Kathoden- und Anodenpuffer wurden von der Firma Biotec-Fischer (Reiskirchen) bezogen.

2.6.4. Visualisierung der transferierten Proteine

2.6.4.1. Färbung mit Ponceau S

Zur Kontrolle der Effizienz des Proteintransfers wurden die Proteine auf einer Membran mit dem roten Ponceau-S-Farbstoff gefärbt [176]. Diese Färbung ist sehr schnell, vollständig reversibel und stört in den meisten Fällen nicht nachfolgende immunochemische Visualisierungsverfahren. Zur Färbung wurde die Membran eine Minute lang in der Ponceau-S-Arbeitslösung inkubiert, bei Bedarf photographiert und anschließend 10 bis 15 Minuten lang entfärbt. Als Entfärber dienten TBS- oder PBS-Puffer (siehe Abschnitt 2.6.4.2.2.) oder eine 1%-ige Essigsäure-Lösung.

Ponceau-S-Stammlösung

Ponceau S	2% (w/v)
Trichloressigsäure	30% (w/v)
Sulfosalicylsäure	30% (w/v)
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Zur Herstellung der Ponceau-S-Arbeitslösung wurde 1 Teil der Ponceau-S-Stammlösung mit 9 Teilen *Aqua dem.* verdünnt. Die Arbeitslösung wurde unmittelbar vor Verwendung angesetzt.

2.6.4.2. Immunodetektion

Immunochemische Verfahren ermöglichen den Nachweis von Proteinen mit großer Empfindlichkeit und hoher Spezifität. Das Grundprinzip der Immunodetektion wird im folgenden kurz erläutert. Die Nachweisreaktion basiert auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das entsprechende Antigen – das zu untersuchende Protein. Dieser Antikörper wird als Erst-Antikörper bezeichnet; der mit dem Erst-Antikörper entstehende Immunkomplex ist in der Regel nicht sichtbar. Eine Visualisierung wird erst durch die Bindung eines Zweit-Antikörpers bewerkstelligt. Der Zweit-Antikörper entstammt im Vergleich zu dem Erst-Antikörper in der Regel einer anderen Spezies und ist gegen die konstanten Bereiche des Erst-Antikörpers gerichtet. An den Zweit-Antikörper sind chemisch leicht

nachweisbare Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe o.ä. geknüpft, so daß der Antigen-Antikörper-Komplex durch eine chemische Reaktion sichtbar gemacht werden kann.

2.6.4.3. Herstellung der Antiseren

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antiseren wurden von den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien) und VaccineLab (Rostock) hergestellt. Hierzu wurden die aufgereinigten rekombinanten Proteine in Kaninchen oder Hühner injiziert. Die Immunisierung der Tiere erfolgte nach Standardprotokollen der Hersteller [177]. Danach wurden etwa 30-100 µg Antigen pro Injektion benötigt. Die an der Luft getrockneten und zerkleinerten Polyacrylamidgel-Stückchen mit dem Antigen wurden in Freund'schen Adjuvans subkutan injiziert. Die Erstinjektion erfolgte im kompletten Freund'schen Adjuvans; die darin enthaltenen, abgetöteten Tuberkelbakterien rufen eine Stimulierung des gesamten Immunsystems der Versuchstiere hervor. Die Immunantwort auf das injizierte Antigen wird so um ein Vielfaches verstärkt. Die nachfolgenden Injektionen erfolgten in inkomplettem Freund'schen Adjuvans, das keine abgetöteten Bakterien enthielt. Nach insgesamt je 4 Injektionen pro Tier (die ersten 3 Injektionen alle 14 Tage, die letzte Injektion nach 56 Tagen) wurden nach 87 Tagen die Antiseren gewonnen, die zur Immunodetektion verwendet wurden. Die während der Immunisierung entnommenen Antiseren aus der kleinen und der großen Blutung sowie die Präimmunseren wurden ebenfalls zum Testen verwendet.

Als Zweit-Antikörper wurden Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat, Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat und Ziegen-Anti-Huhn-IgG-HRP-Konjugat der Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, USA) verwendet.

2.6.4.4. Immunochemische Nachweisreaktion

Zur immunochemischen Nachweisreaktion wurden die auf Nitrocellulose-Membranen transferierten Proteine folgender Behandlung unterzogen:

Um die überschüssigen Proteinbindestellen der Membran zu besetzen und so eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Membranen vor Beginn der Nachweisreaktion abgesättigt. Hierzu wurden sie 60 min in einer Blocking-Lösung inkubiert und anschließend 1 mal 10 s und 2 mal 10 min in TBST- oder PBST-Blotto (Blotto-Puffer) gewaschen. Für HRP-konjugierte Zweit-Antikörper wurde PBS/PBST-Blotto, für AP-konjugierte Zweit-Antikörper TBS/TBST-Blotto verwendet. Alle unter diesem Punkt beschriebenen Inkubations- und Waschschriffe wurden unter leichtem Schütteln auf einem Rotationsschüttler durchgeführt. Es folgte die Inkubation mit dem Antiserum für 60 – 120 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Das Antiserum wurde zuvor mit TBS- oder PBS-Blotto verdünnt. Der Grad der Verdünnung und die Inkubationszeiten richteten sich jeweils nach dem Titer des Antiserums und nach der Menge des geblotteten Proteins auf der Membran und mußten bei jedem neuen Experiment individuell angepaßt werden. Die Standardverdünnungen des Antiserums waren 1:250, 1:500, 1:1000 und 1:2500. Anschließend wurden die unspezifisch gebundenen Antikörper durch mehrmaliges Waschen der Membran in Blotto-Puffer entfernt (1 mal 10 s und 2 mal 10 min). Es folgte die Inkubation mit dem ausgewählten Zweit-Antikörper (60 min bei RT), der zuvor 1:1000 mit dem entsprechenden PBS- bzw. TBS-Blotto verdünnt wurde. Vor der Detektion wurde die Membran zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Zweit-Antikörper 1 mal 10 s und 2 mal 10 min in Blotto-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte im Falle des HRP-konjugierten Zweit-Antikörpers mit Sigma Fast DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid)-Tabletten (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers. Im Falle des AP-konjugierten Zweit-Antikörpers wurde zur Detektion eine frisch angesetzte NBT (Nitrotetrazoliumblausäure) / BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)-Visualisierungslösung verwendet. Es folgte eine 2- bis 30-minütige Inkubation in der Visualisierungslösung. Nach Entwicklung der Banden bis zur gewünschten Intensität wurde die Visualisierungslösung entfernt und die Membran 3 mal mit *Aqua dem.* gewaschen, getrocknet und zur Dokumentierung photographiert. Die Lagerung der entwickelten Membranen erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur.

10 × PBS (PBST)-Stammlösung (pH = 7,3)

NaCl	1,37 M
Na ₂ HPO ₄	81 mM
KCl	27 mM
KH ₂ PO ₄	14,7 mM
(Tween 20	0,05% (v/v))
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

10 × TBS (TBST)-Stammlösung (pH = 7,3)

NaCl	1,37 M
Tris-HCl	100 mM
(Tween 20	0,05% (v/v))
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Blocking-Lösung

Magermilchpulver	10% (w/v)
PBS oder TBS	q.s.

Blotto-Puffer

Magermilchpulver	0,5% (w/v)
PBS/PBST oder TBS/TBST	q.s.

Die Blocking-Lösung und der Blotto-Puffer wurden vor dem Einsatz mindestens 10 min gerührt. Alternativ zum Magermilchpulver wurde auch flüssige Gelatine (Proteingehalt: 40,3%) verwendet. Bei Inkubationen über Nacht ist dem Puffer 1 mM Natriumazid oder 0,01% (w/v) Thimerosal (bei HRP-konjugierten Zweit-Antikörpern) als Konservierungsmittel zugesetzt worden.

BCIP-Stammlösung

5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	100 mg
DMF	1,9 ml

NBT-Stammlösung

Nitrotetrazoliumblausulfat	
(NBT)	100 mg
DMF 70% (v/v)	1,9 ml

Zur Herstellung einer BCIP/NBT-Visualisierungslösung wurden für eine Membran (ca. 40 cm²) unmittelbar vor Verwendung 33 µl NBT-Stammlösung und 17 µl BCIP-Stammlösung unter Rühren in 5 ml TBS zugegeben.

2.6.4.5. Visualisierung der His-tag-Proteine.

Die Visualisierung der His-tag-Proteine erfolgte in dieser Arbeit nach zwei unterschiedlichen Verfahren.

Zum Einen wurde eine Immunofärbung durchgeführt, wobei ein Maus-Anti-His-tag-IgG1 als Erst-Antikörper und ein Ziegen-Antimaus-IgG-HRP-Konjugat als Zweit-Antikörper eingesetzt wurden (beide von der Firma Dianova). Solche Immunofärbungen erfolgten nach der unter 2.6.4.4. beschriebenen Methodik.

Zum Anderen wurden die His-tag-Proteine mit Ni-NTA-HRP-Konjugat von Qiagen angefärbt. Dieses Verfahren hat gegenüber einer konventionellen Immunofärbung einen großen Vorteil. Da der Ni-NTA-Komplex bereits mit einem chemisch detektierbaren Enzym (HRP oder AP) konjugiert ist, entfällt die Notwendigkeit der Inkubation mit einem Zweit-Antikörper, was bei einer hohen Anzahl von Versuchen zu einer großen Zeitersparnis führt. Die Empfindlichkeit der Visualisierungsreaktion mit Ni-NTA-HRP-Konjugat ist vergleichbar mit der Empfindlichkeit des zweistufigen Antikörper-Enzym-Systems. Nach Angaben der Firma Qiagen liegt die Empfindlichkeit der Reaktion mit Ni-NTA-HRP-Konjugat sogar über der der Immunoreaktion.

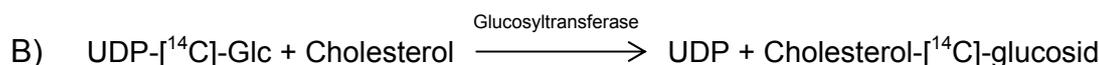
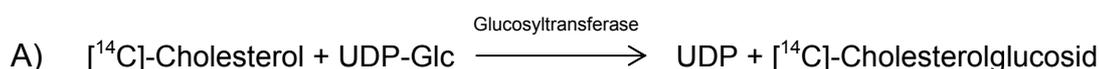
Tabelle 2.7: Detektionsgrenzen eines 6 × His-tag-Proteins nach verschiedenen Detektionsarten in Dot-Blot und in Western-Blot

(Angaben der Firma Qiagen [178])

Detektionsart	konjugiert mit	Detektionsgrenze [ng]	
		Dot-Blot	Western-Blot
Anti-His-Antikörper / Zweit-Antikörper (0,1 µg Antikörper in 1 ml Lösung)	AP (Detektion mit NBT/BCIP)	0,5 - 1	2
	HRP (Detektion mit 4-Chloro-1- Naphthol)	5 - 10	keine Angaben
Ni-NTA-Konjugat (1000-fache Verdünnung der Stammlösung)	AP	1 - 2	2 - 5
	HRP	1 - 2	2 - 5

2.6.5. Enzymtests

Zur Überprüfung der transgenen Organismen auf *in vitro* UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität wurden zellfreie *E. coli*-Homogenate Enzymtests unterzogen. Die Anzucht der Mikroorganismen erfolgte nach 2.4.1. Die Tests wurden nach Warnecke *et al.* (1999) durchgeführt [8]. Dabei wurden in zwei verschiedenen Testsystemen Cholesterol bzw. UDP-Glucose als radioaktiv markierte Substrate eingesetzt. Durch die beiden folgenden Gleichungen sind diese zwei Möglichkeiten des Enzymtests auf Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität beschrieben:



Die Enzymtests wurden wie folgt durchgeführt: zuerst wurden die Zellen einer *E. coli* -Expressionskultur 10 min bei 3500 rpm sedimentiert, das Zellsediment einer 50 ml-Kultur wurde in 2 ml Lysispuffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschallstab aufgebrochen (6 Zyklen je 10 Sekunden, unterbrochen von jeweils 10 Sekunden Pause). Sollte im Experiment die Glucosyltransferase-Aktivität einer Membranfraktion überprüft werden, wurde das Zellysat anschließend in der Ultrazentrifuge fraktioniert; anderenfalls wurde das Zellysat als Probe verwendet. Der Probenansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2.8: Zusammensetzung eines Probenansatzes zur Messung der UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität

3 μl [^{14}C]-Cholesterol (250000 dpm / $4,167 \times 10^3$ Bq) entsprechen 1,975 nmol; 10 μl [^{14}C]-UDP-Glucose (50000 dpm / $0,0833 \times 10^3$ Bq) entsprechen 74,4 pmol. Das Cholesterol wurde im absoluten Ethanol angesetzt

Bestandteile	Reaktion nach A	Reaktion nach B
50 mM Tris-HCl; pH = 8,0	40 μl	40 μl
Probe	50 μl	50 μl
UDP-Glucose; 3,6 mM	10 μl	-
[^{14}C]-UDP-Glucose	-	10 μl
Cholesterol; 4 mM	-	4 μl
[^{14}C]-Cholesterol	3 μl	-

Die enzymatische Reaktion wurde 3,5 bis 4,5 Stunden bei 30°C durchgeführt und anschließend durch Zugabe einer Mischung aus 0,8 ml 0,45%-iger (w/v) NaCl-Lösung und 3 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) gestoppt. Die weitere Probenaufbereitung und die Detektion verlief nach verschiedenen Methoden:

Enzymtest nach Reaktion A

Die organische Phase mit [^{14}C]-Cholesterol und [^{14}C]-Cholesterolglucosid wurde in ein Spitzgefäß überführt und im Wasserbad bei 50°C mit Argon abgedampft. Der Rückstand wurde in 50 μl Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen und auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen. Nach einer

dünnschichtchromatographischen Trennung in Chloroform/Methanol 85:15 (v/v) wurde die DC-Platte getrocknet und je nach Signalstärke für 2,5 bis 14 Stunden auf eine Imaging-Platte gelegt. Die Detektion erfolgte mittels eines BAS 1000 Bio-Imaging Analyzer (Fuji/Raytest) und die Auswertung am Computer mit Hilfe der Software PC-BAS (Raytest). Die Quantifizierung der detektierten Banden erfolgte durch Vergleich mit [¹⁴C]-Cholesterol bekannter Aktivität, das nach der chromatographischen Auftrennung auf die DC-Platte aufgetragen wurde.

Enzymtest nach Reaktion B

Die organische Phase mit Cholesterol-[¹⁴C]-glucosid (UDP-[¹⁴C]-Glucose verbleibt in der wässrigen Phase) wurde in ein Szintillationsgefäß überführt, mit Szintillationscocktail (OptiPhase „Hi Safe 3“ von der Firma Wallac, Turku, Finnland) aufgefüllt und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen.

Detektion des nicht radioaktiv markierten Cholesterolglucosids

Die nicht radioaktiv markierte Cholesterolglucosid-Kontrolle wurde nach der chromatographischen Auftrennung durch das Besprühen mit dem Reagenz α -Naphthol-Schwefelsäure und anschließender Erhitzung der DC-Platte auf 110 bis 140 °C sichtbar gemacht.

Lysispuffer

Tris-HCl; pH = 7,5	50 mM
Pefabloc	1 mg
Lysozym	10 mg
DTE	2 mg
<i>Aqua dem.</i>	ad 20 ml

Pefabloc, Lysozym und DTE wurden unmittelbar vor Verwendung zugegeben.

α -Naphthol-Schwefelsäure

8 g α -Naphthol in 250 ml Methanol + 30 ml konz. H₂SO₄ + 20 ml *Aqua dem.* unter Rühren im Eisbad zugegeben.

2.6.6. Lipidanalysen

2.6.6.1. Isolierung von Gesamtlipiden

Die geernteten Zellen einer 300 ml-Kultur wurden in einer 0,45%-igen (w/v) NaCl-Lösung 10 min lang bei 100°C gekocht und bei Raumtemperatur abzentrifugiert (5 min, 4000 × g). Der wässrige Überstand wurde verworfen. Zur Extraktion der Gesamtlipide wurde das Zellsediment mit 15 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) resuspendiert und für 4 bis 6 h bei 8°C in einem Zentrifugenglas bei 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Extrakt erneut abzentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Gefäß überführt. Im zweiten Extraktionsschritt wurden die Zellen mit 10 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) versetzt, über Nacht geschüttelt und anschließend erneut abzentrifugiert. Die Lipidextrakte aus beiden Extraktionsschritten wurden vereinigt, in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und in insgesamt 9 ml einer 2:1:1 (v/v) Mischung aus Chloroform/Methanol/0,45%-NaCl-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden die Lipide ausgeschüttelt. Nachdem sich die organische und die wässrige Phase voneinander getrennt hatten, wurde die untere (organische) Phase über eine Wattesäule (gestopfte Pasteurpipette) in ein sauberes Gefäß überführt. Der erhaltene Lipidextrakt wurde unter Argonstrom bis zur Trockene eingedampft und daraufhin in 100 bis 200 µl Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen. Dieser Lipidextrakt konnte nun mittels Dünnschichtchromatographie analysiert werden.

2.6.6.2. Dünnschichtchromatographie

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lipidgemische dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Merck) mit einer Schichtdicke von 0,25 mm aufgetrennt. Die zu untersuchenden Lipidgemische wurden mit Hilfe einer Mikrospritze (Hamilton) strichförmig auf die Startlinie etwa 2 cm über dem unteren Plattenrand aufgetragen.

Als Fließmittel zur Auftrennung von Glycolipiden wie Sterolglucosid und Glucosylceramid diente Chloroform/Methanol 85:15 (v/v).

Nach der Auftrennung wurden die Lipide durch das Besprühen mit α -Naphthol-Schwefelsäure (3.6.5.) oder mit Anilinnaphthalinsulfonsäure

(0,2% (w/v) in Methanol) sichtbar gemacht. Mit α -Naphthol-Schwefelsäure werden die kohlenhydrathaltigen Verbindungen – wie Glykolipide – angefärbt. Anilinnaphthalinsulfonsäure führt zur Fluoreszenz aller hydrophoben Verbindungen unter UV-Licht bei 366 nm.

2.6.7. GUS-Färbung

Die *in-vivo*-Expressionsanalyse der Sterol-Glucosyltransferase von *A. thaliana* wurde mit dem GUS-Reporter-System durchgeführt. Mit dem Substrat X-Gluc erzeugt das Enzym β -Glucuronidase (GUS) ein blaues Reaktionsprodukt, das sich mikro- und makroskopisch leicht nachweisen lässt.

Zur GUS-Färbung wurden die transgenen *A. thaliana*-Pflanzen komplett in die X-Gluc-Färbelösung getaucht. Nach einer Inkubationszeit von 4 bis 8 h bei 37°C wurde die Färbung fixiert. Hierzu wurde die Färbelösung entfernt und die gefärbten Pflanzen in einer Ethanol/Eisessig-Lösung 3:1 (v/v) bei 65°C inkubiert, bis ihre grüne Chlorophyll-Farbe vollständig verschwand. Die so behandelten GUS-gefärbten Pflanzen konnten bei 4°C in 70%-igem (v/v) Ethanol über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

X-Gluc-Färbelösung

Na-Phosphat-Puffer, pH=7,0	50 mM
K-Ferrocyanid	0,5 mM
K-Ferricyanid	0,5 mM
Na-EDTA	10 mM
Triton X-100	0,1 %
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Die Lösung wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Färbung erfolgte die Zugabe von 100 mg X-Gluc in 1 ml DMF auf 200 ml Färbelösung.

2.6.8. Das grün-fluoreszierende Protein und seine Abkömmlinge

Da in dieser Arbeit viele Versuche mit Hilfe der GFP-Technik durchgeführt wurden, werden ihre Grundlagen in diesem Abschnitt kurz erläutert.

Die Anwendung von Fluoreszenzproteinen in der experimentellen Biologie ist relativ neu. Vor etwa zehn Jahren entdeckten Chalfie und Mitarbeiter, daß das grün-fluoreszierende Protein (GFP) bei der rekombinanten Expression in eukaryotischen wie auch bakteriellen Zellen (*Caenorhabditis elegans* bzw. *Escherichia coli*) intensive, direkt sichtbare Fluoreszenz zeigt und dazu, außer dem molekularen Sauerstoff, keine exogenen Substrate oder Kofaktoren benötigt [179, 180]. Damit war demonstriert, daß sich das GFP als biologische Sonde zum Studium der Genexpression sowie der Proteinlokalisierung in lebenden Zellen verwenden läßt. Bereits im Jahre 1995 wurden in einem Übersichtsartikel 36 experimentelle Anwendungen von GFP aufgezählt [181].

Das GFP kommt ursprünglich in der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* vor. Diesem Meeresorganismus ermöglicht das GFP Biolumineszenz mit hoher Energieausbeute, indem es Anregungsenergie aus der weniger effizienten, Ca^{2+} -aktivierten Chemilumineszenz-Reaktion des Photoproteins Aequorin strahlungsfrei absorbiert und mit hoher Quantenausbeute abstrahlt [182, 183]. Die Fluoreszenz des GFP ist äußerst tolerant gegenüber Hitze (bis 65°C), Einwirkung von Alkalien (pH 11) und Detergentien (1% SDS), Guanidiniumchlorid (6 M) sowie vielen Proteasen [179, 184]. Zudem zeigt das GFP bei der Fluoreszenzmikroskopie nur einen geringen Photobleicheffekt.

Die Polypeptidkette des GFP zählt 238 Aminosäuren, wobei sich das eigentliche Fluorophor aus der Tripeptidsequenz **Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷** im geometrischen Zentrum des Moleküls befindet (Abb. 2.2.). Die Lichtemission dieser Gruppe ist mit einer Quantenausbeute von 0,72 bis 0,85 der des bekannten Fluoreszenzreagenz Fluorescein nur knapp unterlegen [185].

Das native GFP hat zwei Absorptionsmaxima bei 396 nm und 475 nm [186]. Die Anregung bei diesen Wellenlängen führt in beiden Fällen zur Emission bei 508 nm, was eine Ausstrahlung im grünen Bereich des sichtbaren Spektrums bedeutet.

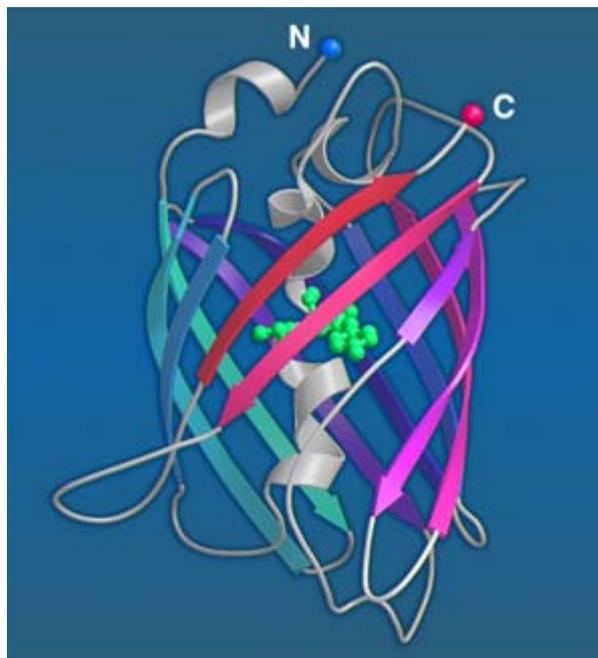


Abb. 2.2: Räumliche Struktur des GFP. Das zylindrische, elfsträngige β -Barrel wird von einer zentralen α -Helix durchzogen. Der Fluorophor (grün gefärbt) befindet sich im geometrischen Zentrum des Moleküls. Diese Struktur wird auch als „ β -Can“ bezeichnet [187]. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Boris Steipe, Departments of Biochemistry & Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Canada

Um die Eigenschaften des GFP noch besser den experimentellen Erfordernissen anzupassen, wurde es nach seiner Entdeckung bald zum Gegenstand von Protein-Engineering. Das in dieser Arbeit verwendete EGFP (*Enhanced GFP*) von Clontech besitzt dank gezielter Mutagenese im Bereich der chromophoren Gruppe stark verbesserte experimentelle Eigenschaften gegenüber der nativen GFP-Form. So bewirkte die Substitution von **Phe⁶⁴** durch **Leu** und von **Ser⁶⁵** durch **Thr** wesentlich stärkere Fluoreszenz, schnellere Bildung des aktiven Fluorophors nach Induktion der Expression sowie deutlich verlangsamtes Ausbleichen [188, 189]. Durch diese Mutationen verschiebt sich das Anregungsmaximum von EGFP nach 490 nm [188].

In einer anderen GFP-Mutante, die in dieser Arbeit zum Einsatz kam – dem EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescence Protein*, Clontech) – sind im Vergleich zum Wildtyp-GFP folgende Aminosäuren ausgetauscht: **Ser⁶⁵** \Rightarrow **Gly**; **Ser⁷²** \Rightarrow **Ala**; **Thr²⁰³** \Rightarrow **Tyr**. Diese Mutationen bewirken eine Verschiebung des Emissionsmaximums von 508 nm (grün) nach 527 nm (gelb-grün) und des Anregungsmaximums nach 513 nm [190].

Außerdem wurde aus den DNA-Sequenzen der beiden gentechnisch-veränderten GFP-Varianten, EGFP und EYFP, das sogenannte kryptische Intron entfernt. Bei der Transkription des nativen GFP werden die Nucleotide 400-483 von vielen Pflanzen, wie z.B. *Arabidopsis thaliana*, als Intron erkannt und herausgespleißt. Dies führt zur Translation in ein nichtfunktionales Protein, das keine Fluoreszenz zu entfalten vermag. Haseloff *et al.* modifizierten die DNA-Sequenz vom Wildtyp-GFP durch Codon-Veränderung, so daß die genannte Stelle von den Pflanzen nicht mehr als Intron gedeutet wird [191]. Die Aminosäure-Sequenz des translatierten Proteins bleibt hingegen unverändert – die transformierten Pflanzen zeigen nun die GFP-Fluoreszenz.

Das andere in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzprotein ist das DsRed von Clontech. Dabei handelt es sich nicht um eine weitere GFP-Variante, sondern um ein natives Protein aus der Koralle *Discosoma* sp. Dieses Fluoreszenzprotein hat ein Anregungsmaximum von 558 nm und ein Emissionsmaximum von 583 nm [190], wodurch es bei Bestrahlung mit grünem Licht eine rote Fluoreszenz entfaltet.

2.7. Transformation von Pflanzen

Zur pflanzlichen Expression der Zielproteine mußten die Pflanzen mit entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert werden. In dieser Arbeit wurden sowohl transiente Transformationen von epidermalen Zwiebelzellen als auch stabile Transformationen von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Die Methoden werden im Folgenden näher beschrieben.

2.7.1. Transiente Transformation pflanzlicher Gewebe

Zur transienten Transformation von DNA in Pflanzenmaterial wurde die Methode der biolistischen Transformation verwendet, die auch *particle bombardment* bezeichnet wird. Es handelt sich um eine physikalische Transformationsmethode, wobei die Plasmid-DNA, gebunden an mikroskopischkleine Goldpartikel, in einer speziellen Apparatur beschleunigt und in das Pflanzenmaterial eingeschossen wird (biolistisch = biologisch + ballistisch). In einem günstigen Fall durchdringen die Goldpartikel die Zellwände und das Protoplasma ohne die Zelle zu zerstören; die auf diese Weise ins Zellinnere eingeschleuste Plasmid-DNA wird repliziert.

Die biolistische Technik wird bereits seit Jahren erfolgreich zur Transformation von verschiedenen pflanzlichen und tierischen Geweben angewendet. Mit Hilfe dieser Technik wurde auch eine Reihe von Bakterien und Pilzen transformiert.

Die Transformationseffizienz dieser Methode hängt von mehreren physikalischen Parametern ab [192]. Durch eine Optimierung der wichtigsten Parameter, wie Einschußgeschwindigkeit, Goldpartikelgröße, Partikeldichte und Distanz zwischen Transformationsobjekt und Partikelkanone, kann eine akzeptable Transformationsrate erreicht werden.

2.7.1.1. Beschichtung von Goldpartikeln mit DNA

Zur transienten Transformation von epidermalen Zwiebelzellen wurde die Plasmid-DNA an die Goldpartikel nach einer modifizierten Methode von Unseld *et al.* gebunden [193]. Hierzu wurden 50 mg Goldpartikel (0,6 µm Goldpowder, Biorad, München) drei mal mit 1 ml Ethanol und einmal mit 1 ml *Aqua dem.* gewaschen. Der Ansatz wurde jeweils ca. 1 min auf einem Vibromischer gemischt, 10 s bei 10000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge pico, Heraeus Instruments) und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Goldpartikel erneut in 1 ml *Aqua dem.* gründlich resuspendiert und zusätzlich 1 min im Ultraschallbad vereinzelt. Schließlich wurde die Suspension á 50 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für jede Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der Goldsuspension aufgetaut und unter Eis-Kühlung mit 2,5 – 7 µg Plasmid-DNA, 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin-Lsg. versetzt. Der Ansatz wurde ca. 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert, der Niederschlag mit 250 µl Ethanol gewaschen und schließlich in 80 bis 150 µl Ethanol aufgenommen. 5 bis 10 µl dieses Fällungsansatzes wurden für den Beschuß des pflanzlichen Probenmaterials eingesetzt.

2.7.1.2. Transformation von epidermalen Zwiebelzellen

Das *particle bombardment* erfolgte mit einer Partikelkanone „Biolistik® Particle Delivery System“ PDS-1000/HE der Firma Biorad (München), in der Helium als Treibgas zum Beschuß verwendet wird. Die Zwiebeln von *Allium fistulosum* (Frühlingszwiebeln) wurden der Länge nach halbiert, die Wurzel- und Sproßansätze sowie die innersten Schalen entfernt. 5 bis 10 µl des gründlich resuspendierten Fällungsansatzes wurden auf einen Makrocarrier aufgebracht. Dieser wurde in eine Halterung eingelegt und in der zweiten Schiene der Kanone positioniert. Der Beschuß erfolgte unter den in unserem Institut für Zwiebel-Transformationen als optimal ermittelten Bedingungen [194]:

Gasdruck (Helium)	1100 psi
Kammer-Unterdruck	28 inch Hg
Plazierung des Pflanzenmaterials	Schiene 5

Die Zwiebelstückchen wurden von der konkaven Seite beschossen, anschließend in eine Petrischale mit der Schnittfläche auf befeuchtetes Saugpapier gelegt und für eine Dauer von 6 – 40 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

2.7.2. Analyse transformierter Zellen mittels Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie

Die Epidermisschicht wurde von den transformierten Zwiebelstückchen vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen, in einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckgläschen möglichst blasenfrei zugedeckt. Mikroskopische Untersuchungen wurden gemäß entsprechender Betriebsanleitung an folgenden Geräten durchgeführt:

- Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 35 M, Carl Zeiss)
Es wurde der Filtersatz Nr. 09 verwendet (Anregung bei 450 – 490 nm, Emission bei 520 nm). Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony XLO03) unter Anwendung des IMAGE-PRO-PLUS-3.0-Programms (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) aufgenommen, als TIF-Dateien gespeichert und nachträglich mit dem Adobe-Photoshop-4.0-Programm (Adobe Systems Inc., USA) bearbeitet.
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (TCS SP2, Leica)
Als Energiequelle diente ein Krypton-Argon Laser (Anregung bei 488 nm). Die GFP-Fluoreszenz wurde zwischen 495 – 520 nm aufgenommen. Die Bilder wurden als TIF-Dateien gespeichert und nachträglich mit dem Adobe-Photoshop-4.0-Programm (Adobe Systems Inc., USA) bearbeitet.

2.7.3. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalle) erfolgte durch die Infektion dieser Pflanze mit dem pflanzenpathogenen Bakterium *Agrobacterium tumefaciens*. Hierzu mußten diese Bakterien

zunächst mit einem Vektor transformiert werden, der das für die pflanzliche Expression bestimmte Gen enthält.

2.7.3.1. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Herstellung elektrokompenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde eine 500 ml Kultur des Stammes ATHV C58C1[★] [150] wie im Abschnitt 2.4.3. beschrieben bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 angezogen. Nach einer 15-minütigen Inkubation in Eis wurde die Zellsuspension geerntet (4000 × g, 15 min, 4°C), das Sediment in 400 ml sterilem *Aqua dem.* resuspendiert und wiederum 15 min in Eis inkubiert. Nach einer einmaligen Wiederholung dieses Waschschrilles wurde das Sediment in 0,75 ml steriler, 10%-iger Glycerol-Lösung aufgenommen und in Aliquots von 40 µl im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die so hergestellten elektrokompenten Zellen konnten über einen längeren Zeitraum bei -70 °C gelagert werden.

Zur Transformation wurde ein Aliquot der Zellsuspension in Eis aufgetaut, mit ca. 100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt (in 5 µl *Aqua dem.*, salzfrei) und in eine Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, BioRad) überführt. Die Küvette wurde in den Elektroporator eingesetzt, und die Zellen wurden durch einen Spannungsimpuls von 1500 V für 4,0 ms transformiert. Nach erfolgter Elektroporation wurde der Transformationsansatz unter Eiskühlung in ein steriles Reagenzglas überführt und mit 2 ml YEB-Medium versetzt. Nach zweistündiger Inkubation der transformierten Agrobakterien bei 28°C unter Schütteln wurden diese auf YEB-Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion wurde dem Nährmedium Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Agrobakterien wuchsen in ca. 2 Tagen bei 28°C zu Kolonien heran. Die *Screening* der potentiell transgenen *A. tumefaciens*-Kolonien erfolgte mittels Kolonie-PCR (2.5.4.1.).

★ dieser *A. tumefaciens*-Stamm wurde freundlicherweise von Dr. J. Dettendorfer, KWS, Einbeck zur Verfügung gestellt

2.7.3.2. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Virulente Stämme der gram-negativen Bakterien *A. tumefaciens* verursachen in der Natur ein tumorähnliches Wachstum bei Pflanzen, das als Wurzelhals-Gallen-Krankheit bezeichnet wird [166]. Die molekularen Auslöser für diese Krankheit sind bakterieneigene, tumorinduzierende Plasmide (Ti-Plasmide), die genetisches Material auf der sogenannten T-DNA (Transfer-DNA) in die Pflanze zu übertragen vermögen. Diese T-DNA wird ins pflanzliche Genom integriert, aktiv transkribiert und die mRNA in pflanzenfremde Proteine translatiert. In den für die experimentelle Pflanzentransformation geeigneten *A. tumefaciens*-Stämmen, wie ATHV C58C1, sind die Ti-Plasmide jedoch „entwaffnet“. Ihre T-DNA besitzt keine Pathogenitäts-Gene, an deren Stelle nun beliebige Fremd-DNA ins pflanzliche Genom integriert werden kann.

Die agrobakterieninduzierte Transformation von *A. thaliana* wurde nach einer veränderten „*Floral dip*“-Methode [195] durchgeführt. Hierbei wurden die Infloreszenzen der Pflanze in eine Lösung getaucht, die neben transgenen *A. tumefaciens*-Zellen Sucrose und das Benetzungsmittel „Silwet L-77“ enthielt (Infiltrationsmedium). Die mit dem interessierenden Plasmid transformierten *A. tumefaciens*-Zellen wurden in 25 ml YEB-Medium mit Kanamycin (50µg/ ml Endkonzentration) bei 28°C über Nacht kultiviert. Nach der Sedimentation (5 min bei 2500 rpm, GS-15R Zentrifuge, Beckman) wurden die Bakterien in 2 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Für die Transformation wurden ca. 4 Wochen alte Pflanzen verwendet. Um die Ausbildung mehrerer sekundärer Sprosse und damit eine höhere Samenausbeute zu erhalten, wurden ihre primäre Sprosse mit einem Skalpell entfernt. Direkt anschließend wurde in jede Pflanzenrosette mit Hilfe eines Pinsels das Infiltrationsmedium mit transgenen *A. tumefaciens*-Zellen durch grobes Betupfen aufgetragen. Nach etwa einer Woche wurde diese Prozedur wiederholt, ohne jedoch die Sprosse zu entfernen; hierbei wurden vor allem die Blütenstände betupft. Nach jedem Betupfen wurden die Pflanzen für 2 – 3 Tage mit einer Haube bedeckt, um die lokale Luftfeuchtigkeit zu erhöhen. Die transformierten Pflanzen wurden bis zur Samenreife in der Klimakammer bei 23°C Tagestemperatur und einer Belichtungszeit von acht Stunden (Kurztag) kultiviert. Die Temperatur der Dunkelperiode betrug 18°C.

Infiltrationsmedium

Sucrose	5% (w/v)
Silwet L-77 (OSi Specialties Inc., Danbury, USA)	0,05% (v/v)
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

2.7.3.3. Selektionierung potentiell transgener Samen

Nachdem die transformierten Pflanzen Schoten ausgebildet hatten und diese vollständig ausgereift waren, wurden die Samen geerntet. Zur Selektion wurden die Samen sterilisiert und auf MS-Agar-Platten verteilt. Dem Nährmedium in den Agarplatten waren 25 µg/ml Hygromycin zugesetzt. Nur aus transgenen Samen, die ein rekombinantes Hygromycin-Resistenzgen in ihrem Genom enthielten, konnten sich gesunde Pflanzen entwickeln.

Zur Sterilisation wurden ca. 30 - 40 mg Samen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zunächst wurden die Samen für 1 min mit 98% Ethanol, danach für 7 min in einer Lösung aus 6% Hypochlorit und 0,4% Triton X 100 inkubiert. Diese Lösung wurde durch fünf- bis siebenmaliges Waschen mit sterilem *Aqua dem.* entfernt. Nach der Sterilisierung wurden die Samen auf sterilem Filterpapier (Whatmann, 3MM) getrocknet und anschließend mit Hilfe eines Spatels auf die MS-Agarplatten überführt. Die Petrischalen wurden mit einem luftdurchlässigen Klebeband (Micropore, 3M) verschlossen und in der Klimakammer bei 23°C Tagestemperatur und einer Belichtungszeit von acht Stunden (Kurztage) inkubiert. Die Temperatur der Dunkelperiode betrug 18°C. Die Lichtstärke betrug 55 µE x m⁻² x s⁻¹ (Weißlicht, Philips TL, 65W/25).

MS-Agar

MS (Murashige und Skoog)	
Gamborg B5-Vitamine	4,4 g/L
MES-Puffer pH 5,8	0,5 g/L
Plant-Agar	0,8%
<i>Aqua dem.</i>	q.s.

Die Hygromycin-resistenten transgenen Pflanzen bildeten nach etwa 2 bis 3 Wochen lange Wurzeln sowie grüne Primärblätter aus. Die nichtresistenten Pflanzen bildeten zwar Kotyledonen aus, waren aber nicht in der Lage längere Wurzeln und Primärblätter auszubilden. Transgene Pflanzen wurden sehr vorsichtig ohne Verletzung ihrer Wurzeln, aus dem Nähragar herausgeschnitten, in feuchte Erde übertragen und mit einer Plastikfolie zugedeckt. Die weitere Kultivierung erfolgte in der Klimakammer unter den bereits oben beschriebenen Bedingungen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist die intrazelluläre Lokalisierung der Glucosylceramid-Synthase (GCS) und der Sterol-Glucosyltransferase (SGT). Wie bereits im Abschnitt 1.5. erwähnt wurde, können zur Lokalisierung der genannten Enzyme mehrere Strategien verwendet werden.

Die eine Möglichkeit ist der indirekte Nachweis durch eine immunochemische Farbreaktion. Um die hierzu notwendigen Antiseren herzustellen, müssen die interessierenden Glucosyltransferasen zuerst in einem geeigneten System überexprimiert und bis zu einem hohen Reinheitsgrad aufgereinigt werden.

Zum anderen können die Glucosyltransferasen als Fusionsproteine mit einem leicht nachweisbaren Reporter-Protein als Fusionspartner exprimiert werden. Anschließend können sie beispielsweise als grün- oder gelb-fluoreszierende Fusionsproteine mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Techniken direkt in der Zelle des transgenen Organismus nachgewiesen werden.

Die intrazelluläre Lokalisierung der genannten Enzyme sollte zunächst unter Verfolgung der „immunologischen“ Strategie exemplarisch an der Hefe *Pichia pastoris* untersucht werden. *P. pastoris* besitzt sowohl GlcCer als auch SG, und die entsprechenden Glucosyltransferasen aus diesem Organismus wurden bereits in unserem Laboratorium kloniert [8, 196]. Weiterhin ist *P. pastoris* eine gut untersuchte Hefe, die problemlos auf Standardmedien kultiviert werden kann. Diese Vorteile machen *P. pastoris* zu einem geeigneten Modellorganismus.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst versucht ein immunochemisches Detektionssystem für die GCS und die SGT aus *P. pastoris* zu entwickeln.

3.1. Entwicklung eines immunochemischen Detektionssystems für die GCS und die SGT aus *Pichia pastoris*

3.1.1. Klonierung in pBAD-TOPO-Vektoren und Expression in *E. coli*-TOP-10-Zellen

Die Gene für Glucosylceramid-Synthase und Sterol-Glucosyltransferase von *P. pastoris* wurden zunächst in pBAD-TOPO-Vektoren kloniert.

Als Template für SGT diente der genomische Klon aus *P. pastoris* pUC19SGT [23]. Als Template für GCS diente der genomische Klon pYM873 [71]. Die offenen Leserahmen der beiden Gene wurden mittels PCR mit Vent-Polymerase amplifiziert [Primer[★]: OK10, OK11, OK20, OK13] (2.5.4.). Die PCR-Produkte wurden mit Taq-Polymerase adenyliert und elektrophoretisch in einem Agarosegel gereinigt (2.6.2.1.).

Außer den für die GCS und die SGT kodierenden Sequenzen von *P. pastoris* wurden noch die ORFs von Glucosyltransferasen aus einigen anderen Organismen amplifiziert. Dies waren die Sequenzen von Sterolglucosyltransferasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* sowie der Glucosylceramid-Synthase aus *Candida albicans*. Die Klonierung der Amplifikate in pBAD-TOPO-Vektoren führte zu den Expressionsplasmiden pBPSG11 mit dem ORF für SGT von *P. pastoris* und pBPCG61 mit dem ORF für GCS von *P. pastoris*. Außerdem enthielten pBSSG31 den ORF für SGT von *S. cerevisiae*, pBASG51 den ORF für SGT von *A. thaliana* und pBCCG71 den ORF für GCS von *C. albicans*.

Die Transformation der *E. coli*-TOP-10-Zellen mit den Expressionsplasmiden erfolgte nach 2.5.1.2.

Zur Expression der offenen Leserahmen wurden die transgenen *E. coli*-Zellen nach 2.4.1. kultiviert. Bei $OD_{600} \approx 0,5$ wurde die Expression durch Zugabe von L(+)-Arabinose induziert. Nach 4 h Inkubation bei 30°C wurden die Zellen absedimentiert. Der Kontrolle dienten die TOP-10-Zellen, die mit dem pBAD-TOPO-Leervektor transformiert waren. In der Hoffnung auf eine

★ eine Tabelle mit allen in dieser Arbeit verwendeten Primern befindet sich im Anhang. Die spezifischen Primer für die PCR wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Sigma-Genosys (The Woodlands, USA) hergestellt.

Verbesserung der Expression wurden in einem zusätzlichen Experiment die Expressionsbedingungen geändert. Die Inkubation wurde bei 8°C über 48 Stunden durchgeführt.

3.1.1.1. Rekombinante Expressionsprodukte zeigten *in vitro* Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität

Zur Überprüfung der Expressionsprodukte von Plasmiden mit Sterol-glucosyltransferasen aus *A. thaliana*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* auf UDP-Glucose:Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität wurden die entsprechenden zellfreien *E. coli*-Homogenate einem *in-vitro*-Enzymtest unterzogen. Dabei wurden radioaktiv markiertes Cholesterol und nicht markierte UDP-Glucose eingesetzt (2.6.5.). Die lipophilen Reaktionsprodukte wurden dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt (2.6.6.2.) und mittels eines BAS 1000 Bio-Imaging Analyzer detektiert (siehe Abbildung 3.1.). Ein nicht radioaktiv markierter Cholesterolglucosid-Standard (nicht in der Abbildung 3.1. zu sehen) wurde nach der chromatographischen Auftrennung durch Besprühen mit α -Naphthol-Schwefelsäure sichtbar gemacht.

Die R_f -Werte der in der Abbildung 3.1. mit „SG“ markierten radioaktiven Reaktionsprodukte stimmten mit dem R_f -Wert der Cholesterolglucosid-Kontrolle überein. Die Expressionsprodukte aller eingesetzten Plasmide (außer Kontrollplasmide) zeigten also eine UDP-Glucose:Sterolglucosyltransferase-Aktivität. Daher konnte davon ausgegangen werden, daß die Klonierung der ORFs aus allen drei Spezies erfolgreich durchgeführt und die Enzyme in pBAD-TOPO funktional exprimiert wurden.

Mit Hilfe der PC-BAS-Software von Raytest wurde die Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm ausgewertet. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurden nach der chromatographischen Auftrennung am Start und an der Laufmittelfront Eichpunkte mit [¹⁴C]-Cholesterol aufgetragen (jeweils 9000 dpm). Die Expression bei 8°C über 48 Stunden führte bei den *S. cerevisiae*-Proben zu einer stärkeren SGT-Aktivität gegenüber einer Expression bei 30°C über 4 Stunden (245000 dpm gegenüber 9300 dpm). Bei den *A. thaliana*-Proben war der Unterschied hingegen nicht signifikant (entsprechend 97000 dpm und 90000 dpm). Bei den Proben von *P. pastoris* schließlich konnte bei der 4-Stunden-Expression

kein Reaktionsprodukt detektiert werden; bei der 48-Stunden-Expression wurde hingegen ein deutliches Signal (10000 dpm) gemessen.

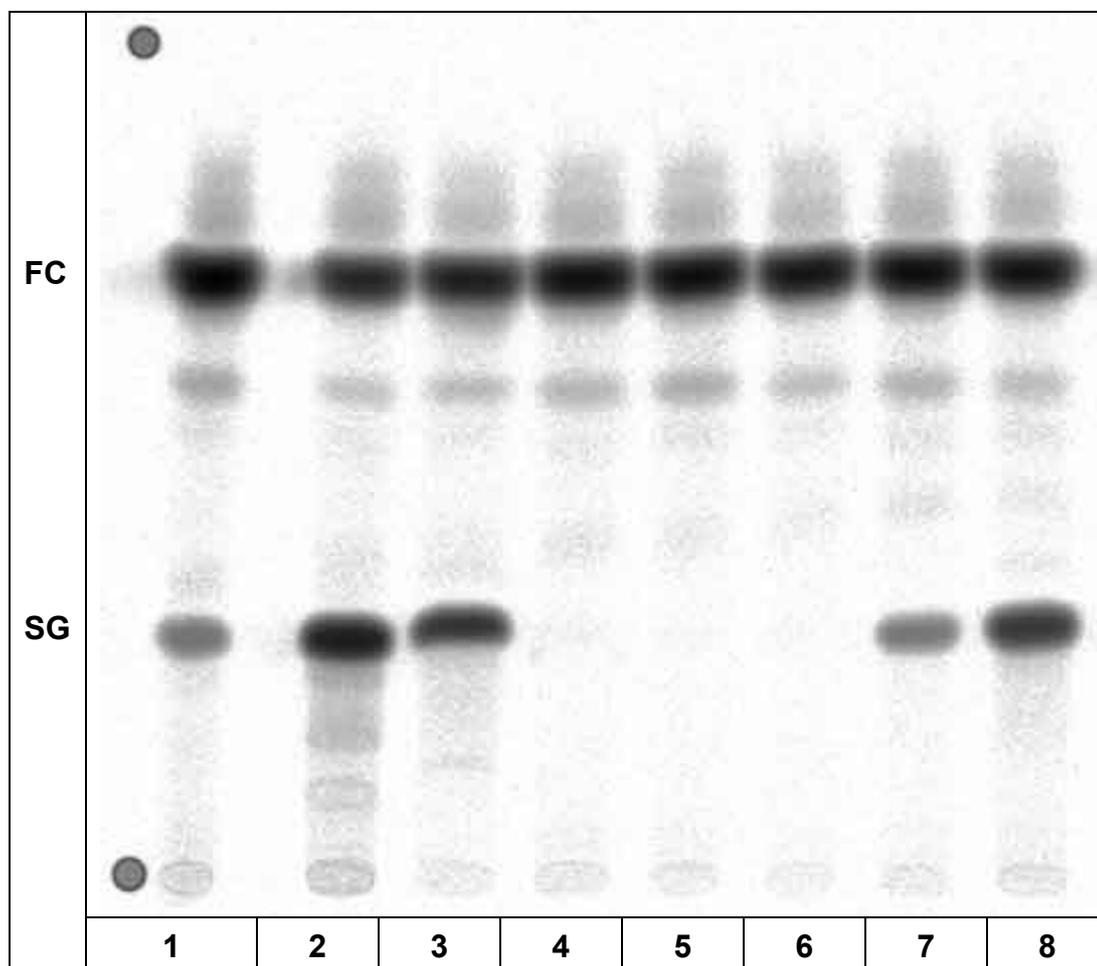


Abb. 3.1: Radioautogramm einer DC der Enzymtest-Produkte. Die rekombinanten Expressionsprodukte aus zellfreien *E. coli*-Homogenaten zeigen *in vitro* eine UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität. **FC:** freies Cholesterol; **SG:** Sterolglucosid.

- Spur 1: *P. pastoris*-SGT (pBPSG11), Expression 48 h bei 8°C
- Spur 2: *S. cerevisiae*-SGT (pBSSG31), Expression 48 h bei 8°C
- Spur 3: *A. thaliana*-SGT (pBASG51), Expression 48 h bei 8°C
- Spur 4: Leervektor-Kontrolle, Expression 48 h bei 8°C
- Spur 5: Leervektor-Kontrolle, Expression 4 h bei 30°C
- Spur 6: *P. pastoris*-SGT (pBPSG11), Expression 4 h bei 30°C
- Spur 7: *S. cerevisiae*-SGT (pBSSG31), Expression 4 h bei 30°C
- Spur 8: *A. thaliana*-SGT (pBASG51), Expression 4 h bei 30°C

Die Auftrennung der lipophilen Reaktionsprodukte erfolgte in $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 85:15 (v/v). Die Radioaktivitätsverteilung auf dem Dünnschichtchromatogramm wurde mit Hilfe der Software PC-BAS von Raytest dargestellt.

An dieser Stelle konnten keine Enzymtests auf Aktivität der Glucosylceramid-Synthase durchgeführt werden. Die verlässlichen *in-vitro*-

Enzymtests existierten zum Zeitpunkt der Versuche lediglich für die GCS aus Säugern [67, 197, 198].

3.1.1.2. Versuch einer affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinanten Expressionsprodukten der *E. coli*-TOP-10-Zellen

Bei der Überprüfung der Zellysate aus TOP-10-Expressionskulturen mittels SDS-PAGE (2.6.2.3.) war bei keiner der Proben im Vergleich zu den mitgeführten Leervektor-Kontrollen eine neue Proteinbande im erwarteten Größenbereich zu sehen (ohne Abbildung). Daher wurde ein Versuch unternommen, die interessierenden Proteine mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC; 2.6.1.4.) aufzureinigen.

Der pBAD-TOPO-Vektor besitzt eine C-terminale His-tag-Sequenz (codierend für 6 Histidine). Somit wurden alle rekombinanten Proteine als His-tag-Fusionsproteine exprimiert, was eine einfache Reinigung über eine Metall-Chelat-Säule erlauben sollte.

Die IMAC wurde sowohl unter nativen (2.6.1.5.) als auch unter denaturierenden Bedingungen mit Ni-NTA-Minisäulen (Qiagen) durchgeführt.

Zur Reinigung unter denaturierenden Bedingungen wurden die Zellen aus einer 100-ml-Expressionskultur in 2 ml Lysispuffer A resuspendiert, durch die Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen und zwecks Zerstörung der störenden DNA 15 – 30 min bei 30°C mit der Dnase I (Sigma-Aldrich) inkubiert. Anschließend wurde das Zellysat mit Guanidiniumchlorid versetzt (Endkonzentration 6 M). Die Proteine wurden bei dieser extrem hohen Salzkonzentration denaturiert und eventuell vorhandene *Inclusion Bodies* aufgelöst. Anschließend sollten die Zelltrümmer abzentrifugiert werden, um den Überstand auf einer Ni-NTA-Minisäule zu reinigen. Durch den Zusatz von großen Mengen Guanidiniumchlorid wurde das Zellysat jedoch so zähflüssig, daß das Abzentrifugieren von Zelltrümmern nahezu unmöglich war. Die Poren von Qiagen-Minisäulen wurden beim Durchgang des zähflüssigen Zellysats schnell verstopft, so daß es unmöglich war, bei der für die Minisäulen gerade noch zulässigen Zentrifugationsgeschwindigkeit (2000 rpm; Tischzentrifuge Biofuge pico, Heraeus Instruments) das gesamte Zellysat durch die Säulen hindurch zu pressen. Durch dieses Problem wurde

die Reinigungsprozedur erheblich gestört. Deswegen wurde die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen bei den nachfolgenden Versuchen nach dem Batch-Verfahren (2.6.1.6.) durchgeführt.

Anschließend an diese Reinigungsprozeduren wurde versucht die rekombinanten SGT von *A. thaliana*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sowie die GCS von *P. pastoris* und *C. albicans* nach einer SDS-PAGE durch eine Coomassie-Färbung zu visualisieren, bzw. nach einem Western-Blot durch eine Immunofärbung nachzuweisen.

Die Analyse der Reinigungsfractionen (Durchgang, Wasch-Fractionen und Eluat) mittels SDS-PAGE ergab keine positiven Ergebnisse. Auch nach mehrfacher Aufkonzentrierung der Proteine der Eluat-Fractionen konnte im Polyacrylamidgel bei keiner der Proben eine Bande im erwarteten Größenbereich festgestellt werden (ohne Abbildung).

Zur Immunofärbung der auf Nitrocellulose-Membran geblotteten Proteine diverser Reinigungsfractionen (2.6.3.; 2.6.4.4.) wurden Maus-Anti-His-tag-IgG₁ (Dianova) als Erstantikörper in der Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Zweitantikörper fungierte Ziegen-Antimaus-IgG-HRP-Konjugat (Dianova) in der Verdünnung von 1:4000. Auch nach mehrmaliger Wiederholung der Versuche konnte bei keiner der Proben ein His-tag-Protein detektiert werden (ohne Abbildung). Die Immunofärbungen der mitgeführten His-tag-Kontrollproteine (Dianova) waren dagegen stets positiv.

Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die Expression der untersuchten Glucosyltransferasegene im pBAD-TOPO-System offensichtlich nicht ausreichend hoch war. Die pBAD-TOPO-Vektoren stellen ein einfaches und zeitsparendes Klonierungssystem dar. Die Expression des ORF für das Zielprotein wird jedoch von einem relativ schwachen *araBAD*-Promotor gesteuert, der schwächer als z.B. ein *tac*-Promotor ist [162]. Außerdem kann die Induktion mit L-Arabinose zu sehr heterogenen Ergebnissen führen [199].

Dies alles sprach dafür, die Zielproteine unter Kontrolle eines stärkeren Promotors zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurde das pET-System (2.5.4.3.) mit einem starken T7-Promotor gewählt.

3.1.2. Expression der rekombinanten GCS- und SGT-Gene mit dem pET-System führte nicht zum Erfolg

Die Primer, mit denen die Glucosyltransferasen-ORFs in den vorhergegangenen Versuchen amplifiziert wurden (3.1.1.), enthielten bereits spezifische Endonuclease-Erkennungssequenzen, um die Übertragung der Amplifikate aus pBAD-TOPO in andere Vektoren zu ermöglichen (siehe Anhang). So enthielten pBPSG11 (SGT von *P. pastoris*) *SacI*-Schnittstellen und pBPCG61 (GCS von *P. pastoris*) *XhoI*-Schnittstellen vor dem ersten ATG und nach der STOP-Sequenz. Diese Plasmide sowie pET24c- und pET19b-Vektoren wurden nun mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt (2.5.3.1.). Anschließend wurden die linearisierten Vektoren mit entsprechenden Inserts ligiert (2.5.3.4.). Die kompetenten *E. coli*-XL1-Blue-Zellen wurden mit Ligationsansätzen transformiert (2.5.1.2.) und auf LB-Selektivmedien kultiviert. Die positiven Kolonien enthielten die Expressionsplasmide pEPSG11 mit der SGT-Sequenz und pEPCG61 mit der GCS-Sequenz von *P. pastoris*.

Der für die Expression geeignete *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurde nun mit pEPSG11 und pEPCG61 transformiert. Die Expression der offenen Leserahmen über 4 Stunden bei 30°C wurde durch Zugabe von IPTG induziert (Endkonzentration 0,8 mM). Als Negativkontrolle dienten die BL21(DE3)-Zellen, die mit pET19b- bzw. pET24c-Leervektoren transformiert waren.

Nach der gleichen Vorgehensweise wurden auch die *E. coli*-Zellen des Stammes c41(DE3)[★] mit pEPSG11 und pEPCG61 transformiert und zur Expression gebracht. Dieser Bakterienstamm wurde durch gezielte Selektion isoliert und stellt ein durch spontane Mutation entstandenes BL21(DE3)-Derivat dar [151]. Miroux und Walker machten bei der Expression verschiedener *E. coli*-toxischer Membranproteine im pET-System eine Beobachtung, daß die wenigen von BL21(DE3) abgeleiteten Bakterienkolonien, die die Expression überlebten, über mehrere Generationen einen stabilen Phänotyp hatten und die Fähigkeit zur Überexpression einiger

★ Der C41(DE3)-Stamm wurde aufgrund eines Material-Transfer-Vertrages von der Firma Avidis (Clermont-Limagne, France) zur Verfügung gestellt

Membranproteine besaßen. Im Vergleich zu BL21(DE3) ist C41(DE3) in der Lage, die 4- bis 10-fache Menge von einigen Membranproteinen zu produzieren [151]. Diese positiven Eigenschaften des C41(DE3)-Stammes wurden nun in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt.

Die Gesamtproteinmuster der BL21(DE3)- und C41(DE3)-Expressionskulturen wurden elektrophoretisch untersucht. Da dabei bei keiner der Proben im Vergleich zu den mitgeführten Negativkontrollen eine neue Proteinbande im erwarteten Größenbereich zu sehen war, wurde der Versuch unternommen, die Enzyme, die nach der Expression im pET-System als His-tag-Proteine vorliegen sollten, mittels IMAC aufzureinigen. Die IMAC wurde sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen mit Ni-NTA-Minisäulen nach dem im Abschnitt 3.1.1.2. beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Analyse der Reinigungsfractionen mittels SDS-PAGE und die Detektion mit Ni-NTA-HRP-Konjugat (2.6.4.5.) ergaben jedoch keine positiven Ergebnisse. Auch nach mehrfacher Aufkonzentrierung der Proteine der Eluat-Fractionen durch die TCA-Fällung konnte im Polyacrylamidgel bei keiner der Proben eine Bande im erwarteten Größenbereich festgestellt werden (ohne Abbildung). Die Versuche, die auf NC-Membranen geblotteten Proteine mit Ni-NTA-HRP-Konjugat zu detektieren, ergaben ebenfalls keine Hinweise auf Expressionsprodukte mit einem His-tag (ohne Abbildung). Die Färbungen der mitgeführten His-tag-Kontrollproteine waren hingegen stets positiv.

3.1.3. Expression der Teilsequenzen aus GCS und SGT in *E. coli*

Wie die bisher durchgeführten Versuche zeigten, ist die Expression der untersuchten Glucosyltransferasen sowohl im pBAD-TOPO- als auch im pET-Expressionssystem offensichtlich sehr niedrig. Zwar konnte mit dem sehr empfindlichen radioaktiven Enzymtest die *in-vitro*-Aktivität der rekombinanten Sterol-Glucosyltransferasen aus verschiedenen Spezies gemessen werden (3.1.1.1.); für eine Aufreinigung mittels IMAC reichte die Quantität der Expressionsprodukte allerdings nicht aus.

Die Überexpression von Membranproteinen erweist sich generell als schwierig. Die früheren Untersuchungen haben gezeigt, daß speziell die Expression von Sterol-Glucosyltransferasegenen aus verschiedenen Hefe-Arten sehr niedrig ist [8]. Einer der limitierenden Faktoren bei der heterologen Expression eines eukaryotischen Proteins im prokaryotischen Organismus *E. coli* ist die im Vergleich zur eukaryotischen Zelle viel geringere Gesamtmembranmenge. Membranproteine, die nach der Expression nicht an ihre nativen Membransysteme binden können, können zudem wieder enzymatisch abgebaut werden [200, 201]. Oft sind fremde Membranproteine toxisch für den Wirtsorganismus, können dadurch seine Entwicklung und sein Wachstum erheblich stören oder verursachen sogar den Zelltod [151]. Auch in den oben beschriebenen Experimenten konnte ein verlangsamtes Zellwachstum in Expressionskulturen im Vergleich zu den nicht-transformierten *E. coli*-Zellen beobachtet werden.

Um dennoch genügend Protein für die Antikörperherstellung bereitzustellen, sollte nun versucht werden jeweils nur eine Teilsequenz der Glucosyltransferasegene aus *P. pastoris* in *E. coli* zu exprimieren. Die von diesen Teilsequenzen kodierten Polypeptide sollten für eine Immunisierung ausreichend groß sein, möglichst keine biologische Aktivität in dem Wirtsorganismus entfalten und zugleich keine Transmembrandomänen enthalten. Von dem auf diese Weise entlasteten Expressionsorganismus wurde im Endeffekt eine verbesserte Proteinausbeute erhofft.

Warnecke *et al.* zeigten, daß die Sequenzen der Sterol-Glucosyltransferasegene aus einigen Pflanzen und den Hefen *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* signifikante Ähnlichkeiten in ihrem C-terminalen Bereich haben. Weitere Untersuchungen bestätigten, daß nur dieser Bereich am C-Terminus für die *in-vitro*-Enzymaktivität in *S. cerevisiae* verantwortlich ist [8]. Bei der Auswahl einer Teilsequenz sollte dieser für die biologische Aktivität verantwortliche Bereich möglichst vermieden werden. So wurde aus der SGT-Sequenz von *P. pastoris* ein für 378 Aminosäuren kodierendes Fragment ausgewählt (vom ersten ATG des ORF gezählt: Nucleotide 1986 bis 3056; siehe auch Anhang).

Die Wahl einer Teilsequenz aus der Glucosylceramid-Synthase von *P. pastoris* konnte sich nicht auf Enzymaktivität-Untersuchungen stützen. Hier galt es, zumindest die hypothetische Transmembrandomäne zu vermeiden. So wurde aus der GCS-Sequenz ein für 288 Aminosäuren

codierendes Fragment ausgewählt (vom ersten ATG des ORF gezählt: Nucleotide 291 bis 1089; siehe auch Anhang).

Das Protokoll zur Reinigung der His-tag-Proteine unter denaturierenden Pufferbedingungen wurde ebenfalls geändert. Von nun an wurden die Reinigungsprozeduren nach dem wesentlich robusteren Batch-Verfahren durchgeführt (2.6.1.6.).

3.1.3.1. Klonierung in pET-Vektoren. Expression in *E. coli*-C41(DE3)

Als Template für das SGT-Fragment diente der genomische Klon aus *P. pastoris* pUC19SGT mit dem offenen Leserahmen UGT51B1 [23]. Als Template für das GCS-Fragment diente der genomische Klon pYM873 [71]. Das GCS-Fragment wurde mit Vent-Polymerase (Primer: PPGCS1, PPGCS2), das SGT-Fragment mit Proof-Start-Polymerase amplifiziert (Primer: PPSGT3, PPSGT4). Die Primer wurden so konzipiert, daß sie an ihren Enden spezifische Erkennungssequenzen für *Nde*I (3'-Ende) und *Bam*HI (5'-Ende) enthielten. Die PCR-Produkte wurden in pET19b-Vektoren kloniert (2.5.4.3.). So entstanden die Expressionsplasmide pECGTfr6 (pET19b (*Nde*I/*Bam*HI) + 288-AS-Fragment aus GCS von *P. pastoris*) und pESGTfr11 (pET19b (*Nde*I/*Bam*HI) + 378-AS-Fragment aus SGT von *P. pastoris*). *E. coli*-C41(DE3)-Zellen wurden nun einzeln mit diesen Plasmiden transformiert.

Die Expression der offenen Leserahmen wurde in transgenen *E. coli*-C41(DE3)-Zellen durch Zugabe von IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM). Als Negativkontrolle dienten die C41(DE3)-Zellen, die mit pET19b-Leervektor transformiert waren.

3.1.3.2. SGT- und GCS-Fragmente aus *P. pastoris* konnten affinitätschromatographisch gereinigt werden

Nach der Expression wurde das Gesamtproteinmuster der transgenen *E. coli*-Zellen elektrophoretisch untersucht (2.6.1.1. und 2.6.2.3.). Da bei keiner der Proben im Vergleich zu den mitgeführten Negativkontrollen eine

Bande im erwarteten Größenbereich zu sehen war, wurden die Polypeptide, die im pET19b-Vektor mit einem His-tag exprimiert wurden, mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie gereinigt.

Die IMAC wurde sowohl unter nativen (2.6.1.5.) als auch unter denaturierenden Bedingungen nach dem Batch-Verfahren (2.6.1.6.) durchgeführt.

Nach einer Überprüfung der Fraktionen beider Reinigungsgänge mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung konnte zunächst bei keiner der Proben eine Proteinbande im erwarteten Größenbereich sicher festgestellt werden (ohne Abbildung). Erst nach einer 15-fachen Aufkonzentrierung der Proben durch Fällung mit TCA (2.6.1.8.), wurden sowohl bei der GCS-Fragment-Probe als auch bei der SGT-Fragment-Probe jeweils eine Bande im erwarteten Größenbereich festgestellt. In beiden Fällen traten die Banden bei den unter denaturierenden Bedingungen erhaltenen Eluat-Fraktionen auf. Die für Expressionsprodukte berechneten molekularen Massen liegen bei 43,8 kDa (SGT-Fragment) und 31,8 kDa (GCS-Fragment). Die, besonderes im direkten Vergleich zu Proteinbanden der Negativkontrolle, deutlich sichtbaren Überexpressionsbanden (Abb. 3.2. & 3.3.) liegen bei ca. 43 – 45 bzw. 31 – 33 kDa und entsprechen somit den für die beiden Polypeptide erwarteten Größen. Bei den Leervektor-Kontrollen konnten keine Banden in entsprechenden Größenbereichen festgestellt werden.

Nun galt es zu überprüfen, ob die detektierten Polypeptide als His-tag-Fusionsproteine vorlagen oder nicht. Zur Überprüfung wurden die im Polyacrylamidgel getrennten Proben auf eine NC-Membran geblottet und mit Ni-NTA-HRP-Konjugat inkubiert (2.6.4.5.). Die Detektion erfolgte mit DAB-Tabletten von Sigma-Aldrich. Die Färbung fiel für beide Polypeptide positiv aus (Abb. 3.2. & 3.3.). Bei den Leervektor-Kontrollen konnten keine Banden in entsprechenden Größenbereichen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse belegten, daß bei der Expression des 288-AS-Fragments der *P. pastoris*-GCS in *E. coli* ein Polypeptid synthetisiert wurde, das der berechneten Größe dieses Fragments entsprach. Auch im Falle des 378-AS-Fragments der *P. pastoris*-SGT wurde ein der erwarteten Größe entsprechendes Polypeptid exprimiert. Eine positive Farbreaktion mit Ni-NTA-HRP-Konjugat/Diaminobenzidin bestätigte jeweils die Expression eines His-tag-Fusionsproteins.

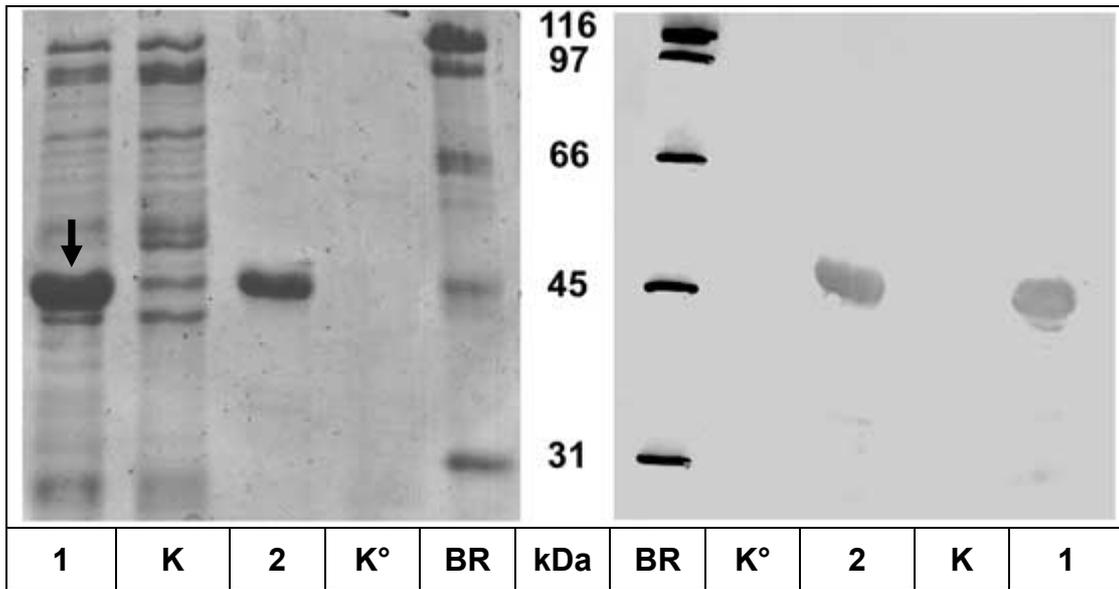


Abb. 3.2: Proteinmuster der Präparation des 44-kDa-SGT-Fragments; links: Polyacrylamidgel, rechts: NC-Membran. **1:** SGT-Fragment nach der einfachen Reinigung (Pfeil); **2:** SGT-Fragment nach der zweiten Reinigung; **K:** Leervektor-Kontrolle nach der einfachen Reinigung; **K°:** Leervektor-Kontrolle nach der zweiten Reinigung; **BR:** *Broad-Range*-Standard (auf der NC-Membran mit einem Kugelschreiber markiert). Als Proben wurden 15-fach konzentrierte Eluat-Fractionen verwendet.

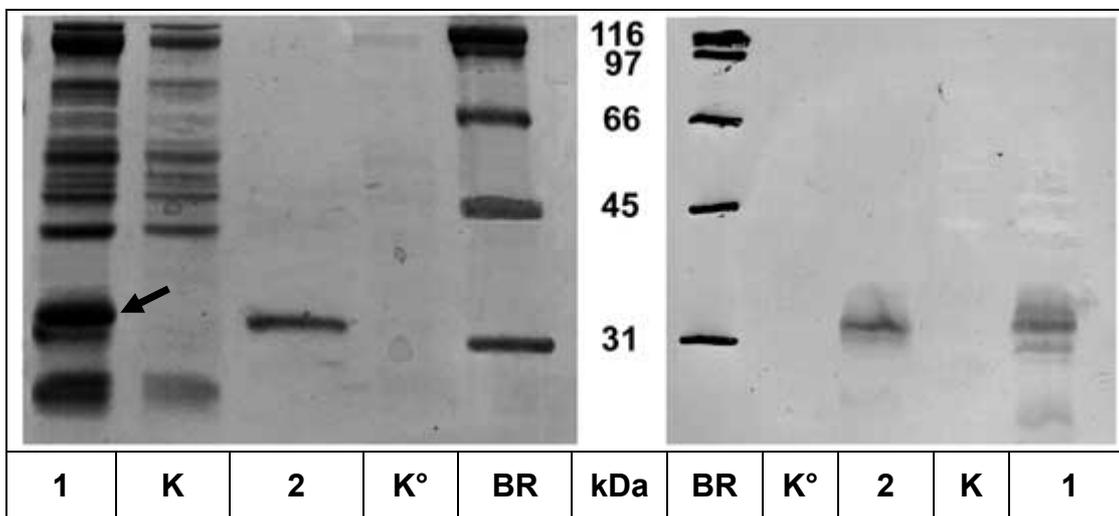


Abb. 3.3: Proteinmuster der Präparation des 32-kDa-GCS-Fragments; links: Polyacrylamidgel, rechts: NC-Membran. **1:** GCS-Fragment nach der einfachen Reinigung (Pfeil); **2:** GCS-Fragment nach der zweiten Reinigung; **K:** Leervektor-Kontrolle nach der einfachen Reinigung; **K°:** Leervektor-Kontrolle nach der zweiten Reinigung; **BR:** *Broad-Range*-Standard (auf der NC-Membran mit einem Kugelschreiber markiert). Bei den schwachen Banden, die auf der NC-Membran unterhalb des GCS-Fragmentes zu sehen sind, handelt es sich wahrscheinlich um die Abbauprodukte dieses Polypeptids. Als Proben wurden 15-fach konzentrierte Eluat-Fractionen verwendet.

Daher handelt es sich bei den detektierten Expressionsprodukten um die durch die heterologe Expression in *E. coli* erzeugten Fragmente der SGT und der GCS von *P. pastoris*.

Die beiden Polypeptide lagen nach dem einmalig durchgeführten Reinigungsgang noch nicht in reiner Form vor. Deswegen wurde versucht, durch ein zweites, direkt an den ersten Reinigungsgang angeschlossenes Batch-Verfahren den Reinheitsgrad der Expressionsprodukte zu erhöhen. Als Ergebnis wurden sowohl das GCS- als auch das SGT-Fragment so rein erhalten, daß sie im Polyacrylamidgel jeweils als eine einzige, diskrete Bande detektiert werden konnten (Abb. 3.2. & 3.3.). Bei den schwachen Banden, die auf Nitrocellulose-Membran unterhalb des GCS-Fragments zu sehen sind, handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte dieses Polypeptids.

3.1.4. Herstellung der Antiseren gegen die rekombinanten GCS- und SGT-Fragmente

Wie oben beschrieben, ist es gelungen die Expression und die Aufreinigung eines 288-AS-Fragments aus der Glucosylceramid-Synthase und eines 378-AS-Fragments aus der Sterol-Glucosyltransferase von *P. pastoris* durchzuführen. Um Antiseren gegen diese beiden Polypeptide zu erhalten, sollten nun verschiedene Tiere dagegen immunisiert werden. Für eine Immunisierung in Kaninchen werden mindestens 100 µg Antigen pro Tier benötigt. Eine ausreichende Menge der jeweiligen Antigen-Proteine sollte nun durch die präparative Reinigung nach dem bereits beschriebenen IMAC-Verfahren gewonnen werden. Anschließend sollten die Antigene im Polyacrylamidgel an externe Firmen zur Immunisierung geschickt werden.

3.1.4.1. Präparative Reinigung der GCS- und der SGT-Fragmente. Immunisierung

Die präparative Reinigung des GCS- und des SGT-Fragments wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Polypeptide in einem Polyacrylamidgel zusätzlich elektrophoretisch gereinigt und mit der

Coomassie-Brilliant-Blue-Reagenz gefärbt (2.6.2.4.). Die nun sichtbaren Protein-Banden wurden mit einem Skalpel aus dem Gel herausgeschnitten. Die Antigen-enthaltende Gelstückchen wurden über Nacht an der Luft und bei Zimmertemperatur getrocknet. Es wurden insgesamt ca. 1000 µg von jedem Antigen präpariert.

Die Immunisierung der Tiere sowie die Gewinnung der Antiseren wurde von den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien) und VaccineLab (Rostock) nach dem im Abschnitt 2.6.4.3. beschriebenen Verfahren durchgeführt. Insgesamt wurden pro Antigen drei Kaninchen und 1 Huhn immunisiert.

3.1.4.2. Testen der Antiseren

Die gewonnenen Antiseren wurden auf spezifische Bindung an GCS- und SGT-Fragmente getestet. Hierzu wurden die entsprechenden Polypeptide in verschiedener Quantität (10 bis 50 µg) auf NC-Membranen geblottet. Die Gesamtpeptidmenge wurde nach Bradford bestimmt (2.6.1.7.). Die immunochemischen Nachweisreaktionen (2.6.4.4.) wurden in mehreren separaten Versuchen mit Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat und Ziegen-Anti-Huhn-IgG-HRP-Konjugat als Zweit-Antikörper durchgeführt. Als Färbereagenz diente 3,3'-Diaminobezidintetrahydrochlorid. In verschiedenen Versuchen wurden unterschiedliche Verdünnungen der Antiseren ausgetestet (1:100, 1:250, 1:500 und 1:1000). Die Tests wurden bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (1, 2 und 3 Stunden bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C) und mit verschiedenen Blotto-Puffern (mit Magermilchpulver oder flüssiger Gelatine als Proteinquelle) durchgeführt.

Trotz mehrmaliger Wiederholung der Versuche unter verschiedenen Bedingungen konnte bei keinem der Antiseren eine spezifische Immunoreaktion gegen das entsprechende Antigen festgestellt werden.

Das Ausbleiben einer detektierbaren Immunoreaktion gegen das in großer Menge vorhandene Antigen läßt darauf schließen, daß die gewonnenen Antiseren offensichtlich keine oder nur sehr wenig Antikörper gegen die zur Immunisierung verwendeten Enzym-Fragmente enthielten. Als Ursache dafür kommt eine insgesamt sehr unstete und unterschiedlich stark

ausfallende Immunantwort bei Kaninchen in Frage (persönliche Mitteilung von Dr. F. Haag, Abteilung für Immunologie und Allergologie, UKE, Hamburg). So unterscheidet sich die Immunantwort gegen ein Antigen bei Kaninchen von Rasse zu Rasse und innerhalb einer Rasse von Tier zu Tier relativ stark (Eurogentec, 2000). Bei verschiedenen Antigen-Proteinen gibt es aufgrund struktureller Unterschiede ebenfalls sehr große Differenzen hinsichtlich ihrer Antigenität in unterschiedlichen Versuchstieren.

Nach diesen negativen Ergebnissen wurde die immunologische Strategie nicht weiter verfolgt.

3.2. Die intrazelluläre Lokalisierung der pflanzlichen GCS und SGT mittels Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie

In den vorhergehenden Experimenten war versucht worden, ein immunochemisches Detektionssystem für die GCS und die SGT aus *Pichia pastoris* zu entwickeln. Es gelang zwar jeweils ein Fragment von den beiden Enzymen in ausreichender Menge und Reinheit für eine Immunisierung aufzureinigen, jedoch erwiesen sich die erhaltenen Antiseren für weitere Untersuchungen als unbrauchbar.

Nach diesen negativen Ergebnissen wurde die zweite Strategie in Angriff genommen, die interessierenden Glucosyltransferasen mittels Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie direkt in den lebenden Zellen zu lokalisieren. Um diese Enzyme, die nativ nicht fluoreszieren, den genannten Untersuchungstechniken zugänglich zu machen, mußten sie zunächst mit geeigneten Fluoreszenzproteinen (2.6.8.) fusioniert und in einem geeigneten Organismus exprimiert werden.

3.2.1. Weitere Untersuchungen werden mit pflanzlichen Glucosyltransferasen fortgeführt

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation wurden die Glucosylceramid-Synthase aus Baumwolle (*Gossypium arboreum*) und die Sterol-Glucosyltransferase aus Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) ausgewählt. Nachdem diese pflanzlichen Glucosyltransferasen in unserem Laboratorium kloniert und charakterisiert wurden [39, 196], sollte nun im Hinblick auf ihre physiologischen Funktionen untersucht werden, in welchem zellulären Kompartiment sie sich befinden.

Aus der Sicht der Fluoreszenzmikroskopie-Methodik besitzen pflanzliche Zellen gegenüber Hefe einige Vorteile. So ist die Zellgröße eines Untersuchungsobjekts von entscheidender Bedeutung. In den großen Pflanzenzellen sind die intrazellulären Strukturen mikroskopisch gut zu erkennen und morphologisch zumeist gut voneinander zu unterscheiden. In den sehr viel kleineren Hefezellen ist es oft schwierig eine korrekte Aussage über die

Identität der Organelle zu treffen, in welcher sich die Fluoreszenz beobachten läßt. In den Pflanzenzellen hingegen ist es oft auch ohne Einsatz von speziellen mehrfarbigen Fluoreszenzmarkern möglich, den intrazellulären Lokalisierungsort der fluoreszierenden Fusionsproteine morphologisch zu bestimmen.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden weitere Arbeiten zur intrazellulären Lokalisation von Glucosyltransferasen auf pflanzliche Enzyme und pflanzliche Zellen beschränkt.

3.2.2. Expression und Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine in epidermalen Zwiebelzellen

Zunächst sollten die Glucosylceramid-Synthase von *G. arboreum* und die Sterol-Glucosyltransferase von *A. thaliana* (Ugt80A2) mit dem grünfluoreszierenden Fusionspartner – dem EGFP von der Firma Clontech – in geeignetem pflanzlichen Gewebe exprimiert werden. Hierzu wurden Plasmide hergestellt, in denen sich die EGFP-Sequenz im Leserahmen an den C-Terminus des jeweiligen Glucosyltransferasegens anschließt.

3.2.2.1. Herstellung der EGFP-Fusionskonstrukte

Die Fusionskonstrukte wurden für beide Glucosyltransferasen nach derselben Strategie kloniert (Abb. 3.4.). Die EGFP-Sequenz wurde mit Vent-Polymerase amplifiziert (2.5.4.); der pEGFP-Vektor von Clontech diente dabei als Template. Die eingesetzten spezifischen Primer enthielten Sequenzen für Restriktionsschnittstellen *SacII* und *HpaI/NheI* (Primer: N-EGS1, N-EGS2). Die ORFs der beiden Glucosyltransferase-Gene wurden jeweils mit eingebauten Schnittstellen *ApaI* vor dem ersten ATG und *SacII/NheI* am hinteren Sequenzende amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer (ATS1, N-ATS2, GAC1, GAC2) wurden so konzipiert, daß das STOP-Codon der beiden Gene nicht mitamplifiziert wurde. Als Templates dienten die Vektoren pBDxxatsgt für SGT [39] und pPGa für GCS [196]. Die PCR-Produkte wurden schließlich in pCR2.1-Vektoren subkloniert (2.5.4.2.). Die Identifizierung der richtigen Klone wurde wie oben beschrieben

durchgeführt (3.1.1.). Die Richtigkeit der Amplifizierungen wurde jeweils durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt (2.5.5.).

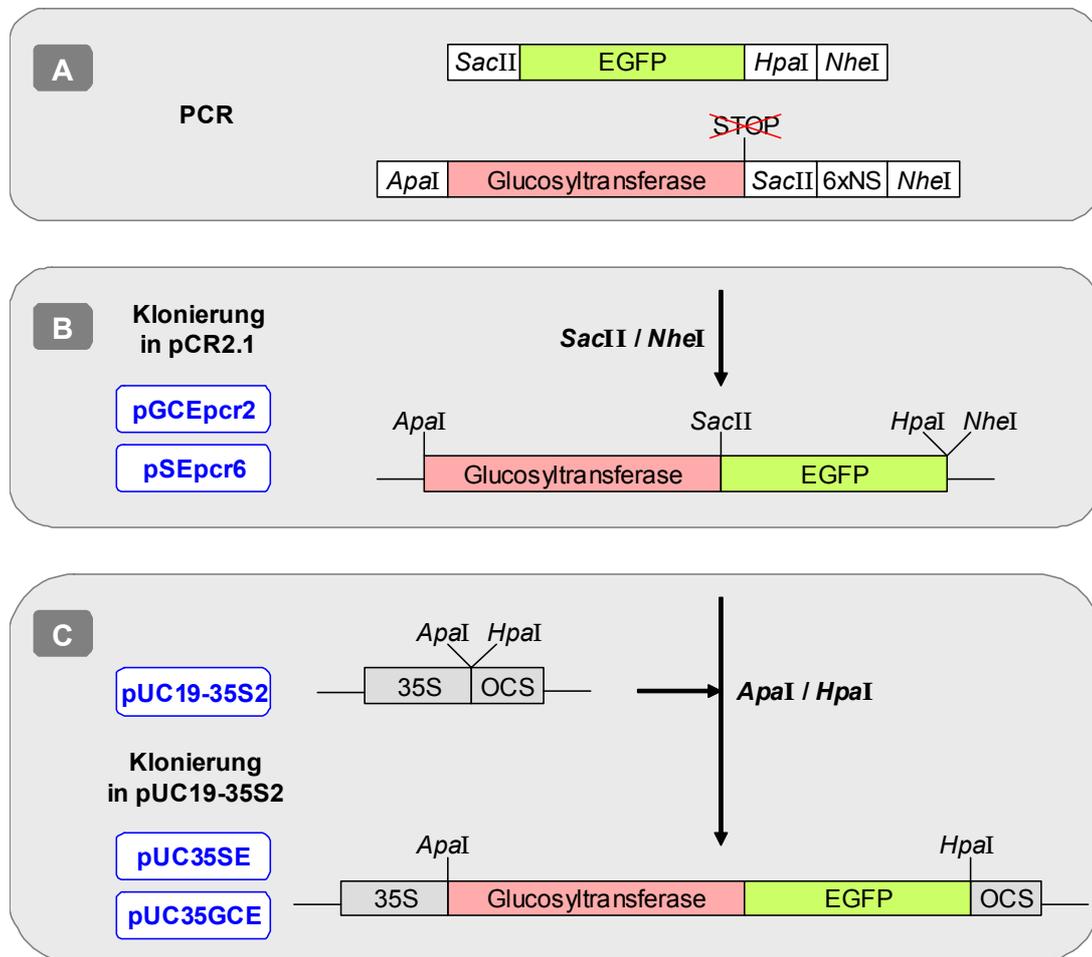


Abb. 3.4: Klonierung der Pflanzenexpressionsplasmide pUC35SE und pUC35GCE. EGFP-Fusionskonstrukte mit den Sequenzen von GCS aus *G. arboreum* und SGT aus *A. thaliana* (Ugt80A2) wurden nach derselben Strategie hergestellt.

A: Die kodierenden Bereiche der Glucosyltransferasen (ohne STOP-Codon) und des EGFP wurden mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen per PCR amplifiziert und jeweils in den pCR2.1-Vektor subkloniert (6xNS = Nonsense-Sequenz aus 6 Nucleotiden). **B:** Die pCR2.1-Glucosyltransferase-Konstrukte wurden mit *SacII* und *NheI* geöffnet; die EGFP-Sequenz wurde mit den gleichen Endonucleasen aus dem Vektor herausgeschnitten. Bei der Ligation der EGFP-Fragmente mit den entsprechenden Vektoren entstanden die Plasmide pGCEpcr2 mit GCS aus *G. arboreum* und pSEpcr6 mit SGT aus *A. thaliana*, beide mit der im Leserahmen folgenden EGFP-Sequenz. **C:** Der pUC19-35S2-Vektor wurde zwischen dem Promotor (35S) und der OCS-Terminator-Sequenz (OCS) mit *ApaI/HpaI* geöffnet. Die Glucosyltransferase-EGFP-Fragmente wurden aus pSEpcr6 sowie pGCEpcr2 mit *ApaI/HpaI* herausgeschnitten und mit pUC19-35S2 ligiert. Die Expression der klonierten ORFs in **pUC35SE** (Ugt80A2-EGFP) und **pUC35GCE** (GCS-EGFP) wird vom 35S-CaMV-Promotor reguliert.

Die so entstandenen Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *NheI* behandelt. Die pCR2.1-Vektoren mit den Glucosyltransferase-Sequenzen wurden dabei geöffnet und die EGFP-Sequenz aus dem Vektor herausgeschnitten. Nach Reinigung in Agarosegelen wurden die Vektoren mit SGT und GCS jeweils mit dem EGFP-Fragment ligiert (2.5.3.4.). Dabei entstanden die Plasmide pSEpchr6 mit SGT aus *A. thaliana* und pGCEpchr2 mit GCS aus *G. arboreum*, beide mit der im Leserahmen folgenden EGFP-Sequenz. Diese Vektoren waren jedoch noch nicht für eine Expression in Pflanzen geeignet, weil sie keinen pflanzenspezifischen Promotor enthielten. Zur Herstellung der Expressionsplasmide wurde ein Vektor verwendet, der einen pflanzenspezifischen Promotor aus Blumenkohl-Mosaikvirus enthält, einen 35S-CaMV-Promoter. Dieser pUC19-35S2-Vektor[★] wurde zwischen der Promotor- und der OCS-Terminator-Sequenz (Octopin-Synthase-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*) mit *ApaI/HpaI* restringiert. Die Glucosyltransferase-EGFP-Fragmente wurden aus pSEpchr6 und pGCEpchr2 ebenfalls mit der Kombination *ApaI/HpaI* herausgeschnitten. Bei der darauf folgenden Ligation des linearisierten pUC19-35S2-Vektors mit dem jeweiligen Fragment entstanden die Expressionsvektoren **pUC35SE** (pUC19 mit 35S-Promotor + *ugt80A2* + EGFP + OCS-Terminator) und **pUC35GCE** (pUC19 mit 35S-Promotor + GCS von *G. arboreum* + EGFP + OCS-Terminator).

Parallel zur Klonierung der Glucosyltransferase-EGFP-Vektoren wurde ein EGFP-Vektor ohne fusionierte Glucosyltransferase-Sequenz hergestellt. Dieser EGFP-Leervektor sollte der positiven Kontrolle dienen. Hierzu wurde die EGFP-Sequenz mit einer 6 × Nonsense-Sequenz sowie einer *ApaI*-Schnittstelle vor dem ersten ATG und einer *HpaI*-Schnittstelle am Sequenzende amplifiziert (Primer: K-EGF1, N-EGS2). Das PCR-Produkt und der pUC19-35S2-Vektor wurden mit *ApaI/HpaI* behandelt und anschließend miteinander ligiert. In dem entstandenen **pUC-GK**-Vektor befindet sich das EGFP-ORF unter der Kontrolle des pflanzenspezifischen CaMV-35S-Promotors. Dadurch konnte das freie EGFP-Protein im pflanzlichen Gewebe exprimiert werden.

★ der Vektor pUC19-35S2 wurde freundlicherweise von Dr. Amine Abbadi, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt

3.2.2.2. Die Fluoreszenz des SGT-EGFP-Fusionsproteins wurde im Cytosol und im Zellkern beobachtet

Epidermale Zellen von *Allium fistulosum* (Frühlingszwiebel) wurden biolistisch mit dem Expressionsvektor pUC35SE transformiert (2.7.1.). Zur Expression des rekombinanten Proteins wurden die transformierten Zwiebelstückchen (Untersuchungseinheiten) in diesem Experiment für eine Dauer von etwa 18 h bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Bei der darauf folgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (2.7.1.3.) wurde eine Transformationsrate von etwa 10 bis 20 Zellen pro Untersuchungseinheit festgestellt. Die mit dem pUC19-35S2-Leervektor zur Kontrolle transformierten Untersuchungseinheiten zeigten keine Fluoreszenz.

Die Fluoreszenz des SGT-EGFP-Fusionsproteins wurde im Cytosol und im Zellkern beobachtet (Abb. 3.5.):

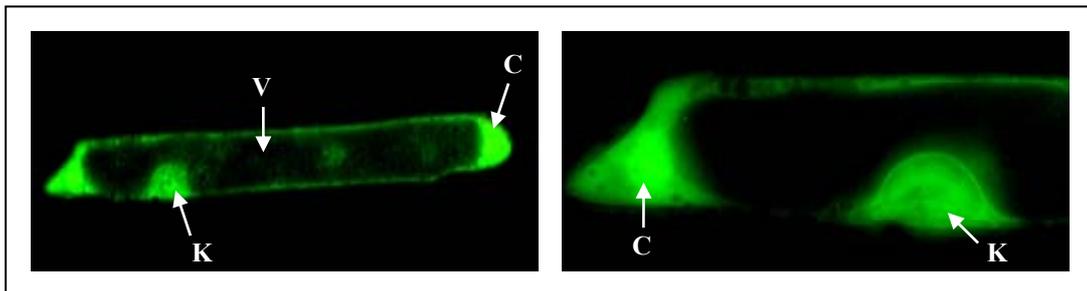


Abb. 3.5: Fluoreszenz des SGT-EGFP-Fusionsproteins in Zellen von *A. fistulosum*. Epidermale Zwiebelzellen wurden mit dem pUC35SE-Plasmid transient transformiert. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Fluoreszenz des rekombinanten Fusionsproteins im Cytosol und im Zellkern beobachtet; C = Cytosol, K = Kern, V = Vakuole.

Den größten Teil der in der Abbildung 3.5. sichtbaren epidermalen Zwiebelzelle nimmt die Zentralvakuole (V) ein. Das Cytoplasma ist als schmaler fluoreszierender Streifen an der Zellwand zu sehen (Zellwand selbst ist nicht sichtbar). Außerdem befinden sich größere Cytoplasma-Ansammlungen (C) in apikalen Bereichen der Zelle, die nicht von der Vakuole ausgefüllt sind. In der gleichen Abbildung ist die Zellkern-Region zu sehen (K), wobei nicht ganz klar ist, ob es sich hier um die Fluoreszenz aus dem Kerninneren handelt oder allein um das fluoreszierende Cytosol in der Kerntasche. Um diese Frage zu beantworten, wurde neben der fluoreszenz- auch eine konfokal-mikroskopische Untersuchung durchgeführt (2.7.1.3.).

Die Abbildung 3.6. zeigt zwei konfokalmikroskopische Bilder von einer mit dem pUC35SE-Plasmid transformierten Zwiebelzelle. Das linke Bild ist eine Einzelaufnahme und stellt eine 4,69 μm tiefe Schicht aus dem Inneren der Zelle dar. Das rechte Bild besteht aus 35 Einzelaufnahmen und zeigt dieselbe Zelle in ihrer vollen Ausdehnung. Die Einzelaufnahmen der verschiedenen Zellebenen wurden mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms zusammengesetzt. Auf beiden Bildern ist die Fluoreszenz des SGT-EGFP-Fusionsproteins im Cytosol (C) und im Zellkernbereich zu sehen. Dabei ist besonderes anzumerken, daß die Ebene der Einzelaufnahme (Abb. 3.6. links) mitten durch den Zellkern (K) verläuft. Es ist offensichtlich, daß die Fluoreszenz der Fusionsproteine gleichmäßig in dieser Ebene des Zellkerns verteilt ist.

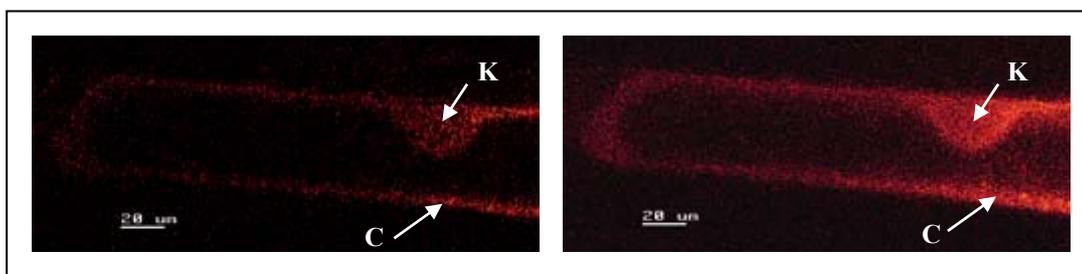


Abb. 3.6: Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer Zwiebelzelle zeigen Fluoreszenz des SGT-EGFP-Fusionsproteins. Epidermale Zellen von *A. fistulosum* wurden mit dem pUC35SE-Plasmid transient transformiert. Die Einzelaufnahme (links) zeigt eine 4,69 μm tiefe Schicht in der Ebene des Zellkerns. Es ist zu beobachten, daß das fluoreszierende SGT-EGFP-Fusionsprotein im Inneren des Zellkerns gleichmäßig verteilt ist. Das rechte Bild ist eine computergestützte Überlagerung von 35 Einzelaufnahmen derselben Zelle. Auf beiden Bildern ist die Fluoreszenz der Fusionsproteine im Cytosol (C) und im Zellkern (K) zu sehen. Die Grünfluoreszenz des GFP ist in diesen Falschfarben-Abbildungen durch das Bildbearbeitungsprogramm des Konfokalmikroskops rot dargestellt.

Auch andere Einzelaufnahmen aus unterschiedlich tief gelegenen Zellebenen zeigten eine durchgehende Fluoreszenzverteilung durch den gesamten Zellkern (ohne Abbildung). Dies bedeutet, daß sich das Fusionsprotein nicht nur im Cytosol (u.a. in der Kerntasche) befindet, sondern auch im Inneren des Zellkerns angehäuft wird.

Die Transformation der epidermalen Zwiebelzellen mit pUC35SE sowie die fluoreszenz- und konfokalmikroskopischen Untersuchungen wurden mehrmals wiederholt. Alle untersuchten Zellen zeigten die gleiche Lokalisation der rekombinanten Sterol-Glucosyltransferase.

3.2.2.3. Das GCS-EGFP-Fusionsprotein wird im ER vermutet

Epidermale Zellen von *Allium fistulosum* wurden ebenfalls mit dem Expressionsvektor pUC35GCE biolistisch transformiert (2.7.1.). Zur Expression des rekombinanten GCS-EGFP-Proteins wurden die transformierten Untersuchungseinheiten für eine Dauer von etwa 18 h bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Die Transformationsrate von 1 bis höchstens 5 Zellen pro Untersuchungseinheit lag deutlich unter der Transformationsrate mit dem pUC35SE-Plasmid (3.2.2.2.). Die Fluoreszenzintensität der transformierten Zellen lag ebenfalls unter der der vorangegangenen Experimente mit dem SGT-EGFP-Protein. Eine Erhöhung der Expressionsdauer auf 24 bis 40 h in weiteren Versuchen führte zu keiner Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

Um die Fluoreszenz des freien GFP mit der der rekombinanten Fusionsproteine zu vergleichen, wurde das epidermale Gewebe ferner mit dem pUC-GK-Vektor transformiert. Die Fluoreszenz des freien GFP wurde im Cytosol und im Zellkern beobachtet (ohne Abbildung).

Die Abbildung 3.7. zeigt zwei mit pUC35-GCE-Plasmid transformierte Zwiebelzellen. Sowohl auf der fluoreszenzmikroskopischen (links) als auch auf der konfokalmikroskopischen Aufnahme (rechts) ist ein fluoreszierender Gürtel um den Zellkern herum, der sogenannte *nuclear rim* (NR), zu sehen. Dabei handelt es sich um das kernnahe Endoplasmatisches Reticulum (ER). Das kernnahe ER ist mit der äußeren Kernmembran assoziiert und fluoreszenzmikroskopisch von der letzteren nicht zu unterscheiden. Das konfokalmikroskopische Bild (rechts) wurde in der Ebene aufgenommen, die den Zellkern zentral durchschneidet. Darauf ist deutlich zu erkennen, daß die Fluoreszenz des GCS-EGFP-Fusionsproteins nicht im Inneren des Zellkerns zu beobachten ist. Die in übrigen Zellbereichen sichtbare Fluoreszenz kommt sehr wahrscheinlich von GCS-EGFP, das sich im ER-Netzwerk zwischen der Zentralvakuole und der Zellwand sowie in Cytoplasmasträngen, die durch die Vakuole ziehen, befindet. Im Unterschied zur Fluoreszenz im Cytosol (Abb. 3.5.) ist die Fluoreszenz des GCS-EGFP-Fusionsproteins in den Cytoplasma-Räumen nicht homogen verteilt (Abb. 3.7. links), was auf eine Strukturierung hindeutet. Leider konnte in diesem Versuch keine Aufnahme gemacht werden, auf der das ER-Netzwerk gut sichtbar wäre.

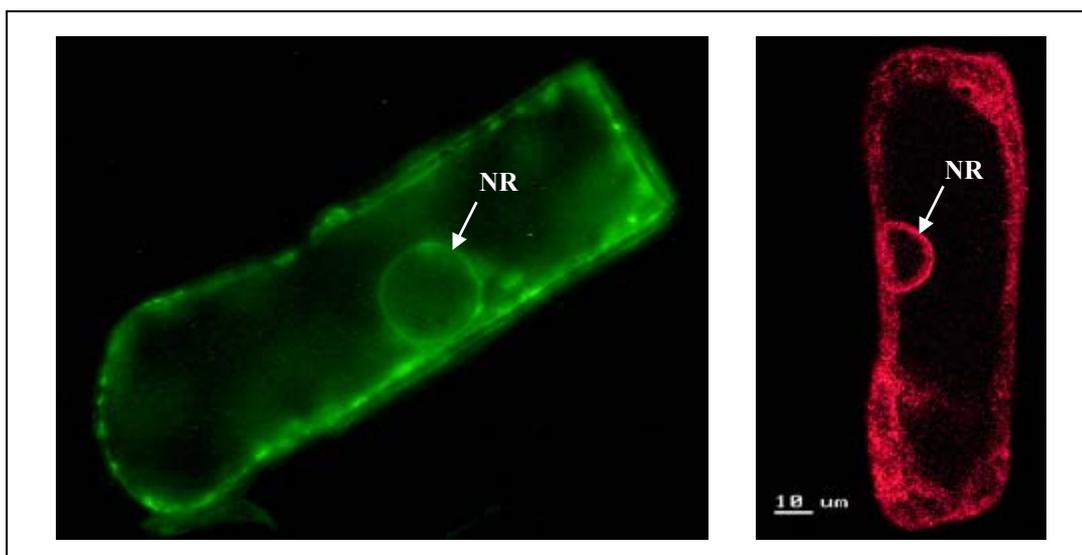


Abb. 3.7: Fluoreszenz des GCS-EGFP-Fusionsproteins in Zellen von *A. fistulosum*. Epidermale Zwiebelzellen wurden mit dem pUC35GCE-Plasmid transient transformiert. Auf dem fluoreszenzmikroskopischen Bild links ist ein fluoreszierender Gürtel (*nuclear rim*) um den Zellkern deutlich zu sehen (NR). Es handelt sich hierbei um das mit der äußeren Kernmembran assoziierte Endoplasmatische Reticulum. Das rechte Bild zeigt eine Fusion aus mehreren konfokalmikroskopischen Einzelaufnahmen, die insgesamt einer 22-µm-Schicht aus dem Bereich des Zellkerns entspricht. Es ist deutlich zu sehen, daß sich das fluoreszierende GCS-EGFP-Protein im kernnahen Bereich anhäuft (NR), aber nicht im Inneren des Zellkerns vorhanden ist.

Die Transformation der epidermalen Zwiebelzellen mit pUC35GCE sowie die mikroskopischen Untersuchungen wurden mehrmals wiederholt und ergaben stets die gleichen Ergebnisse. Wenngleich die Aufnahmen aus diesem Versuch einen deutlichen Hinweis auf die Lokalisation der Glucosylceramid-Synthase im ER ergaben, war die Qualität der Bilder dennoch für eine verlässliche Aussage nicht ausreichend. Aufgrund der schwachen Fluoreszenzintensität der transformierten Zellen mußten insbesondere die konfokalmikroskopischen Aufnahmen an der Empfindlichkeitsgrenze der Kamera durchgeführt werden, was u.a. zu einem starken Hintergrund führte. Für eine bessere Bildqualität, wurde der Hintergrund mit Hilfe einer speziellen Bildbearbeitungssoftware (2.7.2.) reduziert und die Parameter Helligkeit/Kontrast optimiert. Denkbar war, daß dabei kleinere Bilddetails verloren gegangen sein könnten, so daß eine Verifizierung der Ergebnisse aus diesem Versuch notwendig erschien.

3.2.3. Verifizierung der bisherigen Ergebnisse mit gelb-fluoreszierenden Fusionsproteinen

Wie die vorhergehenden Versuche zeigten, war die Fluoreszenzintensität insbesondere bei dem GCS-EGFP-Fusionsprotein nicht ausreichend, um seine Lokalisation in der Pflanzenzelle mit Sicherheit zu bestimmen. Deshalb wurde nun in weiteren Experimenten versucht, die intrazelluläre Lokalisierung beider Glucosyltransferasen mit Hilfe des **gelb**-fluoreszierenden Fusionsproteins (YFP) zu verifizieren. YFP ist eine künstliche GFP-Mutante, in der im Vergleich zum Wildtyp-GFP drei Aminosäuren ausgetauscht sind (2.6.8.). Diese Mutation führt nicht nur zu einer Verschiebung der Emissions- und Anregungsmaxima, sondern bewirkt auch oftmals eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität in den mit YFP-Konstrukten transformierten Zellen [190].

Zur weiteren Intensivierung des Signals sollten außerdem die fluoreszierenden Fusionsproteine unter der Kontrolle eines stärkeren Promotors exprimiert werden. Der pflanzenspezifische 35S-CaMV-Promotor sollte deshalb in den nachfolgenden Experimenten durch ein stärkeres Derivat – den „doppelten“ 35S-CaMV-Promotor – ersetzt werden. Aufgrund der mehrfach vorliegenden essentiellen Konsensussequenzen besitzt dieser Promotor eine höhere Affinität für die pflanzliche RNA-Polymerase.

Außerdem sollte nun der fluoreszierende Fusionspartner – das YFP – sowohl am C- als auch am N-Terminus der jeweiligen Glucosyltransferase angefügt werden. Dadurch sollte die Richtigkeit der Aussage über die Lokalisierung zusätzlich verifiziert werden.

3.2.3.1. Herstellung der EYFP-Konstrukte

Zur Erleichterung nachfolgender Arbeiten wurden in dieser Arbeit zwei Vektoren hergestellt, die bereits den „doppelten“ 35S-CaMV-Promotor, die kodierende Sequenz des YFP, den OCS-Transkriptionsterminator und eine *multiple cloning site* (MCS) enthalten. Diese Vektoren wurden so konzipiert, daß der interessierende ORF im Leserahmen hinter der YFP-Sequenz beim ersten Vektor oder direkt vor der YFP-Sequenz beim zweiten Vektor eingesetzt werden kann, so daß die Expression eines N- bzw. C-terminalen Fusionsproteins resultiert. Die *multiple cloning site* beider Vektoren besteht

aus drei Erkennungssequenzen für *Xma*I, *Spe*I und *Sac*II. Die MCS der einzelnen Vektoren enthalten noch zusätzlich eine *Bam*HI- bzw. eine *Nhe*I-Schnittstelle. Somit können in diese Vektoren nicht nur die hier interessierenden Glucosyltransferase-ORFs eingesetzt werden, sondern alle Sequenzen, die durch eine der genannten Endonucleasen nicht restringiert werden.

Zur Herstellung der beschriebenen Vektoren (Abb. 3.8.) wurde zunächst die DNA des „doppelten“ 35S-Promotors mittels PCR amplifiziert; der pCAMBIA1305.1-Vektor von CAMBIA[★] diente dabei als Template. Die eingesetzten spezifischen Primer enthielten Sequenzen für *Xho*I (Primer: CAM-2x35-1) und *Bam*HI (Primer: CAM-2x35-2). Das PCR-Produkt wurde in pCR2.1-Vektor subkloniert (2.5.4.2.).

Die entstandenen Plasmide sowie der pUC19-35S2-Vektor wurden mit Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I behandelt. Der pUC19-35S2-Vektor wurde dabei geöffnet und die 35S-Promotor-Sequenz aus dem Vektor herausgeschnitten. Nach Trennung der DNA-Fragmente in Agarosegelen wurde der linearisierte pUC19-35S2 mit der Sequenz des „doppelten“ 35S-Promotors ligiert (2.5.3.4.). Das resultierende p19-2x35-Plasmid enthielt *Bam*HI-/ *Nhe*I-Schnittstellen zwischen dem „doppelten“ 35S-Promotor und dem OCS-Terminator.

In der zweiten Phase der Klonierung (**B** in der Abb. 3.8.) wurden zwei Amplifikate der EYFP-Sequenz mit unterschiedlichen Enden hergestellt; der pEYFP-Vektor von Clontech diente dabei als Template. Das erste Amplifikat erhielt durch das Primer-Engineering *Bam*HI, *Xma*I, *Spe*I und *Sac*II Schnittstellen vor dem ersten ATG und eine *Nhe*I-Schnittstelle nach dem STOP-Codon (Primer: YFP+S-1, YFP+S-2). Das zweite Amplifikat wurde mit einer *Bam*HI-Schnittstelle vor dem ersten ATG und mit *Xma*I, *Spe*I, *Sac*II und *Nhe*I Schnittstellen nach dem Sequenzende hergestellt (Primer: YFP-3, YFP-4); um einen durchgehenden ORF zu ermöglichen, wurde das STOP-Codon nicht mitamplifiziert. Die Amplifikate wurden in pCR2.1-Vektoren subkloniert.

[★] Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture, Canberra, Australien

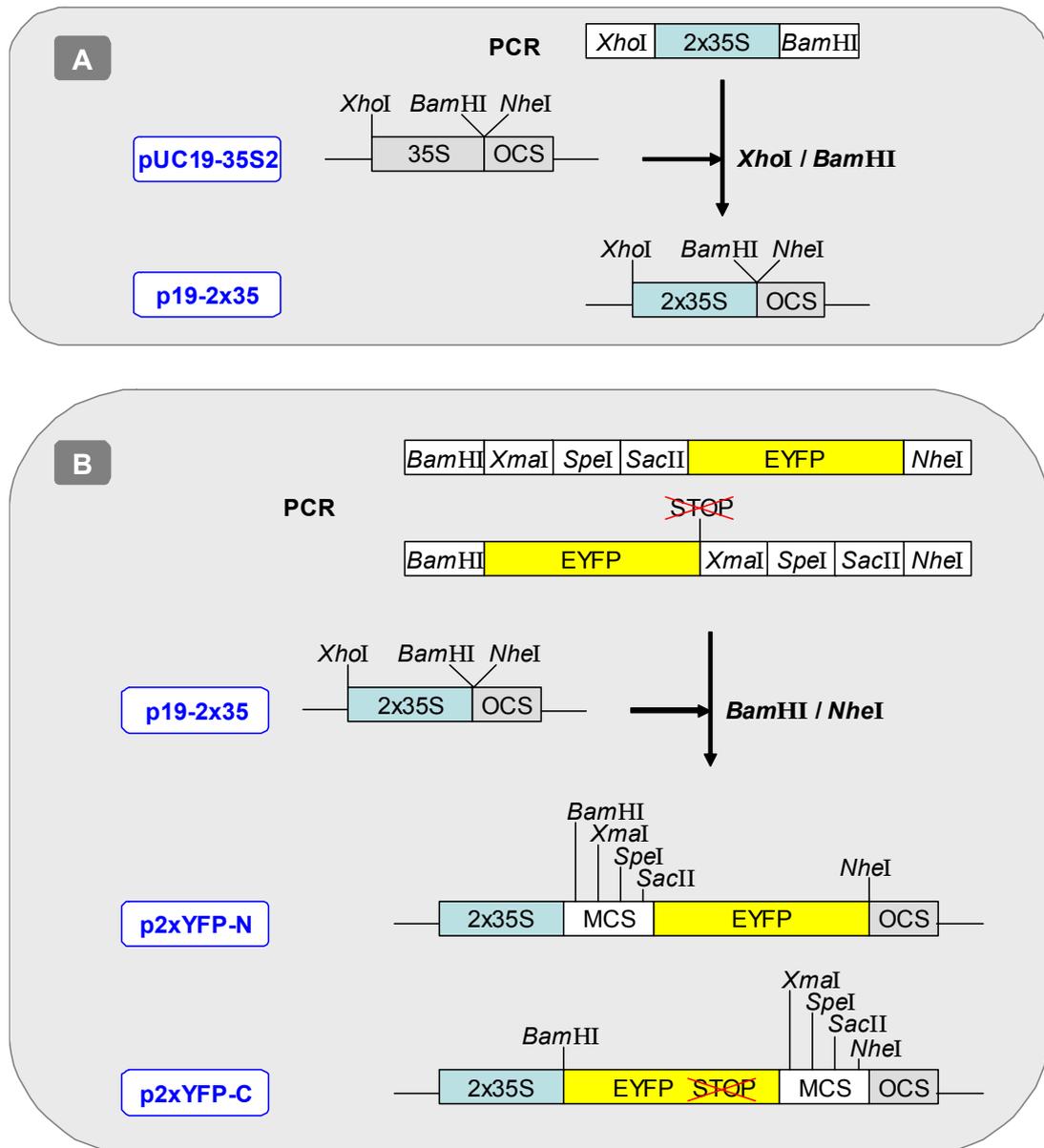


Abb. 3.8: Klonierung der Vektoren p2xYFP-N und p2xYFP-C. Diese Konstrukte ermöglichen die Klonierung der interessierenden ORFs und die darauffolgende Expression in Pflanzen, jeweils mit einem N- oder C-terminalen EYFP.

A: Der kodierende Bereich des „doppelten“ 35S CaMV-Promotors (2x35S) wurde samt entsprechender Restriktionsschnittstellen per PCR amplifiziert und in den pCR2.1-Vektor subkloniert. Das resultierende Plasmid wurde ebenso wie ein pUC19-35S2-Vektor mit *BamHI/XhoI* Enzymen behandelt. Bei der darauffolgenden Ligation des „doppelten“ 35S CaMV-Promotors mit dem linearisierten pUC19-35S2-Vektor entstand das Plasmid p19-2x35. **B:** Der kodierende Bereich von EYFP wurde jeweils mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen per PCR amplifiziert und in den pCR2.1-Vektor subkloniert. Die resultierenden Plasmide wurden ebenso wie der p19-2x35-Vektor mit *BamHI/NheI* Enzymen behandelt. Bei der darauffolgenden Ligation der EYFP-Sequenzen mit dem linearisierten p19-2x35-Vektor entstanden Vektoren, die sich durch die Lage der MCS unterscheiden. Bei p2xYFP-N befindet sich die MCS vor dem ersten ATG der EYFP-Sequenz. Bei p2xYFP-C folgt die MCS der EYFP-Sequenz, die in diesem Konstrukt kein STOP-Codon enthält.

Das in der ersten Klonierungsphase hergestellte Plasmid p19-2x35 wurde nun mit *Bam*HI/*Nhe*I geöffnet. Mit den gleichen Enzymen wurden auch die pCR2.1-Vektoren mit den darin enthaltenen EYFP-Sequenzen restringiert. Bei der nachfolgenden Ligation der EYFP-Fragmente mit dem linearisierten p19-2x35-Vektor entstanden schließlich die Konstrukte **p2xYFP-N** und **p2xYFP-C**: pUC19-Vektoren mit dem „doppelten“ 35S-Promotor + EYFP-Sequenz + OCS-Terminator und mit unterschiedlich positionierter MCS (siehe Abb. 3.8.).

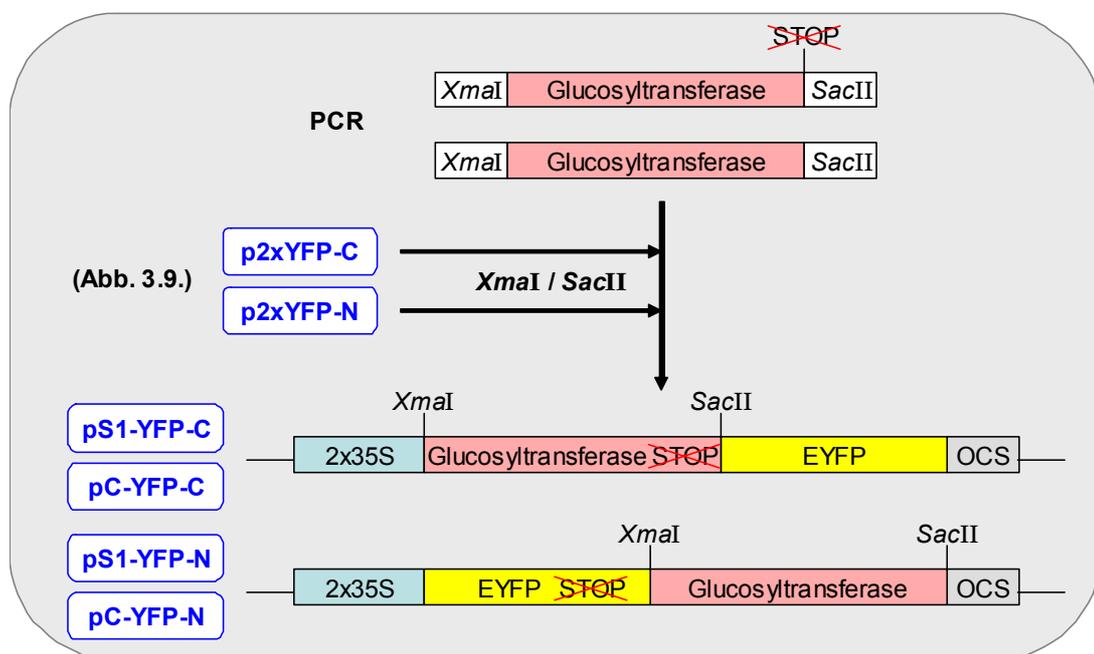


Abb. 3.9: Herstellung der Fusionsvektoren für die Expression der GCS oder der SGT – jeweils mit EYFP am N- bzw. am C-Terminus – in Pflanzen.

Die ORFs der SGT aus *A. thaliana* sowie der GCS aus *G. arboreum* wurden jeweils mit *Xma*I- und *Sac*II-Erkennungssequenzen sowohl mit als auch ohne STOP-Codon per PCR amplifiziert und in pCR2.1-Vektoren subkloniert. Die resultierenden Plasmide wurden ebenso wie die p2xYFP-N- und p2xYFP-C-Vektoren mit *Xma*I/*Sac*II Enzymen behandelt. Bei der darauffolgenden Ligation der Glucosyltransferase-Fragmente mit linearisierten Vektoren entstanden die Vektoren **pS1-YFP-C**, **pS1-YFP-N**, **pC-YFP-C** und **pC-YFP-N**. Diese Vektoren ermöglichen die Expression der genannten Glucosyltransferasen in Pflanzen, wobei die Glucosyltransferasen an ihrem C- bzw. an ihrem N-Terminus jeweils mit EYFP fusioniert sind.

In diese Vektoren (p2xYFP-N und p2xYFP-C) wurden nun die Glucosyltransferase-Sequenzen – beide nach derselben Strategie – kloniert. Hierzu wurden die ORFs der SGT aus *A. thaliana* und der GCS aus *G. arboreum* jeweils mit eingebauten Schnittstellen *Xma*I vor dem ersten ATG

und *SacII* am hinteren Sequenzende mit und ohne STOP-Codon amplifiziert (Primer: S1-1-S, S1-2-S, S1-3+S, C-1-S, C-2-S, C-3+S; Templates: pBDxxatsgt für SGT [39] und pPGa für GCS [196]). Die PCR-Produkte wurden in pCR2.1-Vektoren subkloniert (Abb. 3.9.).

Die Richtigkeit der Amplifizierungen wurde jeweils durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt (2.5.5.).

Die p2xYFP-N-, p2xYFP-C- und pCR2.1-Vektoren mit Amplifikaten wurden schließlich mit *XmaI* und *SacII* behandelt. Bei der darauffolgenden Ligation der linearisierten p2xYFP-N- und p2xYFP-C-Vektoren mit dem jeweiligen Fragment entstanden die Expressionsvektoren **pS1-YFP-C** (pUC19 mit dem „doppelten“ 35S-Promotor + SGT von *A. thaliana* (*ugt80A2*) + EYFP + OCS-Terminator), **pC-YFP-C** (pUC19 mit dem „doppelten“ 35S-Promotor + GCS von *G. arboreum* + EYFP + OCS-Terminator), wobei sich in beiden Konstrukten die EYFP-Sequenz im Leserahmen an die Glucosyltransferase-Sequenz anschließt. Des Weiteren wurden bei dieser Klonierung die Vektoren **pS1-YFP-N** (pUC19 mit dem „doppelten“ 35S-Promotor + EYFP + *ugt80A2* + OCS-Terminator) und **pC-YFP-N** (pUC19 mit dem „doppelten“ 35S-Promotor + EYFP + GCS von *G. arboreum* + OCS-Terminator) hergestellt, wobei hier in beiden Fällen die EYFP-Sequenz im Leserahmen vor dem ersten ATG der Glucosyltransferase-Sequenz plaziert ist.

3.2.3.2. Lokalisierung der SGT von *A. thaliana* (Ugt80A2) im Zellkern und im Cytosol wurde mit YFP bestätigt

Epidermale Zellen von *Allium fistulosum* wurden biolistisch mit den neuen Expressionsvektoren pS1-YFP-C (für die Expression des EYFP am C-Terminus der SGT) und pS1-YFP-N (EYFP am N-Terminus) transformiert (2.7.1.). Zur Optimierung der Expressionsdauer wurden die transformierten Zwiebelstückchen für unterschiedliche Zeiten von 6, 12, 18, 22 und 26 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Bei der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden für die Transformation mit dem pS1-YFP-C-Plasmid eine Expressionsdauer von 22 h und für die mit dem pS1-YFP-N-Plasmid eine solche von 6 h als optimal ermittelt. Als Bewertungskriterien bei dieser Untersuchung wurden die Anzahl der transformierten Zellen pro Untersuchungseinheit sowie die Fluoreszenzintensität berücksichtigt.

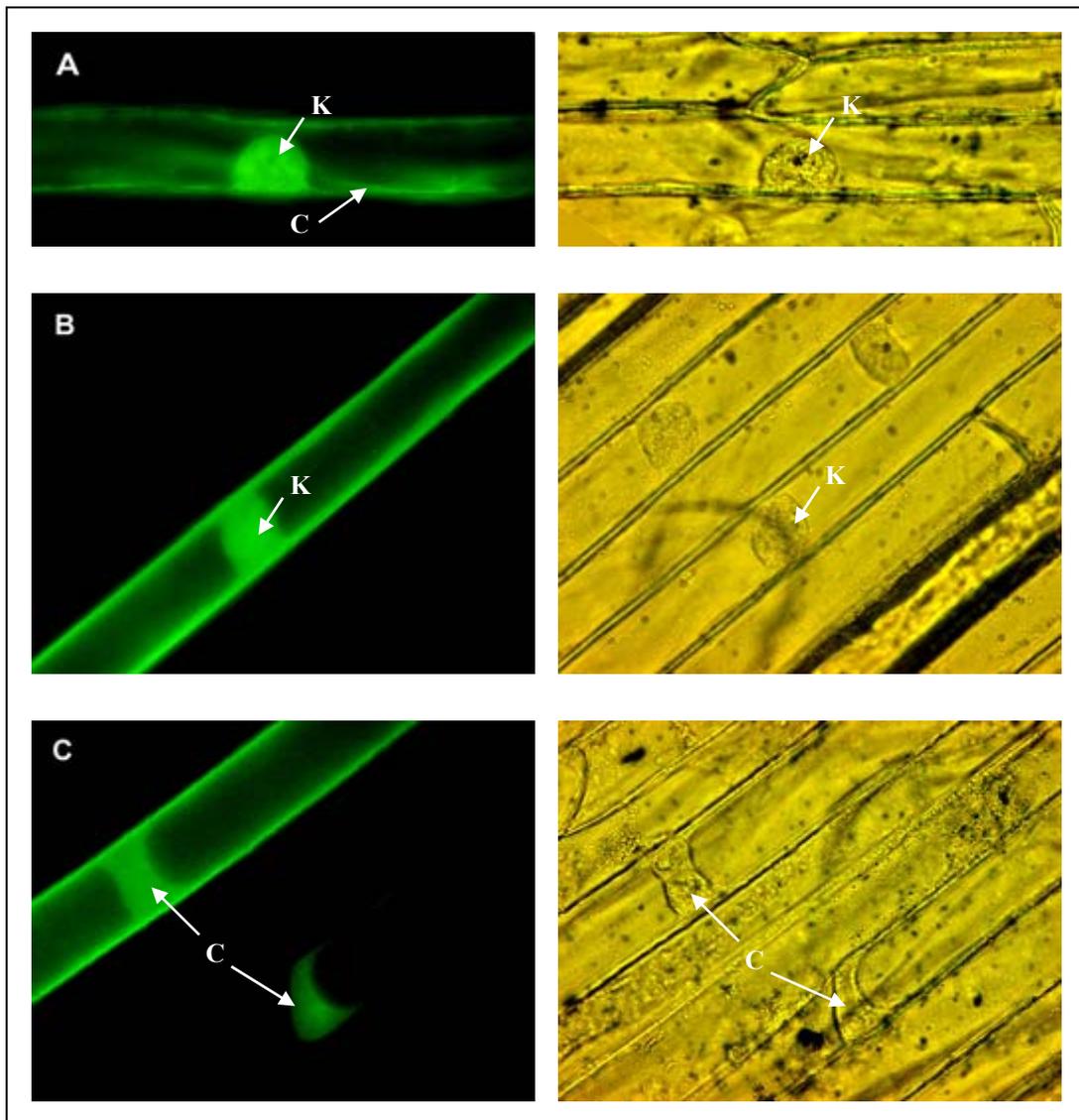


Abb. 3.10: Lokalisierung der SGT im Zellkern und im Cytosol. Epidermale Zwiebelzellen wurden mit pS1-YFP-C (Expression des EYFP am C-Terminus der SGT) und pS1-YFP-N (EYFP am N-Terminus) transient transformiert. In der Abbildung sind links die fluoreszenzmikroskopischen und rechts die dazugehörigen lichtmikroskopischen Aufnahmen aus derselben Geweberegion zu sehen. Im Fluoreszenzmikroskop konnte sowohl bei N- als auch bei C-terminaler EYFP-Fusion eine Fluoreszenz im Cytosol und im Zellkern beobachtet werden; C = Cytosol, K = Zellkern. **A:** Fluoreszenz des Fusionsproteins (C-terminales EYFP) im Zellkern und in dem sich in den Plasmasträngen befindlichen Cytosol. Die Lage des Nucleus in der Zelle ist auf dem lichtmikroskopischen Bild gut erkennbar; **B:** Fluoreszenz im Zellkern und in dem durch die Zentralvakuole an die Zellwand abgedrängten Cytosol (N-terminales EYFP); **C:** Fluoreszenz im Cytosol (N-terminales EYFP); im zentralen Abschnitt der Zelle ist eine Plasmaansammlung gut erkennbar. Der ebenfalls fluoreszierende Zellkern ist bei dieser Aufnahme nicht in dem Beobachtungsfeld.

Fluoreszenz- und konfokalmikroskopische Untersuchungen – die mehrmals wiederholt wurden – zeigten hinsichtlich der intrazellulären Lokalisierung der SGT das gleiche Bild, das bereits im Versuch 3.2.2.2. mit grün-

fluoreszierenden Fusionsproteinen festgestellt wurde. Die Fluoreszenz der Sterol-Glucosyltransferase mit C- oder N-terminalem YFP konnte in beiden Fällen im Zellkern und im Cytosol der transformierten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.10.). Die zweite wichtige Feststellung aus dem zuvor durchgeführten Versuch mit GFP konnte hier anhand konfokalmikroskopischer Aufnahmen ebenfalls bestätigt werden. Die gelb-fluoreszierenden Fusionsproteine verteilten sich homogen auf das gesamte Zellkerninnere und befanden sich somit nicht nur im Cytosol der Kerntasche (ohne Abbildung, da diese der Abb. 3.6. gleicht).

Die nun durch mehrere unabhängige Versuche bestätigte Lokalisierung von Ugt80A2 im pflanzlichen Zellkern wirft die Frage auf, wie dieses Protein ins Kerninnere gelangen kann. Die passive Diffusion durch die Kernporen, vorstellbar bei kleineren Polypeptiden, ist bei SGT-EGFP- bzw. SGT-EYFP-Fusionsproteinen aufgrund ihrer Molekülgröße nicht mehr möglich. Die berechnete Molekulare Masse beider SGT-Fusionsproteine beträgt jeweils 96 kDa (M_r SGT = 69 kDa; M_r EGFP/EYFP = 27 kDa [187]). Proteine, die größer sind als 40 kDa, können jedoch nur durch den aktiven Transport in den Zellkern gelangen und benötigen dafür bestimmte Signalsequenzen [202]. Bei der daraufhin unternommenen computergestützten Sequenzanalyse wurde in der Sequenz von Ugt80A2 tatsächlich ein potentiell Kern-Lokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localization Signal*) gefunden. Dieses NLS sollte daraufhin eliminiert und die Lokalisation von der SGT nach NLS-Deletion nochmals überprüft werden (siehe Abschnitt 3.2.4.).

3.2.3.3. Die Glucosylceramid-Synthase von *G. arboreum* ist im ER lokalisiert

Nach der biolistischen Transformation der epidermalen Zwiebelzellen (*Allium fistulosum*) mit pC-YFP-C (EYFP am C-Terminus der GCS) sowie pC-YFP-N (EYFP am N-Terminus) wurde die Expressionsdauer durch die gleiche Untersuchung wie im Experiment 3.2.3.2. optimiert. Dabei konnte für die Transformation mit beiden Plasmiden eine Expressionszeit von 12 h als optimal ermittelt werden.

Auch im Fall der Glucosylceramid-Synthase konnte die Vermutung aus dem vorhergegangenen Versuch (3.2.2.3.) hinsichtlich der intrazellulären Lokalisierung von GCS bestätigt werden. Bei den mikroskopischen Untersuchungen wurde die Fluoreszenz des C-terminalen als auch des N-terminalen GCS-EYFP-Fusionsproteins im Endoplasmatischen Reticulum beobachtet (Abb. 3.11. & 3.12.). Das kernnahe ER ist wie ein schmaler fluoreszierender Gürtel um den Zellkern herum zu sehen (*nuclear rim*). Es ist deutlich zu erkennen, daß die Fluoreszenz des GCS-EYFP-Fusionsproteins nicht im Inneren des Zellkerns vorhanden ist, sondern auf die äußere, kernnahe Region beschränkt ist (Abb. 3.11. & 3.12. links). Es sind zudem Strukturen des ER-Netzwerks zu erkennen, die wie verzweigte Stränge durch die Zelle ziehen. Auf dem konfokalmikroskopischen Bild (Abb. 3.11. rechts) ist die Struktur des kortikalen ER gut aufgelöst.

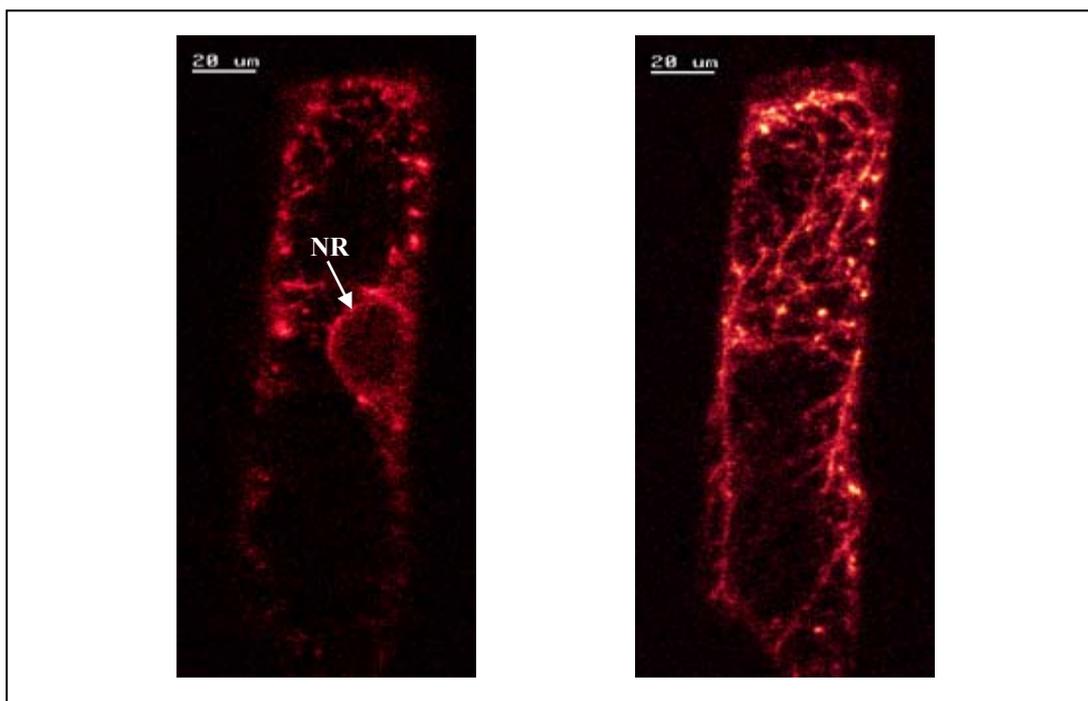


Abb. 3.11: Lokalisierung der GCS im ER (1). Konfokalmikroskopische Bilder einer mit dem pC-YFP-N-Plasmid transformierten epidermalen Zwiebelzelle (EYFP am N-Terminus der GCS). Das Bild links zeigt die zentrale Region der Zelle. Das fluoreszierende Fusionsprotein befindet sich im kernnahen Bereich (*nuclear rim* = NR). Das rechte Bild zeigt das kortikale ER-Netzwerk aus der Region zwischen der Zentralvakuole und der Zellwand. Die Fluoreszenz des YFP ist in diesen Falschfarben-Abbildungen durch das Bildbearbeitungsprogramm des Konfokalmikroskops rot dargestellt.

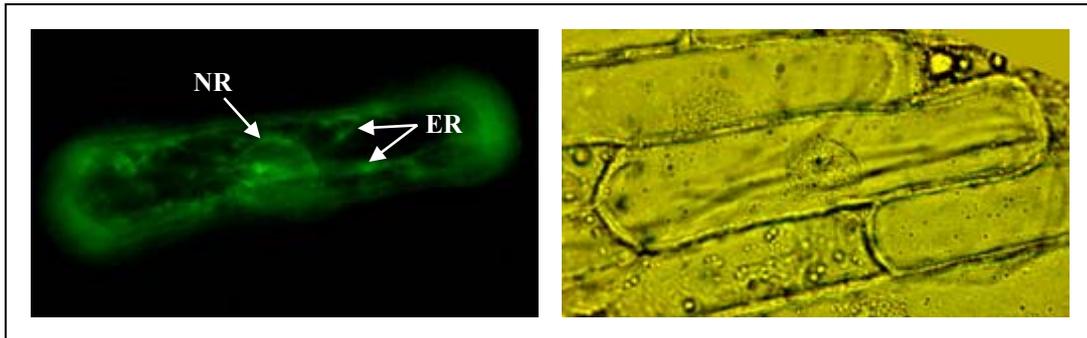


Abb. 3.12: Lokalisierung der GCS im ER (2). Fluoreszenz- (links) und lichtmikroskopische (rechts) Aufnahmen einer mit dem pC-YFP-C-Plasmid transformierten epidermalen Zwiebelzelle (EYFP am C-Terminus der GCS). NR = das kernnahe ER (*nuclear rim*); ER = Strukturen des ER-Netzwerks.

Die Einzelaufnahmen dieses zusammengesetzten Bildes stammen aus der Region zwischen der Zentralvakuole und der Zellwand, wo sich das hier gut sichtbare ER-Netzwerk befindet. Dieses ER-Netzwerk umhüllt den Tonoplasten wie eine Rinde (kortikales ER). Seine tubulären Strukturen verlaufen in einer lebenden Zelle u.a. in den transvakuolaren Plasmasträngen (1.4.1.).

3.2.4. Austausch des potentiellen NLS in der Ugt80A2-Sequenz

Im Abschnitt 3.2.3.2. wurde bereits erwähnt, daß während einer Sequenzanalyse[★] ein potentielles Kern-Lokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localization Signal*) in der Sequenz von Ugt80A2 gefunden werden konnte. Das putative NLS **KKKLKLRP** befand sich in der Mitte der SGT-Sequenz (Aminosäuren 374 – 383; siehe auch Anhang). Um festzustellen, ob sich das Zellkern-Import-Verhalten der Sterol-Glucosyltransferase durch NLS-Deletion ändert, sollte dieses putative Signal in der Sequenz der SGT verändert werden. Die in derartigen NLS stets vorhandenen positiv geladenen Aminosäuren können an Importine binden und sind somit für die NLS-Funktionalität essentiell [203, 204]. Aus diesem Grund wurden hier die

★ Die Sequenzanalyse wurde online bei "Database of nuclear localization signals" von Rajesh Nair & Phil Carter, Columbia University, New York, USA durchgeführt. Internet-Adresse: <http://cubic.bioc.columbia.edu/db/NLSdb>

drei ersten Lysine aus der Sequenz **KKKLKLRP** mittels gerichteter Mutagenese durch drei neutrale Aminosäuren ersetzt. Dafür wurde aus dem bereits bestehenden Vektor pUC35-SE (pUC19-35S2 mit *ugt80A2* + EGFP) mit *Bsu36/SacII* ein 798-bp-Fragment der SGT-Sequenz herausgeschnitten, das an seinem Ende das putative NLS enthielt. Mittels PCR wurde ein homologes DNA-Fragment amplifiziert. Durch die Primer-Auswahl wurden in diesem Fragment die Nucleotide, die die drei ersten Lysine des NLS kodierten, durch eine für drei Asparagine kodierende Nucleotid-Sequenz ersetzt (Primer: NLS-MUT-1, N-ATS-2). Die Richtigkeit der Amplifizierung wurde durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt (2.5.5.). Durch Ligation dieses PCR-Fragments mit dem zuvor linearisierten pUC35SE-Vektor entstand ein Plasmid mit der Bezeichnung **pSE-NLS**, in dem die putative NLS-Sequenz im *ugt80A2*-Gen durch die durchgeführte Mutagenese verändert wurde.

Epidermale Zellen von *Allium fistulosum* wurden biolistisch mit dem pSE-NLS-Plasmid transformiert (2.7.1.). Zur Expression des rekombinanten Proteins wurden die transformierten Zwiebelstückchen in mehreren Experimenten für eine Dauer von 18 bis 36 h bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Bei den darauffolgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (2.7.1.3.) zeigte sich die Fluoreszenz des Ugt80A2-EGFP-Fusionsproteins mit zerstörtem putativem NLS stets im Cytosol und im Zellkern der transformierten Zwiebelzellen (ohne Abbildung). Dies bedeutet, daß die eingeführte Mutation in der potentiellen NLS-Sequenz keine Veränderung hinsichtlich des Zellkern-Imports der untersuchten Sterol-Glucosyltransferase erbrachte. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, daß die durch *in-silico*-Sequenzanalyse ermittelte **KKKLKLRP**-Sequenz in diesem Fall kein Kern-Lokalisierungssignal darstellt, oder daß der Austausch von Lysin gegen Asparagin den Signalcharakter nicht grundlegend ändert.

3.2.5. Charakterisierung und intrazelluläre Lokalisierung von Ugt80B1 – einer Isoform der SGT

In den online-verfügbaren Sequenz-Datenbanken von *Arabidopsis* ist außer der bereits hier untersuchten Sterol-Glucosyltransferase Ugt80A2 noch eine

andere, putative Isoform dieses Enzyms verzeichnet. Diese zweite, als **Ugt80B1** bezeichnete Sequenz hat Sequenzidentität zu Ugt80A2 und wurde bisher noch nicht charakterisiert. In dieser Arbeit sollten diese potentielle SGT-Isoform charakterisiert und ihr Lokalisationsort in der pflanzlichen Zelle bestimmt werden.

3.2.5.1. Untersuchung der Ugt80B1 auf *in vitro* UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität

Zunächst wurde die *ugt80B1*-Sequenz[★] in einem geeigneten Expressionsvektor kloniert. Hierzu wurde der ORF von *ugt80B1* per PCR amplifiziert (2.5.4.); der RAFL14-05-O11-Klon von RIKEN GSC diente dabei als Template. Die eingesetzten spezifischen Primer enthielten Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (Primer: PET-S2-V) und *NotI* (Primer: PET-S2-H). Nach Subklonierung des PCR-Produktes im pCR2.1-Vektor (2.5.4.2.) wurde das entstandene Plasmid mit *EcoRI/NotI* behandelt. Die dabei herausgeschnittene *ugt80B1*-Sequenz wurde nun mit dem pET24c-Vektor (mit gleichen Restriktionsenzymen linearisiert) ligiert (2.5.3.4.). Dabei entstand das Plasmid pET-SGT2. Die Richtigkeit von Amplifizierung und Klonierung wurde durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt (2.5.5.).

Die mit pET-SGT2 transformierten *E. coli*-C41(DE3)-Zellen wurden nach 2.4.1. kultiviert; die Expression von Ugt80B1 wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Als Negativkontrolle dienten die C41(DE3)-Zellen, die mit pET24c-Leervektor transformiert waren. Zur Positivkontrolle wurden *E. coli*-TOP-10-Zellen mit pBASG51 (in pBAD-TOPO-Vektor) transformiert; die Expression von Ugt80A2 wurde durch Zugabe von L(+)-Arabinose induziert.

Zur Überprüfung der putativen SGT (Ugt80B1) auf UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität wurden zellfreie *E. coli*-Homogenate einem *in vitro*-Enzymtest nach Warnecke *et al.* unterzogen [8]. Bei diesem Test wurden als Substrate radioaktiv markiertes Cholesterol und nicht markierte

★ Die cDNA *ugt80B1* (RAFL14-05-O11-Klon) wurde aufgrund eines Material-Transfer-Vertrages von RIKEN Genomic Sciences Center, RIKEN Yokohama Institute, Yokohama, Japan zur Verfügung gestellt

UDP-Glucose eingesetzt (2.6.5.). Die lipophilen Reaktionsprodukte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (2.6.6.2.). Die Detektion der radioaktiven Reaktionsprodukte erfolgte mittels eines BAS 1000 Bio-Imaging Analyzer (Abbildung 3.13.). Ein nicht radioaktiv markierter Cholesterolglucosid-Standard (nicht in der Abbildung 3.13. sichtbar) wurde durch Besprühen mit α -Naphthol-Schwefelsäure detektiert.

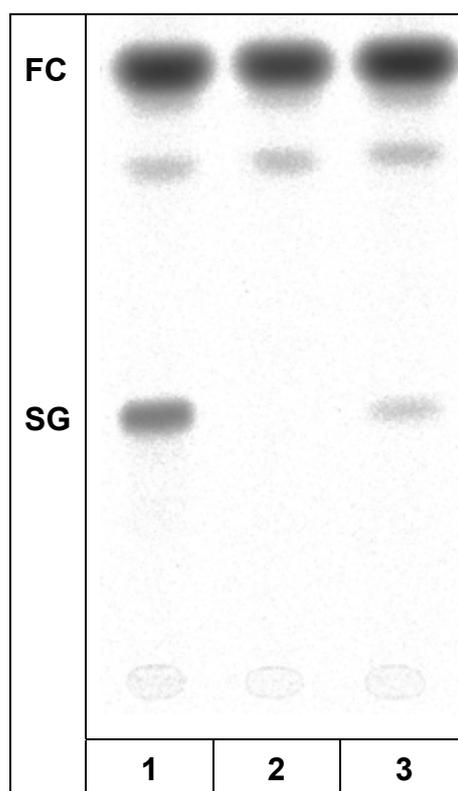


Abb. 3.13: Radioautogramm einer DC der Enzymtest-Produkte. Die rekombinanten Expressionsprodukte aus zellfreien *E. coli*-Homogenaten zeigen *in vitro* eine UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität. **FC**: freies Cholesterol; **SG**: Sterolglucosid. Spur 1: Ugt80A2 (pBASG51); Spur 2: Leervektor-Kontrolle (pET24c); Spur 3: Ugt80B1 (pET-SGT2). Die Auftrennung der lipophilen Reaktionsprodukte erfolgte in CHCl_3 : CH_3OH 85:15 (v/v).

Die R_f -Werte der in der Abbildung 3.13. mit „SG“ markierten radioaktiven Reaktionsprodukte stimmten mit dem R_f -Wert des Cholesterolglucosid-Standards überein. Es wurde festgestellt, daß das Expressionsprodukt von pET-SGT2 (Ugt80B1) eine *in vitro* UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität hat. Seine Aktivität war jedoch bei den gewählten Bedingungen (Induktion über 4 h bei 30°C; Reaktionsbedingungen des Enzymtests) im Vergleich zur SGT-Aktivität der Positivkontrolle (Ugt80A2) erheblich

geringer. Bei der eingesetzten Negativkontrolle bildete sich kein Reaktionsprodukt.

3.2.5.2. Bei der Expression der rekombinanten Ugt80B1 in eukaryotischen Zellen bildet sich Sterolglucosid

Bei dem vorausgegangenen Versuch konnte gezeigt werden, daß die putative SGT – Ugt80B1 – *in vitro* tatsächlich eine UDP-Glucose:Sterolglucosyltransferase-Aktivität aufweist. Nun galt es zu überprüfen, ob Ugt80B1 auch *in vivo* das Sterolglucosid zu produzieren vermag.

Zur funktionellen Expression von Ugt80B1 wurde das *Pichia pastoris*-Expressionssystem verwendet (2.5.3.).

Die *ugt80B1*-Sequenz wurde zunächst im binären pPIC3.5-Vektor kloniert und anschließend durch homologe Rekombination ins *Pichia*-Genom integriert (2.5.6.1.). Als Wirtsstamm wurde *P. pastoris*-JC308 verwendet, bei dem das native Sterol-Glucosyltransferase-Gen von *P. pastoris* (*UGT51B1*) deletiert war [74]. Nach der Transformation (2.5.6.2.) wurden mehrere durch ein Mut⁺/Mut^S-Screening (2.5.6.3.) detektierte positive Kolonien in Kultur genommen. Diese transgenen Hefen wurden nach 2.4.2. kultiviert, und die Expression wurde mit Methanol induziert. Zur Kontrolle wurde ein nicht-transgener *P. pastoris*-GS115-Stamm unter identischen Bedingungen angezogen und wie folgt analysiert.

Nach Isolierung der Gesamtlipide (2.6.6.1.) wurde eine Lipidanalyse nach 2.6.6. durchgeführt. Nach einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung konnte festgestellt werden, daß bei der Expression der rekombinanten Ugt80B1 in *P. pastoris*-JC308 ($\Deltaugt51$) tatsächlich Sterolglucosid entsteht (Abbildung 3.14.). Hiermit wurde bewiesen, daß es sich bei dem als *ugt80B1* bezeichneten Gen um eine funktionstüchtige Isoform der Sterol-Glucosyltransferase von *A. thaliana* handelt.

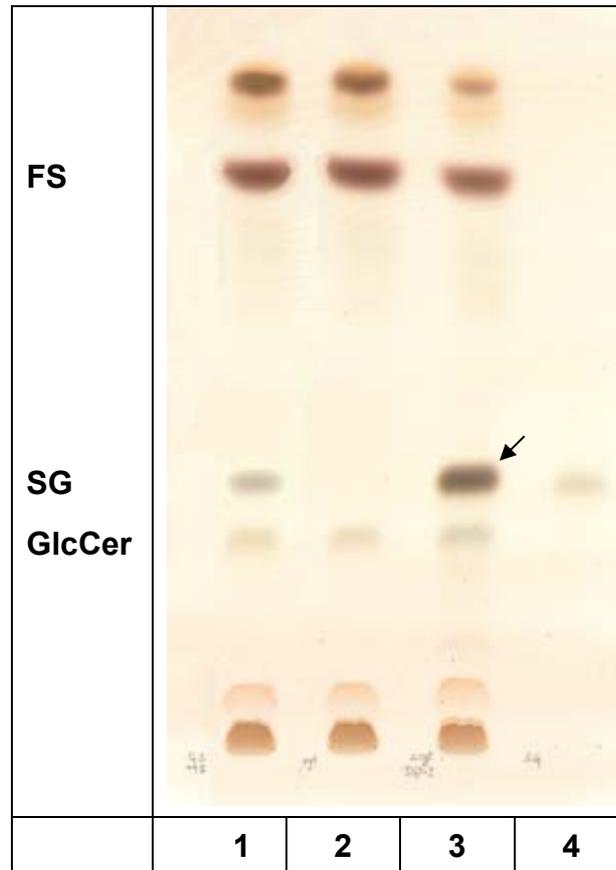


Abb. 3.14: Bei der Expression der rekombinanten Ugt80B1 in *P. pastoris*-JC308 ($\Delta ugt51$) entsteht Sterolglucosid (Pfeil). Die Gesamtlipide der *P. pastoris*-Expressionskulturen wurden in $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 85:15 (v/v) dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und die Glykolipide mit α -Naphthol-Schwefelsäure detektiert. Spur 1: *P. pastoris*-GS115 (Wildtyp); Spur 2: *P. pastoris*-JC308 ($\Delta ugt51$); Spur 3: *P. pastoris*-JC308 ($\Delta ugt51$, Ugt80B1); Spur 4: Sterolglucosid-Standard. **FS:** freie Sterole; **SG:** Sterolglucosid, **GlcCer:** Glucosylceramid.

3.2.5.3. Die beiden Isoformen der SGT von *A. thaliana* unterscheiden sich in ihrer intrazellulären Lokalisation

Zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisierung von Ugt80B1 in Pflanzen wurden zwei EYFP-Fusionskonstrukte hergestellt. Dank passender Restriktionsschnittstellen wurden die *ugt80B1*-PCR-Amplifikate (Primerpaare: S2-1-S/S2-2-S und S2-1-S/S2-3+S; RAFL14-05-O11-Klon von RIKEN GSC als Template) in die zuvor hergestellten Vektoren p2xYFP-N und p2xYFP-C nach der im Abschnitt 3.2.3.1. beschriebenen Strategie kloniert.

Nach der biolistischen Transformation der epidermalen *Allium fistulosum*-Zellen mit den erzeugten **pS2-YFP-C**- und **pS2-YFP-N**-Plasmiden konnten die Fusionsproteine mit C- bzw. N-terminaler EYFP-Domäne unter der Kontrolle des „doppelten“ 35S-Promotors exprimiert werden.

Bei den anschließenden mikroskopischen Untersuchungen wurde die Fluoreszenz der Ugt80B1-Fusionsproteine in beiden Fällen in dem Endoplasmatischen Reticulum der transformierten Zellen detektiert. Außer dem kernnahen ER (Abb. 3.15.) und den netzwerkartigen ER-Strukturen (ohne Abbildung), die in dieser Arbeit bereits bei der Lokalisierung der GCS beobachtet wurden, konnte bei diesem Versuch noch ein anderes Phänomen bemerkt werden. Im Fluoreszenzmikroskop waren mehrere Mikrometer große, längliche, stark fluoreszierende Strukturen zu sehen, die sich in der Zelle sehr mobil verhielten. Unter anderem wurde beobachtet, wie sich diese Strukturen mit Geschwindigkeiten im Bereich von mehreren Mikrometern pro Minute an den ER-Strängen entlang bewegten und sich vesikelartig von den ER-Membranen abschnürten (Abb. 3.15.).

Im Jahre 1998 konnte Gunning ähnliche Strukturen in Zellen von *Arabidopsis*-Pflanzen, die zuvor mit einem ER-Lokalisierungskonstrukt transformiert worden waren, beobachten [205]. Diese von Gunning als „*mystery organelles*“ bezeichneten Strukturen wurden später auch in transgenem Tabak gefunden; ihre Zugehörigkeit zum Endoplasmatischen Reticulum konnte bestätigt werden [206]. Matsushima *et al.* nannten sie „ER-Bodies“ und stellten fest, daß diese in *Arabidopsis* vermehrt unter Streß-Bedingungen entstehen [207]. Bei den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Strukturen könnte es sich ebenfalls um ER-Bodies handeln.

Nach der z.Z. zugänglichen Literatur ist es noch weitgehend unklar, unter welchen Bedingungen sich die ER-Bodies bilden. Matsushima *et al.* beobachteten sie in mechanisch verwundetem Gewebe von *Arabidopsis* und bei der Behandlung von Wildtyp-Pflanzen mit Methyljasmonat. Es wurde daher vermutet, daß die mögliche biologische Funktion dieser neuentdeckten ER-Strukturen mit dem pflanzeigenen Abwehrsystem zusammenhängt [208]. Jedoch wurden die ER-Bodies auch für die intakten, ungestreßten epidermalen *Arabidopsis*-Zellen beschrieben [209].

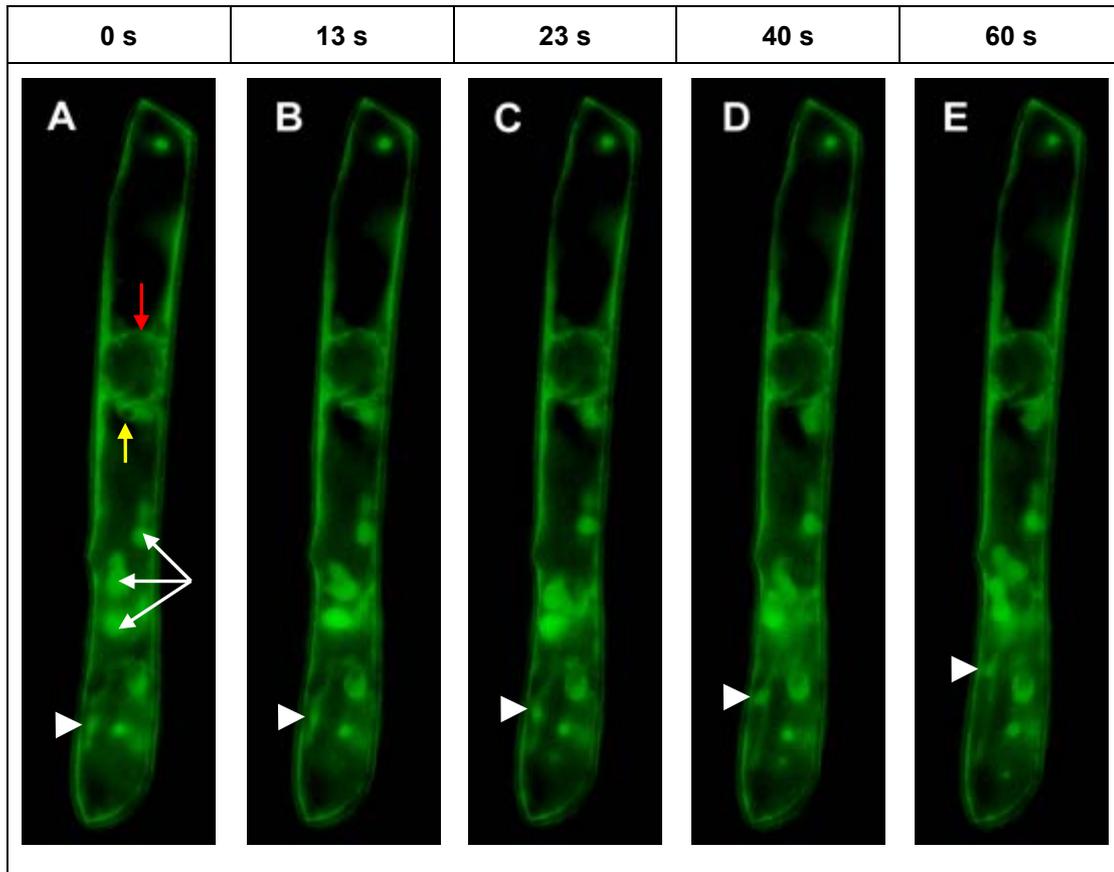


Abb. 3.15: ER-Bodies. Fluoreszenzmikroskopische Bilder einer mit dem pS2-YFP-C-Plasmid transformierten epidermalen Zwiebelzelle (EYFP am C-Terminus von Ugt80B1). In der Aufnahme A mit dem roten Pfeil markiert – das ER an der Kern-Außenmembran (kernnahes ER); mit weißen Pfeilen markiert – ER-Bodies; mit dem gelben Pfeil markiert – ein sich vom kernnahen ER abschnürendes Vesikel. In allen Aufnahmen mit weißen Pfeilköpfen markiert – ein am ER-Strang entlang laufender ER-Body.

Auch mit der konfokalmikroskopischen Technik konnte die mit dem EYFP fusionierte Ugt80B1-Isoform der Sterol-Glucosyltransferase im ER lokalisiert werden (ohne Abbildung).

Es konnte folglich festgestellt werden, daß die zwei unterschiedlichen Isoformen der SGT von *A. thaliana* an verschiedenen intrazellulären Orten lokalisiert sind. Die Ugt80A2-Isoform wurde im Cytosol und im Zellkern der pflanzlichen Zellen detektiert, während die Ugt80B1-Isoform nur im ER beobachtet wurde.

3.2.6. Expression und intrazelluläre Lokalisierung verkürzter Glucosyltransferase-Fragmente

Sequenzmotive, die als Signale für die intrazelluläre Lokalisierung eines Proteins dienen, treten oft in terminalen Bereichen auf. In dem folgenden Versuch wurden die terminalen Bereiche der GCS und der SGT eliminiert. Dadurch sollte überprüft werden, ob sich die intrazelluläre Lokalisation der verkürzten Glucosyltransferasen ändert, und ob die entsprechenden Lokalisierungssignale wirklich in den terminalen Bereichen dieser Proteine vorkommen.

Per PCR wurden DNA-Abschnitte aus den Glucosyltransferase-Sequenzen amplifiziert. Die PCR-Primer waren dabei so konzipiert, daß die terminalen Sequenzen der jeweiligen ORFs nicht mitamplifiziert wurden. Die Ugt80A2-Isoform der SGT wurde dabei an ihrem N-Terminus um 152 AS und an ihrem C-Terminus um 76 AS verkürzt. Die Ugt80B1-Isoform wurde N-terminal um 116 AS und C-terminal um 90 AS verkürzt (siehe Anhang). Dies führt dazu, daß die N-terminal verkürzten Sequenzen beider Sterol-Glucosyltransferasen mit einer Konsensus-Sequenz beginnen, die bei diesen Enzymen möglicherweise schon zur katalytischen Domäne zählt. Bei der GCS sollte der N-Terminus um die erste Transmembran-domäne (48 AS) und der C-Terminus um die putative ER-Rückhaltesequenz (10 AS) verkürzt werden (siehe Anhang).

Die C-terminal verkürzten Sequenzen wurden in den Vektor p2xYFP-N und die N-terminal verkürzten Sequenzen in den Vektor p2xYFP-C kloniert. So sollten die C-terminal verkürzten Polypeptide an ihrem N-Terminus und die N-terminal verkürzten an ihrem C-Terminus mit YFP fusioniert werden.

Dank passender Restriktionsschnittstellen (*XmaI* und *SacII*) wurden alle Klonierungen nach der selben Strategie (Abschn. 3.2.3.1.) durchgeführt[★]. Dabei wurden folgende Plasmide hergestellt: **pS1-Y-NX** (*ugt80A2* N-terminal verkürzt + EYFP), **pS1-Y-CX** (EYFP + *ugt80A2* C-terminal verkürzt), **pS2-Y-NX** (*ugt80B1* N-terminal verkürzt + EYFP), **pS2-Y-CX** (EYFP + *ugt80B1* C-terminal verkürzt), **pC-Y-NX** (GCS N-terminal verkürzt + EYFP). Die Klonierung des C-terminal verkürzten GCS-Fragments in

★ Primerpaare für *ugt80A2* N-terminal verkürzt [98]: S1-N, S1-2-S; *ugt80A2* C-t: S1-1-S, S1-C; *ugt80B1* N-t: S2-N, S2-2-S; *ugt80B1* C-t: S2-1-S, S2-C; GCS N-t: C-N, C-2-S; GCS C-t: C-1-S, C-C

p2xYFP-C blieb auch nach mehrmaliger Wiederholung ohne Erfolg und mußte leider aus zeitlichen Gründen unvollendet abgebrochen werden.

Die epidermalen *Allium-fistulosum*-Zellen wurden jeweils mit diesen Plasmiden transformiert. Bei den anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte nur in einem Fall eine Abweichung von der zuvor beobachteten Lokalisation festgestellt werden. Die Fluoreszenz der N-terminal verkürzten GCS, exprimiert als EYFP-Fusionsprotein, wurde nicht im ER – wie bei der GCS mit vollständiger Sequenz – sondern im Cytosol beobachtet (Abb. 3.16.):

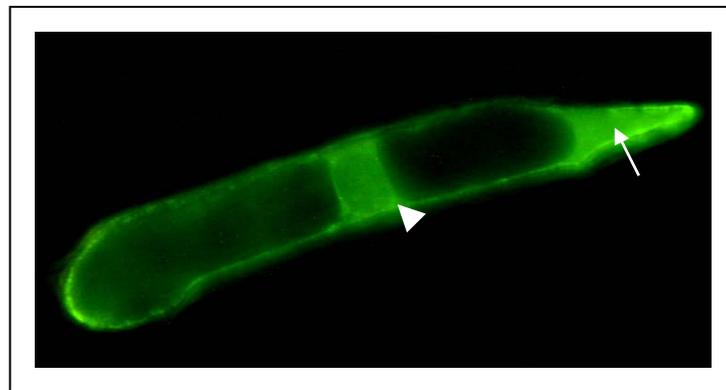


Abb. 3.16: Fluoreszenz der N-terminal verkürzten GCS (Fusionsprotein mit EYFP) in einer Zelle von *A. fistulosum*. Epidermale Zwiebelzellen wurden mit pC-Y-NX transient transformiert. Die Fluoreszenz des Fusionsproteins ist in einer Cytosol-Ansammlung im apikalen Bereich der Zelle (Pfeil) sowie in der Kerntasche (Pfeilkopf) zu sehen.

Bei allen anderen untersuchten Glucosyltransferasen führte die Verkürzung der terminalen Bereiche zu keiner Veränderung der intrazellulären Lokalisation (ohne Abbildung).

3.3. Expressionsanalyse der SGT in Pflanzen

Um festzustellen, in welchem Gewebe und Entwicklungsstadium eines Organismus sowie bei welchen Umweltbedingungen ein Gen exprimiert wird, werden oft Reportergene benutzt. Reportergene lassen sich in intaktem oder totem Gewebe leicht sichtbar machen. Bei Tieren und Hefen wird häufig das *LacZ*-Gen von *E. coli* verwendet, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Bei Pflanzen ist β -Galactosidase als Reporter gen ungeeignet, da Pflanzenzellen bereits endogene β -Galactosidase-Aktivität besitzen. Stattdessen wird hier ein Gen verwendet, das für das Enzym β -Glucuronidase kodiert (GUS). Mit dem entsprechenden Substrat X-Gluc erzeugt dieses Enzym ein blaues Reaktionsprodukt, das sich mikro- und makroskopisch leicht nachweisen läßt.

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, ein Reporter gen einzusetzen: die transkriptionelle und die translationelle Fusion. Bei der transkriptionellen Fusion wird das Reporter gen unter die Kontrolle des Promotors des zu untersuchenden Gens gestellt. Dadurch wird der Reporter in den gleichen Zellen und zur gleichen Zeit exprimiert wie das zu untersuchende Gen. Bei der translationellen Fusion wird dagegen ein artifizielles Konstrukt aus Reporterprotein und zu untersuchendem Protein hergestellt. Damit kann die subzelluläre Lokalisation des interessierenden Proteins untersucht werden, wie dies bereits hier mit fluoreszierenden Fusionsproteinen gezeigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Expressionsanalyse der Sterolglucosyltransferase von *A. thaliana* durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde das GUS-Reporter gen unter der Kontrolle des SGT-Promotors in *Arabidopsis*-Pflanzen exprimiert (transkriptionelle Fusion). Eine Expressionsanalyse der Glucosylceramid-Synthase von *G. arboreum*, deren Ergebnisse hier ebenfalls diskutiert werden, wurde parallel von Frau Inga Hillig (Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) im Rahmen ihrer Dissertation in unserem Laboratorium durchgeführt.

3.3.1. Herstellung von GUS-Fusionskonstrukten mit dem *ugt80A2*-Promotor

Zur Herstellung der GUS-Fusionskonstrukte mit dem SGT-Promotor von *A. thaliana* (*ugt80A2*) wurde der binäre Pflanzenvektor pCAMBIA1391Z (CAMBIA, Canberra, Australien) benutzt. Mit einer computergestützten Sequenzanalyse der genomischen *A. thaliana*-Sequenz wurde ein 1280 bp langer Promotorbereich ermittelt. Dieser Promotorbereich erstreckte sich rückwärts gesehen vom Anfang der kodierenden Sequenz des SGT-Gens bis zum Ende der CDS des davor liegenden Gens. Der ausgewählte Promotorbereich wurde mit Adaptoren für die Restriktionsschnittstellen *AvrII* und *SmaI* mittels PCR amplifiziert (Primer: GUS-S1-1, GUS-S1-R). Genomische DNA von *A. thaliana* diente dabei als Template. Nach der Subklonierung des PCR-Produkts in den pCR2.1-Vektor (2.5.4.2.) wurde das entstandene Plasmid mit *AvrII* und *SmaI* behandelt. Der SGT-Promotorbereich wurde dabei aus dem Vektor herausgeschnitten. pCAMBIA1391Z wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert und mit dem SGT-Promotorbereich ligiert (2.5.3.4.).

Das so entstandene Plasmid **pGUS1** enthielt den Promotorbereich von SGT aus *A. thaliana* (*ugt80A2*) und die im fortlaufenden Leserahmen darauffolgende GUS-Sequenz. Zur Transformation von Pflanzen wurde zunächst der *A. tumefaciens*-Stamm ATHV C58C1 mittels Elektroporation mit diesem Plasmid transformiert (2.7.3.1.). Diese transgenen *A. tumefaciens*-Zellen dienten schließlich zur Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen (2.7.3.2.).

3.3.2. Das Sterol-Glucosyltransferase-Gen wird in der gesamten Pflanze exprimiert

Die mit pGUS1 stabil transformierten, etwa 2 Wochen alten, transgenen *A. thaliana*-Pflanzen wurden einer GUS-Färbung nach 2.6.7. unterzogen. Dabei wurde beobachtet, daß die blaue Färbung nach etwa 2,5 h Inkubation in der Färbelösung das gesamte Gewebe umfaßte. Durch längere Inkubationszeiten (bis zu 8 h) konnte keine Ausdehnung der Färbung beobachtet werden; die nach 2,5 h bereits vorhandene Färbung wurde jedoch in ihrer Intensität verstärkt. Die unmittelbar anschließend durchgeführten

makroskopischen Analysen mit einer Lupe ergaben, daß die GUS-Färbung in allen analysierten pflanzlichen Organen wie Keimblättern, Primärblättern, Wurzeln und Sproßachse vorhanden war (Abbildungen 3.17. & 3.18.).

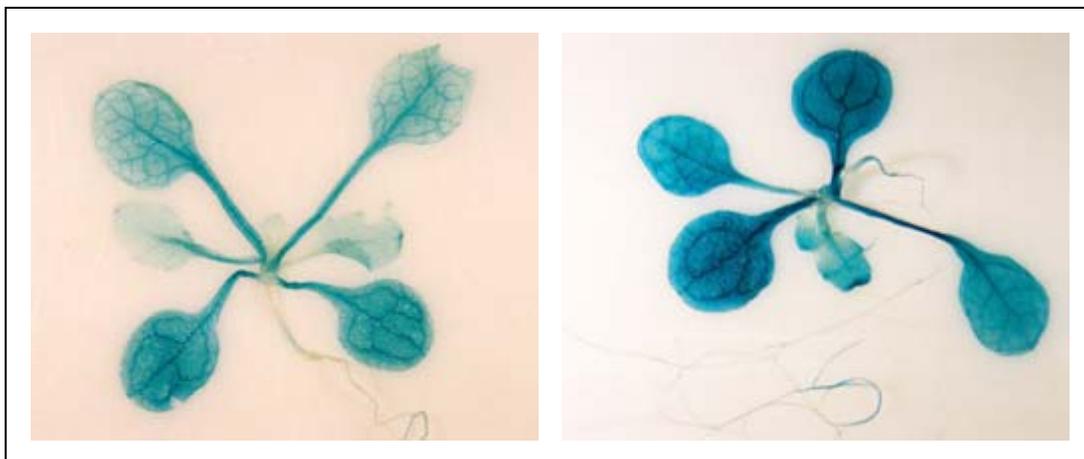


Abb. 3.17: Expressionsanalyse von Ugt80A2 (ganze Pflanze). Färbung von *A. thaliana*-Pflanzen nach einer 2,5-stündigen (links) und nach einer 4-stündigen GUS-Inkubation (rechts). Die Pflanzen waren stabil mit pGUS1 transformiert. Es ist deutlich zu sehen, daß die GUS-Färbung in Keimblättern, Primärblättern, Wurzeln und Sproßachse auftritt.

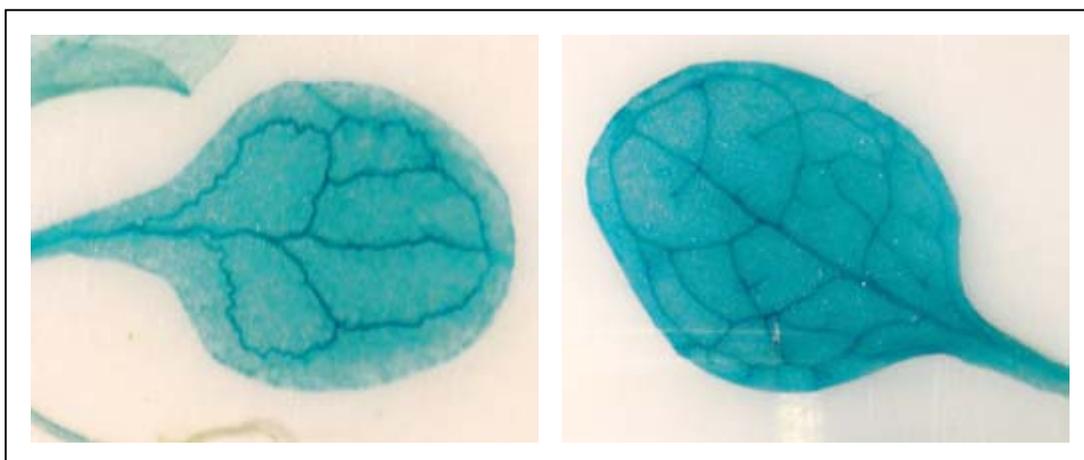


Abb. 3.18: Expressionsanalyse von Ugt80A2 (Blätter). Keimblatt (links) und Primärblatt (rechts) von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen nach einer GUS-Färbung. Die Färbung tritt in allen Blatt-Geweben auf. Das Gewebe in der Leitbündelregion ist kompakter und weniger vakuolisiert. Deshalb kann sich dort im Vergleich zum umliegenden Gewebe mehr Farbstoff einlagern, was in einer stärkeren Färbung des Leitbündels resultiert.

Die anschließenden mikroskopischen Analysen zeigten, daß sich die Färbung in allen Geweben ausgebildet hatte (ohne Abbildung). Dies bedeutet, daß das unter der Kontrolle des nativen SGT-Promotors stehende GUS-Gen in allen

Gewebe und Organen der Pflanze exprimiert wurde. Daraus läßt sich schließen, daß auch das native *ugt80A2*-Gen bei *A. thaliana* in der gesamten Pflanze exprimiert wird, und die Sterolglucosyl-transferase folglich in allen untersuchten pflanzlichen Geweben vorhanden sein muß.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden jeweils mehrere Analysen an zwei verschiedenen transgenen Pflanzen-Linien vorgenommen. Die mikro- und die makroskopischen Untersuchungen der GUS-Färbung führten bei beiden Pflanzen-Linien zu den gleichen Beobachtungen. Als Negativkontrolle wurden mehrere mit einem pCAMBIA1391Z-Leervektor transformierte, transgene Pflanzen-Linien hergestellt und der gleichen Behandlung unterzogen. Bei den Analysen der Kontrollpflanzen konnte keine GUS-Färbung festgestellt werden (Abbildung 3.19.). Die Transformation und die Analysen dieser Kontrollpflanzen wurden von Frau Inga Hillig (Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) ausgeführt.

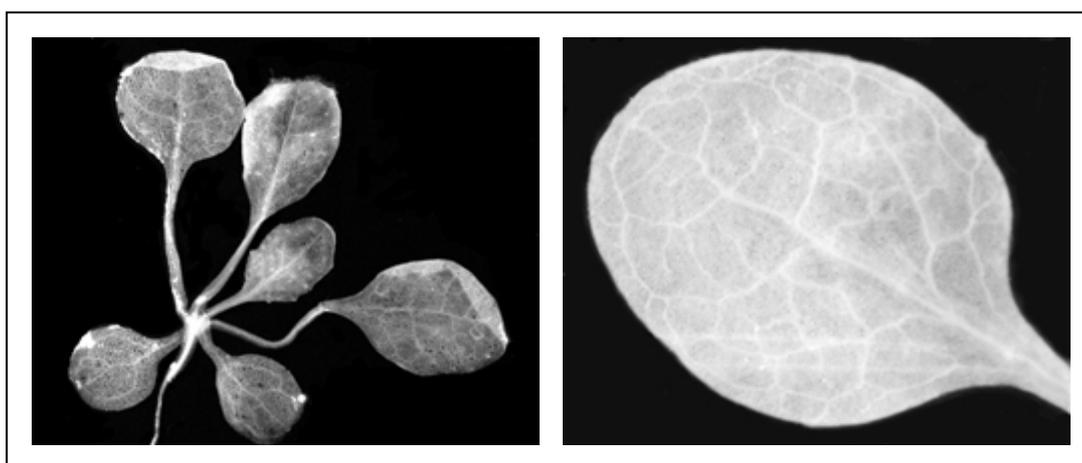


Abb. 3.19: Transgene *A. thaliana*-Kontrollpflanzen. Die zur Negativkontrolle mit einem pCAMBIA1391Z-Leervektor transformierten Pflanzen zeigten nach einer GUS-Färbung keinerlei Spuren des blauen Farbstoffs.

3.4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine subzelluläre Lokalisierung der Sterol-Glucosyltransferasen aus *A. thaliana* und der Glucosylceramid-Synthase aus *G. arboreum* in Zellen von *Allium fistulosum* durchgeführt. Die Ugt80A2-Isoform der SGT wurde im Zellkern und im Cytosol detektiert. Die zweite, uncharakterisierte, putative Isoform der SGT – die Ugt80B1 – wurde auf ihre *in-vitro*-Aktivität untersucht, in eukaryotischen Zellen funktional exprimiert und dabei als Sterol-Glucosyltransferase identifiziert. Diese Isoform der SGT konnte im ER lokalisiert werden. Die GCS wurde ausschließlich im ER detektiert.

Zusätzlich zu den Lokalisierungsversuchen wurde in dieser Arbeit eine Expressionsanalyse der Sterol-Glucosyltransferase Ugt80A2 in Pflanzen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß dieses Enzym in der gesamten Pflanze exprimiert wird, und in allen untersuchten Geweben vorhanden ist. Eine durch Mitarbeiter unseres Laboratoriums parallel dazu durchgeführte Expressionsanalyse der Glucosylceramid-Synthase zeigte das gleiche Ergebnis. Auch die GCS wird in allen untersuchten pflanzlichen Geweben und Organen exprimiert (persönliche Mitteilung von Inga Hillig, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde die Glucosylceramid-Synthase der Säuger im Golgi-Apparat lokalisiert. Diese GCS ist ein integrales Membranprotein, deren aktives Zentrum an der cytosolischen Seite der Golgi-Membran liegt [67, 69, 70]. Die GCS aus *Drosophila*-Fruchtfliege wurde hingegen nicht nur im Golgi, sondern auch im kernnahen ER gefunden [127].

Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lokalisierung in Pflanzen wurde die Glucosylceramid-Synthase aus Baumwolle ausschließlich im ER detektiert. Sie konnte in keinem anderen Membransystem, wie beispielsweise dem Golgi-Apparat, beobachtet werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde (1.2.3.1.), findet die Ceramidbiosynthese im ER statt [63, 64]. Bei der pflanzlichen Synthese des Glucosylceramids war es jedoch bisher unbekannt, ob die Glucose wie bei Säugertieren erst nach der vollständigen Derivatisierung des Ceramidgrundgerüsts im Golgi an das Ceramid angefügt wird, oder möglicherweise schon vorher im ER [67]. Durch die hier

gezeigte Lokalisierung einer pflanzlichen GCS im ER erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß die Glucosylierung des Ceramids schon am Ort der Ceramidbiosynthese im ER stattfindet. Diese Feststellung wird darüberhinaus durch das Vorhandensein eines putativen ER-Rückhaltesignals am C-Terminus der untersuchten GCS unterstützt (1.2.3.2.).

Die Hypothese von Lynch *et al.* aus dem Jahr 2000, nach der die GCS auf der apoplastischen Seite der Plasmamembran vermutet wird [126], kann durch die hier durchgeführten Lokalisierungsversuche jedoch nicht völlig entkräftet werden. Nach dieser Hypothese dient das Sterolglucosid als Glucose-Donor bei der Synthese von Glucosylceramid an der Plasmamembran. 2003 konnte jedoch festgestellt werden, daß das Ceramid SG-unabhängig durch UDP-Glucose glucosyliert wird [74]. Von daher könnte es möglicherweise zwei verschiedene Glucosylceramid-Synthasen geben: das Enzym in der PM, das SG als Glucose-Donor benötigt, und ein anderes, UDP-Glucose-abhängiges Enzym im ER. Im Genom von *A. thaliana* konnte jedoch nur eine einzige Sequenz mit Ähnlichkeit zur GCS aus Baumwolle gefunden werden. Diese *Arabidopsis*-GCS ist daher sehr wahrscheinlich ebenfalls UDP-Glucose-abhängig und im ER lokalisiert.

Die Lokalisierung der N-terminal verkürzten GCS im Cytosol läßt vermuten, daß sich innerhalb der ersten 48 Aminosäuren dieses Polypeptids ein ER-Lokalisierungssignal befindet. Aufgrund der Länge des deletierten Sequenzabschnitts ließ sich die mögliche Signalsequenz jedoch nicht genau erkennen und konnte auch nicht bei Sequenzanalysen *in silico* identifiziert werden. Um diese putative Signalsequenz am N-Terminus der GCS zu bestimmen, sind weitere Untersuchungen notwendig, die aus zeitlichen Gründen innerhalb dieser Arbeit nicht mehr möglich waren.

Die in der vorliegenden Arbeit funktional exprimierte Sterolglucosyltransferase-Isoform von *A. thaliana* – Ugt80B1 – wurde in einer Studie von Carter *et al.* in der Tonoplastenmembran detektiert [131]. Dieses Ergebnis widerspricht der hier durchgeführten Lokalisierung dieses Enzyms im Endoplasmatischen Reticulum. Allerdings wurden von Carter *et al.* in der selben Studie drei weitere Proteine beschrieben, die jeweils ein ER-Retentionssignal enthielten und trotzdem in der Tonoplastenmembran detektiert wurden. In zwei anderen Studien konnte außerdem beobachtet werden, wie die aus dem ER stammenden, proteintransportierenden Vesikel – die ER-Bodies – unter bestimmten Bedingungen mit der Tonoplasten-

membran fusionierten [209, 210]. Diesen Berichten zufolge enthielten die ER-Bodies größere Mengen einer vakuolären β -Glucosidase, die so verpackt zum Tonoplasten transportiert wurde. Hayashi *et al.* vermuten deshalb, daß die ER-Bodies in ein bisher unbekanntes Proteintransportsystem involviert sind, das sich von dem schon lange bekannten Sekretorischen Transportweg unterscheidet. Im letzteren können ER-Proteine den Tonoplasten nur durch eine Golgi-Passage erreichen [139]. In dem neu-beschriebenen Transportsystem dagegen sollen die Proteine in ER-Bodies direkt zur Vakuole gelangen. Am Ende des Transports fusionieren die ER-Bodies schließlich mit der Tonoplastenmembran [209].

Auf diese Weise könnte auch die SGT, die in vorliegender Arbeit als YFP-Fusionsprotein in ER-Bodies beobachtet wurde, zur Tonoplastenmembran gelangen. Außer in ER-Bodies konnte hier die Fluoreszenz von Ugt80B1-EYFP mehrmals in unbestimmten sphärischen Strukturen beobachtet werden. Diese hatten die Gestalt sehr großer Vesikel (Abb. 3.20.) und ähnelten den von Brandizzi *et al.* beschriebenen „*spherical organelles*“, die in Protoplasten von *Arabidopsis* als Vakuolen identifiziert wurden [211].

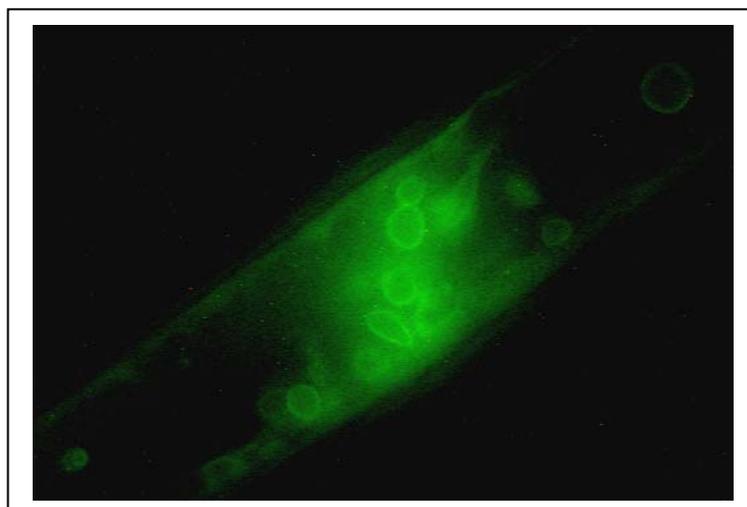


Abb. 3.20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von „*spherical organelles*“ in einer Zelle von *A. fistulosum*. Epidermale Zwiebelzellen wurden mit pS2-YFP-C transient transformiert (Ugt80B1 mit EYFP am C-Terminus). Die YFP-Fluoreszenz ist in sphärischen Strukturen lokalisiert. Die Fluoreszenz dieses Fusionsproteins wurde außerdem in ER-Bodies beobachtet (Abb. 3.15.).

Möglicherweise wird Ugt80B1 postsynthetisch in ER-Bodies „verpackt“ und anschließend, unter Umgehung des Golgi-Apparates, zum Tonoplasten transportiert. Diese These wird zudem durch die Tatsache bekräftigt, daß bei

keinem der hier durchgeführten Experimente Fluoreszenz in Golgi-ähnlichen Strukturen beobachtet werden konnte. Die mögliche Tonoplasten-Lokalisation von Ugt80B1 wurde hier jedoch nicht experimentell bestätigt. Andererseits ist seit langem bekannt, daß Tonoplastenmembrane *in vitro* SGT-Aktivität aufweisen [117].

Die Lokalisierung von Ugt80A2-Isoform der SGT im Zellkern war überraschend. Nach aktuellen Untersuchungen übernehmen die Kernlipide außer strukturellen Funktionen überwiegend Aufgaben als *second messengers* [212, 213] und sind in andere Funktionen, u.a. in die Reorganisation des Chromatins und in das Splicing der pre-mRNA involviert [214-216]. Es ist jedoch unklar, welche Rolle die SGT im Zellkern spielen soll, zumal das Produkt dieses Enzyms – das Sterolglucosid – bisher nicht im Zellkern detektiert werden konnte. Allerdings liegen bisher keine umfangreiche Lipidanalysen gereinigter Zellkerne aus pflanzlichen Geweben vor. Das Vorhandensein des SG im Zellkern ist daher nicht völlig auszuschließen. Nach der zur Zeit zugänglichen Literatur wurde in bisherigen Studien noch nie explizit nach dem SG im Nucleus gesucht. Es ist auch denkbar, daß der Anteil an SG im Vergleich zu den anderen Kernlipiden sehr gering sein könnte, so daß die bisher zur Identifizierung von Kernlipiden angewendeten Nachweismethoden nicht empfindlich genug waren.

Ebenfalls unklar bleibt, wie Ugt80A2 in das Kerninnere gelangt. Der passive Weg durch die Kernporen, möglich bei kleineren Polypeptiden, ist für Ugt80A2-GFP-Fusionsproteine auszuschließen. Die berechnete Molekulare Masse dieses Proteins beträgt 96 kDa[★] ($M_{\text{r Ugt80A2}} = 69 \text{ kDa}$; $M_{\text{r GFP}} = 27 \text{ kDa}$ [187]). Proteine, die größer als 40 kDa sind, können jedoch nur durch den aktiven Transport in den Zellkern gelangen und benötigen bestimmte Signalsequenzen für die Bindung an Importine [202, 217]. Das in der Sequenz von Ugt80A2 durch *in-silico*-Sequenzanalyse ermittelte putative NLS stellte sich in einem zusätzlichen Experiment jedoch nicht als Kern-Lokalisierungssignal heraus.

Es bleibt festzuhalten, daß die Fragen, die in Zusammenhang mit der Kernlokalisierung von Ugt80A2 stehen, durch zusätzliche Studien geklärt werden müssen, wofür mit dieser Dissertation ein Grundstein gelegt wurde.

★ die Molekulare Masse des Ugt80A2-YFP-Fusionsproteins beträgt ebenfalls 96 kDa

Die Lokalisierung von Ugt80A2 im Cytosol wird von einer Proteom-weiten Studie, in welcher SGT aus *S. cerevisiae* (Ugt51p) ebenfalls im Cytosol detektiert wurde, indirekt unterstützt [129]. Überraschend ist dabei, daß sich Ugt80A2 bei früheren Untersuchungen [39] wie auch in dieser Arbeit biochemisch als Membranprotein verhalten hat. Möglicherweise hat dieses Enzym zwei Substrate: ein membrangebundenes und ein lösliches im Cytosol. Es ist denkbar, daß sich Ugt80A2 vorwiegend im Cytosol aufhält und in bestimmten Entwicklungsstadien der Zelle mit subzellulären Membranen assoziiert wird. Eine solche stadienspezifische Enzym-Lokalisierung wurde bereits für die SGT aus der fakultativ methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* beschrieben [218]. Dieses Hefe-Enzym (Ugt51B1) assoziiert während des Peroxisomen-Abbaus mit Membranen des MIPA (*micropexophagic apparatus*). Die PH-Domäne und die GRAM-Domäne, die in der Sequenz von Ugt51B1 vorhanden sind, könnten dabei für den Kontakt und die Assoziation mit MIPA-Membranen verantwortlich sein. Jedoch besitzt Ugt80A2 keine derartigen Domänen oder Transmembranregionen sowie keine bekannten Signalsequenzen, was während dieser Arbeit *in silico* überprüft wurde (1.1.4.). Die Hypothese der stadienspezifischen Lokalisierung von Ugt80A2 bedarf also einer experimentellen Überprüfung.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem eine Expressionsanalyse von *ugt80A2* durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß dieses Gen in der gesamten Pflanze exprimiert wird. Sterolglucosid wurde stets in verschiedenen Geweben und Organen einer Pflanze detektiert (siehe den Abschnitt 1.3.5.), so daß die Sterol-Glucosyltransferase folglich ebenfalls in diversen pflanzlichen Geweben und Organen vorhanden sein müßte. Dieses wurde von der hier durchgeführten Expressionsanalyse bestätigt. Das Ergebnis dieser Untersuchung wird zusätzlich durch eine Studie von Meßner *et al.* gestützt [219]. Bei einer *Nothern*-Analyse wurde die Transkription des Ugt80A2-Gens in allen untersuchten Organen (Blätter, Wurzeln, Stengel, Blüten und Schoten) nachgewiesen.

3.5. Zusammenfassung

Glucosylceramid und Sterolglucosid fungieren nicht nur als Strukturkomponenten biologischer Membranen, es mehren sich vielmehr auch die Hinweise, daß sie in regulatorischer Weise an ganz unterschiedlichen Funktionen von Pflanzen- und Pilzzellen beteiligt sind. Der jeweils letzte Schritt ihrer Biosynthese wird von der Glucosylceramid-Synthase (GCS) und der Sterol-Glucosyltransferase (SGT) katalysiert. Die intrazelluläre Lokalisation dieser Enzyme in Pflanzen war vor Beginn der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt, obwohl eine solche Lokalisierung zur Aufklärung von Funktionen der entsprechenden Glucolipide unerlässlich ist. In dieser Arbeit ist es gelungen die zwei Isoformen der SGT aus *Arabidopsis thaliana* und die GCS aus *Gossypium arboreum* in pflanzlichen Zellen zu lokalisieren.

Die durch frühere Studien bekannte Ugt80A2-Isoform der SGT wurde im Zellkern und im Cytosol detektiert. Die Funktion dieses Enzyms im Zellkern ist unklar, ihre Klärung bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Eine andere putative Isoform der SGT aus *A. thaliana* – Ugt80B1 – wurde hier erstmals funktionall charakterisiert worden: *in vitro* wurde sie als UDP-Glucose:Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität gemessen und *in vivo* in eukaryotischen Zellen funktional exprimiert. Diese SGT-Isoform wurde in den vom Endoplasmatischen Reticulum (ER) abstammenden vesikulären Strukturen – den ER-Bodies – lokalisiert. In diesem Zusammenhang sind Publikationen relevant, in denen ein Transport von ER-Bodies zum Tonoplasten beobachtet wurde, so daß eine mögliche Lokalisierung von Ugt80B1 in der Tonoplastenmembran nicht ausgeschlossen werden soll.

Die GCS wurde ausschließlich im ER beobachtet. Daher erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß die Glucosylierung des Ceramids bei Pflanzen nicht wie bei Tieren im Golgi-Apparat, sondern im ER erfolgt.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit eine Expressionsanalyse der SGT (Ugt80A2) in Pflanzen durchgeführt. Dazu wurde ein Reportergen unter der Kontrolle des SGT-Promotors in *A. thaliana* exprimiert. Diese Versuche zeigten, daß die SGT in der gesamten Pflanze exprimiert wird und daß das Enzym in allen Zellen der untersuchten Gewebe und Organe vorhanden ist.

Literaturverzeichnis

1. Moss, G.P., *The nomenclature of steroids: recommendations by the IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature*. Eur. J. Biochem. **186**: 429-458, 1989.
2. Hartmann, M.A., *Plant sterols and the membrane environment*. Trends Plant Science **3**: 170-175, 1998.
3. Wojciechowski, Z.A., *Biochemistry of Phytosterol Conjugates*, in *Physiology and Biochemistry of Sterols*, G.W. Patterson and W.D. Nes, Editors, American Oil Chemists Society, Illinois, 361-395, 1991.
4. Ghannoum, M.A., Janin, G., Khamis, L. and Radwan, S.S., *Dimorphism-associated Variations in the Lipid Composition of Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. **132**: 2367-2375, 1986.
5. Hirai, Y., Haque, M., Yoshida, T., Yokota, K., Yasuda, T. and Oguma, K., *Unique cholesteryl glucosides in Helicobacter pylori: composition and structural analysis*. J. Bacteriol. **177**: 5327-33, 1995.
6. Esders, T.W. and Light, R.J., *Occurrence of a uridine diphosphate glucose: sterol glucosyltransferase in Candida bogoriensis*. J. Biol. Chem. **247**: 7494-7, 1972.
7. Parodi, A.J., *Synthesis of steryl glucoside in Bakers yeast*. Acta Physiol. Lat. Am. **26**: 430-3, 1976.
8. Warnecke, D., Erdmann, R., Fahl, A., Hube, B., Muller, F., Zank, T., Zahringer, U. and Heinz, E., *Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Pichia pastoris, and Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. **274**: 13048-59, 1999.
9. Sakaki, T., Zahringer, U., Warnecke, D.C., Fahl, A., Knogge, W. and Heinz, E., *Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in Pichia pastoris, Rhynchosporium secalis and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress*. Yeast **18**: 679-95, 2001.
10. Murakami-Murofushi, K., Nakamura, K., Ohta, J., Suzuki, M., Suzuki, A., Murofushi, H. and Yokota, T., *Expression of poriferasterol monoglucoside associated with differentiation of Physarum polycephalum*. J. Biol. Chem. **262**: 16719-23, 1987.
11. Smith, P.F., *Biosynthesis of cholesteryl glucoside by Mycoplasma gallinarum*. J. Bacteriol. **108**: 986-91, 1971.
12. Gil, B.-M., Kubler-Kielb, J., Coxon, B., Yergey, A. and Schneerson, R., *A newly discovered cholesteryl galactoside from Borrelia burgdorferi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 7913-7918, 2003.
13. Hungund, B.L., Dayal, B., Dayal, V.K. and Salen, G., *In vivo incorporation of [2-14C]mevalonic acid into rat brain complex glycolipids: characterization of glycosylsterols in mammalian brain*. Chem. Phys. Lipids **69**: 167-73, 1994.
14. Kunitomo, S., Kobayashi, T., Kobayashi, S. and Murakami-Murofushi, K., *Expresion of cholesteryl glucoside by heat shock in human fibroblasts*. Cell Stress Chaperones **5**: 3-7, 2000.

15. Hayami, M., Okabe, A., Sasai, K., Hayashi, H. and Kanemasa, Y., *Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms*. J. Bacteriol. **140**: 859-63, 1979.
16. Bloch, K.E., *Sterol structure and membrane function*. CRC Crit. Rev. Biochem. **14**: 47-92, 1983.
17. Rothblat, G.H. and Smith, P.F., *Nonsaponifiable lipids of representative pleuropneumonia-like organisms*. J. Bacteriol. **82**: 479-91, 1961.
18. Livermoore, B.P., Bey, R.F. and Johnson, R.C., *Lipid methabolism of Borrelia hermsii*. Infect. Immun. **20**: 215-220, 1978.
19. Patel, K.F., Smith, P.F. and Mayberry, W.R., *Comparison of lipids from Spiroplasma citri and corn stunt spiroplasma*. J. Bacteriol. **136**: 829-831, 1978.
20. Duperon, R., Doireau, P. and Duperon, P., *Presence of steryl glycosides and amyirin glycosides in a blue-green alga Nostoc commune and a red alga Porphyridium sp.*, in *Biogenesis and Function of Plant Lipids*, P. Mazliak, et al., Editors, 445-447, 1980.
21. Parks, L.W., McLean-Bowen, C., Taylor, F.R. and Hough, S., *Sterols in yeast subcellular fractions*. Lipids **13**: 730-5, 1978.
22. Ramgopal, M. and Bloch, K., *Sterol synergism in yeast*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 712-715, 1982.
23. Muller, F., *Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der Sterolglucosyltransferase aus Pichia pastoris*, in *Fachbereich Biologie*. Universität Hamburg, Hamburg, 1999.
24. Zank, T.K., *Klonierung und Expression neuartiger Sterol-Glucosyltransferasen*, in *Fachbereich Biologie*. Universität Hamburg, Hamburg, 1998.
25. Hase, A., *Isolation and characterization of a glycolipid from Dictyostelium discoideum*. Arch. Biochem. Biophys. **210**: 280-8, 1981.
26. Wojciechowski, Z.A., Zimowski, J., Zimowski, J.G. and Lyznik, A., *Specificity of sterol-glucosylating enzymes from Sinapis alba and Physarum polycephalum*. Biochim. Biophys. Acta **570**: 363-70, 1979.
27. Guo, D.A., Venkatramesh, M. and Nes, W.D., *Developmental regulation of sterol biosynthesis in Zea mays*. Lipids **30**: 203-19, 1995.
28. Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P. and Schaller, H., *The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1*. Plant J. **25**: 605-15, 2001.
29. Bergenstrahle, A., Borga, P. and Jonsson, L., *Sterol composition and synthesis in potato tuber discs in relation to glycoalkaloid synthesis*. Phytochemistry **41**: 155-160, 1996.
30. Christie, W.W., *Sterols and sterol esters: structure, occurrence, biochemistry and analysis*. Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland, 2005.
31. Persson, M., *Sterol levels in potato plants in response to light and wounding*, in *Institutionen for vaxtbiologi och skogsgenetik*. University of Uppsala, Uppsala 22, 2003.

32. Schaller, H., Bouvier-Nave, P. and Benveniste, P., *Overexpression of an Arabidopsis cDNA encoding a sterol-C24(1)-methyltransferase in tobacco modifies the ratio of 24-methyl cholesterol to sitosterol and is associated with growth reduction*. Plant Physiol. **118**: 461-9, 1998.
33. Benveniste, P., *Sterol Metabolism*, in *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, 31, 2002.
34. Valkonen, J.P.T., Keskiälto, M., Vasara, T. and Pietilä, L., *Potato Glycoalkaloids: a burden or a blessing?* Crit. Rev. Plant Sci. **15**: 1-20, 1996.
35. Clouse, S.D. and Sasse, J.M., *BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **49**: 427-451, 1998.
36. Hartmann, M.A. and Benveniste, P., *Plant membrane sterols: isolation, identification and biosynthesis*. Methods Enzymol. **148**: 632-650, 1987.
37. Hou, C.T., Umemura, Y., Nakamura, M. and Funahashi, S., *Enzymatic synthesis of steryl glucoside by a particulate preparation from immature soybean seeds*. J. Biochem. (Tokyo) **63**: 351-60, 1968.
38. Warnecke, D.C. and Heinz, E., *Purification of a Membrane-Bound UDP-Glucose: Sterol [beta]-D-Glucosyltransferase Based on Its Solubility in Diethyl Ether*. Plant Physiol. **105**: 1067-1073, 1994.
39. Warnecke, D.C., Baltrusch, M., Buck, F., Wolter, F.P. and Heinz, E., *UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in Escherichia coli*. Plant Mol. Biol. **35**: 597-603, 1997.
40. Ullmann, P., Ury, A., Rimmel, D., Benveniste, P. and Bouvier-Nave, P., *UDP-glucose sterol beta-D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic properties and lipid dependence*. Biochimie **75**: 713-23, 1993.
41. Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G., *Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence*. J. Mol. Biol. **300**: 1005-16, 2000.
42. Yano, I., Imaizumi, S., Tomiyasu, I. and Yabuuchi, E., *Separation and analysis of free ceramide containing 2-hydroxy fatty acids in Sphingobacterium species*. FEMS Microbiol. Lett. **20**: 449-453, 1983.
43. Miyagawa, E., Azuma, R., Suto, T. and Yano, I., *Occurrence of free ceramides in Bacteroides fragilis NCTC 9343*. J. Biochem. (Tokyo) **86**: 311-20, 1979.
44. Jensen, M.T., Knudsen, J. and Olson, J.M., *A novel aminoglycosphingolipid found in Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum*. Arch. Microbiol. **156**: 248-254, 1991.
45. Hirai, Y., Kukida, S., Matsushita, O., Nagamachi, E., Tomochika, K. and Kanemasa, Y., *Membrane lipids of Mycoplasma orale: lipid composition and synthesis of phospholipids*. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR **24**: 21-7, 1992.
46. Kawahara, K., Moll, H., Knirel, Y.A., Seydel, U. and Zahringer, U., *Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium Sphingomonas capsulata*. Eur. J. Biochem. **267**: 1837-46, 2000.

47. Naka, T., Fujiwara, N., Yabuuchi, E., Doe, M., Kobayashi, K., Kato, Y. and Yano, I., *A novel sphingoglycolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of Sphingomonas yanoikuyae*. J. Bacteriol. **182**: 2660-3, 2000.
48. Patton, J.L. and Lester, R.L., *The phosphoinositol sphingolipids of Saccharomyces cerevisiae are highly localized in the plasma membrane*. J. Bacteriol. **173**: 3101-8, 1991.
49. Warnecke, D. and Heinz, E., *Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi*. Cell Mol. Life Sci. **60**: 919-41, 2003.
50. Toledo, M.S., Levery, S.B., Straus, A.H., Suzuki, E., Momany, M., Glushka, J., Moulton, J.M. and Takahashi, H.K., *Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (E)-Delta 3-unsaturation in cerebroside of Paracoccidioides brasiliensis and Aspergillus fumigatus*. Biochemistry **38**: 7294-306, 1999.
51. Wagner, H. and Zofcsik, W., *Sphingolipide und Glykolipide von Pilzen und hoheren Pflanzen*. Biochem. Z. **346**: 333-342, 1966.
52. Lester, R.L., Smith, S.W., Wells, G.B., Rees, D.C. and Angus, W.W., *The isolation and partial characterization of two novel sphingolipids from Neurospora crassa: di(inositolphosphoryl)ceramide and ((gal)3glu)ceramide*. J. Biol. Chem. **249**: 3388-94, 1974.
53. Toledo, M.S., Levery, S.B., Glushka, J., Straus, A.H. and Takahashi, H.K., *Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen Sporothrix schenckii: identification of novel glycosylinositol phosphorylceramides with core manalpha1->6Ins linkage*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **280**: 19-24, 2001.
54. Thevissen, K., Warnecke, D.C., Francois, I.E., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B.P., Ferket, K.K. and Cammue, B.P., *Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides*. J. Biol. Chem. **279**: 3900-5, 2004.
55. Voet, D. and Voet, J.G., *Biochemie*, Weinheim VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994.
56. Kolter, T. and Sandhoff, K., *Sphingolipids- Their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases*. Angew. Chem. Int. Ed. **38**: 1532-1568, 1999.
57. Sperling, P., Warnecke, D. and Heinz, E., *Plant sphingolipids*, in *Lipid metabolism and membrane biogenesis*, G. Daum, Editor, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2004.
58. Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus, P.L., *Cold Acclimation of Arabidopsis thaliana (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions)*. Plant Physiol. **109**: 15-30, 1995.
59. Lynch, D.V., *Sphingolipids*, in *Lipid Metabolism in Plants*, T.S.J. Moore, Editor, CRC Press, Boca Raton, 285-308, 1993.
60. Heinz, E., *Plant glycolipids: structure, isolation and analysis*, in *Advances in Lipid Methodology - Three*, W.W. Christie, Editor, The Oily Press, Dundee, 211-332, 1996.
61. Imai, H., Yamamoto, K., Shibahara, A., Miyatani, S. and Nakayama, T., *Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxy fatty acids of glucosylceramides by gas chromatography-mass spectrometry*. Lipids **35**: 233-6, 2000.

62. Machado, M.J., Guerrini, M., Gorin, P.A.J., Torri, G. and Iacomini, M., *A galactosphingolipid from the lichen Ramalina celastri*. *Phytochemistry* **45**: 651-653, 1997.
63. Holthuis, J.C., Pomorski, T., Riggers, R.J., Sprong, H. and Van Meer, G., *The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport*. *Physiol. Rev.* **81**: 1689-723, 2001.
64. Mandon, E.C., van Echten, G., Birk, R., Schmidt, R.R. and Sandhoff, K., *Sphingolipid biosynthesis in cultured neurons. Down-regulation of serine palmitoyltransferase by sphingoid bases*. *Eur. J. Biochem.* **198**: 667-74, 1991.
65. Toke, D.A. and Martin, C.E., *Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 18413-22, 1996.
66. Oh, C.S., Toke, D.A., Mandala, S. and Martin, C.E., *ELO2 and ELO3, homologues of the Saccharomyces cerevisiae ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation*. *J. Biol. Chem.* **272**: 17376-84, 1997.
67. Marks, D.L., Wu, K., Paul, P., Kamisaka, Y., Watanabe, R. and Pagano, R.E., *Oligomerization and topology of the Golgi membrane protein glucosylceramide synthase*. *J. Biol. Chem.* **274**: 451-6, 1999.
68. Ichikawa, S., Sakiyama, H., Suzuki, G., Hidari, K.I. and Hirabayashi, Y., *Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 12654, 1996.
69. Futerman, A.H. and Pagano, R.E., *Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver*. *Biochem. J.* **280 (Pt 2)**: 295-302, 1991.
70. Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K.N., van Meer, G. and Wieland, F., *Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions*. *J. Cell. Biol.* **117**: 259-67, 1992.
71. Leipelt, M., *Isolierung, Klonierung und funktionale Charakterisierung von Glucosylceramid-Synthasen aus Tieren, Pilzen und Pflanzen*, in *Fachbereich Biologie*. Universität Hamburg, Hamburg, 2001.
72. Venkataraman, K. and Futerman, A.H., *Comparison of the metabolism of L-erythro- and L-threo-sphinganine and ceramides in cultured cells and in subcellular fractions*. *Biochim. Biophys. Acta* **1530**: 219-26, 2001.
73. Lynch, D.V., Criss, A.K., Lehoczky, J.L. and Bui, V.T., *Ceramide glucosylation in bean hypocotyl microsomes: evidence that sterol glucoside serves as glucose donor*. *Arch. Biochem. Biophys.* **340**: 311-6, 1997.
74. Hillig, I., Leipelt, M., Ott, C., Zahringer, U., Warnecke, D. and Heinz, E., *Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **553**: 365-9, 2003.
75. McCartney, A.W., Dyer, J.M., Dhanoa, P.K., Kim, P.K., Andrews, D.W., McNew, J.A. and Mullen, R.T., *Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini*. *Plant J.* **37**: 156-73, 2004.

76. Bohinski, R.C., *Современные воззрения в биохимии*, Москва Издательство "Мир", 544, 1987.
77. Demel, R.A. and De Kruyff, B., *The function of sterols in membranes*. Biochim. Biophys. Acta **457**: 109-32, 1976.
78. Warnecke, D., *Reinigung und Charakterisierung der Uridindiphosphat-Glucose: Sterol-beta-D-Glucosyltransferase*, in *Fachbereich Biologie*. Universität Hamburg, Hamburg 111, 1994.
79. Boggs, J.M., *Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function*. Biochim. Biophys. Acta **906**: 353-404, 1987.
80. Pascher, I., *Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability*. Biochim. Biophys. Acta **455**: 433-51, 1976.
81. Simons, K. and Ikonen, E., *Functional rafts in cell membranes*. Nature **387**: 569-72, 1997.
82. Simons, K. and Toomre, D., *Lipid rafts and signal transduction*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **1**: 31-9, 2000.
83. Conzelmann, A., Puoti, A., Lester, R.L. and Desponds, C., *Two different types of lipid moieties are present in glycosphosphoinositol-anchored membrane proteins of Saccharomyces cerevisiae*. Embo. J. **11**: 457-66, 1992.
84. Flury, I., *Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in "Saccharomyces cerevisiae": characterization of proteins involved in side chain modifications*. Universite de Fribourg, Fribourg 116, 2001.
85. Uemura, M. and Steponkus, P.L., *A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance*. Plant Physiol. **104**: 479-496, 1994.
86. Bohn, M., *Der Einfluss einer Kaltehartung im Vergleich zu einer Hormonbehandlung (Abscisinsäure) auf das Lipidmuster von Plasma- und Chloroplastenmembranen des Winterweizens (Triticum aestivum)*, in *Fachbereich Biologie*. Universität Hamburg, Hamburg, 1999.
87. Lynch, D.V. and Steponkus, P.L., *Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (Secale cereale L. cv Puma)*. Plant Physiol. **83**: 761-767, 1987.
88. Quartacci, M.F., Glisic, O., Stevanovic, B. and Navari-Izzo, F., *Plasma membrane lipids in the resurrection plant Ramonda serbica following dehydration and rehydration*. J. Exp. Bot. **53**: 2159-66, 2002.
89. Palta, J.P., Whitaker, B.D. and Weiss, L.S., *Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of Solanum Species*. Plant Physiol. **103**: 793-803, 1993.
90. Stone, J.M., Palta, J.P., Bamberg, J.B., Weiss, L.S. and Harbage, J.F., *Inheritance of freezing resistance in tuber-bearing Solanum species: evidence for independent genetic control of nonacclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**: 7869-73, 1993.

91. Mandava, N.B., *Plant growing-promoting brassinosteroids*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **39**: 23-52, 1988.
92. Clouse, S.D., Langford, M. and McMorris, T.C., *A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development*. Plant Physiol. **111**: 671-8, 1996.
93. Choe, S., Tanaka, A., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ross, A.S., Tax, F.E., Yoshida, S. and Feldmann, K.A., *Lesions in the sterol delta reductase gene of Arabidopsis cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis*. Plant J. **21**: 431-43, 2000.
94. Schneider, G., *Arzneidrogen: ein Kompendium für Pharmazeuten, Biologen und Chemiker*, Mannheim Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, 1990.
95. Guy, R.K., *Inhibition of sonic hedgehog autoprocessing in cultured mammalian cells by sterol deprivation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**: 7307-12, 2000.
96. Karpen, H.E., Bukowski, J.T., Hughes, T., Gratton, J.P., Sessa, W.C. and Gailani, M.R., *The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane*. J. Biol. Chem. **276**: 19503-11, 2001.
97. Hannun, Y.A., *The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide*. J. Biol. Chem. **269**: 3125-8, 1994.
98. Abul-Milh, M., Foster, D.B. and Lingwood, C.A., *In vitro binding of Helicobacter pylori to monohexosylceramides*. Glycoconj J **18**: 253-60, 2001.
99. Umemura, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., Iwata, M., Shimura, M. and Koga, J., *Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants*. Plant Cell Physiol. **41**: 676-83, 2000.
100. Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M. and Ogasawara, N., *Cerebroside A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants*. J. Biol. Chem. **273**: 31985-91, 1998.
101. Sitrin, R.D., Chan, G., Dingerdissen, J., DeBrosse, C., Mehta, R., Roberts, G., Rottschaefer, S., Staiger, D., Valenta, J. and Snader, K.M., *Isolation and structure determination of Pachybasium cerebroside which potentiates the antifungal activity of aculeacin*. J. Antibiot. (Tokyo) **41**: 469-80, 1988.
102. Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabieres, F., Ricci, P. and Blein, J.P., *Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **245**: 133-9, 1998.
103. Kasparovsky, T., Blein, J.P. and Mikes, V., *Ergosterol elicits oxidative burst in tobacco cells via phospholipase A2 and protein kinase C signal pathway*. Plant Physiol. Biochem. **42**: 429-35, 2004.
104. Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P. and Delmer, D., *Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants*. Science **295**: 147-50, 2002.
105. Read, S.M. and Bacic, T., *Plant biology. Prime time for cellulose*. Science **295**: 59-60, 2002.

106. Delmer, D.P., *CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50**: 245-276, 1999.
107. Richmond, T.A. and Somerville, C.R., *The cellulose synthase superfamily*. Plant Physiol. **124**: 495-8, 2000.
108. Elbein, A.D. and Forsee, W.T., *Biosynthesis and structure of glycosyl diglycerides, steryl glucosides, and acylated steryl glucosides*. Lipids **10**: 427-36, 1975.
109. Rochester, C.P., Kjellbom, P., Andersson, B. and Larsson, C., *Lipid composition of plasma membranes isolated from light-grown barley (*Hordeum vulgare*) leaves: identification of cerebroside as a major component*. Arch. Biochem. Biophys. **255**: 385-91, 1987.
110. Sandstrom, R.P. and Cleland, R.E., *Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membranes: lack of short-term change in response to auxin*. Plant Physiol. **90**: 1207-13, 1989.
111. Brown, D.J. and DuPont, F.M., *Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of barley (*Hordeum vulgare* L.)*. Plant Physiol. **90**: 955-961, 1989.
112. Bohn, M., Heinz, E. and Luthje, S., *Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots*. Arch. Biochem. Biophys. **387**: 35-40, 2001.
113. Yoshida, S. and Uemura, M., *Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.)*. Plant Physiol. **82**: 807-812, 1986.
114. Haschke, H.-P., Kaiser, G., Martinoila, E., Hammer, U., Teucher, T., Dorne, A.J. and Heinz, E., *Lipid profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO₂-fixation mechanisms*. Bot. Acta **103**: 32-38, 1990.
115. Hartmann, M.A., Normand, G. and Benveniste, P., *Sterol composition of plasma membrane enriched fractions from maize coleoptiles*. Plant Sci. Lett. **5**: 287-292, 1975.
116. Janiszowska, W., Sobociska, E. and Kasprzyk, Z., *Distribution of different forms of sterols in three cellular subfractions of *Calendula officinalis* leaves*. Phytochemistry **18**: 427-430, 1979.
117. Verhoek, B., Haas, R., Wrage, K., Linscheid, M. and Heinz, E., *Lipids and enzymatic activities in vacuolar membranes isolated via protoplasts from oat primary leaves*. Z. Naturforsch. **38c**: 770-777, 1983.
118. Lynch, D.V. and Phinney, A.J., *The transbilayer distribution of glucosylceramide in plant plasma membrane*, in *Plant Lipid Metabolism*, P. Mazliak, Editor, Kluwer, Dordrecht, 239-241, 1995.
119. Bowles, D.J., Lehle, L. and Kauss, H., *Glucosylation of sterols and polyprenol phosphate in the Golgi apparatus of *Phaseolus aureus**. Planta **134**: 177-181, 1977.
120. Lercher, M. and Wojciechowski, A., *Localization of plant UDP-glucose:sterol glucosyltransferase in the Golgi membranes*. Plant Sci. Lett. **7**: 337-340, 1976.

121. Hartmann-Bouillon, M.A. and Benveniste, P., *Sterol biosynthetic capability of purified membrane fractions from maize coleoptiles*. *Phytochemistry* **17**: 1037-1042, 1978.
122. Grandmougin, A., Bouvier-Nave, P., Ullmann, P., Benveniste, P. and Hartmann, M.A., *Cyclopropyl sterol and phospholipid composition of membrane fractions from maize roots treated with Fenpropimorph*. *Plant Physiol.* **90**: 591-597, 1989.
123. Hartmann-Bouillon, M.A., Walter, B. and Lazar, E., *Sterol glucosylation by plasma membrane from cotyledons of Phaseolus aureus*. *Plant Cell Rep.* **1**: 56-58, 1981.
124. Wardale, D.A., Lambert, E.A. and Galliard, T., *Localization of fatty acid hydroperoxide cleavage activity in membranes of cucumber fruit*. *Phytochemistry* **17**: 205-212, 1978.
125. Nakayama, M., Kojima, M., Ohnishi, M. and Ito, S., *Enzymatic formation of plant cerebroside: properties of UDP-glucose: ceramide glucosyltransferase in radish seedlings*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 1882-6, 1995.
126. Cantatore, J.L., Murphy, S.M. and Lynch, D.V., *Compartmentation and topology of glucosylceramide synthesis*. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 748-50, 2000.
127. Kohyama-Koganeya, A., Sasamura, T., Oshima, E., Suzuki, E., Nishihara, S., Ueda, R. and Hirabayashi, Y., *Drosophila glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors*. *J. Biol. Chem.* **279**: 35995-6002, 2004.
128. Tian, G.W., Mohanty, A., Chary, S.N., Li, S., Paap, B., Drakakaki, G., Kopec, C.D., Li, J., Ehrhardt, D., Jackson, D., Rhee, S.Y., Raikhel, N.V. and Citovsky, V., *High-throughput fluorescent tagging of full-length Arabidopsis gene products in planta*. *Plant Physiol.* **135**: 25-38, 2004.
129. Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. and O'Shea, E.K., *Global analysis of protein localization in budding yeast*. *Nature* **425**: 686-91, 2003.
130. Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S. and Snyder, M., *Subcellular localization of the yeast proteome*. *Genes Dev.* **16**: 707-19, 2002.
131. Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T. and Raikhel, N.V., *The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins*. *Plant Cell* **16**: 3285-303, 2004.
132. Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C. and Kjellbom, P., *Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking*. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1543-56, 2004.
133. Koch, H.G., Moser, M. and Muller, M., *Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **146**: 55-94, 2003.
134. Johnson, A.E. and van Waes, M.A., *The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane*. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**: 799-842, 1999.
135. Brodsky, J.L., *Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane*. *Int. Rev. Cytol.* **178**: 277-328, 1998.

136. Brodsky, J.L., Goeckeler, J. and Schekman, R., *BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**: 9643-6, 1995.
137. Zhang, G.F. and Staehelin, L.A., *Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells*. Plant Physiol. **99**: 1070-1083, 1992.
138. Driouich, A., Faye, L. and Staehelin, L.A., *The plant Golgi-Apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins*. TIBS **18**, 1993.
139. Kermode, A.R., *Mechanisms of Intracellular Protein Transport and Targeting in Plant Cells*. Crit. Rev. Plant Sci. **15**: 285-423, 1996.
140. Donaldson, J.G. and Klausner, R.D., *ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure*. Curr. Opin. Cell Biol. **6**: 527-532, 1994.
141. Rothman, J.E., *Mechanisms of intracellular protein transport*. Nature **372**: 55-63, 1994.
142. Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Дймоллиге, С., Duden, R., Emr, S.D., Riezmann, H. and Cosson, P., *Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum*. Cell **79**: 1199-1207, 1994.
143. Pearse, B.M.F. and Robinson, M.S., *Clathrin, adaptors and sorting*. Annu. Rev. Cell Biol. **6**: 151-171, 1990.
144. Funato, K. and Riezman, H., *Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast*. Jour. Cell Biol. **155**: 949-960, 2001.
145. Funakoshi, T., Yasuda, S., Fukasawa, M., Nishijima, M. and Hanada, K., (), *Reconstitution of ATP- and cytosol-dependent transport of de novo synthesized ceramide to the site of sphingomyelin synthesis in semi-intact cells*. J. Biol. Chem. **275**: 29938-29945, 2000.
146. Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M. and Nishijima, M., *Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide*. Nature **426**: 803-809, 2004.
147. Riezmann, H. and van Meer, G., *Lipid pickup and delivery*. Nature Cell Biol. **6**: 15-16, 2004.
148. Schnabl, M., Daum, G. and Pichler, H., *Multiple lipid transport pathways to the plasma membrane in yeast*. Biochim. Biophys. Acta **1687**: 130-40, 2005.
149. Bachmann, B., *Linkage map of Escherichia coli K12*. Microbiol. Rev. **47**: 180-230, 1983.
150. Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.D., *The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA*. J. Bacteriol. **168**: 1291-301, 1986.
151. Miroux, B. and Walker, J.E., *Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels*. J Mol Biol **260**: 289-98, 1996.
152. Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M., *XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli with -galactosidase selection*. Biotechniques **5**: 376-378, 1987.

153. Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J., *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. *Gene* **33**: 568-572, 1985.
154. Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F. and Nebert, D.W., *The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence*. *Pharmacogenetics* **7**: 255-69, 1997.
155. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular cloning - A Laboratory Manual*. 2 ed, Cold Spring Harbor, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
156. Qiagen, *The QIAexpressionist™. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*, Hilden, 2001.
157. Riggs, M.G. and McLachlan, A., *A simplified screening procedure for large numbers of plasmid miniprep*. *Biotechniques* **4**: 310-313, 1986.
158. Saiki, R.K., *The design and optimisation of the PCR*, in *PCR-Technology*, E. H.A., Editor, Stockton Press, New York, 7-16, 1989.
159. Shuman, S., *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase*. *J. Biol. Chem.* **269**: 32678-84, 1994.
160. Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. and Beckwith, J., *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-30, 1995.
161. Ogden, S., Haggerty, D., Stoner, C.M., Kolodrubetz, D. and Schleif, R., *The Escherichia coli L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **77**: 3346-50, 1980.
162. Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 411-21, 1999.
163. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**: 5463-7, 1977.
164. Higgins, D.G. and Sharp, P.M., *CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer*. *Gene* **73**: 237-44, 1988.
165. Gassen, H.G. and Schrimpf, G., *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Heidelberg Spektrum Akademischer Verlag, 432, 1999.
166. Dingermann, T., *Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in Pharmazie und Medizin*, Stuttgart Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 632, 1999.
167. Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. and Birkenberger, L.A., *Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55-62, 1997.

168. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature **258**: 598-9, 1975.
169. Yip, T.T., Nakagawa, Y. and Porath, J., *Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography*. Anal. Biochem. **183**: 159-71, 1989.
170. Hochuli, E., Dobeli, H. and Schacher, A., *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. J. Chromatogr. **411**: 177-84, 1987.
171. Hochuli, E., *Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent*. Genet Eng (N Y) **12**: 87-98, 1990.
172. Qiagen, *Ni-NTA Spin Handbook*, Hilden, 2000.
173. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. **72**: 248-54, 1976.
174. Qiagen, *QIAquick Spin Handbook*, Hilden, 1999.
175. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**: 680-5, 1970.
176. Salinovich, O. and Montelaro, R.C., *Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Anal. Biochem. **156**: 341-7, 1986.
177. Eurogentec, *Serviceleistungen im Proteinbereich: Antikörper-produktion, Peptide*. Eurogentec, Seraing, 2000.
178. Qiagen, *QIAexpress® Detection and Assay Handbook*, Hilden, 1999.
179. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science **263**: 802-5, 1994.
180. Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y., *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 12501-4, 1994.
181. Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem. Sci. **20**: 448-55, 1995.
182. Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y., *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol. **59**: 223-227, 1962.
183. Morin, J.G. and Hastings, J.W., *Energy transfer in a bioluminescent system*. J. Cell. Physiol. **77**: 313-318, 1971.
184. Wang, S. and Hazelrigg, T., *Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis*. Nature **369**: 400-03, 1994.
185. Steipe, B. and Skerra, A., *Das Gruen Fluoreszierende Protein*. Biospektrum **3**: 28-30, 1997.

186. Chatteraj, M., King, B.A., Bublit, G.U. and Boxer, S.G., *Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 8362-7, 1996.
187. Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. and Remington, S.J., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science **273**: 1392-5, 1996.
188. Heim, R., Cubitt, A.B. and Tsien, R.Y., *Improved green fluorescence*. Nature **373**: 663-4, 1995.
189. Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S., *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene **173**: 33-8, 1996.
190. Clontech, *Living Colors® User Manual*, Palo Alto, CA, USA, 2001.
191. Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. and Hodge, S., *Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 2122-7, 1997.
192. Sanford, J.C., Smith, F.D. and Russell, J.A., *Optimizing the biolistic process for different biological applications*. Methods Enzymol. **217**: 483-509, 1993.
193. Unseld, S., Hohnle, M., Ringel, M. and Frischmuth, T., *Subcellular targeting of the coat protein of African cassava mosaic geminivirus*. Virology **286**: 373-83, 2001.
194. Techen, N., *Molekulare Untersuchungen zur Funktion des regulativen Intensifier Gens aus Zea mays L.*, in *Fachbereich Biologie*. Universität Hamburg, Hamburg, 2002.
195. Clough, S.J. and Bent, A.F., *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. Plant J. **16**: 735-43, 1998.
196. Leipelt, M., Warnecke, D., Zahringer, U., Ott, C., Müller, F., Hube, B. and Heinz, E., *Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi*. J. Biol. Chem. **276**: 33621-9, 2001.
197. Matsuo, N., Nomura, T. and Imokawa, G., *A rapid and simple assay method for UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase*. Biochim. Biophys. Acta **1116**: 97-103, 1992.
198. Shayman, J.A. and Abe, A., *Glucosylceramide synthase: assay and properties*. Methods Enzymol. **311**: 42-9, 2000.
199. Siegele, D.A. and Hu, J.C., *Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 8168-72, 1997.
200. Schertler, G.F.X., *Overproduction of membrane proteins*. Curr. Op. Struct. Biol. **2**: 534-544, 1992.
201. Grisshammer, R. and Tate, C.G., *Overexpression of integral membrane proteins for structural studies*. Q. Rev. Biophys. **28**: 315-422, 1995.

202. Yasuhara, N., Takeda, E., Inoue, H., Kotera, I. and Yoneda, Y., *Importin α/β -mediated nuclear protein import is regulated in a cell cycle-dependent manner*. Exp. Cell Res. **297**: 285-293, 2004.
203. Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J., *Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α* . Cell **94**: 193-204, 1998.
204. Cokol, M., Nair, R. and Rost, B., *Finding nuclear localization signals*. EMBO Rep. **1**: 411-5, 2000.
205. Gunning, B.E.S., *The identity of mystery organelles in Arabidopsis plants expressing GFP*. Trends Plant. Sci. **3**: 417, 1998.
206. Hawes, C., Saint-Jore, C., Martin, B. and Zheng, H.Q., *ER confirmed as the location of mystery organelles in Arabidopsis plants expressing GFP!* Trends Plant Sci. **6**: 245-6, 2001.
207. Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I., *The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. **44**: 661-6, 2003.
208. Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I., *An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis*. Plant Physiol. **130**: 1807-14, 2002.
209. Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N.K., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I., *A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. **42**: 894-9, 2001.
210. Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I., *A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in Arabidopsis*. Plant J. **33**: 493-502, 2003.
211. Brandizzi, F., Irons, S.L., Johansen, J., Kotzer, A. and Neumann, U., *GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system*. J. Microsc. **214**: 138-58, 2004.
212. Divecha, N., Clarke, J.H., Roefs, M., Halstead, J.R. and D'Santos, C., *Nuclear inositides: Inconsistent consistencies*. Cell Mol. Life Sci. **57**: 379-393, 2000.
213. Martelli, A.M., Bortul, R., Tabellini, G., Aluigi, M., Peruzzi, D., Bareggi, R., Narducci, P. and Cocco, L., *Re-examination of the mechanisms regulating nuclear inositol lipid metabolism*. FEBS Lett. **505**: 1-6, 2001.
214. Osborne, S.L., Thomas, C.L., Gschmeissner, S. and Schiavo, G., *Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing*. J. Cell Sci. **114**: 2501-2511, 2001.
215. Rando, O.J., Zhao, K., Janmey, P. and Crabtree, G.R., *Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 2824-2829, 2002.
216. Martelli, A.M., Tabellini, G., Borgatti, P., Bortul, R., Capitani, S. and Neri, L.M., *Nuclear Lipids: New Functions for Old Molecules?* J. Cell Biochem. **88**: 455-461, 2003.

-
217. Merkle, T., *Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling*. *Planta* **213**: 499-517, 2001.
218. Oku, M., Warnecke, D., Noda, T., Muller, F., Heinz, E., Mukaiyama, H., Kato, N. and Sakai, Y., *Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain*. *Embo J.* **22**: 3231-41, 2003.
219. Messner, B., Thulke, O. and Schaffner, A.R., *Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates*. *Planta* **217**: 138-46, 2003.

Anhang

A1. Primer

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide aufgelistet. Restriktionsschnittstellen und das Zielgen sind fett gekennzeichnet.

(NS = Nonsense-Sequenz; **STOP** = ohne STOP-Sequenz; +STOP = mit eingebauter STOP-Sequenz; **TMD** = ohne Transmembrandomänen; AS = Aminosäuren; ORF = *Open Reading Frame*; ORF-Fragm. = ORF-Fragment; Pr. = Promotor; CDS = *coding sequence*; **NLS** = zerstörtes NLS)

Primer	Sequenz 5' → 3'	Zielsequenz
OK10	GAG CTC ATG TCA CAA CTC AGA CCC AGA G	UGT51B1 [<i>SacI</i> +ORF(STOP *) + <i>SacI</i>]
OK11	GAG CTC CAC TTC AAA CCA TGA TCC GCT T	
OK14	CTC GAG ATG CCC ATC ACT CAA ATC ATA TCA G	UGT51 [<i>XhoI</i> +ORF(STOP) + <i>XhoI</i>]
OK15	CTC GAG AAT CAT CGT CCA CCC TTC ATC C	
OK16	CTC GAG ATG GAA ATT TTG TTC AAT TTT AGA AAT CGG	GCS (<i>C.albicans</i>) [<i>XhoI</i> +START** +ORF(TMD , STOP) + <i>XhoI</i>]
OK17	CTC GAG CAT TTC TTC AGC AGT TAA ATC TTT C	
OK18	CAT ATG CCG GAA ATA TCG CCG GCT G	ugt80A2 [<i>NdeI</i> +ORF(STOP) + <i>NdeI</i>]
OK19	CAT ATG CGA ACA GCC AAA GCA TTT CCT G	
OK20	CTC GAG ATG ATA ATG CAG CTT GGA TTG ACT T	GCS (<i>P.pastoris</i>) [<i>XhoI</i> +ORF→] (vorderer Primer)
OK21	CTC GAG ATG GTT CAA GAA GAA TTA TCC TTA TTT	GCS (<i>C.albicans</i>) [<i>XhoI</i> +ORF→] (vorderer Primer)
PPCGT1	G GAA TTC CAT ATG GAA CTC TGC CT G CAA AGT GC	GCS (<i>P.pastoris</i>)

★ STOP-Sequenz (TAA/TAG/TTA)

★★ START-Sequenz (ATG)

PPCGT2	GCG GGA TCC TTA TCG AAG AAG GTA GTT CTT CAA TG	[NdeI+ORF-Fragm. (288 AS)+STOP +BamHI]
PPSGT3	G GAA TTC CAT ATG ATT GTT ATA CGT GCG CAC GAG	UGT51B1 [NdeI+ORF- Fragm. (378 AS)+STOP +BamHI]
PPSGT4	GCG GGA TCC TTA TCC AAT GTA TAC CAA TTT CTT ACC	
N-EGS1	CCG CGG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG	EGFP [SacII+ORF+HpaI +NheI]
N-EGS2	GCT AGC GTT AAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
ATS1	GGG CCC ATG CCG GAA ATA TCG CCG GCT G	ugt80A2 [ApaI+ORF(STOP) +SacII+NheI]
N-ATS2	GCT AGC ACT AGA CCG CGG CGA ACA GCC AAA GCA TTT CCT G	
GAC1	GGG CCC ATG TCA GCG GCA TTG GAC CCT G	GCS (G. arboreum) [ApaI+ORF(STOP) +SacII+NheI]
GAC2	GCT AGC ACT AGA CCG CGG AAC CTC GTA TTT CTT GGG TTG ATG	
K-EGF1	ACT AGT GGG CCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG	EGFP [6×NS+ApaI+ORF→] (vorderer Primer)
CAM- 2x35-1	CTC GAG TGC GTA TTG GCT AGA GCA GCT TG	2x35S-CaMV-Pr. [XhoI+CDS+BamHI]
CAM- 2x35-2	GGA TCC AGA GAT AGA TTT GTA GAG AGA GAC T	
YFP+S-1	GGA TCC CCC GGG ACT AGT CCG CGG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG	EYFP [BamHI+XmaI +SpeI+SacII+ORF +NheI]
YFP+S-2	GCT AGC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
YFP-3	GGA TCC GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG	EYFP [BamHI+ ORF(STOP)+XmaI +SpeI+SacII+NheI]
YFP-4	GCT AGC CCG CGG ACT AGT CCC GGG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G	
S1-1-S	CCC GGG ATG CCG GAA ATA TCG CCG GCT G	ugt80A2 [XmaI+ORF(STOP) +SacII]
S1-2-S	CCG CGG CGA ACA GCC AAA GCA TTT CCT G	
S1-3+S	CCG CGG TTA CGA ACA GCC AAA GCA TTT CCT G	ugt80A2 [←ORF+SacII] (hinterer Primer)
C-1-S	CCC GGG ATG TCA GCG GCA TTG GAC CCT G	GCS (G. arboreum) [XmaI+ORF(STOP) +SacII]
C-2-S	CCG CGG AAC CTC GTA TTT CTT GGG TTG ATG	

C-3+S	CCG CGG CTA AAC CTC GTA TTT CTT GGG TTG A	GCS (<i>G. arboreum</i>) [←ORF+ <i>SacII</i>] (hinterer Primer)
S2-1-S	CCC GGG ATG GCT AGT AAT GTA TTT GAT CAT CC	<i>ugt80B1</i> [<i>XmaI</i> +ORF(STOP) + <i>SacII</i>]
S2-2-S	CCG CGG CAC GCC ACC ACA TGG AAG ACA AC	
S2-3+S	CCG CGG TCA CAC GCC ACC ACA TGG AAG AC	<i>ugt80B1</i> [←ORF+ <i>SacII</i>] (hinterer Primer)
GUS-S1-1	AGC CCC GGG GTT ATG TGA TCT TCG GAG GAC GG	Promotor von <i>ugt80A2</i> [<i>SmaI</i> +Sequenz + <i>AvrII</i>]
GUS-S1-R	AGA CCT AGG CGT GAT TCT CTC TCT ATC TCC AC	
NLS-MUT-1	TC AGC CTT AGG AAC AAT AAC TTG AAA CTA C	<i>ugt80A2</i> [4×NS+ <i>Bsu36</i> + (NLS)ORF→] (vorderer Primer)
S1-N	CCC GGG GAG TTT GAA GTT CCA GCA GAT GCT	<i>ugt80A2</i> [<i>XmaI</i> +(verkürzt)ORF →] (vorderer Primer)
S1-C	CCG CGG TTA TGG GAT TGG TGA AGG ACC AAC AC	<i>ugt80A2</i> [←ORF(verkürzt)+ <i>SacII</i>](hinterer Primer)
S2-N	CCC GGG GAA GTT ATA GAT AAC GT ACT CCG	<i>ugt80bB1</i> [<i>XmaI</i> +(verkürzt)ORF →] (vorderer Primer)
S2-C	CCG CGG TCACGG TAT TGG CGC AGG CCC AAG	<i>ugt80B1</i> [←ORF(verkürzt)+ <i>SacII</i>](hinterer Primer)
C-N	CCC GGG AGG AAC AGA GAG ATC AAT AGA ATG AA	GCS (<i>G. arboreum</i>) [<i>XmaI</i> +(verkürzt)ORF →] (vorderer Primer)
C-C	CCG CGG CTA ACA CAA ACT TCT CGC CAA TGA GCT	GCS (<i>G. arboreum</i>) [←ORF(verkürzt)+ <i>SacII</i>](hinterer Primer)

A2. ORF-Sequenz von UGT51B1

(die Teilsequenz aus dem Versuch 3.1.3. ist **fett** gekennzeichnet)

```

1   ATGTCACAACCTCAGACCCAGAGATTCAGTGCTGGGAAATCTTCTTCCCCTCGAAGGACA
61  GATAGAAATCCTGAATCTATCGACGTCAACTCTAAGGGGGTTCTGAAGGGATGACTTCC
121 GGCCTTGTCCCAGGTACAGCACCTCATAAGGAAGATGAAACTGAAGCAGAGGATGATATT
181 GACTGTGGAAGGTTAATTACCTCCAAGTCGCTGGCTACCATGCTGACAACGGCGAGCATG
241 TATGCCGGGGTGTCCCAATTGGATGATGATGCTATTGAGAGCAGCGCTCTCGATGAGCCA
301 ATTCCATATGTTCCATACGAAGAGGATGCTGAAAGCGTAATGTCAGAACTACTGTTGGT
361 GTTGACACAGTCAGAGACACAGACTCTTCAGAACAAATAAAATCCAGAAATTGATGGCCTG
421 GTTGCTTTTGAGAAAAGAAAACAACACACCCTTCCAAAGTTTGAACTCTCTGTTGTTCCGG
481 AAACGATGTTCCCAACTGAGTCTGGCTGGCTCCAGTTCAGGTTCCGACGCGCAGGAACAGT
541 TTCACTTTAGACAATAATGAAACTACGAGAGCTGTGAAACTCTGCGAAAAACTGAAAACC
601 ACCTTTGATTTGTCTGACGATGACGAGTTTGTGAATGATTACCTTGTGGCTGTTGCAT
661 GAAGTCTTCTTCAAGGTCACATCTACATCACATCTAGATACCTGTTATACTTTGCATTT
721 CTTCCGAAAAGAGACTCCACTGTGACCATGTCTGGTGCCTTGTCATCAGAAGCTCCACA
781 ACTATGAGATTTTCTGTCGACGCTGGGCTGTATTGAAGGGTAACTACTTTTCGTCTATA
841 GCCAATTCACAGAACGGTATTTCTTCACTTAATATTGATTTGCGTTCCTTGTGTGAAA
901 GTAGAATTGTCAAATCCTAACCTTGAGGAAAAATAAGCCTACCGTTTTCAAGTTAATCACA
961 GAAGCACGTACTCATTATTTTCAAGCAGATTCCCTAGACAATGCTAGATCTTGGGTAACT
1021 GATCTCAGAAAAATATATATTTACAGCCAAGAAATAGCGGTGGTCATGTCACCATCAAAGTA
1081 CCGCTGGAGAACATACTGGATTTATCAATTGAGACACTTTTTGAAGCATCTCAAACCTTG
1141 AAACTTAAAGTCTTGAAAGTGAAGAATCTTATGCTATTGACGACTACTATTTTTATGTTT
1201 TTCAACAACGGAGACCAGGTTCTAGATAGCATTCGGCAATCCATGAAAGCCCTAGGGATC
1261 GAACTTACAGATTCTGATAGTTCTGAAAGTGATAGTGTCTCTGGCTCAGAAACTAAT
1321 GGTGATCAACTCATCGAAAATCAAAGCTTCTCGTTCCTTGAGTGTGTTAACACCTATT
1381 CCGAGGGGCATTGGAAGTATTTATAAGCCAATCAAAGTTCAGCTAGTGGCATCATAGGG
1441 GCTATCAAAAAGCCGACAGAAATCAGCTACACGTCCTTTTTCTGTCAGTAGTAGAAACAGTT
1501 GTTCCGAATGACAATGACTCCGAGTTGAAAACAAGATCATGCCGGGGACGCTCCAAAGGAT
1561 TCAGAAGAACCTTCTACCAAGCCAAGTAATTGGAGTGCAAAAATCTCTGGTCCAAGGGTTC
1621 TTGAGTACTACTTCTTCTATCAGTCAAAGTATGCTCTTTGCTTCCCCTATGCATTACAAC
1681 AATCAGCTATTTATTGAGCGAGGTGAAGAGGACCCTTATTTTGTACCATAAAAGAGGAA
1741 AGAGAAGTTGCACAGTCCAGATTTGAAAAGCATTTTTCCCTTCCCTGATTACAGAGGAGCTA
1801 CTGGCTAGTTACTTCTGCCATTTTCAAAAAAATATACCTGTATACGGCAAAGTATACCTA
1861 GGAACAACATTTGCATTTGCTACAGATCTTTATTTCCCGGCACAAAACAACATGATACTT
1921 CCATACTCCGATATTGAGAATGTTTATAATTTGAAGGGCTTTAGATTCGGGTACTCTGGG
1981 CTTGTCATTGTTATACGTGCGCACGAGGAATTATTTTTTGAATTCGGTTCTAACGAAAGC
2041 CGGGATGATTGTGACCTGTTCTGCTAAAGCAATTAGATTTTACAAAATCACATAAGAAT
2101 GCTCATTCAGAACAAAAGAGGAAAACGCAATGATAGTATTAACTAGCAGAATCTGTCCAA
2161 CTTGCCGACGCAAGACTCAGGTATTTGAAACTCGAATAGAGTCTGATATAGGCAGGGAG
2221 GTTCCATAATACTGGAGGAAAACCAGTATTTCTACGTCAGAAATTAGATCAAAGAGGAGG
2281 TACAAATTTGTGCTATTAACTATTGGTCTCGAGGAGATGTACAACCTATATATCTTTG
2341 GCGAAAGGTTTACTTGCAGAGAATCAAAAGTCAAGATTGTGACCCATGAAGAGTTCAA
2401 CCTTGGGTAGAAAGTTATGGTATCGAATTCGCAACAATTCAGGTAACCCAGCGGAGCTT
2461 ATGTCATTGATGGTAACTCATAAGTCATTAAGTGTAAGGTTTTTGAAGAGGGCTAAAGAA
2521 AAATTCACTGGCTGGATTGGAGAGTTATTGCAAAGCTCGTGGGACGCATGTCAGGATGCT
2581 GATGTGCTTATCGAATCGCCTTCCGCAATGGCAGGTATCCATATCGCAGAGAAGTTACAA
2641 ATTCCCTATTTCCGTGCTTTTACAATGCCATGGACACGAACTAGAGCGTATCCACATGCA
2701 TTTGTGGTCCCAGAACAGAAAAGAGGAGGTTCTTACAATTATCTCACGCATATAATATTT
2761 GAGAATGCTTTTTGAAAGGTATTTCAGGAGAGTGAATAAATGGCGTGAGCAAGTCTTA
2821 ATGCTTCAAAGACCAATTTGGAGAGATTGGAACAAAACAAGGTACCATTCTGTACAAT
2881 GTGTCTCCACGGTTTTTCCACCATCTATGGACTTTCTCATTGGGTTAAGGTAGTTGGA
2941 TATTGGTTTTTTGGATGAGGGGGAGGCAGATAGTTATGATCCTCCTAAGCCATTGCTGGAG
3001 TTCATGGAGAAGGCTAAGACTGATGGTAAGAAATTGGTATACATTGGATTTGGATCCATT
3061 GTAGTTAGTGATCCCAACAACCTGACTGAGGCTGTAATCGACGCGGTGCTCAGTGCTGAT
3121 GTGAGGTGATTTCTAAATAAAGGCTGGTCAGATAGGTTAGGTAAGCAGACGGGAGTGGAG

```

3181 GTTGAACCTACCTGAAGAGATTTACAATTCAGGAAACGTTCCCTCACGATTGGTTGTTTGGC
 3241 AAAATCGACGCGTCCGTTTCATCATGGTGGATCTGGAACAACAGGTGCAACACTCCGCGCT
 3301 GGAATCCCCACCATCATCAAACCATTTTTTGGAGATCAATTCCTTTTATGCCAACAGAGTA
 3361 GAAGATATTGGAGTGGGTATAGGGCTGAGAAAAGTTAAACAGTAAGTCACTTTCCAAAGCT
 3421 ATCAAAGAGGTAACCTACAAACACTCGTATCATAGAAAAGGCTAAAGAAATTTGGAAAGCAG
 3481 ATCCAGTCAGAAAACGGTGTCTCTGCAGCCATTCGTTGCCTCTACCAGGAGATGGAATAC
 3541 GCCAAGAAACTTTCCAAGAGCAAGCAGAAATACTGGGACAACCAGAGCGAAGATATTAGC
 3601 GACGACAGCGTAAGCGGATCATGTTTTGAAGTGTA

A3. ORF-Sequenz der GCS aus *P. pastoris*

(die Transmembranregion ist *fett-kursiv* und die Teilsequenz aus dem Versuch 3.1.3. ist **fett** gekennzeichnet)

1 ATGATAATGCAGCTTGGATTGACTTCTTTGGCGTTTCTTGCGCTTAAGTGTGATGCTTAT
 61 AACATCGCCCCGAAAATCGATACCCCAAACGTTGAACCGTTTGCACCATCAGGAGGACTT
 121 **AAACTCTTGGCTATTGTAGCAATAATTTGGTACGTTGTTGTTTTATTAGTTGCATATTAC**
 181 **GGGTTCTTCGAAATTATGCAAAAAGTTCAGTAAGAGAAAAACATTGCCTGTTCCCCCACAA**
 241 GTGGAAGGTGTCACCATTTTGAGACCAATTAAGGGCATAGATCCGGAGAT**GGAACCTCGC**
 301 **CTGCAAAGTGCATTTGATCAGGATTACCCAAAGTTTGAGATCATTATTTGTGTGGAGAGT**
 361 **GAAAACGATCCTGGCATTGGCGTTGCTGAGGCATTAATCAGGAAATATCCACATGTGGAT**
 421 **GCTCGGATACTCAAGGGTGATTCCCAACCCAGACCATTTTGGACCTAACCTAAGGTT**
 481 **AACAACCTTGGCGAAAGGATACAGTCTGAAAGTATGACATCATGTGGATTTTGGATAGT**
 541 **AATGTTTTGGGTTTTGCTCGGGTGCATTTGCTCTCGTTCTGTGGATGCGTTGAACAGATCGTTA**
 601 **GACAATGGACGAAGCACTTTCGACTTCCAAACTGGAAAAGGAAGGAAGGTGAACCTTGTA**
 661 **CATCATGTACCTATGGCAATCTCTATCAATCCGCAAACGGGTACAAATTTGGACGAAATG**
 721 **TTTTTGTTCACTTCCCACTCAAAGTTTTATATTTCCATAAACAAAGCAGCATTAGCCCCCT**
 781 **TGTGTCAATGGGAAATCGAACCTGTATCGGCGAAGTGAGCTGGATTTGGCAGTGAAAAGG**
 841 **CTGGGAAAGGGTAGCGAGCCAAGTCTAGACGGGACCACCGGTATCCTGGCAAAGGATGCT**
 901 **GCATATTACGGGTCCAAACCTGGCCAAGGCCTACGATTTTTTGAAGATACATTGGTGAG**
 961 **GACAACATGATAGCAACAGCATTGTGTTTTCAAACGGAGGGCGCACCTGGCCTAACAGGC**
 1021 **GATGCTGCCATTCAACCACTAGGAGGTGTCAATAGTACATCATTGAAGAACTACCTTCCTT**
 1081 **CGAAGGATCCGCTGGCTCCGTGTTAGAAAACATATGGTTC TAGAAGCTACATTTATTGGAG**
 1141 CCAACTACAGAGTGCCTGTTATGCGGCACGTTTGGAACTTTTGCCATATCCACGCTATTC
 1201 CTTCAGTCATATTTCAATTGGAAAATTTTTCATCTTTCACTTGCTAGTCTGGATGGTCACA
 1261 GATTACACACAATTTTCATATCCTACTAACC AATGCATCTCAAGACACAGCGACTTGTAAC
 1321 GTACCATATTTTGC GGAACCTAACTTCAATGCTTACGGAAGTCCTTTCGAAAGCTCAAAC
 1381 TTAAGGACATTTTACAGATGGGTTCTTTATTGGTTACTCAGAGAGGTTTTAGCCCTTCCC
 1441 ATATGGATATCCGCCATGTTAGGGACTAGAATTATCTGGAGAAAATAGACCATTTAGAATC
 1501 AATGTGGATCTAAGCGCCGAAGAACTGTAG

A4. Aminosäure-Sequenz von Ugt80A2

(das putative NLS ist *fett-kursiv* und die im Versuch 3.2.6. deletierten terminalen Bereiche sind **fett** gekennzeichnet)

MPEISPAELAKVSSSSSSSSSSSSSSGRASVKIEEIEGGAAASGVVIVSEELETNPKT
VVASIADETVAESSGTGNKSF SRVWTMPLEGSSSSDRAESSSTNQPRLDKSKTERQ
QKVTHILAEDA AKIFDDKISAGKKLKLLNRIATVKHDGTV*EFEV***PADAI***PQPI***VVD**
 RGESKNGVCADESIDGVDLQYIPPMQIVMLIVGTRGDVQPFVAIAKRLQDYGHRVR
 LATHANFKEFVLTAGLEFYPLGGDPKVLAGYMVKNKGFLPSGPSEIPIQRNQMKDI
 IYSLLPACKEPDPDSGISFKADAI IANPPAYGHTHVAEALKIPIHVFFTMPWTPTS
 EFPHPLSRVKQPAGYRLSYQIVDSL IWLGIRDMVNDLR **KKKLKLRP**VTYLSGTQGS
 GSNI PHGYMWSPHLVPKPKDWGPQIDVVGFCYLDLASNYEPPAELVEWLEAGDKPI
 YIGFGLPVQEP EKMTEI IVEALQRTKQ RGI INKGWGGLGNLKEPKDFVYLLDNVP
 HDWLFPRCKAVVHHGGAGTTAAGLKASCPTTIVPFFGDQPFWGERVHARGVGPSP I
PVDEFSLHKLEDAINFMLDDKVKSSAETLAKAMKDE*GDVAGAVKAF***FKHLP***SAQN*
ISDPIPEPSGFLSFRKCFGCS

A5. Aminosäure-Sequenz von Ugt80B1

(die im Versuch 3.2.6. deletierten terminalen Bereiche sind **fett** gekennzeichnet)

MASNVDHPLQELEGEDNGVKSEKASLLETSGSVDTPEDSGHRSSDGHRLDHCE
TAPVGLYGDMLINDSEIQYSRSLTEKGS PAIHNLKLDRLSEQEKQKLIVELVRIQN
DGTV*EVID***NGTPVSELWEFEPTKQ***STITYE***KSLTESFRSIPRLKIAILVVGTRGD**
 VQPFLAMAKRLQEFGHRVRLATHANFRSFVRAAGVEFYPLGGDPRELAAYMARNKG
 LIPSGPSEISKQRKQLKAI IESLLPACIEPDLETATSFRAQAI IANPPAYGHVHVA
 EALGVPIHIFFTMPWTPTNEFPHPLARVPQSAAYWLSYIVVDLMVWWSIRTYINDF
 RKRKLNLAPIAYFSTYHGSISHLPTGYMWSPHVVPKPSDWGPLVDVVG YCFLNLGS
 KYQPREEFLHWIERGSPVYIGFGSMPLDDPKQTMDI ILETLDTEQ RGI VDRGWG
 GLGNLATEVPENVFLVEDCPHDWLF PQCSAVVHHGGAGTTATGLKAGCPTTIVPFF
 GDQFFWGDRIYEKGLGPAPIP **IAQLSVENLSSSIRFMLQPEVKSQVMELAKVLENE**
DGVAAAVDAFHRHLPPELPLPESSEK*DEDDRPDLLQWFFIQIGKKCLPCGGV*

A6. Aminosäure-Sequenz der GCS aus *G. arboreum*

(die im Versuch 3.2.6. deletierten terminalen Bereiche sind **fett** gekennzeichnet)

MSAALDPVDWLLFSLSKAFRSPLAVFVQIQGCVICLTLAIGWAF AAYVRNREINRM
KDAMKCGNSFAFLCHDINELEHTNQVNLPRVTVVMPLKGFGEHNLHNWKSQITSLY
GGPLEFLFVVESTEDPAYHAVSRLIRDFKDDVDAKIIVAGLSTTCSQKIHNQLVGV
ERMHKDTKYVLFLLDDDDVRLHPGSIGALTAEMEKNPEIFIQTGYPLDLPSGSLGSYC
IYEHMPCSMGFATGGKTFFLWGGCMMQADDFRRDNYGVVSGLRDGGYSDDMTLA
AIAGAHKRLITSPVAVFPHPLASDLSFSRYWNYLRKQTFVLESYISRVNWLMMNRG
LFSFHCYLSWGFVAPYFMAAVHIAAALQIYIKGYSYEETTCTTSGLLLASCLAICT
LTELMSMWNLTREIVQLCNMLSPEAPKLSLDYYNWSLIFVALLVDNFLYPISAFRS
HFSQSINWSGIRYHLKNGKINKIERNKGRGPKFTDLGGKHLYGKKGAPPKASFLSS
LARSLC**QWHQPKKYE**V

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht ist, sowie, daß ich eine Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. E. Heinz betreut worden.

München, den 09.05.2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. E. HEINZ
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. H. QUADER
Tag der Disputation: 21. Oktober 2005

Hamburg, den 10. September 2005

gezeichnet: Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für eine außerordentlich gute Arbeitsatmosphäre im Labor sowie für viele angenehme Stunden außerhalb des Instituts bedanken.

Insbesondere danke ich dem Kopf und Leiter unserer Arbeitsgruppe Herrn Prof. E. Heinz. Mit Herrn Prof. Heinz habe ich einen besonderen, wahrlich begeisterten Wissenschaftler kennenlernen dürfen, der mir nicht nur eine interessante Dissertationsthema gab, sondern auch zeigte, wie es in der richtigen Wissenschaft läuft. Es war für mich ein großes Glück und eine große Ehre in seinem Labor arbeiten zu können.

Bei Herrn Dr. D. Warnecke möchte ich mich für die gute Betreuung der Arbeit und für die ständige Bereitschaft, meine mehr oder auch minder intelligenten Fragen zu beantworten, bedanken. Ich danke Herrn Dr. Warnecke herzlich für seine Zeit und für die Geduld, die er aufbringen mußte, um mich auf den „biologischen“ Weg zu trimmen.

Außerdem danke ich meinem „geheimen“ Betreuer Dr. A. Abbadi, der ebenfalls sehr viel Zeit verwendet hat, um für mich die kleinen und die großen Geheimnisse der Molekularbiologie geduldvoll zu entschlüsseln.

Herrn PD Dr. H. Quader danke ich für die Ermöglichung der konfokalmikroskopischen Analysen in seinem Labor sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. R. Lorbiecke danke ich für die vielen aufschlußreichen und interessanten Gespräche und Diskussionen der letzten Jahre sowie für das Korrekturlesen eines Teils der Arbeit.

Bei Herrn Dr. S. Scholten möchte ich mich für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Frau I. Hillig für die stets nette Atmosphäre innerhalb wie außerhalb unseres Arbeitszimmers sowie für die vielen kleinen Hilfestellungen im Laboralltag herzlich bedanken.