

**Untersuchungen zur Erhöhung des Gehalts polarer
Lipide und zur Modifizierbarkeit ihrer Profile
in Ölsaaten (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. + *Brassica napus* L.)
und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Sören Witt
Hamburg

Hamburg, August 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. E. HEINZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. H. QUADER
Tag der Disputation: 12. Oktober 2007

Hamburg, den 28. September 2007




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Abkürzungen

AAPT	=	Aminoalkohol-Phosphotransferase
Amp	=	Ampicillin
ANS	=	8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure
Antisense-	=	„Gegensinn“; Gen-Einfügung in umgekehrter Orientierung
AS	=	Aminosäuren
ASG	=	Acyliertes Sterolglykosid
ATF6	=	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	=	Adenosintriphosphat
Attenuation	=	(Dosis-) Abschwächung; Bezeichnung für die Wirkung eines Gens in Antisense-Orientierung auf die mRNA-Konzentration
BAP	=	6-Benzylamino-Purin
BCA	=	Bicinchonininsäure-Assay
BiP	=	Bindeprotein
BMBF	=	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Bp	=	(DNA-) Basenpaar(e)
Cam	=	Chloramphenicol
CAMBIA	=	<i>Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture</i>
CAMV	=	<i>cauliflower mosaic virus</i>
Cb ₅ (MA)	=	Cytochrom b ₅ (-Membrananker)
CCD	=	<i>charge coupled device</i>
CCV	=	<i>Clathrin coated vesicle</i>
cDNA	=	copy Desoxyribonukleinsäure
CDP	=	Cytidindiphosphat
Cer	=	Cerebrosid (= Glykosylceramid)
CHO1,2	=	Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferasen
CIP	=	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CL	=	Cardiolipin
Cm1	=	Cytochrom P ₄₅₀ -Isoform 1 aus <i>Candida maltosa</i>
C-/N-Terminus	=	Carboxyl- bzw Aminoende eines Proteins
CoA	=	Coenzym A
COP I/II	=	<i>Coat Protein I/II</i>
COS	=	Nierenzelllinie aus Grünen Meerkatzen
CPMV	=	<i>Cowpea Mosaic Virus</i>
CPR	=	Cytochrom P ₄₅₀ -Reduktase
DAF	=	<i>days after flowering</i>
DAG(K)	=	Diacylglycerol(Kinase)
DC	=	Dünnschichtchromatographie
Δ6	=	Delta 6-Desaturase
DEPC	=	Diethylpyrocarbonat
DGD(S)	=	Digalaktosyldiacylglycerol (Synthase) oder Diglucosyldiacylglycerol (Synthase)
DMI	=	<i>Does not make infections</i>
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
dNTP(s)	=	Desoxynukleosidtriphosphat(e)
DRM	=	Detergenz-unlösliche Membrandomänen
DV	=	<i>Dense vesicle</i>
EC ₅₀	=	<i>effectiv concentration (50 % of max. concentration)</i>
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2	=	Eukaryoter Translationsinitiationsfaktor 2
EOR	=	<i>ER-overload response</i>
(r/g)ER	=	(rauhes/glattes) Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	=	<i>ER-associated degradation</i>
E-Seite	=	Extraplasmatische Membranseite
ESR	=	<i>ER-stress response</i>
EtOH	=	Ethanol
FS	=	Fettsäuren
g	=	Erdbeschleunigung (9,81ms ⁻²)
GA	=	Glutaraldehyd
G3P	=	Glycerin-3-phosphat

GFP	=	Grün-fluoreszierendes Protein
GL	=	Glykolipid
GPI	=	Glycosylphosphatidylinositol
GUS	=	β -Glucuronidasegen
h	=	Stunde
H _{I,II}	=	Hexagonale Membranphasen
HAC1	=	Durch Protein-Fehlfaltung aktivierter Hefe-Transkriptionsfaktor
H/KDEL	=	Histidin/Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin
hPa	=	Hektopascal (entspricht der Einheit mbar)
HPTLC	=	<i>High Performance Thin layer Chromatography</i> (Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie)
HSP70	=	<i>heat shock protein 70</i> (kD)
HY5	=	<i>Elongated Hypocotyl-5</i> (Transkriptionsfaktor)
I _{I,II}	=	kubische Membranphasen
IE	=	Innere Chloroplastenmembran
INO1(Ino1-4p)	=	Inositol-1-phosphat-Synthase (Transkriptionsfaktoren)
IP ₃	=	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	=	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
IRE	=	<i>ER transmembrane protein kinase/endoribonuclease</i>
Kan	=	Kanamycin
L _{α,β}	=	Lamellare Membranphasen
LeB ₄	=	Legumin B 4
LHC	=	Lichternte-Komplex
liq.	=	Flüssig (als Zusatz, z.B. N ₂ liq.)
M	=	Mol/l
MA	=	Membrananker
Mid1p	=	Die Zellteilungsebene in <i>S. pombe</i> festlegendes Protein (auch dmf1)
min	=	Minute
MES	=	Morpholinoethan-Sulfonsäure
MGD(S)	=	Monogalaktosyldiacylglycerol (Synthase)
MVB	=	<i>Multi vesicular body</i>
MZ	=	Mesophyllzelle
NAD(P)H	=	Nikotinamidadenindinukleotid-(phosphat) _{reduziert}
NOS	=	Nopalinsynthase
OCS	=	Octopinsynthase
OD ₆₀₀	=	Optische Dichte photometrisch bei 600 nm Wellenlänge bestimmt
OE	=	Äußere Chloroplastenmembran
Opi1p	=	Repressor der Phospholipidsynthese in Hefe
OS	=	Oleosom(en)
P-Seite	=	Plasmatische Membranseite
PA	=	Phosphatidsäure
PAC	=	<i>Precursor-accumulating compartment</i>
PC(S)	=	Phosphatidylcholin (Synthase)
PCR	=	Polymerase Kettenreaktion oder <i>partially coated vesicle</i>
PE	=	Phosphatidylethanolamin
PEG	=	Polyethylenglykol
Pellet	=	Sediment auf dem Gefäßboden nach Zentrifugation/Fällung
PERK	=	<i>Protein kinase-like ER kinase</i>
Pex15p	=	Peroxisomales Import-/Exportprotein
PFA	=	Paraformaldehyd
PG	=	Phosphatidylglycerol und Proteingehalt
PI	=	Phosphatidylinositol
PI3K	=	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂	=	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PL	=	Phospholipid
Pl	=	Plastid
Plams	=	<i>Plastid-associated membrane(s)</i>
PLC/D	=	Phospholipase C/D
PM	=	Plasmamembran
PPA	=	Phosphatidylpropanolamin
PS	=	Phosphatidylserin

PS I,II	=	Photosystem I,II
PSD	=	PS-Decarboxylasen
psi	=	pounds per square inch (14,5 psi = 1 bar = 10 ⁵ Pa)
PVC	=	Prävuokuläre Kompartimente
R _f	=	Retentionsfaktor
(m)RNA	=	(messenger) Ribonukleinsäure
Rif	=	Rifampicin
RISC	=	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RT	=	Raumtemperatur
S	=	Sedimentationskonstante (Svedberg)
S.c.	=	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	=	Natriumdodecylsulfat bzw. Natriumlaurylsulfat
sek	=	Sekunde
SG	=	Sterolglycosid
σ _{Xquer} (%)	=	Standardabweichung des Mittelwertes (in Prozent)
Sk _{g.}	=	Signifikanzgrenze
<i>sn</i>	=	stereospezifische Numerierung
SQD	=	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
SSH	=	Subtraktive Suppressions-Hybridisierung
SV	=	Sekretorische Vesikel
TAG	=	Triacylglycerole (= Neutrallipide)
TEM	=	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Template	=	DNA, die als Polymerisationsvorlage in der PCR-Synthese dient
Tet	=	Tetracyclin
TG	=	Transgen
TGN	=	Trans Golgi-Netzwerk
THF	=	Tetrahydrofuran
TIGR	=	<i>The Institut for Genomic Research</i>
T _m	=	Schmelz-/Denaturierungstemperatur
Tm	=	Trockenmasse
TMD	=	Transmembran-Domäne
TV	=	Transportvesikel
TY	=	Thylakoide
UAS	=	<i>Upstream activating sequence</i>
UDP	=	Uridindiphosphat
Upm (rpm)	=	Umdrehungen pro Minute
UPR	=	<i>Unfolded protein response</i>
USP	=	<i>Unknown seed protein</i>
(5'3') UTR	=	Untranslatierter Bereich vor/hinter der codierenden Sequenz
ü.N.	=	über Nacht
VAP	=	<i>VAMP(v-SNARE)-associated proteins</i>
v/v	=	Volumenzugabe auf Volumenendwert bezogen
w/v	=	Massenzugabe auf Volumenendwert bezogen
XBP1	=	<i>X-box-binding protein-1</i>
X-Gal	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid
YPFP	=	Prozessive β-Glukosyltransferase aus <i>Staphylococcus aureus</i>
Zw	=	Zellwand

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort	11
	Zielsetzungen	13
1	Einleitung	15
	Teil 1 – Lipidzusammensetzung, Aufbau und Dynamik von Biomembranen	
1.1	Membranlipide	15
1.1.1	Phospholipide	16
1.1.2	Glykolipide	17
1.1.3	Sterole	17
1.1.4	Sonstige Lipide	18
1.2	Biosynthese der Membranlipide	20
1.2.1	Fettsäuren	20
1.2.2	Syntheschema der Glycerolipide im Überblick	21
1.2.2.1	Phosphoglycerolipide	22
1.2.2.2	Glykoglycerolipide	22
1.3	Funktionen der Membranlipide	23
1.3.1	Struktureller Grundaufbau	23
1.3.2	Spezifische Funktionen	27
1.3.2.1	Phosphoglycerolipide	27
1.3.2.2	Glykoglycerolipide	28
1.3.2.3	Sterole	29
1.3.2.4	Wirtschaftliche Bedeutung	29
1.4	Membranaufbau	30
1.4.1	Lipidverteilung – Asymmetrie der Membran	30
1.4.2	Membranmodell („fluid mosaic“)	31
1.5	Membranfluß	33
1.5.1	Der Sekretorische Weg	33
1.5.2	Nebenwege	36
	Teil 2 – Homöostase und Proliferation	
1.6	Allgemeines zur Membranvermehrung	38
1.7	Zugrunde liegende Mechanismen	40
1.7.1	Die ER-Streß-Antwort: Reaktion auf Peptidimport am ER	40
1.7.2	Funktionen	42
1.7.3	Intentionen	43
1.7.4	ER-Streß in Pflanzen	43
1.7.5	Ein Rätsel - Zusammenhang zwischen ER-Streß und Membranproliferation	44
1.8	Mechanismen experimentell induzierter Membranproliferation	
	(Beispiele Tabelle 1 - Anhang A)	46
1.8.1	Dosis-Steigerung	46
1.8.1.1	Cytochrom b5	48
1.8.1.1.1	Insertion und Lokalisation	49
1.8.1.1.2	Cytochrom b5 als Teil chimärer Proteine in Fusionsstudien	49
1.8.2	Dosis-Senkung	50
1.8.2.1	Wirkungsweise	51

1.9	Beispiele induzierter Membranproliferation in Pflanzen	51
1.9.1	Induktion der Wurzelknöllchen	51
1.9.2	Pflanzenviren	53
1.9.3	Reißverschlußmembranen	55
1.10	Samenentwicklung – <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
	Experimenteller Ansatz dieser Arbeit	58
2	Material und Methoden	59
2.1	Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien	59
2.1.1	Geräte	59
2.1.2	Chemikalien und Enzyme	61
2.1.3	Chemikalien für die elektronenmikroskopische Präparation	62
2.1.4	Elutionsmittel für Lipide	63
2.1.5	Laufmittel für DC/HPTLC	63
2.1.6	Färbemittel für die Chromatographie	63
2.2	Organismen	64
2.2.1	Bakterien	64
2.2.2	Hefen	65
2.2.3	Pflanzen	65
2.3	Vektoren	65
2.3.1	Klonierungsvektoren für <i>Escherichia coli</i>	65
2.3.2	Expressionsvektoren für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
2.3.3	Expressionsvektoren für Pflanzen	66
2.3.3.1	Expressionskassetten	66
2.4	Anzucht der Organismen	66
2.4.1	Kultur von <i>Escherichia coli</i>	66
2.4.2	Kultur von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68
2.4.3	Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
2.4.4	Kultur und Selektion von Arabidopsis und Raps	70
2.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	71
2.5.1	Herstellung kompetenter Zellen	71
2.5.2	Transformation	72
2.6	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	72
2.6.1	Herstellung Ca ²⁺ kompetenter Zellen	73
2.6.2	Transformation	73
2.7	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
2.7.1	Transformation mit der PEG-Methode	74
2.7.2	Herstellung elektrokompenter Zellen	74
2.7.3	Elektroporation	75
2.8	Pflanzentransformation	75
2.8.1	Biolistische Transformation	75
2.8.2	Stabile Transformation	77
2.8.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77
2.8.2.2	<i>Brassica napus</i>	78
2.8.2.3	<i>Linum usitatissimum</i>	78
2.9	Isolierung von Plasmid-DNA	79
2.9.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	79

2.9.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	79
2.9.3	Präparation von low-copy Plasmid-DNA aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	79
2.9.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
2.10	Isolierung genomischer DNA	81
2.10.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Escherichia coli</i>	81
2.10.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
2.10.3	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen	83
2.11	Isolierung von RNA aus Pflanzen	85
2.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	87
2.13	Synthese von cDNA	87
2.14	Klonierungsmethoden	88
2.14.1	Restriktion von DNA	88
2.14.2	Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	88
2.14.3	Ligation	88
2.15	Polymerase-Kettenreaktion	89
2.15.1	Standardbedingungen	89
2.15.2	<i>Hot start</i> -PCR	90
2.15.3	<i>Touch down</i> -PCR	90
2.15.4	<i>Tailing</i> -Reaktion	90
2.15.5	Kolonie-PCR	91
2.15.6	Semiquantitative-(RT) PCR	91
2.15.7	Assembly-/Overlap-PCR	93
2.16	Agarose-Gelelektrophorese	94
2.16.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	94
2.16.2	Agarose-Gelelektrophorese von RNA	94
2.16.3	Elution aus Agarose-Gelen	95
2.17	Sequenzierung	95
2.18	Computer-gestützte Auswertung von Sequenzdaten	96
2.19	Southern-Blot Analyse	97
2.19.1	Restriktion genomischer DNA	97
2.19.2	DNA-Transfer auf Nylonmembranen	97
2.19.3	Herstellung von DNA-Sonden	98
2.19.4	Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschung	99
2.19.5	Detektion	99
2.20	Expression in Hefe	100
2.20.1	Klonierung rekombinanter Hefepasmide	100
	Tabelle 1: Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in Hefe	101
2.20.2	Heterologe Ko-Expression von Doppel- u. Dreifachkonstrukten in Hefe	103
2.21	Expression in Pflanzen	104
2.21.1	Klonierung von Konstrukten zur Pflanzentransformation	104
	Tabelle 2: Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in Pflanzen	105
2.22	Lipidanalytik	107
	Schema 1: Lipidanalyse von Pflanzensamen - Arbeitsgang im Überblick -	107
2.22.1	Isolierung der Gesamtlipide aus Hefe und Pflanzen	108
2.22.2	Säulenchromatographische Trennung von Neutral-, Glyko- und Phospholipiden	108
2.22.3	HPTLC-Untersuchung mit dem CAMAG-System	109
2.22.4	Präparative Dünnschichtchromatographie	109
2.22.5	Darstellung und GC-Analyse von Fettsäuremethylestern	109
2.22.6	Gaschromatographische Quantifizierung	110

2.22.7	Kolorimetrische Lipid-Phosphatbestimmung	111
2.22.8	Kolorimetrische Lipid-Zuckerbestimmung	112
2.23	Bestimmung des Proteins von Pflanzensamen	112
2.24	Elektronenmikroskopie	113
2.24.1	Hefen	113
2.24.2	Pflanzensamen	115
3	Ergebnisse und Diskussion	117
3.1	Rapssorten-Screening	118
3.2	Attenuationsansätze in <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
3.2.1	Datenbanksuche	121
3.2.2	Untersuchung des Expressionsstatus homologer Cb ₅ -Vertreter in <i>Arabidopsis</i>	122
3.2.3	Auswertung der Cytochrom b ₅ -Attenuationslinien	125
3.2.4	Abschließende Bewertung der Attenuationsansätze	127
	Bildtafel 1	129
3.3	Expressionsansätze in <i>Brassica napus</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	132
3.3.1	Überprüfung auf Funktionalität <i>in planta</i>	132
3.3.2	Samenanalysen	133
3.3.2.1	<i>Brassica napus</i>	134
3.3.2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	135
3.3.2.3	Bewertung der Resultate	136
3.3.3	Saatuntersuchung der Cb ₅ - und der CPR-Linien aus <i>Arabidopsis</i>	137
3.3.3.1	Keimungsverhalten der Krüppelsamen der CPR-Linien	137
3.3.3.2	Überprüfung des Transgenstatus	138
3.3.3.3	Neutrallipidgehalte im Vergleich zum Wildtyp	139
3.3.4	Auswirkungen auf die Polarlipidzusammensetzung	139
3.3.4.1	Phospholipidverteilung im Vergleich zum Wildtyp	140
3.3.4.2	Glykolipidverteilung im Vergleich zum Wildtyp	142
	Bildtafel 2	144
3.3.5	Abschließende Diskussion der Attenuations- und Expressionsansätze in Pflanze	148
3.3.6	Zusammenfassung - Membranproliferation <i>in planta</i>	150
3.4	Expressionsversuche in Hefe	151
3.4.1	Hefe-Screening	151
3.4.2	Expression einer chimären heterologen Sequenz	152
3.4.3	Kombinierte Expressionen in Hefe	153
3.4.3.1	Erster Ansatz: Gezielte Steigerung des Phosphatidylcholin-Gehaltes in Hefe	153
3.4.3.2	Zweiter Ansatz: Gezielte Anreicherung der MGD- und DGD-Gehalte in Hefe	156
3.4.3.3	Einfluß von Fettsäuremodifikationen auf induzierte Membranproliferation in Hefe	161
3.4.3.4	Einfluß von Fettsäuremodifikationen auf das Phospholipidprofil	164
	Bildtafel 3	169
3.4.4	Zusammenfassung - Membranproliferation in Hefe -	171
3.5	Rückblick: Kritische Bewertung der Methoden	172
3.6	Membranproliferation: Rückblick und Ausblick	174

Literatur

Anhänge

Danksagung

Vorbemerkungen

Zur besseren Hervorhebung sind zentrale Begriffe in den einzelnen Abschnitten der Einleitung in Fettdruck gehalten.

Bei der Topographie der Membranseiten wurde auf das Konzept von Schnepf (1964 und 1966) zurückgegriffen. Allen plasmatischen Kompartimenten (Cyto-, Karyo-, Mito- und Plastoplasma) zugeneigte Monolayer werden als P-Seiten bezeichnet. Alle extraplasmatischen Reaktionsräumen (Lumina von ER, Golgi, Peroxisomen, vesikulär-vakuolärer Einrichtungen und der Thylakoide sowie Intermembranräume von Mitochondrien und Chloroplasten und das extrazelluläre Medium) zugewandten Monolayer werden danach als E-Seiten gekennzeichnet.

Proliferation, die, lat. *proles* (= Nachkommenschaft), lat. *ferre* (= tragen). Auf Zell- und Gewebeebene Bezeichnung für Sprossung/ Vermehrung (med. auch für Wucherung). In dieser Arbeit sind *ausschließlich* solche *intrazellulären* Prozesse gemeint, die zusätzliche Membranfläche über den bestehenden Umfang hinaus erzeugen. (In Anlehnung an Hentschel und Wagner, 1990)

Abkürzungen von Genen und Genprodukten

Gene werden allgemein mit Großbuchstaben bezeichnet (z.B.: CB₅, MID1 usw).

Bei Genprodukten ist entweder nur der erste Buchstabe ein Großbuchstabe (z.B.: Cb₅, Mid1 usw) mit gelegentlich angehängtem -p- für Protein (z.B. Mid1p) oder die Bezeichnung erfolgt in kursiven Großbuchstaben (z.B.: *AAPT*, *DGDS*, *LPAAT* usw).

Ausnahmen bilden importierte Abbildungen und Schaubilder aus der Literatur. Dort wird die Nomenklatur der Autoren/ des Autors übernommen.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit war Bestandteil des 5jährigen BMBF-Verbundprojektes „NAPUS 2000 – Gesunde Lebensmittel aus transgener Rapssaat“. Der Zielsetzung dieser Arbeit vorangestellt, soll zunächst ein Überblick über die Absichten und die Verbundstruktur dieses Projektes, insbesondere des hier bearbeiteten Teilprojektes gegeben werden.

Das Ziel von NAPUS 2000 war einerseits die umfassende Nutzung des Rapskorns, um eine bessere Ausnutzung dieses nachwachsenden Rohstoffes zu erzielen. Andererseits galt es auch, durch Hinzunahme gentechnischer Ansätze in kürzerer Zeit neue Qualitätslinien auf dem Weg zu einer gesünderen Ernährung zu erhalten.

Im Zentrum der Bemühungen, den ernährungsphysiologischen Wert zu steigern und Konkurrenzüberlegenheit gegenüber Sojaprodukten herzustellen, standen vier Komponenten:

- Neutrallipid
- Protein
- Antioxidantien
- Polarlipid

Im Fokus dieser Arbeit standen die Polarlipide, deren einzelne Fraktionen in den Membranen der pflanzlichen Eucyte keineswegs einheitlich verteilt sind, wie das Schaubild zeigt:

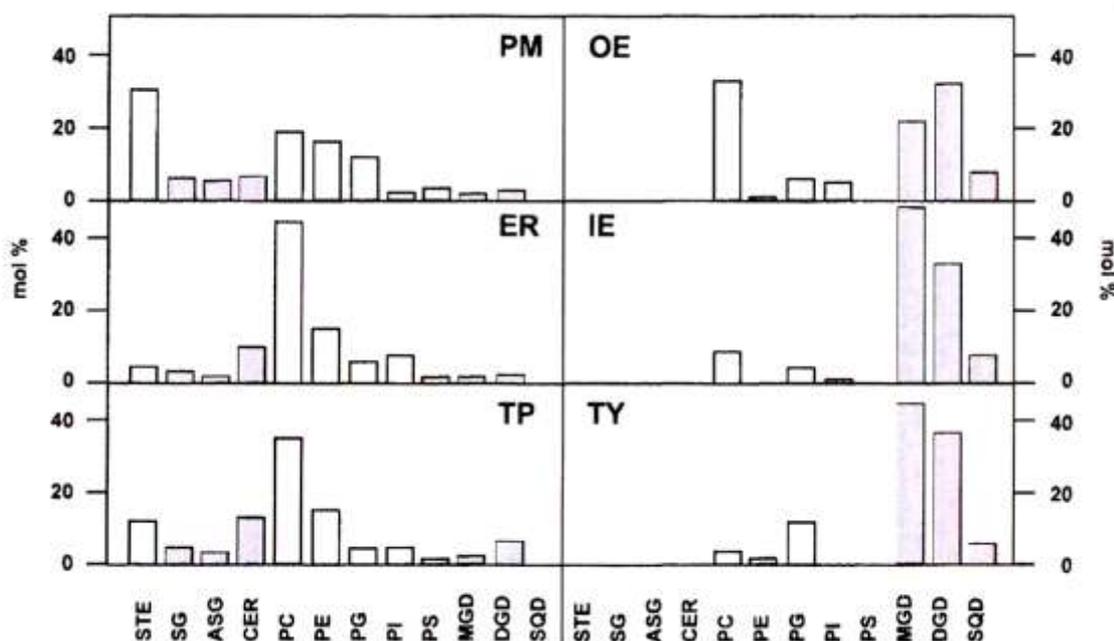


Abbildung 1: Lipidprofile pflanzlicher Membransysteme

Nach Lochnit et al. (2001). Plasmamembran (PM); Endoplasmatisches Retikulum (ER); Tonoplast (TP); Thylakoide (TY); innere + äußere Chloroplastenmembran (IE + OE). Acyliertes Sterolglycosid (ASG), Cerebrosid (CER), Di- und Monogalaktosyldiacylglycerol (DGD und MGD), Phosphatidylcholin

(PC), -ethanolamin (PE), -glycerol (PG), -inositol (PI), -serin (PS), Sterolglycosid (SG), freies Sterol (STE) und Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQD). **Phospholipide** = PC, PE, PI, PS und PG. **Glykolipide** = MGD, DGD, SQD, Cer, ASG und SG. Werte auf der linken Seite aus Gerstenwurzeln, auf der rechten Seite aus Roggenblättern.

Die Aufgabe bestand einerseits (und vorrangig) in der generellen Anreicherung aller dieser Komponenten in Rapssaat, um langfristig diese heimische Ressource als quantitative Alternative zum Soja-Lecithin zu etablieren. Weiterhin bestand von industrieller Seite die Vorgabe, durch gezielte Anreicherung einzelner Polarlipidkomponenten wie z.B. Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS) oder Diglykosyldiacylglycerol (DGD) eine verbesserte Lecithinqualität zu erzeugen, um neue Absatzmärkte zu erschließen.

Um innerhalb von fünf Jahren Ergebnisse vom ersten Forschungsansatz bis zur abgeschlossenen Produktentwicklung voranzutreiben, agierten die 18 Projektpartner in einem „Hand-in-Hand“-Verbund, bei dem die universitären Arbeitsgruppen des Projekts vorrangig mit Bereitstellung der Transformationskassetten beschäftigt waren. Die Transformation und Selektion erfolgte zentral im Saaten-Union Resistenzlabor; die Inanzuchtnahme bei den Züchtern Norddeutsche Pflanzenzucht (NPZ) und Deutsche Saatenveredelung (DSV). Die anschließende Untersuchung der transgenen Saaten wurde wiederum von den Universitätspartnern vorgenommen. Das Screening mariner Mikroorganismen zur Bereitstellung neuer kodierender Sequenzen sowie die Untersuchung der Produkteigenschaften und Optimierung der Extraktionsbedingungen wurde parallel von den Industriepartnern durchgeführt.

Existierten anfangs kaum Einschränkungen im Rahmen der „Überprüfung des Konzepts“, dominierten doch gegen Mitte der Projektlaufzeit von Züchterseite Einwände gegen die Inanzuchtnahme transgener Pflanzen mit tierischen oder viralen Gensequenzen aus Gründen öffentlicher Akzeptanz.

Diesen Bedenken mußte auch in der vorliegenden Arbeit insoweit Rechnung getragen werden, als daß auf Expressionsansätze mit entsprechenden Sequenzen verzichtet wurde.

Zielsetzungen

Die hier beschriebenen Untersuchungen sind ein erster Versuch, gezielt in die Regulierung der Membranproliferation pflanzlicher Zellen einzugreifen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse und die aufgetretenen Schwierigkeiten sowie die ausgedehnte Literaturrecherche zu dieser Thematik stellen eine Basis dar, auf der weitere Studien zur Membranhomöostase bei Pflanzen aufbauen können. Die ursprünglichen Zielsetzungen und Absichten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Mit einem einfachen Transformationsansatz über „sense“- und „antisense“-Expression ausgewählter Proteine sollte der zelluläre Gehalt an Membranfläche in Speichergewebszellen von Ölsaaten gesteigert werden.

Abgesehen von der damit erreichten Realisierung der Zielsetzung böten derartige Pflanzen die außerordentlich interessante Möglichkeit, in Folgeuntersuchungen durch genomweite Durchmusterung die an der Homöostase-Regulation beteiligten Proteine zu identifizieren.

Die Konsequenzen induzierter Membranproliferationen sollten auf der Ebene der Membranlipide näher untersucht werden.

Die Polarlipidprofile der transformierten Organismen sollten zeigen, ob Membranproliferation mit einer Veränderung der Membranlipide einhergeht und auf diese Weise Lipidprofile zu verändern sind. Wäre eine Membranvermehrung mit verstärkter Synthese nur einer einzigen Lipidkomponente verknüpft, könnte dies die Anreicherung anderer Membranlipide begrenzen. Darüberhinaus bestünde die Möglichkeit, durch die Überexpression eines Kopfgruppen-modifizierenden Membranenzym über dessen Anreicherung auch eine Vermehrung der Gesamtmembranfläche zu erreichen und damit gleichzeitig den Bedarf an Membranlipiden zu erhöhen.

Durch Kombination von Membranproliferation mit gezielter Membranlipid-Kopfgruppensynthese sollte eine Anreicherung bestimmter Membranlipide erzielt werden (kombinierter Ansatz).

Im Erfolgsfall entstünden neue Linien von Ölsaaten mit schon angereicherten Membranlipiden, die als Ausgangsprodukte für neue industrielle Anwendungen dienen könnten (siehe hierzu 1.3.2.4). Da der experimentell induzierte Proliferationserfolg *in planta* zu Beginn dieser Arbeit ungewiß war, wurde alternativ als „proof of concept“ die Realisierung des kombinierten Ansatzes in Hefezellen ins Auge gefaßt.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob Fettsäureprofile die Proliferationsfähigkeit einer Membran beeinflussen können. Diese Fragestellung wurde an Hefezellen durch Fütterung mit Fettsäuren verschiedener Kettenlänge und Doppelbindungszahlen untersucht. Damit sollte herausgefunden werden, ob es auf der Ebene der Fettsäuren eine „Idealzusammensetzung“ für Membranvermehrung gibt.

Einleitung

Teil 1

Lipidzusammensetzung, Aufbau und Dynamik von Biomembranen

Membranen sind in sich geschlossen, von endlicher Ausdehnung und vermitteln eine Vielzahl wichtiger Funktionen.

Die Zellmembran übernimmt die Funktion der Abschirmung der Zelle gegen die Außenwelt; Endomembranen grenzen innerhalb der Euzyte Reaktionsräume voneinander ab.

Prozesse der Energietransformation und –konservierung, Signalperzeption und –weiterleitung, Biosynthese, Transport, interzelluläre Erkennung, Homöostaseregulation und Motilität sind wesentlich an Membranen gebunden.

1.1 Membranlipide

Membranen eukaryoter Zellen enthalten als Lipidkomponenten u.a. Phospholipide, Glykolipide und Sterole. Ihnen allen eigen ist der amphipathische Charakter aus hydrophiler, der Wasserphase zuneigender Kopfgruppe und hydrophober, das Membranzentrum ausfüllender Anteile. Dieser Eigenschaft verdanken Phospho- und Glykolipide die Fähigkeit, in Wasser spontan Strukturen höherer Ordnung auszubilden wie z.B. Micellen (kugelige und zylinderförmige, einschichtige Monolayer) oder Bilayer (planare Doppel-Lipidschichten).

1.1.1 Phospholipide

Die Phospholipide bilden den anteilmäßig dominierenden Part der Membranlipide eukaryoter Zellen in Pilz-, Tier- und nichtgrünen Pflanzenzellen. Sie werden unterschieden in **Glycerophospholipide** und **Sphingolipide** (siehe Abb.2).

Das Rückgrat der **Glycerophospholipide** bildet Glycerol, an dessen C₁- und C₂- (auch *sn1* und *sn2*) Hydroxygruppen je eine Fettsäure verestert ist. An C₃ hingegen erfolgt die Veresterung mit Phosphorsäure zu Diacylglycerin-3-phosphat. Dieses einfachste Glycerophospholipid, auch **Phosphatidsäure (PA)** genannt, ist die Ausgangsverbindung für alle weiteren Komponenten dieser Lipidgruppe, deren bedeutendste Vertreter **Phosphatidylcholin (PC)**, **Phosphatidylserin (PS)**, **Phosphatidylethanolamin (PE)**, **Phosphatidylinositol (PI)**, **Phosphatidylglycerol (PG)** und Diphosphatidylglycerol bzw. **Cardiolipin (CL)** sind. Der komplexe Biosyntheseweg ist in 1.2.2 kurz skizziert. Während PA und PG in eukaryoten Zellen Minorkomponenten sind, bilden die restlichen in der Reihenfolge PC, PE u. PS/PI die Hauptanteile polarer Phospholipide.

Ebenfalls zu den Glycerophospholipiden gehören die in Säugern synthetisierten **Plasmalogene**, deren Hauptmerkmal die Verknüpfung eines ungesättigten Alkohols über eine Vinylether-Bindung an die *sn1*-Position des Glycerols darstellt. Sie sind angereichert in Muskeln, Herz und Hirn und können im Sarkoplasmatischen Retikulum und im neuronalen Myelin bis zu 20% der Phospholipide ausmachen (Horrocks und Sharma, 1982). Da sie zwar *in planta* auch beschrieben wurden (Wagenknecht, 1957; Scherer et al., 1988), ihre Bedeutung in der Membran jedoch nicht bekannt ist, werden sie im folgenden nicht mehr behandelt.

Einen gänzlich anderen Aufbau haben die **Sphingolipide**. Das Molekül-Grundgerüst bildet **Ceramid**, welches aus einer langkettigen Fettsäure und einem langkettigen Aminoalkohol (Sphingosin bzw Phytosphingosin) besteht. **Sphingomyeline** entstehen daraus durch Verknüpfung der endständigen Hydroxygruppe des Ceramids mit Phosphorylcholin/-ethanolamin. Sie finden sich jedoch nicht in Pflanzen.

1.1.2 Glykolipide

Anstelle des Phosphats treten in dieser Polarlipidklasse Zucker-Kopfgruppen an *sn3* von 1,2-Diacyl-*sn*-glycerol (DAG) bzw an der Hydroxygruppe des Ceramidgerüsts auf.

Die beiden Hauptvertreter der **Glykoglycerolipide** sind Monogalaktosyldiacylglycerol, **MGD** [1,2-Diacyl-3-O-(β -D-galaktopyranosyl)-*sn*-glycerol] und Digalaktosyldiacylglycerol, **DGD** [1,2-Diacyl-3-O-(α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-galaktopyranosyl)-*sn*-glycerol]. Sie kommen überwiegend bei einigen Bakterien sowie in Algen und höheren Pflanzen vor und erreichen dort höchste Konzentrationen in plastidären Membranen. Fast gänzlich auf photosynthetisierende Pro- und Eukaryoten beschränkt ist das **Sulfolipid** Sulfoquinovosyldiacylglycerol, **SQD** mit 6-Desoxy-6-sulfo- α -D-glucose als Kopfgruppe in der *sn3*-Position des DAG-Gerüsts, das unter physiologischen pH-Bedingungen eine negative Ladung trägt.

Den **Glykosphingolipiden** wiederum liegt Ceramid als Rückgrat zugrunde. Ein bedeutender Anteil an dieser Gruppe entfällt bei Pflanzen auf die neutralen Glykosylceramide (**Cerebroside**), deren Aufbau den Sphingophosphatiden ähnlich ist, mit dem Unterschied, daß anstelle von Phosphat eine oder mehrere Zuckergruppen mit der Hydroxygruppe des Ceramids verknüpft sind. Während dies Glukose und Galaktose bei Tieren und Pilzen ist, finden sich bei Pflanzen ausschließlich Gluko- und Mannocerebroside (Sperling et al., 2004). Komplexere Glykosphingolipide wie die sauren **Ganglioside** aus verzweigtkettigen Sialinsäurebausteinen (N-Acetyl-/N-Glykoly-Neuraminsäure) am Ceramid finden sich nicht in Pflanzen; Cerebroside mit Sialinsäuremonomeren finden sich jedoch in photosynthetisierenden Prokaryoten und eukaryoten Einzellern (Preisfeld und Ruppel, 1995; Jensen et al., 1991). Zu den Glykosphingolipiden gehören schließlich auch an C3 der Galaktose sulfatierte und β -glykosidisch mit Ceramid verknüpfte Cerebrosideulfate, (**Sulfatide**) die in Pflanzen ebenfalls nicht vorkommen.

1.1.3 Sterole

Zu den wichtigsten, ubiquitär in Eukaryoten gefundenen Membranbestandteilen gehören die Sterole. Während in höheren Organismen zumeist ein einziges Sterolendprodukt dominiert, wie z.B. Ergosterol in Pilzen oder Cholesterol in Tieren, kommen *in planta* mehrere

Endprodukte des Sterolstoffwechsels vor. So konnten in *Zea mays* bis zu 61 verschiedene Sterole und -derivate nachgewiesen werden (Guo et al., 1995).

Als strukturelles Charakteristikum ist dieser Stoffklasse ein tetrazyklisches Gerüst aus einem Pentan- und drei Hexanringen mit einer Hydroxygruppe am C3 gemein. Funktionell bildet die C3-OH-Gruppe als polarer Substituent das Pendant zur Kopfgruppe anderer Membranlipide und ordnet sich an der Wasserphase des Bilayers an. Zusätzlich tragen die meisten Sterole eine Doppelbindung zwischen C5-C6 und werden daher als Δ^5 -Sterole bezeichnet, während in Pflanzen auch gesättigte Komponenten als Stanole vorkommen. Außer Cholesterol tragen die meisten Sterole zudem am C24 eine kurze Alkylgruppe.

In Abbildung 2 ist die Grundstruktur eines Produkts dieser Stoffklasse dargestellt (Campesterol).

Sterole liegen entweder ohne Substituenten oder konjugiert vor (zumeist als Sterolester, als Sterolglykoside oder als acylierte Sterolglykoside). In Prokaryoten werden Sterole nur sehr selten angetroffen, dort können stattdessen pentazyklische Hopane mit ähnlichen Funktionen vorkommen.

1.1.4 Sonstige Lipide

Neben den drei oben beschriebenen Hauptgruppen wird eine Reihe weiterer Substanzen in der Literatur zu den Lipiden gerechnet, die aber kaum zu Struktur, Aufbau und Funktion des Bilayers beitragen. Sie können entweder Energiedepots bilden wie die Triacylglycerole oder an der Energietransformation beteiligt sein sowie Oxidations- und Radikalabwehrfunktionen wahrnehmen (Chlorophylle, Carotinoide, Xanthophylle, Chinone, Tocopherole), hormonähnliche Aufgaben ausführen (Eicosanoide), akzessorische Verankerungen vermitteln (Farnesol, Phytol, Dolichol), am Fettaufschluß beteiligt sein (Gallensäuren) oder Abschlußfunktionen ausüben (Wachse).

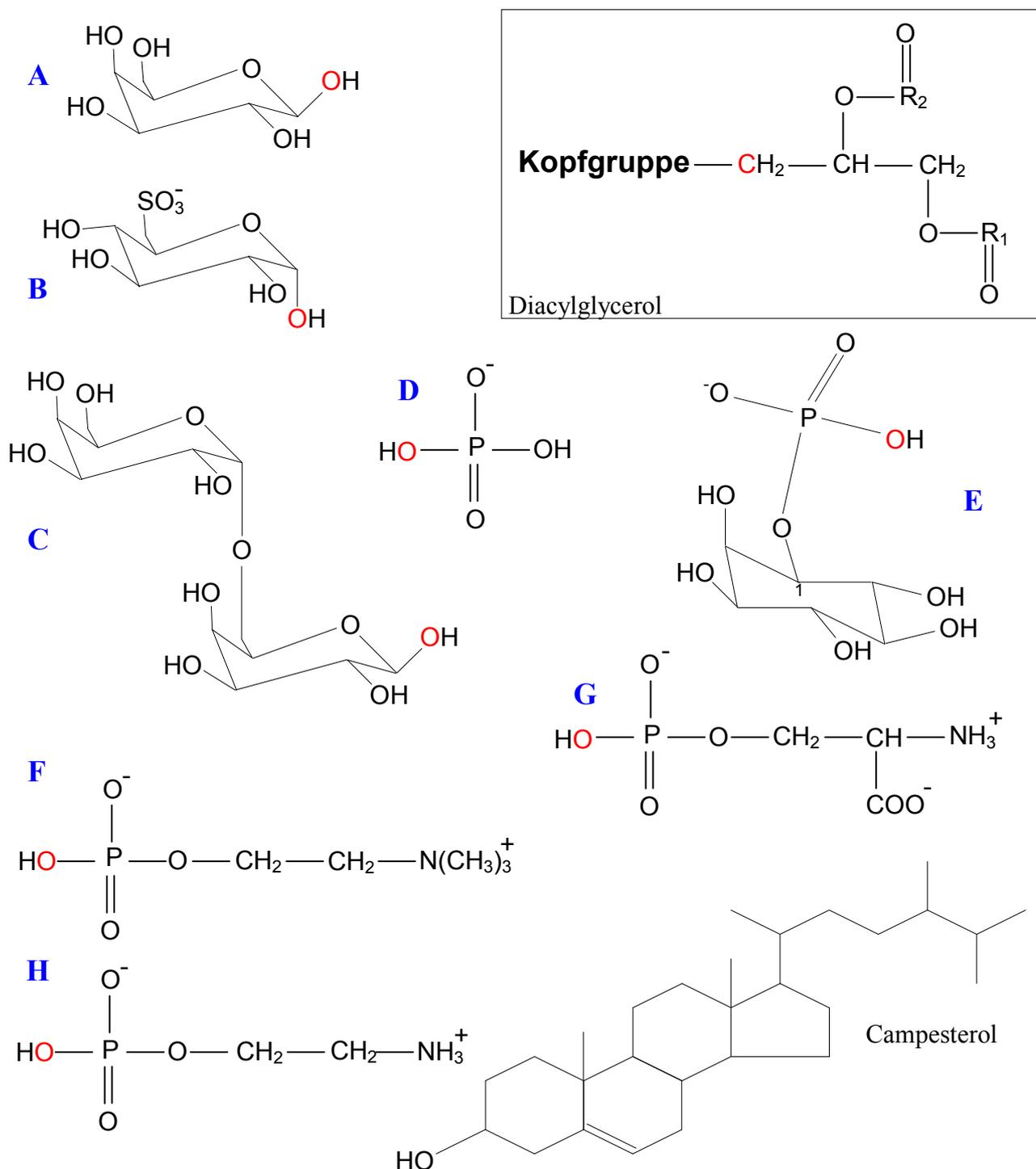


Abbildung 2: Darstellung einiger wichtiger Polarlipidvertreter

Diacylglycerol (DAG; Kästchen) ergibt mit folgenden Kopfgruppen verknüpft:

A = Monogalaktosyldiacylglycerol (MGD); **B** = Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQD); **C** = Digalaktosyldiacylglycerol (DGD); **D** = Phosphatidsäure (PA); **E** = Phosphatidylinositol (PI); **F** = Phosphatidylcholin (PC); **G** = Phosphatidylserin (PS); **H** = Phosphatidylethanolamin (PE). Miteinander verknüpfte Atome sind rot unterlegt. Von den vielen möglichen Endprodukten des Isoprenstoffwechsels wurde ein pflanzliches Sterol dargestellt (Campesterol).

1.2 Biosynthese der Membranlipide

1.2.1 Fettsäuren

(nach: Ohlrogge und Browse, 1995; Ohlrogge und Jaworski, 1997)

Die bei Pflanzen im Stroma der Chloroplasten lokalisierte Biosynthese startet mit der aktivierten C2-Verbindung Acetyl-CoA, die, in fortlaufenden Kondensationsrunden durch eine zum Fettsäuresynthase-Komplex zusammengefasste Enzymmaschinerie, auf 16 bis 18 Kohlenstoffatome anwächst. Während des Anwachsens der Fettsäurekette ist diese an ein ACP (Acyl Carrier Protein) als Trägermolekül gekoppelt.

Der Initialschritt für den Synthesestart ist die Bildung von Malonyl-CoA (C3) durch die Acetyl-CoA-Carboxylase, einem zentralen Kontrollglied dieses Weges. Unter **Kondensation, Reduktion, Dehydratisierung** und erneuter **Reduktion** wird Malonyl-ACP mit Acetyl-CoA zum C4-Körper Butyryl-ACP umgesetzt. Nach fortlaufender Wiederholung der fett unterlegten 4-Schritt Reaktionsfolge mit neuen Malonyl-CoA-Molekülen treten als Hauptendprodukte der Fettsäuresynthese in den Chloroplasten ACP-gebundene **16:0** (Palmitinsäure) und, nach Desaturierung von Stearinsäure, **18:1^{A9}** (Ölsäure) auf. Werden diese Fettsäuren für die Genese von Glycerolipiden an der inneren Chloroplastenmembran verwendet (prokaryoter Weg), so wird 16:0 an der *sn2*- und zumeist 18:1 an der *sn1*-Position des Glycerolphosphat-Rückgrats gefunden (**prokaryotes Muster**). Werden 16:0 und 18:1 hingegen als CoA-Ester ins Cytoplasma transportiert und für den Aufbau von Glycerolipiden an der ER-Membran benutzt (eukaryoter Weg), so finden sich entweder an beiden Glycerin-Positionen C18-Spezies oder 16:0 an *sn1* (**eukaryotes Muster**).

Nach Glycerolveresterung können die Fettsäuren weitere Modifikationen wie z.B. Desaturierung (bis nach **16:3** und **18:3**) erfahren.

Die Erhöhung des Desaturierungsgrades führt dabei zur Steigerung der Fluidität der Membranen und bewirkt z.B. eine Zunahme der Kältetoleranz bei niedriger Umgebungstemperatur (Raison und Orr, 1986; Raison et al., 1982; Kodama et al., 1994). Desaturierung scheint außerdem für die Aufrechterhaltung der Photosynthese in den Chloroplasten unerlässlich zu sein (McCann und Browse, 1998).

1.2.2 Synthese der Glycerolipide im Überblick

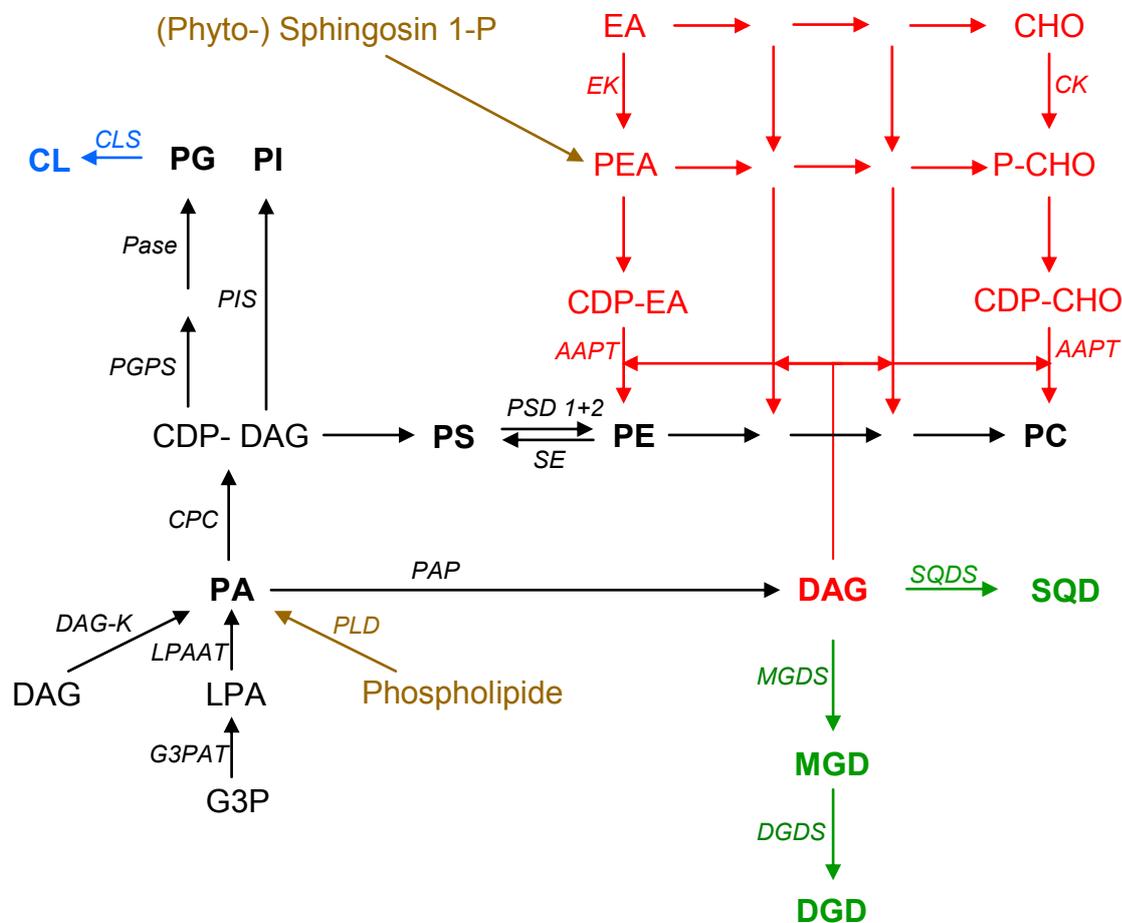


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Glycerolipidstoffwechsels. Rekonstruiert nach Bessoule und Moreau, 2004; Nebauer et al., 2004; Athenstaedt und Daum, 1999; Joyard et al., 1996. Die wichtigsten polaren Lipide sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die Kaskade des über CDP-DAG laufenden *de novo*-Weges ist schwarz gehalten, die Reaktionsfolgen des über aktivierte Kopfgruppen laufenden Kennedy-Weges (Nukleotid-Weges) sind rot unterlegt. Exklusiv in Chloroplasten ablaufende Reaktionsfolgen sind in grün gehalten, solche in Mitochondrien in blau. Einspeisungen aus Abbau- oder Signalstoffwechselwegen sind braun unterlegt. Horizontale rote Reaktionspfeile deuten sukzessive Zwischenprodukte der Methylgruppen-Übertragungsreaktionen von Ethanolamin und dessen aktivierten Derivaten in Richtung Cholin und dessen aktivierten Derivaten an. Der Übersicht halber wurden die Namen fortgelassen.

AAPT = Aminoalkohol Phosphotransferase, CK = Cholin kinase, CLS = Cardiolipin-Synthase, CPC = CTP-Phosphatidsäure-Cytidyltransferase, DAGK = Diacylglycerol-Kinase, DGDS = DGD-Synthase, EK = Ethanolaminkinase, G3PAT = Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase, LPAAT = Lyso-Phosphatidsäure-Acyltransferase, MGDS = MGD-Synthase, P_{ase} = Phosphatase, PIS = PI-Synthase, PGPS = PG-Phosphat-Synthase, PLD = Phospholipase D, PSD = PS-Decarboxylasen, SE = Kopfgruppenaustauschprotein („serin exchange“), SQDS = SQD-Synthase.

1.2.2.1 Phosphoglycerolipide

(nach: Browse und Somerville, 1994; Bessoule und Moreau, 2004; Nebauer et al., 2004)

Obwohl die Enzyme der PC, PE-, CDP-DAG- und PS-Synthese auch an Golgimembran, äußerer Mitochondrienmembran und Plasmamembran nachgewiesen wurden (Kent, 1997; Wang und Moore, 1991; Wissing et al., 1992; Bessoule und Moreau, 2004), vollzieht sich der *de novo* –Aufbau der Polarlipide ab der Stufe der lyso-Phosphatidsäure (LPA) ausschließlich an den P-Seiten von ER, innerer Chloroplasten- und Mitochondrienmembran, wobei am ER die Hauptmenge pflanzlicher Phospholipide synthetisiert wird.

Die unter 1.2.1 beschriebenen Fettsäureverknüpfungen des pro- und eukaryoten Weges führen zunächst über **LPA** zu **PA** und folgen dann zwei möglichen Routen, die in Abb. 3 voneinander abgegrenzt wurden.

Nach Bessoule und Moreau (2004) kann die Phospholipidsynthese sowohl von aktivierten Kopfgruppen (**Kennedy-Weg/Nukleotid-Weg**) als auch von aktiviertem DAG (**de novo-Weg**) ausgehen.

Dabei werden PC und PE in Pflanze größtenteils über den Kennedy-Weg hergestellt, während in Hefe in Abwesenheit von Cholin und Ethanolamin die Synthese aller Phospholipide über aktiviertes DAG abläuft.

Arbeiten an verschiedenen Pflanzenorganismen (Tanaka et al., 1980; Vincent et al., 1999; Manoharan et al., 2000) legen die Vermutung nahe, dass nach vollzogener Synthese direkte Umwandlungen der Phospholipide ineinander durch Kopfgruppen-austauschende und –modifizierende Prozesse ebenso möglich sind wie in tierischen Organismen (Siddiqui und Exton, 1992).

1.2.2.2 Glykoglycerolipide

Die Synthesen der Glykoglycerolipide finden ausschließlich in den Chloroplasten statt und gehen von aktivierter Zuckerkopfgruppe aus (Joyard et al., 1996). Dabei wird DAG mit UDP-Galaktose zu **MGD** verknüpft und kann erneut mit UDP-Galaktose zu **DGD** reagieren, während UDP-Sulfoquinovose mit DAG das Sulfolipid **SQD** liefert (Joyard et al., 1996).

Primärer Syntheseort für MGD kann dabei jeweils entweder ausschließlich die innere Chloroplastenmembran sein (Spinat, - Block et al., 1983) oder beide Hüllmembranen

(*Arabidopsis*, - Awai et al., 2001), wobei die Synthesen in der äußeren Membran wahrscheinlich extraplastidäres Ausgangssubstrat verwenden. DGD-Synthesen hingegen scheinen auf die äußere Hüllmembran beschränkt zu sein (Froehlich et al., 2001) und hauptsächlich Substrat vom ER zu verwenden. Als Haupttransportsubstrat aus dem ER wird u.a. Lyso-PC diskutiert (Mongrand et al., 2000).

Wegen der dominanten Enzymaktivität der SQD-Synthase in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran findet hauptsächlich dort die Synthese dieses Sulfolipids statt (Tietje und Heinz, 1998).

1.3 Funktionen der Membranlipide

1.3.1 Struktureller Grundaufbau

Biologische Membranen können in Abhängigkeit von Zusammensetzung und Temperatur verschiedene Grundstrukturen annehmen. Die beiden häufigsten (und biologisch wichtigsten) Zustände des lamellaren Bilayers sind die flüssig-kristalline Phase (L_{α}) und die Gelphase (L_{β}). Erstere ist durch hohen Bewegungsspielraum von Acylketten und Kopfgruppen gekennzeichnet und ist nach Leshem (1992b) charakteristisch für Membranen von Zellen junger Pflanzengewebe, während die Gelphase eher für seneszente Zellen kennzeichnend sein soll und den geordneten kompakten Aspekt der Membran widerspiegelt. Im Gegensatz zu $L_{\alpha,\beta}$ stehen die nicht-Bilayer bildenden hexagonalen (H_I), invertiert hexagonalen (H_{II}), kubischen (I_{II}) und invertiert kubischen (I_I) Phasen (siehe Abb. 4), die Aspekte der Membran darstellen, welche zumeist mit Spezialleistungen im Zusammenhang stehen wie beispielsweise Dehydratationstoleranz in Samen und Pollen, Induktion von Membranporen, Membrankurvatur in Thylakoiden und Golgi-Zisternen sowie Prolamellarkörper-Aufbau (Lindblom und Rilfors, 1989; Selstam et al., 1990).

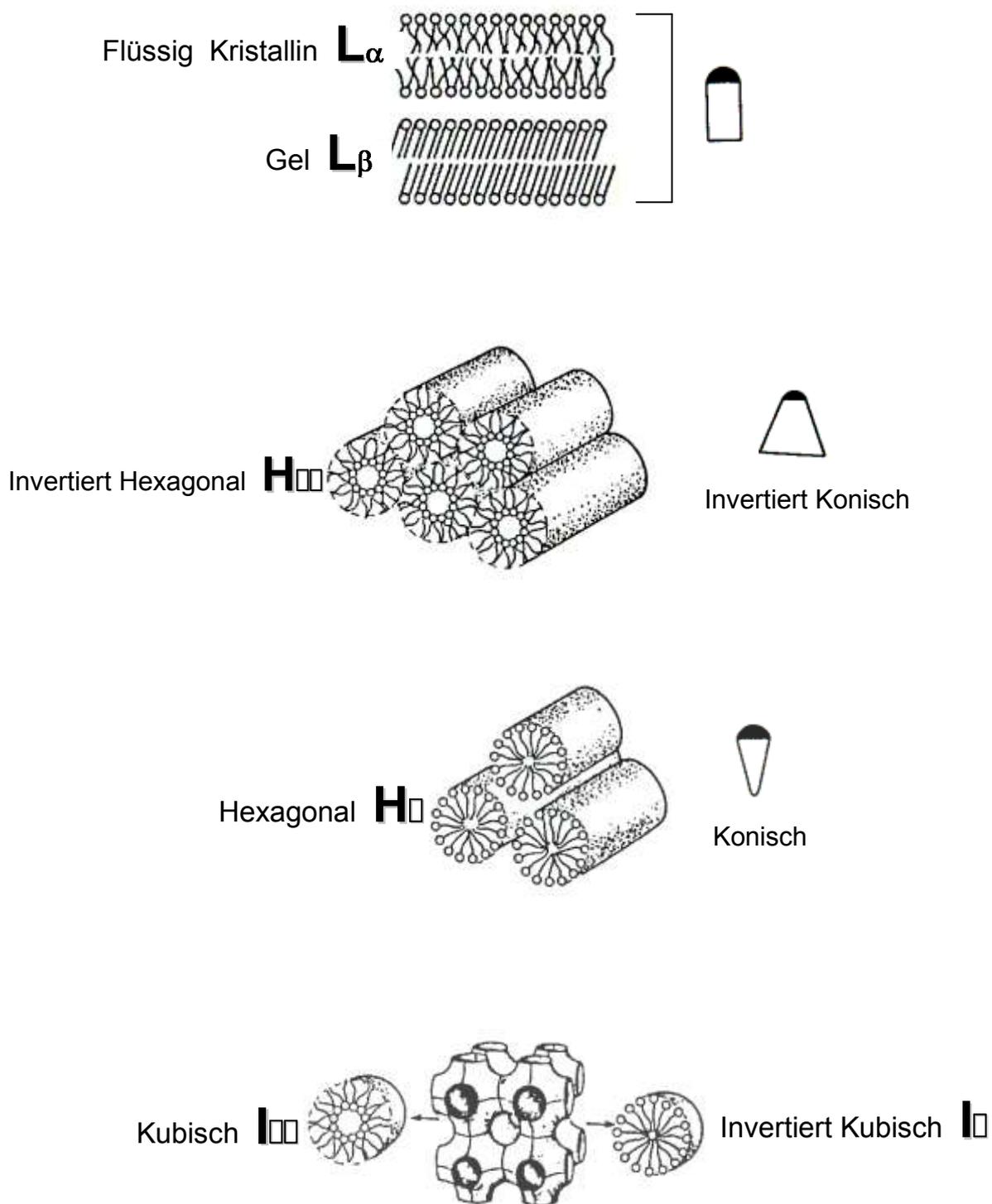


Abbildung 4: Membranphasen-Modelle. Die wichtigsten Membranphasenkonfigurationen inklusive der korrespondierenden geometrischen Figuren rechts davon. Darstellung modifiziert nach Leshem (1992b).

Innerhalb lamellarer Übergänge wirken Temperaturabsenkung, Erhöhung der Sterolgehalte, Fettsäureketten-Verlängerung und steigender Saturierungsgrad in Richtung der rigiden L_{β} -Konfiguration, während entgegengerichtete Prozesse die fluide L_{α} -Phase begünstigen (Leshem, 1992b). Von hervorgehobener Bedeutung für die Fluiditätszunahme scheint dabei die Einfügung von Doppelbindungen zu sein, wobei nur *cis*-Doppelbindungen wirksam sind während *trans*-Derivate das Verhalten gesättigter Fettsäuren aufweisen (Roach et al., 2004). Die Fluidität wird am stärksten bei mittiger Positionierung der Doppelbindung(en) in der Acylkette gesteigert, wobei mit der Einführung der ersten und zweiten Doppelbindung der größte Effekt erzielt wird (Huang et al., 1997), während weitere Doppelbindungen die Fluiditätssteigerung revertieren können (Coolbear et al., 1983). Zudem führen kürzere oder, bei gleicher Kettenlänge, höherdesaturierte Fettsäuren in der *sn2*-Position zu einer stärkeren Bilayerfluidität als in der *sn1*-Stellung (Davis et al., 1981).

Um zu einer Vorhersage zu gelangen, welche Membrankonfiguration ein Lipid bevorzugt erzeugt, wurden die Bewegungsdurchmesser von Kopfgruppe und Acylresten zueinander in Beziehung gesetzt und drei geometrischen Figuren zugeordnet (siehe Abb4) (Cullis und de Kruijff, 1979; Gruner, 1985; Bruce, 1998):

Die **zylindrische Form** mit gleichen Raumabständen entlang der Längsachse wird als Bilayer-begünstigend aufgefasst. PC und DGD entsprechen ideal diesem Typus.

Bei der **invertiert konischen Form** mit schmalen Kopfgruppen- und großen FS-Radien wie bei MGD und PE werden H_{II} - bzw I_{II} -Zustände angestrebt.

Die **konische Form**, bei der der Kopfgruppenraum größer ist als der Acylrest und die bei Lyso-PL und Gangliosiden Verwirklichung findet, tendiert zu H_I - bzw I_I -Strukturen.

Veränderungen der Membranstruktur wurden zumeist an Liposomen in ein- bis drei-Komponentenmischungen polarer Lipide untersucht, während sie *in vivo* das Ergebnis des Einflusses vieler Faktoren *in concerto* sind. Die folgende Aufstellung gibt deswegen nur Tendenzen wieder (nach: Cullis und De Kruijff, 1979; Bruce, 1998; Dowhan, 1997; Leshem, 1992a+b, Dörmann und Benning, 2002; Boumann et al., 2006)

Lipide und Faktoren, die **Bilayer-destabilisierend** wirken:

- ⇒ Temperaturanstieg
- ⇒ Sinkende Wasserkonzentration
- ⇒ Absenkung des pH-Wertes
- ⇒ PE, MGD, Ganglioside, Lyso-Phospholipide und CL(+Ca²⁺)
- ⇒ Desaturierungszunahme bei kleiner Kopfgruppe (MGD, PE)
- ⇒ Desaturierungsabnahme bei großer Kopfgruppe (Ganglioside, Lyso-Phospholipide)
- ⇒ Anstieg der Ca²⁺/Mg²⁺-Konzentration
- ⇒ Hohe Salzkonzentration
- ⇒ Sterole in hohen Konzentrationen
- ⇒ Detergentien (z.B. Saponine)

Lipide und Faktoren, die **Bilayer-stabilisierend** wirken:

- ⇒ PC, PI, DGD, SQD, Sphingomyelin und - unter physiologischen Bedingungen - PS, PG, PA und saturiertes PE
- ⇒ Sterole in geringer Konzentration
- ⇒ Physiologische(r) Temperatur, Wassergehalt, pH-Wert und Salzkonzentration
- ⇒ Kürzerkettige Fettsäuren

Obgleich selbst keine Bilayerstruktur bildend, ist der Einfluß der Sterole auf den Bilayer ganz erheblich. Nach Bloch (1983) läßt sich die Wirkung des Steroleinbaus in vier Schlagworten zusammenfassen: **Verbessertes Packungsverhalten, höhere Rigidität, geringere Durchlässigkeit und verringerte Fluidität.**

Eine Konsequenz des Steroleinbaus in Membranen ist thermodynamischen Untersuchungen zufolge der Verlust einer definierten Phasenübergangstemperatur (Khan und Tucker, 1992).

Wichtig ist auch eine andere Konsequenz ihrer Integration: die „**Streckung**“ ungesättigter Fettsäuren (Bretscher und Munro, 1993). So nimmt der Durchmesser des hydrophoben Bilayerzentrums bei 30 mol-% Cholesterol von ~ 2,6 auf ~ 3 nm zu (Nezil und Bloom, 1992).

Biomembranen sind nicht ausschließlich aus Bilayerkonfiguration-stabilisierenden Lipiden zusammengesetzt. Vielmehr liegen Vertreter stabilisierender und destabilisierender Gruppen in einem für den jeweiligen Organismus typischen Äquilibrium vor. Nicht-bilayerbildende

Lipide wie beispielsweise PE erfüllen wichtige Aufgaben bei Membranfusionen und – abknospungsprozessen und der Funktionssteuerung von integralen Proteinen durch Einstellung des Lateraldrucks (van den Brink-van der Laan et al., 2004). Sie vermögen durch Ausbildung von Krümmung Ein-/Ausfaltungprozesse zu ermöglichen und den Raumbedarf bei steigender Membranfläche zu begrenzen (Cullis und de Kruijff, 1979).

1.3.2 Spezifische Funktionen

Neben den oben skizzierten physiko- und mechanochemischen Eigenschaften einzelner Vertreter, denen nur in artifiziellen *in vitro*- Systemen ein eindeutiger Phaseneinfluß nachgewiesen werden kann, erfüllen alle Polarlipide speziellere Rollen, die zumeist die Bedeutung des von ihnen umhüllten Kompartimentes reflektieren. Schlaglichtartig sind nachfolgend einige wichtige physiologische Funktionen vorgestellt.

1.3.2.1 Phosphoglycerolipide

PC bildet zumeist den Ausgangspunkt der von Vertretern der Phospholipase D-vermittelten Signalstoffwechselwege. Nach Abspaltung der Cholingruppe kann es in Form des zentralen Mediators PA u.a. Einfluß nehmen auf Steuerung des Vesikelflußes, des polaren Zellwachstums, der Pathogenabwehr, des Transkriptionsprogramms, der abiotischen Streßantwort, des Sekretionsverhaltens und der Ausrichtung des Cytoskeletts (Wang, 2004, 2005; Zhang et al., 2005; Monteiro et al., 2005). Das Verhältnis von PC zu PA kann dabei allein durch Phospholipase D-Aktivität grundlegend verändert werden (Welti et al., 2002). Eine ähnliche Bedeutung für Signalprozesse hat PI, das als höher phosphoryliertes PIP₂ von Phospholipase C in DAG und IP₃ gespalten wird. Beide Produkte induzieren über Kalziumfreisetzung sowie Proteinkinase C- und Phospholipase D- Aktivierung eine ähnliche Kette pleiotroper Phänomene wie PA (Mueller-Roeber und Pical, 2002; Monteiro et al., 2005).

Als ubiquitärer Sensor für den Vitalitätsstatus der Zellen kann PS angesehen werden.

Da der Verlust der strikten PS-Beschränkung auf den plasmatischen Monolayer der Plasmamembran apoptotische Prozesse in Tier- und Pflanzenzellen auslöst (Zwaal et al., 2005; O'Brien et al., 1997), wird dessen Lokalisation in vitalen Zellen enzymatisch streng kontrolliert (siehe 1.4.1 → Daleke, 2003).

PE als nicht-Bilayer bildendes Polarlipid scheint benötigt zu werden für vesikuläre Fusionsprozesse beim Aufbau größerer vakuolärer Kompartimente (Tavernier und Pugin,

1995); eventuell verbunden mit seiner Eigenschaft über direkte Proteinbindung in die Steuerung autophagosomaler Prozesse eingreifen zu können (Ichimura et al., 2000). Es ist ferner beteiligt am Aufbau des Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers (Menon und Stevens, 1992; Kamitani et al., 1992) und damit indirekt am (GPI-) Proteinmodifikationsmuster. Wegen der Bedeutung dieser Proteine bei der Polyglykanvernetzung spielt PE eine ebenfalls indirekte Rolle bei der Ausbildung der Zellwandstabilität (Mouyna et al., 2000). Schließlich dient es als Ausgangssubstrat für die PC-Synthese, in welches es nach drei sukzessiven Methylgruppenübertragungen umgewandelt wird (*de novo*-Weg: Scarborough und Nyc, 1967a+b; Atkinson et al., 1980).

CL soll an der Steuerung der Formgebung der Cristae der Mitochondrien sowie der Feinarchitektur der Membranstruktur unter Streßbedingungen beteiligt sein (Mileykovskaya et al., 2005). Erreicht werden soll dies mutmaßlich durch Stabilisierung der Komponenten der Atmungskomplexe (vornehmlich Cytochrom bc₁- u. Cytochrom c Oxidase-Komplex) und Assoziation der Komponenten des „Respirasoms“ miteinander. Analoge Funktionen in der inneren Mitochondrienmembran vermag **PG** zu erfüllen (Dowhan, 1997), das zudem großen Anteil am funktionellen Ablauf der Proteintranslokation durch die Membran hat.

Auch soll plastidär synthetisiertes PG von entscheidender Bedeutung für Funktion und Organisation der Thylakoidmembran sein (Härtel et al., 1998) und durch Begünstigung der Oligomerisierung von PS II, PS I und LHC II stabilisierenden Einfluß auf die Photosysteme haben (insbesondere auf PSII, - Kruse et al., 2000).

1.3.2.2 Glykoglycerolipide

Die in Chloroplasten synthetisierten Galaktosylglyceride **MGD** und **DGD** sind eng mit der Photosynthesefunktion verknüpft. Wie aus Studien an Mutanten belegt wurde, ist die ausreichende Menge beider wichtig für Chlorophyllgehalt, Aufrechterhaltung der Photosynthese und die normale Chloroplastenentwicklung (Jarvis et al., 2000; Kelly et al., 2003). Zudem vermögen sie unter Phosphatmangelbedingungen chloroplastidäre und extraplastidäre Phospholipide zu substituieren, z.B. in Plasmamembran, Tonoplast und Mitochondrien (Härtel et al., 2000; Kobayashi et al., 2004).

Während **SQD** in Cyanobakterien und einzelligen Grünalgen unmittelbar essentiell für die Integrität des Photosystems II zu sein scheint (Sato, 2004), ist in höheren Pflanzen nur die Bedeutung als Substituent für das ebenfalls anionische PG (Haupt-Phospholipid in Chloroplasten) unter Phosphatmangelbedingungen nachgewiesen (Essigmann et al., 1998; Härtel et al., 1998).

1.3.2.3 Sterole

Spezifisch physiologische Wirkungen der Sterole sind häufig von ihren unter 1.3.1 aufgelisteten mechanischen Eigenschaften abgeleitet, so daß eine sichere Aussage über „mechanounabhängige“ Eigenschaften kaum möglich erscheint.

Beispielsweise wird in tierischen Geweben durch Cholesterolanstieg die Funktion aller ATPasen beeinträchtigt, die vieler anderer Transportproteine hingegen angeregt (Bastiaanse et al., 1997). Ob diese Beobachtung zurückzuführen ist auf spezifisch chemisch-intermolekulare Wechselwirkungen oder von Membranverdichtung und Lateraldruck abhängt, kann nicht sicher entschieden werden.

In Pflanzen scheint der Sterolgehalt über die korrekte Lokalisation der Auxintransporter in den Zellen zu entscheiden und die Zellpolarität zu beeinflussen (Willemsen et al., 2003).

Allgemein besitzen Sterole die Fähigkeit Lipide voneinander zu separieren. So bildet Cholesterol mit den gesättigten Phospholipiden hohen Schmelzpunktes „kondensierte Komplexe“ und schließt die ungesättigten Komponenten aus (Radhakrishnan und McConnell, 2005;). Dieses Verhalten erleichtert in Biomembranen die Entstehung von Mikrodomänen (siehe 1.4.2).

1.3.2.4 Wirtschaftliche Bedeutung

Da das BMBF-geförderte Drittmittelprojekt „NAPUS 2000“ von Anfang an eine ökonomische Ausrichtung besaß, soll an dieser Stelle ein kurzes Schlaglicht auf die bisherige Nutzung der Polarlipide geworfen werden. Von vorrangiger Bedeutung sind unter diesem Aspekt die Phosphoglycerolipide.

Ökonomisch interessant sind Phospholipide, die zusammen mit anderen Polarlipiden unter dem wirtschaftlichen Sammelbegriff Lecithine firmieren, als Emulgatoren (Zusatzstoffbezeichnung = E322), Stabilisatoren, Antioxidations- und Dispergiermittel in Schokoladen, Backwaren, Fertiggetränken, Margarinen, Mayonnaisen, Diätetika, Granulaten, Reinpräparaten (z.B. Buerlecithin), Kosmetika, Cremes, Shampoos, Pharmazeutika (z.B. als Liposomenbildner), der Lebensmitteltechnik (z.B. als Trägersubstanz), der Parenteralernährung und als dermatologische Wirkstoffe (Hautregeneration bei Neurodermitis, Schuppenflechte, Akne) (Pardun, 1985 und 1989; Lautenschläger, 2003).

In der Schokoladenherstellung werden sie in großem Umfang eingesetzt wegen der Fähigkeit, die Schmelzeigenschaft und Viskosität schon in geringen Mengen optimal einzustellen und

den Anteil der teuren Kakaobutter zu begrenzen (Lucas Meyer, 1998). Im Bereich kommerzieller Backwaren verbessern sie deren Körnung, Porung, Volumen und elastische Eigenschaften durch Konjugation mit Amylosepolymeren (Schneider, 1992), um nur zwei Beispiele herauszugreifen. Bis 1997 fanden Lecithine einem Unilever-Report (1997) zufolge in bis zu 30000 verschiedenen Lebensmittelprodukten Verwendung.

1.4 Membranaufbau

1.4.1 Lipidverteilung - Asymmetrie der Membran

Die Zusammensetzung beider Seiten eukaryoter Membranen weist eine bemerkenswerte Asymmetrie auf. An tierischen Plasmamembranen, dem Endpunkt des anterograden Sekretionsflusses, ist die Seitigkeit am besten untersucht (Zachowski, 1993; Daleke, 2003; Devaux und Morris, 2004; Gummadi und Kumar, 2005). Jeweils 80% der Lipide PE, PA, PI, und PIP₂ werden dort auf der P-Seite gefunden sowie 100% des gesamten PS und PIP. Genau entgegengesetzt verhält es sich mit PC, Sphingomyelin, Cerebrosiden und den komplexeren Gangliosiden, die zu 75%-100% auf der E-Seite inserieren. In Pflanzen verhält es sich analog hinsichtlich der Verteilung von PS (Plasmamembran) und PE (Tonoplast) (Tavernier und Pugin, 1995; Takeda und Kasamo, 2001). Auch an Membranen prokaryoten Ursprungs ist die Ungleichverteilung beider Seiten beachtlich. So überwiegen in der Thylakoidmembran PG (66-75%) und MGD (65-70%) auf der P-Seite und DGD (85-90%) und SQD auf der E-Seite (Unitt und Harwood, 1985; Rawyler und Siegenthaler, 1985; Sundby und Larsson, 1985; Giroud und Siegenthaler, 1988). Desgleichen trifft man an der inneren Mitochondrienmembran an: CL, obwohl auf der P-Seite synthetisiert, wird mit 60-80% auf der E-Seite angereichert (Gallet et al., 1997). PC (~70%) und PE (~60%) hingegen dominieren auf der P-Seite (Gallet et al., 1999).

Da die Synthese der Glycerophospholipide an der P-Seite des ER stattfindet, gleichmäßiges Membranwachstum jedoch sofortigen Lipidausgleich beider Seiten erforderlich macht (Gummadi und Kumar, 2005) und nachfolgend (in tierischen Organismen) eine rasche Asymmetriezunahme in der Richtung ER → Plasmamembran eintritt (Zachowski, 1993), sind Ausgleichs- und Sortierungsmechanismen erforderlich. Diese lassen sich nach Daleke (2003) wie folgt kategorisieren:

- ⇒ In beide Richtungen arbeitende, ATP-unabhängige Transporter („**Scramblasen**“) sind am ER aktiv. Sie sorgen für Lipidgleichverteilung, sind unspezifisch und an der Plasmamembran inaktiv.
- ⇒ ATP-abhängige Proteine, die zur P-Seite transportieren („**Flippasen**“). Sie sind für den Rücktransport von PS und PE verantwortlich.
- ⇒ ATP-abhängige Transporter, die zur E-Seite arbeiten („**Floppasen**“). Sie sind für den Transport von PC (ev. auch Cholesterol) in die extraplasmatische Richtung verantwortlich.

1.4.2 Membranmodell („fluid mosaic“- Abb.5)

Die heutigen Vorstellungen fußen wesentlich auf dem von Singer und Nicolson (1972) entwickelten „Fluid Mosaic Modell“ der Biomembran. Dieses Modell ist wie folgt skizziert:

Membranintegrale und assoziierte Proteine alternieren mit Bilayer-Lipiden auf der Membranoberfläche (mosaic-Charakter); keine polaren oder ionischen Lipidkopfgruppen und Proteinanteile im Bilayer-Zentrum (Minimierung der Abstoßungskräfte); Anordnung membranzentraler Proteinabschnitte so, daß Abstoßungskräfte minimal, hydrophobe Wechselwirkungen maximal sind; freie Beweglichkeit aller Einzelkomponenten (fluider Charakter); Polarlipide besitzen, entsprechend ihrer niedrigeren Masse, eine höhere Beweglichkeit als transmembrane Proteine („thermodynamische Kontrolle“); die Bewegung ist ungerichtet.

Dieses in Grundzügen auch heute noch gültige Modell wurde aufgrund röntgenkristallographischer und kalorimetrischer Daten sowie thermodynamischer Überlegungen aus einer Reihe von Postulaten und Gewichtungen entwickelt. So wurden hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen für Aufbau und Gestalt des Bilayers als entscheidender bewertet als der Feinbau der apolaren Anteile membranintegraler Proteine und der Lipidfettsäureketten. Auch wurde die Interaktion zwischen Membran-(Phospho)lipiden und Proteinen als vernachlässigbar betrachtet und ihre Bewegung als voneinander unabhängig angesehen. Ebenso hätten membranassoziierte Proteine auf die Bilayerintegrität keinen Einfluß. Membrankomponenten besäßen zudem nicht die Fähigkeit zum Aufbau von Strukturen höheren Ordnungszustands über 0,1µm Durchmesser.

Untersuchungen an Membranen aus Zellen verschiedener Organismen zeigten das Vorhandensein von Detergenz-unlöslichen Membrandomänen (DRM oder „rafts“), innerhalb derer Sterole und Sphingolipide dominieren und deren Zusammenhalt zusätzlich durch inserierte Proteine stabilisiert sein kann (Thomas et al., 1994; Foster et al., 2003; Bagnat und Simons, 2002; Mongrand et al., 2004; Shahollari et al., 2004; Borner et al., 2005).

Abbildung 5 zeigt eine modifizierte *fluid-mosaic*-Membrandarstellung.

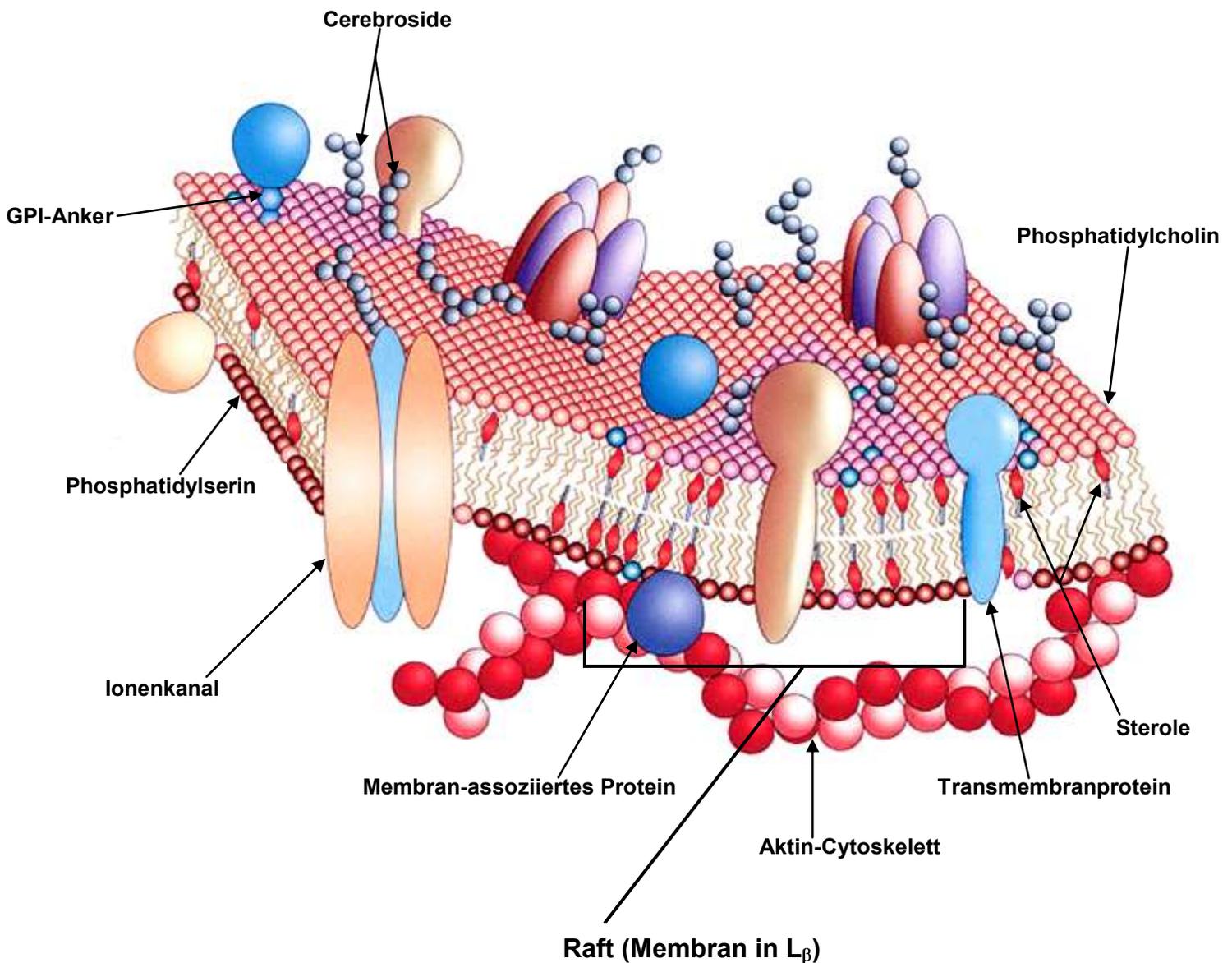


Abbildung 5: Modifiziertes Fluid Mosaic Modell

1.5 Membranfluß

Um sekretorische Proteine in den Apoplasten und transmembrane Proteine sowie synthetisierte Polarlipide in die Zielmembranen zu platzieren, existiert ein umfangreicher, größtenteils Vesikel-gestützter Membranverkehr innerhalb der Euzyte. Beteiligte Glieder dieses Netzwerkes sind (nach: Battey et al., 1999; Sanderfoot und Raikhel, 1999; Jürgens, 2004):

Rauhes und Glattes **ER** als zentraler Syntheseort, **Golgi-Zisternensystem** als Glykoprozessierungsstätten, die **Plasmamembran** als Korrespondenzsystem mit der Außenwelt, **lytisch-vakuoläre Kompartimente** als Verdauungs- und Entgiftungssysteme, **Protein-Speichervakuolen**, **Prävakuoläre Kompartimente (PVC)** oder **Endosomen-ähnliche Kompartimente** mit Reifungs- und Wiederverwertungsfunktion, **Peroxisomen/Glyoxisomen** für oxidative Abbauprozesse, **äußere Membranen** von Mitochondrien und Chloroplasten sowie, als kurzfristiges Kompartiment während der Zellteilung, **die Zellplatte**.

Einige Aspekte dieses „Verkehrssystems“ sollen nachfolgend kurz skizziert werden.

1.5.1 Der Sekretorische Weg

Das Gros der am ER synthetisierten und N-glykosylierten Proteine wird nach weiteren Modifikationen im Golgi-Kompartiment über die Plasmamembran in den Apoplasten entlassen bzw gelangt in vakuoläre Kompartimente. Als Frachttransporter zwischen den Zielstationen treten Vakuolen verschiedenen Typs auf. Sie lassen sich nach Hanton et al. (2005) folgendermaßen einteilen:

Vesikel der Richtung ER→Golgi kennzeichnet ein „Mantel“ des aus 5 Untereinheiten zusammengesetzten **COPII**- („coat“) Proteins. Proteine mit Sequenzabschnitten, die als ER-resident erkannt werden mit H/KDEL- (Wandelt et al., 1992) und Dilysinmotiven (KKXX-COOH; Benghezal et al., 2000), gelangen in Form von Vesikeln eines weiteren Typs wieder in Richtung Golgi→ER zurück. Diese Retrovesikel mit aus 7 Proteinen zusammengesetztem **COPI**-Mantel, die auch am rückwärtigen Vesikelfluß der Golgi-Zisternen von trans→cis beteiligt sein sollen, halten die spezifische Protein-Zusammensetzung von ER- und Golgi-Lumen aufrecht und stellen die Balance der Membranzahl zwischen beiden Kompartimenten her (Pelham, 2001).

Ein dritter Vesikeltyp tritt beim Transport zwischen trans-Golgi (-Netzwerk) → PVK/lytischer Vakuole auf, ebenso beim endocytotischen Transport von der Plasmamembran zu PVK/Endosomen und zwischen Plasmamembran und einem Clathrin-bedeckten Teil des TGN (dem PCR = “partially coated reticulum“), sowie zwischen PCR und den lytischen Kompartimenten (Holstein, 2002). Dieser mit stacheliger Oberfläche aus dreiarmligen Clathrinmolekülen und Adaptorproteinen aufgebaute Typus wird als **CCV-** („clathrin coated“) Vesikel bezeichnet und scheint wesentlich an Aufnahme und Abbau von Plasmamembranprotein und Membranfläche beteiligt zu sein (Geldner et al., 2001; Emans et al., 2002). Ein vierter Typus, der vom Golgi ausgehend Speicherproteine wie z.B. Viciline, Gluteline und Legumine zu Proteinvakuolen transportiert, besitzt eine glatte Oberfläche und wird wegen seines elektronendichten Inhalts als **DV** („dense vesicel“) bezeichnet (Hohl et al., 1996; Vitale und Hinz, 2005).

Während des Durchganges durch den Golgi-Apparat in Richtung cis→medial→trans→TGN erfahren die Proteine zumeist O-Glykosylierungen an Threonin, Serin und Hydroxyprolingruppen incl. Umbau der Zuckergruppen. Die Wanderung durch den Golgi-Komplex kann über Vesikularisierung der terminalen Zisternenbereiche vonstatten gehen („Vesicle Shuttle“) oder *en bloc* als Reifungsprozeß zu trans-Zisternen und unter ständiger Bildung neuer cis-Kompartimente durch Vesikelfusion („Zisternale Progression“) (Pelham, 2001) erfolgen.

Nachfolgend ist eine vereinfachte schematische Skizze der möglichen Routen dargestellt.

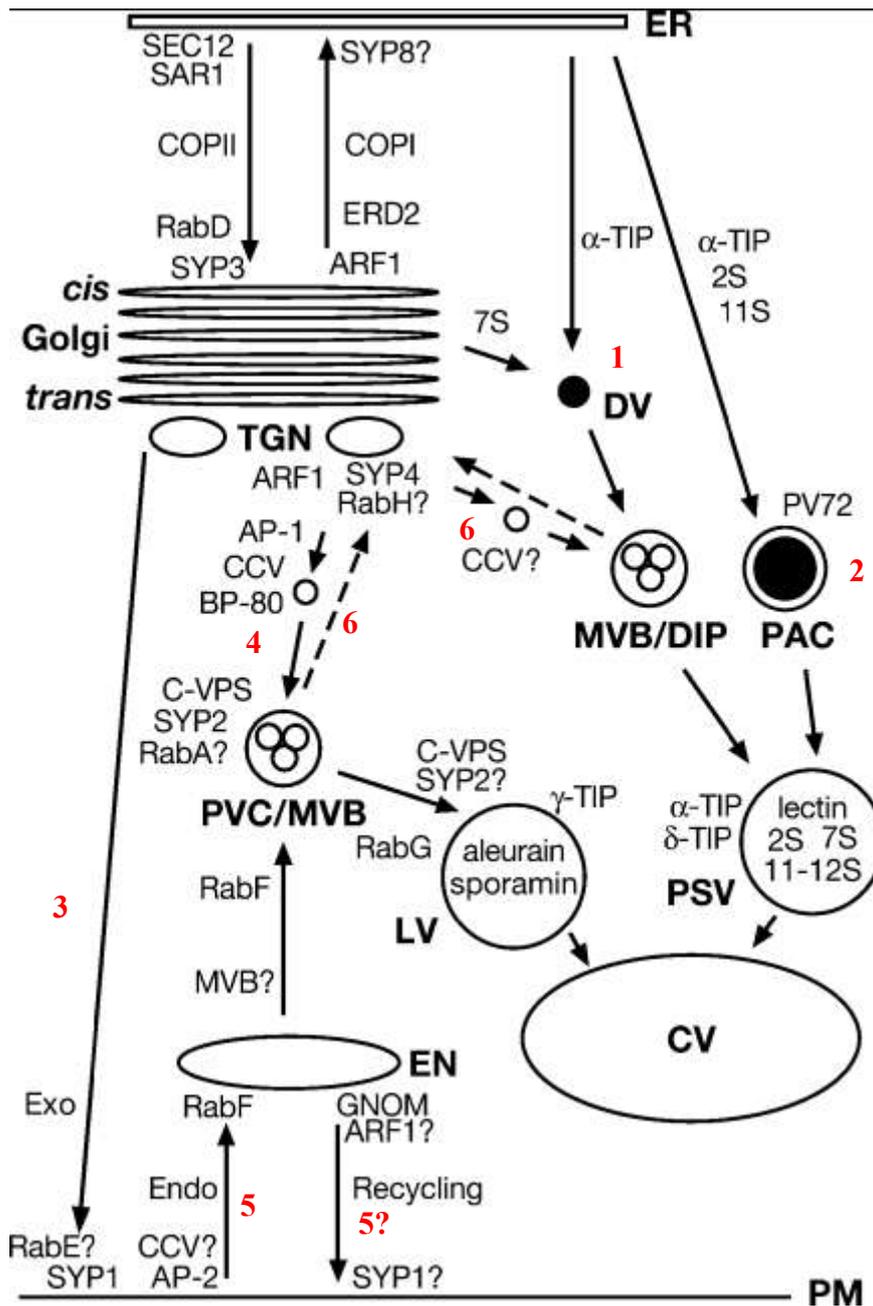


Abbildung 6: Membranflüsse und Transportwege innerhalb der Pflanzenzelle

Übersicht nach Jürgens (2004). Golgi-Umgebungsweg zur Protein-Speichervakuole (PSV): **1**) „Dense Vesikel“(DV)-Weg von Golgi zu Protein-Speichervakuole, wahrscheinlich über multivesikuläre („MVB“) Kompartimente oder **2**) direkt über Vorstufen-anreichernde Reifungskompartimente („PAC“). **3**) „Default-Weg“ von ER über Golgi zur Plasmamembran. **4**) Clathrin-Vesikel („CCV“) auf dem Weg zu lytischen Kompartimenten über Prävakuoläre Kompartimente („PVC“); **5**) Endocytotischer Rückweg von Clathrin-Vesikeln (auch anterograd ?). **6**) Mögliche (Clathrin-) Vesikelrouten zwischen lytischen Kompartimenten (Endosomen ?) und Golgikompartimenten.

Abkürzungen (α -TIP, AP2, ERD2 u.a.) stehen für Membran-Markerproteine der jeweiligen Wege.

1.5.2 Nebenwege

Ausgehend von einem Modell verschiedenster funktioneller ER-Domänen nach Staehelin (1997 → Abb. 7b), lassen sich weitere (mögliche) intrazelluläre Austauschwege beschreiben:

→ Danach kann die Synthese einiger Speicherproteine an bestimmten Stellen des rauhen ER stattfinden, die als „**Proteinbody-ER**“ bezeichnet werden. Dies trifft auf 2S- (Albumin) und 11S- (Legumin) Speicherproteine in Kürbis zu (Hara-Nishimura et al., 1998), die ohne Golgi als Transitkompartiment die Richtung ER→Protein-Speichervakuole einschlagen.

→ **Oleosin-reiche ER Bezirke** markieren entsprechend den Ausgangspunkt für die Ölkörpergenese.

→ Die **Vakuolen-Initialbildung** kann von Bereichen des glatten ER ausgehen, welche starke Anreicherung von Tonoplastenenzymen wie ATPasen aufweisen (Herman et al., 1994).

→ Ein **Mitochondrien-assoziiertes ER**, wie von Staehelin postuliert, ist in Hefe nachgewiesen (Achleitner et al., 1999) und betreibt Phospholipidaustausch mit der äußeren Mitochondrienmembran.

→ Ebenfalls dem Polarlipidaustausch dienen **Plasmamembran-ER-Domänen** („Lipid-recycling“ ER). Sie vermögen offenbar Teile der vesikelgestützten und endocytotischen Membran-Wiederverwertungsfunktion zu übernehmen, da Hefen mit Endocytosedefekten dennoch Wachstum zeigen (Chu et al., 1996).

→ Staehelin beschrieb ebenfalls mit Golgi-Zisternen vergesellschaftete ER-Bereiche („**Transitional ER**“). Ob dies enge räumliche Kolokalisationen sind, wie in Tabakblättern gezeigt (Boevink et al., 1998; daSilva et al., 2004), oder Teile eines einzigen durchgehenden ER-Golgi-Kontinuums, wie von Hawes und Satiat-Jeunemaitre (2005) formuliert, bleibt jedoch offen.

→ Gleichwohl läßt sich aus Untersuchungen anderer Organismen auch ein distinkter Teil des ER ausmachen, der an Genese und Phospholipid-Homöostase der **Peroxisomen** beteiligt zu sein scheint (Geuze et al., 2003; Heiland und Erdmann, 2005 → siehe auch 1.5.1.2).

→ Als Erweiterung der Einteilung sollte die Möglichkeit der Ausbildung von Kontaktflächen der Plastiden mit ER der Kernhülle abschließend aufgeführt werden. Plastiden vermögen tubuläre Verbindungen untereinander auszubilden („**Stromules**“), deren Ausläufer sowohl mit dem Zellkern als auch mit der Plasmamembran Kontaktpunkte bilden (Kwok und Hanson, 2004; Whatley et al., 1991). Der Nachweis fester ER-Chloroplasten Membrankontaktflächen („**Plams**“), möglicherweise über Protein-Protein Wechselwirkungen vermittelt und polare Lipide in beide Richtungen austauschend, wurde an Arabidopsis-Protoplasten in jüngster Zeit geliefert (Andersson et al., 2007).

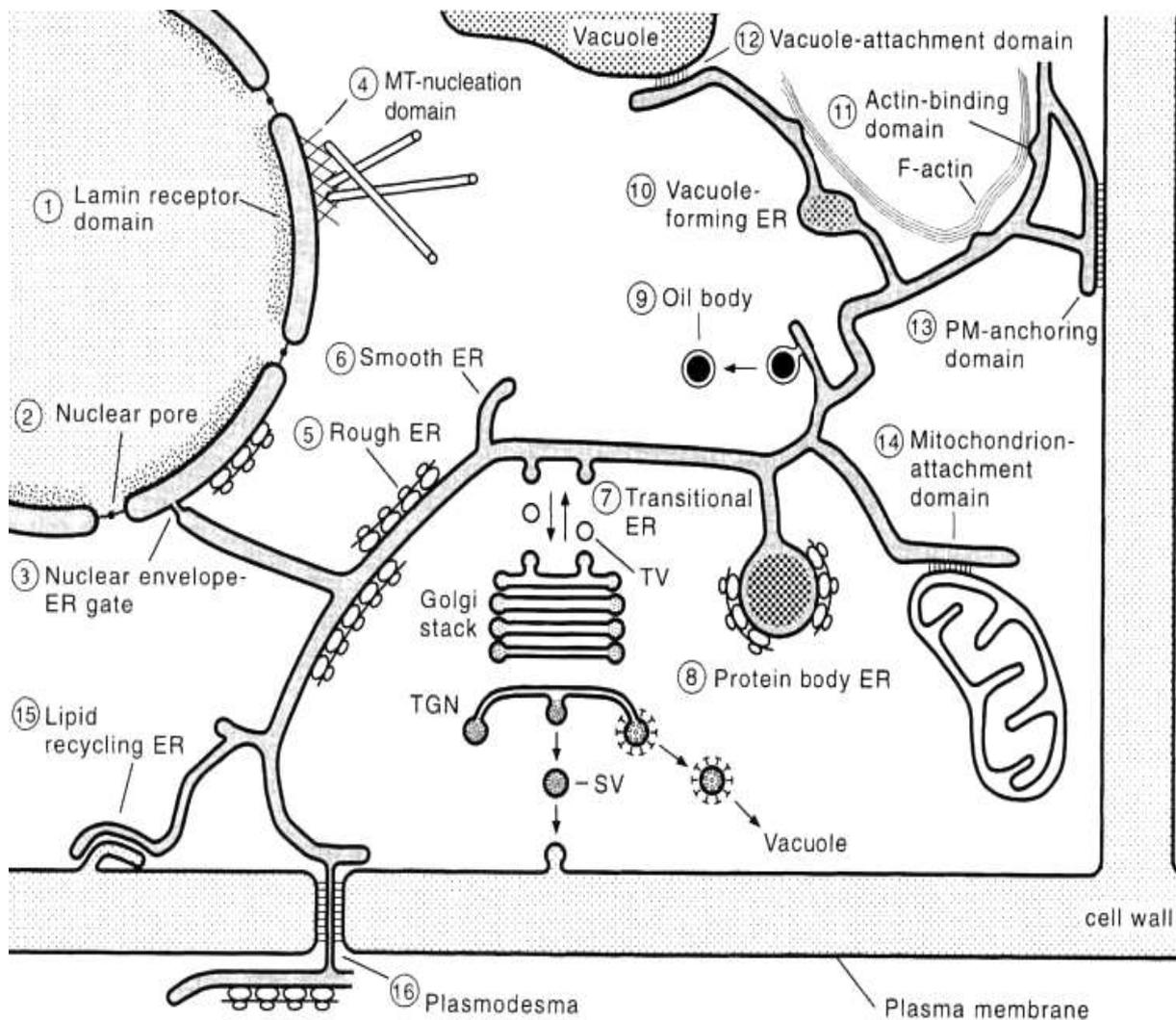


Abbildung 7: Schematische Darstellung der 16 verschiedenen ER-Domänen (nach Staehelin(1997)). PM (Plasmamembran); TV (Transportvesikel); SV (Sekretorische Vesikel); TGN (Trans-Golgi-Netzwerk).

Teil 2

Homöostase und Proliferation

Nachdem im ersten Teil der Einleitung ein allgemeinen Überblick über die Lipidkomponenten, ihre Biosynthese und Funktionen sowie über Aufbau und Dynamik von Biomembranen gegeben wurde, sollen im 2. Teil die Mechanismen der Regulation der Membranmenge, soweit bekannt, vorgestellt werden. Den Schwerpunkt bilden konkrete Beispiele der Membranproliferation in Organismen. Induzierte Proliferations-Ansätze *in planta* werden ausführlicher vorgestellt und im Hinblick auf ihre experimentelle Verwendbarkeit abschließend bewertet.

1.6 Allgemeines zur Membranvermehrung

Die Vielgestaltigkeit und zeitliche Anpassung des Umfangs der Membranmenge als Reaktion auf exogene oder endogene Einflüsse läßt zunächst nur eine grobe Charakterisierung zu.

So kann Proliferation in moderatem Umfang stattfinden und von längerer Dauer sein, wie z.B. als Reaktion auf immunologische Erfordernisse in B-Lymphozyten, deren induzierte Immunglobulin-Sekretion nach Lipopolysaccharid-Kontakt zu einer 3-4 fachen Membranflächenvergrößerung von rauhem ER und Golgi-Zisternen führt, und der Zelle eine Verzwölfachung der sekretierten IgG-Menge ermöglicht (Wiest et al., 1990).

Sie kann kurzfristiger Natur sein, dabei spontan ausgelöst werden und ganz erhebliche Ausmaße erreichen, wie z.B. in Leberzellen nach akuter Intoxikation mit Phenobarbital (Jones und Fawcett, 1966; Orrenius et al., 1965). Hier kann die Menge glatten ERs um das 40 fache ansteigen.

Schließlich kann sie als Ausdruck extremster Spezialisierung eines endogen angelegten Programmes aufgefaßt werden, permanenter Natur sein und gewaltige Ausmaße annehmen. So entstehen die Sehpigment-integrierenden Sacculimembranen der Stäbchen- und Zäpfchenzellen durch fortschreitende Einfaltung der Plasmamembran, was zu einer etwa 177 fachen Oberflächenvergrößerung führt (Ude und Koch, 1994).

Weitere Beispiele dieser Art liefern Drüsenzellen von Tier und Pflanze (→ siehe Tabelle 1, Anhang A).

Jedoch sind alle diejenigen Fälle nicht als Proliferation anzusprechen, in denen Membranstrukturen unter Abbau bereits bestehender neu angelegt werden.

Ein solches Beispiel liefert die Induktion von Peroxisomen unter Anzucht von Hefe auf Ölsäure (Veenhuis et al., 1987). Hier kommt es zur Neubildung vieler Peroxisomen (zahlreich und klein), wohingegen die Peroxisomen-Membranprotein Pmp27p-defiziente Mutante (Erdmann und Blobel, 1995) nach Ölsäureinduktion nur wenige Peroxisomen von sehr großen Ausmaßen generiert. Hier handelt es sich statt einer Proliferation eher um einen **Kompensationseffekt** oder eine Umsteuerung.

Ein Beispiel anderer Art liefert die morphometrische Untersuchung der Membranflächenveränderung in Hefe bei Eintritt in die stationäre Phase (Damsky, 1976). Während die Gesamtoberfläche der inneren Mitochondrienmembran sich auf dem Weg in die stationäre Phase mehr als verdoppelt und damit eine Proliferation dieses Subkompartiments vorliegt, verringert sich parallel dazu die ER-Membranfläche um eine ähnliche Größenordnung. Die Gesamt Betrachtung des Polarlipidgehaltes offenbart in diesem Fall ein Nullsummenspiel, statt einer Steigerung der Gesamt-Polarlipidgehalte scheint einfach eine **Verlagerung** vorzuliegen.

In Tabelle 1 (- Anhang A) sind ausschließlich diejenigen Fälle aufgeführt, deren Vergrößerung der Gesamt-Membranstellfläche aus der Literatur durch quantifizierende oder morphologische Untersuchungen ausreichend gut belegt sind.

1.7 Zugrunde liegende Mechanismen

1.7.1 Die ER-Streß-Antwort: Reaktion auf Peptidimport am ER

Das ER stellt den Hauptumschlagplatz für sekretorische und membranintegrale Proteine des anterograden Sekretionsweges dar (Abb.6+7). Qualität und Menge der im ER eintreffenden Proteine hängen dabei u.a. vom Streßzustand der Zelle ab. So können Veränderungen des Kalziumhaushalts, Steigerung der Synthesemenge sekretorischer und membranintegroaler Proteine, Störungen des Redoxzustandes, Abnahme der verfügbaren Zuckermenge, Veränderungen der Glykosylierung, Protein-Falschfaltung durch Transkriptions-/Translationsveränderung und Überladung mit Sterolen in der Zelle zu einer Anreicherung von falschgefalteten oder ungefalteten Proteinen im ER führen (Werner et al., 1996; Nakatsukasa et al., 2001; Travers et al., 2000; Szczesna-Skorupa et al., 2004).

Die von der Zelle ausgelöste Antwort, als **UPR** („Unfolded Protein Response“), **ESR** („ER-stress Response“) oder **EOR** („ER-overload Response“) bezeichnet, begegnet der Streßzunahme nach Zhang und Kaufman (2004) in folgender Weise:

Anfangs wird die Menge ins ER-Lumen translozierter Polypeptide verringert, gleichzeitig wird ihre Retranslokation ins Cytosol angeregt, wo sie nach Ubiquitinierung in Proteasomen abgebaut werden („ER-associated Degradation“ = **ERAD-Weg**). Anschließend wird die Translationsrate von Chaperonen gesteigert, um die Faltungskapazität zu erhöhen, und letztlich erfolgt eine Anpassung der Sekretionsaktivität des ERs.

In Säuger- und Hefezellen wurde als zentraler Regulator der UPR das ER-luminale Bindeprotein **BiP** identifiziert (Dorner et al., 1992; Bertolotti et al., 2000). Neben diesem Chaperon der HSP70-Familie sind derzeit drei weitere Vermittler der UPR bekannt:

Ire1, sowie in Säugern Perk und Atf6 (Cox et al., 1993; Harding et al., 1999; Haze et al., 1999). Einen schematischen Eindruck von den Grobabläufen vermittelt Abb. 8.

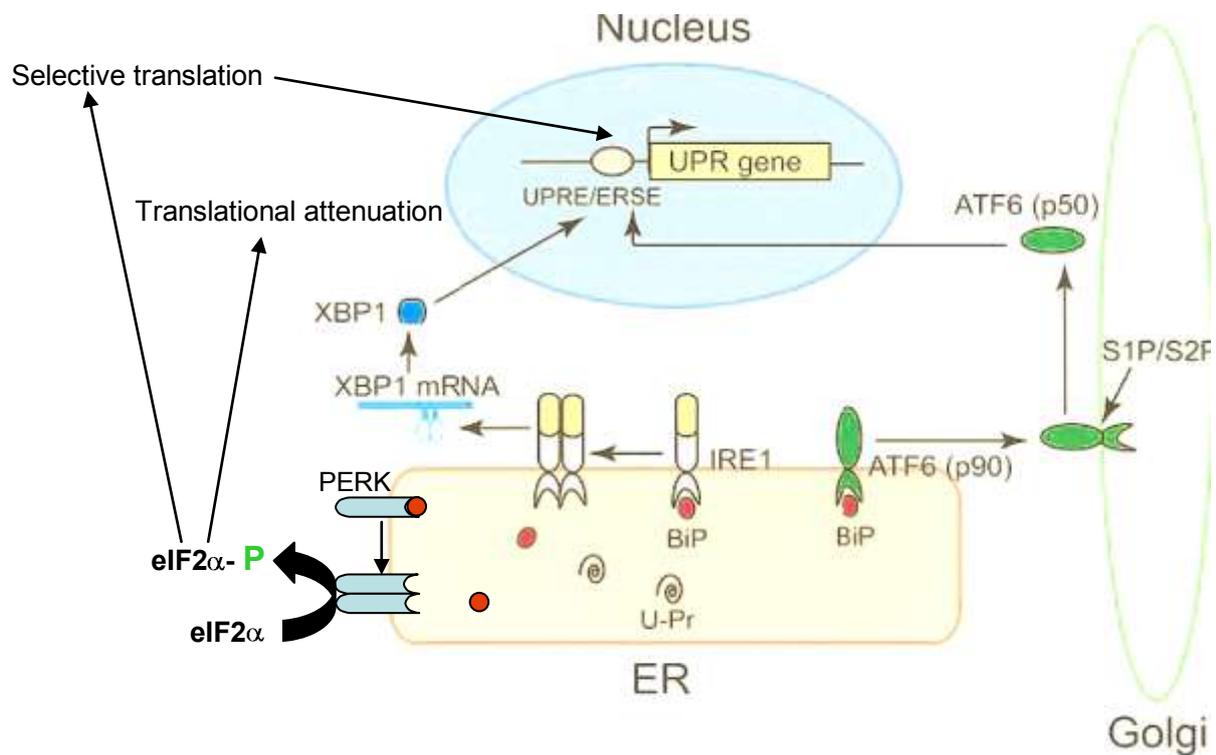


Abbildung 8: „Signaling the unfolded protein response (UPR)“

Darstellung zusammengesetzt nach Zhang und Kaufman (2004). „Protein kinase-like ER kinase“ (PERK), „ER transmembrane protein kinase/endoribonuclease“ (IRE1), „activating transcription factor 6“ (ATF6), „X-box DNA-binding protein“ (XBP1), „eukaryotic translation initiation factor 2 α “ (eIF2 α), „UPR element/ER stress response element“ (UPRE/ERSE) und „site 1 protease/ site 2 protease (S1P/S2P)“.

Die Abläufe der UPR-Signalkette lassen sich nach Zhang und Kaufman (2004) wie folgt skizzieren:

BiP ist als Peptid-abhängige ATPase im Lumen des ERs direkt an der Proteinfaltung beteiligt und legt durch Bindung der luminalen Domänen von **Ire1**, **Perk** und **Atf6** deren ER-Lokalisation fest. Steigt nun die Menge ungefalteter Polypeptiddomänen im Lumen oder nimmt die Menge an Fehlfaltungen zu, so wird eine steigende Menge BiP aus der Bindung mit den drei UPR-Mediatoren freigesetzt und für Faltungsprozesse abgezogen.

Als direkte Reaktion darauf dimerisieren die luminalen Domänen der ER-Kinase Perk miteinander, woraufhin deren cytosolischer C-Terminus den eukaryoten

Translationsinitiationsfaktor eIF2 phosphoryliert und dieser als Entlastung einerseits eine kurzzeitige allgemeine Drosselung der gesamten Translationsrate in der Zelle bewirkt, andererseits jedoch selektiv die Synthese zentraler Enzyme, wie z.B. jener des Aminosäurestoffwechsels, anregt.

Ebenso dimerisieren auch die luminalen Domänen der Serin/Threonin-Kinase – Endoribonuklease Ire1 miteinander nach BiP-Ablösung. Ire1-Dimere prozessieren nach Autophosphorylierung ihrer C-terminalen Domäne den Transkriptionsfaktor **Hac1** (Hefe)/**Xbp1**(Säuger), welcher im Zellkern die Transkription von Genen mit UPR-Element in den Promotoren aktiviert (Chaperone wie BIP, Calretikulin u.a.). In Säugerzellen bewirkt die BiP-Dissoziation von der luminalen Domäne des Transkriptionsfaktors Atf6 dessen Weitertransport ins Golgi-Kompartiment, wo die Zerlegung der membrangebundenen Form durch zwei Proteasen (S1/S2) in ein cytosolisches Fragment stattfindet. Dieses cytosolische Atf6 gelangt in den Kern und aktiviert die Transkription weiterer ER-luminaler Chaperone.

1.7.2 Funktionen

Eine der Hauptmaßnahmen des UPR-Weges ist der Abbau un- bzw fehlgefalteter Polypeptide über den ERAD-Weg (Werner et al., 1996). Dieser steht wesentlich unter der Kontrolle von Ire1 und kann bei deren Ausfall nicht mehr besprochen werden (Yoshida et al., 2003).

Der UPR-Weg steht darüberhinaus im Zusammenhang mit der Steuerung des Energiehaushalts über Glucose-Homöostaseregulierung (Pouyssegur et al., 1977), Adjustierung des Aminosäurestoffwechsels (Harding et al., 2003), Arretierung des Zellzyklus (Arnold und Tanner, 1982), Anpassung des Membranlipidbedarfs (Menzel et al., 1997; Cox et al., 1997), Senkung des Titers reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS, Harding et al., 2003) und, bei Fortdauer des ER-Stresses, der Einleitung des Apoptoseintritts (Kaufman, 2002).

Die UPR kann zudem als Begleitphänomen von „Umbaumaßnahmen“ des ERs im Zuge von Zelldifferenzierung und –spezialisierung (B-Lymphozyten zu Plasmazellen, - Reimold et al., 2001) ebenso auftreten wie nach viralem oder mikrobiellem Befall (Dimcheff et al., 2003; Jelitto-Van Dooren et al., 1999).

1.7.3 Intentionen

Nach Yoshida et al. (2003) führt in Säugern die konzertierte BiP-Steuerung von Ire1, Perk und Atf6 zu einem Aktivitätsfenster mit Prioritätsabstufung. Zunächst wird über Translationsattenuation versucht, die Stressdosis zu senken (Perk). Dann erfolgt die Aktivierung bestimmter Chaperone (Atf6), bis schließlich das Spektrum induzierter Chaperone erweitert und die Kapazität des ERAD-Weges gesteigert wird (Ire1). Erst wenn auch hierdurch die Streßursache nicht behoben werden kann, wird der Eintritt in die Apoptosis eingeleitet (Ire1, Perk).

Beim Menschen betreffen fast drei dutzend Krankheiten einen oder mehrere Aspekte des UPR-Weges (für Auflistung siehe Schröder und Kaufman, 2005).

1.7.4 ER-Streß in Pflanzen

Der pflanzliche UPR-Weg ist derzeit noch nicht gut charakterisiert.

Wie in anderen Organismen ist jedoch bekannt, daß auch Pflanzen auf Fehlfaltungsstreß, ausgelöst z.B. durch Glykosylierungsstörung (Tunicamycin, - D'Amico et al., 1992) oder mutierte Proteine (*floury-2* in *Z. mays*, - Boston et al., 1991), ebenfalls mit Überexpression von BiP und anderen Chaperonen reagieren. Auch konnten in *Arabidopsis* zwei Ire1-homologe Vertreter gefunden werden, die in Hefe den Verlust eines Teils des hefeeigenen Gens zu kompensieren vermochten (Koizumi et al., 2001).

Im Gegensatz zu Säugern fehlen jedoch die zentralen Mediatoren Atf6 und Perk in Pflanzen wie auch in Hefe (Martinez und Chrispeels, 2003; Schröder et al., 2003). Stattdessen wurde in *Arabidopsis* ein durch UPR aktivierter Transkriptionsfaktor gefunden, der neben BiP-Induktion auch Eigentranskript-verstärkend wirkt (Iwata und Koizumi, 2005). Dieser bislang nur in Pflanzen festgestellte Ablauf wird als Hinweis auf eine möglicherweise andere UPR-Mechanistik bewertet. Eine weitere Beobachtung scheint ebenfalls einen anderen Reaktionsablauf nahelegen. Kamauchi et al. (2005) fanden nach UPR-auslösenden Stressen keine allgemeine Attenuation der Translation in *Arabidopsis*, wie sie in tierischen Zellen üblicherweise durch Perk ausgelöst wird. Ein anderer UPR Ablauf wäre nicht ganz ohne Beispiel, da auch in Hefe ein Ire1-unabhängiger Weg beschreibbar scheint (Schröder et al., 2003).

1.7.5 Ein Rätsel - Zusammenhang zwischen ER-Streß und Membranproliferation ?

Viele Untersuchungen aus Hefen und Tierorganismen legen den Verdacht nahe, daß beide Phänomene, ER-Streß und Membranproliferation, miteinander in Zusammenhang stehen. So ist beispielsweise die im Zuge der B-Lymphozyten-Differenzierung zu Plasmazellen einsetzende ER-Membranflächenvergrößerung auf einen funktionierenden UPR-Weg angewiesen (Iwakoshi et al., 2003). Überexpression eines UPR-Transkriptionsaktivators allein induziert dort die Phosphatidylcholin-Synthese und kann sowohl Phospholipid-Konzentrationsanstieg als auch ER-Expansion erzeugen (Sriburi et al., 2004).

Analogerweise geht in Hefe bei Überexpression von Cytochrom P450 die Proliferation des glatten ER (Karmellaetyp) immer einher mit Aktivierung der Chaperonsynthese (Menzel et al., 1996 und 1997), wobei dieser Fall der Streßantwort durch große Mengen korrekt gefalteter Proteine in der Literatur z.T. mit EOR bezeichnet wird und einen Sonderfall der UPR darstellen soll (Kaufman, 1999).

Auch ist in Stämmen, denen durch Genzerstörung zentrale Stellglieder des UPR-Weges fehlen (Ire1 und Hac1), die Bereitstellung von Inositol aus Glukose durch Inositol-1-phosphat-Synthase (Ino1), einem Schlüsselenzym der Phospholipidbiosynthese, nicht möglich (Nikawa und Yamashita, 1992). Zudem ist dieses Schlüsselenzym in Hefe unter UPR stressauslösenden Bedingungen induzierbar (Cox et al., 1997).

Andere Befunde hingegen weisen darauf hin, daß ER-Stress und Membranproliferation in einem – wenn überhaupt - eher indirekten Verhältnis zueinander stehen.

So führt in Hefe die Überexpression von HMG-CoA-Reduktase zur Proliferation des glatten ERs (Karmellaetyp) ohne Chaperonsynthese-Aktivierung (Larson et al., 2002); gleiches gilt bei der Proliferation von glattem und rauhem ER nach Überexpression verschiedener Anteile eines Ribosomenrezeptors (Hyde et al., 2002). Auch scheint dort die Intensität der UPR-Antwort nicht von Proteinmenge und –faltungsvermögen abzuhängen, da Takewaka et al. (1999) zeigen konnten, daß die Störung der *de novo* -Lipidbiosynthese durch Cerulenin in geringen Dosen allein bereits ausreicht, den Chaperontiter zu erhöhen und eine anschließend induzierte Proteinüberexpression keinen weiteren steigernden Einfluß mehr auszuüben vermochte.

Auch scheint die Kopplung zwischen Polarlipidsynthese und ER-Beladungsstreß nicht über den herkömmlichen Transkriptions-Aktivierungsmechanismus zu laufen, in dessen Folge

Dimere aus zwei Transkriptionsfaktoren der Phospholipidregulation, Ino2p und Ino4p, den INO1-Promotor aktivieren (Ambroziak und Henry, 1994 - siehe Schaubild unten), da Akkumulation von ER-Membran nach Überexpression eines membranintegrateden Ribosomenrezeptors auch in vollständiger Abwesenheit von Ino4p beobachtet wurde (Block-Alper et al., 2002). Ein Schema der Regulation der an der Polarlipidsynthese in Hefe beteiligten Enzyme zeigt Abbildung 9.

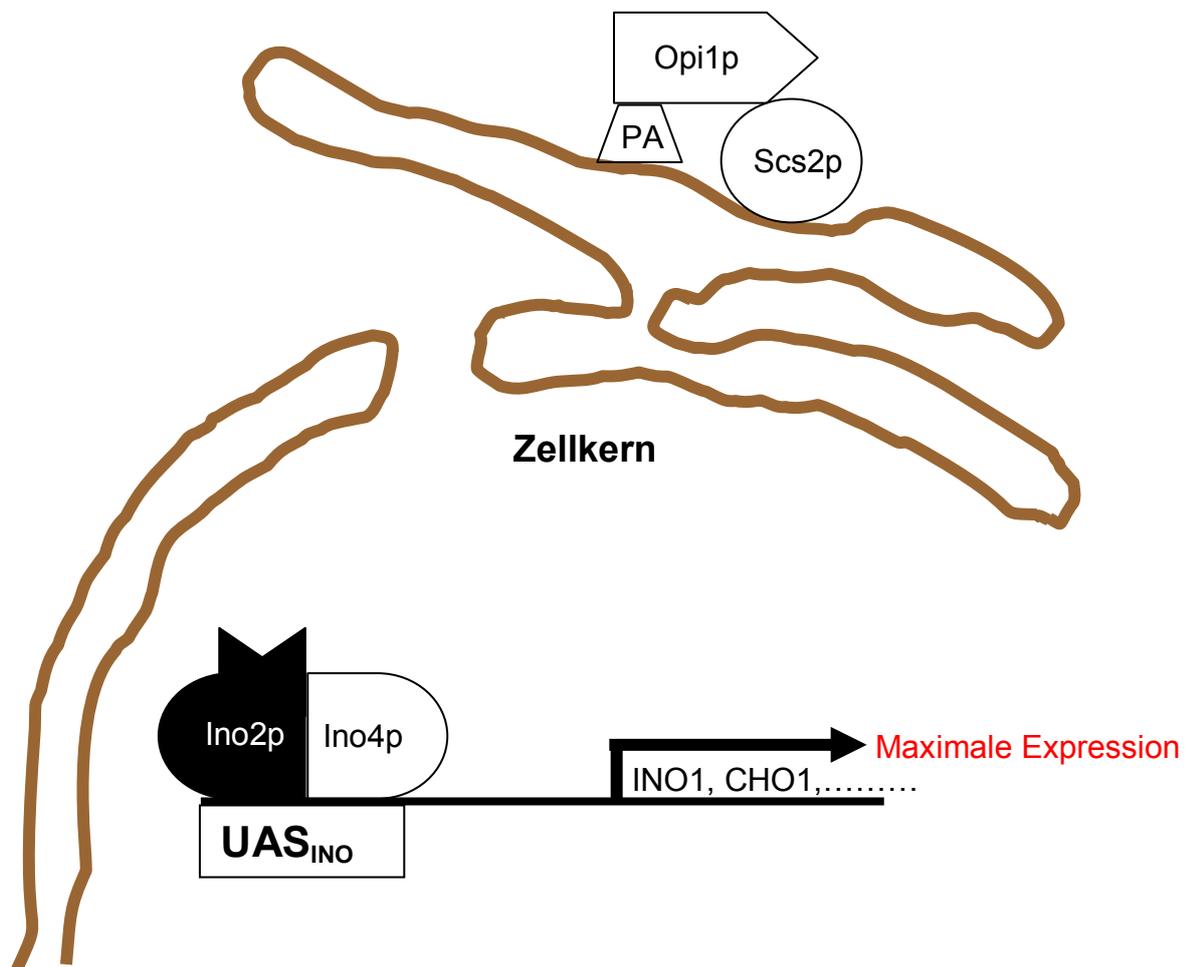


Abbildung 9: Regulation der Phospholipidsynthese in Hefe

Schema nach Carman (2005). Maximale Expression verschiedener Sequenzen Polarlipid-synthetisierender Enzyme, in Abwesenheit des Repressors Opi1p, durch Bindung der Ino2p/4p-Aktivator-dimere an ein „Inositol-sensitive upstream activating sequence“-Motive (UAS_{INO}) der Promotoren. Der vollständige Expressionsstopp tritt nach Bindung von Opi1p an Ino2p auf. Im expressionsaktiven Zustand bleibt Opi1p an Phosphatidsäure (PA) und ein VAP-ähnliches Kernmembran-integrales Protein (Scs2p) außerhalb des Karyoplasmas gebunden.

Weiterhin wurde eine Beeinflussung der UAS_{ino}-Elemente der Promotoren von an der Phospholipidbiosynthese beteiligten Proteinen durch UPR Transkriptions-Aktivatoren nicht festgestellt (Chang et al., 2002 und 2004). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine genomweite Genregulations-Untersuchung in Hefe liefern, die zeigte, daß als Reaktion auf Inositol- und Cholinmangel ein anderer Satz von Genen auf- und abreguliert wird als nach Einleitung des UPR-Weges (Jesch et al., 2005).

Denkbar wäre ein anderer Ort der Streßerfassung als die Membran, mit einem Kontrollpunkt der Membranprotein- und -lipidmenge indirekt gegeneinander „verrechnet“. So wird in einer neueren Arbeit von einem Hefeprotein berichtet (Smp2), dessen phosphorylierte Form die Phospholipid-Biosynthese forciert und eine dem Karmellaetyp ähnliche Proliferation der Kernmembran erzeugt (Santos-Rosa et al., 2005). Der Phosphorylierungszustand dieses Proteins wird von einem Kernmembran-integralen Phosphatasekomplex (Nem1/Spo7) kontrolliert und lenkt den Verdacht in Richtung eines Sensoriums an der Kernporenmaschinerie. Ein solcher Detektor könnte bei Überexpression transmembraner Proteine die Notwendigkeit einer Bedarfsdeckung an Membranlipid möglicherweise über den Phosphorylierungsstatus der in die Membran zu integrierenden Proteine erkennen und die entsprechende Lipidsynthese einleiten.

Aus Pflanzen liegen keine entsprechenden Untersuchungen vor, da experimentell induzierte Membranproliferation nur in sehr wenigen Fällen erfolgreich war (siehe 1.9).

1.8 Mechanismen experimentell induzierter Membranproliferation

1.8.1 Dosis-Steigerung

Aus Tabelle 1 - Anhang A geht hervor, daß entsprechende Untersuchungen an eukaryoten Organismen überwiegend in Hefe durchgeführt wurden. Die beobachteten Proliferationsphänomene waren dabei fast durchweg das Ergebnis starker Genexpression unter Kontrolle konstitutiver oder induzierbarer Promotoren von Vektoren hoher Kopienzahl. Außerdem wurde experimentelle Membranvermehrung in allen bekannten Fällen ausschließlich unter Expression membranintegraler Proteine beobachtet.

Einige in der Tabelle aufgeführte Vertreter wurden in dieser Arbeit für die „Sense“-Expression in Pflanze eingesetzt:

Ein Beispiel ist das **Mid1**-Protein aus *S. pombe*. Ein 120-130 kDa großes Shuttleprotein, das nach mehrfach-Phosphorylierung während Interphase und früher Mitose aus dem Zellkern wandert und an Aufbau und Positionierung des kontraktiven Aktinringes beteiligt ist, der die Ebene der Zellteilung festlegt (Sohrmann et al., 1996; Chang und Nurse, 1996; Paoletti und Chang, 2000). Die Überexpression dieses Proteins, das, soweit bekannt, nicht an Elektronen-Übertragungsprozessen beteiligt ist, erzeugt Anreicherung eines kernnahen ER-typs, der als „Karmellae“ bezeichnet wird.

Den gleichen Proliferationstyp erzeugt das etwa 44 kDa große **Pex15**-Protein aus *S. cerevisiae*, ein integraler Vertreter der Peroxisomenmembran, in die es C-terminal verankert ist und dort als Basis für Verankerung weiterer Peroxine dient. Pex15p wird durch Anzucht auf Ölsäure induziert und ist beteiligt am Import peroxisomaler Matrixproteine und der Ausbildung der Peroxisomenmorphologie (Elgersma et al., 1997; Stroobants et al., 1999; Birschmann et al., 2003). Auch Pex15 ist nicht an e⁻-Übertragungsprozessen beteiligt.

Ein 59-60 kDa **Cytochrom P450** (Isoform 1) sowie dessen 79 kDa große **Cytochrom P450-Reduktase**, beide aus *C. maltosa*, wurden getrennt voneinander in Pflanze exprimiert. Beide sind in der Alkan-assimilierenden Hefe als Mitglieder an der Elektronen-Übertragung im Zuge der Hydroxylierung aliphatischer Kohlenwasserstoffe beteiligt (Schunck et al., 1991; Kärgel et al., 1996). Während die Reduktase überexprimiert in Hefe Karmellae-ähnliche Proliferation zeigt, erzeugt das Cytochrom stapelartige ER-Anreicherung über das Cytoplasma verteilt.

Die Diacylglycerol (**DAG**)-**Kinase** aus *E. coli* wurde in *A. thaliana* und *B. napus* exprimiert. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von sn-1,2-Diacylglycerol, steht damit an der Basis der Glycerolipidsynthese (Walsh und Bell, 1986) und steigert nach Expression die Menge des PC-Gehaltes (Fritz et al., 2007). Da dieser Befund nur einen indirekten Hinweis auf Membranproliferation liefert, wurde die DAG-Kinase nicht in Tabelle 1 (Anhang A) mit aufgeführt.

Als derzeit bestcharakterisiertes Studienobjekt experimentell induzierbarer Proliferation kann das **Cytochrom b5** gelten, das nach Überexpression wiederum zur Membran-Anreicherung in Stapelform um den Zellkern führt (Karmellae).

Da die Expression dieses Proteins in Raps und Arabidopsis in dieser Arbeit den Schwerpunkt bildete, soll es nachfolgend eingehender vorgestellt werden.

1.8.1.1 Cytochrom b_5

Die 17-kDa großen, aus 6 Helices und 5 β -Faltblättern zylindrisch aufgebauten Cytochrome b_5 sind wichtige Elektronenüberträger vieler am ER und mitochondrialer Außenmembran ablaufender Redoxprozesse. Sie vermögen dabei sowohl Elektronen von NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase als auch von NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aufzunehmen (Oshino et al., 1971; Enoch und Strittmatter, 1979), die an verschiedene Akzeptoren übertragen werden, deren jeweiliger Stoffwechselfzusammenhang eine Vielfalt von reduktiven Verwendungsmöglichkeiten offenbart und zu Modifikationen meist lipophiler Endsubstrate führt. Die Primärakzeptoren lassen sich nach Schenkman und Jansson (2003) folgendermaßen subsumieren: \rightarrow Fettsäure-Desaturasen \rightarrow Steroldesaturasen \rightarrow Plasmalogensynthesen \rightarrow Cr^{VI} -Reduktasen \rightarrow Lyasen und Hydroxylasen der Sterol- und Hormonsynthese \rightarrow Myoglobin Reduktasen \rightarrow Cytochrome P450 für Xenobiotikaabbau, Prostaglandin- und Hormonsynthese.

Die oben verzeichneten Funktionen der Elektronenübertragung können entweder von eigenständigen Cytochrom b_5 -Molekülen oder von Akzeptormolekülen mit fusionierten Cytochrom b_5 -Domänen ausgeübt werden. Daneben existieren auch nicht-membranintegrierte, lösliche Formen, wie z.B. in Erythrozyten, die dort den Redoxzustand des Hämoglobins kontrollieren (Hegesh et al., 1986).

Die Grundstruktur aller Cytochrome b_5 ist recht einheitlich und konserviert.

Alle Vertreter zeigen einen Aufbau aus drei funktionellen Einheiten:

Die zumeist aus 134 Aminosäuren (AS) aufgebauten Proteine bestehen aus dem N-terminalen, Protohäm-einfassenden katalytischen Anteil im Cytosol (\sim 100 AS), einem hydrophoben, α -helikalen membranintrinsic Abschnitt (\sim 17- 23 AS) und einem für die ER-Zielerkennung wichtigen C-terminalen Bereich (\sim 10-11AS) (Mitoma und Ito, 1992; Pedrazzini et al., 1996; Hanlon et al., 2000; Tanaka et al., 2003)

Einige Cytochrome kommen zusätzlich in der äußeren Mitochondrienmembran vor (Lederer et al., 1983; Zhao et al., 2003). Die Art der Ladungen der 10 C-terminalen AS entscheidet jeweils über die genaue Lokalisation. Basische AS fördern mitochondriale Verortung, neutrale und saure hingegen verlagern die Insertion ins ER (Zhao et al., 2003; Hwang et al., 2004). In tierischen Organismen wurde bei den mitochondrialen Vertretern Beteiligung an

Ascorbatregeneration und Androgeneseaktivierung nachgewiesen (Nishino und Ito, 1986; Ogishima et al., 2003).

1.8.1.1.1 Insertion und Lokalisation

Die Membraninsertion scheint wesentlich vom Verdichtungsgrad des Bilayers abzuhängen, da der Einbau in Membranen mit nur etwas höherem Sterolanteil als typischerweise am ER angetroffen vollständig unterbleibt (Brambillasca et al., 2005 → s. Tabelle 2). Möglicherweise spielen aber auch Fettsäurespezifika eine Rolle; nach Einbau von 18:2 in Polarlipide künstlicher Membranen nimmt die Affinität des Cytochrom b₅ für die Membran ab, ebenso verkürzt sich dessen Verweildauer im Bilayer (Basaran et al., 1999).

Die Retention von Golgienzymen kann durch kurze Transmembrandomänen (TMD) erreicht werden (Munro, 1995). Dies wird auch bei Cytochromen b₅ als entscheidender Mechanismus für den ER-Verbleib angesehen, da eine künstliche Verlängerung der TMD von 17 auf 22 AS das veränderte Protein in die Plasmamembran dirigiert (Pedrazzini et al., 1996); ein Verhalten, dessen Ursächlichkeit in der Justierung der TMD-Länge auf den optimalen Bilayerdurchmesser gesehen wird, da dieser sukzessive infolge steigender Sterol- und Sphingolipidgehalte zur Plasmamembran hin zunimmt (s. Tabelle 2) (Bretscher und Munro, 1993; Pelham und Munro, 1993).

Cytochrom b₅ erscheint jedoch nicht permanent im ER lokalisiert zu sein, sondern vollzieht offenbar einen Pendelverkehr zwischen ER → cis-Golgi und zurück (Pedrazzini et al., 2000), obwohl keine H/KDEL- oder Dilysin-Rückführmotive vorhanden sind.

1.8.1.1.2 Cytochrom b₅ als Teil chimärer Proteine in Fusionsstudien

Cytochrom b₅ bietet sich für Fusionsstudien an, da einerseits die Membranverankerung nicht von einer spezifischen hydrophoben Sequenz abhängt und von einer artifiziellen Polyleucinkette ebenso geleistet werden kann (Vergères und Waskell, 1992), andererseits der Einbau als Idealfall eines posttranslational inserierenden Proteins von der Integrationsmaschinerie heterologer Wirtssysteme unabhängig zu sein scheint. So konnten 43 AS des hydrophoben C-terminus an die lösliche β-Galaktosidase fusioniert und diese ohne Funktionsverlust in der Plasmamembran von *E. coli* und in Liposomen verankert werden (George et al., 1989, 1991).

Tabelle 2

Durchmesser verschiedener Hefe-Membranen

Subzellulärer Membrantyp	Durchmesser [nm]	[Cholesterol]/[PL] ^{**} -Verhältnis
Lipid-Partikel*	4,5	
(Rauhes) Endoplasmatisches Retikulum ¹	6,3	~ 0,05 Colbeau et al., 1971
Äußere Mitochondrienmembran	6,7	
Vakuole	6,8	
Golginembran	7,3	~ 0,57 Sandhoff et al., 1999
Innere Mitochondrienmembran	7,4	
Plasmamembran	9,2	~ 0,75 Colbeau et al., 1971

Darstellung aus Schneiter et al. (1999). Ergänzt durch: ¹ Fujiki et al. (1982)

* Oleosomenpendant in Hefe; ** PL= Phospholipid

1.8.2 Dosis-Senkung

Nur in seltenen Fällen führt die Senkung der Menge eines Proteins zu verstärkter Membran-Neusynthese. Vorrangig scheinen in diesen wenigen Fällen Aspekte des Vesikularisationsweges betroffen zu sein.

Im Falle der Reduktion des Membranproteins Bos1p bei Hefe tritt z.B. eine Anreicherung von ER-Vesikeln (Shim et al., 1991) im Zusammenhang mit einem Fusionsdefekt im anterograden Vesikelfluß zwischen ER und Golgi auf. Dies legt eine Beteiligung des Proteins am Membranfusionsprozeß nahe. Ein anderer Aspekt des Sekretionsweges, das Rückhalte- bzw Redirektionssystem vom Golgi- zum ER-Kompartiment, ist beim Ausfall des H/KDEL-Rezeptors Erd2p betroffen (Semenza et al., 1990). Hier proliferieren Golgi-Membranen, und die Funktion der Golgi-Zisternen scheint beeinträchtigt zu sein.

1.8.2.1 Wirkungsweise

Da in dieser Arbeit ebenfalls mit Dosis-Senkung der Primärtranskripte verschiedener Mitglieder der Cytochrom b5-Familie in Arabidopsis gearbeitet wurde, soll der von Expressionsansätzen vollständig verschiedene Wirkmechanismus kurz erläutert werden.

Während mit Expression heterologer Nukleinsäuresequenzen über die Synthese transgenen Proteins die Ausführung bestimmter Stoffwechsellleistungen beabsichtigt ist, wird durch Absenkung der mRNA- und Proteinmenge zelleigener Gene die Ausführung der mit ihnen verbundenen Funktionen verhindert oder abgeschwächt (attenuiert).

Erzeugt wird die Attenuation durch experimentelle Einführung einer Sequenz, deren RNA komplementär zur Zielgen-RNA ist. Nach Brodersen und Voinnet (2006) findet dann folgender Ablauf statt: Eine Zielgen-homologe Sequenz in umgekehrter Orientierung („klassischer“ Antisense (AS)) oder eine Zielgen(promotor)-Sequenz mit zueinander komplementären Anfangs- und Endbereichen („inverted-repeat hairpin“AS) bilden nach Transkription durch Bindung an die Ziel-RNA oder durch Selbstkomplementarität doppelsträngige RNA-Bereiche aus (dsRNA). DsRNA wird von RNase III-Typ Enzymen („Dicer“) zu 20-26 Nukleotide kurzen dsRNAs prozessiert. Einer der beiden Stränge wird von einem endonukleolytischen Enzymkomplex („RISC“) gebunden und führt nach Hybridisierung mit homologer Zielgen-RNA zu deren Abbau durch RISC.

Solche exogen erzeugten RNA-Abbauwege können z.B. eine Schutzfunktion gegen Virenbefall bieten; sie können jedoch auch endogen angelegt sein und induziert werden z.B. im Rahmen der Entwicklungskontrolle eines Organismus („microRNAs“ und „transacting RNAs“).

1.9 Beispiele induzierter Membranproliferation in Pflanzen

1.9.1 Induktion der Wurzelknöllchen

(nach van Rhijn und Vanderleyden,1995; Jacobi et al., 1995; Whitehead und Day, 1997 und Gage, 2004)

Die Organogenese von Wurzelknöllchen nach der Infektion von Leguminosen-Wurzelhaarzellen mit Rhizobien ist als Typus extern-induzierter Membranproliferation anzusehen.

Bei Infektion geeigneter Pflanzen mit Bodenbakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* und *Bradyrhizobium* gelangen diese durch einen Infektionsschlauch des Wirtsgewebes bis in das Wurzelrindenparenchym.

Unter endocytotischer Aufnahme innerhalb von Vesikeln gelangen die Bakterioide schließlich in die Wirtszellen.

Die durch Aufnahme und Teilung einsetzende Besiedelung des Cytoplasmas kann bei einigen Symbiosen gewaltige Ausmaße annehmen wie Abb. 10 zeigt:

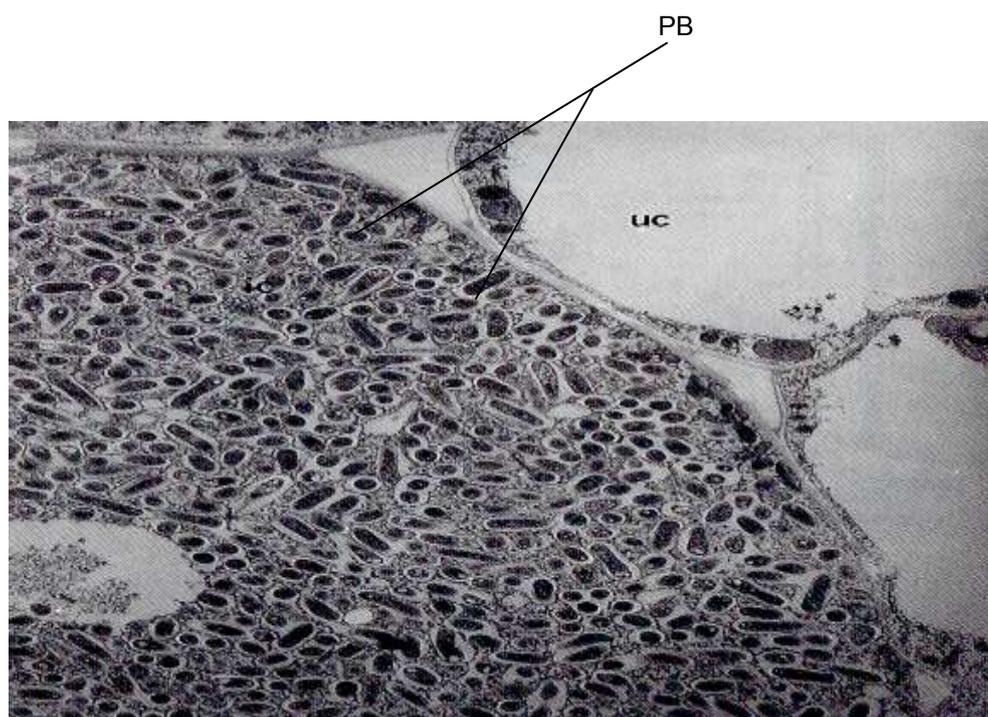


Abbildung 10: *Bradyrhizobium japonicum* in *Macroptilium atropurpureum*.

EM-Aufnahme eines Knöllchens. UC = nicht infizierte Rindenparenchymzelle,

PB = Peribacteroide. Aus Whitehead und Day (1997)

Die aus dem Infektionsschlauch hervorgegangene Vesikelmembran wird als Peribakteroid- bzw Symbiosomenmembran bezeichnet und bildet die proliferierende Stellfläche in den Parenchymzellen der Wurzelrinde von Leguminosen.

Die kalkulierte Gesamtfläche aller Symbiosomen-Membranen einer infizierten Sojabohnen-Wirtszelle eines Knöllchens entspricht etwa $21500\mu\text{m}^2$ zusätzlicher Membranfläche,

gegenüber ca. $2800\mu\text{m}^2$ Plasmamembranfläche derselben Zelle (Roth und Stacey, 1989). Andere Quellen gehen im Verhältnis zur Plasmamembran von 20-40fach mehr Symbiosomen-Membranfläche aus (Verma und Hong, 1996).

Untersuchungen, welchen Proteinen die Schlüsselstellung bei der Induktion der Membranproliferation zukommt, sind bis heute nicht gezielt durchgeführt worden.

Korreliert wird eine erhöhte Biosyntheserate von Endomembranen in Wurzelknöllchen von Erbse mit dem Vorkommen von β -Amyrin, einem Triterpen-Sterol, welches außer in PBM und Endomembranen infizierter Zellen auch in keimenden Samen gefunden wird (Hernandez und Cooke, 1996). In Sojabohnen wird eine Isoform der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) nur im Zuge der Knöllchen-Organogenese zu den Zeitpunkten höchster Membranproliferation in jungen Knöllchen stark exprimiert, während ihr Expressionsniveau mit sinkender Membran-Neusynthese abfällt (Hong und Verma, 1994).

1.9.2 Pflanzenviren

Viren verschiedenster Gattungen vermögen in unterschiedlichen Organismen und Zellsystemen endomembranäre Proliferationen zu erzeugen (eine Auswahl ist in Tabelle 1 - Anhang A aufgeführt). Massive Eingriffe in die Morphogenese der Endomembranstruktur konnten bei tierischen Viren schon in den 60er Jahren beobachtet werden (Dales et al., 1965). In den meisten Untersuchungen wurden entsprechende Anomalien im Zusammenhang mit Replikation des Virusgenoms oder Zusammensetzung der Viruspartikel beobachtet (Guinea und Carrasco, 1990; Sodeik et al., 1993). In dem sehr gut untersuchten phytopathogenen Cowpea Mosaic Virus (CPMV), welches nach Befall von *Vigna*- und *Nicotiana*-Zellen vesikelartige, vom ER herrührende Membranstrukturen ausbildet (De Zoeten et al., 1974; Carette et al., 2000), konnte einem viralen Protein die zentrale Rolle bei der Proliferation der Membranstrukturen zugeschrieben werden (Goldbach und Wellink, 1996). Danach ist von den beiden einzelsträngigen, das virale Genom bildenden mRNA-Molekülen (RNA-1 und -2) RNA-1 allein imstande, nach Translation in ein 200kD-Polyprotein Membranreicherung zu erzeugen. Dieses Polyprotein vermag sich durch autoproteolytische Prozessierung in neun Polypeptide aufzuteilen, von denen bereits ein 60kD-Protein (60K) für die Induktion vesikulärer Strukturen in Insektenzellen ausreicht (van Bokhoven et al., 1992). Wenn dieses als Helikase eingestufte 60K-Protein in *Nicotiana benthamiana*-Zellen exprimiert wird,

induziert es Membranproliferation (Carette et al., 2002a → ein weiteres 32kD Protein jedoch ebenfalls). In „two-hybrid“-Bindungsstudien zeigt es Interaktionen mit VAP-Proteinen (VAMP-assoziierte Proteine), welche an Vesikelfusionsprozessen beteiligt sind (Carette et al., 2002b).

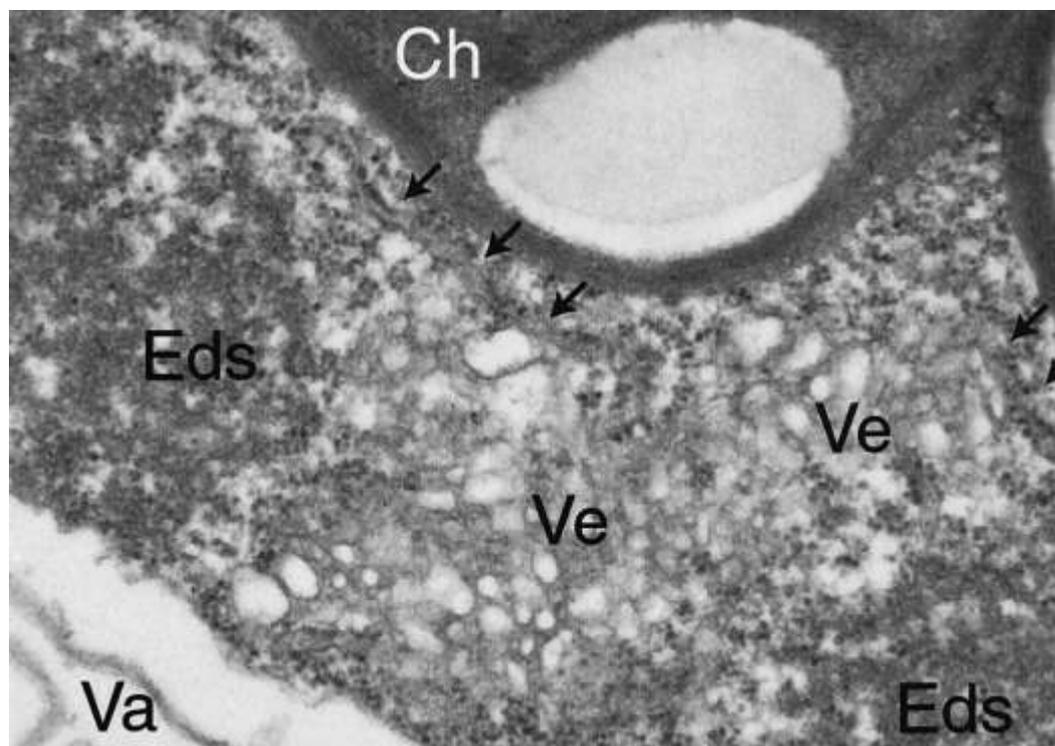


Abbildung 11: CPMV-infizierte *Nicotiana benthamiana*-Mesophyllzelle. Eds = Elektronendichte Strukturen; Ve = kleine membranöse Vesikel; Va = Vakuole; Ch = Chloroplast; Pfeile = rER. Aus Carette et al. (2000).

In welchem Umfang durch Beeinflussung der zellulären Membranfusionsmaschinerie auch die Membran-Neusynthese angeregt wird, ist jedoch nicht untersucht worden. Auch wurde weder im Zuge der Expression des 60K- noch der des homologen 2BC-Proteins aus Poliovirus (mit ähnlichen Phänomena, siehe Tabelle 1 - Anhang A) der zelluläre Syntheseaufwand in Polarlipid- oder Flächenzuwachs gemessen, sodaß über das Proliferationsausmaß keine Angaben vorliegen.

1.9.3 Reißverschlußmembranen

Bei Pflanzen gelang bislang nur in einem Fall die stabile Anreicherung von Endomembranen. Gong et al (1996) fusionierten aus einem Vogel-infizierenden Bronchitis-Virus das Gen für dessen M-Protein (IBV-M) mit dem bakteriellen β -Glucuronidasegen (GUS) und exprimierten dieses Fusionskonstrukt unter Kontrolle des CAMV-35S Promotors in Tabakprotoplasten. Das N-terminal vorliegende IBV-M Protein mit drei Transmembran-Domänen und das C-terminal angeordnete GUS-Protein zeigen nach Anreicherung in Tabakzellen im elektronenmikroskopischen Bild „schneckenhausartige“ Membranomorphologie (siehe Abb.10). Diese Struktur wird als **Z-Membran** („zippered membrane“) bezeichnet und auf die Tetramerisierungseigenschaft des C-terminalen cytosolisch angeordneten GUS-Proteins zurückgeführt.

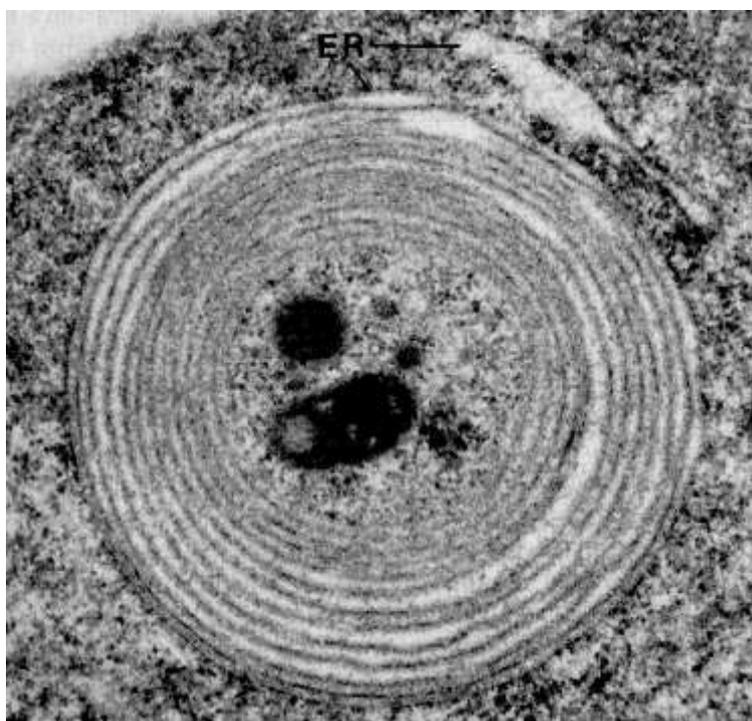


Abbildung 12: Z-Membranstapel

Querschnitt durch eine Tabakmesophyllzelle aus einer Suspensionskultur.

Elektronenmikroskopische Aufnahme aus Gong et al. (1996).

Etwa 20-50 derartige Z-Membranstapel wurden pro infizierter Zelle festgestellt, die einer zusätzlichen Membranfläche von bis zu $500\mu\text{m}^2$ entsprechen. Da die nativ vorhandene Membranfläche nicht quantifizierend untersucht wurde, fehlt leider der notwendige Vergleichswert, um das Ausmaß des Z-Membranflächenanstiegs einordnen zu können.

Eine ähnliche Proliferation mit analoger Membrananordnung nach Expression des o.g. Fusionskonstruktes soll auch in Hefe auftreten (Cowan et al., 1995).

1.10 Samenentwicklung – *Arabidopsis thaliana*

Da in dieser Arbeit das Ziel in der Erzeugung von endomembranärer Proliferation in den Samen von *Arabidopsis* und Raps bestand, erscheint ein Überblick über die typische Samenenwicklung abschließend angebracht. Dieser wird am Beispiel des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* exemplarisch nachvollzogen.

Die typische Samenenwicklung nach Beginn der Blütenöffnung (DAF „days after flowering“) ist nach etwa 20 Tagen abgeschlossen. Sie läßt sich nach Baud et al. (2002) unter Standard-Anzuchtbedingungen (16 Std Tag, 20°C/ 8 Std Nacht, 15°C) in folgende Phasen einteilen:

Die **Frühe Embryogenese**, die sich bis DAF 7 erstreckt. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch große Zellteilungsaktivität und morphologische Veränderungen des Embryo, der Zweizell-, Dermatogen- und Globularstadium bis DAF 4 durchläuft, im Triangularstadium (DAF5) den Übergang zur Bilateralsymmetrie vollzieht und nach Entwicklung von frühem und spätem Herzstadium (DAF 5-6) gegen Ende dieser ersten Entwicklungsphase in das frühe Torpedostadium einmündet (DAF 7).

Physiologisch zeichnet diese teilungsaktive Entwicklungsphase ein rascher Anstieg von Trocken- und Frischmasse aus sowie mit beginnendem Torpedostadium ein Absinken des Wassergehaltes. Die hohe Stoffwechselaktivität geht einher mit hohen Gehalten an schnell verstoffwechselbaren Hexosen. Bemerkbar ist eine ansteigende Menge an Stärke. Die Speicherstoffsynthese (Öl und Protein) setzt mit beginnendem Torpedostadium ein.

Im Anschluß an das frühe Torpedostadium beginnt die **Reifungsphase** (DAF 7→16). Die Zellteilungsaktivität ist beendet. Morphologisch tritt der Embryo in eine Streckungsphase ein, die mit Zell-Elongation verbunden ist. Das Frischgewicht erreicht gegen Ende dieses Abschnitts den höchsten Wert, das Trockengewicht den Endwert.

Unter sukzessivem Wasserverlust elongiert der Embryo zunächst in eine umgedrehte U-Form (DAF 8), resorbiert das Endosperm schließlich weitgehend (~ DAF 10) und nimmt dessen Platz ein. Mit dem zügigen Abbau der Stärke bei Beginn der Reifungsphase korrespondiert ein Anstieg der Speicherlipidmenge und, ab DAF 10, ein rascher Anstieg des Proteingehaltes. Ebenfalls ist ein Anstieg der Saccharosekonzentration ab DAF 12 zu verzeichnen.

In diesem Reifungsabschnitt haben nach Ruuska et al. (2002) die Promotoren der an der Fettsäuresynthese beteiligten Gene höchste Aktivität (Amplitude DAF 8-11) genauso wie die der *Arabidopsis*-Speicherproteine 2S-Albumin (Arabin) und 12S-Globulin (Cruciferin) (Aktivitäts-Amplitude ~ DAF 11). Ähnliche Aktivitätsfenster wurden bei heterologen Speicherprotein-Promotoren wie USP, Napin und LeB4 in *Arabidopsis* und anderen Pflanzen festgestellt (Bäumlein et al., 1991a, 1991b, 1992; Singh et al., 2001).

In der **Späten Reifungsphase** (DAF 17→20) fällt der Wassergehalt auf den Endwert von etwa 7% ab. Das Frischgewicht nähert sich bis auf diese Differenz dem Trockengewicht (~ 17-25 µg pro Samen) und Öl- und Proteingehalte erreichen ihre Endwerte (bis zu maximal 40 % vom Trockengewicht). Der starke Anstieg der Saccharosekonzentration während DAF 13-20 übt eventuell ähnliche Stabilisierungsfunktion auf Membranlipide und -proteine aus wie dies für Trehalose gezeigt werden konnte (Crowe et al., 1984).

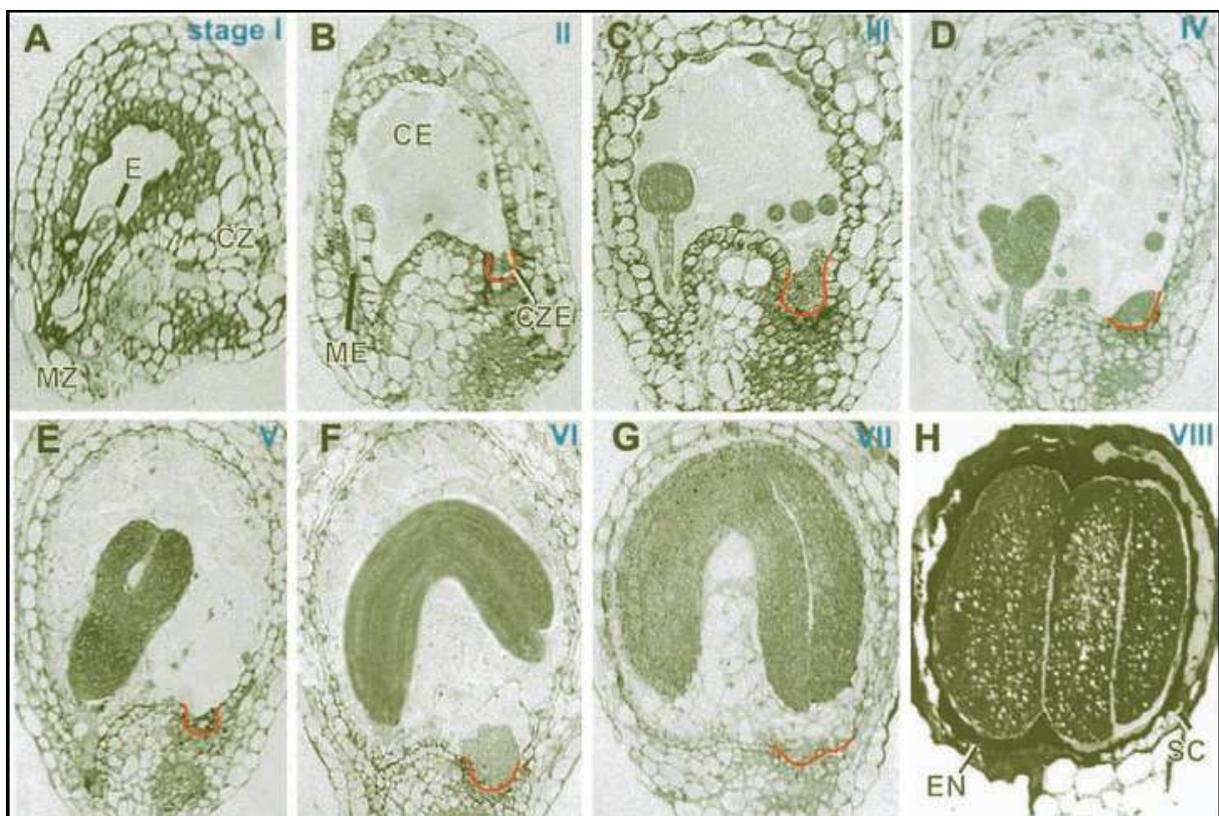


Abbildung 13: Samen-Entwicklungsstadien in *Arabidopsis*.

A: Zweizell-Embryostadium

B: Quadranten Stadium

C: Globuläres Stadium

D: Herzstadium

E: Torpedostadium

F: Beginnende U-Form

G: Späte U-Form

H: Reifer Embryo

Gliederung des Endosperms: ME= mikropyläres Endosperm; CE= zentrales Endosperm; CZE= chalazoides Endosperm; SC= Testa; EN= Endosperm; E= Embryo; MZ= Mikropyle(n Zone); CH= Chalaza Zone. Aus Otegui et al. (2002).

Experimenteller Ansatz dieser Arbeit

Die Verwirklichung von zwei der vier unter >Zielsetzungen< formulierten Vorhaben setzte die experimentelle Erzeugung hoher Membrangehalte in den Speichergewebszellen von Ölsaaten voraus (2+3). Deshalb stehen Membranproliferation-induzierende Versuchsansätze (1) im Zentrum dieser Arbeit. Die Auswahl geeigneter Strategien war jedoch von Anfang an limitiert. Durch Projektvorgaben wegen einer eventuell vorgesehenen Freisetzung und kommerziellen Nutzung war die Transformation von Organismen mit humanen und viralen Nukleinsäuresequenzen ausgeschlossen, sodaß eine experimentelle Übernahme der unter 1.9.2 („60-K Protein“) und 1.9.3 („Reißverschlußmembranen“) beschriebenen Ansätze unterblieb. Für beide Ansätze waren in den entsprechenden Publikationen allerdings auch keine quantitativen Daten zur Membranproliferation enthalten (De Zoeten et al., 1974; Carette et al., 2000; Gong et al., 1996; Cowan et al., 1995). Eine Adaptation der unter 1.9.1 („Peribakteroid-Membran“; Hong und Verma, 1994) beschriebenen Proliferationsstrategie erschien aussichtslos, da sich zu Beginn dieser Arbeit (1999/2000) kein zur Pi3K-Sequenz aus Soja homologes Pendant in *A. thaliana* fand.

Aus diesen Gründen wurden insgesamt 13 Gensequenzen der unter 1.8 vorgestellten Proteine ausgewählt, darunter 8 kodierende Sequenzen, deren Membran-Proliferationsvermögen aus Arbeiten an Hefe bekannt war (s.a. Tabelle 2 - Material & Methoden). Zunächst wurden durchweg „sense“-Expressionen unter Kontrolle starker samenspezifischer Promotoren durchgeführt. Einen besonderen Raum nehmen in der vorliegenden Arbeit dabei die Versuche mit Cytochrom b_5 ein, dessen Vorzüge bereits unter 1.8.1.1 näher vorgestellt wurden. Nach Anregung durch Befunde einer schwedischen Arbeitsgruppe in Raps wurden mit Cytochrom b_5 -Vertretern in Arabidopsis auch zusätzliche „Antisense“-Expressionen durchgeführt (1.8.2). Abschließend durchgeführte Expressionen in Hefe dienten der Absicherung bzw. Überprüfung des erweiterten Versuchskonzeptes.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Gaschromatograph

Gaschromatograph	H6850 Series	Hewlett Packard
Auto-Injektor	7683 Series	Hewlett Packard
Kapillarsäule	ZB-Wax 52 (30 m x 320 µm x 0,5 µm)	Phenomenex
Auswertung	ChemStation Rev. 1.06.03[509]	Hewlett Packard

HPTLC

Extraktions-Säulen:

Strata SI-2 Silica 55µm-140A Phenomenex/Strata

Auftragegerät: TLC3 CAMAG

Scanner: TLC4 CAMAG

Elektronenmikroskopie

TEM: Zeiss Leo 906E

Kamera: Gatan Multiscan Model 794

Ultramikrotom: Reichert-Jung Ultracut E

Trimmblock: Reichert-Jung Stereo Star

Diamantmesser: Diatome MX 3732

Particle Gun

BioRad Model PDS-1000/He

Biolytic Particle Delivery System

Digitalmikroskopie

Zeiss Axiovert 35M

3CCD-Kamera: Sticksel CCD- Kameratechnik GmbH

Modell: XC003-LZI

Zentrifugen

Kühlzentrifuge	5810 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Centrikon 324	Kontron
Tisch-Kühlzentrifuge	MICRO 22R	Hettich
Tischzentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Rotoren	A6.9, A8.24, SW60, AS4.13	Kontron
	A-6-24	Eppendorf

Sonstige Geräte

Elektrophoresekammern	Horizon 11.14	Gibco BRL
Elektroporator	Electroporator 2510	Eppendorf
Netzgeräte	PS304	Life Technologies
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Photometer	20 GENESYSTEM	Spectronic
UV-Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Hybridisierungsöfen	OV2	Biometra
Ultraschallbäder		
unbeheizt	BRANSONIC 220	B. Braun
beheizbar	TRANSSONIC DIGITAL	Elma
Wasserheizbäder	THERMOMIXTM MM	B. Braun
Sterilbank	DLF/BSS4	Woerdau
Heizplatte/Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA
Vortexschüttler	REAX 2000	Heidolph
Thermo-Cycler	PRIMUS	MWG Biotech
	T Gradient	Biometra
Thermo-Schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
UV-Crosslinker	UVC 500	Hofer
UV-Transilluminatoren	UVT-28M	Herolab
MultiImage™ Light Cabinet		α Innotech Corp.
Ultraschallstab	LABSONIC 2000	B. Braun
Videoprinter	429 K	Herolab
Schwingmühle	MM 2000	Retsch
Stahlkugeln	0,5mm Durchmesser	div. Herst.
Zählkammer	Neubauer improved	Neubauer

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Handelsübliche Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen, Detergenzien, Nährmediengrundstoffe, Kohlenhydrate, Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika wurden von folgenden Firmen geliefert: Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Biomol (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Duchefa (Haarlem, Niederlande), BD Biosciences Clontech (Heidelberg) und Carl Roth (Karlsruhe). Fettsäuren wurden von der Firma Sigma-Aldrich geliefert.

DNA-modifizierende Enzyme und Feinchemikalien für molekularbiologische Methoden wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), Amersham Pharmacia (Freiburg) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) bezogen. Oligonukleotide lieferten die Firmen Sigma-ARK (Darmstadt), Life Technologies (Braunschweig) und Invitrogen (Groningen, Niederlande). Kits für molekularbiologische Anwendungen wurden von den Firmen Qiagen (Hilden), Machery und Nagel (Düringen), Promega (Mannheim), Stratagene (Amsterdam-Zuidoost, Niederlande) und BD Biosciences Clontech (Heidelberg) geliefert.

Chemikalien für die Elektronenmikroskopie wurden geliefert von den Firmen: ICN (Amsterdam, NL), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Polyscience Inc. (Warrington, USA), Next Chimica (Centurion, Südafrika) und Serva (Heidelberg). Chemikalien für Protein-, Phosphat- u. Zuckerbestimmung wurden von den Firmen Pierce (Rockford, USA), Interchim (Montflucon, Frankreich), Sigma Diagnostics (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt) und Fluka (Neu-Ulm) bezogen. An Gasen für Chromatographie und Biologische Transformation wurden Argon, Druckluft, Wasserstoff und Helium von den Firmen Linde (Hamburg) und Messer-Griesheim (Hamburg) verwendet.

Substanzen für Pflanzentransformation u. Kulturmedien kamen zusätzlich von Duchefa (Haarlem, Niederlande) und Lehle Seeds (Round Rock, USA).

2.1.3 Chemikalien für die elektronenmikroskopische Präparation

Cacodylatpuffer	Endkonz.: 50, 75 und 100 mM; pH 7,0
Kaliumphosphatpuffer	Endkonz.: 50 mM; pH 6,8
Phosphat-/Zitratpuffer	50 mmol/100 ml Fertigtabletten von Sigma; pH 5,8
Zymolyase (ICN)	Lösung: 1 mg/ml in Phosphat-/Zitratpuffer
Bleizitrat	Arbeitslg. nach Reynolds (1963): 1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und 1,76 g $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times [2\text{H}_2\text{O}]$ zu 30 ml H_2O gegeben, kurz geschüttelt und 1 N NaOH zugegeben bis Lösung klar wurde (Umsetzung zu Bleizitrat).
Formvar	0,4 %ige Lösung (w/v) in Chloroform.
Glutaraldehyd	25 %ige Stammlösung in H_2O .
Paraformaldehyd (PFA)	Stammlösung: 16% w/v in H_2O , auf 60-80°C erhitzen und 1 N NaOH zutropfen bis PFA gelöst war.
Primärfixativ	1. Variante: Endkonzentration = 1,5 - 2% v/v Glutaraldehyd (GA) in 50 mM Cacodylatpuffer. 2. Variante: Endkonzentration = 1 - 2% Glutaraldehyd und 0,5 - 1% Paraformaldehyd in 50 mM Cacodylatpuffer.
Osmiumtetroxid (OsO_4)	2 % w/v in H_2O , OsO_4 liegt hier als schwache Osmiumsäure (H_2OsO_5) vor. Fix.-konz.: 0,4-1 %
Einbettung	Low Viscosity-Gemisch nach Spurr (1969): 5,0 g VCD (Vinylcyclohexendioxid, E.R.L. 4206) = Matrix 3,0 g D.E.R. 736 (Diglycidether von $\text{H}_8\text{C}_3\text{O}_2$) = Weichmacher 13,0 g NSA (Nonenyl-Bernsteinsäureanhydrid) = Härter 0,2 g DMAE (1-Dimethylaminoethanol) = Beschleuniger
Uranylacetat	In A. bidest als gesättigte Lösung angesetzt (~ 2 % w/v bei RT).

2.1.4 Elutionsmittel für Lipide

Neutrallipide

Chloroform = absolut

Glykolipide

Aceton/Isopropanol = 9 : 1

Phospholipide

Methanol = absolut

2.1.5 Laufmittel für DC/ HPTLC

Phospholipide

Chloroform : Methanol : Eisessig = 65 : 25 : 8

Chloroform : Ethanol : Wasser : Triethylamin = 30 : 35 : 7 : 35

Hexan-THF Gemisch (99 : 1) : Isopropanol : H₂O = 40 : 50 : 10

Glycolipide

Chloroform : Methanol = 85 : 15

Neutrallipide

Chloroform : Aceton = 96 : 4

Die durch Doppelpunkt getrennten Zahlen stellen additive Volumenanteile dar. Entsprechend ist Chloroform : Aceton = 96 : 4 zu verstehen als 96 Volumenanteile Chloroform plus 4 Volumenanteile Aceton.

2.1.6 Färbemittel für die Chromatographie

Präparative Dünnschicht-Chromatogramme wurden mit Anilinnaphthalinsulfonsäure (ANS; 0,2% w/v in Methanol) besprüht, die Position der Lipidbanden unter UV (366 nm) mit Bleistift markiert, mit H₂O aufgeweicht, das Silicagel mit einem Feinspatel abgeschabt und in Sovirel-Gläser überführt.

Glykolipide auf DC-Platten wurden mit α - Naphtholschwefelsäure (2,67 % w/v α - Naphthol in Lösungsmittel: 83,3 % v/v Methanol + 6,7 % v/v A. dest. + 10 % v/v H₂SO₄) besprüht und auf der Heizplatte bei 140-160°C entwickelt. Die einzelnen Glykolipide waren nach ca. 7 min als rot-braune Banden sichtbar. Per Digitalkamera (Kodak DC 290) oder Scanner (hp 2300C) wurden die DC-Platten jeweils aufgenommen und als jpeg-Format gespeichert. Entsprechend wurde mit Phospho- und Neutrallipiden verfahren. Bei Phospholipiden bot sich jedoch eine Alternative an. Hier wurden die Silicaplatten mit Phosphatidreagenz nach Dittmer und Lester 1964 (1 Vol.: 0,28 M Molybdänoxid und 0,037 M pulverisiertes Molybdän in 25 N H₂SO₄ + 2 Vol.: A. dest.) behandelt. Nach wenigen Minuten waren die Phospholipide als blaue Banden sichtbar. Dokumentation und Speicherung erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Visualisierung der Polarlipidbanden mit der empfindlichen Scannereinheit (TLC4) der automatischen HPTLC-Anlage von CAMAG war es notwendig, den bei Verwendung von Phosphatidreagenz auftretenden Hintergrund zu reduzieren. Die TLC-Platten wurden deshalb ca. 8 s eingetaucht in Kupfersulfat/Phosphorsäure-Reagenz (10 % w/v CuSO₄ in 10 % v/v H₃PO₄; nach Stahl, 1969), bei 140°C entwickelt und dokumentiert.

2.2 Organismen

2.2.1 Bakterien

Escherichia coli XL1-Blue MRF' $\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, *endA1*, *supE44*,
(Bullock *et al.*, 1987) *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*[F'*proAB*, *lacI^qZ* Δ M15, Tn10(tet^r)]

Escherichia coli BM25.8 *supE44*, *thi* $\Delta(lac-proAB)$ [F' *traD36*, *proAB*⁺, *lac^qZ* Δ M15]
(Palazzolo *et al.*, 1990) *limm434* (*kan^R*)P1 (*cam^R*) *hsdR* (*r_{k12}-m_{k12}-*)

Escherichia coli SURE
(Greener, 1990)

e14⁻ (mcrA⁻), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5(kan^r), uvrC, F' proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(tet^r)

2.2.2 Hefen

Saccharomyces cerevisiae 334
(Hovland *et al.*, 1989)

MAT α , *pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3, reg1-501, gall*

Saccharomyces cerevisiae YS18
(Sengstag und Hinnen, 1988)

MAT α , *pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3, leu112, his3-11, his3-15, can^R, reg1-501, gall*

2.2.3 Pflanzen

<u>Art</u>	<u>Sorte bzw Cultivar</u>	<u>Familie</u>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia C24	Brassicaceae
<i>Brassica napus</i>	Lisora/Drakkar/Hanna	Brassicaceae
<i>Linum usitatissimum</i>	Flanders	Linaceae

2.3 Vektoren

2.3.1 Klonierungsvektoren für *Escherichia coli*

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pGEM-T	Amp ^R	Promega
pUC18	Amp ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pBluescript II SK-	Amp ^R	Stratagene
pCATgfp	Amp ^R	Fulda <i>et al.</i> , 2002

2.3.2 Expressionsvektoren für *Saccharomyces cerevisiae*

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pYES2 (URA+)	Amp ^R	Invitrogen
pYEp51	Amp ^R	Broach 1983

2.3.3 Expressionsvektoren für Pflanzen

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pCAMBIA	Kan ^R /Kan ^R	www.cambia.org
pCAMBIA	Chloramp ^R /Kan ^R	www.cambia.org
pPZP111	Chloramp ^R /Kan ^R	Hajdukiewicz et al., 1994

2.3.3.1 Expressionskassetten

Promotoren	Terminatoren
USP (641 bp; Bäumlein et al., 1991b)	OCS (187 bp)
LeB4 (1236 bp; Bäumlein et al., 1991a)	35S-T (204 bp)
Napin (1150 bp; Josefsson et al., 1987)	NOS (276 bp)
Doppelter 35S (2 x 421bp; Fulda et al., 2002)	35S-T (204 bp)

2.4 Anzucht der Organismen

2.4.1 Kultur von *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* wurden auf festen oder in flüssigen Vollmedien bei 37 °C angezogen. Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180-200 rpm) oder Rotation belüftet.

Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wurde dem Medium Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) steril zugesetzt. Das Antibiotikum wurde als tausendfach konzentrierte Stammlösung in A. bidest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Bei Klonierungen in die Vektoren pUC18 und pGEM-T wurde den Selektionsplatten IPTG und X-Gal zugesetzt

IPTG: 200 µM Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (100 mM Stammlösung in A. dest.)

X-Gal: 80 µg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (in 5 ml *N,N*-Dimethylformamid) pro Liter Medium

LB-Medium

LB-Medium (Luria & Bertani Medium) enthielt 25 g/l LB-Broth (Duchefa), zusammengesetzt aus 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. LB-Platten enthielten zusätzlich 1,4 % (w/v) Agar (AppliChem).

SOB-Medium:

SOB-Medium enthielt 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄ und 10 mM MgCl₂. MgSO₄ und MgCl₂ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben.

SOC-Medium:

SOC-Medium enthielt 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 0,05 % (w/v) NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ und 0,4 % (w/v) Glukose. Glukose, MgSO₄ und MgCl₂ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben

Zelldichte:

Die Zelldichte einer *E. coli*-Kultur in Flüssigmedium wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entsprach eine OD₆₀₀ von 1,0 einer Zelldichte von 1-2 x 10⁹ Zellen/ml.

Dauerkulturen:

Zum Anlegen einer Dauerkultur wurde eine Übernachtskultur der Zellen mit dem gleichen Volumen 70 % (v/v) Glycerin (autoklaviert) gemischt und bei -70 °C gelagert.

2.4.2 Kultur von *Agrobacterium tumefaciens*

Für *in-planta*-Transformationen wurde der Agrobakterienstamm C58C1 ATHV Rif^r (Koncz und Schell, 1986; van Larebeke et al., 1974) benutzt. Die Bakterien wurden bei 28 °C auf Fest- oder Flüssigvollmedien angezogen. Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (160-180 upm) oder Rotation auf Drehtrommel-Inkubatoren 1-3 Tage belüftet.

Anzucht ohne Plasmid erfolgte immer mit Rifampicin (30 µg/ml Regeneration -180 µg/ml Stringentselektion), um Kontaminationen ausschließen zu können. Für plasmidäre Selektionen wurde dem Medium Kanamycin (10 µg/ml Regeneration – 50 µg/ml Stringentselektion) oder Chloramphenicol (20 µg/ml Regeneration – 60 µg/ml Stringentselektion) steril zugesetzt. Die Antibiotika wurden als tausendfach konzentrierte Stammlösungen in *A. bidest.* (Kanamycin), Ethanol_{abs.} (Chloramphenicol) und DMSO (Rifampicin) gelöst, sterilfiltriert (Kanamycin) und bei –20 °C gelagert. Für Herstellung von LB-Platten und Dauerkulturen sowie die Ermittlung der Zelldichte gilt gleiches wie bei *E. coli* beschrieben.

Herstellung von YEP-Medien (pro liter):

	<u>Bacto-Hefeextrakt</u>	<u>Bacto-Pepton</u>	<u>NaCl</u>	<u>Bacto-Agar</u>
YEP-Flüssig-				
Medium:	10 g	10 g	5 g	—
YEP-Agarplatten:	10 g	10 g	5 g	15 g

2.4.3 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* wurden auf festem oder in flüssigem Vollmedium (YPD) oder Minimalmedium (CMdum) bei 30 °C angezogen. Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180-200 rpm) oder Rotation belüftet. Die bei der normalen Anzucht verwendete Glukose im Medium CMdum (s.u.) wurde bei

Expressionsversuchen durch die Kohlenstoffquelle Raffinose ersetzt, da Glukose den P_{GALI}-Promotor des Hefe-Expressionsvektors pYES2 reprimiert (Lohr *et al.*, 1995).

YPD:

YPD-Medium enthielt 2 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD) und 2 % (w/v) Glukose. Die Glukose wurde als sterilfiltrierte Lösung nach dem Autoklavieren dazugegeben. YPD-Platten enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Bacto-Agar (BD).

CMdum:

CMdum-Medium enthielt in einem Liter 1,155 g Dropout Powder (s. u.), 2 % (w/v) Glukose oder Raffinose, 0,67 % (w/v) YNB-AA (*Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids*, BD), 20 mg Histidin, 60 mg Leucin oder Uracil und 40 mg Tryptophan. Bei Koexpressionen wurden Leucin u. Uracil weggelassen. Die Kohlenhydrate und die Aminosäuren wurden nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben. CMdum-Platten enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Bacto-Agar (BD).

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

Die Substanzen wurden vermischt und mit einem Mörser pulverisiert.

Zelldichte / Zellzahl:

Die Zelldichte wurde photometrisch ebenso bestimmt wie für *E. coli* beschrieben (2.4.1). Zusätzlich wurde als Bezugsgröße auch die Zellzahl ermittelt. Dies geschah mit einer

Zählkammer „Neubauer improved“ nach Herstellerangaben, wobei gemäß der Kammergeometrie (Gruppenquadrat: Fläche = 0,04 mm², Tiefe = 0,1 mm) galt: Zellzahl / ml = Zellzahl pro Gruppenquadrat x 250000. Zur statistischen Absicherung wurde der Mittelwert aus 20 Gruppenquadrat-Auszählungen gebildet.

2.4.4 Kultur und Selektion von Arabidopsis und Raps

Kultur:

Etwa 20-50 *Arabidopsis*-Samen der Sorte Columbia C24 wurden in Rundbecher-Tontöpfen (100 cm² Öffnung) auf Wasser-durchtränkter Erde (1 Teil Mutterboden und 2 Teile Sand) ausgelegt und zur Keimungssynchronisation 2 Tage bei 8°C im Kühlraum stratifiziert.

Im Anschluß wurden die Kulturgefäße unter Klimakammerbedingungen bei 16 h Belichtung, 22-23°C und 8 h Dunkelheit, 17°C, etwa 2 Wochen unter regelmäßiger Bewässerung kultiviert, dann per Pinzette 3-4 gut entwickelte Pflanzen vereinzelt und weitere 3-4 Wochen kultiviert. Alle drei Wochen wurden die Pflanzen mit Flüssigdünger-Supplement versorgt (~20 ml Konzentrat /10 Töpfe). Nach diesem Zeitraum waren die Achsen der ersten Seitentriebe 1-3 cm lang, und es wurde mit der Transformation begonnen.

Zur Wiederanzucht transgener Rapssaat der Sorten Lisora, Drakkar und Hanna wurden Samen zwischen mehrere Lagen feuchten Löschpapiers in Petrischalen gelegt und 2 Tage im Dunkeln vorkultiviert. Jeweils ein gut entwickelter Keimling wurde pro Rundbecher-Tontopf in Erde gepflanzt und bis zu 24 Wochen unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Dann konnten die Samen der abgereiften Pflanzen geerntet und für weitere Untersuchungen genutzt werden.

Selektion:

Samen transformierter Arabidopsispflanzen wurden nach Oberflächensterilisierung (1min in Ethanol_{absolut}, 10 min in halbkonzentriertem Natriumhypochlorit (~ 6,5% freies Chlor), 4x waschen in A. bidest) auf Selektionsplatten mit Kanamycin ausgelegt und zur Stratifikation 2 Tage bei 8°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Anzucht unter Klimakammerbedingungen 16 h Tag, 23°C und 8 h Nacht, 17°C, bis die transgenen Pflanzen deutlich zu identifizieren

waren (7-11 Tage). Diese wurden per Pinzette aus dem Agar der Petrischalen gezogen, in Erde umgesetzt und in der Klimakammer bis zur Abreife kultiviert.

Ähnlich wurde mit Rapssaat verfahren. Diese wurde zur besseren Durchwurzelung in Weckgläser mit 6 cm hohem Agarboden ausgelegt und nach 29 Tagen auf Erde umgesetzt.

Selektionsplatten

1 x Murashige & Skoog Salze

+ Gamborg B5 Vitamine = 4,4 g /l

0,05% (w/v) MES, pH 5,7 = 0,5 g /l

1,2% (w/v) Phytagar = 12 g /l

Kanamycin = 70 µg /l Arabidopsis u. 250 µg /l Raps

2.5 Transformation von *Escherichia coli*

2.5.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach einer Methode von Inoue *et al.* (1990). Hierzu wurden 200 ml SOB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1 Blue MFR' angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180 – 200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden in 80 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Nach einer weiteren 10minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 8 ml eiskaltem TB-Puffer mit 0,56 ml DMSO (7% Endkonzentration) resuspendiert. Die jetzt kompetenten Zellen wurden in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70 °C gelagert.

<u>TB-Puffer:</u>	10 mM	PIPES pH 6,7 (KOH), sterilfiltriert
	55 mM	MnCl ₂
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl

2.5.2 Transformation

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit bis zu 20 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA vermischt. Nach weiteren 30 min auf Eis wurden die Zellen 60 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurden sie für 2 min auf Eis gekühlt, mit 800 µl SOC-Medium versetzt und 30-60 min bei 37 °C im Rotor inkubiert, um die phänotypische Expression der neuen Eigenschaften zu erlauben. Danach wurden die Zellen sedimentiert (22000 x g, 20 sec, RT) und in einem kleineren Volumen SOC-Medium resuspendiert. Ein Transformationsansatz wurde auf 1-2 Selektionsplatten ausplattiert.

SOC-Medium

SOC-Medium enthielt 2 % (w/v) Bacto-Pepton (BD), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 0,05 % (w/v) NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ und 0,4 % (w/v) Glukose. Glukose, MgSO₄ und MgCl₂ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren dazugegeben.

2.6 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Hier wurde in Abwandlung eines Protokolls von An et al. (1988) eine Kalzium-vermittelte Transformationsmethode eingesetzt.

2.6.1 Herstellung Ca-kompetenter Zellen

Zunächst wurden 5 ml YEP-Medium Vorkultur (Antibiotikakonz. siehe unten) mit *Agrobacterium* inokuliert. Nach 1-2 Tagen war photometrisch eine OD₆₀₀ zwischen 0,8-1,6 erreicht, und 2 ml der Vorkultur wurden in 50 ml YEP-Medium gleicher Selektion überimpft. Bei 28°C und 160 upm (Infors-Schüttler) inkubierte die Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 (3-5 h), wurde anschließend im 50 ml-Falcongefäß bei 3000 x g unter RT für 15 min sedimentiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 1 ml eiskalter 10 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen, zu 100 µl Portionen auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, sofort in N₂ liq. eingefroren und bei -80°C gelagert oder unmittelbar in die Transformation eingesetzt.

2.6.2 Transformation

Je 5 µl (1-3 µg) Plasmid-DNA aus einer Minipräparation wurden auf 100 µl gefrorener Ca-kompetenter Zellen pipettiert und 5 min für 37°C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock). Nach Zugabe von 1 ml YEP-Medium (Antibiotika siehe unten) konnten die Hitzeschock-behandelten Zellen für 4 h bei 28°C unter leichter Bewegung (60 upm, Tischschüttler) zur Etablierung der Antibiotikaresistenz regeneriert werden. Abschließend wurden die Zellen 2 min bei Maximalumdrehung sedimentiert, der Zellrückstand in 200 µl Antibiotika-supplementiertem YEP-Medium resuspendiert und 50 µl hiervon auf YEP-Agarplatten (Antibiotika siehe unten) ausgestrichen. Auf den evaporationsdicht mit Parafilm umschlossenen Platten waren nach 2-4 Tagen *Agrobacterium*-Kolonien sichtbar.

	<u>Rifampicin</u>	<u>Chloramphenicol</u>	<u>Kanamycin</u>
YEP-Vorkultur-			
Medium (flüssig):	180 µg/ml	————	————
YEP-Regenerations-			
medium (flüssig):	30 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml
YEP-Agarplatten:	120 µg/ml	60 µg/ml	50 µg/ml

2.7 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

2.7.1 Transformation mit der PEG-Methode

Eine Übernachtskultur von *S. cerevisiae* in YPD wurde 1:100 (v/v) im gleichen Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1-2 bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 x g, 10 min, RT) geerntet und einmal mit 10 ml 0,1 M Lithiumacetat gewaschen. Die Zellen wurden erneut pelletiert, in 10 ml 0,1 M Lithiumacetat aufgenommen und 1 Stunde bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (3200 x g, 10 min, RT) und in 0,5 ml 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert. 50 µl der Zellen wurden mit 1-3 µg Plasmid-DNA vermengt, und der Ansatz wurde 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl 40 % (w/v) Polyethylenglykol (PEG) 4000 (in 10 mM Tris/HCl pH 7,5) verdünnt und erneut 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach einem 5minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden 900 µl A. dest. zu den Zellen gegeben. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert (10 sec) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden erneut in 1 ml A. dest. resuspendiert, abzentrifugiert, und der Überstand wurde wieder verworfen. Schließlich wurden die Zellen in 100 µl A. dest. aufgenommen und auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Platte wurde 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.7.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

500 ml YPD-Medium mit 10 % (v/v) Glycerin wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur der Hefen in Vollmedium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5 bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4 °C) und in 500 ml eiskaltem A. dest. resuspendiert. Bei allen nachfolgenden Schritten wurde darauf geachtet, dass die Zellen eiskalt gehalten wurden. Die Zellen wurden erneut geerntet und in 250 ml eiskaltem A. dest. aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, erneut pelletiert und anschließend in 0,5-1 ml 1 M Sorbitol + 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 65 µl-Aliquots bei -70 °C eingefroren. Die Zellen wurden langsam eingefroren, um eine möglichst hohe Viabilität zu erreichen.

2.7.3 Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompenter Hefezellen wurde bei RT aufgetaut und mit bis zu 5 μ l möglichst salzfreier DNA vermenget. Die Zellen wurden in eine vorgekühlte Küvette überführt und einem Spannungspuls von 1500 V ausgesetzt. Anschließend wurde sofort 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol hinzugegeben, um die osmotisch gestreßten Zellen zu stabilisieren. Die Zellen wurden abzentrifugiert (22000 g, 30 sec, RT), in ca. 200 μ l 1 M Sorbitol resuspendiert und auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

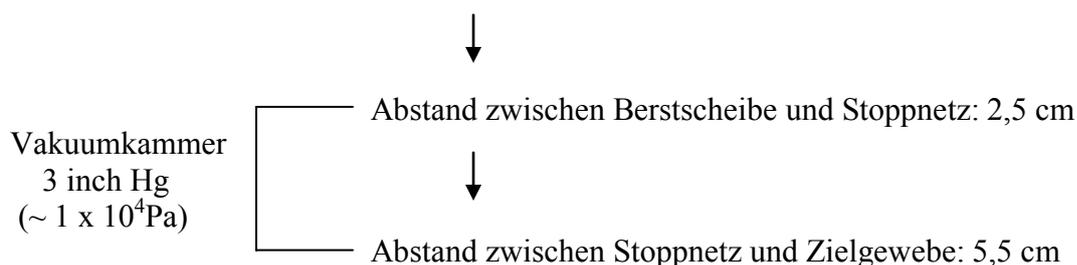
2.8 Pflanzentransformation

2.8.1 Biolistische Transformation

Um innerhalb von 1-2 Tagen zu Aussagen über Expressionsfähigkeit, -stärke und intrazelluläre Lokalisation von Genprodukten zu gelangen, wurde ein Transformationsverfahren eingesetzt, das auf ballistischem Wege Nukleinsäuren in die Pflanzenzelle transportiert, ohne diese zu zerstören (Russel et al., 1992). Realisiert wurde der Transformationserfolg durch Beschichtung von Goldpartikeln (0,4 bis 1,2 μ m Durchmesser) mit DNA (Beschichtungs- und Fällungsprotokoll siehe unten). Die beschichteten Goldpartikel wurden in einer *particle gun* unter Helium-Gasdruckentladung beschleunigt, durchliefen eine evakuierte Vakuumkammer und trafen auf die adaxiale Seite von Zwiebelschuppen-Segmenten von *Allium cepa*.

Geräte-/ Einstellungsparameter u. Anordnung:

Überdruckkammer: Zwischen Helium-Eintrittsventil und Berstscheibe



Die Eindringtiefe der Mikroprojekteile in das Gewebe wird einerseits durch das Vakuum (Verringerung des Luftwiderstandes) und andererseits durch den Überdruck vor der Berstscheibe bestimmt (Brettschneider, 1992). In dieser Arbeit wurden Berstscheiben mit einem Soll-Bruchdruck von 900 und 1100 psi gewählt.

Obwohl der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation schwer zugängliche Organismen häufig nur auf biolistischem Wege stabil transformiert werden können, wie z.B. Weizen (Altpeter et al., 1996), Knoblauch (Sawahel, 2002) u.a., wurde die Methode doch hauptsächlich für eine transiente Transformation und Genexpression eingesetzt.

Die in vorliegender Arbeit mit GFP (Chalfie et al., 1994) und GFP-Fusionskonstrukten transient transformierten Zwiebelchuppen-Epidermen wurden nach Beschuss auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen ü.N. unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der für die Etablierung der Expression des Fusionskonstruktes notwendigen Zeitspanne wurden die Zwiebelepidermen mit Skalpell und Pinzette abpräpariert, in Vierecke von 1 cm Kantenlänge geschnitten, zwischen befeuchteten Objektträger und Deckglas gegeben, und die Luft zwischen Epidermis und Glasoberfläche vorsichtig herausgedrückt.

Das Durchmustern der Epidermiszellen geschah bei 100-, 400- und 1000facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 35M) mit 488 nm Anregungswellenlänge (Filtersatz 15, Zeiss 487915). Bilder wurden per CCD-Kamera (XC003-LZI) aufgenommen und als *jpeg*-Format gespeichert.

Beschichtungs- u. Fällungsprotokoll

Vorbereitung der Goldpartikel:

Aufnahme von 50 mg Goldpartikel in 1ml Ethanol_{absolut} und 2 min vortexen. Es erfolgte Zentrifugation für 10 s bei Maximalumdrehung (Tischzentrifuge). Die Goldpartikel wurden dreimal mit Ethanol gewaschen und anschließend in 1 ml A. bidest aufgenommen. Der Ansatz wurde in 50 µl Aliquotierungen aufgeteilt und diese bei -20°C gelagert.

Fällungsansatz:

Zu 50 µl Partikelansatz wurden auf Eis 5 µl Plasmid-DNA (Konz.: 1 µg/µl), 50 µl CaCl₂ (2,5 M) und 20 µl Spermidin (0,1 M) gegeben und durch Vortexen gemischt. Nach Zentrifugation bei Maximalumdrehung (Tischzentrifuge) wurden die Goldpartikel in 250 µl Ethanol_{absolut}

resuspendiert und nach einer abschließenden Zentrifugation in die Endvolumina 60 µl oder 120 µl oder 240 µl aufgenommen. Unter gründlichem Resuspendieren der Endvolumina wurden je 3-5 µl des gut durchmischten Fällungsansatzes auf einen Makrocarrier (Kunststoffplättchen zwischen Berstscheibe und Stoppnetz) pipettiert. Nach Evaporation des Alkohols wurde der Makrocarrier in eine Fixiervorrichtung geschraubt, in die Particle gun eingesetzt und mit dem Beschuß gestartet.

2.8.2 Stabile Transformation

2.8.2.1 *Arabidopsis thaliana*:

Arabidopsispflanzen wurden nach zwei unterschiedlichen Protokollen transformiert. In beiden Fällen stellten die Infloreszenzen den Teil der Pflanze dar, der mit den Bakterien in Kontakt kommen mußte; das primäre Angriffs- u. Transformationsziel der Bakterien waren in beiden Fällen die Eizellen der Samenanlagen (Ye et al., 1999). Die Methode der Vakuuminfiltration nach Bechtold et al. (1993) ist apparativ aufwendiger und zeitraubend, liefert jedoch hohe Transformationsraten (bis 10 % aller keimfähigen Samen sind transgen). Schnell und ohne apparative Hilfsmittel demgegenüber ist das Verfahren des „*Floral dip*“ (Clough und Bent, 1998) durchführbar.

Vakuuminfiltration:

An 5-6 Wochen alten Arabidopsispflanzen wurden die Schoten der älteren Triebe 3 Tage vor Transformationsstart abgeschnitten und die Pflanzen einen Tag vor Beginn gut gewässert. Parallel wurden als Vorkulturen 30 ml Antibiotika-supplementierte YEP-Medien 3 Tage vor Transformationsbeginn mit Agrobakterien beimpft, und die Vorkulturen einen Tag vorher in jeweils 1 l Hauptkultur überführt. Inkubation von Vor- u. Hauptkulturen erfolgte bei 28°C und 160 upm. Am Transformationstag betrug die OD₆₀₀ der 1 l Hauptkultur 1-2. Die Bakterien wurden bei 3000 x g, 25min bei RT abzentrifugiert und in 330 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Die Infiltrationslösung wurde in je ein Weckglas eingefüllt (330ml /Glas) und jeweils ein Tontopf mit 3-4 Arabidopsispflanzen so auf das Weckglas gesetzt, daß die oberirdischen Pflanzenteile in die Bakterienlösung eintauchten. Topf und Weckglas wurden in einen Desikkator (Nalgene) gesetzt, der Desikkator wurde luftdicht verschlossen und über eine Öldruckpumpe solange Vakuum angelegt, bis die

Infiltrationslösung Luftblasen aufwarf (zwischen 100-150 hPa). Das Vakuum wurde 3 min gehalten, dann erfolgte der schnelle Druckausgleich. Die Pflanzen kamen anschließend zurück in die Klimakammer und wurden mit einer befeuchteten Haube überdeckt, um das Austrocknen der Bakterienlösung zu verhindern. Am nächsten Tag wurde der Verdunstungsschutz entfernt; die Pflanzen verblieben bis zur Abreife in der Klimakammer.

Floral Dip:

Ein Unterschied zur Vakuuminfiltration bestand in der Verwendung niedrigerer Volumina. So reichten 20 ml Infiltrationsmedium für die Behandlung von 3-4 Pflanzen aus. Eine weitere Differenz lag in der Auftragung der Bakterien auf die Pflanzenoberfläche. Mit einem Rauhborsten-Pinsel wurde die Bakterienlösung unter mechanischer Beschädigung der Pflanzenoberflächen auf die Arabidopsis-Rosette getippt. Diese Behandlung wurde alle 6 Tage wiederholt (insgesamt nicht mehr als 3 mal). Die Transformationsrate lag bei 1-2 % der gekeimten Samen.

Infiltrationsmedium

0,5 x Murashige & Skoog Salze

+ Gamborg B5 Vitamine = 2,2 g /l

5 % (w/v) Saccharose = 50 g /l

0,044 µM BAP (Stammlösung: 1mg/ml DMSO) = 10 µl (aus Stammlösung)/l

0,05 % (w/v) MES, pH 5,7 = 0,5 g /l

0,03 % (w/v) Silwet L-77 = 300 µl /l

2.8.2.2 Brassica napus:

Die Raps-Transformation an der Sorte Lisora wurde im Rahmen des BMBF-Projektes NAPUS 2000 von Herrn Dr. J. Orsini im Saatenunion- Resistenzlabor, Leopoldshöhe, durchgeführt.

2.8.2.3 Linum usitatissimum:

Die Transformation an *Linum usitatissimum* der Sorte Flanders (Dribnenki und Green, 1994) wurde nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (Voss, 2001) durchgeführt.

2.9 Isolierung von Plasmid-DNA

2.9.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse isoliert. Dazu wurde das Protokoll nach Sambrook *et al.* (1989) leicht modifiziert. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert und vollständig in 100 µl GET-Puffer (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 M NaOH + 1 % (w/v) SDS setzte die Lyse der Zellen ein und durfte für maximal 5 min fortschreiten. Daraufhin wurde der Ansatz mit 150 µl 5 M Kaliumacetat, pH 5, versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation (22000 x g, 10 min, RT) erfolgte die Trennung der Zelltrümmer vom plasmidhaltigen Überstand. Der Überstand wurde mit 1 ml Ethanol (abs.) gemischt und erneut 10 min zentrifugiert. Die so gefällte DNA wurde mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (22000 x g, 5 min, RT), luftgetrocknet und in 30 µl RNase A-haltigem (1 mg/ml) A. bidest. aufgenommen.

2.9.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurde das DNA-Extraktions-Kit NUCLEOBOND® AX 500 der Firma Machery-Nagel verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die isolierte, gefällte DNA wurde in 300-500 µl A. bidest. aufgenommen.

2.9.3 Präparation von low-copy Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*

Eine nach Walkerpeach und Velten (1994) veränderte Präparationsmethode liefert low-copy Plasmid-DNA für etwa 1-2 Restriktionsverdaue.

Eine 5 ml YEP-*Agrobacterium*-Flüssigkultur (Minipräparationsmaßstab; Antibiotika siehe unten) wurde sukzessive im 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (jeweils Maximalumdrehung, 3min), das Sediment in 300 µl Zell-Suspensionslösung aufgenommen, nach Zugabe von 60 µl Lysozymlösung (20 mg/ml) zum Andauen der Zellhülle der Ansatz gründlich resuspendiert und 25 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl Zell-Aufschlusslösung erfolgte eine kurze Durchmischung des Ansatzes, dann wurde 150 µl Phenol/Chloroform (Vol.-anteile 1:1) hinzuappliziert und der Ansatz gründlich gevortext.

Zur Neutralisation und Protein-Präzipitation kamen 600 µl Neutralisierungslösung zum Ansatz, der unter flockiger Ausfällung durchmischt wurde.

Nach 20minütiger Zentrifugation unter Maximalumdrehung bei RT wurde die obere Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, mit 2,5 Vol. Ethanol_{absolut} gründlich vermischt und zur schnellen DNA-Fällung 20 min bei -70°C gelagert. Eine erneute Sedimentation bei Maximalumdrehung, 4°C, für 30 min lieferte ein noch stark mit Phenol kontaminiertes DNA-Pellet, das dreimal mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 30 µl TE^{**} aufgenommen wurde. Für Restriktionsanalysen konnten bis zu 2 x 15 µl (meist > 1 µg low-copy Plasmid-DNA) eingesetzt werden.

<u>Zell-Suspensionslösung</u>	<u>Zell-Aufschlusslösung</u>	<u>Neutralisierungslösung</u>
50 mM Glukose	0,2 M NaOH	3 M Na-Acetat, pH 5,2
25 mM Tris-HCl, pH 8	1 % (w/v) SDS	
10 mM EDTA, pH 8		
<u>TE^{***}</u>		
10 mM Tris-HCl, pH 8		
0,1 mM EDTA, pH 8		

2.9.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

1-2 ml einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* in YPD wurden in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (22000 x g, 1 min, RT). Das Zellpellet wurde in 200 µl TENS-Puffer resuspendiert und mit ca. 700 mg sterilen Glasperlen (0,45-0,5 mm

Durchmesser) versetzt. Der Ansatz wurde 1 min gevortext, mit 200 µl Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) vermengt, erneut 1 min gevortext und schließlich 2 min zentrifugiert (22000 x g, RT). Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und in zwei weiteren Extraktionsschritten mit je 400 µl Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) bzw. Chloroform extrahiert. Die zuletzt gewonnene obere Phase wurde mit 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 ml Ethanol (abs.) versetzt, gemischt, und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (22000 x g, 30 min, 4°C) sedimentiert, mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (22000 x g, 5 min, 4°C), luftgetrocknet und in 10 µl A. dest. aufgenommen. Da so präparierte DNA für eine Restriktionsanalyse in zu geringer Menge und in einem zu geringen Reinheitsgrad vorlag, wurde sie für die Transformation von *E. coli* verwendet (siehe 2.5). Nach ihrer Isolierung aus dem Bakterium wurde sie restringiert und über ein Agarosegel analysiert.

<u>TENS-Puffer:</u>	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0
	0,1 % (w/v)	SDS

2.10 Isolierung genomischer DNA

2.10.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Escherichia coli*

Eine 1,5 ml ü.N.-Kultur wurde 3min bei Maximalumdrehung und RT sedimentiert, mit 1 ml TE-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 300 µl TE-Puffer unter Zugabe von 50 µl 10 % (w/v) SDS und 100 µl Proteinase K (2,5 mg/ml, frisch angesetzt) resuspendiert, gefolgt von einer Inkubation von 1h bei 37°C. Mit einer 2 ml-Spritze wurde die Bakterienlösung mehrfach aufgezogen um den Zellaufschluß zu unterstützen (Anstieg der Viskosität). Anschließend wurde 1 Vol. Phenol/Chloroform (50:50 v/v) zugesetzt und der

Extraktionsgang so oft wiederholt, bis kein Proteinrückstand mehr in der Interphase festzustellen war (dazwischen Zentrifugationen: Maximalumdrehung bei RT). Abschließend wurde der Phenolrest durch Ausschütteln des Ansatzes mit 1 Vol. Chloroform aus der wässrigen Ober- in die Chloroform-Unterphase entfernt, die Oberphase in ein neues Gefäß überführt, mit 2,5 Vol. Ethanol_{absolut} und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5 versetzt, der Fällungsansatz gemischt, 1 h bei -20°C inkubiert und bei 4°C und Maximalumdrehung 15 min sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde der DNA-Rückstand mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 μl TE oder A. bidest unter Zusatz von 10 μl RNase A (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aufgenommen.

TE

10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA, pH 8

2.10.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Hier wurde ein Aufschlussprotokoll verwendet, das auch bei der Gewinnung genomischer DNA aus *Pichia pastoris* hinreichend gute Ausbeute liefert und eine Modifikation der von Ausubel et al. (1995) publizierten Methode darstellt.

Aus einer 10-15 ml Übernachtkultur wurden durch 5minütige Zentrifugation bei $2000 \times g$ (RT) die Hefezellen sedimentiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellsediment mit A. bidest gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml Breaking-Puffer gründlich resuspendiert, mit 20 μl Zymolyase-Lösung (20 mg/ml) versetzt und 40 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300-350 mg Glasperlen (0,45-0,6mm Durchmesser) und 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, Vol.-anteile 25:24:1) hinzugefügt. Der Ansatz wurde 10 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Das Volumen der Lösung wurde mit 1ml TE angehoben und der Ansatz 10 min bei RT mit $2500 \times g$ zentrifugiert. Die Oberphase wurde in 600 μl -Portionen auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und so oft mit PCI extrahiert, bis keine Protein-Interphase mehr auftrat. Der Überstand wurde abschließend mit 0,1 Vol. 3 M Kaliumacetat, pH 5 und 2,5 Vol. Ethanol_{absolut} versetzt, durchmischt, 1 h bei -20°C inkubiert und 20 min, 4°C , bei Maximalumdrehung in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend

getrocknet und unter Zugabe von RNase A (40 µg/ml) in dem Endvolumen TE-Puffer oder A. bidest aufgenommen und bei -20°C gelagert.

<u>Breaking-Puffer</u>	<u>TE</u>
2 % (v/v) Triton X-100	10 mM Tris-HCl, pH 8
1 % (w/v) SDS	1 mM EDTA, pH 8
100 mM NaCl	
10 mM Tris-HCl, pH 8	
1 mM EDTA, pH 8	

2.10.3 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

Die Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Linum usitatissimum* erfolgte nach zwei Methoden. Beide Verfahren sind prinzipiell ähnlich gut geeignet zur Gewinnung größerer Mengen sauberer, genomischer DNA (30-200 µg), eignen sich aber nicht für alle pflanzlichen Organismen gleich gut. DNA-Extraktion aus Rapsblättern (besonders aus älteren) lieferte meist nur nach Abwandlung eines Protokolls von Dellaporta et al. (1983) genügend genomische DNA für Southern-Analysen. Meist jedoch wurde eine schnelle, im Hause gut etablierte Extraktionsmethode angewandt.

1. Protokoll (Abwandlung nach Dellaporta):

Bis zu 2 g Blattmaterial wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in der Schwingmühle zermahlen, in 50 ml-Falcon Gefäße überführt, 15 ml Extraktionspuffer zugesetzt, geschüttelt, 1 ml 20 % SDS zugegeben, abermals gut gemischt und die Extraktionsansätze für 10 min in einem 65°C Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml 5 M Kaliumacetat wurden die Ansätze erneut gemischt und

20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3500xg, 4°C, wurde der Überstand auf je 2 Falcongefäße verteilt, die Ansätze mit 0,9 Volumen Isopropanol (RT) versetzt und zur DNA-

Fällung 2 h bei -20°C inkubiert. Die genomische DNA wurde bei 3500xg, 4°C u. 30minütiger Zentrifugation sedimentiert, der Überstand anschließend abgegossen, das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen in 400 µl TE* vorsichtig resuspendiert und 2 h zum vollständigen RNA-Abbau bei RT inkubiert. Die Volumina je zwei gleicher Ansätze (~800 µl) wurden in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen vereinigt und dreimal mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Vol.-verhältnis: 25:24:1) extrahiert (gründlich gemixt und in Tischzentrifuge bei Maximalumdrehung zentrifugiert). Der Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5 sowie 1 Vol. Isopropanol durchmischt, 30 min auf Eis gestellt und anschließend 30 min, 4°C, bei Maximalumdrehung in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Nach erneutem Waschen mit 70 %igem Ethanol und kurzer Trocknung wurde die DNA in 100 µl TE oder A. bidest aufgenommen und stand für Restriktions- u. PCR-Anwendungen zur Verfügung.

<u>Extraktionspuffer</u>	<u>TE*</u>	<u>TE</u>
100 mM Tris-HCl, pH 8	50 mM Tris-HCl, pH 8	10 mM Tris-HCl, pH 8
50 mM EDTA, pH 8	10 mM EDTA, pH 8	1 mM EDTA, pH 8
500 mM NaCl	60 µg RNase A /ml TE*	
0,1 % (v/v) β- Mercaptoethanol		

2. Protokoll (Schnellverfahren):

Ca. 2 g Blattmaterial wurde in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in N₂ liq. schockgefroren, mit Stahlkugeln versehen per Schwingmühle aufgeschlossen und anschließend in 1ml Extraktionspuffer aufgenommen (Stahlkugeln wurden nach gründlicher Durchmischung wieder entfernt). Anschließend folgten 1-3 Extraktionen (bis keine Interphase mehr zu sehen war) mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (Vol.-anteile 25:24:1); nach gründlicher Durchmischung wurde zur Phasentrennung je 10 min, RT, bei Maximalumdrehung (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Anschließend wurden die Oberphasen in neue 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,5 und 0,9 Vol. Isopropanol versetzt, durchmischt und 10 min, 4°C, bei Maximalumdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl TE- Puffer/ A. bidest. aufgenommen.

<u>Extraktionspuffer</u>	<u>TE</u>
100 mM Tris-HCl, pH 8,5	10 mM Tris-HCl, pH 8
10 mM EDTA, pH 8,5	1 mM EDTA, pH 8
100 mM NaCl	40 µg RNase /ml TE
1 % (w/v) N-Lauryl-Sarcosin	

2.11 Isolierung von RNA aus Pflanzen

Bei der Isolierung von und beim Umgang mit RNA wurde versucht, die Kontamination mit RNase möglichst gering zu halten. Zudem wurden alle Arbeitsschritte rasch durchgeführt. Die Lösungen wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt (A. bidest, Natriumacetat) oder mit DEPC-behandeltem A. dest. angesetzt (SDS, Tris/HCl, EDTA, 70 % (v/v) Ethanol). Dazu wurden die Lösungen bzw. das A. dest. vor dem Autoklavieren mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Zudem wurden RNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Flaschen, Spatel, Mörser, Pistille und Rührfische wurden 6-8 h bei 180 °C gebacken. pH-Elektroden wurden 10 min mit 3 % H₂O₂ inkubiert und gründlich mit DEPC-behandeltem A. dest. gespült. Vor Wiederverwendung bereits benutzter Puffer, wurden diese in UV-permissiven Plastikgefäßen zweimal 10 min bei 0,6 J/cm² im UV-Crosslinker durch Bestrahlung autoklaviert.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial:

10-100 mg Blatt-, Wurzel-, Blütenmaterial bzw. Samen (11-13 DAF) wurden in vorgekühlte 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, mit einer Stahlkugel (0,5 cm Durchmesser) versehen und in N₂ liq. eingefroren. Die mechanische Zerkleinerung des Pflanzengewebes erfolgte in ebenfalls N₂ liq. -vorgekühlten Mahlbechern per Schwingmühle (1 min,

80 Umläufe/Sekunde). Das gemahlene Gewebe wurde in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen und zur RNA-Fällung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 30minütiger Abzentrifugation (22000 x g, 4 °C) wurde das Zellpellet mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet (RT) und in 1 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen. Die anschließenden Extraktionen erfolgten bei RT; die Zentrifugationen bei 4 °C (15 min). Zweimal wurde mit gleichem Volumen Phenol pH 7,6 extrahiert, anschließend mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, bis keine Verunreinigungen der Interphase mehr auftraten. Abschließend wurde zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 gründlich ausgeschüttelt, um Reste von Phenol zu entfernen.

Die letzte obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit jeweils 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,0 und 1,5 Volumen Ethanol (absolut) gründlich durchmischt und zur Fällung 2 Std bei ~ -20 °C im Gefrierschrank inkubiert.

Dem anschließenden Zentrifugationsschritt (30 min, 4 °C, 22000 x g) folgte die Aufnahme des jetzt transparenten Pellets in 0,5 ml 3 M Natriumacetat. Nach 1minütigem Vortexen und 10minütiger Zentrifugation (4 °C, 22000 x g) erfolgte ein letzter Waschschrift in 70 %igem Ethanol. Nach kurzer Lufttrocknung wurde das RNA-Pellet in 100 µl A. dest.

aufgenommen. Die RNA-Lsg wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt anschließend in die Reverse Transkription zur c-DNA eingesetzt.

Extraktionspuffer

8 M	Lithiumchlorid
2 % (v/v)	β - Mercaptoethanol

Solubilisierungspuffer

0,5 % (w/v)	SDS
100 mM	Natriumchlorid
25 mM	EDTA
10 mM	Tris-HCl, pH 7,6
2 % (v/v)	β - Mercaptoethanol

Isolierung von poly(A)-RNA:

Die Isolierung von mRNA erfolgte mit dem Oligotex Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Es wurde das *Batch Protocol* gewählt. Als Ausgangsmaterial diente zuvor isolierte Gesamt-RNA.

2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration genomischer DNA, Plasmid-DNA, Gesamt-RNA oder von gelösten Oligonukleotiden wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Extinktion der Probe bei 260 und 280 nm gemessen. $OD_{260} = 1$ entspricht etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA und 33 μg Oligonukleotid/ml (Sambrook et al., 1989). Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt den Grad der Verunreinigung durch Proteine an. Eine saubere DNA- oder RNA-Präparation sollte einen Quotienten von 1,8-2 aufweisen.

2.13 Synthese von cDNA

Für die Synthese von cDNA wurde die Stratascript Reverse Transcriptase (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.14 Klonierungsmethoden

2.14.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden die Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs verwendet. Dabei wurden die Enzyme in 5-10fachem Überschuss eingesetzt. 1 Unit ist definiert als Enzymmenge, die 1 µg DNA in einem 50 µl Ansatz in einer Stunde bei optimaler Temperatur vollständig schneidet. Analytische Restriktionsansätze wurden ca. 1 h bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Präparative Restriktionsansätze wurden mindestens 4 h, meist aber über Nacht inkubiert. Die Restriktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.16.1).

2.14.2 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Um einen hohen Ligationshintergrund durch religierte Vektoren, die zuvor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten worden waren, zu vermeiden, wurden die Vektoren mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, New England Biolabs) dephosphoryliert. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Anschließend wurde die DNA direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Elution Kit (Qiagen) gereinigt (siehe 2.16.3).

2.14.3 Ligation

Für Ligationen wurde die T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Für eine Ligation wurden 400 U T4 DNA-Ligase eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert, bevor er für die Transformation von *E. coli* eingesetzt wurde.

2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) wurden zwei unterschiedliche Enzyme verwendet. Die Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL) aus *Thermus aquaticus* wurde für die Amplifikation von genomischer oder cDNA mit degenerierten Primern verwendet. Aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität konnten die entstandenen PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T kloniert werden. Für alle weiteren Amplifikationen wurde die Pfu Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet, die über eine *proof reading*-Aktivität verfügt. Da sie keine terminale Transferase-Aktivität besitzt, wurden diese PCR-Produkte mit Hilfe des SureClone-Klonierungskits (Amersham Pharmacia) in den *Sma*I-geschnittenen Vektor pUC18 ligiert oder mit der Taq-DNA-Polymerase nachinkubiert (*Tailing*-Reaktion) und anschließend in den Vektor pGEM-T kloniert (pGEM-T-Klonierungskit, Promega).

2.15.1 Standardbedingungen

Standard Taq-PCR-Ansatz:

10-100 pg	DNA
5 µl	10 x PCR-Puffer
3 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
100 pmol	Primer 1
100 pmol	Primer 2
2,5 U	Taq-DNA-Polymerase
ad 50 µl	A. dest.

Standard Pfu Turbo-PCR-Ansatz:

10-50 ng	DNA
5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
100 pmol	Primer 1
100 pmol	Primer 2
5 U	VENT TM -DNA-Polymerase
ad 50 µl	A. dest.

Temperaturprofil:

	96 °C	3 min	
30 Zyklen		96 °C	30 sec
		T _m	30 – 45 sec
		72 °C	1 min für 1 kb zu amplifizierende DNA (Taq und Pfu Turbo)
			72 °C, 10 min; T _m = 55-62°C

2.15.2 *Hot start-PCR*

Um einen unspezifischen Hintergrund von PCR-Amplifikaten zu unterdrücken, wurde meistens eine *hot start-PCR* durchgeführt. Dabei erfolgt die Polymerasezugabe erst nach 2-5 minütiger Denaturierung des PCR-Ansatzes bei 95°C.

2.15.3 *Touch down-PCR*

Bei PCR-Primern mit sehr unterschiedlichen T_m -Werten wurde eine *touch down-PCR* durchgeführt, bei der die Hybridisierungstemperatur in jedem Zyklus um 0,1-0,5 °C verringert wurde.

2.15.4 *Tailing-Reaktion*

Nachinkubation eines Pfu PCR-Produktes mit der Taq-DNA-Polymerase:

50 µl	PCR-Ansatz
10 µl	10x PCR-Puffer + Mg ²⁺
10 U	Taq-DNA-Polymerase
ad 100 µl	A. dest.

Der Ansatz wurde 30 min bei 72 °C inkubiert.

Gewöhnlich wurden 10 µl des PCR-Ansatzes zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen. Sollten die Amplifikate direkt in einer Restriktion eingesetzt werden, so wurden sie zunächst mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Ansonsten erfolgte die Reinigung der PCR-Produkte nach Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.16.3).

2.15.5 Kolonie-PCR

Um eine große Anzahl *E.coli*-Klone gleichzeitig auf den Besitz des Plasmids mit dem gewünschten Transgen zu durchmustern und dabei das sehr zeitaufwendige Verfahren der Wiederanzucht, DNA-Minipräparation und Restriktionsanalyse einer großen Anzahl von Kolonien zu umgehen, wurde auf einen Massenuntersuchungs-Ansatz per PCR zurückgegriffen. Hierbei wurden mit Zahnstocherspitzen Bakterienkolonien auf der Transformations-Agarplatte angestochen, und die Zahnstocherspitzen dann je zuerst in ein PCR-Reaktionsgefäß und anschließend auf markierte Positions-Felder einer Beleg-Agarplatte getippt. Sukzessive wurden so Inokula in das gleiche PCR-Gefäß und auf neue

Positionsfelder überführt. Dieses Verfahren gewährleistet einerseits genügend Zellen für die PCR-Untersuchung und gestattet andererseits die Anzucht der Referenz-Kolonien auf den Belegplatten. Wichtig war die Überimpfung zuerst in das PCR-Gefäß, da im umgekehrten Fall die PCR-Reaktion durch Agarreste inhibiert wurde.

Prinzipiell sah das Standard-Cycler Programm aus w.o. beschrieben (→ 2.15.1), nur betrug der initiale Denaturierungsschritt zum Aufbrechen der Zellhülle 6 min, anschließend wurde Polymerase zugegeben (*hot start*).

Durch dieses Verfahren konnten Zellen von 10-20 *E.coli*-Kolonien in einem PCR-Gefäß untersucht werden – gleichzeitig bis zu 700 Kolonien auf 35 Reaktionsgefäße verteilt. Hinreichend gut funktioniert diese Methode auch bei *Saccharomyces cerevisiae* (8 min initiale Denaturierung, max. 10 Kolonien /PCR-Gefäß), nicht jedoch bei *Agrobacterium tumefaciens*.

2.15.6 Semiquantitative (RT) PCR

Um den Erfolg attenuativer Ansätze beim Absenken des Titers von Genprodukten über *gene silencing* skalierbar zu machen und eine Bewertung über den Erfolg der gewählten Ansätze treffen zu können, wurde ebenfalls auf ein PCR-Verfahren zurückgegriffen. Der Hauptgrund für den Vorzug gegenüber einer Quantifizierung via *Northern Blotting* bei *Arabidopsis-*

Samen lag einerseits in der geringen Menge transgener Saat, andererseits in ihrer äußerst geringen Masse begründet, sodaß der Einsatz von 0,1 g Samenmaterial zur Gewinnung der notwendigen mRNA Menge nach Verwoerd et al. (1989) nicht realisierbar war.

Zunächst wurden *Arabidopsis*-Samen zum Zeitpunkt hoher Promotoraktivität geerntet. Da Speicherprotein-Promotoren wie die der Napine in späteren Stadien der Samenentwicklung höchste Aktivität besitzen (Fernandez et al., 1991; Heath et al., 1986; Higgins, 1984), wurden Pflanzen mit unter Napinpromotor-Kontrolle exprimiertem Transgen nach Singh et al., 2001, 10 Tage nach Blühbeginn beerntet, einem RNA-Aufschluß (siehe 2.11) unterworfen und die mRNA-Proben revers transkribiert zu c-DNA (siehe 2.13). Die c-DNA wurde als *Template* in die PCR eingesetzt.

Das Design der Primerpaare (Anhang D) wurde so gewählt, daß der in Vorwärtsrichtung bindende Primer (= *Forward Primer*, hat Sequenz des *leading strands*, bindet am *lagging strand*) in einer Spleißstelle lag und dessen 6-9 Nukleotide am 3`-Ende ($T_m = 18-28^\circ\text{C}$) sich hinter der Spleißstelle im in Polymerisationsrichtung angeordneten Exon befanden. Durch dieses Design wurde die Amplifikation der Zielsequenz von genomischer DNA als *Template* ausgeschlossen (s. Anhang C).

Als interner Kalibrierungs- u. Referenzstandard für Expressionsstudien an *Arabidopsis* wurde das 40S ribosomale Protein S18 (RPS18B) gewählt (Chrom.-locus: At1g34030), da die Expressionstärke anderer häufig benutzter Haushaltsgene als interne Standards nach jüngeren Studien (Volkov et al., 2003 und Martzivanou und Hampp, 2003) z.T. erheblich von äußeren Einflüssen abhängt. Die Primer von Referenz- und Untersuchungsobjekt wurden in demselben PCR-Gefäß in die Amplifikation eingesetzt, PCR-Ansätze nach 17, 20, 23, 26, 29, 32 und 35 Zyklen herausgenommen und anschließend gelelektrophoretisch in 3,5 % low-melt small-DNA-Agarose (Biozym) aufgetrennt (S18-Amplifikat = 318 bp; Amplifikat des zu untersuchenden Gens = 260 bp). Um die Amplifikate unter UV quantifizieren zu können, wurde den PCR-Ansätzen vor der Gelauftragung mit Sybr Green vermischter Blaumarker zugesetzt (40 µl Blaumarker + 20 µl Sybr Green (1:100 verd. Stammlsg.)).

Die Gelauswertung erfolgte durch ein Digitalkamera-unterstütztes Visualisierungssystem (MultiImage™ Light Cabinet, Alpha Innotech) mit der „spot density- Integration“-Funktion der AlphaDigiDoc™ System 1000 Software. Aus den hier erhaltenen dimensionslosen Werten der Fluoreszenz-Emissionsintensität wurden mit dem Kalkulationsprogramm Microcal Origin 5.0 – unter Annahme hyperboloid/sigmoidalen Funktionsverlaufes – EC_{50} -Kennwerte ermittelt. Diese Kennwerte bezeichnen die PCR-Zyklenzahl zum Zeitpunkt

halbmaximaler Fluoreszenz-Emissionsintensität und erlauben einen direkten, quantifizierenden Vergleich zwischen Referenzgen-Amplifikat und Untersuchunggen-Amplifikat. Die Beziehung, welche diesen Vergleich erlaubt, wurde aus der Formel für PCR-Vervielfältigung abgeleitet: $Z \times 2^m$ (Z = Anzahl der Templatemoleküle; m = Anzahl der PCR-Zyklen). Nach Gleichsetzung und Umformung ergibt sich:

$$Z_{\text{Referenzgen}} / Z_{\text{Untersuchunggen}} = 2^{m_{\text{Untersuchunggen}}} / 2^{m_{\text{Referenzgen}}}$$

wobei für den Exponenten m die EC_{50} -Werte eingesetzt wurden. Zur statistischen Grundabsicherung der EC_{50} -Werte, wurde mit $n = 5$ Parallelansätzen gearbeitet.

Semi-Q PCR-Ansatz:		PCR-Temperaturprofil:	
1,5 µl	c-DNA	95°C	3 min
5 µl	10 x PCR-Puffer + Mg ²⁺	X Zyklen {	95°C 45 sek.
1,5 µl	dNTPs (10 mM)		59°C 40 sek.
2 x 1 µl	Primerpaar Ref.-gen (je 10 µM)		72°C 30 sek
2 x 1 µl	Primerpaar Unt.-gen (je 10 µM)	X = 17,20,23, ...35	
2,5 U	Taq-DNA-Polymerase		
ad 50 µl	A. dest.		

2.15.7 Assembly-/Overlap-PCR

Bei der *Overlap*-PCR zur Herstellung eines chimären Konstruktes aus zwei DNA-Fragmenten wurden zunächst die zu fusionierenden Fragmente durch eine PCR wie in Kapitel 2.15.1 mit der Pfu Turbo-Polymerase amplifiziert. Dabei wurden die Primer so konstruiert, dass das 3'-Ende des vorderen DNA-Fragmentes eine 26 bp lange Sequenzübereinstimmung mit dem 5'-Ende des hinteren DNA-Fragmentes, und das 5'-Ende des hinteren Fragmentes eine 26 bp lange Übereinstimmung mit dem 3'-Ende des vorderen Fragmentes aufwies. Anschließend wurden jeweils 1 µl der ungereinigten PCR-Ansätze als Matrize in einer weiteren PCR eingesetzt, bei der die ersten 10 PCR-Zyklen ohne Primer abliefen. Dies sollte die Hybridisierung der komplementären Überhänge und die Synthese der fehlenden Sequenz des jeweiligen Fragmentes durch die Pfu Turbo-Polymerase erlauben. Nach den 10 Zyklen wurden das Primerpaar zur Amplifikation des fusionierten Fragmentes hinzugefügt und die PCR-Reaktion für weitere 30 Zyklen fortgesetzt.

2.16 Agarose-Gelelektrophorese

2.16.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Restriktionsansätzen, PCR-Produkten und genomischer DNA wurden 0,7 %ige bis 1 %ige Agarosegele in 1 x TBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) verwendet. Als Probenpuffer diente 1 x GL (50 % (w/v) Glycerin;

0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanolblau; 0,5 x TBE). Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Kammer bei 80-100 V und 40-100 mA in 1 x TBE. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde entweder dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt (3 µg/100 ml Gel), oder die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SYBR[®] Green I (Molecular Probes, Leiden) inkubiert. Dazu wurde eine 100fache Stocklösung des SYBR[®] Green I 1:6 in 6 x GL-Puffer verdünnt. 2 µl dieses GL-Puffers wurden mit 10 µl DNA-Proben vermischt und 10 min bei RT inkubiert, bevor der Ansatz auf das Gel aufgetragen wurde. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem Transilluminator (UV-Peak bei 302 nm) sichtbar gemacht und mit der AlphaDigiDoc[™] System 1000 Software analysiert.

2.16.2 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Zur kurzen Analyse der RNA wurden 1,2-1,5 %ige Agarosegele in 1 x TBE angesetzt. Elektrophoresekammer, Gelträger und Kämme wurden zuvor 10 min mit 3 %igem H₂O₂ inkubiert und anschließend sorgfältig mit DEPC-behandeltem A. bidest. abgespült. Die RNA-Proben wurden mit je 1 µl Ethidiumbromid (1 µg/µl) versetzt. Als Probenpuffer diente 1 x GL (siehe 2.16.1).

2.16.3 Elution aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Reinigung von PCR-Produkten oder restringierten DNA-Molekülen wurden diese nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert, oder sie wurden direkt nach der Reaktion mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.17 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nicht-radioaktiv nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Sie beruht auf der Verwendung von Didesoxynukleotiden, die aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe bei einer DNA-Polymerase-Reaktion zum Kettenabbruch führen. Es wurde eine "Cycle Sequencing"-Methode verwendet, bei der der zu sequenzierende Bereich in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird. Die Reaktion wurde mit dem "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit" der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Die Didesoxynukleotide sind hierbei mit einem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert.

<u>Reaktionsansatz:</u>	0,5-1 µg	DNA-Matrize
	3 µl	BDT <i>Ready Reaction Mix</i>
	7 µl	<i>half term</i> -Puffer
	15 pmol	Sequenzierungsprimer
	ad 20 µl	A. dest.

Optional wurde dem Ansatz 1 µl 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt.

<u>Temperaturprofil:</u>	2 min	96 °C
	25 Zyklen	30 sec
		25 sec
		47-60 °C
		4 min
		60 °C

Anschließend wurde der Ansatz mit 35 µl Ethanol (abs.) gefällt und die DNA durch Zentrifugation (20 min, 20000 x g, RT) sedimentiert. Die DNA wurde luftgetrocknet und bis zur gelelektrophoretischen Analyse bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte mit dem "ABI

Prism 377 DNA Sequencer" (Applied Biosystems, Weiterstadt) in der Arbeitsgruppe Wienand oder über Auftragsdienst am Universitätsklinikum Eppendorf.

2.18 Computer-gestützte Auswertung von Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte am PC mit Hilfe folgender Programme:

CHROMAS 1.4.3 <http://trishil.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>

Editierung von Sequenzdaten anhand ihres "Peakmasters"

CLUSTAL (X 1.81)

und GENEDOC Higgins & Sharp, 1988, Alignments von Sequenzen

BLAST Altschul *et al.*, 1990

Sequenzvergleiche mit Sequenzen der "GenBank" von NCBI (National Center of Biotechnology Information)

CLONE Clone Manager for Windows, Version 4.1, 1995-1996, Scientific & Educational Software) *In silico*-Klonierungen

TIGR www.tigr.org Ermittlung von Arabidopsis-Gensequenzen, Primerbindestellen, Intron- u. Exonbereichen sowie Spleißstellen

Die Analyse von Proteinen erfolgte im Internet mit folgenden Programmen:

PSORT <http://psort.nibb.ac.jp/> (Nakai & Kanehisa, 1992)

Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen

TMHMM 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> (Krogh *et al.*, 2001)

Vorhersage der Topologie von Membranproteinen

Sekundär- u. Tertiärstrukturvorhersagen: <http://www.expasy.ch>

2.19 Southern Blot-Analyse

2.19.1 Restriktion genomischer DNA

Je 15-25 µg genomische DNA aus Blättern von *A. thaliana* oder *B. napus* wurden mit 50-100 Units verschiedener Restriktionsenzyme für 20 h bei optimaler Temperatur geschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über Nacht in einem 1 %igen TAE-Agarosegel getrennt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde unter dem UV-Transilluminator überprüft, die Laufweite des verwendeten Markers mit einem Lineal festgestellt und durch den Photoprinter dokumentiert.

<u>TAE (50x):</u>	242 g	Tris-Base
	51,7 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA
	ad 1 l	A. bidest.

2.19.2 DNA-Transfer auf Nylonmembranen

Der Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine NX-Nylonmembran (Pharmacia) erfolgte durch einen Kapillarblot nach Sambrook *et al.* (1989). Die Schritte sind im einzelnen unten beschrieben.

1. Inkubation des Gels für 8 min in 250 mM HCl, um die DNA zu depurinieren
2. 1 min Spülen des Gels in A. dest.
3. 30 min Inkubation des Gels in Denaturierungslösung bei RT
4. 1 min Spülen des Gels in A. dest.
5. 2 x 15 min Inkubation des Gels in Neutralisierungslösung
6. Äquilibration des Gels in 20 x SSC

Anschließend wurde ein Kapillarblot aus folgenden Schichten aufgebaut (von unten nach oben):

1. eine Lage Whatman-3M-Papier, dessen Enden in 20 x SSC tauchen
2. das Gel mit der Oberseite auf dem Whatman-Papier
3. die Nylon-Membran
4. 3 Lagen Whatman-Papier
5. 10-20 cm Zellstoffpapier
6. eine Glasplatte mit einem leichten Gewicht

Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht bei RT. Die DNA wurde am nächsten Tag durch UV-Crosslinken mit $2 \times 0,12 \text{ J/cm}^2$ fixiert. Daraufhin wurde die Membran kurz mit A. bidest. gewaschen und in die Prähybridisierung eingesetzt.

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH
 1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris/HCl pH 7,5
 3 M NaCl

20 x SSC: 3 M NaCl
 300 mM Natriumcitrat
 pH 7,0

2.19.3 Herstellung von DNA-Sonden

Die DNA-Sonden wurden mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Als Matrize für die PCR wurde ein mit den gleichen Primern amplifiziertes, gereinigtes DNA-Fragment verwendet.

2.19.4 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschung

Die Membran wurde zunächst in 20 ml der Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb (Roche) prähybridisiert. Dazu wurde sie für mindestens 2 h im Hybridisierungsofen bei 42 °C inkubiert.

Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über Nacht im Hybridisierungsofen. Bevor die Sonde zur DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung gegeben wurde, wurde sie 10 min bei 100 °C denaturiert. Für eine Membran wurden 4 ml Hybridisierungslösung mit einer Sondenkonzentration von ca. 25 ng/µl verwendet. Die verdünnte Sonde wurde nach Gebrauch bei -20 °C gelagert und vor der nächsten Verwendung 10 min bei 68 °C denaturiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT mit 100ml 2 x Waschlösung unter leichtem Schwenken gewaschen. Dazu wurde die Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen genommen und in eine Schale überführt. Es folgten zwei stringente Waschschrte für je 15 min bei 68 °C im Hybridisierungsofen in 100 ml 0,5 x Waschlösung.

2 x Waschlösung: 2 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS

0,5 x Waschlösung: 0,5 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS

2.19.5 Detektion

Die Membran wurde nach den stringenten Waschschrten kurz in Maleinsäurepuffer äquilibriert und dann 60 min unter leichtem Schütteln bei RT in 50 ml 2 x Blocking-Lösung (Roche) inkubiert, um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzudecken. Danach wurde die Membran 30 min bei RT und unter leichtem Schwenken mit 50 ml Antikörperlösung inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zwei 15minütige Waschschrte bei RT in Maleinsäurepuffer abgewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran kurz in Detektionspuffer äquilibriert und danach 10 min bei 37 °C im Hybridisierungsofen mit einer CSPD[®]-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in Folie eingeschweißt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch Belichtung eines Films (HYPERFILM[™], 18 x 24 cm, Amersham Pharmacia Biotech), der, je nach Signalstärke, 30 min bis 48 h auf die Membran aufgelegt wurde. Die Entwicklung des Filmes erfolgte maschinell.

<u>Maleinsäurepuffer:</u>	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5 (mit NaOH-Plätzchen)
<u>10 x Blocking-Lösung:</u>	10 % (w/v) Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer
<u>Antikörperlösung:</u>	20 µl Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragment konjugiert mit alkalischer Phosphatase, 750 units/ml) in 200 ml 2 x Blocking-Lösung
<u>Detektionspuffer:</u>	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl
<u>CSPD[®]-Lösung:</u>	2 µl 25 mM 3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat, Dinatriumsalz in 2 ml Detektionslösung

2.20 Expression in Hefe

2.20.1 Klonierung rekombinanter Hefepasmide

Für die Expression in Hefe wurden von genomischer DNA u. cDNA die offenen Leserahmen mit der Pfu Turbo-Polymerase durch PCR amplifiziert und in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen) kloniert. Die verwendeten Primer enthielten Restriktionsschnittstellen, um eine gerichtete Klonierung der Amplifikate in die multiple Klonierungsstelle des Vektors zu erlauben. Zudem enthielten sie vor dem Startcodon zumeist eine Hefe-spezifische Konsensussequenz zur verstärkten Translation (Donahue & Cigan, 1990). Die Amplifikate wurden entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, anschließend restringiert und dann nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert, oder sie wurden nach der PCR mit der Taq-Polymerase inkubiert und anschließend aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden in den ebenfalls geschnittenen Expressionsvektor pYES2 ligiert. Ungeschnittene Amplifikate wurden zunächst in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert und anschließend mit den entsprechenden Enzymen herausgeschnitten, in einem präparativen

Agarosegel von pGEM-T getrennt und nach Elution in den entsprechend geschnittenen Vektor pYES2 ligiert. *E. coli* XL1 Blue MRF' wurde mit den Ligationsansätzen transformiert und anhand der erworbenen Ampicillin-Resistenz selektioniert. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert. Anschließend wurden die Plasmide aus den Bakterienzellen isoliert und zur Transformation von *S. cerevisiae* 334/ YS18 eingesetzt. Zur Kontrolle der Transformation wurden die Plasmide wieder aus den Hefezellen isoliert, für die Transformation von *E. coli* eingesetzt, aus dem Bakterium isoliert und sequenziert.

Tabelle 1: Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in Hefe

Gen-Name und Herkunft	Vektor und Hefestamm	Konstruktnamen und Expressionstyp	Referenz → Genbank-Nr.
Cytochrom b ₅ (CB₅) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pYES2 in YS18	pCb ₅ Einfachexpression	Vergères und Waskell, 1992 → D13205
Cytochrom b ₅ -Membrananker (CB₅MA , 43 Aminosäuren) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pYES2 in SC334	pCb ₅ MA Einfachexpression	Vergères und Waskell, 1992 → D13205
Cytochrom b ₅ -Membrananker (CB₅MA) aus <i>Rattus norvegicus</i> am C-Terminus von Green Fluorescent Protein (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i>	pYES2 in SC334	Fusionskonstrukt: pGFP-Cb ₅ MA Einfachexpression	Vergères und Waskell, 1992 → D13205 + Variante nach Chalfie et al., 1994 → L29345
Cytochrom b ₅ -Membrananker (CB₅MA) aus <i>Rattus norvegicus</i> am C-Terminus der prozessiven β-Glukosyltransferase (DGDS) aus <i>Staphylococcus aureus</i>	pYES2 in YS18	Fusionskonstrukt: pDGDSMA Einfachexpression	Vergères und Waskell, 1992 → D13205 und Jorasch, et al., 2000 → Y14370
3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG1) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pJR59 in JRY1239	pHmg1 Einfachexpression	Basson et al., 1986 → M22002
Phosphatidylcholin-Synthase (PCS) aus <i>Sinorhizobium meliloti</i>	pYES2 in YS18	pPCS1 Einfachexpression	Sohlenkamp et al., 2000 → AF155772
Delta 6-Desaturase (Δ6) aus <i>Phaeodactylum tricoratum</i>	pYES2 in YS18	pΔ6 Einfachexpression	Domergue et al., 2002 → AY082393

Prozessive β -Glukosyltransferase (DGDS) aus <i>Staphylococcus aureus</i>	pYES2 in YS18	pDGDS Einfachexpression	Jorasch, et al., 2000 → Y14370
β GalD-Synthase (MGDS) aus <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	pYES2 in YS18	pMGDS Einfachexpression	Hölzl et al., 2005
NADPH-Cytochrom P ₄₅₀ -Oxidoreduktase (CPR) und Cytochrom P ₄₅₀ - Isoform 1 (CM1) aus <i>Candida maltosa</i>	pYEP51 in YS18	Doppelkonstrukt: pCm1CPR Koexpression	CPR=Kärgel et al., 1996 → X76226 Cm1=Schunck et al., 1991 → X51931
NADPH-Cytochrom P ₄₅₀ -Oxidoreduktase (CPR) und Cytochrom P ₄₅₀ - Isoform 1 (CM1) aus <i>Candida maltosa</i> mit Phosphatidylcholin Synthasegen (PCS) aus <i>Sinorhizobium meliloti</i>	pYEP51 und pYES2 in YS18	Dreifachkonstrukt: pCm1CPRPCS Tripelexpression	
NADPH-Cytochrom P ₄₅₀ Oxidoreduktase (CPR) und Cytochrom P ₄₅₀ - Isoform 1 (CM1) aus <i>Candida maltosa</i> mit Delta 6-Desaturase (Δ6) aus <i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	pYEP51 und pYES2 in YS18	Dreifachkonstrukt: pCm1CPR Δ 6 Tripelexpression	
NADPH-Cytochrom P ₄₅₀ -Oxidoreduktase (CPR) und Cytochrom P ₄₅₀ - Isoform 1 (CM1) aus <i>Candida maltosa</i> mit prozessiver β -Glukosyltransferase (DGDS) aus <i>Staphylococcus aureus</i>	pYEP51 und pYES2 in YS18	Dreifachkonstrukt: pCm1CPRDGDS Tripelexpression	
NADPH-Cytochrom P ₄₅₀ -Oxidoreduktase (CPR) und Cytochrom P ₄₅₀ - Isoform 1 (CM1) aus <i>Candida maltosa</i> mit β GalD-Synthase (MGDS) aus <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	pYEP51 und pYES2 in YS18	Dreifachkonstrukt: pCm1CPRMGDS Tripelexpression	

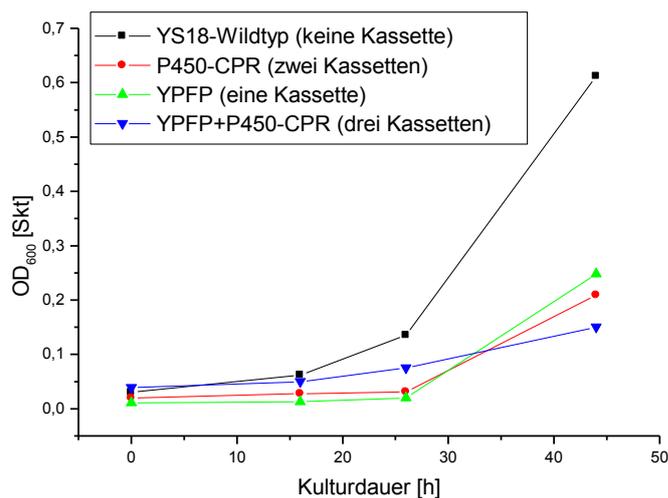
2.20.2 Heterologe Ko-Expression von Doppel- u. Dreifachkonstrukten in Hefe

Die Expression mehrerer konzentriert induzierter, heterologer Gene erfolgte in *S. cerevisiae*, Stamm YS18, der neben dem zur Selektion plasmidhaltiger Zellen gebräuchlichen Uracil-Synthesedefekt zusätzlich auch Leucin und Histidin-Synthesedefizienz besitzt. Der Stamm hat außerdem eine Deletion des *REG1*-Gens, das für den Glukose-induzierten P_{GAL} -Repressor kodiert. Dieser Repressor wirkt auf den im Hefe-Expressionsplasmid verwendeten Promotor P_{GALI} . Dennoch wurde bei Expressionen im Stamm YS18 auf die Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle verzichtet, da eine Repression des P_{GALI} -Promotors noch durch weitere Faktoren vermittelt wird (Lohr *et al.*, 1995). In Vergleichen mit SC334 u.a. Hefestämmen proliferierte YS18 in weit größerem Umfang Endomembranen bei Expression derselben Gene und wurde daher bevorzugt.

Für die Expressionen wurden 3-5 ml CMdum-Medium mit einer Vorkultur, die zwei Tage bei 30 °C inkubierte (180 rpm), zu einer $OD_{600}=0,03$ angeimpft und für 6 h bei 30 °C inkubiert (180 rpm). Anschließend erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 2 % (w/v) Galaktose. Zum gleichen Zeitpunkt wurde in die $\Delta 6$ -exprimierenden Kulturen (siehe Tabelle 1) 250 μ M 18:2 ^{$\Delta 9,12$} hinzugegeben, da Linolsäure nicht von den Hefen synthetisiert werden kann.

Die Kulturen wurden durch Zentrifugation (4000g, 5 min, RT) geerntet. Nicht inkorporierte Fettsäuren wurden durch zweifaches Waschen mit 5 ml 100 mM $NaHCO_3$ entfernt. Die gesäuberten Zellsedimente wurden direkt zur Derivatisierung der Fettsäuren für die Gaschromatographie eingesetzt.

Die in der Arbeitsgruppe bei Mehrfachkassetensystemen häufig beobachtete „Stillegung“ der eingeführten heterologen Konstrukte korrelierte recht genau mit einer Annäherung des Wachstumsverhaltens an den Wildtyp, wurde durch regelmäßige Probennahme und photometrische Messung jedoch frühzeitig erfaßt und die Kulturen verworfen. Weiterverarbeitet wurden all jene Ansätze, deren OD_{600} Zunahme in umgekehrtem Verhältnis zur Expressionskassetten-Anzahl stand (siehe Graphik unten).



2.21 Expression in Pflanzen

2.21.1 Klonierung von Konstrukten zur Pflanzentransformation

Für samenspezifische Expression in Sense- und Antisense-Orientierung *in planta* wurden von genomischen DNA- u. cDNA-Vorlagen die offenen Leserahmen mit der Pfu Turbo-Polymerase durch PCR amplifiziert und entsprechend der Schnittstelleneignung in verschiedene Zwischenvektoren (pBSIIK, pUC18/19, pGEM-T und pYES2) subkloniert. Die verwendeten Primer enthielten Restriktionsschnittstellen, um eine gerichtete Klonierung der Amplifikate in die multiple Klonierungsstelle des geeigneten Vektors zu erlauben. Die Amplifikate wurden entweder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, anschließend restringiert und dann nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert und in einen der geschnittenen Zwischenvektoren ligiert, oder sie wurden nach der PCR mit der Taq-Polymerase inkubiert, anschließend aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert und in den Klonierungsvektor pGEM-T ligiert. In diesen Zwischenvektoren erfolgte auch die Sequenzierung der PCR-Amplifikate.

Nach Sequenzüberprüfung, Vermehrung in *E. coli* und Extraktion erfolgte die erneute Restriktion der Amplifikate und Klonierung in entsprechend geschnittene Vektoren, die geeignete Pflanzenexpressionskassetten enthielten (siehe 2.3.3.1). Nach erneuter Vermehrung

und Extraktion wurden die Expressionskassetten ausgeschnitten und in die binären Pflanzentransformationsvektoren pCAMBIA oder pPZP111 kloniert. Mit diesen wurde schließlich *Agrobacterium tumefaciens* transformiert.

Die Inverted-Repeat Hairpin Antisense-Konstrukte wurden jedoch wie in 2.15.7 beschrieben per PCR zusammengesetzt. Als DNA-Sequenz zwischen den beiden gleichen, zueinander gegensinnig und komplementär angeordneten 5'UTR-Abschnitten wurden Intronsequenzen desselben Gens kloniert.

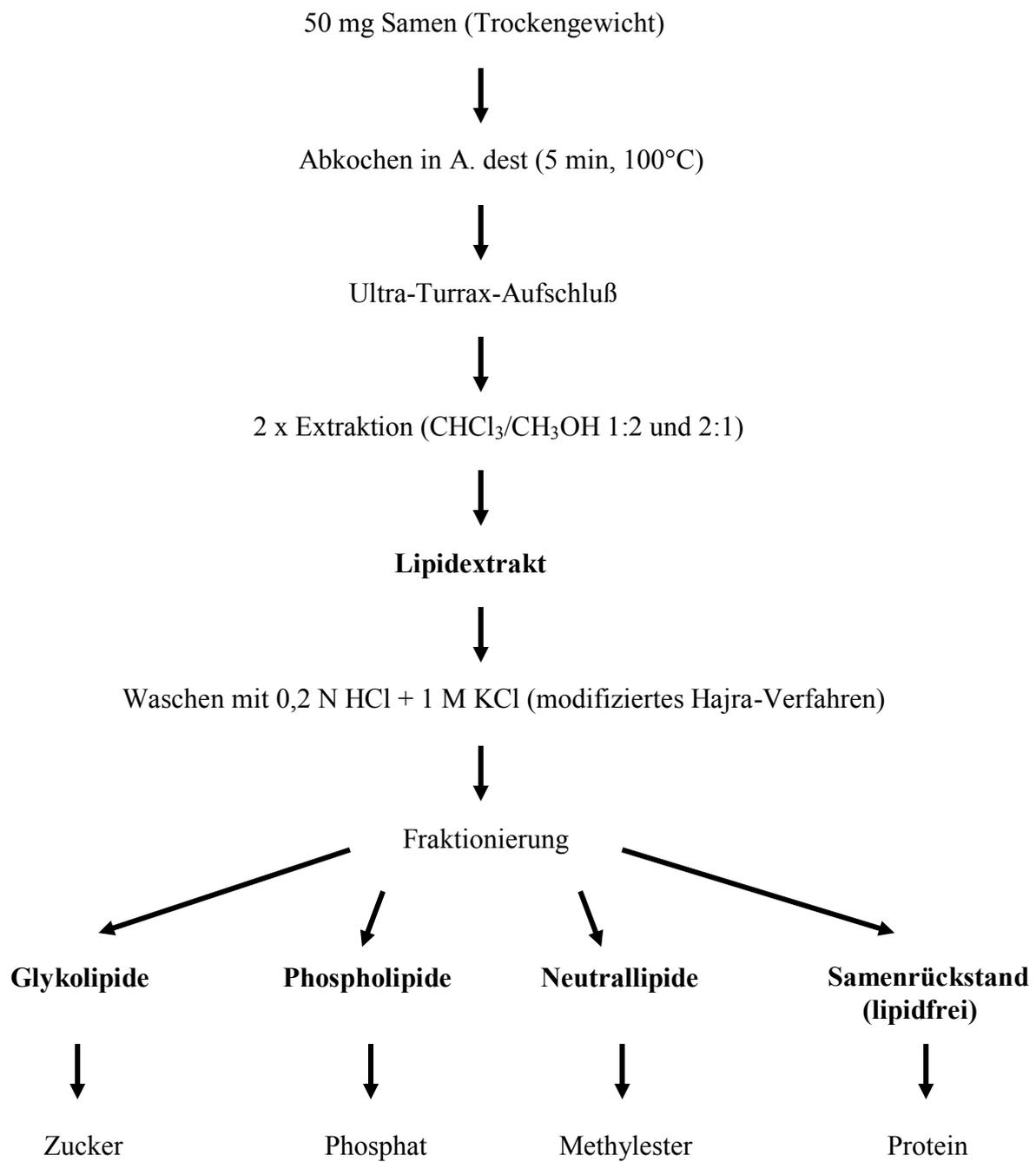
Die Selektion der transgenen *E. coli* XL1 Blue MRF' – Zwischenwirte erfolgte anhand der erworbenen Ampicillin-Resistenz. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert.

Tabelle 2: Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in Pflanzen

Gen-Name und Herkunft	Vektor und Pflanze	Konstruktname Promotor Selektion Expressionstyp	Referenz → Genbank-Nr.
Cytochrom b ₅ (CB₅) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pPZP111 in <i>Brassica napus</i>	pCb ₅ LeB ₄ NptII Sense-Expression	Vergères und Waskell, 1992 → BC086945
Cytochrom b ₅ -Membrananker (CB₅MA , 43 Aminosäuren) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pPZP111 in <i>Brassica napus</i>	pCb ₅ MA LeB ₄ NptII Sense-Expression	Vergères und Waskell, 1992 → BC086945
Cytochrom b ₅ -Membrananker (CB₅MA) aus <i>Rattus norvegicus</i> am C-Terminus von Green Fluorescent Protein (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i>	pCAT <i>Allium cepa</i> (Zwiebel- epidermen)	pCATGFPMA Doppelter 35S keine Transiente Sense- Expression	Vergères und Waskell, 1992 → BC086945 und Fulda et al., 2002
Diacylglycerol-Kinase (DAGK) aus <i>Escherichia coli</i>	pCAMBIA <i>A. thaliana</i> <i>B. napus</i>	pCAMDagK USP NptII Sense-Expression	Lightner et al., 1983 → K00127

Mid1 (MID1) aus <i>S. pombe</i> (auch DMF1)	pCAMBIA <i>A. thaliana</i> <i>L. usitatissimum</i> <i>B. napus</i>	pCAMMid USP-Promotor NptII Sense-Expression	Sohrmann et al., 1996 → Y07599
Cytochrom P ₄₅₀ - Reduktase (CPR) aus <i>Candida maltosa</i>	pPZP111 <i>A. thaliana</i> <i>L. usitatissimum</i> <i>B. napus</i>	pPZPCPR USP NptII Sense-Expression	Kärgel et al., 1996 → X76226
Cytochrom P ₄₅₀ Isoform1 (CM1) aus <i>Candida maltosa</i>	pPZP111 <i>A. thaliana</i> <i>B. napus</i>	pPZPCm1 USP NptII Sense-Expression	Schunck et al., 1991 → X51931
Peroxisomales Im-/Exportprotein 15 (PEX15) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pCAMBIA <i>A. thaliana</i> <i>B. napus</i>	pCAMPex USP NptII Sense-Expression	Elgersma et al., 1997 → Z74786/ YOLO44W
Cytochrom b ₅ (BOCB₅) aus <i>Brassica oleracea</i>	pMS1 * <i>A. thaliana</i> <i>B. napus</i> (Hanna)	pBoCb ₅ Napin A ** Spectinomycin Antisense-Expression	→ M87514 * Schröder-Pontoppidan et al., 2000 ** Ellerström et al., 1996
Cytochrom b ₅ 53560 (CB₅535) aus <i>A. thaliana</i>	pPZP111 <i>A. thaliana</i>	pPZP535 Napin NptII Inverted-repeat (IR) Hairpin Antisense- Expression	www.tigr.org → At5g53560
Cytochrom b ₅ 48810 (CB₅488) aus <i>A. thaliana</i>	pPZP111 <i>A. thaliana</i>	pPZP488 Napin NptII Antisense-Expression	www.tigr.org → At5g48810
Cytochrom b ₅ 32720 (CB₅327) aus <i>A. thaliana</i>	pPZP111 <i>A. thaliana</i>	pPZP327 Napin NptII IR Hairpin Antisense- Expression	www.tigr.org → At2g32720
Cytochrom b ₅ 26340 (CB₅263) aus <i>A. thaliana</i>	pPZP111 <i>A. thaliana</i>	pPZP263 Napin NptII Antisense-Expression	www.tigr.org → At1g26340

2.22

Lipidanalytik**Schema 1: Lipidanalyse von Pflanzensamen****- Arbeitsgang im Überblick -**

2.22.1 Isolierung der Gesamtlipide aus Hefe und Pflanzen

Hefesedimente von 100 ml- und 200 ml-Kulturen und 50 mg Pflanzensaat wurden 10 min in 0,45 % (w/v) NaCl bei 100 °C erhitzt, um Lipasen zu inaktivieren. Die Hefen wurden abzentrifugiert (4000 g, 5 min, RT), die Saaten mechanisch via Ultra-Turrax aufgeschlossen. Hefesedimente u. Saatenaufschlüsse wurden mit 8 ml Chloroform/Methanol 1:2 (v/v) versetzt und ü.N. bei 8 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Extrakte erneut zentrifugiert und die Überstände in neue Gefäße überführt. Die Proben wurden im 2. Extraktionsschritt für mindestens 12 h mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) geschüttelt und erneut abzentrifugiert. Die beiden Lipidextrakte wurden vereinigt, in einem Rotationsverdampfer getrocknet und in 6 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen. Anschließend wurden die gelösten Lipide in Abwandlung nach Hajra (1974) unter Zugabe von 2 ml Hajra-Lösung gewaschen, so dass nach gründlichem Schütteln und erneutem Zentrifugieren Chloroform-Unterphase und saure methanolische Oberphase in gleichem Volumenverhältnis vorlagen. Die untere Lösungsmittelphase wurde über eine Wattesäule (gestopfte Pasteurpipette) zur Entfernung von Zellresten in ein neues Gefäß überführt. Die obere Phase wurde mit gleichem Volumen Chloroform versetzt, erneut w.o. beschrieben gewaschen, zentrifugiert und die Chloroformphasen vereinigt.

Hajra-Lösung:

0,2 M	HCl
1 M	KCl

2.22.2 Säulenchromatographische Trennung von Neutral-, Glyko- und Phospholipiden

Der Gesamtlipidextrakt der unter 2.22.1 vereinigten und unter Argon getrockneten Chloroformphase wurde auf Chloroform-voräquilibrierte Strata SI-2 Silica-Säulen pipettiert. Zunächst wurden mit je 8 x 1ml Chloroform die Neutrallipide von der Säule eluiert. Anschließend wurden die Glykolipide mit 6 x 1ml Aceton/Isopropanol 9:1 eluiert (in Hefe nur

bei Expression Glykolipid-synthetisierender Enzyme). Abschließend wurden die Phospholipide in 8 x 1ml-Schritten mit Methanol aus der Säule gelöst.

Die verschiedenen Fraktionen wurden unter Argon eingeengt und zur Überprüfung der Ausbeute dünnschichtchromatographisch untersucht.

2.22.3 HPTLC Untersuchung mit dem CAMAG-System

Nach Abschätzung der Lipid-Konzentration wurde im geeigneten Volumenbereich zwischen 5 µl und 80 µl der Lipidprobe pro Probenspur auf normale DC- oder TLC-Platten (10 x 20cm) mit einem automatisierten Probenauftragegerät (TLC3) aufgesprüht, in Horizontalkammern mit geeigneten Laufmitteln (siehe 2.1.5) aufgetrennt, gefärbt und in einem automatisierten Scanner (TLC4) bei 600 nm oder im UV-Bereich (Wellenlänge automatisch nach Emissionsintensität gewählt) aufgenommen. Die Auswertung wurde mit der „wincat“-Software des CAMAG-Systems vorgenommen.

2.22.4 Präparative Dünnschichtchromatographie

Um die Konzentrationen von PC, PI/PS und PE messen zu können, wurden Phospholipidfraktionen aus 30-200 ml Hefe-Kulturen auf 10 x 20cm/20 x 20cm DC-Platten aufgetragen und mit Chloroform/Ethanol/Wasser/Triethylamin (30 : 35 : 7 : 35) als Laufmittel getrennt. Die getrennten Polarlipid-Subklassen wurden nach Besprühen mit ANS unter UV markiert und in Sovirelgläser geschabt.

Ohne weitere Behandlung wurde das phospholipidhaltige Kieselgel in die kolorimetrische Phosphatbestimmung nach Fiske&Subbarow eingesetzt.

2.22.5 Darstellung und GC-Analyse von Fettsäuremethylestern

Die Darstellung der Fettsäuremethylester (FAME) für die gaschromatographische Analyse erfolgte durch saure Methanolyse. Hierfür dienten gereinigte Zellsedimente von Hefen, Pflanzen-Lipidextrakte oder von Kieselgelplatten abgekratzte Lipidfraktionen als Ausgangsmaterial. Das Material wurde möglichst wasserfrei in ein Pyrex-Röhrchen

überführt und mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % (v/v) Dimethoxypropan (FAMES-Lsg.) versetzt und 1 h bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die entstandenen FAME mit 2 ml Petrolether extrahiert. Nicht derivatisierte, freie Fettsäuren wurden durch Waschen mit jeweils dem gleichen Volumen 100 mM NaHCO₃ und A. bidest. entfernt. Von der (oberen) Petroletherphase wurden jeweils 300 µl in ein GC-Gefäß überführt und jeweils 5 µl injiziert. War eine Aufkonzentrierung notwendig, so erfolgte die Einengung der gesamten Petroletherphase mit Wiederaufnahme in 1/10 des Ausgangsvolumens.

FAMES-Lösung:

11,1 ml	H ₂ SO ₄ conc.
8 ml	Dimethoxypropan (DMP)
381 ml	Methanol

2.22.6 Gaschromatographische Quantifizierung

Um die TAG-Konzentration bestimmen zu können, wurde wie folgt verfahren: Die Lipid-Subfraktionen (2.22.2) wurden nach Eindampfen unter Argon in einem definierten Volumen (konzentrationsabhängig) Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen. Je 1 ml hiervon wurde in ein neues Gefäß pipettiert und mit 10 µl 100 mM 15:0- oder 17:0-Fettsäure (Kalibrierung) versetzt und dann wie unter 2.22.5 beschrieben durch saure Methanolyse zu FAMES umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit 2 ml Petrolether ausgeschüttelt und 5 µl der Petroletherphase in die GC injiziert. Die effektiv injizierte Menge Kalibrierungsfettsäure betrug 2,5 nmol; die integrierte Peakfläche der Kalibrierungsfettsäure betrug 10-20% der Gesamtfläche. Die Anteile der anderen Fettsäuren wurden entsprechend aus ihren Peakflächen durch Bezug zur Kalibrierungsfettsäure errechnet. Die Kalkulation der Neutrallipid-Konzentration erfolgte unter der Annahme, daß 1 Mol TAG genau 3 Mol Fettsäure entspricht.

GC-Bedingungen:

Säule:	DB23, 30 m, 0252 mm, 0,25 µm Film (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)
Trägergas:	Stickstoff 5.0
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Splitventil:	1/30

2.22.7 Kolorimetrische Lipid-Phosphatbestimmung

Die Bestimmung des Phospholipidgehalts geschah über Messung des Phosphats der Lipid-Kopfgruppe in einer Farbreaktion nach Fiske und Subbarow (1925). Um die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen, wurde der Assay in Anlehnung an Bartlett (1959) wie folgt angepasst: In hitzebeständigen Sovirelgläsern wurden phospholipidhaltige Silicaproben aus 2.22.4, ebenso wie 20-50 µl Aliquots aus den Methanolfractionen von 2.22.2 nach kurzer Trocknung mit 250 µl 70 %iger Perchlorsäure versetzt und 2 h bei 190°C in offenen Gefäßen unter Rauchentwicklung im Heizblock inkubiert. Anschließend kühlten die Ansätze 15 min ab, dann erfolgte die Zugabe von 1150 µl Ammoniummolybdat-Lösung (P_i-Komplexierung) und 50 µl Fiske&Subbarow-Lösung (Reduktionsmittel). Die Ansätze wurden kurz gevortext und 10 min bei 90°C inkubiert. Nach 20minütiger Abkühlung wurden die blau gefärbten Lösungen photometrisch bei 815 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Microcal Origin 5.0.

Ammoniummolybdat-Lösung:

220 mg/ 100ml A. bidest.

Fiske&Subbarow-Lösung:

100 mg/ 1630µl A.bidest.

Eichlösung:

30,5 mg Dinatriumphosphat/ 100ml (= 12 nmol pro 10 µl)

2.22.8 Kolorimetrische Lipid-Zuckerbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Glycolipide Monogalaktosyldiacylglycerol (MGD) und Digalaktosyldiacylglycerol (DGD) erfolgte ebenfalls über eine Farbreaktion mit der Zucker-Kopfgruppe in Anlehnung an Radin (1958). 20 µl- und 40 µl-Aliquots aus den Aceton/Isopropanol-Fractionen von 2.22.2 wurden kurz getrocknet und dann mit 1ml Anthronlösung versetzt. Nach kurzem Vortexen inkubierten die Ansätze 30 min bei 85°C im Heizblock. Abschließend wurden die Proben zum Durchmischen gevortext, kurz zentrifugiert, um den schleimigen Film, der sich bei der Erhitzung gebildet hat, zu sedimentieren, in Einwegküvetten bei 625 nm photometrisch gemessen und mit Microcal Origin 5.0 ausgewertet.

Ansetzen der Anthronlösung:

70 mg Anthron wurden in 35 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst, auf dem Eisbad abgekühlt und mit Magnetrührer in Bewegung gehalten. 17,5 ml eiskaltes A.bidest. wurde langsam hinzugegossen und die Lösung 2 h auf dem Eisbad unter Rühren weiterinkubiert.

Eichlösung:

Galaktose bzw. Glukose wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in H₂O/ Methanol 9:1 angesetzt und in 5 µg-Schritten für die Ermittlung der Eichgeraden eingesetzt.

2.23 Bestimmung des Proteins von Pflanzensamen

Die Ermittlung des Gesamt-Proteingehaltes in Arabidopsis-, Lein- u. Rapssaat erfolgte in Abwandlung von Smith et al. (1985) mit dem Bicinchonininsäure Assay (BCA). Dieses Reagenz hat im Vergleich zu anderen Substanzen den Vorteil hoher Unempfindlichkeit gegenüber Detergenzien.

Ablauf:

Nach Abschluß der beiden Lipid-Extraktionsgänge - Chloroform/Methanol 1:2 und 2:1 (siehe Schema 1) – wurde der unter Argon getrocknete Aufschluß-Rückstand in 10 ml PBS* aufgenommen. Die Sovirelgefäße wurden mit Teflondichtungen luftdicht verschlossen und 24

h bei 60°C im Heizblock unter gelegentlichem Durchmischen inkubiert, um die schwer zugänglichen Speicherproteine der Samen in Lösung zu bringen. Entsprechend wurde parallel mit BSA-Eichlösung verfahren.

Nach dieser Inkubationszeit standen die Ansätze 2 h bei RT zum Abkühlen und Absetzen des Sediments. In 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden jeweils 40 µl (Arabidopsis) bzw. 20 µl (Lein u. Raps) aus den Extraktionsansätzen eingesetzt (n = 4) und mit 60 µl bzw. 80 µl A. bidest aufgefüllt. Die Eichreihe wurde wie folgt angesetzt: 100 µl PBS* (*Blank*, n = 2); Rinderserum-Albumin (BSA) in PBS* gelöst und zu 100 µl Endvolumen in folgenden BSA-Endkonzentrationen auf 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt: 4 µg, 8 µg, 16 µg, 32 µg und 64 µg (je n = 4).

Von der nach Angabe des Herstellers angefertigten Arbeitslösung wurden jeweils 800 µl zu den 100 µl-Proteinlösungen hinzupipettiert, gründlich gevortext und die Ansätze 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 10minütiger Abkühlung, wurden alle Ansätze zügig bei 562 nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Microcal Origin 5.0.

PBS* (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung):

8 % (w/v)	NaCl
0,2 % (w/v)	KCl
1,44 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄
0,2 % (w/v)	KH ₂ PO ₄
1 % (v/v)	Triton X-100
	→ pH 7,0

2.24 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden an Hefen und Pflanzensamen durchgeführt.

2.24.1 Hefen

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Hefen mussten drei prinzipielle Probleme überwunden werden:

- Zellen aus Kulturen mit einer OD_{600} deutlich oberhalb 0,5 unterlagen unterschiedlich stark autophagocytotischen Prozessen (Frey und Röhm, 1978; Trumbly und Bradley, 1983; Takeshige et al., 1992), die zur Auflösung cytoplasmatischer Strukturen führten, weswegen eine klare Aussage über die Transgenwirkung unmöglich war.
- Hefezellen aus Minimalmedium-Kultur zeigten ein kontrastschwaches, elektronendichtes Cytoplasma, welches erst durch anschließende Kultur in Vollmedium kontrastreich wurde (Wright und Rine, 1989).
- Zur Vermeidung von Verdichtungen u. inhomogenen Aushärtungen bei der Verfestigung der verwendeten Epoxidharze mussten Infiltrationsbarrieren beseitigt werden. Daher war ein enzymatischer Zellwandandau notwendig.

In Abwandlung verschiedener Protokolle (Wright et al., 1988; Wright und Rine, 1989; Doye et al., 1994; Paoletti und Chang, 2000) wurde wie folgt verfahren:

20-50 ml einer Hefekultur in Minimalmedium wurden bei OD_{600} 0,2-0,3 kurz abzentrifugiert, das Hefesediment wurde in Vollmedium (+ 2 % w/v Galaktose) resuspendiert, und die Zellen weitere 2 h bei 30°C inkubiert. Die 20 ml-Kultur wurde in ein 50 ml Falcongefäß überführt, mit 5 ml 5fach Primärfixanz (je 10 % v/v GA und PFA) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach kurzer Sedimentation bei 2000 x g, 5min, wurde das Pellet in 1fach Primärfixanz in Kaliumphosphatpuffer (siehe 2.1.3) resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten 2 Waschschrte in o.g. eiskalten Puffer, dann 2 Waschschrte in eiskaltem Phosphat-/Zitratpuffer (siehe 2.1.3) und die Aufnahme des Pellets in 5 ml Zymolyaselösung (siehe 2.1.3). Der Zellwandandau erfolgte für 15 min bei RT. Zwei Waschschrten in eiskaltem Phosphat-/Zitratpuffer sowie zwei weiteren in eiskaltem Kaliumphosphatpuffer schloß sich die Aufnahme des Hefesedimentes in 0,5 %ige OsO_4 -Lösung in Kaliumphosphatpuffer (4°C) an; die Inkubation erfolgte über Nacht. Der Ansatz wurde anderntags im gleichen Puffer 4 x gewaschen.

Entwässerung:

Die Entwässerung erfolgte mit einer Aceton/Wasser-Reihe mit sukzessive ansteigenden Acetonkonzentrationen, die mit Aceton_{absolut} abgeschlossen wurde; alle Schritte erfolgten auf Eis.

Die Acetonkonzentration der Reihe stieg wie folgt an: 15 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % u. 100 %. Die Inkubationszeit der Zellen in jeder Konzentrationsstufe betrug 10 min, die Entwässerung und Sedimentation (1000 x g) wurde in Zentrifugengläsern vorgenommen.

Überschüssiges Pellet konnte in 70 % Aceton bei -20°C gelagert und zu späteren Zeitpunkten weiterbearbeitet werden.

Infiltration:

Als Epoxidharz wurde ein LVG (siehe 2.1.3) nach Spurr (1969) verwendet. Die Infiltration wurde in 3 Stufen vollzogen:

Stufe 1	3 Volumen Aceton _{absolut}	+	1 Volumen Spurr
Stufe 2	1 Volumen Aceton _{absolut}	+	1 Volumen Spurr
Stufe 3	1 Volumen Aceton _{absolut}	+	3 Volumen Spurr

Die jeweiligen Infiltrationszeiten bis zum Wechsel in die nächste Stufe betragen 24 h.

Die Hefepellets wurden nach Ausgasung der letzten Stufe für 12 h in reines Spurr überführt, bei 64°C zwei Tage im Ofen ausgehärtet.

Die eingebetteten Objekte wurden mit Diamantmesser per Mikrotom in Kuben von 70-90 nm Durchmesser geschnitten, auf perforierte Kupferplättchen aufgenommen und nachkontrastiert.

Nachkontrastierung (Konzentrationen siehe 2.1.3):

Um den Kontrast von Protein- u. Lipidstrukturen gegen das Cytoplasma zu verstärken, wurden die Kupferplättchen mit den Schnittobjektseiten zuerst 10 min auf Uranylacetat- und nach Waschung 10 min auf Bleizitrat-Tropfenoberflächen inkubiert.

Danach erfolgte die elektronenmikroskopische Untersuchung.

2.24.2 Pflanzensamen

Trockene Samen von Arabidopsis, Raps und Lein wurden in mit warmem Wasser durchtränktem Filterpapier etwa 8 h zur Quellung inkubiert, während Samen aus späten Entwicklungsstadien (höherer Wassergehalt) direkt präpariert wurden. Zwar existieren Protokolle für die Darstellung trockener, der Fixierung schwer zugänglicher Pflanzengewebe (Grote et al., 1999; Öpik, 1985), sie erfordern jedoch einen höheren apparativen Aufwand, da die Fixierung in der Gasphase abläuft. Dieses Verfahren konnte hier nicht realisiert werden. Stattdessen wurde in Abwandlung von Paul und Egley (1983) wie folgt verfahren:

Mit Skalpell u. Pinzette wurden die Embryonen aus der Testa präpariert und zur leichteren Fixierung in 1 mm³ große Blöcke geschnitten, 10-20 Blöcke in 5 ml eiskalte Fixierlösung (je 1 % GA und PFA in 50 mM Cacodylatpuffer → 2.1.3) gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 4 x in 50 mM eiskaltem Cacodylatpuffer gewaschen und die Blöckchen in eiskalter 0,5 % bis 1 %iger OsO₄-Lösung im selben Puffer ü. N. inkubiert. Anderntags wurde 4 x mit eiskaltem A.bidest gewaschen.

Um die Luft aus den Interzellularen des Speichergewebes der Keimblätter zu entfernen, wurden die in A. bidest befindlichen Blöckchen in offenen Gefäßen in eine Vakuumvorrichtung gestellt und per Öldruckpumpe über einen Zeitraum von 4 min bis auf ~100 mbar evakuiert. Anschließend wurde das Vakuum langsam abgelassen. Der Entlüftungsschritt wurde zweimal wiederholt.

Entwässerung:

Die Entwässerung wurde wie unter 2.24.1 beschrieben vollzogen. Bei ölreichen Samen wurden nach Aufnahme in Aceton_{absolut} zusätzlich die Blöckchen in Aceton/Chloroform 1:1 aufgenommen und unter leichtem Schütteln 20 min inkubiert, um Ölreste zu entfernen.

Infiltration:

Die Infiltration folgte dem Ablauf wie unter 2.24.1 beschrieben, jedoch betragen die Infiltrationszeiten bis zum Wechsel in die nächste Stufe 48 h. Nachkontrastierung und Schneiden verlief wie in 2.24.1 für Hefe beschrieben.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zentraler Aspekt meiner Arbeit waren Versuche zur Membranflächenvermehrung *in planta* durch selektive Eingriffe in den Stoffwechsel polarer Lipide.

Untersucht wurden die beiden in Membranen stark vertretenen Gruppen der Glyko- und Phospholipide. Die Gesamt-Glykolipidgehalte aller in den Abbildungen 1, 4, 5 und 6 aufgeführten Linien wiesen gegenüber dem Wildtyp und untereinander keine quantitativen Unterschiede auf (Totalgehalte pro Korn: 4 - 4,4 nMol¹), und so konzentrierten sich die Untersuchungen letztlich auf die quantitative Erfassung der Änderung des Phospholipidgehalts.

Für die Erfassung der Lipid-Phosphatgehalte standen prinzipiell zwei Verfahren zur Auswahl: die kolorimetrische Bestimmung des komplexierten Pi und die Quantifizierung nach Veraschung auf der Dünnschichtplatte. Das photometrische Verfahren ergab reproduzierbarere Ergebnisse, während die Dünnschichtchromatographie zu rascheren Resultaten führte und deshalb als Durchmusterungsmethode eingesetzt wurde.

Es bestand zunächst die Notwendigkeit, Sicherheit darüber zu gewinnen, ob eine konkrete Messung auf signifikant mehr Polarlipid hinwies oder sich im Bereich der natürlichen Spannweite² der Streuung der Wildtyp-Daten bewegte.

Um eine gesicherte Interpretationsbasis für die Versuchsergebnisse zu erhalten, wurden zunächst die Phospholipidgehalte der Wildtypsaaten von Raps (Sorten: Lisora und Hanna) und *Arabidopsis* (Sorte: C 24) aus verschiedenen Erntejahren bestimmt. Die Ergebnisspannweiten lieferten die Basis für Vergleiche mit Untersuchungen transgener Saat. Von der Erntecharge einer Sorte lagen schließlich 4 bis 5 Meßergebnisse vor. Die Maximalspannweite erreichte dabei bis zu:

19,8 % / 22,4 % für Raps (Hanna/Lisora)

20,3 % für *Arabidopsis* (C 24)

Diese Werte beinhalteten sowohl verfahrenstechnische Fehler (Verluste durch Waschen, Überführen, Aliquotieren), die sich nach Rückstandsuntersuchungen beziffern ließen und mit 6-8 % zu veranschlagen waren, sowie apparative Fehler (Waagen, Photometer, Auftragegeräte), die nach Herstellerangaben abhängig vom gewählten Meßbereich zusammen

¹ Sorten Hanna u. Lisora; Ermittelt über Anthronbestimmung. 1_{ic} Annahme: 1 nMol = 800 ng;

²_{ic} Annahme: Verh. MGD:DGD = 2:1, restl. GL = 1 Zuckerkopfgruppe pro Molekül

² Definition Spannweite (auch Variationsbreite): Differenz zwischen größtem u. kleinstem Wert einer Datenreihe

bei etwa 3 % lagen. Die restliche Abweichung entfiel auf Heterogenität bezüglich Zusammensetzung, Größe und Gewicht im Saatgut einer Charge.

In den folgenden Darstellungen wurden die Ergebnisse transgener Saaten als Zuwächse bzw. Abnahmen gegenüber Wildtypdaten angegeben. Die Spannweiten hingegen wurden in den nachfolgenden Diagrammen als Signifikanzgrenzen gekennzeichnet, innerhalb derer der Anstieg der Lipidphosphatgehalte gegenüber dem Wildtyp als „nicht-signifikant“ erachtet wurde.

3.1 Rapssorten-Screening

Eine Durchmusterung verschiedener schwarzschaliger Rapssorten auf signifikant erhöhte Phospholipidgehalte blieb ohne Erfolg. Lediglich die Untersuchung an einer transgenen Linie der Sommerraps-Sorte Hanna lieferte einen Hinweis auf erhöhten Membranflächenanteil. Das Saatgut ging aus einem 1997 beendeten Projekt schwedischer Kollegen hervor und enthielt ein Cytochrom b5 aus *Brassica oleracea* in Gegensinn-Orientierung.

Im nachfolgenden Diagramm sind die Resultate mehrerer kolorimetrischer Untersuchungen dargestellt.

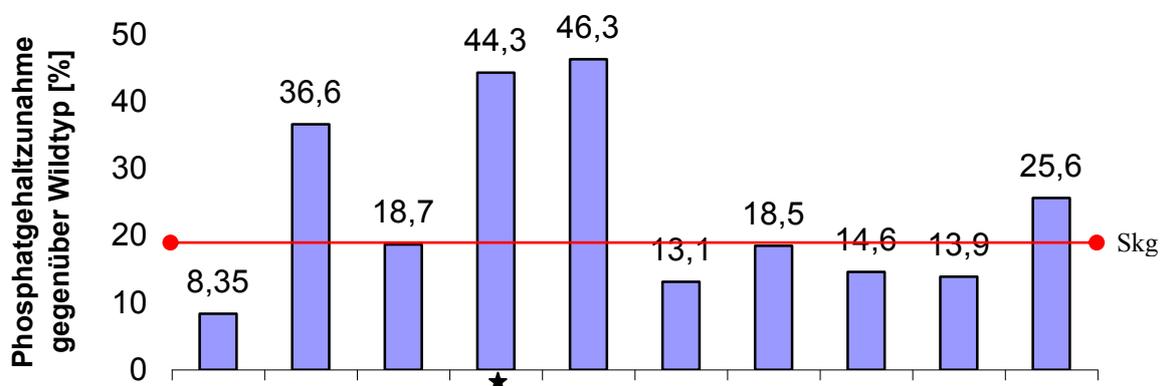


Abb. 1: Analyse verschiedener transgener Rapslinien der Sorte Hanna.

Lipidphosphat-Saatanalysen an je 100 mg *B. napus*-Samen, transformiert mit Cytochrom b₅ aus *B. oleracea* in Gegensinn-Orientierung. Darstellung der prozentualen Pi-Zunahmen 11 verschiedener transgener Linien gegenüber Wildtyp. Basiswert: 1413 nMol Lipidphosphat pro 100 mg Saat der Sorte Hanna. Skg.= Signifikanzgrenze. $\sigma_{X_{\text{quer}}}$ aller Mittelwerte < 1 % der relativen Zunahmewerte. Stern = Diese Rapslinie wurde für die Auszählung der in Tabelle 1 aufgeführten Parameter benutzt. Das Saatgut wurde von schwedischen Kollegen zur Verfügung gestellt.

Während die Samen der meisten transgenen Linien moderate Lipidphosphatgehalt-Anstiege unterhalb der eingangs erwähnten Signifikanzgrenze aufwiesen, zeigten vier Linien signifikante Zunahmen, die allerdings nur knapp 50 % über dem Wert der Wildtypsamen lagen. Mikromorphologische Untersuchungen an abgereiften Samen ließen wegen der unzureichenden Qualität der Strukturauflösung meist keinen Einblick in die Anordnung subzellulärer Membranen zu; wo die Auflösung dennoch einen besseren Einblick erlaubte, war keine Membran-Anreicherung feststellbar (Morphologie wie in Abb. **J** - Bildtafel 2).

Lediglich Präparationen an Samen im späten Reifestadium enthielten Hinweise auf Ausbildung rauhen ERs im Zellkortex (Bildtafel 1 – Abb. **A**). Eine analoge ER-Verteilung wurde auch im Zuge der Oleosomengese in Wildtypzellen ähnlicher Entwicklungsstadien beobachtet, in der transgenen Saat erschien die Membranzahl lediglich geringfügig höher auszufallen. Dabei könnten allerdings zahlreiche „blasige“ Dilatationen kortikaler ER-Anteile möglicherweise auf umfangreiche Oleosomensynthese hinweisen. Wenn dies zuträfe, wäre die endgültige Membranzahl noch nicht so erfaßt (Abb. **A**), wie sie in Zellen vollständig abgereifter transgener Samen vorliegen würde.

Ein direkter Vergleich transgener Mesophyllzellen mit den entsprechenden Wildtypzellen aus jeweils abgereifter Saat zeigte Unterschiede in Größe und Anzahl der Speicherkompartimente (Übersichtsaufnahmen Bildtafel 1 – Abb. **B versus C**).

Eine Auswertung der Dimensionen von Samen, Mesophyllzellen und Oleosomen lieferte eine mögliche Erklärung für das Fehlen zusätzlicher Membranstrukturen bei erhöhten Phospholipid-Konzentrationen der transgenen Saat.

Tabelle 1 Dimensionen der Samen, Mesophyllzellen und Oleosomen der *B.napus*-Sorte Hanna

	Mittlere S-Masse [mg]	Mittlere S -durchmesser* -volumen* [mm/mm ³]	Mittlere OS -durchmesser*, -oberflächen*, -volumen* [µm/µm ² /µm ³]	MZ -durchmesser* -volumen* [µm/µm ³]	Oel-Speicher- volumen pro MZ*** [µm ³]	Mittlerer TAG-Gehalt pro Samen [mg] (Anteil von Tm)	Mittlerer PG pro Samen [mg]
Wildtyp	3,3	1,52 / 1,84	~ 1,02** / 3,27 / 0,555	15 / 1767	~ 589	1,1 (33 %)	0,61
Transgen- Linie★	5	1,96 / 3,94	~ 0,65** / 1,33 / 0,144	25,7/ 8886	~ 2962	1,3 (26 %)	1,07

MZ = Mesophyllzell; OS = Oleosomen; PG = Proteingehalt; S = Samen; TAG = Triacylglycerol; Tm = Trockenmasse

* Kugelform angenommen (Volumen = $4/3 r^3 \pi$; Oberfläche = $4 r^2 \pi$)

** Näherungswerte! Errechnet durch Eingrenzung des Bereiches innerhalb dessen sich 50 % aller Oleosomen-Durchmesser bewegten (zw. 0,9 - 1,2 µm (Wt) und 0,4 - 1 µm (TG))

*** unter der Annahme, daß 33 % bzw 26 % Ölmasseanteil einem Volumenanteil von 33 % bzw 26 % entsprechen

Bei einer Abnahme der Oleosomendurchmesser um 36 % stieg die Oleosomenzahl im zur Verfügung stehenden Gesamt-Ölspeichervolumen um das 3,85fache gegenüber dem Wildtyp an bei je gleichem Speichervolumen, da das Volumen stärker abnahm (3^{te} Potenz) als die Oberfläche (2^{te} Potenz). Multipliziert mit der durchschnittlichen Oleosomen-Oberfläche entstand deshalb eine um 57 % höhere Gesamt-Stellfläche für Phospholipide. Für Protein-Speicherkompartimente galt möglicherweise ähnliches. Die notwendige Abnahme der Öl- bzw Proteinmenge pro Zellvolumen scheint dabei kompensiert worden zu sein durch eine Zunahme von Mesophyllzell-Volumen, Samenumfang und -masse (Wildtyp-Linien: 3-3,5 mg; Transgen-Linien: 3,8-5 mg).

Die o.a. Beispielrechnung ist jedoch stark idealisiert. Tatsächlich war das Gesamt-Ölspeichervolumen nicht konstant, sondern im Wildtyp deutlich kleiner. Wie Abb. C (Bildtafel 1) zeigte, traten andererseits „membranfreie“ cytoplasmatische Bereiche in transgenen Mesophyllzellen auf, sodaß nicht wie in Tab.1 approximiert von einer Verfünffachung der Ölspeichervolumen ausgegangen werden konnte.

Um eine Membranproliferation durch Anreicherung der Bilayer kernnaher- oder distaler ER-Membranen, wie in der Literatur häufig beschrieben (siehe Anhang A), handelte es sich in dieser Saat gewiß nicht. Eher ist von einer Phospholipidzunahme durch Veränderung der Form der Speicherkompartimente auszugehen. Dieser Fall deutet auf zweierlei hin:

- die vollständige Integration der Proliferation in den Speicherstoffwechsel
- eine kontinuierliche, schwache Induktion der Proliferation ohne „Produktions-Überschuß“ über den gesamten Zeitraum der Speicherstoffsynthese hinweg.

Eine Diskussion über die möglichen Mechanismen erfolgt zusammen mit den Resultaten der anderen Antisenseansätze (siehe 3.2.4).

Da die Fettsäurezusammensetzungen von Öl- und Phospholipidfraktion (siehe Anhang B) außerdem keinen Unterschied gegenüber dem Wildtypprofil aufwiesen, konnte die gemessene Zunahme der polaren Lipide nicht auf eine biochemisch-physiologische Ursache des Cb₅-Ausfalls zurückgeführt werden.

Als vorläufiges Fazit der Saat-Durchmusterung erscheint eine Zunahme an Phospholipid über Gegensinn-Konstrukte induzierbar zu sein, obwohl solche Konstrukte meist eine Konzentrationsverminderung des Zielgen-Produktes erzeugen. Durch diese Ergebnisse rückte das Cytochrom b₅ als mögliches Werkzeug zur Membranvermehrung in den Blickpunkt. Da

einerseits die Patentsituation eine weitere Nutzung jener Saat im Rahmen von NAPUS 2000 nicht zuließ und andererseits für Untersuchungen zur Membranhomöostase die Verwendung eines durchsequenzierten Organismus als unverzichtbar erschien, wurde versucht, durch Attenuation eines zelleigenen Cytochroms b₅ aus *Arabidopsis thaliana* Membranvermehrung in diesem Modellorganismus zu erzeugen, um im Erfolgsfall über Mikroarray-Analysen eine unmittelbare genomweite Suche nach Homöostase-Stellgliedern starten zu können.

3.2 Attenuationsansätze in *Arabidopsis thaliana*

3.2.1 Datenbanksuche

Bei der Suche nach entsprechenden Gensequenzen in *Arabidopsis thaliana* in der >TIGR ARABIDOPSIS THALIANA GENOME ANNOTATION DATABASE< (www.tigr.org → Stand:20.4.2003) fanden sich unter 375 Cytochromen 13 Einträge zu Vertretern der Cytochrom b₅-Reihe (Auflistung Tabelle unten). Dabei handelt es sich in 5 Fällen um Cytochrome b₅ im eigentlichen Verständnis (gelb unterlegt), um Fusionsproteine mit zumeist N-terminaler Cytochrom b₅-Domäne (80-100 AS) in 6 weiteren Fällen (grau unterlegt) und 2 Elektronendonatoren.

Tabelle 2 Cytochrome b₅ in *A. thaliana*

At5g48810	cytochrome b5
At5g53560	cytochrome b5 isoform 1
At1g26340	cytochrome b5, putative
At2g32720	cytochrome b5, putative
At2g46650	cytochrome b5, putative
At4g14965	cytochrome b5 domain-containing protein
At1g60660	cytochrome b5 domain-containing protein
At2g24940	cytochrome b5 domain-containing protein
At3g48890	cytochrome b5 domain-containing protein
At5g09680	cytochrome b5 domain-containing protein
At5g52240	cytochrome b5 domain-containing protein
At5g17770	NADH-cytochrome b5 reductase
At5g20080	NADH-cytochrome b5 reductase, putative

Eine Abstufung der CB₅-Sequenzen nach Homologie führte über einen entsprechenden Nukleotid-Sequenzvergleich des Cytochrom b₅ aus *Brassica oleracea* mit den fünf Cytochromen b₅ aus *Arabidopsis thaliana* zu folgender Rangfolge:

- 88,8 %** Übereinstimmung mit At5g53560
- 64,7 %** Übereinstimmung mit At2g32720
- 62,8 %** Übereinstimmung mit At5g48810
- 56,1 %** Übereinstimmung mit At2g46650
- 53,9 %** Übereinstimmung mit At1g26340

Um von diesen 5 (z.T. mutmaßlichen) Cytochromen b₅ die im Samen exprimierten Vertreter zu ermitteln, wurden reife Samen von Wildtyppflanzen zu drei verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Zum Zeitpunkt hoher Ölsynthese (DAF 9), mäßiger Öl- und hoher Speicherproteinsynthese (DAF 13) und geringer Speicherproteinsynthese (DAF 17). Die aus den Samen extrahierte und in cDNA umgeschriebene mRNA wurde zur Überprüfung des Expressionsstatus in eine PCR eingesetzt (Abb. 2).

3.2.2 Untersuchung des Expressionsstatus homologer CB₅-Vertreter in Arabidopsis

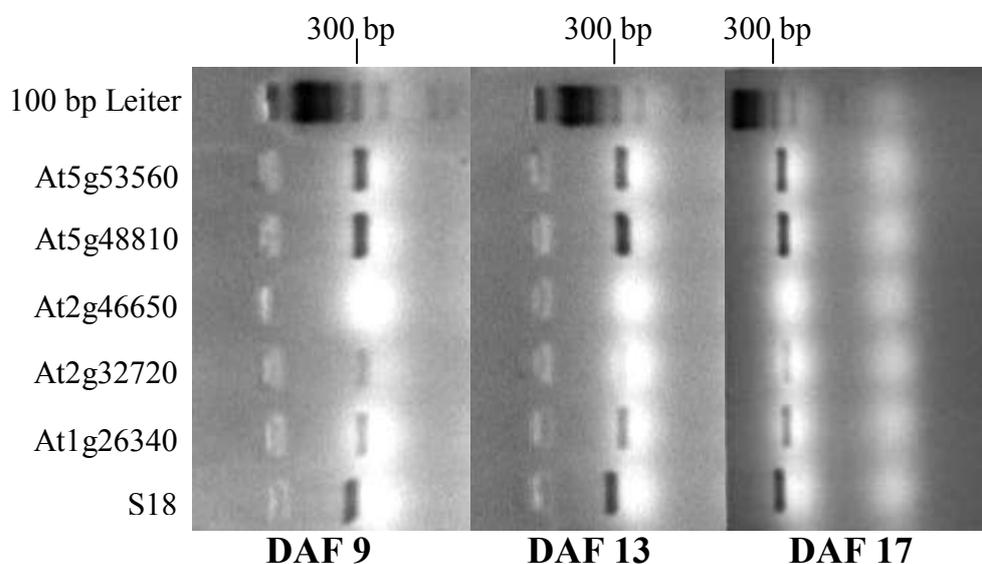


Abb. 2: RT-PCR auf cDNA von Arabidopsissamen verschiedener Entwicklungsstadien
Amplifikation von 265-270 bp-Fragmenten der 5 mutmaßlichen Cytochrome b₅ aus *Arabidopsis thaliana* sowie eines 342 bp Fragments des ribosomalen S18-Proteins als Expressionsstandard. PCR-Parameter: 32 Zyklen: 95°C, 35 s Denaturierung; 57°, 35s Anlagerung; 72°, 25 s Synthese.

Die Analyse des Expressionsstatus zeigte deutliche Transkriptionsaktivitäten für die CB₅-Gene At5g53560, At5g48810 und At1g26340 sowie eine deutlich schwächere Aktivität für At2g32720. Das mutmaßliche CB₅-Gen At2g46650 wurde auch mit drei verschiedenen Primerkombinationen per PCR nicht detektiert (Spleißoptimierung s. Anhang C).

Von diesem Ergebnis ausgehend, wurden Attenuationskonstrukte gegen die Nukleotidsequenzen der vier während der Samenentwicklung transkriptionsaktiven *A. th*-CB₅-Vertreter entwickelt. Dabei wurde die effektivere Methode der Attenuation über „hairpin“-Antisense mit integriertem Gen-eigenen Intron bei den gegen At5g53560 und At2g32720 gerichteten Konstrukten gewählt. Im Falle der gegen die Gentranskripte At5g48810 und At1g26340 gerichteten Ansätze erwiesen sich die hairpin-Konstrukte als nicht klonierbar, und daher wurde auf den „klassischen“ Antisense zurückgegriffen.

Alle Attenuationskonstrukte wurden unter Kontrolle des samenspezifischen Napinpromotors in *Arabidopsis* transformiert. Das Saatgut jener Pflanzen wurde über Anzucht auf Kanamycin-haltigem Medium selektiert, und nach der Analyse des Transgenstatus (Southern, Anhang F) wurde die reifende Saat von Pflanzen mit 1-3 Transgen-Insertionen nach DAF 13 geerntet und die extrahierte und in cDNA umgeschriebene mRNA in eine semiquantitative PCR eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das Attenuationsmaß ermittelt. Dabei diente als Bezugsmaß für den indirekten Vergleich der PCR-Signale zwischen Amplifikaten aus Wildtyp und Transgensaat die Amplifikation des exprimierten ribosomalen S18-Gens, dessen Signalstärke gleich 1 (100%) gesetzt wurde.

Die Höhe der CB₅-Signalabschwächung in den Samen der Transgenpflanzen gegenüber Wildtyp ist in Abb. 3 wiedergegeben.

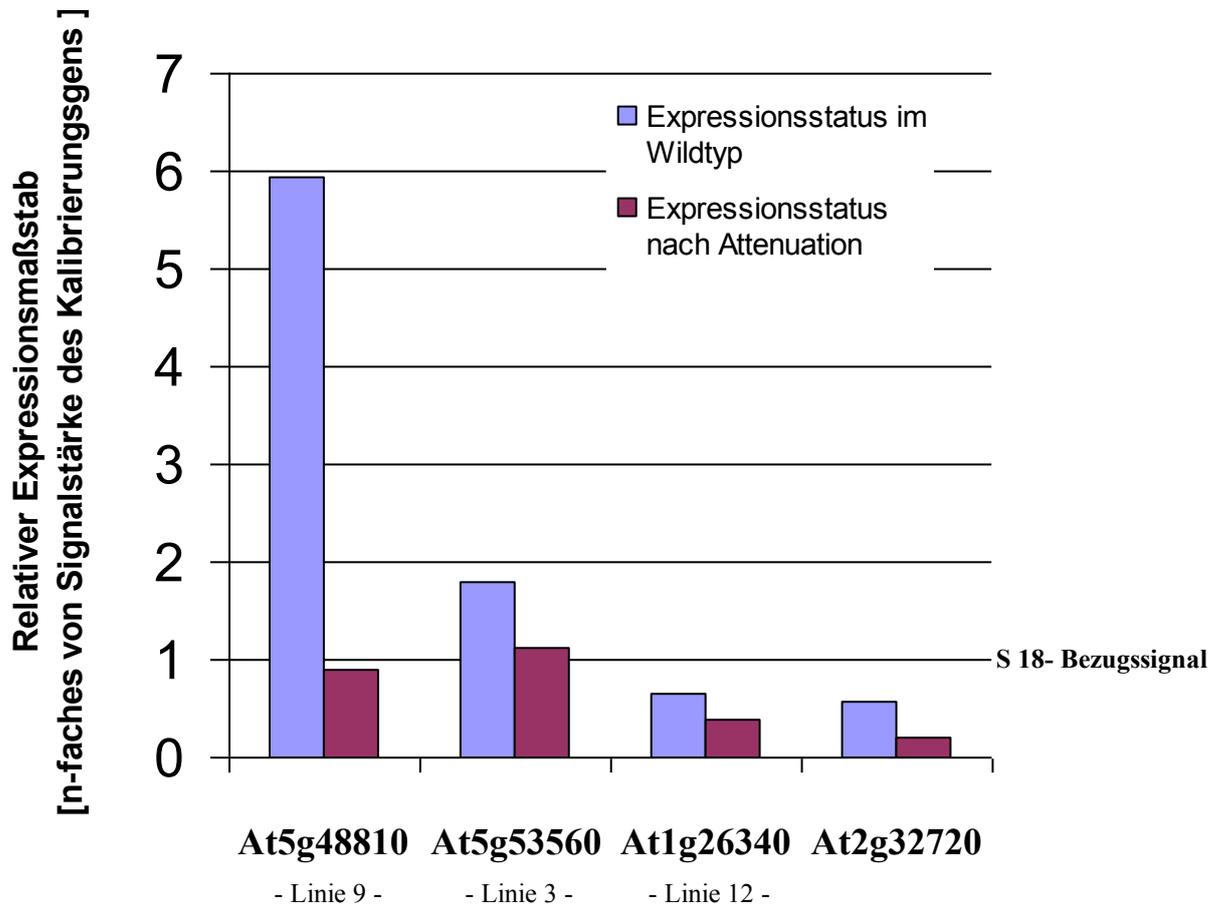


Abb. 3: Expressionsstatus der Cytochrome b5 aus *A. thaliana* nach Attenuation.

Transkriptionsstärke der vier im Samen exprimierten Cytochrome b₅. Transgene Linien mit deutlicher Verringerung der Primärtranskriptmenge. Signalintensität des S 18-Kalibrierungstranskripts normalisiert auf 100 % (= 1).

Die Senkung der Transkriptmenge war in allen Fällen deutlich, wenngleich die Attenuationskonstrukte in keinem untersuchten Fall die Transkriptionsaktivität ganz abzustellen vermochten. Die Ursache lag möglicherweise in der Verwendung ganzer Samen für die m-RNA Gewinnung. Dabei gelangte in den Extrakt auch RNA nicht-embryogener Herkunft, z.B. aus der Testa, in deren Zellen der samenspezifische Napin-Promotor wahrscheinlich inaktiv blieb.

3.2.3 Auswertung der Cytochrom b_5 -Attenuationslinien

Nach vollendeter Abreife und Samenernte der Expressions-attenuierten Pflanzen wurden Lipid-Phosphat-, Protein- und Ölgehalte untersucht (Abb. 4).

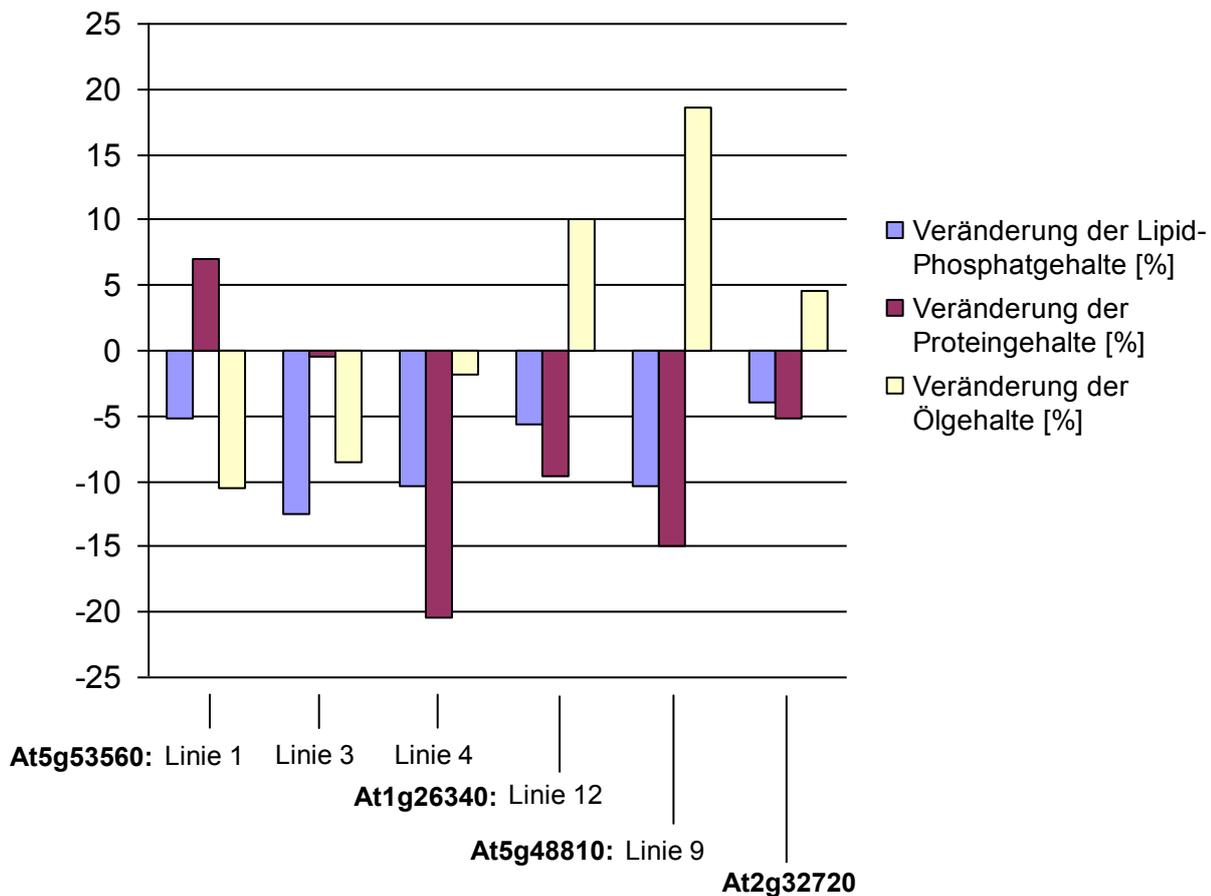


Abb. 4: Öl-, Protein- und Lipid-Phosphatgehalte im Vergleich zum Wildtyp.

Saatuntersuchung transgener *A. thaliana* – Linien. Darstellung als Differenzen gegenüber dem Wildtyp. C24-Wildtypdaten pro Samen: Mittlere Masse = 17,9 µg; 0,29 nMol (~ 0,22 µg) Lipidphosphat; 4,7 µg Gesamtprotein; 5,3 µg Neutrallipid

Die Erwartung, durch Attenuation der eigenen Cb_5 -Transkripte in *Arabidopsis* ein analoges Ergebnis wie in Raps zu erzielen, erfüllte sich nicht. Kein Attenuationskonstrukt erzeugte eine Proliferation polarer Lipide in *Arabidopsis*-Samen. Damit verfehlte der Attenuationsansatz das Ziel und wurde nicht weiter verfolgt.

Analysiert man dennoch die in Abb.4 aufgeführten Ergebnisse im Hinblick auf eine physiologische Wirkung bzw ein Angriffsziel im Stoffwechsel des Embryos, so wiesen die gegenüber dem Wildtyp *in toto* verringerten Lipid-Phosphatgehalte, die sich nach Attenuation eines jeden *Arabidopsis*-Cytochroms einstellten, auf eine Verringerung der ER-Menge hin. Wurden Öl- und Proteingehalte ebenfalls berücksichtigt, so schien die Attenuation der Cytochrome b₅ Einfluß auf unterschiedliche ER-Domänen zu nehmen. Es waren offenbar vom Ausfall der Cytochrome At1g26340, At5g48810 und At2g32720 Bereiche für die Genese der Protein-Speichervakuolen/-Vesikel betroffen, aber scheinbar nicht die ER-Domänen für die Oleosomenbildung. Anders sah es bei At5g53560 aus; dort schienen z.T. die Ölkörperbildung (Linie 1) oder Domänen für die Genese von beiden Kompartimenten betroffen zu sein (Linie 3+4). Dies war auffällig, da normalerweise die Abnahme des einen Speicherstoffes mit der Zunahme des anderen einhergeht („negative Korrelation“ - Grami et al. (1977)): ein mögliches Indiz für grundlegendere Funktionen dieses Cytochroms im ER-Membranstoffwechsel.

Ein morphologischer Überblick bestätigte die Meßdaten (Bildtafel 1):

Kaum mit Protein gefüllten Speichervakuolen (**F**) stehen wenige anormal große Ölkörper gegenüber (**E-G**), deren einzelne Vertreter z.T. die Hälfte des Zellvolumens ausfüllen können (**G**). Ein ähnliches Bild der Protein-Speicherkompartimente zeigte der Antisense gegen At5g53560 (**D** - Linie 4). Hier schien jedoch auch der Umfang der Ölspeicherung im Vergleich zum Wildtyp geringer auszufallen (**C**). Kein morphologischer Unterschied zum Wildtyp war in der Saat des gegen At2g32720 gerichteten Ansatzes festzustellen (traf auch auf At5g53560-Linie 1 zu).

Konkrete Auswirkungen auf den Fettsäurestoffwechsel (Kettenlänge/Desaturierung) zeigte nur der Antisense gegen das CB₅ At2g32720 (Anhang E1+E2). In jenen Samen fand sich ein Drittel mehr α -Linolensäure und etwa ein Drittel weniger 20:0, 20:1 ^{Δ 11} und 20:1 ^{Δ 13}, was auf eine Beteiligung dieses Cytochroms an den Reaktionen von 18:0 \rightarrow 20:0, 18:1 ^{Δ 9} \rightarrow 20:1 ^{Δ 11} und evtl. 18:1 ^{Δ 11} \rightarrow 20:1 ^{Δ 13} hindeutet. Da eine direkte Cb₅-Beteiligung an Elongationen sehr umstritten ist (Vergères und Waskell, 1995), könnte hier ein indirekter Einfluß vorliegen.

3.2.4 Abschließende Bewertung der Attenuationsansätze

Daß im Gegensatz zur Dosisabschwächung des Cb5 At2g32720 die Reduktion der Transkripte der drei anderen Vertreter keine Auswirkung auf das Fettsäureprofil zeigte, könnte durch verstärkte Expression anderer Cb5 ausgeglichen worden sein. Diese Möglichkeit ist nicht untersucht worden, ließe sich aber experimentell durch kombiniertes „Profiling“ aller Cb5s nach Attenuation eines Vertreters erfassen. Eventuell waren auch mit Ausnahme von At2g32720 die basalen Expressionsstärken der anderen drei Cytochrome ausreichend, um ihre Funktionen, zumindest im Fettsäurestoffwechsel, zu erfüllen. Elektronenübertragung für reduktive Prozesse des Fettsäurestoffwechsels könnte möglicherweise auch gänzlich von „front-end“-Desaturasen (Enzyme mit N-terminaler Cb₅-Domäne) erfüllt worden sein. Die Funktion der „freien“ Cb₅ wäre dann freilich unklar.

Die Auswirkungen der mRNA-Dosisabsenkung schienen sich ohnehin eher auf die Protein-Speichervakuolen-Genese ausgewirkt zu haben. Eine Beteiligung der Cytochrome b₅ am Membranfluß dieser Kompartimente inklusive Knospungs- und Fusionsprozessen ist bis dato nicht nachgewiesen. Die Lokalisation von Cb₅-Reduktasen in Vakuolenmembranen von Maiszellen durch Bagnaresi et al. (2000) läßt eine Beteiligung von Cytochromen b₅ an Reduktionsvorgängen am Tonoplasten jedoch möglich erscheinen.

Da der Ansatz „Proliferation durch Attenuation“ in *A. thaliana* nicht gelang, fällt es rückblickend schwer, für die Steigerung der Polarlipidkonzentration in Rapssamen der Sorte Hanna (Abb.1) einen plausiblen Mechanismus zu benennen.

Denkbar wären jedoch drei verschiedene Wirkungsweisen:

(„Unspezifischer Antisense“) → die Verwendung der vollständigen Gensequenz beim „klassischen“ Antisense besaß Sequenzübereinstimmungen zu anderen mRNAs als der gewünschten und erzeugte Attenuation von Genen, die an der Kontrolle der Membranmenge beteiligt waren. Die Wahrscheinlichkeit der Homologie zu Sequenzbereichen anderer Transkripte mit eventuell analogen Funktionen ist bei Antisense mit Vollängen-Sequenzen oft beobachtet worden (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990; de Carvalho et al., 1992).

(„Produktionsbegrenzung aufgehoben“) → der Ausfall des Cb5 führte auch zum Ausfall zellulärer Kontrollfunktionen, durch die die Neusynthese von Membranlipiden begrenzt wurde. Dies führte zu einer vermehrten Membran-Synthese, der keine adäquate Speicherstoffsynthese im selben Zeitraum gegenüberstand. Als Folge davon verschob sich die Oberflächen-/Volumeneinteilung der Speicherkompartimente zugunsten einer größeren Oberfläche.

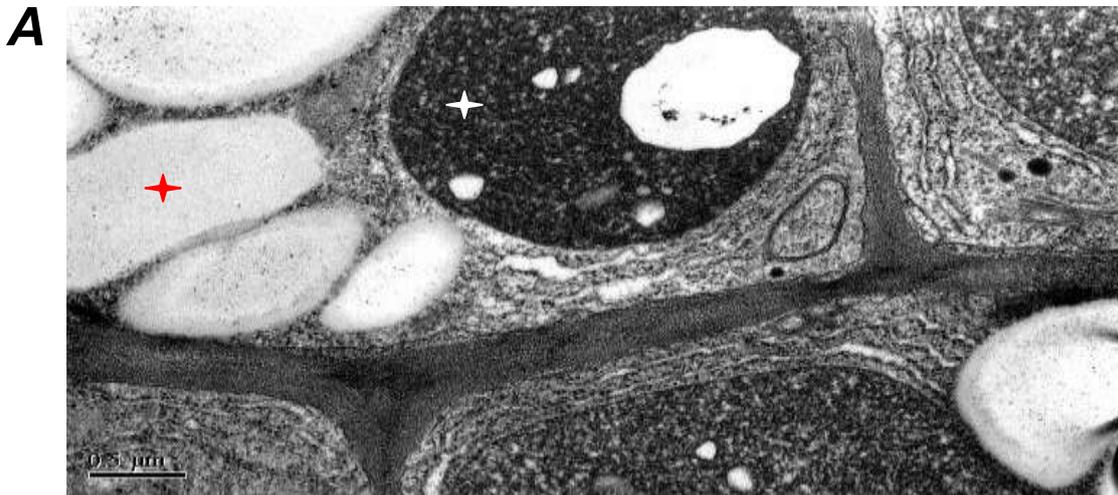
(„Doppelter Kompensationseffekt“) → die mRNA-Dosisverringerung eines CB5 erzwingt vermehrte Expression eines anderen CB₅. Der „Ersatz“ erfüllt die gleiche Funktion mit geringerer Effizienz, dies wird durch Überexpression ausgeglichen. Die Membranintegration des überexprimierten Vertreters erzeugt schließlich eine Proliferation der Membranstellfläche, da das Lipid-/Proteinverhältnis des Bilayers konstant gehalten wird.

Dieser Mechanismus basiert auf Abläufen, die aus anderen Systemen bekannt sind.

So ist der funktionelle Ersatz eines Proteins durch ein anderes mit ähnlicher Funktion ein häufig beobachtetes Phänomen. Es findet sich besonders bei Mitgliedern derselben Familie wie z.B. bei Cytochromen P450 (Yamazaki und Shimada, 2006; Morant et al., 2007) sowie bei Vertretern am Lipidstoffwechsel beteiligter Proteinfamilien (z.B.: Acyl-Coenzym A-Synthetasen (Shockey et al., 2002); G3P-Acyltransferasen (Zheng und Zou, 2001); Phosphatidylserin-Decarboxylasen (Trotter und Voelker, 1995). Ebenso ist Membranproliferation als Folge von Protein-Überexpression durch viele Beispiele belegt (s. Auflistung - Anhang A).

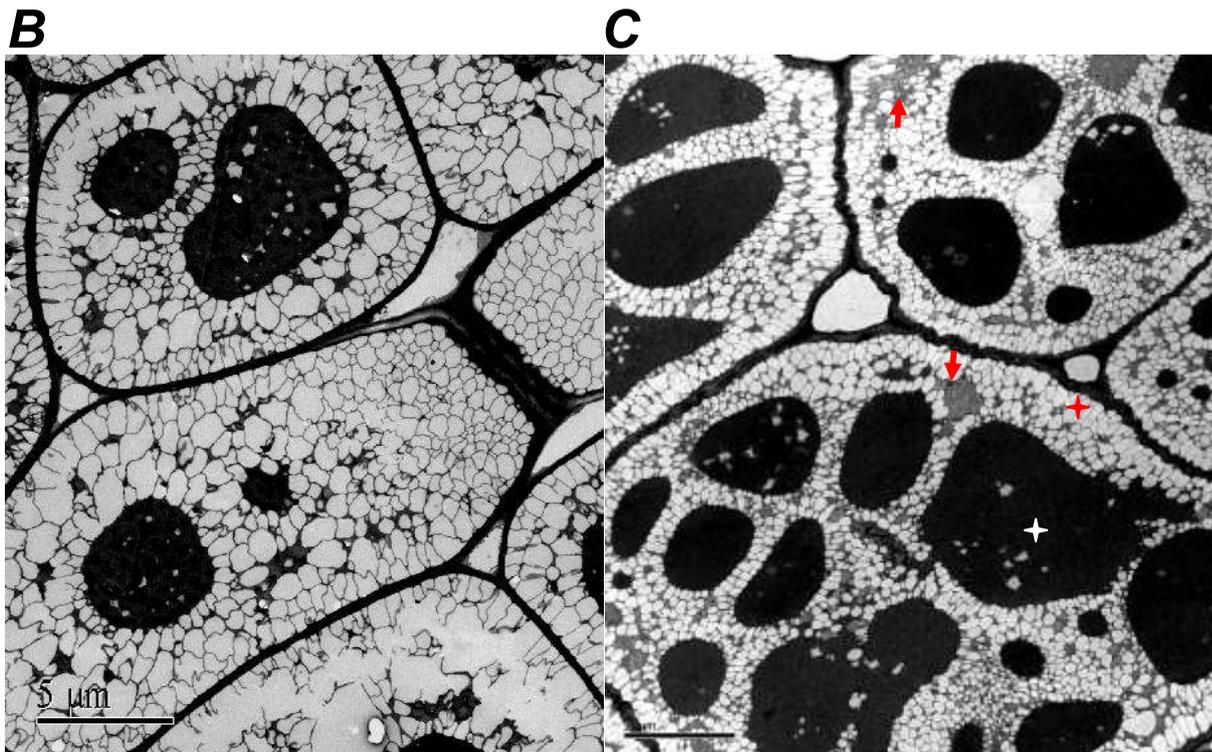
Bildtafel 1: Darstellung der Pflanzen - Feinmorphologie - Auswirkungen der Antisense-Konstrukte -

EM-Untersuchung der Rapssaat aus Schweden A + C



Balken 0,5 µm

A Feinmorphologische Darstellung von Rindenparenchymzellen aus mittlerem Kotyledonenstadium (DAF 35-36). *B. napus* mit **BoCb₅-AS** transformiert. Anreicherung von zumeist rauhem ER, schlauchartig das kortikale Cytoplasma durchziehend. Blasige Auftreibungen möglicherweise Präparationsartefakte. Oleosomen (roter Stern) und Proteinkörper (weißer Stern) normal entwickelt.

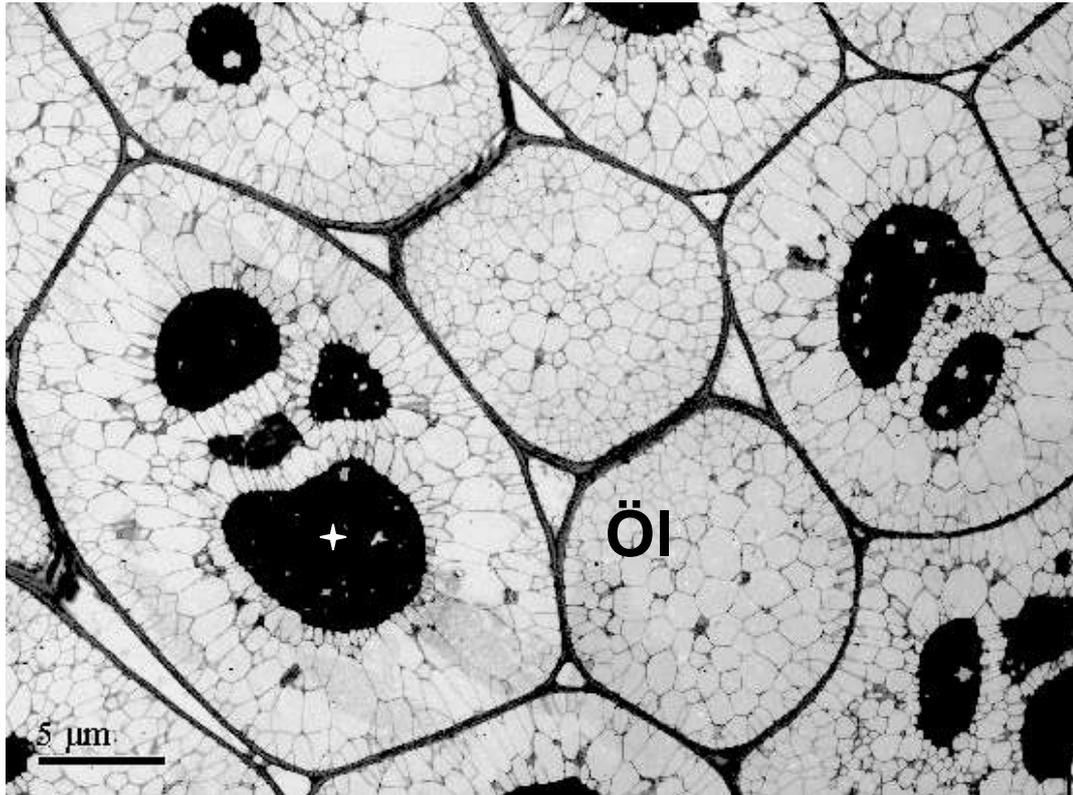


Balken 5 µm

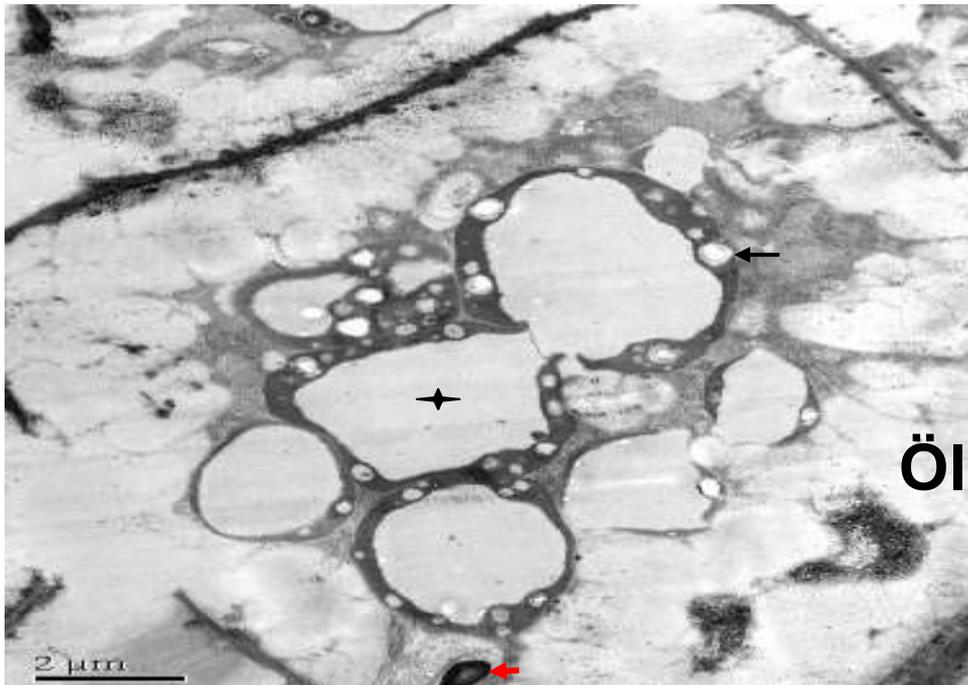
B: Präparation abgereifter Samen: Wildtyp Sorte Hanna. Mesophyllzellen mit wenigen Proteinkörpern und größeren Ölkörpern.

C *Brassica napus* (Sorte Hanna) transformiert mit Cytochrom b₅ aus *B. oleracea* in Gegensinn-Orientierung (**BoCb₅-AS**) unter Kontrolle eines Napin-Minimalpromotors. Samen-Präparation nach Abreife und halbjähriger Lagerung. Querschnitt durch Mesophyllzellen aus Keimblatt.

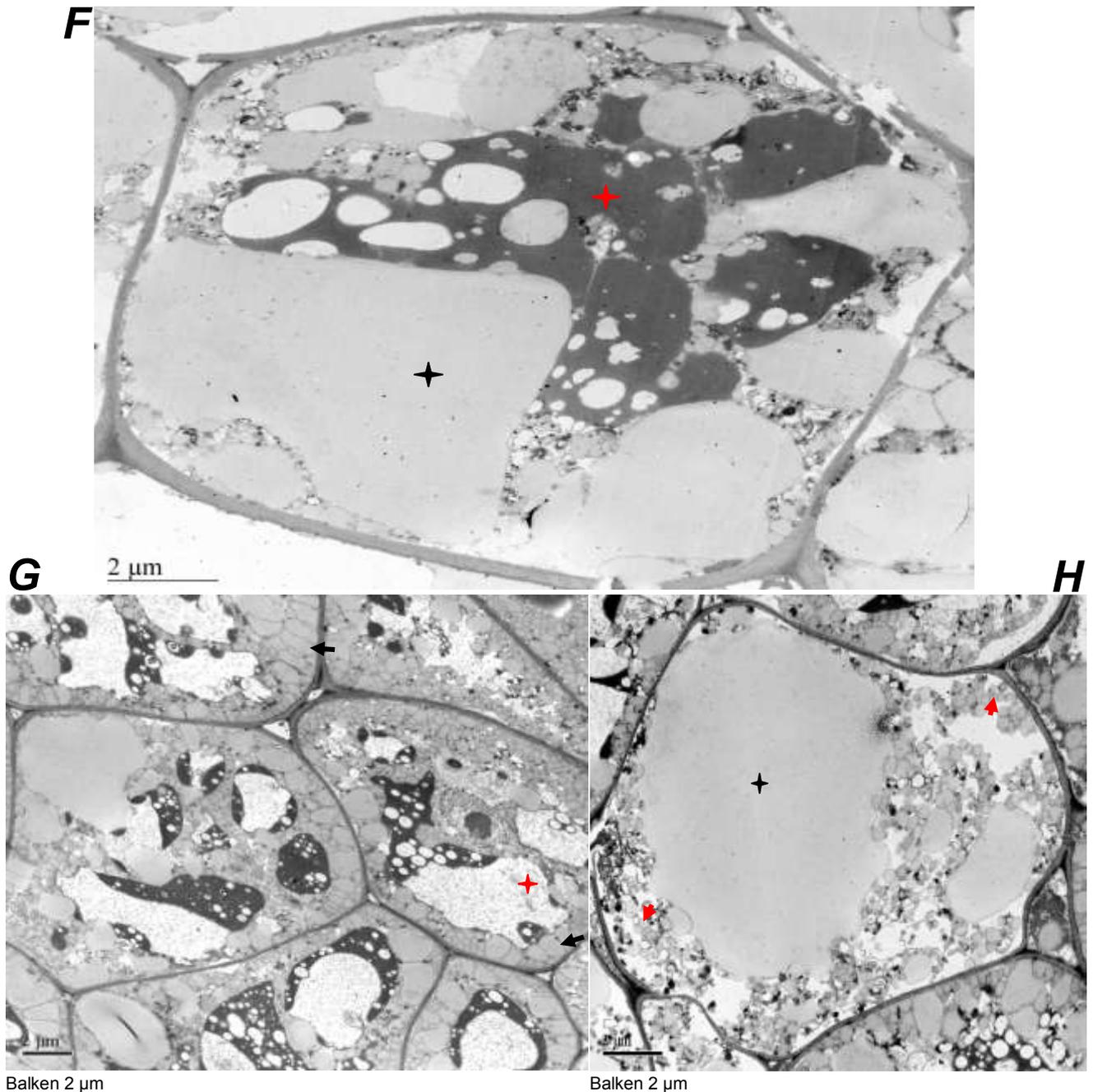
Oleosomen (roter Stern) klein, Proteinkörper (weißer Stern) zahlreich und dispers über den Querschnitt verteilt. Z.T. größere cytoplasmatische Bereiche sichtbar (rote Pfeile).

EM-Untersuchung der Arabidopsis-Samen **D - H****D**

D Kontrolle: Wildtyp, *A. thaliana*, Sorte: Columbia C24. Mikroskopische Übersicht über Mesophyllzellen aus dem Embryo eines abgereiften Samens. Cytoplasma von Oleosomen dominiert (Öl), Proteinkörper (weißer Stern) durchgehend homogen und elektronendicht.

E

E Feinmorphologie von Mesophyllzelle aus dem Embryo abgereifter Arabidopsis-Samen, transformiert mit „Inverted-repeat hairpin Gegensinn“-Konstrukt gegen Cytochrom b_5 **At5g53560** (Linie 4) unter Napinpromotor-Kontrolle. Oleosomenbildung auf Peripherie beschränkt, dort normal entwickelt. Proteinspeicher-Vakuolen (schwarzer Stern) weitgehend leer, außen mit hohlkugelartigen Strukturen (schwarzer Pfeil) übersät. Z.T. Stärke vorhanden (roter Pfeil). Schlechter Strukturerehalt im unteren Bildbereich präparationsbedingt.



F - H : Transgene *Arabidopsis thaliana* Mesophyllzellen

F Transformiert mit Cytochrom b_5 **At5g48810** in Gegensinn-Orientierung. Irreguläre Ölverteilung: Durchgehende Auskleidung des peripheren Cytoplasmas durch Ölkörper fehlt. Ausbildung weniger Oleosomen (schwarzer Stern) mächtigen Umfangs. Proteinkörper (roter Stern) mit normaler Entwicklungstendenz; deutlich zahlreichere und größere leere Bereiche sichtbar im Vergleich zum Wildtyp (**D**).

G + H Transformiert mit Cytochrom b_5 **At1g26340** in Gegensinn-Orientierung.

G Größerer Ausschnitt aus Mesophyll mit leeren bzw wenig Protein-gefüllten Speichervakuolen (roter Stern). Oleosomen z.T. mit regulärer Anordnung (Pfeile), jedoch deutlichen Größenunterschieden.

H Gelegentlich Zellen mit vollständiger Reduktion der Speicherprotein-Anlagen erkennbar. Oleosomen mit stark ausgeprägter Doppelmorphologie: extrem kleine dispers verteilte Ölkörper (rote Pfeilspitzen) sowie ein bis zwei sehr große Oleosomen die Hälfte des Zellvolumens ausfüllend (schwarzer Stern).

3.3 Expressionsansätze in *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana*

Zusätzlich zu Attenuationsstrategien wurde durch Genüberexpression versucht, die Anhebung der Membranstellfläche zu induzieren. Zurückgegriffen wurde auf die in der Literatur beschriebenen Sequenzen, mit denen ein entsprechender Erfolg in Hefe erzielt werden konnte (→ 2.21.1 – S. 105 und Tab. 1 im Anhang A). Da im Rahmen des NAPUS-Projektes die samenspezifische Expression in verschiedenen Wirtspflanzen wie Raps, Lein und *Arabidopsis* vorgesehen war, wurde auf LeB₄- und USP-Promotoren zurückgegriffen, die Aktivität in diesen Organismen besaßen. Als binäre Transformationsvektoren wurden pCAMBIA und pPZP benutzt. Die Transformation mit *Agrobacterium* an Rapspflanzen fand im Saaten-Union Resistenzlabor statt; die an *Arabidopsis* wurde in eigener Regie durchgeführt. Die Selektion der Pflanzen erfolgte in allen Fällen durch Anzucht auf Kanamycin-haltigen Kulturmedien.

3.3.1 Überprüfung auf Funktionalität in planta

Heterolog exprimierte Proteine, die nicht in das jeweilige Zielkompartiment der Wirtszelle integriert werden, können in aller Regel nicht die gewünschte Funktion ausführen und werden wegen fehlender Stabilität zumeist rasch abgebaut (Mechanismen siehe Einleitung 1.8.1). Daher bestand zunächst die Notwendigkeit zu überprüfen, ob heterologe Proteine die Fähigkeit besitzen, in pflanzliches ER integriert zu werden. Die Membranintegration erschien aus zwei Gründen wichtig:

einerseits ist in allen beschriebenen Fällen (Tab.1 - Anhang A und 1.9.1) Membraninsertion die wichtigste Voraussetzung für experimentell induzierte Membranproliferation, andererseits wurde ER-Proliferation mit den gewählten Genen bislang nur in Hefe gezeigt. Es war unklar, ob in einer Pflanze prinzipiell dieselbe Verankerung in die Membran-Zielstruktur erfolgen kann und dort ein ähnliches Phänomen erzeugt würde.

Eine Überprüfung in transgenen Pflanzen erfolgte mit der Membran-Verankerungsdomäne des Cytochrom b₅ aus Ratte. Die exakte Länge der Ankersequenz war im Gegensatz zu derjenigen anderer Proliferations-induzierender Gene durch zahlreiche Vorarbeiten ausreichend gut charakterisiert (George et al., 1989 und 1991; Mitoma und Ito, 1992). 43

Aminosäuren des C-Terminus dieses Proteins wurden C-terminal an die Sequenz des „Grün-fluoreszierenden Proteins“ (GFP) kloniert. Dieses Fusionskonstrukt wurde nach biolistischer Transformation transient in Epidermiszellen von Zwiebelschuppen exprimiert.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte in exprimierenden Zellen netzartige, kortikale Membranmaschen (Bildtafel 2 – Abb. *A*) und „leere“ Zellinnenräume mit Kernfluoreszenz und Signalen in Kortex und Plasmasträngen nach Transformation mit der GFP-Kontrollsequenz ohne CB₅-Membrananker (Abb. *B*).

Mit der Transmembrandomäne des heterologen Cb₅ als einfachstem Vertreter der „tail-anchored“- Proteine war demnach eine Verankerung in der ER-Zielmembran möglich. Durch Überexpression wurde nun versucht, den Umfang der Membranstellfläche zu vergrößern.

3.3.2 Samenanalysen

Die transgenen Pflanzen zeigten während der Entwicklung vielfältige Phänotypen, die z.T. Blütengröße, Achsenmorphologie, Staubblattentwicklung, Samengröße und –form betrafen. Dies mag hauptsächlich am Selektionsstreß durch Kultur auf Kanamycin-haltigen Nährmedien gelegen haben. Es ließ sich aber der Verdacht nicht ausräumen, daß die benutzten Promotoren außer im Samen während der Samenentwicklung auch in anderen Pflanzenorganen zu verschiedenen Entwicklungszeiten Aktivität besaßen.

So wurde von Meristem-Aktivität beim USP-Promotor berichtet (Projekt-interne Promotorstudien), und in einer jüngeren Untersuchung fand sich Aktivität der hier verwendeten samenspezifischen Promotoren auch in nicht-embryogenen Geweben (Zakharov et al., 2004).

Von derartiger „Fehlaktivität“ könnte die Fertilität der Pflanze sowie die Samenentwicklung betroffen sein. Tatsächlich blieben viele transgene Pflanzen steril (30-50% der CPR-, P450- und CB₅-Linien), bzw die Samen der T1-Pflanzen besaßen keine Keimfähigkeit. Bei ausreichender Menge Saatgut konnten Polarlipiduntersuchungen durchgeführt werden. Nachfolgend sind die Untersuchungsergebnisse für Raps- und Arabidopsissaaten graphisch dargestellt.

3.3.2.1 - *Brassica napus* -

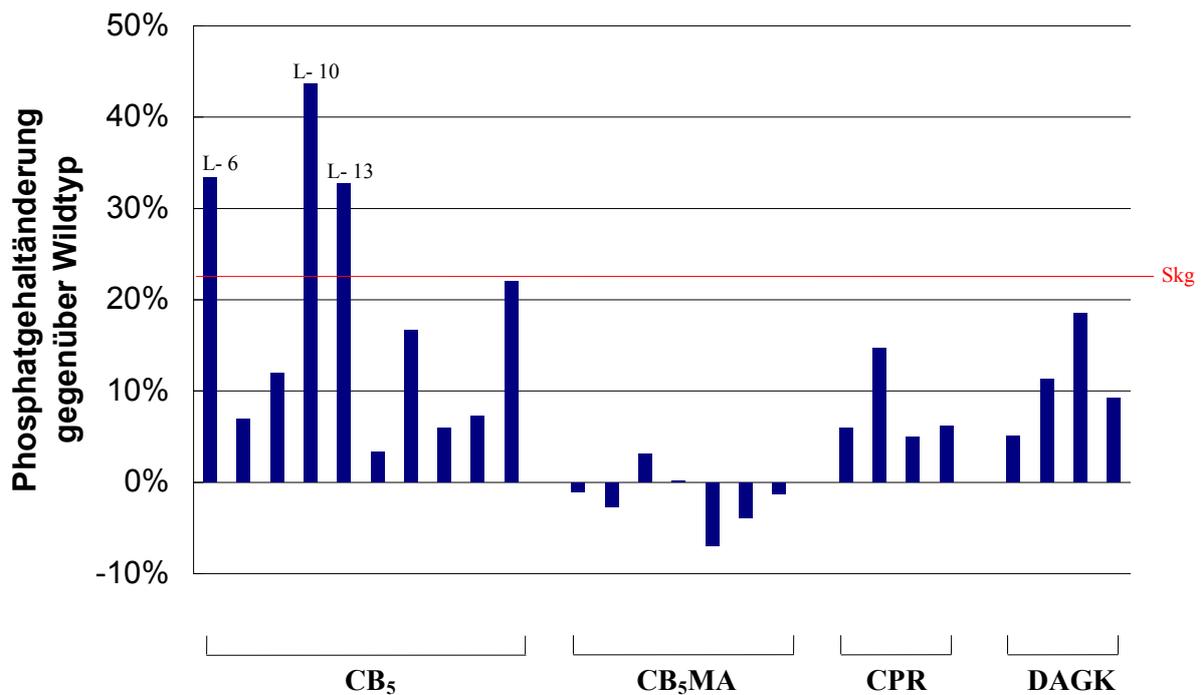


Abb. 5: Phospholipide in transgener Rapssaat

Lipidphosphat-Untersuchung an Rapssamen der Sorte Lisora . Saaten von Linien transformiert mit Cytochrom b₅ aus *Rattus norvegicus* (CB₅) sowie dessen Membrananker (CB₅MA), der Cytochrom P₄₅₀-Reduktase aus *Candida maltosa* (CPR) und der Diacylglycerol-Kinase aus *Escherichia coli* (DAGK). L-6/10/13: Transgene Linien mit signifikanten PL-Zunahmen.

Basiswert Wildtyp Lisora: 1793 nMol Lipidphosphat pro 100 mg

Skg. = Signifikanzgrenze

3.3.2.2 - *Arabidopsis thaliana* -

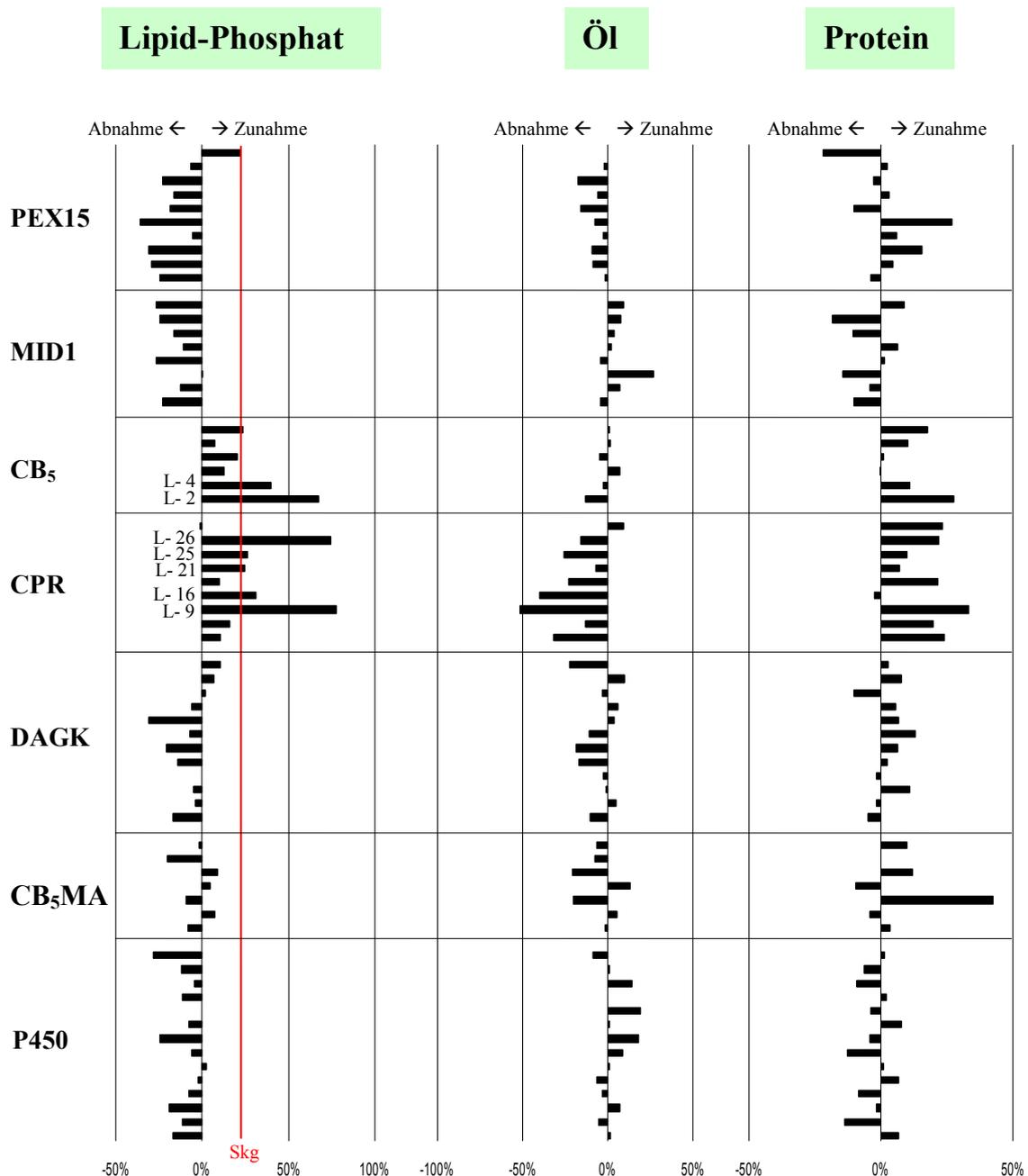


Abb. 6: Darstellung verschiedener Parameter im Vergleich zum Wildtyp

Untersuchung transgener *Arabidopsis thaliana*-Saaten. Ab- und Zunahmen von Lipidphosphat, Öl und Protein gegenüber Wildtyp als Profildarstellung. Heterologe Transgene: Peroxisomales Im-/Exportprotein Pex15p (PEX15) aus *Saccharomyces cerevisiae*, Mitose/Meioseprotein Mid1p (MID1) aus *Saccharomyces cerevisiae*, Cytochrom b₅ (CB₅) aus *Rattus norvegicus*, Cytochrom P₄₅₀-Reduktase (CPR) aus *Candida maltosa*, Diacylglycerol-Kinase (DAGK) aus *Escherichia coli*, Cb₅-Membrananker (CB₅MA) aus *R. norvegicus* und Cytochrom P₄₅₀ Isoform1 (P450) aus *C. maltosa*.

L-2/4/9/16/21/25/26: Transgene Linien mit signifikant veränderten PL-Gehalten.

Basiswert Wildtyp C24: 0,55 nMol Lipidphosphat/Samen (1601 nMol/100 mg); 4,6 mg Öl/Samen (~ 27 % v. Trockenmasse); 6,4 mg Protein/Samen (~ 37 % v. Trockenmasse).

Sk. = Signifikanzgrenze

3.3.2.3 Bewertung der Resultate

Bei Raps und *Arabidopsis* wurden gelegentlich deutliche Anstiege der Phospholipidgehalte detektiert. In den Raps CB₅-Linien bis zu 44 % (L-10) gegenüber dem Wildtyp; in *Arabidopsis* CB₅- und CPR-Linien Zunahmen von 67 % (L-2) bzw 78 % (L-9).

Von den CB₅- und CPR-Arabidopsislinien stand ausreichend Samenmaterial für Protein- und Ölgehalt-Bestimmung zur Verfügung. Die Darstellung dieser Gehalte in einem Vergleichsprofil gegen Phospholipid wies auf zweierlei hin:

- Mit beiden heterologen Genen schien die Phospholipidzunahme mit einer Proteinzunahme zu korrelieren. Da in allen Fällen das Gesamtprotein bestimmt wurde, mag dies an hohen Konzentrationen heterologen Proteins gelegen haben und nicht notwendigerweise auch an einer Zunahme der samentypischen Speicherproteine.
- Der Ölgehalt zeigte kaum eine Korrelation mit der PL-Entwicklung und blieb etwa auf Wildtyp-Niveau in den Saaten der CB₅-Linien. Er wies jedoch eine deutlich negative Korrelation mit der PL-Zunahme in CPR-Saaten auf. Die Ölgehalte lagen drastisch unter denen des Wildtyps.

Die Samen von Cb₅-Linien zeigten dem Wildtyp ähnelnde Morphologien in der Größe und Anordnung der Speicherkompartimente (wie Bildtafel 1- **D**). Feinstrukturelle Untersuchungen (Bildtafel 2) wiesen auf eine Vergrößerung der Fläche der Plasmamembran durch Faltung in Richtung Cytoplasma (**K**) oder Zellwand (**L**) hin, die sich z.T. über größere Areale erstreckte (**M**). Im Gegensatz dazu standen die Befunde in den CPR-Linien. Neben normal entwickelter Saat wiesen bis zu 20 % der Samen stark verkümmerte Embryonen auf, die kein Kotyledonenstadium entwickelten (**C + D** - Krüppel).

Während normal ausgebildete Samen dem Wildtyp glichen und keine Membrananomalität zeigten, unterschied sich die Feinstruktur der Mesophyllzellen der Krüppelsamen drastisch vom Wildtyp. Ein umfangreiches Endomembranengeflecht mit vielfachen Verbindungen zur äußeren Kernmembran kleidete das gesamte Cytoplasma aus (**E**), während an zahlreichen Stellen die Plasmamembran stapelartige Ausfaltungen zur Zellwand aufwies (**F**)³. Eine Wildtyp-ähnliche Ausgestaltung der Öl- bzw Proteinspeicherkompartimente wurde nicht gefunden. Weiße, schwach elektronenbrechende, runde Einschlüsse mit Anknüpfung an das endomembranäre Maschenwerk stellen möglicherweise das ölspeichernde Gegenstück zu den Oleosomen des Wildtyps dar, während nach Uranylkontrastierung stark elektronendichte

³ da die Gehalte in Abb. 6 einen Mix von „normalen“- und „Krüppel“-Samen wiedergeben, wären bei Analyse reiner Krüppelsaat höhere PL-Gehalte zu erwarten. Tatsächlich wiesen die Untersuchungen an je 5 mg Saat einen 2,4fach höheren PL-Gehalt auf (bezogen auf 100 mg: Linie 9 ~ 3892 nMol versus Wildtyp ~ 1612 nMol)

dunkle Bereiche im Zellkortex mit einem Durchmesser $< 0,2 \mu\text{m}$ und ohne Membranbegrenzung möglicherweise frei angereichertem Protein entsprechen.

Wegen der unzureichenden Feinstrukturerhaltung in abgereifter Rapssaat wurden Samen der CB₅-Linien, wie in 2.24.2 beschrieben, nach achtstündiger Quellung einer elektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Ähnlich den CB₅-Linien in Arabidopsissamen war auch in der transgenen Rapssaat keine morphologische Veränderung der Speicherkompartimente gegenüber dem Wildtyp Lisora feststellbar. Während jedoch in cytoplasmatischen Bereichen von Mesophyllzellen des Wildtyps nur wenig Membrananlagen erkennbar waren (**J**), waren diese im Cytoplasma transgener Mesophyllzellen vorherrschend und traten in zweierlei Form auf. Einerseits war überwiegend tubuläres, glattes und rauhes ER dispers verteilt (**G**), andererseits dominierte in anderen Zellen ein bläschenartiges, vesikuläres Membransystem (**H**). Plasmamembran-Einfaltung wurde nicht beobachtet.

Da zudem im Gegensatz zu den in 3.1.1 beschriebenen transgenen Saaten der Sorte Hanna keine merklichen Unterschiede bezüglich der Speicherkompartiment-Durchmesser sowie der Öl- und Proteingehalte pro Samen bestanden (**Protein-Gehalte pro Korn**: Wildtyp 0,528 mg \leftrightarrow Transgen 0,526 mg; Kompartiment-Durchmesser: Wildtyp 7,06 μm \leftrightarrow Transgen 7,11 μm . **Öl-Gehalte pro Korn**: Wildtyp 1,22 mg \leftrightarrow Transgen 1,05 mg, Kompartiment-Durchmesser: Wildtyp 1,2 μm \leftrightarrow Transgen 1,1 μm . **MZ-Durchmesser**: Wildtyp 20,1 μm \leftrightarrow Transgen 21,6 μm . Samenmasse: Wildtyp Lisora 3,7 mg \leftrightarrow Transgen 3,77 mg), schien der Zuwachs an Phospholipid auch ausschließlich in Form von zusätzlicher Membran in abgereifter Saat angelegt und nicht durch Änderung des Oberflächen/Volumenverhältnisses „kanalisiert“ worden zu sein. Offenbar proliferierten Membranen unterschiedlicher ER-Domänen.

3.3.3 Saatuntersuchung der Cb₅- und der CPR-Linien aus Arabidopsis

3.3.3.1 Keimungsverhalten der Krüppelsamen der CPR-Linien

Zur Gewinnung von Material für weitere Untersuchungen wurden morphologisch auffällige Samen dreier CPR-Linien (L-9, L-16 u. L-26) erneut in Anzucht genommen. Die Aussaat erfolgte auf Agarplatten unterschiedlicher Zusammenstellung hinsichtlich Antibiotikums- und Zuckerzusatz, die Ergebnisse waren wie folgt:

Agarplatten

	ohne Kanamycin ohne Saccharose	ohne Kanamycin mit Saccharose [#]	mit Kanamycin [*] mit Saccharose [#]
Keimungsrate:	23 %	30 %	26 %
* 30µg/ml			
# 1 % (w/v)			

Nur knapp ein Drittel der Samen war keimfähig. Die gekeimten Samen aller drei Anzuchtplatten zeigten jedoch nach einer Woche letale Morphologien (keine Durchwurzelung; weiße Blätter) und gingen ein. Da dies unabhängig vom Vorhandensein des Antibiotikums geschah und Saccharose als schnell verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle nicht zur Rettung beitrug, ließen sich aus diesen morphologisch überaus interessanten Samen keine Pflanzen regenerieren. Für eine umfangreichere Lipidanalytik wäre jedoch eine größere Saatmenge notwendig gewesen. Blattmaterial für Southern-Untersuchungen stand ebenfalls nicht zur Verfügung.

3.3.3.2 Überprüfung des Transgenstatus

Um den Transgenstatus zu verifizieren, wurde aus dem abgestorbenen Material ausreichend genomische DNA für PCR-Analysen extrahiert. Untersucht wurden die Linien L-9, L-16, L-25 und L-26 (Abb. 6).

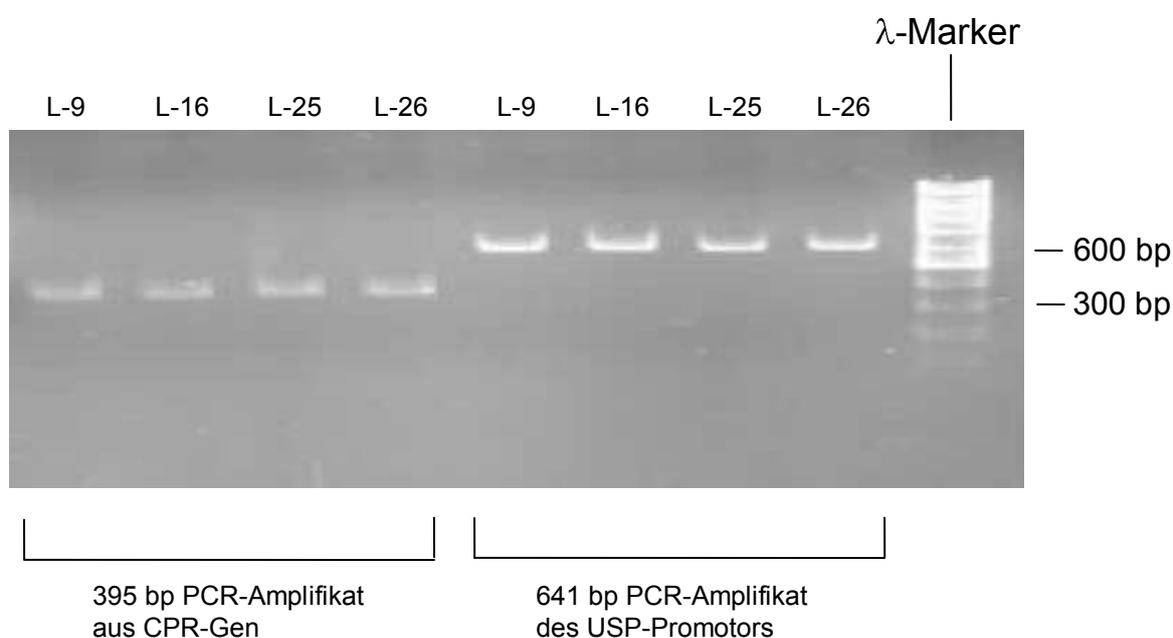


Abb. 7: PCR-Nachweis von Sequenzen der CPR und des Promotors.

Material: Blätter und Achsen abgestorbener Keimlinge (Kitextraktion).

Parameter = Initial 3 min 95°C, Zyklen: 30sek 95°C, 30sek 57°C, 30sek 72°C; 30x.

Produkt-typische Amplifikate konnten sowohl vom „Gen of interest“ als auch vom Promotor nachgewiesen werden.

3.3.3.3 *Neutrallipidgehalte im Vergleich zum Wildtyp*

Die mikromorphologischen Samenvergleiche von CB₅- und CPR-transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen mit der Wildtypsaat ergaben sichtbar weniger Ölkörper-ähnliche Strukturen in den verkrüppelten Samen der CPR-transgenen Pflanzen, jedoch eine dem Wildtyp entsprechende Oleosomenmorphologie bei den CB₅-Transgenen.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der verfügbaren Saat bestätigten den morphologisch gewonnenen Eindruck (Tab. 3 + Abb.8).

Tabelle 3 Relative Neutrallipid-Gehalte

Wildtypsamensamen	CPR-Krüppelsamen	CB ₅ -Samensamen
100 %	39,5 ± 2,3 %	98,7 ± 1,6 %

DC-Bandenintensität bestimmt über Adobe-Histogrammfunktion (Luminanz-Parameter) von gescannter DC-Platte (jpg). Mittelwerte (n = 3) ± $\sigma_{X_{\text{quer}}}$ (%).

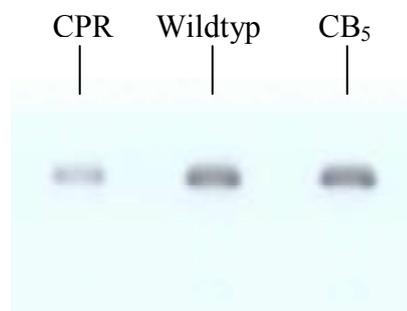


Abb. 8: Dünnschicht-Chromatographie der Chloroform-Eluate von *Arabidopsis*-Samen
Jeweils 5 mg Aufschlußmaßstab. Je 20 µl Auftragung aus je 3 ml Eluatvolumen. LM: Chloroform/Aceton 96 : 4. Die abgebildeten Banden entsprechen im RF-Wert dem TAG-Standard

Während sich der Ölgehalt transgener CB₅-Samen unter Berücksichtigung des Standardfehlers auf dem Wildtypniveau bewegte, war jener der CPR-Saat um das ca. 2,5-fache niedriger.

Eine signifikante Veränderung der Fettsäure-Zusammensetzung der Ölfraction gegenüber dem Wildtyp existierte nicht (FS-Verteilung wie Wildtyp in Anhang E1+E2).

3.3.4 Auswirkungen auf die Polarlipidzusammensetzung

Da die Glykolipid-Gesamtgehalte unverändert blieben, konnte davon ausgegangen werden, daß die festgestellten Membranflächenzunahmen auf angestiegenen Phospholipid-

konzentrationen beruhen. Aus ökonomischer Sicht war nun interessant herauszufinden, ob sich ohne weiteren experimentellen Ansatz einzelne Lipidspecies gegenüber anderen anreichern ließen.

Im Erfolgsfall wäre dies bei den Glykolipiden eine relative Zunahme (zu Lasten anderer GL), bei den Phospholipiden jedoch eine relative **und** absolute Zunahme, die eine zusätzliche Expression von Kopfgruppen-modifizierenden Enzymen überflüssig machen könnte.

3.3.4.1 Phospholipidverteilung im Vergleich zum Wildtyp

Da Plasma- und ER-Membranen höherer Pflanzen voneinander verschiedene Gehalte der einzelnen Phospholipide aufwiesen (siehe Einleitung Abb. 1; auch Bessoule und Moreau, 2004), bestand die Möglichkeit, entsprechende Musterverschiebungen bei Proliferierern von PM (CB₅) und ER + PM (CPR) gegenüber dem Wildtyp wiederzufinden.

Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt.

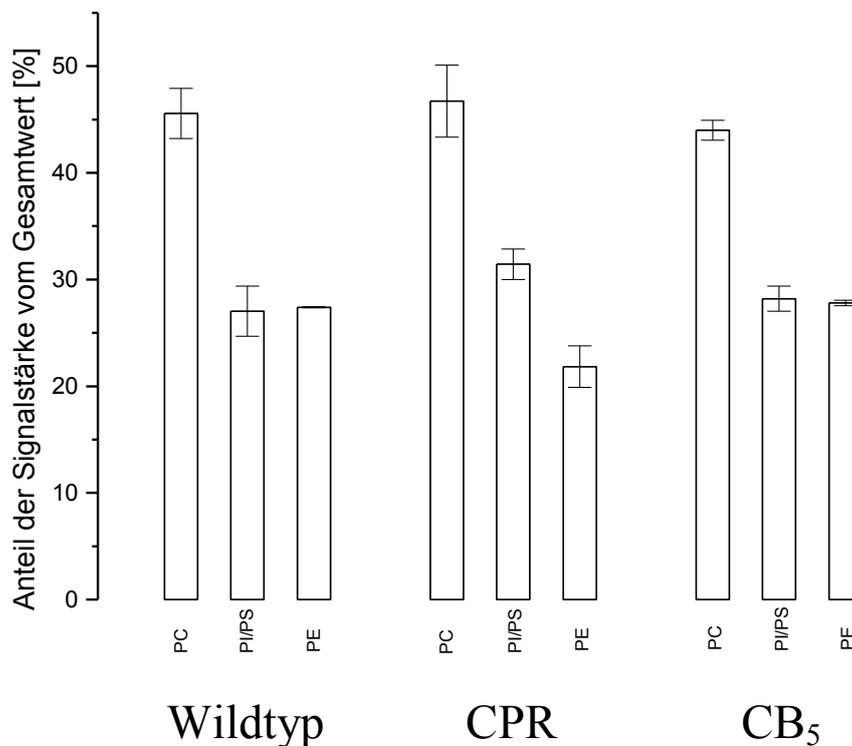


Abb. 9: Verteilung der Phospholipidgruppen bei CB₅- und CPR-Expression vs. Wildtyp DC-Bandenintensität bestimmt über Adobe-Histogrammfunktion (Luminanz-Parameter) von gescannter DC-Platte (jpg). Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE). Mittelwerte (n = 3) ± $\sigma_{X_{\text{quer}}}$ (%).

Ein entsprechender Vergleich der Phospholipid-Hauptgruppen zwischen CPR, CB₅ und Wt, zeigte keine signifikante Anreicherung einer Lipidgruppe und keine deutlichen Profilunterschiede. Die nach Bessoule und Moreau (2004) tabellierten Veränderungen der Zusammensetzung von ER zu Plasmamembran (PC 35 % → 18 %, PS 2,4 % → 5 %)⁴ fielen nicht eindeutig genug aus. Die PC-Abnahme in der PM-proliferierenden Cb₅-Saat war nur geringfügig und bewegte sich im Bereich des Fehlers. Dasselbe galt für die Zunahme der PI/S-Fraktion. Komplizierter lagen die Verhältnisse nach mikromorphologischer Untersuchung der CPR-Saat. Sowohl das ER als auch die Plasmamembran proliferierten, und Anstiege in den PC- und PS-Gehalten wären zu erwarten gewesen. Wiederum war die PC-Zunahme nur marginal und innerhalb des Fehlers; ein immerhin knapp signifikanter Anstieg fand sich in der PI/S-Fraktion. Die PE-Anteile lagen deutlich unterhalb der Gehalte von Wildtyp und Cb₅, obwohl nach Bessoule und Moreau (2004) mit konstanten PE-Konzentrationen zwischen 21 - 24 % für beide Membranarten zu rechnen gewesen wäre. Naheliegenderweise könnten die PI/S-Zunahmen (und ev. auch die von PC) zu lasten der PE-Fraktion gegangen sein. Möglicherweise bestand die Notwendigkeit, die Aufrechterhaltung der Membranphase durch Absenkung bilayer-destabilisierender Polarlipide zu erreichen, da bei derart dominierendem Stoffwechsel die Membranstabilisierung durch Substanzen aus anderen Stoffwechselwegen (z.B. Sterole, Zucker → 1.3.1 + 1.10) blockiert gewesen sein könnte.

⁴ alle Angaben in mol-%

3.3.4.2 Glykolipidverteilung im Vergleich zum Wildtyp

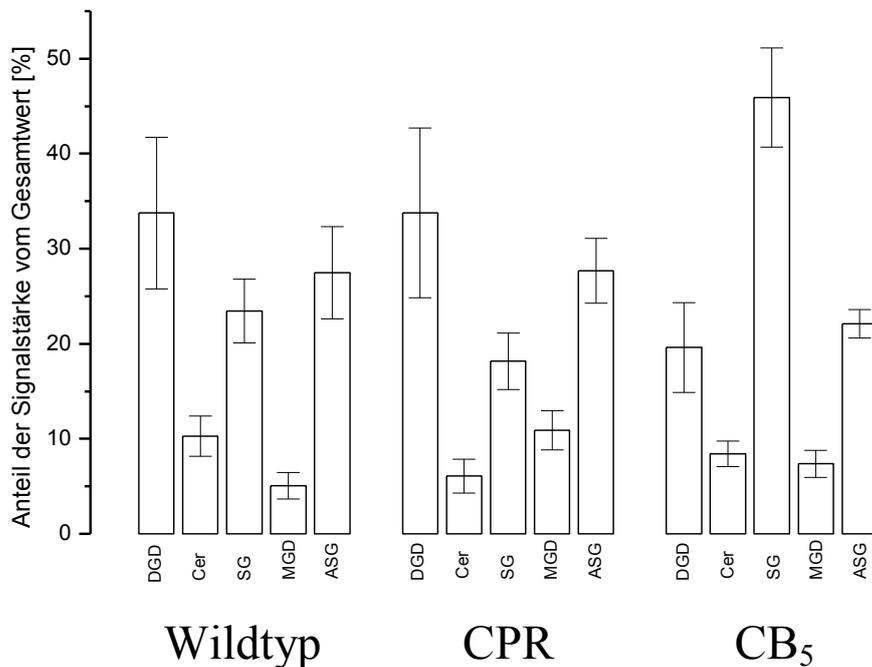


Abb. 10: Verteilung der Glykolipidgruppen bei CB₅- und CPR-Expression vs. Wildtyp
 DC-Bandenintensität bestimmt über Adobe-Histogrammfunktion (Luminanz-Parameter) von gescannter DC-Platte (jpg). Mittelwerte ($n = 3$) $\pm \sigma_{\text{quer}}$ (%).
 Mono- und Digalaktosyldiacylglycerol (MGD und DGD), Cerebrosid (Cer), Sterolglucosid (SG), Acyliertes Sterolglucosid (ASG).

Gemäß der nach Lochnit et al. (2001, Abb. 1 Einleitung) aufgeführten Darstellung wären Membran-Schwerpunktverlagerungen von ER zu Plasmamembran von einer Zunahme der SG- und ASG-Gehalte sowie einer Abnahme des Cer-Anteils begleitet. Dies fand sich nur teilweise bestätigt. Tatsächlich waren die Cerebrosidmengen gegenüber dem Wildtyp verringert: deutlich in der CPR-Krüppelsaat, moderat in den CB₅-Linien. Unterschiede traten im Sterolglucosidmuster auf: ein Anstieg um fast 80 % gegenüber Wildtyp in Plasmamembran-proliferierenden CB₅-Samen, wohingegen die CPR-Krüppelsaat sogar eine Abnahme verzeichnet. Acyliertes Sterolglucosid veränderte sich nicht signifikant.

SG und Cer schienen tatsächlich geeignet, Proliferation der Plasmamembran anzuzeigen und Cerebrosid selbst dann, wenn gleichzeitig ER-Proliferation stattfand.

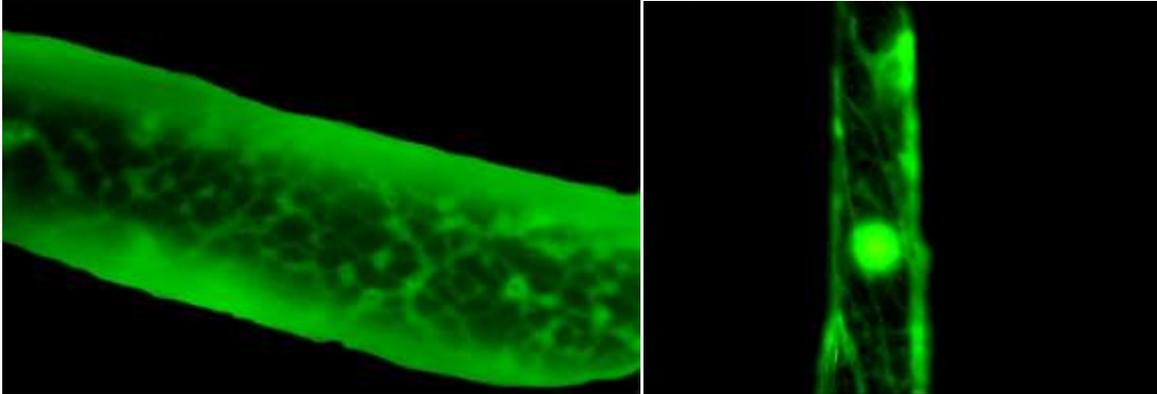
MGD- und DGD-Gehalte blieben nach Lochnit et al. (2001) zwischen ER und PM gleich.

Sie wurden dennoch mituntersucht, da es nicht ausgeschlossen werden konnte, daß im Falle starker Membranvermehrung die Zellen in akuten Phosphatmangel gerieten und daraufhin

Phospholipide durch Glykolipide ersetzen, wie unter entsprechenden Bedingungen in *Arabidopsis* gezeigt wurde (Dörmann und Benning, 2002; Härtel et al., 2000; Andersson et al., 2003). Die Anstiege der Gehalte der CPR-Krüppelsamen sind jedoch eher ursächlich auf die unvollständige Samenentwicklung zurückzuführen. Im Herz- und Torpedostadium waren die Thylakoide der Chloroplasten voll entwickelt (nicht gezeigt), sodaß höhere DGD- und (vor allem) MGD-Mengen auch zu erwarten waren.

Bildtafel 2: Darstellung der Pflanzen - Feinmorphologie - Auswirkungen der Sense-Expressionsansätze -

A + B



A+B Zwiebschuppen-Epidermiszellen aus *Allium cepa*. **A**: Transiente Expression des Fusionskonstrukts aus dem GFP-Protein und der C-terminalen, 43 Aminosäure langen Membranverankerungssequenz von Cytochrom b_5 aus *R. norvegicus* unter doppeltem 35 S-Promotor. Kortikales ER-Netz der Zell-Oberseite.

B: Transiente Expression einer Kontrolle mit cytosolischem GFP. Zell-Unterseite mit vereinzelt cytoplasmatischen Signalen und stark fluoreszierendem Zellkern.

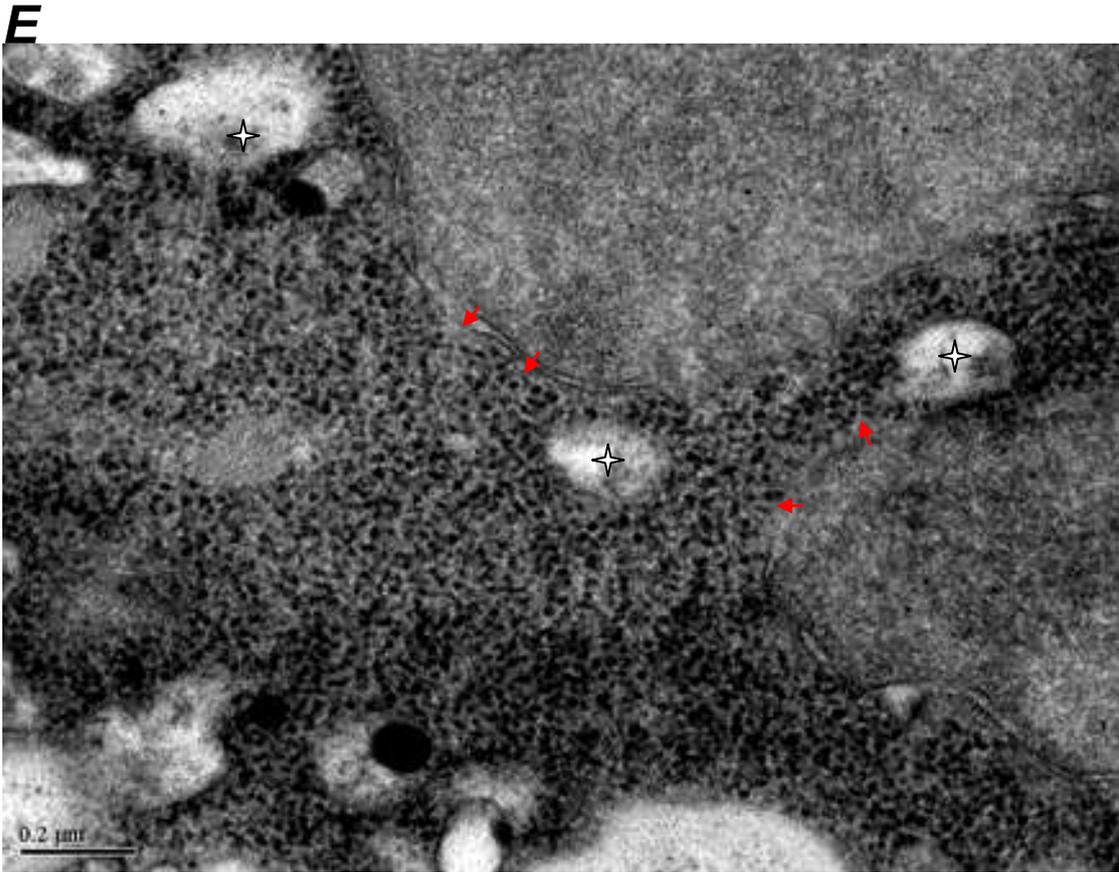
Parameter für **A+B**: Präparation 12 Stunden nach Particle Gun-Beschuß; Anregung mit 488 nm Wellenlänge. Aufnahme: 40x Objektiv (Zeiss Axiovert 35M) + Einstellung elektronischer Vergrößerung über Software IP3.

Transgene CPR-Samen

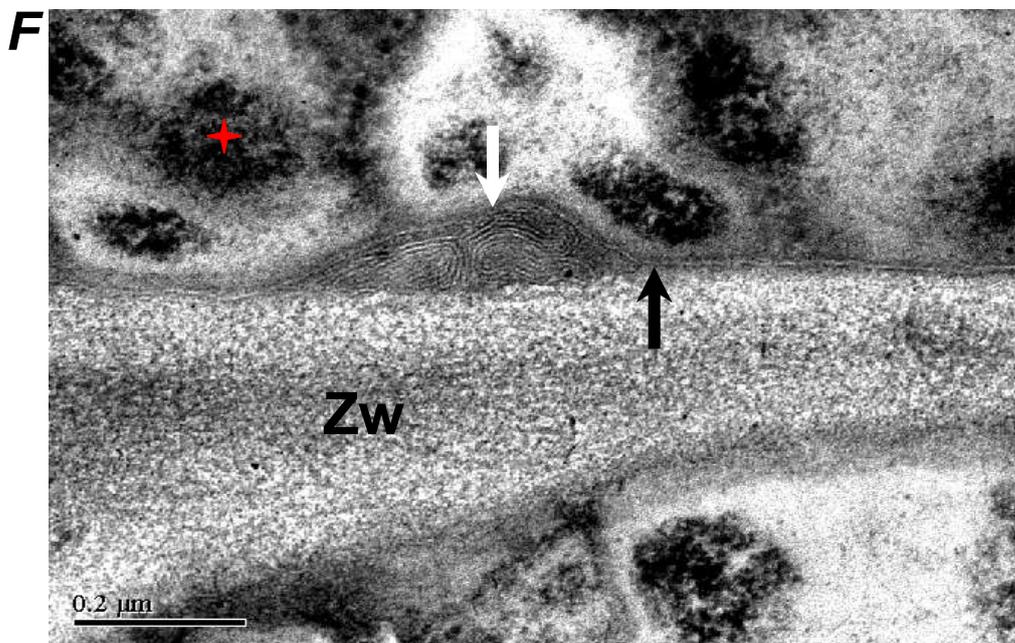
C + D



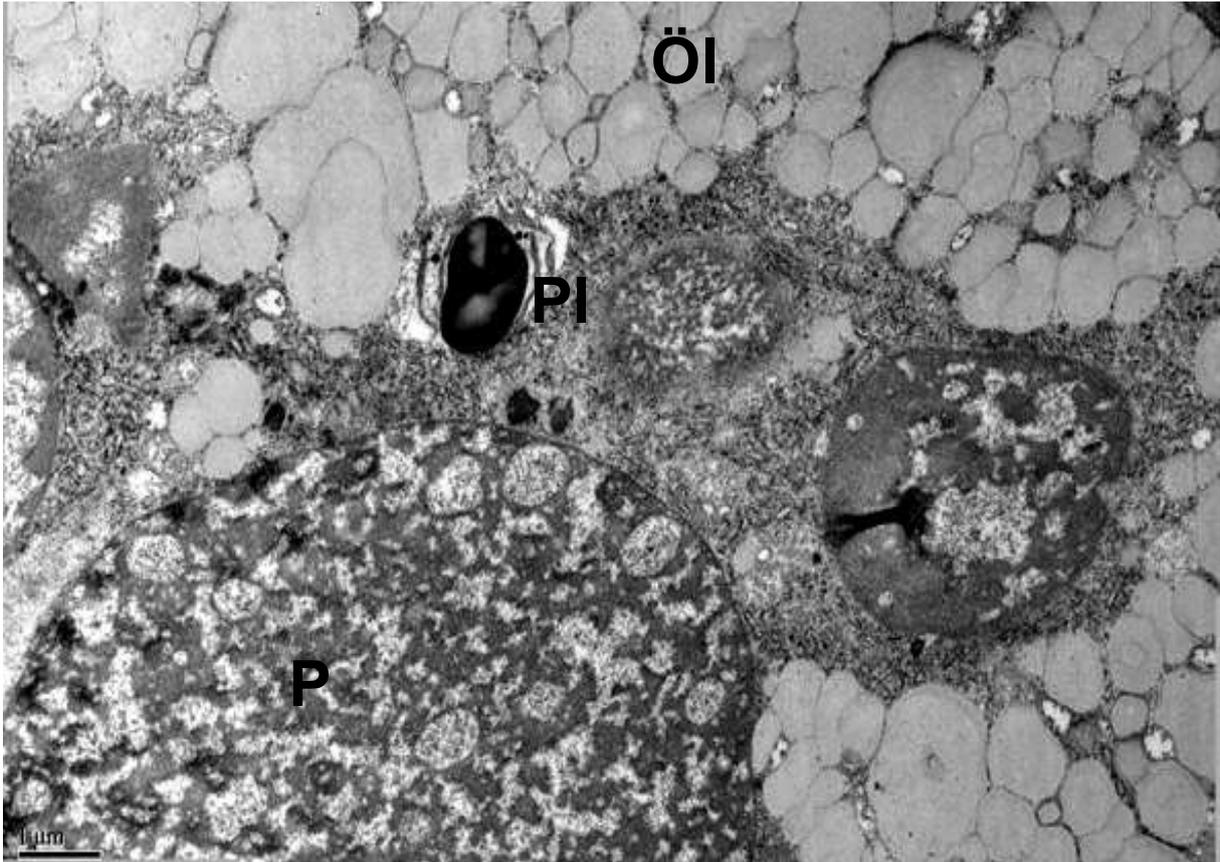
C+D Arabidopsissamen mit Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus *C. maltosa* unter USP-Promotor exprimiert. Präparation der Samen nach Abreife und einjähriger Lagerung. Links intakte Samen mit Testa, rechts präparierte Embryonen. 80-85% Wildtyp-ähnlich (normal), 15-20% Herzstadium-Morphologie (Krüppel) mit teils schraubigen (roter Stern), teils keuligen Achsen (weißer Stern).



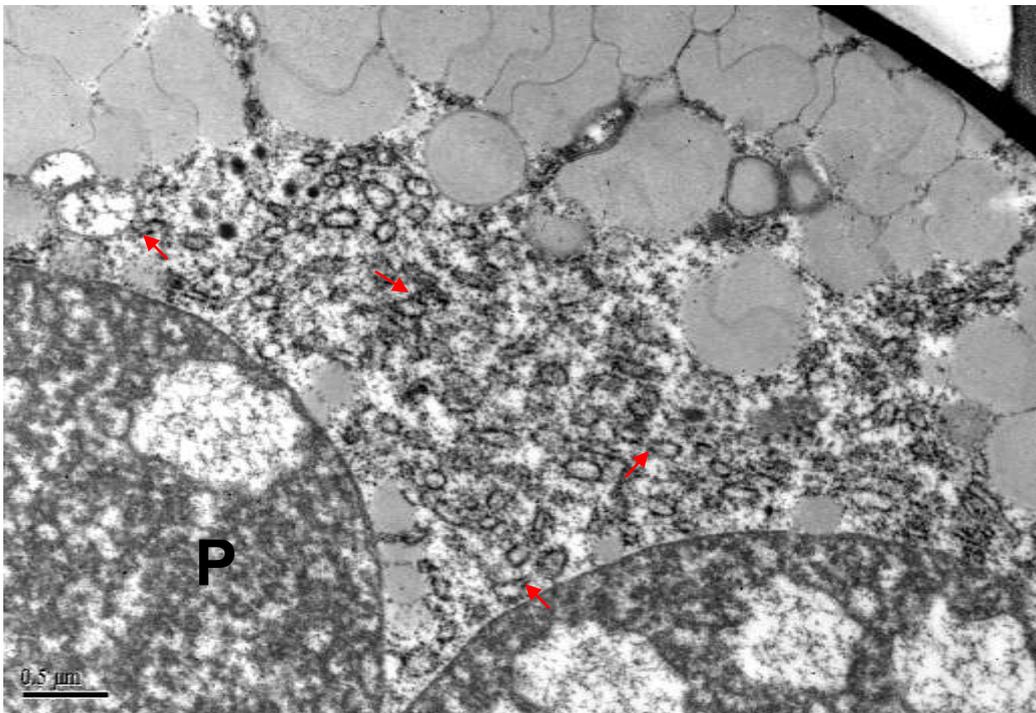
E Elektronenmikroskopische Darstellung einer Mesophyllzelle aus den in **C + D** gezeigten Arabidopsis-Krüppelsamen einer CPR-transgenen Pflanze. Präparation der Samen nach Abreife und einjähriger Lagerung. Endoplasmatisches Retikulum füllt als engmaschiges, durchgehendes Netz das Cytoplasma aus und umschließt hellere, kontrastschwache Körperchen (Sterne; Oleosomen?). Die Kontakte des ER mit der äußeren Kernhülle sind zahlreich erkennbar (rote Pfeile). Nuc = Zellkern



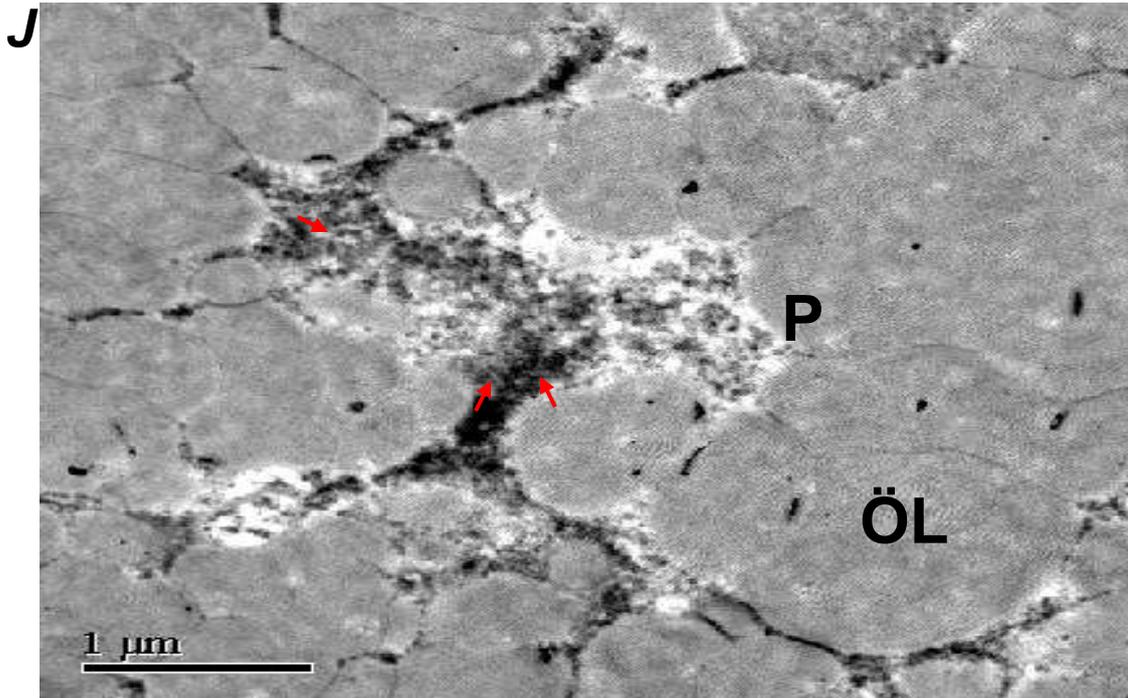
F EM-Darstellung einer Rindenparenchymzelle aus den Arabidopsis-Krüppelsamen in **C + D**. Präparation der Samen nach Abreife und einjähriger Lagerung. Plasmamembran (schwarzer Pfeil) an vielen Stellen mit stapelartigen Faltungen; häufig als Extrudierung in Richtung Zellwand (weißer Pfeil zeigt Ausfaltungsnah). Zytoplasma mit vielen dunklen Einschlüssen (rote Sterne (Speicherprotein?)). Zw = Zellwand

G

G EM-Aufnahme einer Schwammparenchymzelle aus dem Keimblatt eines *Brassica napus*-Embryos (Sorte Lisora). Samenspezifische Expression von Cytochrom b5 aus *R. norvegicus* unter Kontrolle des LeB4-Promotors. Samen nach Abreife und einjähriger Lagerung. Grobmorphologie der Oleosomen- und Proteosomenentwicklung Wildtypverhältnissen entsprechend. Das Cytoplasma wird von stark proliferiertem, rauhen und glatten ER dominiert. ER von dispers-tubulärer Anlage – keine Netzstruktur. P = Proteinkörper, PI = Plastid

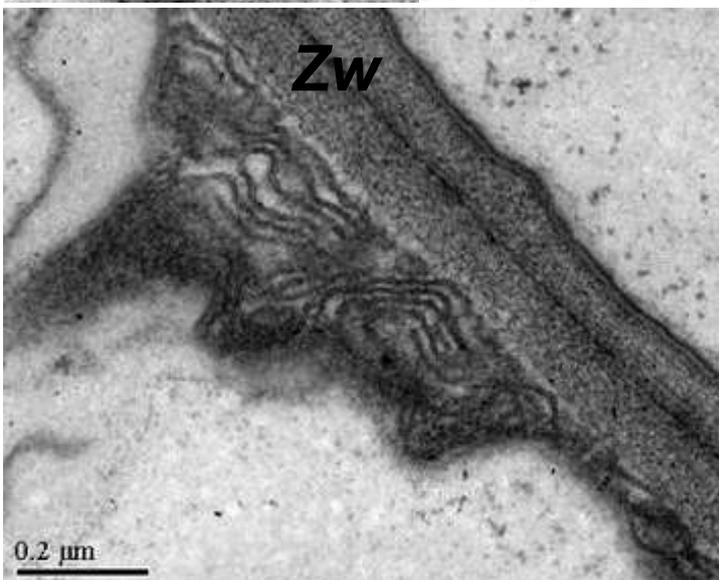
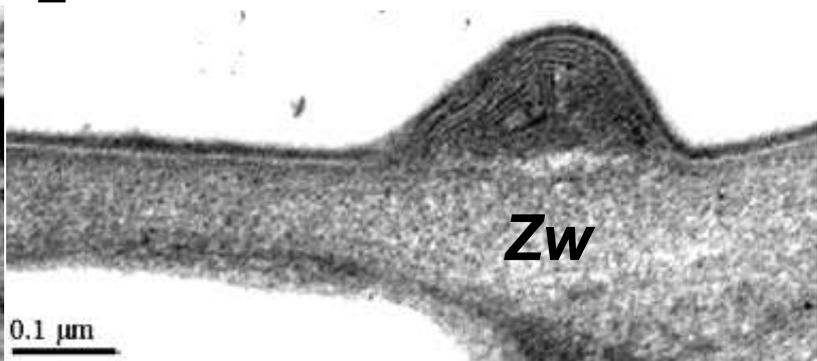
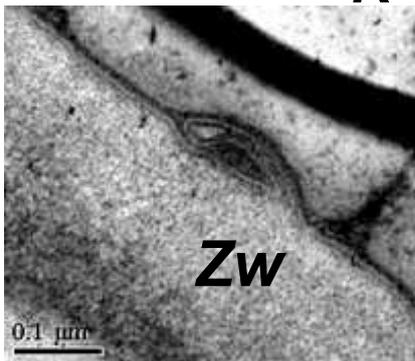
H

H Gleiches Präparat wie in **G**, andere Mesophyllzelle. Cytoplasma ausgefüllt von vesikulär-kaveolären Membranen deren Zusammenhang mit tubulären Strukturen teilweise erkennbar ist (rote Pfeile). P = Proteinkörper



J Wildtyp-Kontrolle. Feinmorphologie einer Schwammparenchymzelle aus dem Keimblatt eines *B. napus*-Embryos (Sorte Lisora). Samen nach Abreife und einjähriger Lagerung. Gelegentlich auftretende ER-Strukturen (rote Pfeile) dokumentieren das normale Ausmaß stoffwechselaktiver Zellen dieses letzten Reifestadiums.

K + L



M

K + L + M

Ultramorphologie des kortikalen Cytoplasmas von Palisaden- u. Schwammparenchymzellen aus transgenen *A. thaliana*-Embryonen. Samenspezifische Expression von Cytochrom b5 aus *R. norvegicus* unter LeB4-Promotor. Präparation unmittelbar nach Abreife der T3. Als Proliferationstyp tritt Plasmamembranfaltung auf. Die PM kann Invaginationen in Schleifenform in Richtung Cytoplasma vollziehen (**K**) oder apoplastisch in Richtung Zellwand extrudieren (**L**). Das Ausmaß der Faltungsanlage kann viele Membranlagen umfassen und ein größeres Plasmamembran-Areal umspannen (**M**). Zw = Zellwand

3.3.5 Abschließende Diskussion der Attenuations- und Expressionsansätze in Pflanze

Die beiden Versuchsansätze, Attenuation vs. Expression, schienen auf unterschiedlichen Wegen eine Membranvermehrung hervorzurufen. Im Fall des Cb₅-Attenuationsansatzes könnte durch eine Reduzierung des für die Synthese der Polyenfettsäuren erforderlichen Elektronentransports am ER die Fähigkeit zur Synthese von Triacylglycerolen begrenzt werden. Dies könnte dazu führen, daß geringere Lipidmengen pro Oleosom hergestellt und dafür an zusätzlichen ER-Bezirken mehr Oleosomen angelegt würden⁵.

Die Überexpression eines heterologen Cb₅ hätte keinen (hemmenden) Einfluß auf den örtlichen Elektronentransport, weshalb neben dem unveränderten Fettsäuremuster auch keine signifikanten Verkleinerungen der Oleosomendurchmesser feststellbar waren.

Überraschend konnte bei der Überexpression des Cytochrom b₅ in *Arabidopsis* eine Proliferation der Plasmamembran festgestellt werden, zumal die Expression des gleichen Gens in Raps auf ER-Proliferation hindeutete. Eine direkte Insertion in die PM kann wegen der zu kurzen Membranverankerungs-Sequenz (Pedrazzini et al., 1996) und wegen der dort vorherrschenden hohen Sterolkonzentrationen (30 mol-% und mehr, Abb.1, Einleitung) ausgeschlossen werden (Brambillasca et al., 2005).

Eine „Unterbringung“ des Cb₅-Proteins und die PM-Proliferation schienen in indirektem Zusammenhang zu stehen. Da das ER nach Staehelin (1997 → 1.6.2 Abb. 7b) aus distinkten, voneinander abgrenzbaren Domänen besteht, wäre es denkbar, daß eine Integration innerhalb von Bereichen mit hoher Polarlipid-Austauschkapazität wie z.B. dem „Transitional ER“ oder dem „Lipid-recycling ER“ den lokalen Anstieg der dortigen Membranmenge zur Folge hätte. Die zelluläre Antwort mit dem Ziel der Wiederherstellung der Homöostase könnte dann über Membranweitergabe an die Plasmamembran durch Vesikeltransport oder direkten Lipidtransfer erfolgen. Überstiege die Anlieferungskapazität den endocytotischen Rückfluß, wäre die Flächenzunahme auf die PM beschränkt. Da die PM im Gegensatz zum ER in Zellen von Samen- und Speichergewebe nicht am Speicherstoffwechsel teilnimmt, ließen sich zusätzliche Phospholipide am ehesten in der PM problemlos unterbringen, ohne den Stoffwechsel zu beeinträchtigen. Da Cb₅ spontan und ohne Vermittlung posttranslational in

⁵ Bei gleichem Energieaufwand wäre von längerer Samenentwicklungszeit auszugehen. Dies wurde bei einigen transgenen Linien (aber nicht bei allen) beobachtet. Die Entwicklung dauerte dort 5-8 Tage länger.

die Membran gelangt (Yabal et al., 2003; Brambillasca et al., 2005), wäre für dessen gezielte Anreicherung in bestimmten ER-Domänen jedoch ein (aktiver?) Sortierungsmechanismus zu fordern.

Die Überexpression der kotranslational in die ER-Membran integrierten CPR schien, da hier ebenfalls PM-Zunahme auftrat, zunächst einer analogen Sortierung bzw Anreicherung in bestimmten Membrandomänen zu unterliegen (s.o.). Daß die Aufnahmekapazität der PM überschritten und das gesamte ER von der Proliferation erfaßt wurde, mag eventuell am zeitlich größeren Aktivitätsfenster des benutzten Promotors liegen. Während nach eigenen Beobachtungen der LeB4-Promotor zu späteren Phasen der Samenentwicklung aktiv wurde, schien der USP-Promotor früher erkannt zu werden, wie Krüppelsamen in Herz- und Torpedostadium belegten.

Letztlich erscheint der Membranlipidanstieg als eine Folgeerscheinung mit dem Ziel, das ursprüngliche Protein/Lipidverhältnis der Membran wieder herzustellen. Andere Mechanismen einer direkteren Beeinflußung von Proteinen der Membranhomöostase durch Cb₅ und CPR wären prinzipiell ebenfalls denkbar, doch gibt es derzeit keinen Beleg für eine solche Beteiligung.

3.3.6

Zusammenfassung

– Membranproliferation in planta –

- ⇒ Die experimentelle Ausweitung der Membranfläche in Speicherzellen von Samen konnte in Ölsaaten sowohl durch Attenuation als auch durch heterologe Expression in einem begrenzten Rahmen verwirklicht werden.
- ⇒ Sie wurde ausschließlich mit Proteinen der Elektronen-Transportkette des ER erreicht.
- ⇒ Nach Art und Umfang ließen sich nach heterologer Expression zwei verschiedene Proliferationstypen unterscheiden:
 - mit zusätzlich angelegter distinkter Membranfläche, ohne Speicherstoffwechsel-Beeinträchtigung und von moderatem Ausmaß
 - mit zusätzlicher Membranfläche von Cytoplasma-dominierendem Ausmaß und starker Speicherstoffwechsel-Beeinträchtigung.
- ⇒ Die signifikante Anreicherung eines polaren Lipids durch Proliferation eines spezifischen Membrantyps gelang nur bei Sterolglucosid unter Proliferation der Plasmamembran, nicht aber bei Vertretern der Phospholipide.
- ⇒ Keine Membranproliferation wurde durch gerichtete Attenuationsansätze gegen Cytochrom b_5 in *A. thaliana* erzielt.

3.4 Expressionsversuche in Hefe

Nachdem demonstriert wurde, daß sich in Pflanzenzellen mit einem einzigen Expressionskonstrukt der Membran-Stellflächenumfang erweitern ließ, stellen die nachfolgend aufgeführten Versuche sowohl ergänzende als auch fortführende Versuchsansätze dar. Der schnelleren Durchführbarkeit wegen wurde *Saccharomyces cerevisiae* als Expressionsorganismus eingesetzt.

Die folgenden Versuchsansätze standen unter der Fragestellung:

Läßt sich Proliferation intrazellulärer Membranen mit gezielter Anreicherung einzelner Polarlipide kombinieren und mit einem einfachen Expressionsansatz realisieren?

3.4.1 Hefe-Screening

Eine elektronenmikroskopische Sichtung verschiedener Hefestämme, die Kopfgruppen-modifizierende Enzyme des Glyko- und Sphingolipidstoffwechsels exprimierten, wurde begonnen, da angenommen wurde, daß als „Nebeneffekt“ der Synthese eines modifizierten Enzyms auch der Stellflächenumfang für dessen Produkt zunehmen könnte.

Tabelle 4 gibt einen kurzen Überblick der untersuchten Genprodukte in Hefe. Die kodierenden Sequenzen stammten aus verschiedenen Projekten der Arbeitsgruppe und standen zum Zeitpunkt der morphologischen Untersuchung zur Verfügung:

Tabelle 4 EM-Untersuchung von Hefen nach Expression verschiedener Kopfgruppen-modifizierender Enzyme des Glykolipidstoffwechsels

Gen	Aus Projekt von...	Expressionswirt	Proliferation
Ceramid-Glucosyltransferase Nr.1	Leipelt (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein
Ceramid-Glucosyltransferase Nr.2	Leipelt (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein
Ceramid-Glucosyltransferase Nr.3	Leipelt (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein
Ceramid-Glucosyltransferase Nr.4	Leipelt (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein
Prozessive Diacylglycerol-Glucosyltransferase Nr.1	Leipelt (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein
Prozessive Diacylglycerol-Glucosyltransferase Nr.2	Jorasch (1999)	<i>Pichia pastoris</i>	Nein
Prozessive Diacylglycerol-Glucosyltransferase Nr.3	Jorasch (1999)	<i>Pichia pastoris</i>	Nein
Ceramid-Galaktosyltransferase Nr.1	Wesche (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein

Ceramid-Galaktosyltransferase Nr.2	Wesche (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein
Sphingolipid-Desaturase	Sperling (1999)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nein
Sterol-Glucosyltransferase	Warnecke (1999)	<i>Pichia pastoris</i>	Nein

Trotz der Anzahl der untersuchten Organismen mit den verschiedenen exprimierten heterologen Genen lieferte das morphologische Screening keine Evidenz für vermehrte Membrananlage.

3.4.2 Expression einer chimären heterologen Sequenz

Da offensichtlich kein Kopfgruppen-modifizierendes Enzym Membranvermehrung auslöste, wurde ein neuer Ansatz gewählt. Dabei wurde ein Protein des Glykolipidstoffwechsels mit der Membranverankerungsdomäne des Cytochrom b_5 fusioniert.

Die Vorteile der „modular“ aufgebauten Cytochrome b_5 bei der Kombination hybrider Proteine sind bereits in der Einleitung unter 1.8.1.1.2 dargelegt worden.

Hier wurden 43 C-terminale Aminosäuren des Cytochrom b_5 aus *R. norvegicus* hinter die kodierende Sequenz einer prozessiven β -Glukosyltransferase (YFPF) aus *S. aureus* kloniert. Die hohe Aktivität der in Hefe exprimierten Ypfp wurde im Rahmen einer anderen Arbeit gezeigt (Jorasch, 1999). Das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Analyse ist in Abb.11 dargestellt, jenes der mikromorphologischen Auswertung in Bildtafel 3 – Abb. **B**.



Abb. 11: Glykolidgehalt nach Expression eines chimären Proteins
 Expression eines Fusionskonstruktes im *S. cerevisiae*-Stamm SC334.
 YFPF = Gen der prozessiven β -Glukosyltransferase aus *Staphylococcus aureus*; YFPF-MA = 43 Aminosäuren vom C-terminalen Cytochrom b_5 -Membrananker aus *Rattus norvegicus* am C-Terminus der YFPF. Ernte- OD_{600} der Hefen $\sim 1,5$; 50 ml Anzuchtmaßstab. 25 μ l Auftragung aus 200 μ l Aufnahmevolumen der Aceton/Isopropanol-Fraktion

Leider besaß auch das Fusionsprotein Ypfp-MA kein Membranproliferationsvermögen (Abb. B). Zudem schien die Fusion mit dem Cytochrom b_5 -Membrananker die Aktivität der Ypfp erheblich zu beeinträchtigen. Durch entsprechende Messung per Scanner konnte nur mehr knapp ein Drittel der DGlcD-Signalstärke des unfusionierten nativen Enzyms detektiert werden (Abb.11).

Nach diesem Resultat wurde ein erneutes Zusammenfassen von Proliferations- und Modifizierungsfunktion in einem Konstrukt aufgegeben, und stattdessen die Anstrengung auf Verteilung beider Ansätze auf getrennte Kassettensysteme und deren Koexpression gelegt.

3.4.3 Kombinierte Expressionen in Hefe

Als starkes Membranproliferationskonstrukt wurde in allen nachfolgend beschriebenen Versuchen ein Doppelkassettensystem eingesetzt. Die erste Kassette trug ein Cytochrom P_{450} aus *C. maltosa* unter Kontrolle des Gal10-Promotors, die zweite Kassette trug dessen Elektronendonator, eine Cytochrom P_{450} -Reduktase aus demselben Organismus unter Kontrolle des Gal1-Promotors (kurz: P_{450} -CPR). Beide Kassetten befanden sich im multicopy-Plasmid pYEp51 (Leucin-Synthesedefizienz komplementierend).

Die Kopfgruppen-modifizierenden Gene des Polarlipidstoffwechsels (aus einem weiteren NAPUS 2000-Teilprojekt) standen ebenfalls unter Kontrolle des Galaktose-induzierten Promotors im Vektor pYES2 (Uracil-Synthesedefizienz komplementierend).

3.4.3.1 Erster Ansatz: Gezielte Steigerung des Phosphatidylcholingehaltes in Hefe

Innerhalb der Phosphoglycerolipide stellt PC in den meisten Eukaryoten wie auch in Hefe die Hauptkomponente dar, mit prozentualen Anteilen, die je nach Stamm, Ernährungszusatz, Anzuchtbedingungen und Auswerteverfahren meist zwischen 35 % und 60 % der Gesamt-Phospholipide liegen. Wegen der breitgefächerten industriellen Verwendungsmöglichkeiten (siehe 1.3.2.4) war zunächst eine gezielte PC-Anreicherung beabsichtigt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung stand die PC-Synthesesequenz aus *Sinorhizobium meliloti* (SmPCS) in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Deren Expression allein und *in concerto* mit P_{450} -CPR ist im Vergleich zum Wildtyp und P_{450} -CPR allein nachfolgend graphisch dargestellt.

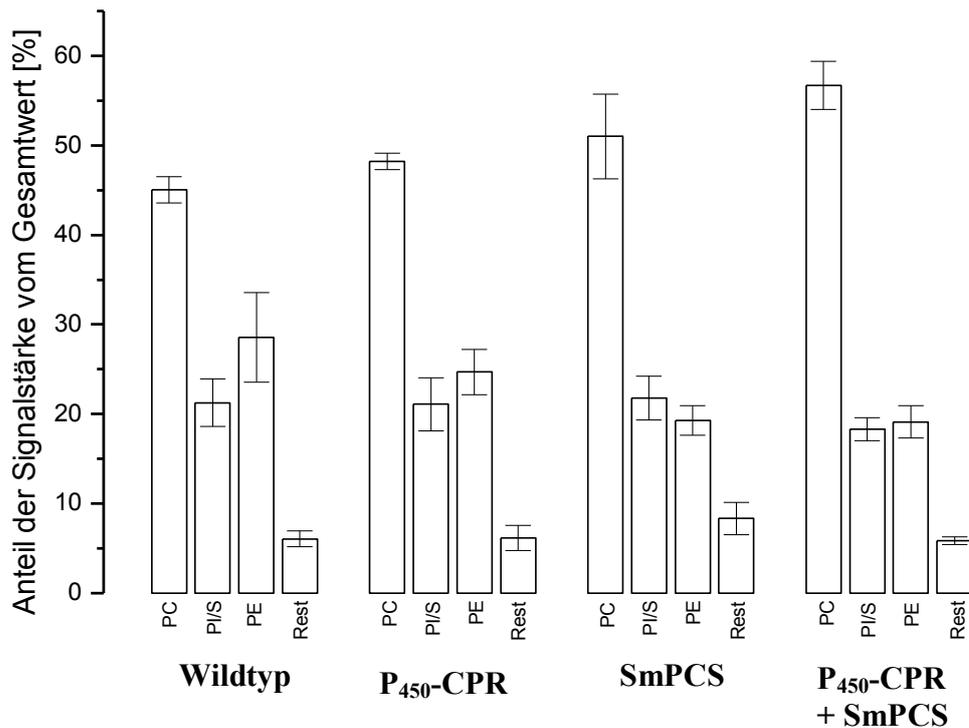


Abb. 12: PC-Gehalte unter Bedingungen erhöhter PC-Synthese und vermehrter Membrananlage

Phosphoglycerolipid-Hauptgruppen unter Einfach- (SmPCS), Doppel- (P₄₅₀-CPR) und Tripelexpression (P₄₅₀-CPR+SmPCS) in *S. cerevisiae* YS18. SmPCS = PC-Synthasegen aus *Sinorhizobium meliloti*.

Unter Induktionsbedingungen bis auf Ernte-OD₆₀₀ ~ 0,5 angezogen. Cholinzusatz in allen Kulturen = 10 µg/ml Cholinchlorid. Anzucht dreier unabhängiger Klone.

Ergebnisse als Mittelwerte aus $n = 3 \pm \sigma_{\text{quer}}$ (%). Auswertung: Densito-Einstellung (Luminanz) der Histogrammfunktion (Adobe Photoshop 5.5).

Bemerkenswert war der sukzessive Anstieg der gemittelten prozentualen PC-Anteile in der Reihenfolge Wildtyp, Membranproliferationskonstrukt, PC-Synthese- und Tripelkonstrukt. Scheinbar konnte die gekoppelte Expression einer PC-Synthase mit einem Membran-Proliferationskonstrukt (P₄₅₀-CPR+SmPCS) die PC-Synthese hochregulieren. Der Erfolg wird jedoch relativiert durch die recht große Wertestreuung innerhalb der PC-Fraktion bei Einfachexpression der SmPCS. Deren größter Wert lag auf Höhe des mittleren PC-Anteils der Tripelexpression, sodaß nicht sicher von einer zusätzlichen Steigerung des PC-Gehaltes unter Membranvermehrungs-Bedingungen ausgegangen werden kann. Keine Expression irgendeines SmPCS-Klons reichte allein für eine Erhöhung des Membranumfangs aus. Morphologisch entsprachen die Zellen weitgehend dem Wildtyp (siehe Bildtafel 3 – Abb. A).

Hieraus läßt sich folgendes vorläufiges Fazit formulieren: Tendenziell führt die Kopplung zwischen Proliferation und Kopfgruppensynthese zu gezielter Anreicherung von PC.

Es muß hier darauf hingewiesen werden, daß die Anreicherung einer Hauptkomponente erfahrungsgemäß schwieriger ist und im Erfolgsfall geringer ausfällt als bei Komponenten in niedrigeren Konzentrationen. Bedacht werden muß zudem, daß die SmPCS-exprimierenden Zellen aus einer einzigen, die des Tripelkonstruktes hingegen aus zwei Transformationen hervorgingen (P₄₅₀ + CPR auf einem Vektor). In einigen Untersuchungen korreliert die Expressionsstärke recht gut mit der Genkopienzahl (unabhängig davon, ob das Transgen plasmidär oder genomintegriert vorlag; Lang und Looman, 1995; Okkels, 1996; Wang et al., 2001; Barbier et al., 2004). Aus diesen Untersuchungen ergibt sich näherungsweise folgendes: Wird die optimale Kopienzahl für eine Maximalexpression des Transgens beispielsweise bei einem von fünf Transformanten erreicht, so wird die Maximalexpression für zwei Transgene aus zwei unabhängigen Transformationsereignissen erst bei einem von 25 Transformanten erreicht.

Trifft diese Überlegung hier zu, entsprach der moderate PC-Anstieg lediglich dem experimentell Möglichen.

Der leichte PC-Anstieg des Proliferationskonstruktes (ohne PC-Synthase) gegenüber dem Wildtyp steht in Übereinstimmung mit älteren Befunden. So führte die Überexpression desselben Cytochrom P₄₅₀ aus *C. maltosa* als Einfachkassette (ohne die Reduktase – im Ggs. zu dieser Arbeit) in *S. cerevisiae* ebenfalls zu einem leichten Anstieg des PC-Gehaltes (Menzel et al., 1997). Da dieses Resultat bereits über 25 Jahre zuvor im Rahmen der Untersuchung Phenobarbital-behandelter Rattenleberzellen beobachtet wurde (Young et al., 1971), scheint die Erhöhung der PC-Konzentration unter (ER-) Membran-Induktionsbedingungen zumindest ein häufiger zu beobachtendes Merkmal der Proliferation zu sein. Als dominantes Charakteristikum typischer ER-Anreicherung muß ein erhöhter PC-Gehalt aber nicht unbedingt gelten, da im Gegensatz zu Pflanzen (Abb.1-Einleitung, Lochnit et al., 2001) in Hefe der PC-Gehalt des ER nicht soviel dominierender gegenüber anderen Endomembranen ausfällt (51 % vs. 45-50 % für Peroxisomen-, Kern-, Vakuolen, Lipidkörper- und mitochondrialer Außenmembran - Zinser et al., 1991).

Ob eine PC-Konzentrationserhöhung als *das* Kennzeichen für induzierte Membransynthese gewertet werden kann, erscheint ebenfalls unsicher. Murata et al. (2003) fanden in Hefe unter Bedingungen Dimethylsulfoxid-induzierter Steigerung der Phospholipidgehalte keinen Konzentrationsanstieg der PC-Fraktion.

Eine Abnahme der PE-Fraktion konnte durch Young et al. (1971) festgestellt werden, die eine PC-Synthese zu Lasten von PE beobachteten (durch sukzessive Methylierung).

3.4.3.2 Zweiter Ansatz: Gezielte Anreicherung der MGD- und DGD-Gehalte in Hefe

Mit einem analogen Ansatz wurde die Konzentrationssteigerung von Glykolipiden untersucht. Verwendet wurden ein MGD-Synthasegen (hier: β Gal-Diacylglycerol-Synthase) und eine DGD-Synthasesequenz (YPFP) (hier: β Glc β GlcD wie in Abb. 11), die beide in der Arbeitsgruppe verfügbar waren. Das Chromatogramm der Glykoglycerolipid-Untersuchung (Abb.13) sowie eine graphische Darstellung der relativen GL-Verteilung (Abb. 14a) und des GL/ PL-Verhältnisses (Abb. 14b) sind nachfolgend wiedergegeben:

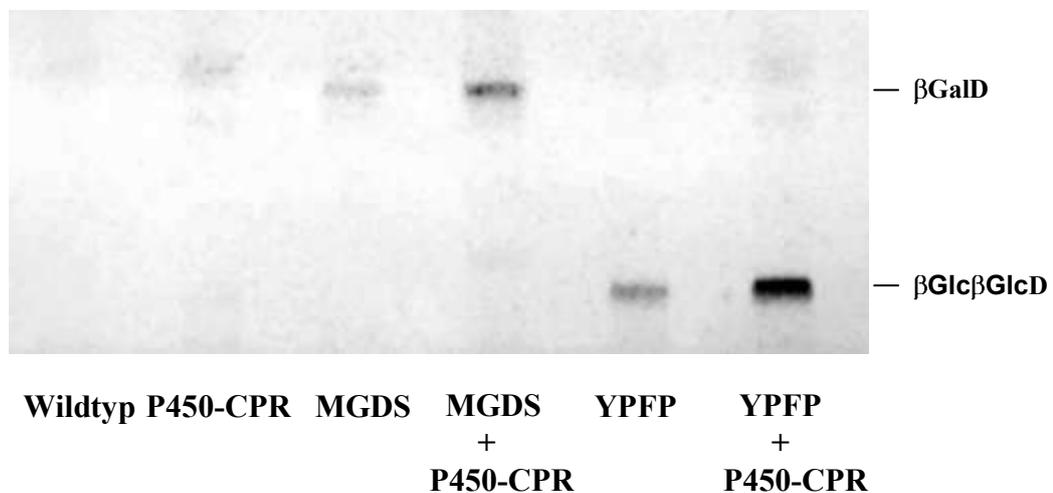


Abb. 13: Biosynthese von Glykoglycerolipiden unter Bedingungen induzierter Membransynthese
 Expression der Gene von Glykoglycerolipid-kopfgruppenmodifizierenden Enzymen in *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm YS18. **Wildtyp** = YS 18; **P₄₅₀-CPR** = Koexpression von Cytochrom P₄₅₀ und NADH-Cytochrom P₄₅₀-Reduktase aus *Candida maltosa* in pYE51; **MGDS** = Expression der β Gal-Diacylglycerol-Synthase aus *Chloroflexus aurantiacus* in pYES2; **YPFP** = prozessive β Glc- β Glc-Diacylglycerol-Synthase aus *Staphylococcus aureus* in pYES2; **MGDS + P₄₅₀-CPR** und **YPFP + P₄₅₀-CPR** = Tripelexpression der oben aufgeführten Konstrukte. Ernte-OD₆₀₀ ~ 1,5; 50 ml Anzuchtmaßstab. DC-Auftrag: 30 μ l aus 600 μ l Aufnahmevolumen der Aceton/Isopropanol-Fraktion.

β GalD-Gehalt

MGDS-Expression

28,7 \pm 5,1%

MGDS & P450-CPR-Expression

β Glc β GlcD-Gehalt

YPFP-Expression

31,8 \pm 4,1 %

YPFP & P450-CPR-Expression

Abb. 14a: MGD- und DGD-Gehalte unter Expression der MGD- und DGD-Synthasen allein (graue Kästchen) und deren kombinierter Expression zusammen mit dem Membranproliferationskonstrukt P450-CPR (schwarze Kästchen)

Direkt-Auswertung mehrerer DC-Auftragungen per TLC-Scanner des HPTLC-Systems. Signal der Triplexprimierer gleich 100 % gesetzt. Graue Kästchen = Prozentualer Anteil der Signalstärke der MGDS- und YPFP Kopfgruppenexprimierer vom Signal der Triplexprimierer.

Mittelwerte (n = 4) \pm σ_{xquer} (%)

Genexpression von:

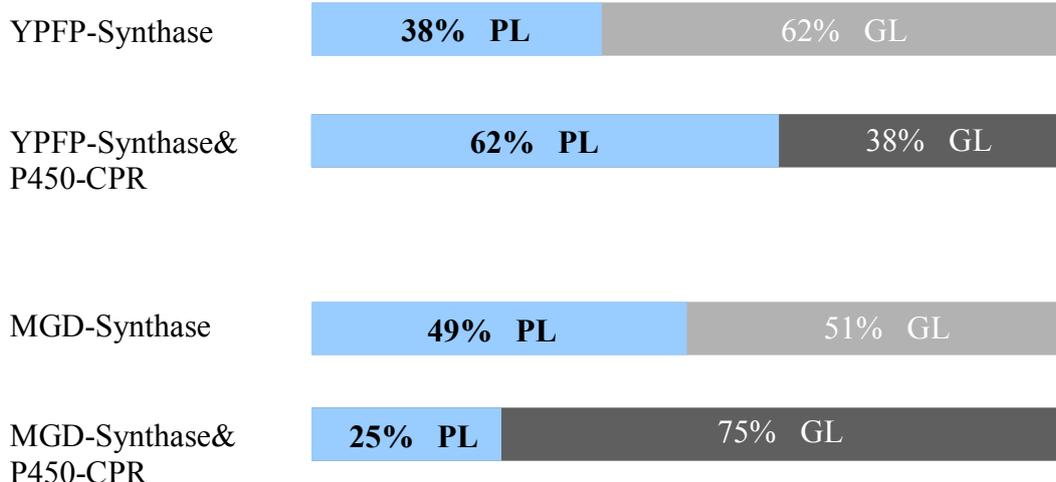


Abb. 14b: Relative Verteilung von Phospho-(PL) und Glykoglycerolipiden (GL: β GalD/ β Glc β GlcD) - 10 Stunden nach Induktion der Genexpression

Phospho- und Glykoglycerolipidanteile der in Abb. 13 analysierten Kulturen. Die Konzentrationen von Lipidzucker und -Phosphat wurden teils nach vorhergehender DC-Trennung, teils direkt aus dem Extrakt wie in 2.22.7 und 2.22.8 beschrieben, kolorimetrisch gemessen. Die direkte Bestimmung aus dem Extrakt lieferte übereinstimmende Ergebnisse, da nur sehr geringe Mengen anderer Glykolipide (Cerebroside, acylierte Sterolglycoside) detektierbar waren (siehe Abb. 13). Obwohl Ypfp prozessiv ist, wurde bei der Kalkulation des Glykoglycerolipid-Gehaltes von der Annahme ausgegangen, daß 1 nMol ihres Reaktionsproduktes = 2 nMol Glukose entspricht, da dieses Enzym überwiegend β Glc β GlcD synthetisiert.

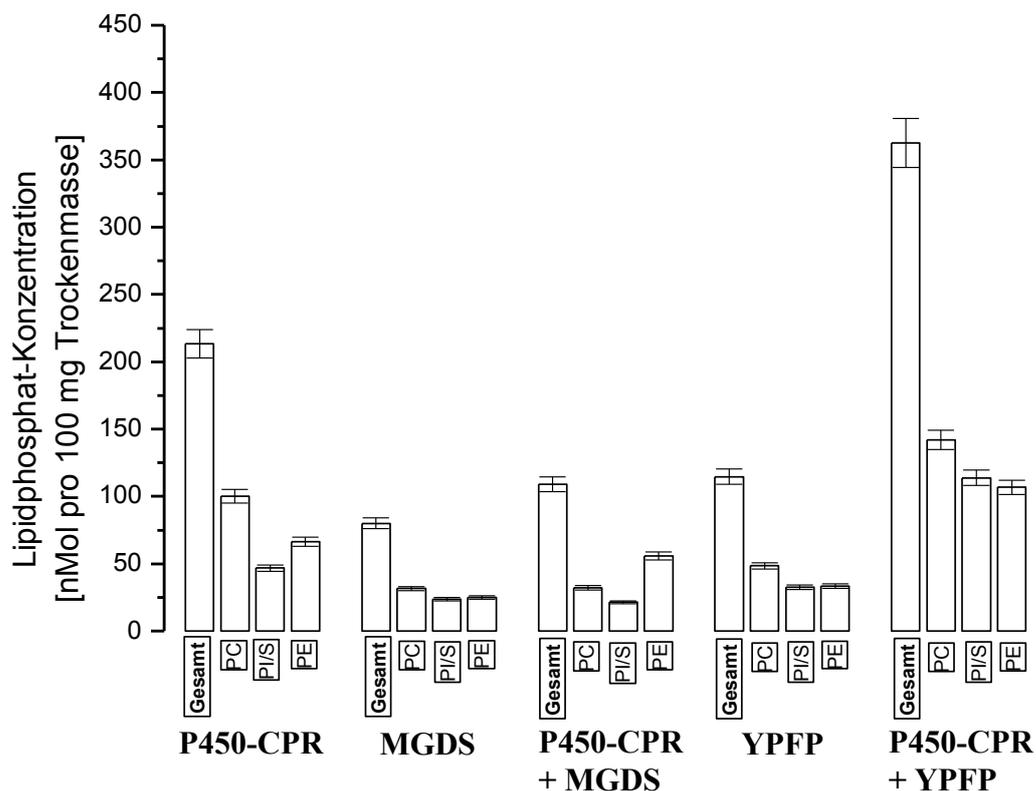


Abb. 15: Konzentrationen und Verteilung der Phosphoglycerolipide

Gesamtlipid-Phosphatgehalte und Anteile der Phosphoglycerolipid-Fractionen der in Abb.13 dargestellten und beschriebenen Glykoglycerolipid-Expressionskulturen. Photometrische Analyse des Gesamt-P_i an je 20 µl aus 800 µl Methanolfraction. DC-Auswertung der Anteile der drei PL-Hauptgruppen per TLC-Scanner (CAMAG) und Zuordnung des Anteils am Gesamtwert. Mittelwerte aus $n = 3 \pm \sigma_{\text{Xquer}}$ (%).

Das Ziel, eine gezielte Anreicherung von Polarlipiden unter Membranproliferationsbedingungen erzeugen zu können, wurde hier erreicht. Zeigte die PC-Konzentration nur eine moderate Zunahme (Abb.12), so wiesen die Gehalte der beiden Glykoglycerolipide unter Bedingungen kombinierter Expression eine Verdreifachung auf (Abb.14a). Hilfreich war dabei einerseits, daß der Wildtyp-Expressionswirt *Saccharomyces cerevisiae* keine Glykoglycerolipide synthetisiert und somit ein „verwässernder Expressionshintergrund“ – Problem bei der PC-Anreicherung - nicht auftreten konnte. Weiterhin stellte das Fehlen von Chloroplasten keine Limitierung der MGD/DGD-Unterbringung dar. Gerade in jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, daß z.B. in Pflanzen unter Phosphatmangelbedingungen Mono- und Diglykosyldiacylglycerole auch in nicht-plastidären Membranen auftreten und dort Phospholipide mit analogen Eigenschaften ersetzen, ohne die Funktion der Kompartimente einzuschränken (Härtel et al., 2000; Kelly und Dörmann, 2004; Jouhet et al., 2004).

Die gezielte proliferationsinduzierte Anreicherung jener Polarlipide wurde erstmals in dieser Arbeit mit Erfolg demonstriert, obgleich Bäckerhefe kein neuentdeckter Expressionswirt für Enzyme der Glykoglycerolipid-Synthese ist und gelegentlich bereits eingesetzt wurde (s. Hölzl et al., 2005).

Die Auswertung der Morphologie der Endomembranen ergab keine Unterschiede in den untersuchten Hefen. Sowohl Zellen mit MGalD- als auch DGlcD-Synthese zeigten unter Proliferationsbedingungen zwei verschiedene Proliferationsanlagen:

- den geordnet-geschlossenen, karmellaeähnlichen Typus (Bildtafel 3 – **D**; YFPFP dargestellt.).
- den dispersen Typus (Bildtafel 3 – **E**; YFPFP dargestellt.).

Da in einzelnen Objekten beider Typen gelegentlich der Kontakt zur äußeren Kernhüllmembran beobachtet werden konnte (nicht gezeigt), kann mit großer Wahrscheinlichkeit von ER-Proliferation ausgegangen werden. Eine Plasmamembraneinfaltung (wie in Bildtafel 2 – **F**, **K**, **L**, **M**) wurde nicht festgestellt. Entsprechend plausibel erscheint die Anreicherung der neusynthetisierten Glykoglycerolipide in ER-Membranen. Eine exakte Verifikation an subzellulären Membranfraktionen steht noch aus.

Ebenso interessant wie unerwartet war in den vier Expressionsansätzen die Verschiebung des Verhältnisses von Glyko- zu Phosphoglycerolipiden (Abb. 14b). Bereits die (Über-) Expression der Kopfgruppen-modifizierenden Enzyme führte zu dominanten Glykoglycerolipid-Gehalten, was darauf hinwies, daß die Gehalte von polaren Lipiden mit Galaktose und Glukose als Kopfgruppe gleichermaßen gut vermehrbar waren.

Während jedoch unter Proliferationsbedingungen der MGD-Anteil noch einmal anstieg und $\frac{3}{4}$ der gesamten Membranlipide darstellte, sank der DGD-Gehalt unter diesen Bedingungen von 62 % auf 38 %.

Da von proliferiertem ER ausgegangen werden mußte (s.o.), schien die Unterbringung von DGlcD in diesen Membrantyp nur begrenzt möglich zu sein. Nicht untersucht wurde, ob dieses Glykolipid dann andere Endomembranen oder die Plasmamembran „besiedelte“ und ob Glukose statt Galaktose als Kopfgruppe von Einfluß war. Lediglich die starke ER-Stellflächenvermehrung (Bildtafel 3 - D + E) deutete an, daß DGlcD wohl nicht vom ER

ausgeschlossen wurde. Mit MGD schien es sich genau entgegengesetzt zu verhalten. Die Zunahme unter Proliferationsbedingungen deutete eher in Richtung einer Präferenz für das ER.

Die MGD-Dominanz wies auch auf eine besondere Regulation innerhalb der Phosphoglycerolipide hin (Abb. 15). So bildete PE unter „P450-CPR+MGDS“-Expression die Hauptkomponente. Dies führte zum paradoxen Ergebnis, daß als Reaktion auf die Anreicherung eines „klassischen“ non-Bilayer Lipids (MGD) mit der Anreicherung eines weiteren non-Bilayer Lipids (PE) reagiert wurde.

Wie läßt sich dieser Befund interpretieren?

Ohne Rückgriff auf die unter 1.3.1 aufgeführten Bilayer-stabilisierenden/ destabilisierenden Faktoren, findet sich kein Erklärungsansatz für dieses Phänomen.

Da die Synthese von MGD keinerlei bekannten Einfluß auf Parameter wie Wassergehalt, pH-Wert, Salzstärke, Temperatur und (divalenten) Kationengehalt einer Zelle ausübte, kam der Fettsäuresaturierungsgrad als verbleibendes Stellglied für die Membranphasen-Regulation in Betracht. MGD (und auch PE) sind nur unter Besetzung mit ungesättigten Fettsäuren als nichtlamellare H_{II} -Bildner einzustufen, wobei die kritische Doppelbindungszahl für MGD bei 4,5 liegt (Gounaris et al., 1983). Sinkt die Anzahl darunter, ist MGD ähnlich Bilayer-bildend wie DGD oder PC. Da lediglich einfach ungesättigte Fettsäuren in *S. cerevisiae* angetroffen werden (s. 3.4.3.3), ergibt sich pro MGD-Molekül nur eine maximale Doppelbindungszahl von 2. Bei übermäßigem MGD-Gehalt unter Proliferationsbedingungen (Abb. 14b) bestände somit eher die Erfordernis, den kritischen Zustand der Bilayer durch „balancierende“ Synthese eines nicht-Bilayer Lipids wieder herzustellen. In Hefe schien diese Aufgabe PE zu übernehmen. Im Gegensatz zu MGD verliert PE die H_{II} -Phasen-bildende Eigenschaft erst bei Besetzung mit gesättigten und kürzerkettigen Fettsäuren (Koynova und Caffrey, 1994; Boumann et al., 2006) oder bei niedrigen Temperaturen (Cullis und de Kruijff, 1979). Da PE jedoch in Hefe von allen PL-Fraktionen (neben PC) den geringsten Anteil gesättigter Fettsäuren aufweist (Schneiter et al., 1999) und die Anzucht bei 30°C erfolgte, wäre PE im vorliegenden Fall geeignet, die Bilayer-stabilisierende Gesamtwirkung des MGDs abzuschwächen und zur Aufrechterhaltung des ursprünglichen Membranzustands beizutragen.

3.4.3.3 Einfluß von Fettsäuremodifikationen auf induzierte Membranproliferation in Hefe

Nach der gelungenen Verknüpfung von Membran-Neusynthese mit Anreicherung polarer Lipide lag es nahe, ebenso die Steigerungsfähigkeit von Desaturierung und Elongation unter Bedingungen forcierter Neusynthese polarer Lipide zu untersuchen.

Diese Bemühungen führten zu keinem Ergebnis, da in allen Fällen die gemeinsame Expression von Proliferations-Doppelkonstrukt (P₄₅₀-CPR) und Fettsäure-modifizierendem Konstrukt (z.B. $\Delta 6$ -Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum*) mißlang (beide Kassetten blieben inaktiv; siehe auch 2.20.2).

Um dennoch eine Einschätzung der Auswirkung eines veränderten Desaturierungs- und Elongationsmilieus auf die Membranproliferationsfähigkeit zu bekommen, wurden entsprechende Fettsäuren in 125 μ M Endkonzentration den Hefe-Hauptkulturen zugesetzt.

Es wurde entsprechend einer in der Arbeitsgruppe vorausgegangenen Untersuchung davon ausgegangen, daß nach Aufnahme in die Zelle freie Fettsäuren sehr rasch zu Acyl-CoAs verestert werden und nach mehreren Stunden lipidgebunden vorliegen (Domergue et al., 2003). Zur Verifikation der Aufnahme in die Zelle wurden parallel zur Beerntung der Kulturen 3 ml Aliquots nach Aufarbeitung (siehe 2.22.5) gaschromatographisch untersucht.

Um den Einfluß genetischer Dispositionen verschiedener Transformanten auszuschalten, wurde von einer einzigen Transformationskultur auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgegangen. Aus der Vorkultur wurden gleiche Volumina in 10 parallele Hauptkulturen überimpft (OD₆₀₀ ~ 0,02) und diese mit verschiedenen FS versetzt.

Im Fokus stand die Frage: **Können bestimmte Fettsäuren einen verstärkenden Effekt auf die Membranproliferation ausüben?**

Zur Klärung der Frage wurde die Auswirkung von Fettsäuren mit unterschiedlichem Desaturierungsgrad (Zusatz von 18:1 ^{$\Delta 9$} , 18:2 ^{$\Delta 9, 12$} , 18:3 ^{$\Delta 9, 12, 15$}), unterschiedlicher Position der Doppelbindung (Supplementation mit 18:1 ^{$\Delta 11$} sowie 18:3 ^{$\Delta 6, 9, 12$}) und unterschiedlicher C-Kettenlänge (Supplementation mit 18:0, 20:0, 22:0 und 24:0) untersucht. Die Phospholipidgehalte der Fettsäure-ergänzten Hefekulturen sind in Abbildung 16 dargestellt.

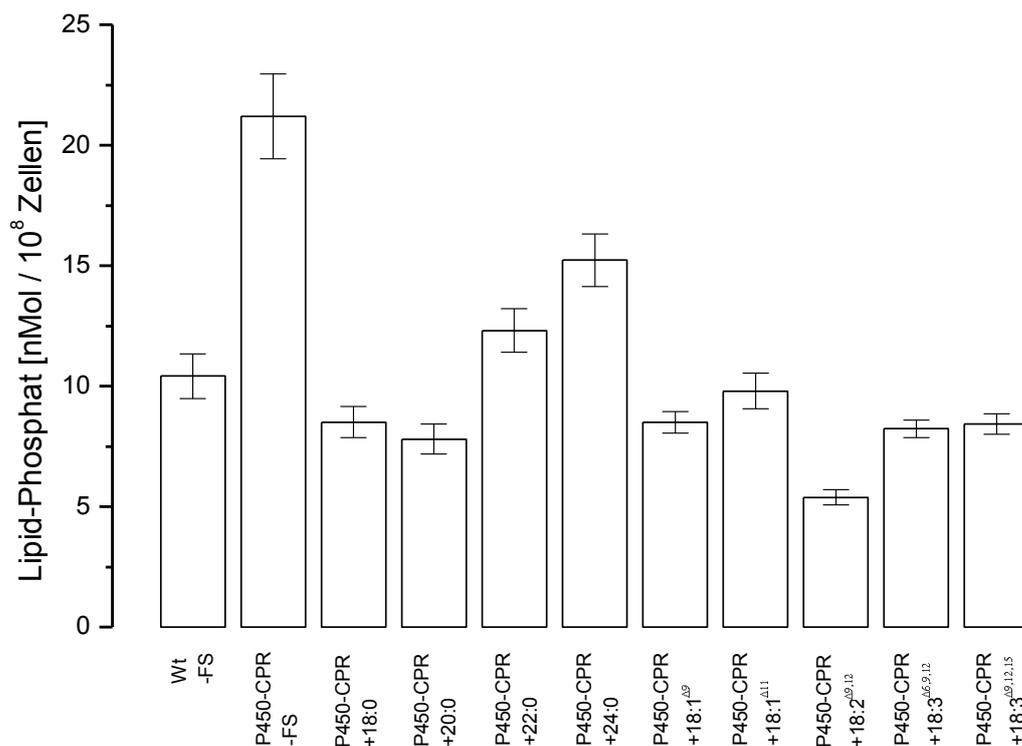


Abb. 16: Einfluß verschiedener Fettsäuren auf die Membranproliferationsfähigkeit

Gesamtlipid-Phosphatgehalte nach Fettsäurezusatz im Vergleich. *S. cerevisiae* YS 18-Wildtyp (links) ohne FS-Zusatz. P450-CPR-Expriemierer aus gleicher Vorkultur in 10 Hauptkulturen übergeimpft (2 v. l. ohne FS-Zusatz); unter Induktionsbedingungen bis auf Ernte-OD₆₀₀ ~ 0,5 angezogen. Supplementation mit der entsprechenden Fettsäure auf jeweils 125 µM. Kulturvolumen = 100 ml. Auswertung: Densito-Einstellung (Luminanz) der Histogrammfunktion (Adobe Photoshop 5.5). Zellzahlermittlung per Zählkammer (2.4.3). Fettsäuren: 18:0 (Stearinsäure), 20:0 (Arachinsäure), 22:0 (Behensäure), 24:0 (Lignocerinsäure), 18:1^{Δ9} (Ölsäure), 18:1^{Δ11} (cis-Vaccensäure), 18:2^{Δ9,12} (Linsäure), 18:3^{Δ9,12,15} (α-Linolensäure) und 18:3^{Δ6,9,12} (γ-Linolensäure).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Membranlipid-Menge durch **keine** extern zugefügte Fettsäure über das Ausmaß des Membran-Proliferierers hinaus erhöht wurde.

Der Lipid-Phosphatgehalt als Monitorgröße für den Umfang der Membranmenge fällt im Hefewildtyp überraschenderweise höher aus als in den meisten Fettsäure-supplementierten Kulturen.

Der zunächst naheliegende Verdacht, daß die zugesetzten Fettsäuren als Kohlenstoffquelle anstelle oder zusätzlich zu Raffinose verstoffwechselt wurden und dadurch als „Bausubstanz“ für das Endomembransystem ausfielen, wurde durch mehrere Beobachtungen widerlegt:

Die bei Anzucht mit Fettsäuren als einziger C-Quelle (β -Oxidationsbedingungen) immer morphologisch feststellbaren, umfangreich entwickelten Peroxisomen (Veenhuis et al., 1987; Erdmann und Blobel, 1995) fehlten, und auch eine deutliche Verlangsamung des Wachstums der Kultur wurde nicht festgestellt. Die photometrisch gemessenen Stichproben ergaben im Vergleich zum nicht-supplementierten Proliferierer (P₄₅₀-CPR -FS) recht ähnliche Werte. Der verwendete Hefestamm YS18 besitzt im Gegensatz zu SC334, der in Anfangsversuchen benutzt wurde, keine Zuckerstoffwechsel-Defizienz. YS 18 konnte Galaktose (Induktor) als „leichtverdauliche“ Nahrung nutzen und verfügte demnach im Vergleich zu einer Fettsäure-abhängigen Ernährung über die bessere Alternative.

Der wahrscheinlichste Grund für PL-Konzentrationen unterhalb des im Wildtyp gefundenen Wertes mag an der Hemmung zahlreicher Enzyme durch freie Fettsäuren und (z.T.) deren CoA-Ester liegen. Bereits vor längerer Zeit wurde in *in vitro*-Untersuchungen ein hemmender Einfluß verschiedener Fettsäuren auf Enzyme des Energiestoffwechsels (Weber et al., 1966; Pande und Mead, 1968) und der Fettsäuresynthese (Korchak und Masoro, 1964; Morikawa und Yamashita, 1978) gefunden. Ob und in welchem Ausmaß diese *in vitro*-Resultate auf intrazelluläre Stoffwechselabläufe an sich und auf solche unter Proliferationsbedingungen übertragbar waren, kann hier nicht beurteilt werden, eine entsprechende Wirkung erscheint aber möglich.

In Abbildung 16 war mit zunehmender C-Kettenlänge entlang der Reihe 18:0 \rightarrow 24:0 mit Ausnahme der Arachinsäure-angereicherten Kultur ein Anstieg der Phospholipid-Konzentration zu verzeichnen, während bei den ungesättigten FS keine Unterschiede zwischen Ölsäure sowie α - und γ -Linolensäurezusatz auftraten und nur unter Linolsäurezusatz eine deutliche Absenkung des Phospholipidgehaltes festgestellt wurde.

Trotz der möglichen hemmenden Stoffwechselbeeinflussungen der Enzyme durch freie Fettsäuren (s.o.) lieferte der fluidifizierende bzw rigidifizierende Einfluß, den FS-Desaturierung und -Kettenlänge in der Membran ausüben, den bündigsten Erklärungsansatz für die beschriebenen Phänomene.

Ausgehend von den zwei bekannten Grundtendenzen

- Zunehmende C-Kettenlänge gesättigter Fettsäuren bewirkt in der Membran ein Absenken der Fluidität (Wang et al., 1995; Huang et al., 1997), meßbar als Anstieg der

Phasenübergangs-Temperatur.

- Ungesättigte Fettsäuren – hier: Ölsäure, cis-Vaccensäure, Linolsäure und beide

Linolensäuren – wirken fluiditätssteigernd mit steigender Wirksamkeit in Richtung $18:1^{\Delta 9} < 18:1^{\Delta 11} \ll 18:3^{\Delta 6,9,12 \sim \Delta 9,12,15} \leq 18:2$ (Wang et al., 1995; Huang et al., 1997)

läßt sich in Bezug auf die Proliferationsbeeinflussung folgender Rahmen abstecken:

Fettsäuren, die die Phasenübergangstemperatur senken (rigide $L_{\beta} \rightarrow$ fluide L_{α}), unterbanden die Erweiterung des Membranzumfangs relativ stark, wohingegen jene mit zunehmend rigidifizierender Tendenz in Richtung ansteigender C-Kettenlänge und größerer Zahl hydrophober Wechselwirkungen in der Membran die Proliferationsinhibierung aufzuheben bzw abzuschwächen schienen.

In der Tat fanden sich erst bei Lignocerinsäure-Applikation Hefezellen mit (dispenser) endomembranärer Proliferation (wie in Abb. *E* - Bildtafel 3) – sonst nirgends.

Die hier eingesetzten Fettsäuren entsprachen größtenteils nicht den nativ in *S. cerevisiae* vorkommenden. In eigenen Untersuchungen wurden typischerweise in *S. cerevisiae*-Stämmen folgende Fettsäuren gefunden: **12:0** (Spuren), **14:0** (Spuren), **16:0**, **16:1^{Δ9}**, **18:0**, **18:1^{Δ9}** und **18:1^{Δ11}** (Spuren) (Vergleiche auch: Schneiter et al., 1999; Zank et al., 2000; Boumann et al., 2006). Als ungesättigte Fettsäuren wurden nur Monoensäuren gefunden, und das Vorkommen von Acylkettenlängen über 18 Kohlenstoffatome ist auf Sphingolipide beschränkt (Ausnahme: Cerebrosid- und GPI-Anker-Synthesedefekte – Lester et al., 1993; Nagiec et al., 1993; Schneiter et al., 2004).

Die Phospholipidgehalte von Wildtyp und Proliferierer liegen um einen Faktor 2 auseinander (10 vs. 21 nMol / 10^8 Zellen -> Abb.16); der Proliferierer wies jedoch in anderen Versuchen in Abhängigkeit von (Vor-) Kulturbedingungen und Alter der Transformationskulturen den bis zu fünffachen PL-Gehalt gegenüber Wildtyp auf. Diese „Plastizität“ in der Membranzmenge war nicht ungewöhnlich, so fanden Murata et al. (2003) in Wildtyp-Hefezellen 9 - 13 nMol Lipidphosphat / 10^8 Zellen und das etwa vierfache dieses Wertes in den Hefen nach sechsständiger DMSO-Einwirkung.

3.4.3.4 Einfluß von Fettsäuremodifikationen auf das Phospholipidprofil

Ob sich die Unterschiede der supplementierten „Fluidifizierer“ und „Rigidifizierer“ auch in der Zusammensetzung der Phospholipide niederschlugen, wurde durch

dünnschichtchromatographische Analyse der drei Hauptgruppen PC + PI/S + PE untersucht und als prozentuale Veränderung gegenüber dem P₄₅₀-CPR-Proliferierer ohne FS-Zusatz graphisch dargestellt (Abb. 17).

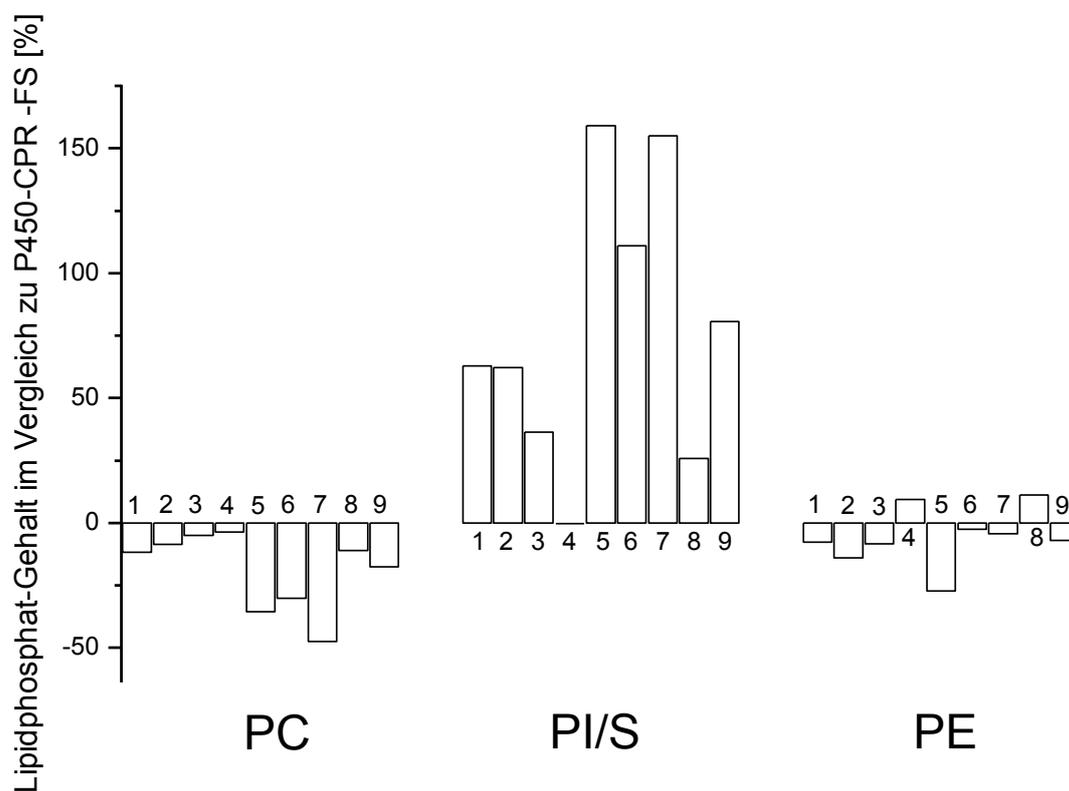


Abb. 17: Änderungen der Phosphoglycerolipidprofile unter Fettsäureeinfluß

Veränderungen der Lipid-Phosphatgehalte der drei Phospholipid-Hauptgruppen der in Abb.16 aufgeführten 9 Expressionskulturen. Fettsäure-supplementierte P450-CPR-exprimierende *S. cerevisiae* YS 18-Kulturen gegenüber der gleichen Expressionskultur ohne Fettsäure - supplement. FS-Zusatz: auf je 125 µM. Ernte-OD₆₀₀ ~ 0,5; 100 ml Kulturvolumen.

Auswertung: Densito-Einstellung (Luminanz) der Histogrammfunktion (Adobe Photoshop 5.5)

Diagrammbalken-Nummern entsprechende Supplementierung:

1 = 18:0 (Stearinsäure) **2** = 20:0 (Arachinsäure) **3** = 22:0 (Behensäure) **4** = 24:0 (Lignocerinsäure) **5** = 18:1^{Δ9} (Ölsäure) **6** = 18:1^{Δ11} (Vaccensäure) **7** = 18:2^{Δ9,12} (Linolsäure) **8** = 18:3^{Δ9,12,15} (α-Linolensäure) **9** = 18:3^{Δ6,9,12} (γ-Linolensäure)

Es fiel auf, daß die Veränderungen der Gehalte der drei PL-Hauptgruppen der supplementierten Proliferationskulturen gegenüber der un-supplementierten Kultur unterschiedlich stark waren und in der Reihe PI/S >> PC > PE abnahmen.

Jede zugesetzte Fettsäure rief eine Absenkung des PC- und eine Erhöhung des PI/S-Gehaltes hervor.

Bei den gesättigten Fettsäuren konnte zudem eine deutliche Tendenz festgestellt werden: von 18:0 nach 24:0 fielen die relativen Absenkungen der PC-Gehalte - ebenso wie die Zuwächse der PI/S-Konzentrationen - sukzessive geringer aus. Innerhalb der ungesättigten FS

zeigten Öl-, Vaccen- und Linolsäure die höchsten PI/S-Zuwächse sowie die größten Abnahmen in der PC-Fraktion. Die Änderungen der PE-Gehalte stellten mit Ausnahmen bei Lignocerin- und α -Linolensäure Absenkungen dar, vermittelten aber kein kohärentes Bild, aus dem sich eine Tendenz ableiten ließe.

Eine schlüssige Interpretation war lediglich für die Reihe gesättigter FS möglich. In Abb. 12 ist die interessante Tendenz in Hefe unter Membran-Proliferationsbedingungen erkennbar, die Höhe des PC-Gehaltes etwas heraufzuregulieren. Eine fortschreitende Annäherung der Phospholipid-Konzentration an den ungesättigten Proliferierer bei 22:0- und 24:0-Zusatz (Abb.16) wurde von einer Regeneration des PC-Gehaltes begleitet oder durch ihn ausgelöst (Abb.17).

Die Zusammenfassung der in den drei Abbildungen dargestellten Ergebnisse deutete auf zweierlei hin:

Der Anstieg der PI/S-Gehalte schien **immer** einherzugehen mit vollständiger Inhibierung zusätzlicher Polarlipidsynthese, wohingegen die Zunahme der PC-Gehalte die Voraussetzung für Membranproliferation zu sein schien. Da Membranproliferation aber auch bei unverändertem PI/S-Gehalt eintrat (Abb.12), sah es ganz so aus, als würde PC die bedeutsamere Rolle bei der Vermehrung des Membranumfanges spielen.

Worin könnte sie bestehen?

Mehrumfang von Membranen im vorliegenden Hefesystem kann offenbar nicht anders stabilisiert werden als über Änderung der Lipidzusammensetzung mit einem höheren PC-Anteil. Im Gegensatz zu prokaryoten Systemen mit umfangreicher Membrananlage wie bei Chloroplasten oder in *E. coli* unter Fumaratreduktase-Expression, die überwiegend Bilayerdestabilisierende Polarlipide besitzen und durch einen spezifischen Proteinbesatz und/oder entsprechendes Ionenmilieu stabilisiert zu werden scheinen (Simidjiev et al., 2000; de Kruijff, 1997; Weiner et al., 1984), ließe sich hier mutmaßen, daß ein entsprechender „akzessorischer“ Proteinbesatz im Hefesystem möglicherweise nicht verfügbar war.

Dies erscheint allerdings zweifelhaft, da Hefemutanten ohne das Vermögen, PC aus PE synthetisieren zu können und ohne externe Cholinzugabe (kein Kennedy-Weg möglich) nach Fütterung mit Propanolamin und Synthese von Phosphatidylpropanolamin (PPA) fast normales Wachstum zeigten (Choi et al. 2004). Verblüffend daran war, das PPA ähnliche Membran-destabilisierende Eigenschaften besitzt wie PE und beider Anteil am Phospholipidgehalt zusammen über 60 % betrug, **ohne** daß in ihnen mehr gesättigte Fettsäuren zu finden waren. Nach den aufgelisteten Kriterien (s.1.3.1.) läge also ein

hochgradig „überkritischer“ Bilayerzustand vor, und dennoch entwickelten sich die Hefen ohne deutliche Beeinträchtigung. Obwohl die interessante Frage, ob unter PC-freien Bedingungen auch Membranproliferation möglich wäre, von den Autoren nicht untersucht wurde, zeigten deren Resultate doch deutlich, daß die Bilayer-stabilisierenden physikalisch-chemischen PC-Eigenschaften allein für die Bilayer-Aufrechterhaltung nicht entscheidend waren. Deshalb erscheint es zweifelhaft, ob jenen Funktionen unter Proliferationsbedingungen die ausschlaggebende Rolle zukommt.

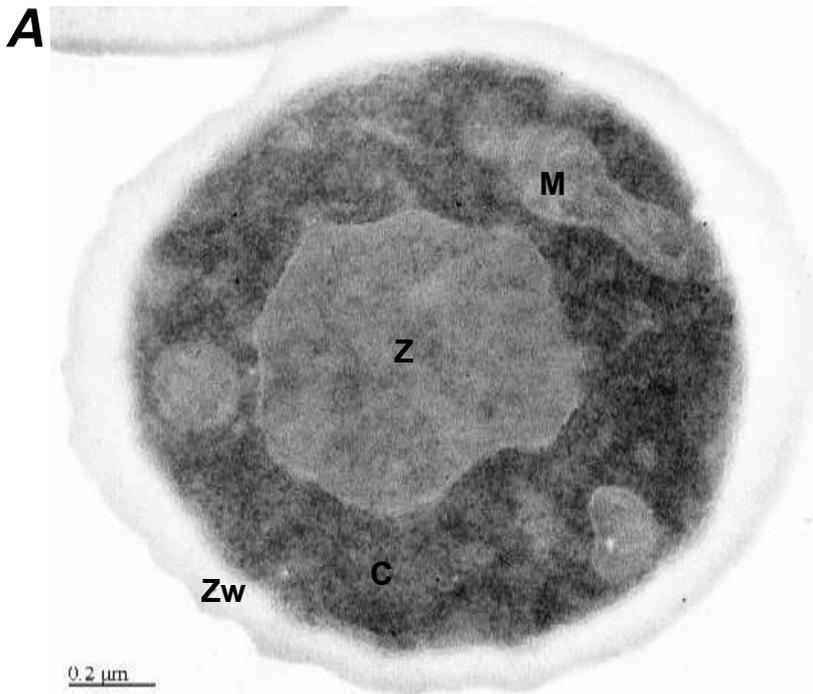
Zu den spezifischeren Wirkungen von PC (s.1.3.2.1) gehört zweifelsfrei die der Signalübermittlung. Befremdlicherweise sinkt der PC-Titer bei Einleitung von Signalstoffwechselprozessen durch verschiedene Phospholipasen (z.T. drastisch) ab (Exton, 1994; Welti et al., 2002). Sollte induzierte Membranproliferation dennoch durch Einleitung von Signalprozessen wirksam werden, so müßte dann die PC-Neusynthese- die Abnahmerate (deutlich) übersteigen. Ein diesbezüglicher schlüssiger Nachweis fehlt, da Microarray-Untersuchungen in den wenigen beschriebenen Fällen zwar eine verstärkte Expression der an der Polarlipidsynthese beteiligten Gene wie INO1, OPI3, CHO1, CHO2, PSD1 u.a. (Murata et al., 2003; Block-Alper et al., 2002) aufzeigten, aber keine Daten über den Expressionsstatus der Phospholipasen lieferten.

Ein alternativer Erklärungsansatz könnte in der funktionellen Erfordernis von bestimmten Membranproteinen für PC als „Stabilisierer“ oder „Restituierer“ der korrekten Funktion von membranintegralen Proteinen bestehen, wie dies in ähnlicher Weise für Mitglieder der mitochondrialen Atmungskette und eines Vertreters der *multi-drug resistance* Proteine in Tumor-Zelllinien gezeigt wurde (zusammengefaßt in Opekarová und Tanner, 2003). Bei verstärkter Expression und Integration eines Membranproteins mit entsprechendem PC-Bedarf wäre dann auch eine forcierte PC-Synthese notwendig. Das Modell könnte selbst im indirekten Fall anwendbar sein, da die Überexpression eines integralen Membranproteins zumeist auch verstärkte Synthese anderer Proteine hervorruft, wie z.B. einiger Chaperone (s.u.), und auch der PC-Bedarf solcher „Sekundärproliferierer“ PC-gehalterhöhend wirksam werden könnte. So wurde bei Überexpression des in dieser Arbeit verwendeten Cytochrom P450 (Isoform 1) aus *C. maltosa* in einer älteren Veröffentlichung auch eine verstärkte Synthese anderer integraler Membranproteine wie Kar2p und Sec61p beobachtet (Menzel et al., 1997). Die benötigte Lipidumgebung dieser u.a. Proteine in Hefe und anderen Eukaryoten ist allerdings derzeit noch unbekannt.

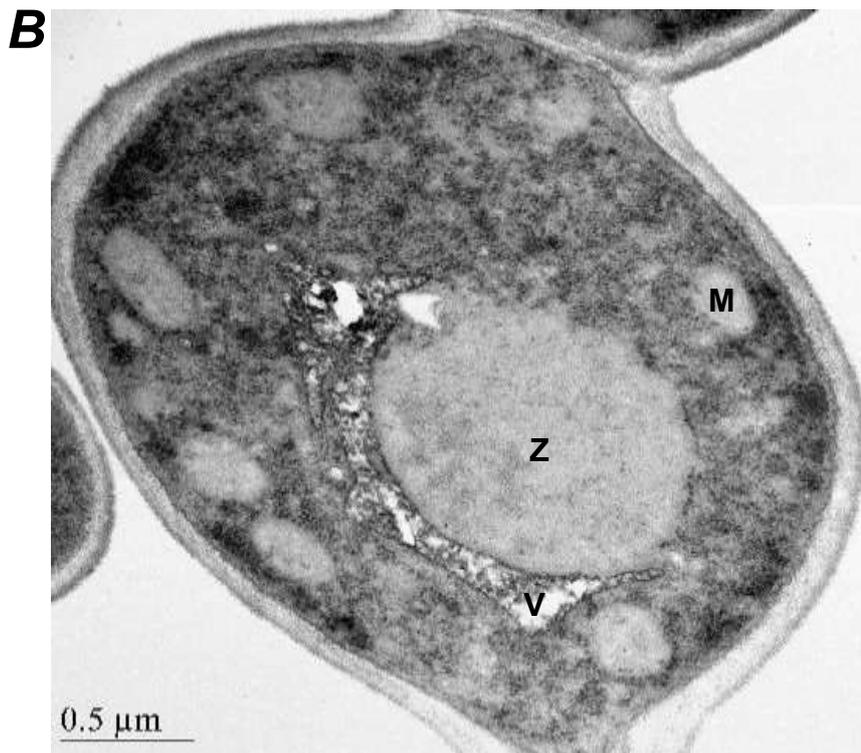
Die gegensätzlichen Veränderungsmuster der PC- und PI/S-Fraktion wurden in der Literatur häufiger beschrieben. So ist die gegensätzliche Regulation von PC und PI bei Mutanten mit PC-Synthesedefekten (cho1, cho2, opi3) ohne gleichzeitige Beeinträchtigung des Kennedy-Weges seit längerem bekannt (Greenberg et al., 1983; Hirsch et al., 1986) und hängt wesentlich vom Umfang fortlaufender PC-Synthese nach Cholinzusatz ab (Griac et al., 1996). Dort wurde unter PC-Synthesebedingungen das INO1-Gen reprimiert und in den o.g. Mutanten dereprimiert. Auch in der bereits erwähnten Arbeit von Choi et al. (2004) ging mit Absenkung des PC-Gehaltes in Richtung der Nachweisgrenze eine deutliche Erhöhung des PI-Titers einher. Da der in vorliegender Arbeit benutzte Hefestamm weder die beschriebenen Defekte besaß noch mit externer Cholin- / Inositolzugabe gearbeitet wurde und unter Proliferationsbedingungen (P450-CPR → Abb.12) die PI/S-Fraktion unverändert blieb, scheint deren Beitrag an der Proliferation, falls überhaupt vorhanden, untergeordnet zu sein.

Als bemerkenswert läßt sich der offenkundige PC-Bedarf bei Membranflächenerweiterung ansehen. Haben sich für zentrale Grundfunktionen wie Wachstum und Zellteilung in Hefe aus bisherigen Arbeiten lediglich PI und PE als essentiell herausgestellt (Nikawa et al., 1987; Birner et al., 2001; Storey et al., 2001) und wurden PC, PS und CL in dieser Hinsicht als nicht-essentiell eingestuft (Atkinson et al., 1980; McGraw und Henry, 1989; Jiang et al., 1997; Choi et al., 2004), so läßt sich für das in dieser Arbeit studierte Phänomen der Membranamengen-Hochregulierung ein Bedarf an PC feststellen, der nicht durch andere PL-Vertreter substituierbar war.

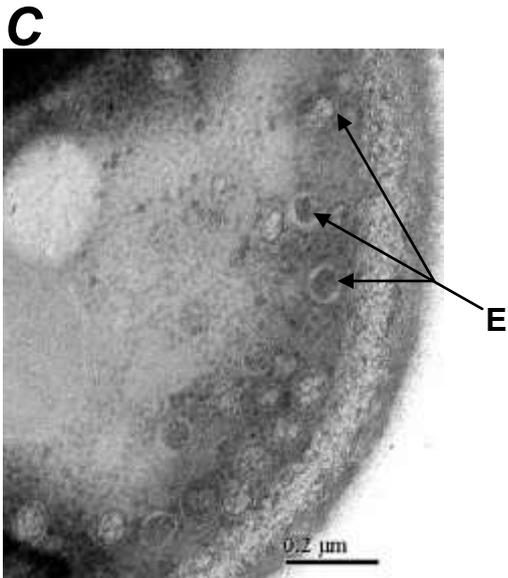
Bildtafel 3 – *Saccharomyces cerevisiae* -Mikromorphologie



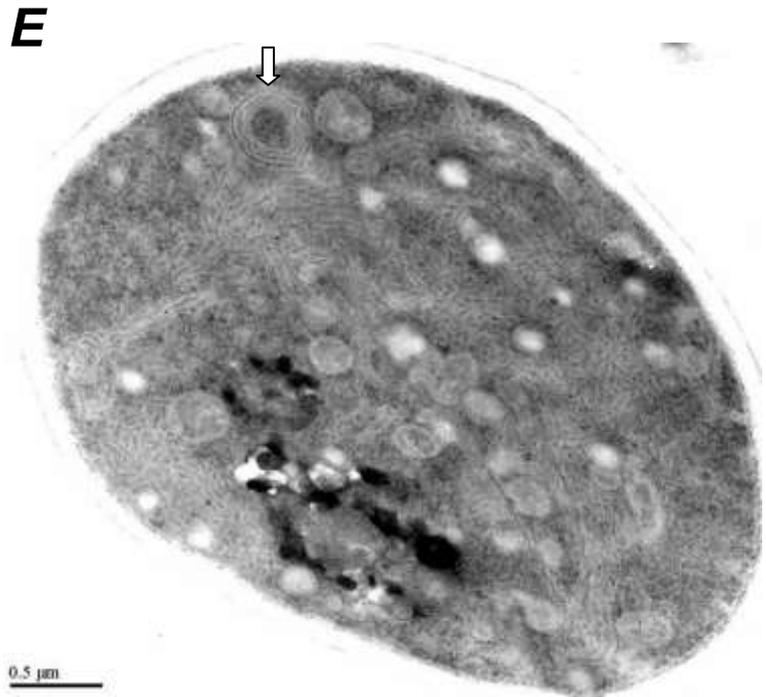
YS18-Wildtyp. Anzucht: 24 h Minimalmedium + Galaktose, Ernte bei $OD_{600} \sim 0,3$, Aufnahme und 1 h Inkubation in Vollmedium + Galaktose. EM-Präparation siehe Material & Methoden 2.24.1. C = Ribosomenreiches Zytoplasma; M = Mitochondrium; Z = Zellkern mit feingranuliertem Karyoplasma; Zw = kontrastarme, helle Zellwand.



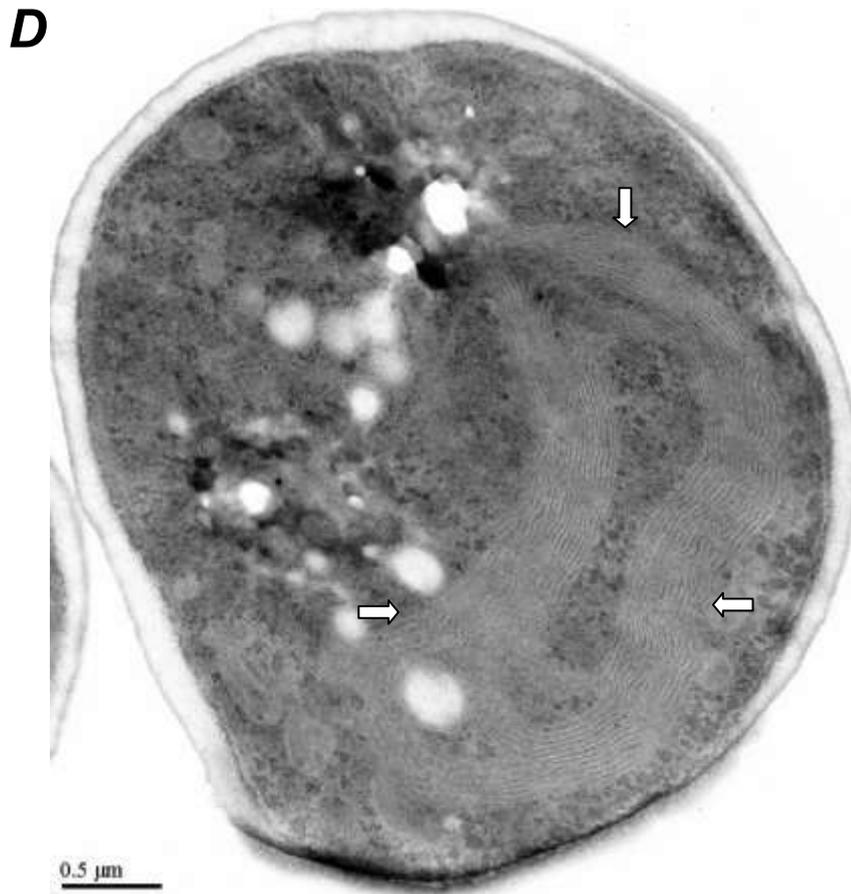
Exprimierte YFPF-MA (Prozessive β -Glukosyltransferase mit Cytochrom b5-Membrananker) in YS18. Anzucht: Wie Wildtyp in **A**. Ernte- $OD_{600} \sim 0,2$. M = Mitochondrium; V = Vakuole; Z = Zellkern;



C
 YPFP in YS18. Anzucht: Wie Wildtyp in **A**.
 Ernte- $OD_{600} \sim 0,4$
 E = (Vakuoläre?) Einschlüsse mit
 elektronendichtem Inhalt nach
 Uranylacetat-Kontrastierung



E
 P450-CPR + YPFP.
 Andere Zelle aus derselben Präparation wie **D**. Disperser
 Proliferationstyp vorherrschend. Ungerichtet-knäuelige Verteilung
 tubulärer Strukturen im gesamten Cytoplasma. Vereinzelt
 geschlossene Lamellen (weißer Pfeilkopf). Viele Mitochondrien.



D
 P450-CPR + YPFP. Anzucht: Wie Wildtyp in **A**. Ernte- $OD_{600} \sim 0,2$
 Geordnet-geschlossener Proliferationstyp: bis zu 15 Bilayer als zusammenhängendes Lamellenband
 Cytoplasma- oder Zellkern-umschließend (Bereich durch weiße Pfeilköpfe markiert)

3.4.4 **Zusammenfassung** **- Membranproliferation in Hefe -**

- ⇒ Keines der in dieser Arbeit untersuchten Kopfgruppen-modifizierenden Enzyme des Membranlipidstoffwechsels vermochte eine Ausweitung der Membranfläche zu bewirken, wenn es als einziges Protein überexprimiert wurde.
- ⇒ Die Kombination von separaten Domänen für Membranproliferation und Kopfgruppenmodifikation in einem einzigen Leserahmen führte nicht zu der beabsichtigten Membranproliferation.
- ⇒ Proliferations- und Kopfgruppen-Modifikations-Sequenz wurden in Form unterschiedlicher Vektoren transformiert und koexprimiert, um die gewünschte Membranlipidanreicherung zu realisieren. Diese war moderat für Phosphatidylcholin, erreichte aber im Falle der beiden Glykoglycerolipid-synthetisierenden Enzyme beträchtliche Ausmaße.
- ⇒ Die Anreicherung der Glykoglycerolipide erfolgte sehr wahrscheinlich im ER.
- ⇒ Die Anreicherung von Glukose- oder Galaktose-haltigen Glykoglycerolipiden hatte keine Konsequenzen für die elektronenmikroskopisch sichtbare Membranmorphologie.
- ⇒ Monogalaktosyldiacylglycerol (MGD) zeigte neben der absoluten auch eine starke relative Anreicherung, die mit einer Zunahme von Phosphatidylethanolamin (PE) in der Phospholipid-Fraktion einherging.
- ⇒ Die Supplementation mit freien Fettsäuren führte zum Verlust der Membranproliferationsfähigkeit; diese konnte erst bei Zugabe langkettiger gesättigter Fettsäuren teilweise wieder hergestellt werden.
- ⇒ Die Stellflächenerweiterung des Endomembransystems korrelierte stets mit einem erhöhten Gehalt an Phosphatidylcholin.

3.5 Rückblick: Kritische Bewertung der Methoden

In den durchgeführten Versuchen wurden Erfolg und Mißerfolg des gewählten Ansatzes anhand zweier Methodensätze überprüft:

- Kolorimetrische/chromatographische Verfahren der Glyko- und Phospholipidbestimmung
- Elektronenmikroskopische Analyse

Hier soll kurz auf die Möglichkeiten und Grenzen der Methoden eingegangen werden. Sowohl trockenes, abgereiftes Samenmaterial als auch viele Hefen sind mikromorphologischen Darstellungen schwer zugänglich. In einer ausführlichen Studie zu den häufigsten Problemen bei der Hefefixierung wiesen Wright und Rine (1989) auf die Notwendigkeit hin, nach Anzucht in Minimalmedium unbedingt eine 1-2 stündige Inkubation in Vollmedium folgen zu lassen, um eine ausreichend hohe Kontraststärke im Cytoplasma zu erhalten (siehe dazu auch Einleitung 2.24.1). In der Tat blieben die Zellstrukturen der Hefestämme SC334 und YS18 nach Inkubation in Minimalmedium extrem kontrastschwach und konnten nicht für intrazelluläre Untersuchungen herangezogen werden. Bei der Umsetzung auf Vollmedium ließ sich zwar die Induktion mit Galaktose fortsetzen, die Plasmidselektion (Uracil → pYES2, Leucin → pYEp51) ging jedoch verloren, sodaß nach 1-2 stündiger Umsetzung mikromorphologisch auch Zellen erschienen, die keine erwarteten Membranstrukturveränderungen mehr aufwiesen. Schwerwiegender waren jedoch die Darstellungsprobleme an den untersuchten Pflanzensaat. An abgereiften Arabidopsissamen, die einer bis zu achtstündigen Quellung ausgesetzt wurden, ergab sich oft eine hinreichend gute Strukturhaltung; an trockenen Samen seltener; an trockenen abgereiften Rapssamen fast nie. Auf die zwar etablierten aber äußerst zeitaufwendigen und apparativ hier nicht realisierbaren Darstellungsverfahren für extrem trockene und/oder fettreiche Pflanzengewebe wurde bereits in der Einleitung hingewiesen (s. 2.24.2). Eine andere, vergleichbar aufwendige Methode, die wegen ihrer guten Feinstrukturhaltung und der sehr schnellen Festlegung des „Lebendzustandes“ der untersuchten Gewebe immer häufiger zum Einsatz kommt, ist die (Hochdruck-)Schnellgefriersubstitution („(high pressure) rapid freeze substitution“). Obwohl erfolgreiche Darstellungen *in planta* - dort z.B. an Blättern (Kaneko und Keegstra, 1996; Bourett et al., 1999;), Gametangien (Thijssen et al., 1997), Drüsenzellen (Turner et al., 2000) und Wurzelspitzen (Kiss et al., 1990) gelangen -, wurde kein konkretes Beispiel für trockene Hochölgebe in der Literatur gefunden. Da auch die technische Ausstattung nicht zur

Verfügung stand, wurde die Präparation an Rapssamen nach Quellung wie in 2.24.2 beschrieben vorgenommen.

Die Quellungsdauer sowie die Quellung an sich bargen jedoch das Risiko einer Veränderung der Membrananordnung während der Wasseraufnahme, während durch Präparation an Samen des letzten Reifungsstadiums möglicherweise nicht der Endzustand dokumentiert werden konnte. Beide Verfahren gewährleisteten jedoch durch Anhebung der Wassergehalte die vollständige Fixierung aller Embryogewebe und waren der direkten Strukturdarstellung an trockener Saat überlegen.

Da Elektronenmikroskopie sich nicht als schnelle Durchmusterungsmethode im Sinne eines rasch auswertbaren Verfahrens eignet, wurden auch kolorimetrische Screeningverfahren eingesetzt. Dies erschien auch gerade deswegen geboten, da polare Lipide in Pflanzenzellen nicht ausschließlich in Form einfach zu identifizierender Bilayer angeordnet sein müssen. So wurden besonders in Pollen und Samen auch hexagonale Anordnungen nachgewiesen (Crowe et al., 1989; Sacandé et al., 2001), und in Tapetumzellen können Phospholipide, Fette und Oleosine möglicherweise miteinander zu einer einheitlichen Matrix, dem „Tapetosom“, zusammentreten (Hsieh und Huang, 2004; Wu et al., 1997). Es ist derzeit nicht bekannt, ob noch weitere Möglichkeiten der Phospholipid-Unterbringung existieren.

Die Lipidphosphat-Bestimmung gemäß 2.22.7 erwies sich als recht robuste Methode, die gegenüber Quantifizierung per DC zudem den Vorteil besaß, auch bei höheren Konzentrationen reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Kritisch für beide Verfahren war lediglich die zügige Weiterverarbeitung der Aceton/Isopropanol- und Methanoleuate, da besonders in der Glykolipidfraktion nach 1-2 Tagen ein leichter Niederschlag auftrat, der auf Lipidverlust hindeutete.

Letztlich deckten die in dieser Arbeit eingesetzten Untersuchungsverfahren alle erwartbaren Eventualitäten ab.

3.6

Membranproliferation - Rückblick und Ausblick -

Pflanze

Mit 40-70% mehr Phospholipid in Ölsaaten ohne Beeinträchtigung der Vitalität und des Speicherstoffwechsels wurde höchstwahrscheinlich die Grenze des Möglichen erreicht. Eine Fortführung der Thematik sollte deshalb nicht den weiteren Ausbau des Gehalts an polaren Lipiden zum Ziel haben. Sinnvoll erscheint die primäre Erforschung der zugrunde liegenden Steuerung der Membranproliferation und der Regulation der Membranhomöostase, ohne allzu sehr von industriell-ökonomischen Vorgaben abhängig zu sein. Die Stellglieder der Regulation in Pflanzen sind vollkommen unbekannt und ihre Steuerung ist unverstanden.

Für weitere Untersuchungen mit dem Ziel der Aufdeckung der Regulationsabläufe der Membranhomöostase konnte in dieser Arbeit ein erster Grundstein gelegt werden.

Expressionsversuche mit Cytochrom b5 und der Cytochrom P450-Reduktase (und eventuell auch anderen e⁻-Donatoren) scheinen *in planta* geeignet zu sein, um die gezielte Anreicherung eines Membrankompartimentes zu bewirken.

Zunächst sollten induzierbare artifizielle Promotoren benutzt werden, um eine experimentell genauere Einstellung des Expressionsstarts zu erreichen und ein letales Proliferationsausmaß verhindern zu können. Dazu böten sich heterologe Promotoren mit hoher Aktivität in Pflanzen an wie z.B. solche mit Dexamethason-Box („glucocorticoid-response element“; Schena et al., 1991; Aoyama und Chua, 1997). Dies wäre ein idealer Ausgangspunkt für folgende Schritte: Nach Auswahl geeigneter Negativ-Kontrollen - als solche könnten Linien mit schwacher Transgenexpression infolge von Positionseffekten dienen - wäre nach Promotor-Induktion zu verschiedenen Zeiten Material für Microarray-Analysen zu entnehmen. In nicht durchsequenzierten Organismen wie Raps u.a. müßte stattdessen auf alternative Ansätze wie „Subtraktive Suppressions-Hybridisierung“ (SSH – Li et al., 2006) zurückgegriffen werden.

Bei Identifizierung Proliferations-korrelierender Sequenzen könnte deren gezielte expressive Anreicherung und Ausschaltung (Überexpression und RNAi) zum Verständnis ihrer Funktion führen. Zur Eingrenzung bei einer größeren Anzahl wären auch biolistische, transiente Hochdurchsatz-Screeningverfahren geeignet (Shang et al., 2007). Parallel dazu müßten Software-gestützte Ansätze verfolgt werden. Sollte z.B. über Microarray-Analysen eine

größere Anzahl von Gensequenzen unter Membranproliferationsbedingungen hochreguliert werden, so ließe sich deren Funktion anhand von Datenbank-Homologievergleichen zu Sequenzen anderer Organismen mit bekannter Funktion aufdecken. Mitglieder beispielsweise des Polarlipidstoffwechsels oder von Transkriptionsfaktoren, deren Regulation im Zusammenhang mit Membransynthese steht, wären so schneller zu identifizieren.

Sollte dennoch die Datenmenge keinen präzisen Zugriff erlauben, so wäre der klassische (und mühsame) Schritt-für-Schritt-Weg der Aufklärung der Membranhomöostase über z.B. *two hybrid*-Bindungsstudien, ausgehend vom Proliferations-induzierenden Transgen, einzuschlagen.

Bemühungen und Ansätze anderer Arbeitsgruppen weisen seit einigen Jahren in dieselbe Richtung. So wurde der von Gong et al. (1996) beschriebene „Reißverschlußmembran-Ansatz“ (s. 1.9.3.3) von jener Gruppe in der folgenden Zeit offenbar nicht weiterverfolgt. Erst 2003 führten Snapp et al. in COS-Zellen Expressionen mit einem Cb₅-Gfp Fusionsprotein durch, welches ähnlich dem von Gong et al. beschriebenen Dimerisierungsmechanismus in tierischen Zelllinien Membranstapel induziert. Mit dem gleichen Fusionskonstrukt konnte ich in dieser Arbeit in Pflanze zwar nur die Markierung von ER feststellen, doch läßt sich nicht ausschließen, daß mit irgendeinem zusammengesetzten Zweikomponentenprotein aus „Anker“ und „Dimerisierer“ ein Anstieg des Membrangehaltes prinzipiell auch in Pflanzen erzeugt werden kann. Eine Quantifizierung der neusynthetisierten Membranmenge wurde leider von Snapp et al. (2003) nicht durchgeführt, so daß letztlich unklar bleibt, ob man überhaupt von Membranzunahme über den natürlichen statistischen Umfang hinaus ausgehen darf. Der Nachweis einer signifikanten Membranvermehrung wäre also zunächst zu leisten. Er ließe sich viel schneller in Tabakprotoplasten oder *Physcomitrella* erbringen als in Geweben höherer Pflanzen.

Der Entwicklungsstand bei CPMV-Proteinen (s. 1.9.3.2) ist dagegen weiter fortgeschritten. Carette et al. (2002b) konnten in Bindungsstudien 5 *two hybrid*-Interaktionspartner mit dem Proliferations-erzeugenden Virusprotein identifizieren, davon zwei Snare-Proteine, die an Membranfusionsprozessen beteiligt waren. Zum engeren Kreis der Regulationsmitglieder hingegen werden sie wahrscheinlich nicht gehören, da keines DNA-Bindungsdomänen aufwies noch einer Signalkette zugerechnet werden konnte.

Die von Carette et al. (2002b) erzielten Ergebnisse mit CPMV wurden in den Folgejahren von keiner Arbeitsgruppe aufgegriffen. Hingegen wurden seit kurzem in anderen Arbeiten Pflanzenviren eingesetzt, die zwar dieselbe Richtung einschlugen, ohne jedoch wirtszelleigene Proliferationsmitglieder oder Interaktionspartner identifizieren zu können (Tombusviren – Turner et al., 2004; Navarro et al., 2006; Rhabdoviren – Goodin et al., 2005).

Besonders gut entwickelte Ausgangspunkte für Microarray-Analysen boten die vorgestellten Untersuchungen an Rhizobien-Leguminosen (s. 1.9.3.1). Fanden sich zu Beginn dieser Arbeit noch keine PI3K-Homologen des knöllchenspezifisch exprimierten Soja-Vertreters in *Arabidopsis*, so ergaben entsprechende BLASTp-Vergleiche in *Arabidopsis*-Datenbanken mittlerweile 4 Proteine mit über 80 % Homologie. Hier böten Expressions-/Repressionsstudien beispielsweise zunächst die Möglichkeit, das proliferationsrelevante Protein herauszufinden, um dann über genomweite Ansätze (s.o.) bzw Bindungsstudien die Regulationswege zur Kontrolle der Membranmenge zu identifizieren.

PI3Ks sind an vielen Signalstoffwechselprozessen beteiligt, und es scheint nicht abwegig, daß sich in dieser Proteinfamilie Mitglieder des „Regulationsorchesters“ befinden.

Noch einen Schritt weiter gekommen sind Limpens et al. (2005). Sie fanden heraus, daß der Verlust der Rezeptorkinase Dmi2 („does not make infections 2“) in *Medicago truncatula* u.a. die Ausbildung der Symbiosomenmembran unterbindet.

Ist die Dmi 2 möglicherweise ein Mitglied der Regulationskette? Homologie-Vergleiche wiesen bislang noch kein eindeutiges Dmi2-Pendant für *Arabidopsis* aus.

Ein gezielterer Zugriff auf Regulationsmitglieder durch Microarray-Ansätze erscheint im Falle der beschriebenen Symbiosen jedoch schwierig, da in jenen Systemen die Steigerung der Membranmenge immer parallel läuft mit der Umstellung des gesamten Stoffwechsels. Die Entdeckung von Mutanten, welche auch in Abwesenheit von Bakterien und ohne Symbiosomen Knöllchen ausbilden, liefert möglicherweise brauchbare Negativkontrollen.

Da beide Modellorganismen *M. truncatula* und *L. japonicus* noch nicht durchsequenziert sind, könnten Versuchansätze in diese Richtung derzeit ohnehin nicht genomumfassend sein.

Ausgefeiltere Ansätze für profiling-Studien in beiden Symbiosepartnern gleichzeitig, wie die von Barnett et al. (2004) vorgestellte „dual-genome symbiosis“-Analyse, haben wahrscheinlich das Potential, mittelfristig Membranhomöostase-Regulatoren *en bloc* aufdecken zu können.

Bislang scheint ein Grundproblem all jener Genom-durchmusternder Ansätze darin zu liegen, den Expressions-, „Istbestand“ der Rhizobien-Leguminosen-Wechselwirkung zu ausschließlich einem einzigen Zeitpunkt abzugreifen. Ein vergleichender Überblick und analytisch präziserer Zugriff ergäbe sich eher aus einer Serie von Expressions Profiling-Dokumentationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung des Symbiosesystems. Hier bestünde die Möglichkeit Antworten auf die Fragen zu erhalten, durch welche genetischen Stellglieder Proliferation erzeugt wird und durch welche ihr Umfang dauerhaft erhalten bleibt.

Soweit aus den Veröffentlichungen seit 1998 bis heute hervorgeht, ist die Erforschung der Membranhomöostase an diesem Symbiosesystem kein vorrangiges Ziel der beteiligten Gruppen.

Eine andere Herangehensweise an die Aufklärung der Mechanistik pflanzlicher Membranproliferation böte die Untersuchung von Organen oder Geweben mit großem Endomembranumfang als Ausdruck natürlich angelegter Spezialisierung. So lieferte eine entsprechende Untersuchung mit 16086 mutmaßlich kodierenden Nukleinsäuresequenzen von Trichomdrüsenzellen der Pflanze *Medicago sativa* u.a. auch Hinweise auf eine Beteiligung von Vertretern, die den Lipid-Transferproteinen ähnlich sind, an der dort vorherrschenden Plasmamembran-Proliferation (Aziz et al., 2005).

Der Ansatz, spezialisierte natürliche Zelltypen zu untersuchen, ist mit Problemen anderer Art konfrontiert. Um Untersuchungen an oberflächenfernen Geweben und Zellen vornehmen zu können, müssen Einflüsse durch Fremdgewebeeinträge ausgeschlossen werden. Hierzu trägt seit kurzer Zeit maßgeblich die apparative Verfeinerung der Probengewinnung bei, wie z.B. die Einzelzellisolierung durch (Laser-) Mikrodissektion (Inada und Wildermuth, 2005; Brandt, 2005). Moderne Methoden der Probengewinnung bieten zur Erfassung der genetischen Charakteristika membranproliferierender Zellen aus spezialisierten Geweben ein geeignetes Verfahren zur Materialgewinnung. Eine sich abzeichnende Schwierigkeit für genomweite Untersuchung an spezialisierten Zelltypen könnte jedoch im Fehlen eines Negativkontroll-Standards bestehen.

Ein Impuls aus anderer Richtung kommt aus Untersuchungen des *X-box binding protein Xbp1* in humanen Zelllinien. Der erwähnte Transkriptionsfaktor (Kapitel 1.7) löst einer neueren Untersuchung zufolge die Proliferation des rER durch verstärkte Synthese von PC aus (Sriburi et al., 2004 und 2007). Seine Expression wurde korreliert mit einer Aktivitätssteigerung der Cholin-Cytidylyltransferase und der Cholin-Phosphotransferase. Eine

BLASTp-Suche mit der Sequenz von Xbp1 lieferte für *Arabidopsis* eine schwache Sequenzübereinstimmung (Homologie $\sim 2e^{-7}$) mit dem Transkriptionsfaktor Hy5 („Elongated Hypocotyl 5“), der im Zusammenhang mit Hypocotyl- und Wurzelentwicklung, Zellelongation, Zellproliferation und Chloroplastenentwicklung steht (Oyama et al., 1997). In jener Arbeit wurden ausschließlich Mutanten mit fehlender Genfunktion untersucht. Eine Überexpression des Gens in *Arabidopsis*, wie mit XBP1 in Fibroblastenzellen durchgeführt, wurde nicht unternommen. Daher kann noch nicht beurteilt werden, ob mit Hy5 ein Transkriptionsregulator der Membran-Homöostase entdeckt wurde.

Hefe

Weitere Untersuchungen zu diesem Thema in Hefe müßten zunächst die Bedeutung des Phosphatidylcholins bei der Membranproliferation näher untersuchen. Dabei böten Proliferationsversuche in PC-synthesedefizienten Stämmen die Gelegenheit zu analysieren, ob und in welchem Umfang PC für die Stellflächengenesse essentiell ist.

Block-Alper et al. (2003) glaubten unter Bedingungen differentieller Expression verschiedener Domänen eines Ribosomenrezeptors in einem Anstieg der Konzentration des Ino2-Transkriptionsfaktors bei gleichbleibender Konzentration seines Konjugationspartners Ino4 das Schlüssel-Stellglied der Membranproliferation gefunden zu haben. In einer weiteren sehr ausführlichen Arbeit zum Thema Genom-Profilung unter Proliferationsbedingungen fand diese Regulationskonstellation hingegen keine Erwähnung (Murata et al., 2003). Dies provoziert die Frage, ob es unterschiedliche Mechanismen der Proliferations-Steuerung gibt, wo doch, zumindest in Hefe, die beteiligten Gene in gleicher Weise reguliert werden (Einleitung 1.7.5).

Die Rolle des Phosphatidylcholins bei der Proliferation bedarf in jedem Fall weiterer Untersuchung. So wäre interessant herauszufinden, ob in dem von Choi et al. (2004) publiziertem Stamm mit Phosphatidylpropanolamin anstelle von PC überhaupt Membranproliferation über das natürliche Maß hinaus möglich ist.

Literatur

- Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S.D., Perktold, A., Zellnig, G. und Daum, G. (1999). Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur.J.Biochem.* **264** S. 545-553
- Adler, G., Kern, H.F., Pan, G.-Z. und Gardner, J.D. (1984). Secretagogue-induced membrane alterations in dispersed acini from rat pancreas. *Eur.J.Cell Biol.* **33** S. 234-241
- Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V. und Vasil, I.K. (1996). Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1AX1 gene into wheat. *Nat. Biotechnol.* **14** S. 1155-1159
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215** S. 403-410
- Ambroziak, J. und Henry, S.A. (1994). INO2 and INO4 gene products, positive regulators of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, form a complex that binds to the INO1 promoter. *J.Biol.Chem.* **269** S. 15344-15349
- An, G., Ebert, P., Mitra, A. und Ha, S. (1988). Binary vectors. In: *Plant Molecular Biology Manual*. Gelvin, S.B. und Schilperoort, R.A., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, A3/1-A3/19
- Andersson, M.X.; Stridh, M.H.; Larsson, K.E.; Liljenberg, C. und Sandelius, A.S. (2003). Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* **537** S. 128-132.
- Andersson, M.X.; Goksör, M. und Sandelius, A.S. (2007). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J.Biol.Chem.* **282** S. 1170-1174
- Aoyama, T. und Chua, N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11** S. 605-612
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M.J. und Walker, J.E. (2000). Characterization of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(0) ATP synthase. *FEBS Lett.* **482** S. 215-219
- Arnold, E. und Tanner, W. (1982). An obligatory role of protein glycosylation in the life cycle of yeast cells. *FEBS Lett.* **148** S. 49-53
- Athenstaedt, K. und Daum, G. (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur.J.Biochem.* **266** S. 1-16

Atkinson, K., Fogel, S. und Henry, S.A. (1980). Yeast mutant defective in phosphatidylserine synthesis. *J.Biol.Chem.* **255** S. 6653-6661

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (eds), (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., NewYork

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

Aziz, N., Paiva, N.L., May, G.D., Dixon, R.A. (2005). Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. *Planta* **221** S. 28-38

Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Panitz, R., Inze, D. und Wobus, U.(1991a). Upstream sequences regulating *legumin* gene expression in heterologous transgenic plants. *Mol.Gen.Genet.* **225** S. 121-8.

Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassüner, R., van Montagu, M., Inzé, D. und Wobus, U. (1991b). A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis plants*. *Mol.Gen.Genet.* **225** S. 459-467

Bäumlein, H., Nagy, I., Villarroel, R., Inze, D. und Wobus, U. (1992). Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant J.* **2** S. 233-239

Bagnaresi, P., Mazars-Marty, D., Pupillo, P., Marty, F. und Briat, J.F. (2000). Tonoplast subcellular localization of maize cytochrome b5 reductases. *Plant J.* **24** S. 645-654

Bagnat, M. und Simons, K. (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99** S. 14183-14188

Barbier, G.G., Joshi, R.C., Campbell, E.R. und Campbell, W.H. (2004). Purification and biochemical characterization of simplified eukaryotic nitrate reductase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr.Purif.* **37** S. 61-71

Barco, A. und Carrasco, L. (1995). A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14** S. 3349-3364

Barnett, M.J., Toman, C.F., Fisher, R.F. und Long, S.R. (2004). A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **101** S. 16636-16641

Bartlett, G.R. (1959). Phosphorous assay in column chromatography. *J.Biol.Chem.* **234** S. 466-468

- Basaran, N., Doebler, R.W., Goldston, H. und Holloway, P.W. (1999). Effect of lipid unsaturation on the binding of native and a mutant form of cytochrome b5 to membranes. *Biochemistry* **38** S. 15245-15252
- Basson, M.E., Thorsness, M. und Rine, J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **83** S. 5563-5567
- Bassot, J.M. (1966). Une forme microtubulaire et paracrystalline de reticulum endoplasmique dans les photocytes des annelides Polynoinae. *J.Cell Biol.* **31** S.135-158
- Bastiaanse, E.M., Hold, K.M. und Van der Laarse, A. (1997). The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc.Res.* **33** S. 272-283
- Battey, N.H., James, N.C., Greenland, A.J. und Brownlee, C. (1999). Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell* **11** S. 643-660
- Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Lepiniec, L. und Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol.Biochem.* **40** S. 151-160
- Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Panitz, R., Inze, D. und Wobus, U. (1991a). Upstream sequences regulating *legumin* gene expression in heterologous transgenic plants. *Mol.Gen.Genet.* **225** S. 121-128
- Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassüner, R., van Montagu, M., Inzé, D. und Wobus, U. (1991b). A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol.Gen.Genet.* **225** S. 459-467
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R.Acad.Sci.Paris, Life Sciences* **316** S. 1194-1199
- Behnke, H.-D. (1965). Über den Feinbau gitterartig aufgebauter Plasmaeinschlüsse in den Siebelementen von *Dioscorea reticulata*. *Planta* **66** S. 106-112
- Benghezal, M., Wasteneys, G.O. und Jones, D.A. (2000). The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. *Plant Cell* **12** S.1179-1201
- Bergfeld, R. und Falk, H. (1968). Geordnete Aggregation von Endoplasmatischem Reticulum in den weißen Hochblättern von *Davidia involucrata*. *Z.Pflanzenphysiol.* **59** S. 297-300
- Berry, D.R. und Smith, H. (1971). Red-light stimulation of prolamellar body recrystalliation and thylakoid formation in barley etioplasts. *J.Cell Sci.* **8** S. 185-200
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. und Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat.Cell Biol.* **2** S. 326-332

- Bessoule, J.-J. und Moreau, P. (2004). Phospholipid synthesis and dynamics in plant cells. In: Lipid metabolism and membrane biogenesis. Daum, G., Ed, *In: Topics in current genetics*. Hohmann, S., Series Ed, Springer S. 89-124
- Birner, R., Bürgermeister, M., Schneiter, R. und Daum, G. (2001). Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell* **12** S. 997-1007
- Birschmann, I., Stroobants, A.K., van den Berg, M., Schafer, A., Rosenkranz, K., Kunau, W.H., Tabak, H.F.(2003). Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Mol.Biol.Cell*.**14** S. 2226-2236
- Black, V.H., Robbins, E., McNamara, N. und Huima, T. (1979). A correlated thin-section and freeze-fracture analysis of guinea pig adrenocortical cells. *Am.J.Anat.* **156** S. 453-503
- Bloch, K.E. (1983). Sterol structure and membrane function. *CRC Crit.Rev.Biochem.* **14** S. 47-92
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J. und Douce, R. (1983). Preparations and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II – Biochemical characterization. *J.Biol.Chem.* **258** S. 13281-13286
- Block-Alper, L., Webster, P., Zhou, X., Supekova, L., Wong, W.H., Schultz, P.G. und Meyer, D.I. (2002). INO2, a positive regulator of lipid biosynthesis, is essential for the formation of inducible membranes in yeast. *Mol.Biol.Cell* **13** S. 40-51
- Boevink, P., Oparika, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A. und Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* **15** S. 441-447
- Borlakoglu, J.T., Edwards-Webb, J.D. und Dils, R.R. (1990). Polychlorinated biphenyls increase fatty acid desaturation in the proliferating endoplasmic reticulum of pigeon and rat livers. *Eur.J.Biochem.* **188** S. 327-332
- Borner, G.H.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., Macaskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H., Lilley, K.S. und Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* **137** S. 104-116
- Boston, R.S., Fontes, E.B.P., Shank, B.B. und Wrobel, R.L. (1991). Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homolog B-70 in 3 zein regulatory mutants. *Plant Cell* **3** S. 497-505
- Boumann, H.A., Gubbens, J., Koorengel, M.C., Oh, C.S., Martin, C.E., Heck, A.J., Patton-Vogt, J., Henry, S.A., de Kruijff, B. und de Kroon, A.I. (2006). Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote. *Mol.Biol.Cell* **17** S. 1006-1017

- Bourett, T.M., Czymmek, K.J., und Howard, R.J. (1999). Ultrastructure of chloroplast protuberances in rice leaves preserved by highpressure freezing. *Planta* **208** S. 472–479
- Brambillasca, S., Yabal, M., Soffientini, P., Stefanovic, S., Makarov, M., Hedge, R.S. und Borgese, N. (2005). Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO J.* **24** S. 2533-2542
- Brandt, S.P. (2005). Microgenomics: gene expression analysis at the tissue-specific and single-cell levels. *J.Exp.Bot.* **56** S. 495-505
- Bretscher, M.S. und Munro, S. (1993). Cholesterol and the golgi apparatus. *Science* **261** S. 1280-1281
- Brettschneider, R. (1992). Studien zur Agrobakterien-vermittelten und biolistischen Transformation von *Zea mays* L. *Dissertation*, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Broach, J.R. (1983). Vectors for high-level, inducible expression of cloned genes in yeast. In: *Experimental manipulation of gene expression*. M. Inoye, ed. Academic Press New York, S. 83-117
- Brodersen, P. und Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* **22** S. 268-280
- Browse, J. und Somerville, C.R. (1994). Glycerolipids. In: *Arabidopsis*. Meyerowitz, E. und Somerville, C.R., Eds, Cold Spring Harbor, New York S. 881-912
- Bruce, B.D. (1998). The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Mol.Biol.* **38** S. 223-246
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5** S. 376-379
- Burgyan, J., Rubino, L. und Russo, M. (1996). The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies. *J.Gen.Virol.* **77** S. 1967-1974
- Carette, J.E., Stuiver, M., Van Lent, J., Wellink, J. und Van Kammen, A. (2000). Cowpea mosaic virus infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not Golgi membranes and is dependent on *de novo* membrane synthesis. *J.Virol.* **74** S. 6556-6563
- Carette, J.E., van Lent, J., MacFarlane, S.A., Wellink, J. und van Kammen, A. (2002a). Cowpea mosaic virus 32- and 60-kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmic reticulum membranes. *J.Virol.* **76** S. 6293-6301
- Carette, J.E., Verver, J., Martens, J., van Kampen, T., Wellink, J. und van Kammen, A. (2002b). Characterization of plant proteins that interact with cowpea mosaic virus '60K' protein in the yeast two-hybrid system. *J.Gen.Virol.* **83** S. 885-893
- Carman, G.M. (2005). Regulation of phospholipid synthesis in yeast by zinc. *Biochem.Soc.Trans.* **33** S.1150-1153.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. und Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263** S. 802-805

Chang, F. und Nurse, P. (1996). How fission yeast fission in the middle. *Cell* **84** S. 191–194.

Chang, H.J., Jones, E.W. und Henry, S.A. (2002). Role of the unfolded protein response pathway in regulation of INO1 and in the sec14 bypass mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162** S. 29-43

Chang, H.J., Jesch, S.A., Gaspar, M.L. und Henry, S.A. (2004). Role of the unfolded protein response pathway in secretory stress and regulation of INO1 expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **168** S. 1899-1913

Chin, D.J., Luskey, K.L., Anderson, R.G., Faust, J.R., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1982). Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **79** S. 1185-1189

Choi, J.-Y., Martin, W.E., Murphy, R.C., Voelker, D.R. (2004). Phosphatidylcholine and N-methylated phospholipids are nonessential in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **279** S. 42321-42330

Chu, D.S., Pishvaei, B. und Payne, G.S. (1996). The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **271** S. 33123-33130

Clough, S.J. und Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16** S. 735-743

Collins, K.D. und Washabaugh, M.W. (1985). The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Quart.Rev.Biophys.* **18** S. 323-422

Colbeau, A., Nachbaur, J. und Vignais, P.M. (1971). Enzymatic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **249** S. 462-492

Coolbear, K.P., Berde, C.B. und Keough, K.M.W. (1983). Gel to liquid-crystalline phase transitions of aqueous dispersions of polyunsaturated mixed acid phosphatidylcholines. *Biochemistry* **22** S. 1466-1473

Cowan, C.A., Galbraith, D.W. und Staehelin, L.A. (1995). Z-membranes: A method for overexpression of integral membrane proteins in plants and yeast. *Plant Physiol.* **108** (2) Suppl. S.137 (abstr.)

Cox, J.S., Chapman, R.E. und Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol.Biol.Cell* **8** S. 1805-1814

Cox, J.S., Shamu, C.E. und Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73** S. 1197-1206.

- Crowe, J.H., Crowe, L.M. und Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223** S. 701-703
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. und Crowe, L.M. (1989). Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86** S. 520-523
- Cullis, P.R. und de Kruijff, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **559** S. 399-420
- Daleke, D.L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J.Lipid Res.* **44** S. 233-242
- Dales, S., Eggers, H.J., Tamm, I. und Palade, G.E. (1965). Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology* **26** S. 379-389
- D'Amico, L., Valsasina, B., Daminati, M.G., Fabbrini, M.S., Nitti, G., Bollini, R., Ceriotti, A. Vitale, A. (1992). Bean homologs of the mammalian glucose-related proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly synthesized seed storage proteins in the endoplasmic reticulum. *Plant J.* **2** S. 443-455
- Damsky, C.H. (1976). Environmentally induced changes in mitochondria and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces carlsbergensis* yeast. *J.Cell Biol.* **71** S. 123-135
- DaSilva, L.L., Snapp, E.L., Denecke, J., Lippincott-Schwartz, J., Hawes, C. und Brandizzi, F. (2004). Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell* **16** S. 1753-1771
- Davies, S.L. und Whittenbury, R. (1970). Fine structure of methane and other hydrocarbon-utilizing bacteria. *J.Gen.Microbiol.* **61** S.227-232
- D'Auzac, J., Jacob, J.L. und Chrestin, H. (1989). The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm. In: Physiology of Rubbertree Latex. D'Auzac, J., Jacob, J.L. und Chrestin, H., eds. CRC Press, Boca Raton, Fl. S. 59-96
- Davis, P.J., Fleming, B.D., Coolbear, K.P. und Keough, K.M.V. (1981). Gel to liquid-crystalline transition temperatures of water dispersions of two pairs of positional isomers of unsaturated mixed acid phosphatidylcholines. *Biochemistry* **20** S. 3633-3636
- De Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., van Montagu, M., Inze, D. und Castresana, C. (1992). Suppression of the b-1,3 glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J.* **11** S. 2595-2602
- De Kruijff, B. (1997). Biomembranes. Lipids beyond the layer. *Nature* **386** S. 129-130
- De Kerchove D'Exaerde, A., Supply, P., Dufour, J.-P., Bogaerts, P., Thinès, D., Goffeau, A. und Boutry, M. (1995). Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase by a plant H⁺-ATPase gen. *J.Biol.Chem.* **270** S. 23828-23837
- Dellaporta, S.L., Wood, J. und Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol.Biol.* **1** S. 19-21

- Demel, R.A. und de Kruijff, B. (1976). The function of sterols in membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **457** S. 109-152
- Devaux, P.F. und Morris, R. (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* **5** S. 241-246
- De Zoeten, G.A., Gaard, G. und Diez, F.B. (1972). Nuclear vesiculation associated with pea enation mosaic virus-infected plant tissue. *Virology* **48** S. 638-647
- De Zoeten, G.A., Assink, A.M. und Van Kammen, A. (1974). Association of cowpea mosaic virus-induced double-stranded RNA with a cytopathological structure in infected cells. *Virology* **59** S. 341-355
- Diboll, A.G. und Larson, D.A. (1966). An electron microscopic study of the mature megagametophyte in *Zea mays*. *Amer.J.Bot.* **53** S. 391-402
- Dimcheff, D.E., Askovic, S., Baker, A.H., Johnson-Fowler, C. und Portis, J.L. (2003). Endoplasmic reticulum stress is a determinant of retrovirus-induced spongiform neurodegeneration. *J.Virol.* **77** S. 12617-12629
- Dittmer, J.C. und Lester, R.T. (1964). A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J.Lipid Res.* **5** S. 126-127
- Domergue, F., Lerchl, J., Zaehring, U. und Heinz, E. (2002). Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur.J.Biochem.* **269** S. 4105-4113
- Domergue, F., Abbadi, A., Ott, C., Zank, T.K., Zähringer, U. und Heinz, E. (2003). Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast. *J.Biol.Chem.* **278** S. 35115-35126
- Donahue, T.F. und Cigan, A.M. (1990). Sequence and structural requirements for efficient translation in yeast. *Methods Enzymol.* **185** S. 366-372
- Dorner, A.J., Wasley, L.C. Kaufman, R.J. (1992). Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* **11** S. 1563-1571
- Dörmann, P. und Benning, C. (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* **7** S. 112-118
- Dörr, I. (1969). Feinstruktur intrazellulär wachsender *Cuscuta*-Hyphen. *Protoplasma* **67** S. 123-137
- Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu.Rev.Biochem.* **66** S. 199-232

- Doye, V., Wepf, R. und Hurt, E.C. (1994). A novel nuclear pore protein Nup133p with distinct roles in poly(A)⁺ RNA transport and nuclear pore distribution. *EMBO J.* **13** S. 6062-6075
- Dribnenki, J.C.P. und Green, A.G. (1995). LinolaTM, 947' low linolenic acid flax. *Can.J.Plant Sci.* **75** S. 201-202
- Elgersma, Y., Kwast, L., van den Berg, M., Snyder, W.B., Distel, B., Subramani, S. und Tabak, H.F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S. cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* **16** S. 7326-7341
- Emans, N., Zimmermann, S. und Fischer, R. (2002). Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* **14** S. 71-86
- Enoch, H.G. und Strittmatter, P. (1979). Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J.Biol.Chem.* **254** S. 8976-8981
- Erdmann, R. und Blobel, G. (1995). Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J.Cell Biol.* **128** S. 509-523
- Esau, K. und Gill, R.H. (1971). Aggregation of endoplasmic reticulum and its relation to the Nucleus in a differentiating sieve element. *J.Ultrastr.Res.* **34** S. 144-158
- Essigmann, B., Guler, S., Narang, R.A., Linke, D. und Benning, C. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95** S. 1950-1955
- Exton, J.H. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim.Biophys.Acta* **1212** S. 26-42
- Eymé, J. (1966). Infrastructure des cellules nectarigènes de *Doplotaxis erucooides* D.C., *Helleborus niger* L. et *H. foetidus*. *C.R.Séances Soc.Biol. (Paris)* **262** S. 1629-1632
- Fahn, A. (2000). Structure and function of secretory cells. Aus: Plant Trichomes. *Adv.Bot.Res.* incorporating *Adv.Plant Pathol.* Hallahan, D.L. und Gray, J.C., Eds. Academic Press, London, **31** S. 37-75
- Fahn, A. und Evert, R.F. (1974). Ultrastructure of the secretory ducts of *Rhus glabra* L. *Amer.J.Bot.* **61** S. 1-14
- Fernandez, D.E., Turner, R.F. und Crouch, M.L. (1991). In situ localisation of storage protein mRNA in developing meristems of *Brassica napus* embryos. *Development* **111** S. 299-313
- Fiske, C.H. und SubbaRow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J.Biol.Chem.* **66** S. 375-400

Foster, L.J. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100** S. 5813-5818

Frey, J. und Röhm, K. (1978). Subcellular localisation and levels of aminopeptidases and dipeptidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim.Biophys.Acta* **527** S. 31-41

Fritz, M., Lokstein, H., Hackenberg, D., Welti, R., Roth, M., Zähringer, U., Fulda, M., Hellmeyer, W., Ott, C., Wolter, F.P. und Heinz, E. (2007). Channeling of eukaryotic diacylglycerol into the biosynthesis of plastidial phosphatidylglycerol. *J.Biol.Chem.* **282** S. 4613-4625

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

Fulda, M., Shockey, J., Werber, M., Wolter, F.P. und Heinz, E. (2002). Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant J.* **32** S. 93-103

Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. und Lazarow, P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* **93** S. 97-102

Gage, D.J.(2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **68** S. 280-300

Gallet, P.F., Petit, J.M., Maftah, A., Zachowski, A. Julien, R. (1997). Asymmetrical distribution of cardiolipin in yeast inner mitochondrial membrane triggered by carbon catabolite repression. *Biochem.J.* **324** S. 627-634

Gallet, P.F., Zachowski, A., Julien, R., Fellmann, P., Devaux, P.F. und Maftah, A. (1999). Transbilayer movement and distribution of spin-labelled phospholipids in the inner mitochondrial membrane. *Biochim.Biophys Acta.* **1418** S. 61-70.

Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G. und Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413** S. 425-428

George, S.K., Najera, L., Sandoval, R., Countryman, C., Davis, R.W. und Ihler, G.M. (1989). The hydrophobic domain of cytochrome b₅ is capable of anchoring β -Galactosidase in *Escherichia coli* membranes. *J.Bacteriol.* **171** S. 4569-4576

George, S.K., Najera, L., Sandoval, R. und Ihler, G.M. (1991). β -Galactosidase fused to the hydrophobic domain of cytochrome b₅ spontaneously associates with liposomes. *Biochim.Biophys.Acta* **1061** S. 26-32

- Geuze, H.J., Murk, J.L., Stroobants, A.K., Griffith, J.M., Kleijmeer, M.J., Koster, A.J., Verkleij, A.J., Distel, B. und Tabak, H.F. (2003). Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol.Biol.Cell* **14** S. 2900-2907
- Giroud, C. und Siegenthaler, P.A. (1988). Development of oat prothylakoids into thylakoids during greening does not change transmembrane galactolipid asymmetry but preserves the thylakoid bilayer. *Plant Physiol.* **88** S. 412-417
- Goldbach, R.W. und Wellink, J. (1996). Comoviruses: Molecular biology and Replikation. *In: The plant viruses, Vol.5: Polyhedral virions and bipartite RNA genomes.* Harrison, B.D. und Murant, A.F., Eds, Plenum Press, New York S. 35-76
- Gong, F-C., Giddings, T.H., Meehl, J.B., Staehelin, L.A. und Galbraith, D.W. (1996). Z-membranes: Artificial organelles for overexpressing recombinant integral membrane proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93** S. 2219-2223
- Goodin, M., Yelton, S., Ghosh, D., Mathews, S. und Lesnaw, J. (2005). Live-cell imaging of rhabdovirus-induced morphological changes in plant nuclear membranes. *Mol.Plant Microbe Interact.* **18** S. 703-709
- Gounaris, K., Mannock, D.A., Sen, A., Brajn, A.P.R., Williams, W.P. und Quinn, P.J. (1983). Polyunsaturated fatty acyl residues of galactolipids are involved in the control of bilayer/nonbilayer lipid transitions in higher plant chloroplasts. *Biochim.Biophys.Acta* **732** S. 229-242
- Grami, B., Baker, R.J. und Stefansson, B.R. (1977). Genetics of protein and oil content in summer rape: heritability, number of effective factors, and correlations. *Can.J.Plant Sci.* **57** S. 937-943
- Greenberg, M.L., Klig, L.S., Letts, V.A., Shicker Loewy, B., Henry, S.A. (1983). Yeast mutant defective in phosphatidylcholine synthesis. *J.Bacteriol.* **153** S. 791-799
- Greener, A. (1990). *Strategies: 3* 5-6
- Griac, P., Swede, M.J. und Henry, S.A. (1996). The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of the INO1 gene of yeast. *J.Biol.Chem.* **271** S. 25692-25698
- Grote, M., Reichelt, R. und Wiermann, R. (1999). A new protocol to prepare dry plant specimens for electron microscopy and immunocytochemistry. *Micron* **30** S. 65-70
- Gruner, S.M. (1985). Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82** S. 3665-3669
- Gummadi, S.N. und Kumar, K.S. (2005). The mystery of phospholipid flip-flop in biogenic membranes. *Cell.Mol.Biol.Lett.* **10** S. 101-121.
- Guinea, R. und Carrasco, L. (1990). Phospholipid biosynthesis and poliovirus genome replication, two coupled phenomena. *EMBO J.* **9** S. 2011-2016

Gunning, B.E.S. und Steer, M.W. (1977). Tafel 13 – Transferzellen. In: *Biologie der Pflanzenzelle*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York S. 30-31

- (1977b). Tafel 22 – Das Cytoplasma von Tapetum-Zellen. In: *Biologie der Pflanzenzelle*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York S. 48-49
- (1977c). Tafel 23 – Das glatte Endoplasmatische Retikulum in Mehldrüsenzellen In: *Biologie der Pflanzenzelle*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York S. 50-51
- (1977d). Tafeln 31 und 32 – Plastiden I und Plastiden II In: *Biologie der Pflanzenzelle*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York S. 50-51
- (1977e). Tafel 29 – Mitochondrien In: *Biologie der Pflanzenzelle*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York S. 50-51

Guo, D., Venkatramesh, M. und Nes, W.D. (1995). Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. *Lipids* **30** S. 203-219

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. und Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol.Biol.* **25** 989-994

Hajra, A.K. (1974). On extraction of acyl and alkyl dihydroxyacetone phosphate from incubation mixtures. *Lipids* **9** S. 502-505

Hanlon, M., Begum, R.R., Newbold, R.J., Whitford, D. und Wallace, B.A. (2000). In vitro membrane-inserted conformation of the cytochrome b5 tail. *Biochem.J.* **352** S. 117-124

Hanton, S.L., Bortolotti, L.E., Renna, L., Stefano, G. und Brandizzi, F. (2005). Crossing the divide--transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plants. *Traffic* **6** S. 267-277

Hara-Nishimura, I.I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y. und Nishimura, M. (1998). Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles *Plant Cell.* **10** S. 825-836

Harding, H.P., Zhang, Y. und Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397** S. 271-274

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. und Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol.Cell* **11** S. 619-633

Hardwick, K.G. und Pelham, H.R. (1992). SED5 encodes a 39-kD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex. *J.Cell Biol.* **119** S. 513-521

Härtel, H., Dörmann, P. und Benning, C. (2000). DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97** S. 10649-10654

- Härtel, H., Essigmann, B., Lokstein, H., Hoffmann-Benning, S., Peters-Kottig, M. und Benning, C. (1998). The phospholipid-deficient *pho1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. *Biochim.Biophys.Acta* **1415** S. 205-218
- Hawes, C. und Satiat-Jeunemaitre, B. (2005). The plant golgi apparatus – going with the flow. *Biochim.Biophys.Acta* **1744** S. 93-107
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. und Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol.Biol.Cell*, **10** S. 3787–3799.
- Heath, J.D., Weldon, R., Monnot, C. und Meinke, D.W. (1986). Analysis of storage proteins in normal and aborted seeds from embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **169** S. 304-312
- Hegesh, E., Hegesh, J. und Kaftory, A. (1986). Congenital methemoglobinemia with a deficiency of cytochrome b5. *N.Engl.J.Med.* **314** S.757-761
- Heiland, I. und Erdmann, R. (2005). Biogenesis of peroxisomes – Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* **272** S. 2362-2372
- Heinrich, G. (1969). Elektronenmikroskopische Beobachtungen zur Entstehungsweise der Exkretbehälter von *Ruta graveolens*, *Citrus limon* und *Poncirus trifoliata*. *Oesterreichische Bot.Z.* **117** S. 397-403
- Hentschel, E. und Wagner, G. (1990). Zoologisches Wörterbuch. 4. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Herman, E.M., Li, X., Su, R.T., Larsen, P., Hsu, H. und Sze, H. (1994). Vacuolar-Type H⁺ - ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells. *Plant Physiol.* **106** S. 1313-1324
- Hernandez, L.E. und Cooke, D.T. (1996). Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochemistry* **42** S. 341-346
- Higgins, T.J.V. (1984). Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann.Rev.Plant Physiol.* **35** S. 191-221
- Higgins, D.G. und Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73** S. 237-44.
- Hirsch, J.P. und Henry, S.A. (1986). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* inositol-1-phosphate synthase (INO1) gene is regulated by factors that affect phospholipid synthesis. *Mol.Cell.Biol.* **6** S. 3320-3328
- Hölzl G, Zähringer U, Warnecke D, Heinz E. (2005). Glycoengineering of cyanobacterial thylakoid membranes for future studies on the role of glycolipids in photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **46** S.1766-1778

- Hohl, I., Robinson, D.G., Chrispeels, M.J., and Hinz, G. (1996). Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without clathrin coat. *J. Cell Sci.* **109** S. 2539–2550
- Holstein, S.E.H. (2002). Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* **3** S. 614-620
- Holt, S.C., Gauthier, J.J. und Tipper, D.J. (1975). Ultrastructural studies of sporulation in *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **122** S. 1322-1338
- Hong, Z. und Verma, D.P.S. (1994). A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** S. 9617-9621
- Horrocks, L.A. und Sharma, M. (1982). Phospholipids. Hawthorne, J.N., Ansell, G.B., Eds. Elsevier, Amsterdam S. 51
- Hovland, P., Flick, J., Johnston, M. und Sclafani, R.A. (1989). Galaktose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene* **83** S. 57-64
- Hsieh, K. und Huang, H.C. (2004). Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol.* **136** S. 3427-3434
- Huang, T.H., Lee, C.W., Das Gupta, S.K., Blume, A. und Griffin, R.G. (1993). A ¹³C and ²H nuclear magnetic resonance study of phosphatidylcholine/cholesterol interactions: characterization of liquid-gel phases. *Biochemistry* **32** S. 13277-13287.
- Huang, C.-H., Lin, H.-N., Li, S. und Wang, G. (1997). Influence of the positions of *cis* double bonds in the sn-2-acyl chain of phosphatidylethanolamine on the bilayer's melting behaviour. *J. Biol. Chem.* **272** S. 21917-21926
- Hwang, Y.T, Pelitire, S.M., Henderson, M.P.A., Andrews, D. W., Dyer, J. und Mullen, R.T. (2004). Novel targeting signals mediate the sorting of different isoforms of the tail-anchored membrane protein cytochrome b5 to either endoplasmic reticulum or mitochondria. *Plant Cell* **16** S. 3002-3019
- Hyde, M., Block-Alper, L., Felix, J., Webster, P., Meyer, D.I. (2002). Induction of secretory pathway components in yeast is associated with increased stability of their mRNA. *J. Cell Biol.* **156** S. 993-1001.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Oshumi, M., Noda, T. und Oshumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408** S. 488-492
- Inada, N. und Wildermuth, M.C. (2005). Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of Arabidopsis mature leaf. *Planta* **221** S. 9-16
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96** S. 23-28

- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K.L., Rajewsky, K. und Glimcher, L.H. (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat.Immunol.* **4** S. 321-329
- Iwata, Y. und Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102** S. 5280-5285
- Jacobi, A., Werner, D. und Müller, P. (1995). Molekulare Mechanismen der Symbioseentwicklung von *Rhizobium/ Bradyrhizobium* und Leguminosen. *Biospectrum* **2** S. 21-28
- Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C.A., Lutes, J., Benning, C. und Chory, J. (2000). Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97** S. 8175-8179
- Jelitto-Van Dooren, E.P., Vidal, S. und Denecke, J. (1999). Anticipating endoplasmic reticulum stress. A novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* **11** S. 1935-1944
- Jensen, W.A. (1965). The ultrastructure and histochemistry of the synergids of cotton. *Amer.J.Bot.* **52** S. 238-256
- Jensen, M.T., Knudsen, J. und Olson, J.M. (1991). A novel aminoglycosphingolipid found in *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* 6230. *Arch.Microbiol.* **156** S. 248-254
- Jesch, S.A., Zhao, X., Wells, M.T. und Henry, S.A. (2005). Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *J.Biol.Chem.* **280** S. 9106-9118
- Jiang, F., Rizavi, H.S. und Greenberg, M.L. (1997). Cardiolipin is not essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on fermentable or non-fermentable carbon sources. *Mol.Microbiol.* **26** S. 481-491
- Jones, A.L. und Fawcett, D.W. (1966). Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver). *J.Histochem.Cytochem.* **14** S. 215-232
- Jorasch, P. (1999). Isolierung, Klonierung und biochemische Charakterisierung neuartiger Diacylglycerol-Glycosyltransferasen aus Bakterien und Pflanzen. *Dissertation*. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Jorasch, P., Warnecke, D.C., Lindner, B., Zähringer, U. und Heinz, E. (2000). Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycolipids, glycosphingolipids, glycosphingolipids and glycosylsterols. *Eur.J.Biochem.* **267** S. 3770-3783
- Josefsson, L.G., Lenman, M., Ericson, M.L., Rask, L. (1987). Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from *Brassica napus*. *J.Biol.Chem.* **262** S. 12196-12201

Jouhet, J., Marechal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. und Block, M.A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J.Cell Biol.* **167** S. 863-874

Joyard, J., Marechal, E., Block, M.A. und Douce, R. (1996). Plant galactolipids and sulfolipid: structure, distribution and biosynthesis. In: Membranes: Specialized functions in plants. Smallwood, M., Knox, J.P. und Bowles, D.J., Eds. BIOS Scientific Publishers, S. 179-194

Jürgens, G. (2004). Membrane trafficking in plants. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **20** S. 481-504

Kärgel, E., Menzel, R., Honeck, H., Vogel, F., Böhmer, A. und Schunck, W-H. (1996). *Candida maltosa* NADPH-cytochrome P450 reductase: cloning of a full-length cDNA, heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and function of the N-terminal region for membrane anchoring and proliferation of the endoplasmic reticulum. *Yeast* **12** S. 333-348

Khan, M.Z. und Tucker, I.G. (1992). A study of the phase transition behaviours of cholesterol and saturated egg lecithin, and their interaction by differential scanning calorimetry. *Chem.Pharm.Bull.* **40** S. 3056-3061

Kamauchi, S., Nakatani, H., Nakano, C. und Urade, R. (2005). Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* **272** S. 3461-3476

Kamitani, T., Menon, A.K., Hallaq, Y., Warren, C.D. und Yeh, E.T. (1992). Complexity of ethanolamine phosphate addition in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **267** S. 24611-24619

Kaneko, Y., und Keegstra, K. (1996). Plastid biogenesis in embryonic pea leaf cells during early germination. *Protoplasma* **195** S. 59-67.

Kaufman R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13** S. 1211-1233

Kaufman, R.J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J.Clin.Invest.* **110** S. 1389-1398

Kearns, E.V., Keck, P. und Somerville, C.R. (1992). Primary structure of cytochrome b₅ from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) deduced from peptide and cDNA sequences. *Plant Physiol.* **99** S. 1254-1257

Kelly, A.A. und Dörmann, P. (2004). Green light for galactolipid trafficking. *Curr.Opin.Plant Biol.* **7** S. 262-269

Kelly, A.A., Froehlich, J.E. und Dörmann, P. (2003). Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* **15** S. 2694-2706

Kent, C. (1997). CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim.Biophys.Acta* **1348** S. 79-90

- Kiss, J.Z., Giddings, T.H., Staehelin, L.A., und Sack, F.D. (1990). Comparison of the ultrastructure of conventionally fixed and high pressure frozen/freeze substituted root tips of *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Protoplasma* **157** S. 64–74.
- Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K. und Ohta, H. (2004). *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol.* **134** S. 640-648
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M. und Iba, K. (1994). Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast omega-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **105** S. 601-605
- Koizumi, N., Martinez, I.M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H. und Chrispeels, M.J. (2001). Molecular characterization of two *Arabidopsis* Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol.* **127** S. 949-962
- Koncz, C. und Schell, J. (1986). The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol.Gen.Genet.* **204** S. 383-396
- Korchak, H.M. und Masoro, E.J. (1964). Free fatty acids as lipogenic inhibitors. *Biochim.Biophys.Acta* **84** S. 750-753
- Koynova, R. und Caffrey, M. (2006). Phases and phase transitions of the hydrated phosphatidylethanolamines. *Chem.Phys.Lipids* **69** S. 1-34
- Koynova, R.D., Tenchov, B.G. und Quinn, P.J. (1989). Sugars favor formation of hexagonal phase at the expense of lamellar liquid crystalline phase in hydrated phosphatidylethanolamines. *Biochim.Biophys.Acta* **980** S. 377-380
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E.L.L. (2001). Predicting transmembrane topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J.Mol.Biol.* **305** S. 567-580
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G.H. und Barber, J. (2000). Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J.Biol.Chem.* **275** S. 6509-6514
- Kwok, E.Y. Hanson, M.R. (2004). Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Rep.* **23** S. 188-195
- Lang, N.J. (1968). The fine structure of blue-green algae. *Ann.Rev.Microbiol.* **22** S. 15-46
- Lang, C. und Looman, A.C. (1995). Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **44** S. 147-156
- Larson, L.L., Parrish, M.L., Koning, A.J. und Wright, R.L. (2002). Proliferation of the endoplasmic reticulum occurs normally in cells that lack a functional unfolded protein response. *Yeasts* **19** S. 373-393

Lautenschläger, H. (2003). Starke Wirkung – Phospholipide in Kosmetika. *Kosmetik International* **2** S. 38-40 Einsicht unter → www.dermaivduals.de/publik/phospholipide.htm

Lederer, F., Ghirir, R., Guiard, B., Cortial, S. und Ito, A. (1983). Two homologous cytochromes b5 in a single cell. *Eur.J.Biochem.* **132** S. 95-102.

Leshem, Y. (1992a). Sterols. *In: Plant membranes – A biophysical approach to structure, development and senescence.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London S.57-64

- (1992b). Plant membrane biophysics in development and senescence. *In: Plant membranes – A biophysical approach to structure, development and senescence.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London S.113-154

Lester, R.L., Wells, G.B., Oxford, G. und Dickson, R.C. (1993). Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *J.Biol.Chem.* **268** S. 845-856

Li, R-J., Wang, H-Z., Mao, H., Lu, Y-F. und Hua, W. (2006). Identification of differentially expressed genes in seeds of two near-isogenic *Brassica napus* lines with different oil content. *Planta* **224** S. 952-962

Lightner, V.A., Bell, R.M. and Modrich, P. (1983). The DNA sequences encoding plsB and dgl loci of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* **258** S. 10856-10861

Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T. und Geurts, R. (2005). Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **102** S. 10375-10380

Lindblom, G. und Rilfors, L. (1989). Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids – possible biological relevance. *Biochim.Biophys.Acta* **988** S. 221-256

Lochnit, G., Geyer, R., Heinz, E., Rietschel, E.T., Zähringer, U. und Müthing, J. (2001). Glycolipids and Glycosphingolipids: Chemical biology and Biomedicine, Plant Glycolipids, in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Fraser-Reid, B., Tatsuta, K. und Thiem, J., eds., Springer-Verlag, Berlin, Vol. III S. 2183-2252

Lockhausen J. und Kristen, U. (1986). Dictyosome-endoplasmic reticulum associations in gland cells of *Veronica beccabunga*. *Eur.J.Cell Biol.* **42** S. 328-331

Lohr, D., Venkow, P. und Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* **9** S. 777-787

Lucas Meyer (1998) int. Mitteilung →
Auszug unter: www.foodmultimedia.de/suesswaren/archiv/index.php?id=180

Mackenzie, J.M., Jones, M.K. und Westaway, E.G. (1999). Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J.Virol.* **73** S. 9555-9567

- Makowska, J.M., Bonner, F.W. und Gibson, G.G. (1991). Comparative induction of cytochrome P450IVA1 and peroxisome proliferation by ciprofibrate in the rat and marmoset. *Arch.Toxicol.* **65** S. 106-113
- Manoharan, K., Chae, H.S., Cha, J.M., Cho, S.H., Shin, S.H., Cho, B.H., Lee, W.S. (2000). Synthesis of phosphatidylserine in carrot cells cultured under carbon-source starvation. *Plant Cell Physiol.* **41** S. 1143-1148
- Martinez, I.M. und Chrispeels, M.J. (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell* **15** S. 561-576
- Martzivanou, M. und Hampp, R. (2003). Hyper-gravity effects on the *Arabidopsis* transcriptome. *Physiol.Plant.* **118** S. 221-231
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N. Miyajima, K. (1995). Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* **34** S. 3423-3429
- McConn, M. und Browse, J. (1998). Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.***15** S. 521-530
- McGraw, P. und Henry, S.A. (1989). Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *opi3* gene: effects on phospholipid methylation, growth and cross-pathway regulation of inositol synthesis. *Genetics* **122** S. 317-330
- Menon, A.K. und Stevens, V.L. (1992). Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein. *J.Biol.Chem.* **267** S. 15277-15280
- Menzel R, Kargel E, Vogel F, Bottcher C, Schunck WH. (1996). Topogenesis of a microsomal cytochrome P450 and induction of endoplasmic reticulum membrane proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Biochem.Biophys.* **330** S. 97-109.
- Menzel, R., Vogel, F., Kärgele, E. und Schunck, W.-H. (1997). Inducible membranes in yeast: relation to the unfolded protein response pathway. *Yeast* **13** S. 1211-1229
- Mileykovskaya, E., Zhang, M. und Dowhan, W. (2005). Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry (Moscow)*, translated from *Biokhimiya* **70** S. 154-158
- Mitoma, J. und Ito, A. (1992). The carboxy-terminal 10 amino acid residues of cytochrome b5 are necessary for its targeting to the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **11** S. 4197-4203
- Mongrand, S., Cassagne, C. und Bessoule, J.-J. (2000). Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Physiol.* **122** S. 845-852
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P., Hartmann, M.A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. und Bessoule, J.J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **279** S. 36277-36286

- Monteiro, D., Castanho Coelho, P., Rodrigues, C., Camacho, L., Quader, H. und Malhó, R. (2005). Modulation of endocytosis in pollen tube growth by phosphoinositides and phospholipids. *Protoplasma* **226** S. 31–38
- Morant, M., Schoch, G.A., Ullmann, P., Ertunc, T., Little, D., Olsen, C.E., Petersen, M., Negrel, J., Werck-Reichhart, D. (2007). Catalytic activity, duplication and evolution of the CYP98 cytochrome P450 family in wheat. *Plant Mol.Biol.* **63** S. 1-19
- Morell, P. und Norton, W.T. (1980). Myelin. *Sci.Amer.* S. 74-89
- Morikawa, M. und Yamashita, S. (1978). Inhibition of yeast phosphatidic-acid synthesis by free fatty acids. *Eur.J.Biochem.* **84** S. 61-68
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, I., Hartland, R.P. und Latge, J.P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J.Biol.Chem.* **275** S. 14882-14889
- Mueller-Roeber, B. und Pical, C. (2002). Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol.* **130** S. 22-46
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.* **155** S. 335-350
- Munro, S. (1995). An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.* **14** S. 4695-4704
- Murata, Y., Watanabe, T., Sato, M., Momose, Y., Nakahara, T., Oka, S.-I., Iwahashi, H. (2003). Dimethylsulfoxide exposure facilitates phospholipid biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. *J.Biol.Chem.* **278** S. 33185-33193
- Murray, R.G. und Watson, S.W. (1965). Structure of *Nitrosocystis oceanus* and comparison with *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *J.Bacteriol.* **89** S.1594-1609
- Naik, R.R. und Jones, E.W. (1998). The PBN1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: an essential gene that is required for the post-translational processing of the protease B precursor. *Genetics* **149** S. 1277-1292
- Nagiec, M.M., Wells, G.B., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (1993). A suppressor gene that enables *Saccharomyces cerevisiae* to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an Escherichia coli fatty acyltransferase. *J.Biol.Chem.* **268** S. 22156-22163
- Nakai, K. und Kanehisa, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*: **14** S. 897-911
- Nakatsukasa, K., Nishikawa, S., Hosokawa, N., Nagata, K. und Endo, T. (2001). MnI1p, an α -mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J.Biol.Chem.* **276** S. 8635-8638

- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **7** S. 599–609
- Navarro, B., Russo, M., Pantaleo, V. und Rubino, L. (2006). Cytological analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells supporting cymbidium ringspot virus defective interfering RNA replication. *J.Gen.Virol.* **87** S. 705-714
- Nebauer, R., Birner-Grünberger, R. und Daum, G. (2004). Biogenesis and cellular dynamics of glycerophospholipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Lipid metabolism and membrane biogenesis. Daum, G., Ed, In: Topics in current genetics. Hohmann, S., Series Ed, Springer S. 125-168
- Nezil, F.A. und Bloom, M. (1992). Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes. *Biophys.J.* **61** S. 1176-1183
- Nikawa, J. und Yamashita, S. (1992). IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **6** S. 1441-1446
- Nierzwicki-Bauer, S.A., Balkwill, D.L. und Stevens, S.E. Jr. (1983). Three-dimensional ultrastructure of a unicellular cyanobacterium. *J.CellBiol.* **97** S.713-722.
- Nishikawa, S., Hirata, A. und Nakano, A. (1994). Inhibition of endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport induces relocalization of binding protein (BiP) within the ER to form the BiP bodies. *Mol.Biol. Cell* **5** S. 1129-1143
- Nishino, H. und Ito, A. (1986). Subcellular distribution of OM cytochrome b-mediated NADH-semidehydroascorbate reductase activity in rat liver. *J.Biochem.* **100** S. 1523-1531
- Novik, G.I., Vysotskii, V.V. und Bogdanovskaia, Zh.N. (1994). Cellular ultrastructure of various species of the genus *Bifidobacterium*. *Mikrobiologiya* **63** S. 515-522
- O'Brien, I.E., Reutelingsperger, C.P. und Holdaway, K.M. (1997). Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* **29** S. 28-33.
- Oelze, J., and G. Drews. 1972. Membranes of photosynthetic bacteria. *Biochim.Biophys.Acta* **265** S. 209-239
- Öpik, H. (1985). The fine structure of some dry seed tissues observed after completely anhydrous chemical fixation. *Ann.Bot.* **56** S. 453-466
- Ogishima, T., Kinoshita, J.Y., Mitani, F., Suematsu, M. und Ito, A. (2003). Identification of outer mitochondrial membrane cytochrome b5 as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. *J.Biol.Chem.* **278** S. 21204-21211
- Ohlrogge, J.B. und Browse, J.A. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7** S. 957-970
- Ohlrogge, J.B. und Jaworski, J.G. (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **48** S. 109-136

- Okkels, J.S. (1996). A URA3-promoter deletion in a pYES2 vector increases the expression level of a fungal lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **782** S. 202-207
- Opekarová, M. und Tanner, W. (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins – a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim.Biophys.Acta* **1610** S. 11-22
- Orrenius, S., Ericsson, J.L. und Ernster, L. (1965). Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolising enzyme and its relationship to the proliferation of the endoplasmic membranes. A morphological and biochemical study. *J.Cell Biol.* **25** S. 627-639
- Oshino, N., Imai, Y. und Sato, R. (1971). A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J.Biochem.* **69** S. 155-167
- Otegui, M.S., Capp, R. und Staehelin, L.A. (2002). Developing seeds of Arabidopsis store different minerals in two types of vacuoles and in the Endoplasmic Reticulum. *Plant Cell* **14** S. 1311–1327
- Oyama, T.; Shimura, Y. und and Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* 1997 **11** S. 2983-2995
- Palazzolo, M.J., Hamilton, B.A., Ding, D.L., Martin, C.H., Mead, D.A., Mierendorf, R.C., Raghavan, K.V., Meyerowitz, E.M. und Lipshitz, H.D.(1990). *Phage lambda* cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion-protein synthesis and Cre-loxP automatic plasmid subcloning. *Gene* **88** S. 25-36.
- Pande, S.V. und Mead, J.F. (1968). Inhibition of enzyme activities by free fatty acids. *J.Biol.Chem.* **243** S. 6180-6185
- Paoletti, A. und Chang, F. (2000). Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol.Biol.Cell* **11** S. 2757-2773
- Pardun, H. (1985). Pflanzenlecithine als Hilfsmittel in der Lebensmittelindustrie. *Seifen, Fette, Öle, Wachse* **14** S. 409-413 + 503-505.
- Pardun, H. (1989). Pflanzenlecithine – wertvolle Hilfs- und Wirkstoffe? *Fat Sci.Technol.* **91** S. 45-58
- Paul, R.N. und Egley, G.H. (1983). Techniques for preparing seeds with water-impermeable coats for light and electron microscopy. *Stain Technol.* **58** S. 73-77
- Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N. und Snijder, E.J. (1999). Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J.Virol.* **73** S. 2016-2026

- Pedrazzini, E., Villa, A. und Borgese, N. (1996). A mutant cytochrome b5 with a lengthened membrane anchor escapes from the endoplasmic reticulum and reaches the plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93** S. 4207-4212
- Pedrazzini, E., Villa, A., Longhi, R., Bulbarelli, A. und Borgese, N. (2000). Mechanism of residence of cytochrome b(5), a tail-anchored protein, in the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* **148** S. 899-914
- Pelham, H.R. (2001). Traffic through the Golgi apparatus. *J.Cell Biol.* **155** S. 1099-1101
- Pelham, H.R. und Munro, S. (1993). Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* **75** S. 603-605
- Pinck, C. (2001). Immunologische Untersuchungen am Schlüsselenzym der Ammoniak-oxidanten. *Dissertation*. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Pouyssegur, J., Shin, R.P. und Pastan, I. (1977). Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* **11** S. 941-947
- Preisfeld, A. und Ruppel, H.G. (1995). Detection of sialic acid and glycosphingolipids in *Euglena gracilis* (Euglenozoa). *Arch.Protistenkd.* **145** S. 251-260
- Prüfert, K., Vogel, A. und Krohne, G. (2004). The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. *J.Cell Sci.* **117** S. 6105-6116
- Radhakrishnan, A. und McConnell, H. (2005). Condensed complexes in vesicles containing cholesterol and phospholipids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102** S. 12662-12666
- Radin, N.S.(1958). Glycolipide determination. *Methods Biochem.Anal.* **6** S. 163-89
- Raison, J.K. und Orr, G.R. (1986).Phase transitions in liposomes formed from the polar lipids of mitochondria from chilling-sensitive plants. *Plant Physiol.* **81** S. 807-811.
- Raison, J.K., Roberts, J.K.M.und Berry, J.A. (1982). Correlations between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant *Nerium oleander* to growth temperature. *Biochim.Biophys.Acta* **688** S. 218-228
- Ralle, T., Grund, C., Franke, W.W. und Stick, R. (2004). Intranuclear membrane structure formations by CaaX-containing nuclear proteins. *J.Cell Sci.* **117** S. 6095-6104
- Rawlyer, und Siegenthaler, P.A. (1985). Transversal localization of monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol in spinach thylakoid membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **815** S. 287-298
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F. und Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412** S. 300-307

- Remsen, C.C., Watson, S.W., Waterbury, J.B. und Truper, H.G. (1968). Fine structure of *Ectothiorhodospira mobilis* Pelsh. *J.Bacteriol.* **95** S. 2374-2392
- Reynolds, E.S.(1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy . *J.Cell.Biol.* **17** S. 208-212
- Roach, C., Feller, S.E., Ward, J.A., Shaikh, S.R., Zerouga, M. und Stillwell, W. (2004). Comparison of *cis* and *trans* fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties. *Biochemistry* **43** S. 6344-6351
- Roth, L.E. und Stacey, G. (1989). Cytoplasmic membrane systems involved in bacterium release into soybean nodule cells as studied with two *Bradyrhizobium japonicum* mutant strains. *Eur.J.Cell Biol.* **49** S. 24-32
- Russel, J.A., Roy, M. und Sanford, J.C. (1992). Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.* **28P** S. 97-105
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C. und Ohlrogge, J.B. (2002). Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *Plant Cell* **14** S. 1191-1206
- Russell, S.D. (1979). Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Can.J.Bot.* **57** S. 1093-1110
- Sacandé, M., Golovina, E.A., van Aelst, A.C. und Hoekstra, F.A. (2001). Viability loss of neem (*Azadirachta indica*) seeds associated with membrane phase behaviour. *J.Exp.Bot.* **52** S. 919-931
- Sagt, C.M.J., Müller, W.H., van der Heide, L., Boonstra, J., Verkleij, A.J. und Verrips, C.T. (2002). Impaired cutinase secretion in *Saccharomyces cerevisiae* induces irregular endoplasmic reticulum (ER) membrane proliferation, oxidative stress, and ER-associated degradation. *Appl.Envir.Microbiol.* **68** S. 2155-2160
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*: 2nd Edition.
- Sanderfoot, A.A.und Raikhel, N.V. (1999). The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell* **11** S. 629-642
- Sandhoff, R., Brugger, B., Jeckel, D., Lehmann, W.D. und Wieland, F.T. (1999). Determination of cholesterol at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J.Lipid Res.* **40** S. 126-132
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74** S. 5463-5467
- Santos-Rosa, H., Leung, J., Grimsey, N., Peak-Chew, S. und Siniosoglou, S. (2005). The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth. *EMBO J.* **24** S. 1931-1941

- Sato, N. (2004). Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution. *J. Plant Res.* **117** S. 495-505
- Sawahel, W.A. (2002). Stable genetic transformation of garlic plants using particle bombardment. *Cell Mol.Biol.Lett.* **7** S. 49-59
- Scarborough, G.A. und Nyc, J.F. (1967a). Properties of a phosphatidylmonomethyl-ethanolamine N-methyl-transferase from *Neurospora crassa*. *Biochim.Biophys. Acta* **146** S. 111-119.
- (1967b). Methylation of ethanolamine phosphatides by microsomes from normal and mutant strains of *Neurospora crassa*. *J.Biol.Chem.* **242** S. 238-242.
- Schena, M., Lloyd, A.M. und Davis, R.W. (1991). A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88** S. 10421-10425
- Schenkman, J.B. und Jansson, I (2003). The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol.Ther.* **97** S. 139-152.
- Scherer, G.F.E., Martiny-Baron, G. und Stoffel, B. (1988). A new set of regulatory molecules in plants. A plant phospholipid similar to platelet-activating factor stimulates protein kinase and proton translocating ATPase in membrane vesicles. *Planta* **175** S. 241-253
- Schlegel, A., Giddings, Jr., T.H., Ladinsky, M.S. und Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J.Virol.* **70** S. 6576-6588
- Schneider, M. (1992). Lecithine - Gewinnung, Eigenschaften und Bedeutung für die industrielle Anwendung. *Fat Sci.Technol.* **94** S. 524-533.
- Schneiter, R., Brügger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F.T. und Kohlwein, S.D. (1999). Elctrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J.Cell Biol.* **146** S. 741-754
- Schneiter, R., Brügger, B., Amann, C.M., Prestwich, G.D., Epan, R.F., Zellnig, G., Wieland, F.T. und Epan, R.M. (2004). Identification and biophysical characterization of a very-long-chain-fatty acid-substituted phosphatidylinositol in yeast subcellular membranes. *Biochem.J.* **381** S. 941-949
- Schnepf, E. (1964). Zur Feinstruktur von *Geosiphon pyriforme*. Ein Versuch zur Deutung cytoplasmatischer Membranen und Kompartimente. *Arch.Mikrobiol.* **49** S. 112-131
- Schnepf, E. (1966). Organellen-Reduplikation und Zellkompartimentierung. In P. Sitte: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. 3. *Internat. wiss. Konf. Ges. Dtsch. Naturf. u. Ärzte: Probleme der biologischen Reduplikation*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York S. 372-393

Schnepf, E. (1969a). Über den Feinbau von Öldrüsen. I. Die Drüsenhaare von *Arctium lappa*. *Protoplasma* **67** S. 185-194

- (1969b). Über den Feinbau von Öldrüsen. II. Die Drüsenhaare von *Calceolaria* Blüten. *Protoplasma* **67** S. 195-203
- (1969c). Über den Feinbau von Öldrüsen. III. Die Ölgänge von *Salidago canadensis* und die Exkretschläuche von *Arctium lappa*. *Protoplasma* **67** S. 205-212
- (1969d). Über den Feinbau von Öldrüsen. IV. Die Ölgänge von Umbelliferen *Heracleum sphondylium* und *Dorema ammoniacum*. *Protoplasma* **67** S. 375-390
- (1972). Tubuläres endoplasmatisches Reticulum in Drüsen mit lipophilen Ausscheidungen von *Ficus*, *Ledum* und *Salvia*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **163** S. 113-125

Schröder, M. und Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* **569** S. 29-63

Schröder, M., Clark, R. und Kaufman, R.J. (2003). IRE1- and HAC1-independent transcriptional regulation in the unfolded protein response of yeast. *Mol. Microbiol.* **49** S. 591-606

Schulz, S.P. und Jensen, W.A. (1969). Capsella embryogenesis: the suspensor and the basal cell. *Protoplasma* **67** S. 139-163

Schunck, W.H., Vogel, F., Gross, B., Kärigel, E., Mauersberger, S., Kopke, K., Gengnagel, C. und Muller, H.G. (1991). Comparison of two cytochromes P-450 from *Candida maltosa*: primary structures, substrate specificities and effects of their expression in *Saccharomyces cerevisiae* on the proliferation of the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Cell Biol.* **55** S. 336-345

Schweitzer, P.A., Taylor, S.E. und Shultz, L.D. (1991). Synthesis of abnormal immunoglobulins by hybridomas from autoimmune „viable motheaten“ mutant mice. *J. Cell Biol.* **114** S. 35-43

Selstam, E., Brentel, J. und Lindblom, G. (1990). The phase structure of galactolipids and their role in the formation of the prolamellar body. In: Current research in photosynthesis III. Balcheffsky, M., Ed, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, **14** S. 843-848

Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N. und Pelham, H.R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61** S. 1349-1357

Sengstag, C. und Hinnen, A. (1988). A 28-bp segment of the *Saccharomyces cerevisiae* PHO5 upstream activator sequence confers phosphate control to the CYC1-lacZ gene fusion. *Gene* **67** S. 223-228

Shahollari, B., Peskan-Berghöfer, T. und Oelmüller, R. (2004). Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol. Plant.* **122** S. 397-403

- Shang, Y., Schwinn, K.E., Bennett, M.J., Hunter, D.A., Waugh, T.L., Pathirana, N.N., Brummell, D.A., Jameson, P.E. und Davies, K.M. (2007). Methods for transient assay of gene function in floral tissues. *Plant Meth.* **3**:1
- Shim, J., Newman, A.P. und Ferro-Novick, S. (1991). The BOS1 gene encodes an essential 27-kD putative membrane protein that is required for vesicular transport from the ER to the Golgi complex in yeast. *J.Cell Biol.* **113** S. 55-64
- Shockey, J.M., Fulda, M.S. und Browse, J.A. (2002). Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol.* **129** S. 1710-1722
- Shohat, M., Janossy, G. und Dourmashkin, R.R. (1973). Development of rough endoplasmic reticulum in mouse splenic lymphocytes stimulated by mitogens. *Eur.J.Immunol.* **3** S. 680-687
- Siddiqui, R.A. und Exton, J.H. (1992). Phospholipid base exchange activity in rat liver plasma membranes. *J.Biol.Chem.* **267** S. 5755-5761
- Simidjiev, I., Stoylova, S., Amenitsch, H., Javorfi, T., Mustardy, L., Laggner, P., Holzenburg, A. und Garab, G. (2000). Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* **97** S. 1473-1476
- Singer, I.I., Kawka, D.W., Kazazis, D.M., Alberts, A.W., Chen, J.S., Huff, J.W. und Ness, G.C. (1984). Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase-containing hepatocytes are distributed periportally in normal and mevinolin-treated rat livers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81** S.5556-5560
- Singer, S.J. und Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175** S. 720-731
- Singh, S., Thomaus, S., Lee, M., Stymne, S. und Green, A. (2001). Transgenic expression of a $\Delta 12$ -epoxygenase gene in Arabidopsis seeds inhibits accumulation of linoleic acid. *Planta* **212** S. 872-879
- Sisson, J.E. und Fahrenbach, W.H. (1967). Fine structure of steroidogenic cells of a primate cutaneous organ. *Am.J.Anat.* **121** S. 337-367
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C.(1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150** S. 76-85
- Snapp, E.L., Hegde, R.S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N. und Lippincott-Schwartz, J. (2003). Formation of stacked cisternae by low affinity protein interactions. *J.Cell Biol.* **163** S. 257-269
- Sodeik, B., Doms, R.W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C.E., van't Hof, W., van Meer, G., Moss, B. und Griffiths, B. (1993). Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks.

J.Cell Biol. **121** S. 521-541

Sohrmann, M., Fankhauser, C., Brodbeck, C. und Simanis, V. (1996). The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev.* **10** S. 2707-2719

Sohlenkamp, C., de Rudder, K.E., Rohrs, V., Lopez-Lara, I.M. und Geiger, O. (2000). Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *J.Biol.Chem.* **275** S. 18919-18925

Sperling, P., Warnecke, D. und Heinz, E. (2004). Plant sphingolipids. *In: Lipid metabolism and membrane biogenesis.* Daum, G., Ed, *In: Topics in current genetics.* Hohmann, S., Series Ed, Springer S. 337-381

Spurr, A.R.(1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J.Ultrastruct.Res.* **26** S. 31-43

Sriburi, R., Bommasamy, H., Buldak, G.L., Robbins, G.R., Frank, M., Jackowski, S., und Brewer, J.W. (2007). Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. *J.Biol.Chem.* **282** S. 7024-7034

Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K. und Brewer, J.W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* **167** S. 35-41

Srivastava, L.M. und O'Brien, T.P. (1966). On the ultrastructure of cambium and its vascular derivatives. *Protoplasma* Band LXI, Heft **3-4** S. 277-293

Stachelin, L.A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* **11** S. 1151-1165

Stahl, E. (1969). *Thin Layer Chromatography.* 2nd Edition, Springer Verlag, NY

Storey, M.K., Clay, K.L., Kutateladze, T., Murphy, R.C., Overduin, M. und Voelker, D.R. (2001). Phosphatidylethanolamine has an essential role in *Saccharomyces cerevisiae* that is independent of its ability to form hexagonal phase structures. *J.Biol.Chem.* **276** S. 48539-48548

Stroobants, A.K., Hetteema, E.H., van den Berg, M. und Tabak, H.F. (1999). Enlargement of the endoplasmic reticulum membrane in *Saccharomyces cerevisiae* is not necessarily linked to the unfolded protein response via Ire1p. *FEBS Lett.* **453** S. 210-214

Sundby, C. und Larsson, C. (1985). Transbilayer organization of the thylakoid galactolipids. *Biochim.Biophys. Acta* **813** S. 61-67

Szczesna-Skorupa, E., Chen, C.-D., Liu, H. und Kemper, B. (2004). Gene expression changes associated with the endoplasmic reticulum stress response induced by microsomal cytochrome P450 overproduction. *J.Biol.Chem.* **279** S. 13953-13961

- Takei, K., Mignery, G.A., Mugnaini, F., Südhof, T.C. und DeCamilli, P. (1994). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* **12** S. 327-342
- Takeda, Y. und Kasamo, K. (2001). Transmembrane topography of plasma membrane constituents in mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyl cells. I. Transmembrane distribution of phospholipids. *Biochim.Biophys.Acta* **1513** S. 38-48.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. und Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J.Cell Biol.* **119** S. 301-311
- Takewaka, T., Zimmer, T., Hirata, A., Ohta, A., Takagi, M. (1999). Null mutation in IRE1 gene inhibits overproduction of microsomal cytochrome P450Alk1 (CYP 52A3) and proliferation of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biochem.* **125** S. 507-514
- Tan, X., Waterham, H.R., Veenhuis, M. und Cregg, J.M. (1995). The *Hansenula polymorpha* PER8 gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved in proliferation. *J.Cell Biol.* **128** S. 307-319
- Tanaka, S., Kinoshita, J.Y., Kuroda, R. und Ito, A. (2003). Integration of cytochrome b5 into endoplasmic reticulum membrane: participation of carboxy-terminal portion of the transmembrane domain. *J.Biochem.* **133** S. 247-251
- Tanaka, T., Ohnishi, J.-I. und Yamada, M. (1980). The occurrence of phosphatidyl choline exchange protein in leaves. *Biochem Biophys Res Commun.* **96** S. 394-399
- Taraschi, T.F., O'Donnell, M., Martinez, S., Schneider, T., Trelka, D., Fowler, V.M., Tilley, L. und Moriyama, Y. (2003). Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* **102** S. 3420-3426
- Tavernier, E. und Pugin, A. (1995). Transbilayer distribution of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cells. *Biochimie* **77** S. 174-181
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E. und Watanabe, M. (1994). Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon.* **32** S. 833-843
- Thijssen, M.H., Mittempergher, F., Van Aelst, A.C., und Van Went, J.L. (1997). Improved ultrastructural preservation of *Petunia* and *Brassica* ovules and embryo sacs by high pressure freezing and freeze substitution. *Protoplasma* **197** S. 199-209
- Thomas, J.L., Holowka, D., Baird, B. und Webb, W.W. (1994). Large-scale co-aggregation of fluorescent lipid probes with cell surface proteins. *J.Cell Biol.* **125** S. 795-802
- Tietje, C. und Heinz, E. (1998). Uridine-diphospho-sulfoquinovose: diacylglycerol sulfoquinovosyltransferase activity is concentrated in the inner membrane of chloroplast envelope. *Planta* **206** S. 72-78

- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S. und Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101** S. 249-258
- Trotter, P.J., Voelker, D.R. (1995). Identification of a non-mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase activity (PSD2) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **270** S. 6062-6070.
- Trumbly, R. und Bradley, G. (1983). Isolation and characterization of aminopeptidase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **156** S. 36-48
- Turner, G.W., Gershenzon, J. und Croteau, R.B. (2000). Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* **124** S. 665–679.
- Turner, K.A., Sit, T.L., Callaway, A.S., Allen, N.S. und Lommel, S.A. (2004). Red clover necrotic mosaic virus replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. *Virology* **320** S. 276-290
- Ude, J. und Koch, M. (1994). 16.1: Der Bau der Retina und die Rolle der Sehfärbstoffe. In: Die Zelle. Atlas der Ultrastruktur. Gustav Fischer Verlag: Jena, Stuttgart S. 219-221
- Unilever (1997). Lecithin und Gentechnik. Unilever-Report, 5/1997
- Unitt, M.D. und Harwood, J.L. (1985). Sidedness studies of thylakoid phosphatidylglycerol in higher plants. *Biochem.J.* **228** S. 707-711
- Ushiyama, R. und Matthews, R.E. (1970). The significance of chloroplast abnormalities associated with infection by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **42** S. 293-303
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S. und Saeland, S. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12** S. 71-81
- Van Bokhoven, H., van Lent, J.W., Custers, R., Vlak, J.M., Wellink, J. und van Kammen, A. (1992). Synthesis of the complete 200K polyprotein encoded by cowpea mosaic virus B-RNA in insect cells. *J.Gen.Virol.* **73** S. 2775-2784
- Van de Meene, A.M.L., Hohmann-Marriott, M.F., Vermaas W.F.J. und Roberson, R.W. (2005). The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch.Microbiol.* **184** S. 259-270
- Van den Brink-van der Laan, E., Killian, J.A. und de Kruijff, B. (2004). Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim.Biophys.Acta* **1666** S. 275-288
- Van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, K., Mol, J.N.M. und Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to suppression of gene expression. *Plant Cell* **2** S. 291–299

- Van der Meer, Y., Snijder, E.J., Dobbe, J.C., Schleich, S., Denison, M.R., Spaan, W.J. und Locker, J.K. (1999). Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication. *J.Virol.* **73** S. 7641-7657
- Van Dooren, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler, L.M., Cowman, A.F. und McFadden, G.I. (2005). Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **57** S. 405-419
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schilperoort, R.A. und Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252** S. 169-170
- Van Rhijn, P. und Vanderleyden J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol.Rev.* **59** S.124-142
- Vartapetian, B.B., Maslov, A.I. und Andreeva, I.N. (1975). Biochemical and cytological studies of mitochondrial development in chloramphenicol-induced rice coleoptiles. *Biochim.Biophys.Acta* **411** S.357-368.
- Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.H. und Harder, W. (1987). Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3** S. 77-84
- Veenhuis, M. und Harder, W. (1991). Microbodies in the yeasts. Aus: *Peroxisome biogenesis*. Waterman und Cregg. Rose, A.H. und. Harrison, J.S., eds. Academic Press, London, **4** (2nd edn.) S. 601-653
- Verma, D.P.S. und Hong, Z. (1996). Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends Microbiol.* **4** S. 364-368
- Vergères, G., Yen, T.S., Aggeler, J., Lausier, J. und Waskell, L. (1993). A model system for studying membrane biogenesis. Overexpression of cytochrome b5 in yeast results in marked proliferation of the intracellular membrane. *J.Cell Sci.* **106** S. 249-259
- Vergères, G. und Waskell, L. (1992). Expression of cytochrome b5 in yeast and characterization of mutants of the membrane-anchoring domain. *J.Biol.Chem.* **267** S. 12583-12591
- Vergères, G. und Waskell, L. (1995). Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* **77** S. 604-620
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M.M. und Hoekema, A. (1989). A small scale procedure for rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids Res.* **17** S. 2362
- Vincent, P., Maneta-Peyret, L., Sturbois-Balcerzak, B., Duvert, M., Cassagne, C. und Moreau, P. (1999). One of the origins of plasma membrane phosphatidylserine in plant cells is a local synthesis by a serine exchange activity. *FEBS Lett.* **464** S. 80-84
- Vitale, A. und Hinz, G. (2005). Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends Plant Sci.* **10** S. 316-323

- Vogel, F., Gengenagel, C., Kärger, E., Müller, H.-G. und Schunk, W.-H. (1992). Immunocytochemical localization of alkane-inducible cytochrome P-450 and its NADPH-dependent reductase in the yeast *Candida maltosa*. *Eur.J.Cell Biol.* **57** S. 285-291
- Völker, H., Schweisfurth, R. und Hirsch, P. (1977). Morphology and ultrastructure of *Crenothrix polyspora* Cohn. *J.Bacteriol.* **131** S. 306-313.
- Volkov, R. A., Panchuk, I. I. und Schöffl, F. (2003). Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *J.Exp.Bot.* **54** S. 2343-2349
- Voss, H. (2001). Versuche zur gentechnologischen Modifikation von Triacylglycerolen durch Expression heterologer Lipoxygenasen in transgenem Lein. *Dissertation*. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Wagenknecht, A.C. (1957). Occurrence of plasmalogens in lipides of green peas. *Science* **126** S. 1288
- Walkerpeach, C.R. und Velten, J. (1994). *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *Plant Mol.Biol.Manual* **B1** 1-19
- Wall, L.G. (2000). The actinorhizal symbiosis. *J.Plant Growth Regul.* **19** S. 167-182
- Walsh, J.P. und Bell, R.M. (1986). *Sn*-1,2-diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*. Mixed micellar analysis of the phospholipid cofactor requirement and divalent cation dependence. *J.Biol.Chem.* **261** S. 6239-6247
- Wandelt, C.I., Khan, M.R., Craig, S., Schroeder, H.E., Spencer, D. und Higgins, T.J. (1992). Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J.* **2** S.181-192
- Wang, X. (2004). Lipid signaling. *Curr.Opin.Plant Biol.* **7** S. 329-336
- Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol.* **13** S. 9566-9573
- Wang, X. und Moore, T.S. Jr. (1991). Phosphatidylethanolamine synthesis by castor bean endosperm. *J.Biol.Chem.* **266** S. 19981-19987
- Wang, Y., Liang, Z.H., Zhang, Y.S., Yao, S.Y., Xu, Y.G., Tang, Y.H., Zhu, S.Q., Cui, D.F. und Feng, Y.M. (2001). Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol.Bioeng.* **73** S. 74-79
- Wang, G., Lin, H.-N., Li, S. und Huang, C.-H. (1995). Phosphatidylcholines with *sn*-1 saturated and *sn*-2 cis-monounsaturated acyl chains. Their melting behaviour and structures. *J.Biol.Chem.* **270** S. 22738-22746

- Wanker, E.E., Sun, Y., Savitz, A.J. und Meyer, D.I. (1995). Functional characterization of the 180-kd ribosome receptor in vivo. *J.Cell Biol.* **130** S. 29-39
- Watson, S.W. (1971). Taxonomic considerations of the family Nitrobacteriaceae. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **21** S. 254-270.
- Weber, G., Convery, H.J.H., Lea, M.A. und Stamm, N.B. (1966). Feedback inhibition of key glycolytic enzymes in liver: action of free fatty acids. *Science* **154** S. 1357
- Weber, S., Granzow, H., Weiland, F. und Marquardt, O. (1996). Intracellular membrane proliferation in *E. coli* induced by foot-and-mouth disease virus 3 A gene products. *Virus Genes* **12** S. 5-14
- Weiner, J.H., Lemire, B.D., Elmers, M.L., R.D. Bradley und Scraba, D.G. (1984). Overproduction of fumarate reductase in *Escherichia coli* induces a novel intracellular lipid-protein organelle. *J.Bacteriol.* **158** S. 590-596
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H.E., Rajashekar, C.B., Williams, T.D. und Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *J.Biol.Chem.* **277** S. 31994-32002
- Werner, E.D., Brodsky, J.L. und McCracken, A.A. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93** S.13797-13801
- Whitehead, L.F. und Day, D.A. (1997). The peribacteroid membrane. *Physiol.Plant.* **100** S. 30-44
- Wiest, D.L., Burkhardt, J.K., Hester, S., Hortsch, M., Meyer, D.I. und Argon, Y. (1990). Membrane biogenesis during B Cell differentiation: Most endoplasmic reticulum proteins are expressed coordinately. *J.Cell Biol.* **110** S. 1501-1511
- Willemsen, V., Friml, J., Grebe, M., van den Toorn, A., Palme, K. und Scheres, B. (2003). Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell* **15** S. 612-625
- Wissing, J.B., Gravowski, L., Drewitz, E., Hanenberg, A., Wylegalla, C. Wagner, K.G. (1992). Plasma membrane preparations from suspension cultured plant cells contain the enzymes for the recycling of phosphatidic acid and diacylglycerol. *Plant Sci.* **87** S. 29-37
- Whatley, J.M., Mclean, B. und Juniper, B.E. (1991). Continuity of chloroplast and endoplasmic-reticulum membranes in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* **117** S.209-217
- Wolf, K.W. und Motzko, D. (1995). Paracrystalline endoplasmic reticulum is typical of gametogenesis in Hemiptera species. *J.Struct.Biol.* **114** S. 105-114
- Wood, P., Moya, F., Eldridge, C., Owens, G., Ranscht, B., Schachner, M., Bunge, M. und Bunge, R. (1990). Studies of the initiation of myelination by *Schwann cells*. *Ann.NY.Acad.Sci.* **605** S. 1-14.

- Wooding, F.B.P. (1967). Endoplasmic reticulum aggregates of ordered structure. *Planta* **76** S. 205-208
- Wright, R., Basson, M., D'Ari, L. und Rine, J. (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J.Cell Biol.* **107** S. 101-114
- Wright, R. und Rine, J. (1989). Transmission electron microscopy and immunocytochemical studies of yeast: analysis of HMG-CoA reductase overproduction by electron microscopy. *Methods Cell Biol.* **31** S. 473-512
- Wu, S.S.H., Platt, K.A., Ratnayake, C., Wang, T.W., Ting, J.T.L. und Huang, A.H.C. (1997). Isolation and characterization of novel neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from *Brassica napus* tapetum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* **94** S. 12711-12716
- Yabal, M., Brambillasca, S., Soffientini, P., Pedrazzini, E., Borgese, N. und Makarow, M. (2003). Translocation of the C-terminus of a tail-anchored protein across the endoplasmic reticulum membrane in yeast mutants defective in signal peptide-driven translocation. *J.Biol.Chem.* **278** S. 3489-3496
- Yamamoto, A., Masaki, R. und Tashiro, Y. (1996). Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection. *J.Cell Sci.* **109** S. 1727-1738
- Yamazaki, H., Shimada, T. (2006). Cytochrome P450 reconstitution systems. *Methods Mol.Biol.* **320** S. 61-71
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** S 103-119
- Ye, G-N., Stone, D., Pang, S-Z., Creely, W., Gonzalez, K. und Hinchee, M. (1999). *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium* in planta vacuum infiltration transformation. *Plant J.* **19** S 249-257
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K. und Mori, K. (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev.Cell* **4** S. 265-271
- Young, D.L., Powell, G. und McMillan, W.O. (1971). Phenobarbital-induced alterations in phosphatidylcholine and triglyceride synthesis in hepatic endoplasmic reticulum. *J.Lipid Res.* **12** S. 1-8
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem.J.* **294** S.1-14.
- Zakharov, A., Giersberg, M., Hosein, F., Melzer, M., Muntz, K. und Saalbach, I. (2004). Seed-specific promoters direct gene expression in non-seed tissue. *J.Exp.Bot.* **55** S. 1463-1471

- Zank, T.K., Zähringer, U., Lerchl, J. Heinz, E. (2000). Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for delta (6)-polyunsaturated fatty acids. *Biochem.Soc.Trans.* **28** S. 654-658
- Zhang, W., Yu, L., Zhang, Y. und Wang, X. (2005). Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochim.Biophys.Acta.* **1736** S. 1-9
- Zhang, K. und Kaufman, R.J. (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* **279** S. 25935-25938
- Zhao, J., Onduka, T., Kinoshita, J.Y., Honsho, M., Kinoshita, T., Shimazaki, K. und Ito, A. (2003). Dual subcellular distribution of cytochrome b5 in plant, cauliflower, cells. *J.Biochem.* **133** S.115-121
- Zheng, Z. und Zou, J. (2001). The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem* **276** S. 41710-41716
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D.M., Fasch, E.-V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. und Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and Lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **173** S. 2026-2034
- Zwaal, R.F., Comfurius, P. und Bevers, E.M. (2005). Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell.Mol.Life Sci.* **62** S. 971-88.

Anhang A

Tabelle 1: Membranproliferation – Eine Übersicht

Beispiele „nativ“-stattfindender Proliferation bei dominantem Stoffwechsel eines spezialisierten Zelltyps sind ohne Hervorhebung in der Tabelle.

Beispiele experimentell erzeugter Proliferation sind hellgrau unterlegt (Virusinfektion wird als „nativ“ eingestuft, anthropogen erzeugte Expression von Teilen viraler Genome hingegen als experimentell-induziert betrachtet und hervorgehoben).

Wo das Auftreten von Membranproliferation innerhalb einer taxonomischen Gruppe dem Regelfall gleichkommt, werden nur wenige Vertreter aufgeführt – diese sind dann *pars pro toto* aufzufassen.

Bakterien

Gattung und Art (oder Endosymbiont)	Mechanismus/Induktor der Proliferation	Membrantyp/ Kompartiment	Literatur
<i>Ectothiorhodospira mobilis</i> u.a. Schwefelpurpurbakterien	Licht (Photosynthesestart)	Membranstapel	Remsen et al., 1968
<i>Rhodospirillum spp.</i> u.a. Nichtschwefel- purpurbakterien	Licht (Photosynthesestart)	Membranstapel	Oelze und Drews, 1972
<i>Methylococcus minimus</i> , <i>Methylobacter vinelandii</i> , <i>Methylomonas rubrum</i> u.a. Methanoxydierer	?	Plasmamembranlamellen und cytoplasmatische Membranstapel	Davies und Whittenbury, 1970
<i>Synechocystis sp.</i> , <i>Oscillatoria rubescens</i> , <i>Agmenellum quadruplicatum</i> u.a. Cyanobakterien	Licht (Photosynthesestart)	Thylakoide	Lang, 1968; Nierzwicki-Bauer et al., 1983; Van de Meene et al., 2005
<i>Crenothrix polyspora</i>	?	Membranstapel	Völker et al., 1977
Bifidobakterien	Zellteilungsaktivität	Intrazelluläre Membranen	Novik et al., 1994
<i>Nitrosomonas eutropha</i> ,	Absenkung der Ammonium- konzentration	Intracytoplasmatische Membranen	Pinck, 2001
<i>Nitrosocystis oceanus</i> ,	?		Murray und Watson, 1965
<i>Nitrobacter agilis</i> u.a. Nitrifizierer	?		Watson, 1971

<i>Bacillus sphaericus</i>	Sporulation	Plasmamembran der Mutterzelle	Holt et al., 1975
Etioplasten in Mesophyllzellen der Pflanzen	Unbekannt	Prolamellarkörper	Berry und Smith, 1971
Chloroplasten in Mesophyllzellen der Pflanzen	Licht	Thylakoide (Grana + Stroma)	Gunning und Steer, 1977d
Mitochondrien	Erhöhter ATP-Bedarf	Cristae	Gunning und Steer, 1977e; Vartapetian et al., 1975
<i>Escherichia coli</i>	Expression der B-Untereinheit der F ₁ F ₀ -ATPase	Intrazelluläre Membranen	Arechaga et al., 2000
<i>Escherichia coli</i>	Expression eines viralen Genprodukts	Intrazelluläre Membranen	Weber et al., 1996

Hefen

Gattung und Art	Mechanismus/Induktor der Proliferation	Membrantyp/Kompartiment	Literatur
Methanotrophe Hefen	Alkohol-Oxidase-Expression mit Methanol als C-Quelle	Peroxisomen	Veenhuis und Harder, 1991
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Induktion der β -Oxidation durch Ölsäure als C-Quelle	Peroxisomen	Veenhuis et al., 1987
<i>Candida maltosa</i>	Monooxygenase-Induktion mit Alkanen als C-Quelle	Peroxisomen-assoziiertes, tubuläres ER	Vogel et al., 1992
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Überexpression des zelleigenen Mid1-Proteins	kernnahes ER („Karmellae“)	Paoletti und Chang, 2000
<i>Hansenula polymorpha</i>	Überexpression des zelleigenen Per8-Proteins	Peroxisomen	Tan et al., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Expression des Poliovirus Proteins 2BC	Vesikel („cytopathic vacuoles“)	Barco und Carrasco, 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression des 180-kd Rezeptors aus MDCK	Rauhes ER	Wanker et al., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression des Cytochrom b ₅ aus <i>R. norvegicus</i>	kernnahes ER („Karmellae“)	Vergères et al., 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression einer Plasmamembran-ATPase aus Pflanzen	kernnahes ER („Karmellae“)	De Kerchove D'Exaerde et al., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpr. <u>und</u> Verhinderung der Expression von Sed 5	ER-Vesikel	Hardwick und Pelham, 1992

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression der zelleigenen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase	kernnahes ER („Karmellae“)	Wright et al., 1988
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression des zelleigenen Sec12-Proteins	„BiP-Bodies“	Nishikawa et al., 1994
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression beider Isoformen des Cytochrom P ₄₅₀ aus <i>Candida maltosa</i>	Sowohl kernnahes ER („Karmellae“) als auch cortikales ER	Schunck et al., 1991
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression des zelleigenen Pbn1-Proteins	ER	Naik und Jones, 1998
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sekretion einer veränderten Kutinase aus <i>Fusarium solani</i>	ER	Sagt et al., 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Attenuation des zelleigenen Erd2-Rezeptors	(Golgi-?) Vesikel und (Golgi-?) Membranen	Semenza et al., 1990
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Attenuation des zelleigenen Bos1-Proteins	ER-Vesikel	Shim et al., 1991
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überexpression des zelleigenen Pex15 Proteins	Karmellae	Elgersma et al., 1997

Tierische Organismen

Zelltyp und Organismus	Mechanismus/Induktor der Proliferation	Membrantyp/ Kompartiment	Literatur
Langerhans-Zellen in <i>Homo sapiens</i>	Synthese von Endocytose-Rezeptor	Zellmembran-Sandwich-Strukturen („Birbeck granule“)	Valladeau et al., 2000
Purkinje-Zellen (Kleinhirn von <i>Homo sapiens</i>) und COS-Zellen	Erhöhte Konzentration des Inositol 1,4,5-Trisphosphatrezeptors	Zisternales glattes ER in Stapeln	Takei et al., 1994
Schwannsche Zellen der Wirbeltiere	?	Plasmamembranum-wachstum (Myelinscheiden)	Morell und Norton, 1980; Wood et al., 1990
Adrenocorticale Zellen der Zona glomerulosa, -fasciculata und -reticularis in <i>Rodentia</i>	Steroidproduktion/-sekretion	Zisternales ER	Black et al., 1979

<i>Plasmodium falciparum</i>	Zellvergrößerung und Entwicklung der Merozoiten	ER, Apicoplast und Mitochondrium	Van Dooren et al., 2005
Erythrozyten von <i>Homo sapiens</i>	Extrazellulärer Transport plasmodialer Proteine durchs Wirtszell-Cytoplasma	(Golgi-?)Vesikel	Taraschi et al., 2003
Acinarzellen des Pankreas von <i>Rattus spec.</i>	Proteinsekretion	Rauhes ER	Adler et al., 1984
B-Lymphozyten aus <i>Mus spec.</i>	Immunglobulin-Sekretion	Zisternales rauhes ER	Shohat et al., 1973 Wiest et al., 1990
Zellen des Antebrachialorgans von <i>Lemur catta</i>	Steroidproduktion	Kristalloides ER	Sisson und Fahrenbach, 1967
Oozyten und Spermatogonien der Hemiptera	Unbekannt	Kristalloides glattes ER	Wolf und Motzko, 1995
Vero-Zellen aus <i>Mammalia</i>	Flavivirus-Infektion	Inter- und Trans-Golgi Zisternen	Mackenzie et al., 1999
HeLa-Zellen	Poliovirus-Infektion	Vesikel („cytopathic vacuoles“)	Schlegel et al., 1996
Hepatozyt in <i>Rodentia</i>	Cytochrom P ₄₅₀ -Induktion durch Phenobarbital	Tubuläres glattes ER	Jones und Fawcett, 1966; Orrenius et al., 1965
Hepatozyt in <i>Rodentia</i>	Cytochrom P ₄₅₀ -Induktion durch Ciprofibrat	Glattes ER Peroxisomen	Makowska et al., 1991
Hepatozyt in <i>Rodentia</i> und <i>Aves</i>	Cytochrom P ₄₅₀ -Induktion durch polychlorierte Biphenyle	Glattes ER	Borlakoglu et al., 1990
Leber-, Nieren-, Thymus- und Herz-zellen von <i>Mus spec.</i>	Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cyldrospermopsin	ER	Terao et al., 1994
Plasmazellen einer Hybridomalinie aus <i>Mus spec.</i>	Akkumulation von fehlgefaltetem Immunglobulin	Vesikel des rauhen ER („Russel bodies“)	Schweitzer et al., 1991
UT-1 Zellen	Überexpression der zelleigenen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase durch Hemmung mit Mevinolin	Glattes ER und parakristallines/kristalloides ER	Chin et al., 1982 Singer et al., 1984
COS1-Zellen	Überexpression der mikrosom. Aldehyd-Dehydrog, aus <i>R. norvegicus</i>	ER	Yamamoto et al., 1996

<i>Xenopus</i> A6-Zellen	Überexpression von Lamin-Proteinen mit CxxM-Motiv	Intranukleäre Membranen	Prüfert et al., 2004; Ralle et al., 2004
Lumineszenz-Photozyten mariner Annelida	Lumineszenzfunktion	Parakristallines/ Kristalloides ER	Bassot, 1966
Nierenzellen aus <i>Rodentia</i>	Expression der Arterivirus Replikase	Doppelmembran ER-Vesikel	Pedersen et al., 1999
Zell-Linie aus <i>Mus spec.</i>	Expression der Hepatitis Virus Replikations- proteine	Endosomen	van der Meer et al., 1999

Pflanzliche Organismen

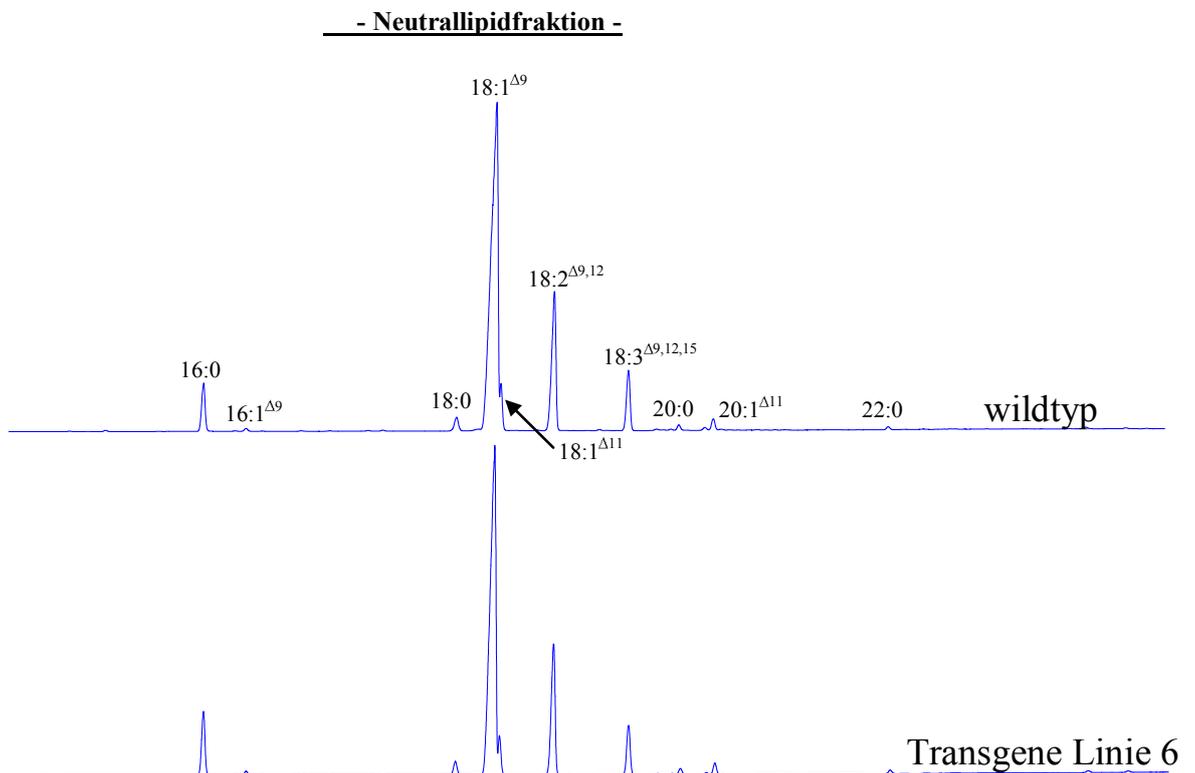
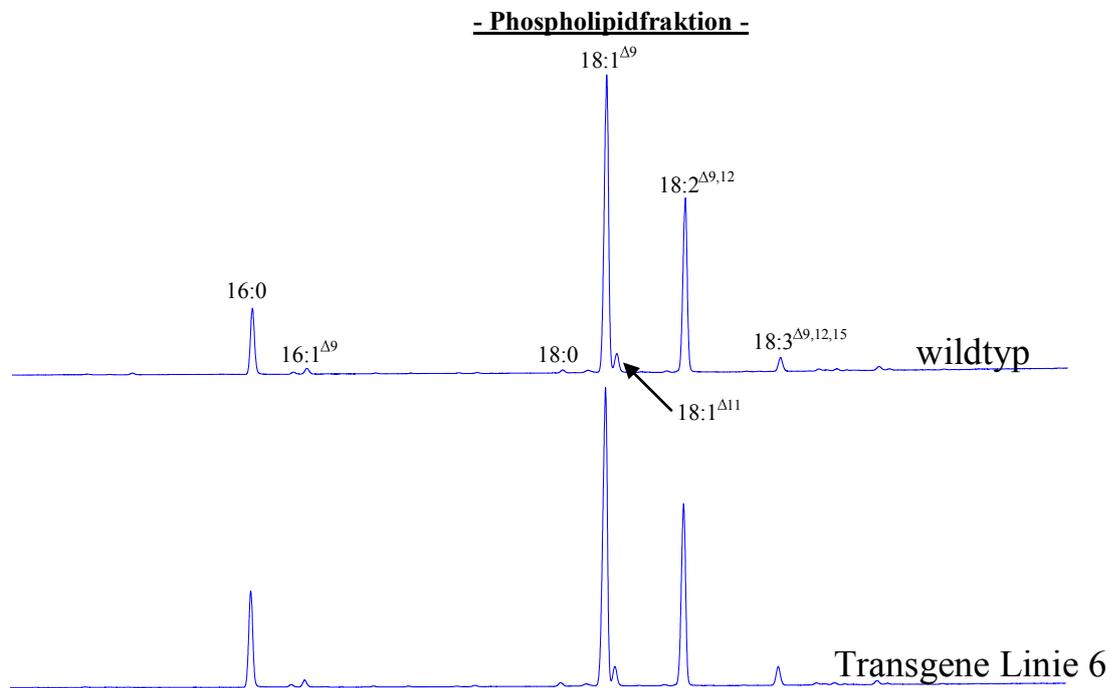
Zelltyp und Organismus	Mechanismus/Induktor der Proliferation	Membrantyp/ Kompartiment	Literatur
Mesophyllzellen von <i>Pisum sativum</i>	„Pea enation mosaic virus“-Infektion	Kernhülle	De Zoeten et al., 1972
Protoplasten von <i>Brassica spec.</i>	„Turnip yellow mosaic virus“-Infektion	Chloroplasten	Ushiyama und Matthews, 1970
Megasporen-Mutterzelle (MMZ) und Antipodenzellen (AZ) in <i>Zea mays</i>	Differenzierung während der Megasporengese	Rauh ER (MMZ) Golgi-Vesikel (AZ)	Russell, 1979 Diboll und Larson, 1966
Synergiden im Embryosack des Megagametophyten von <i>Gossypium hirsutum</i>	Polarität Mikropyle - Chalaza	ER („smooth tubular ER“ und „dense ER“) Sphärosomen	Jensen, 1965
Siebelelemente in <i>Pinus</i> , <i>Datura</i> , <i>Dioscorea</i> , <i>Pisum</i> , <i>Fraxinus</i> , <i>Phaseolus</i> , <i>Metasequoia</i> und <i>Acer</i>	Differenzierung	Kristalloides ER („sieve element reticulum“, SER)	Srivastava und O'Brien, 1966; Esau und Gill, 1971; Behnke, 1965; Wooding, 1967
Trichomzellen von <i>Fagonia glutinosa</i> und <i>Veronica beccabunga</i>	Sekretion lipophiler Substanzen und Protein-Schleimsekretion	Multilamellares, periplastidäres ER; Golgi	Fahn, 2000; Lockhausen und Kristen, 1986
Transferzellen d. Xylemparenchyms	Absorption/Sezernierung von Xylemflüssigkeit	Plasmamembran-einstülpungen	Gunning und Steer, 1977
Tapetumzellen aus Antheren von <i>Avena spec.</i>	Sekretion von Proteinen u. Strukturkomponenten für Sporenexine	Rauh ER	Gunning und Steer, 1977b
Drüsenzellen der Floralnektarien von <i>Lonicera japonica</i> ;	Granulokrine Nektarsekretion	Zisternen des rauhen ER	Fahn, 2000

Mehldrüsenzellen von <i>Auricula</i> ; Drüsenzellen einiger <i>Ranunculaceae</i>	Flavonoid-Sekretion Unbekannt	Glattes ER-Netz Parakristalloides ER	Gunning und Steer, 1977c; Eymé, 1966
Nectar- u. Öldrüsenzellen von <i>Asclepias</i> <i>Citrus</i> , <i>Arctium</i> , <i>Ruta</i> , <i>Poncirus</i> , <i>Rhus</i> , <i>Heracleum</i> , <i>Dorema</i> , <i>Ficus</i> , <i>Ledum</i> , <i>Salvia</i>	Nectar- u. Ölsynthese (Granulokrine oder Ekkrine Sekretion)	Glattes ER, Plasmamembran- invaginationen und/oder Vesikel	Heinrich, 1969; Schnepf, 1969a,b,c,d und 1972; Fahn und Evert, 1974
Milchröhrenzellen von <i>Hevea brasiliensis</i>	Kautschuksynthese	Kautschukpartikel und Lutoide	D'Auzac et al., 1989
Suspensor- und Basalzelle von <i>Capsella</i> - Zygote	Versorgung des Embryos	Glattes u. rauhes ER	Schulz und Jensen, 1969
Mesophyllzellen in seneszenten Hochblättern von <i>Davidia involucrata</i>	Unbekannt	Parakristallines ER („Panzerhemd“-Typ)	Bergfeld und Falk, 1968
Hyphen von <i>Cuscuta</i> <i>odorata</i>	Schnelles Wachstum Enzymsekretion	ER und vakuoläre Kompartimente	Dörr, 1969
Wurzelrinden- Parenchymzellen vieler Pflanzen	Endosymbiotische Besiedelung der Wurzelrindenzellen durch Rhizobiaceae und Actinomyceten	Erzeugung neuer Kompartimente („Symbiosomen“)	Roth und Stacey, 1989; Wall, 2000
Protoplasten von <i>Nicotiana spec.</i>	(Über)-Expression eines doppelheterologen Fusionskonstruktes	Artifizielle Membranrollen („Z-Membranes“)	Gong et al., 1996
Mesophyllzellen von <i>Nicotiana benthamiana</i>	Expression des Tombusvirus- Genoms	Peroxisomen und Mitochondrien	Burgyan et al., 1996

Anhang B

Gaschromatographische Fettsäureanalysen

Brassica napus, Sorte Hanna :
Samen mit Cytochrom b_5 in Antisense-Orientierung versus Wildtypsamen

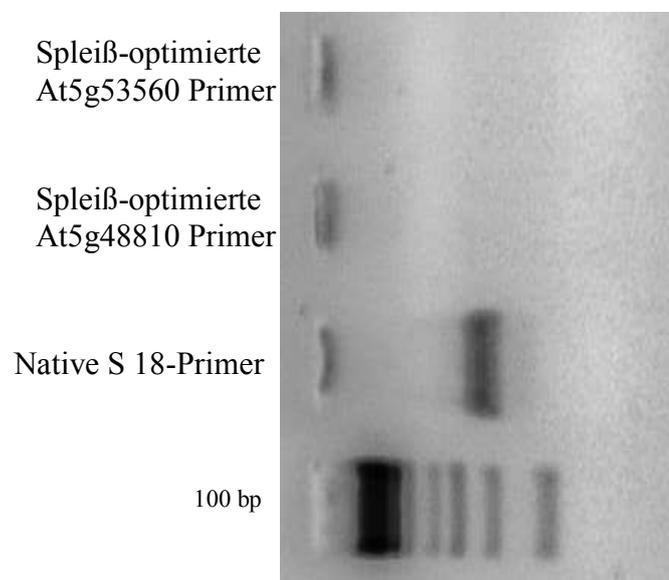
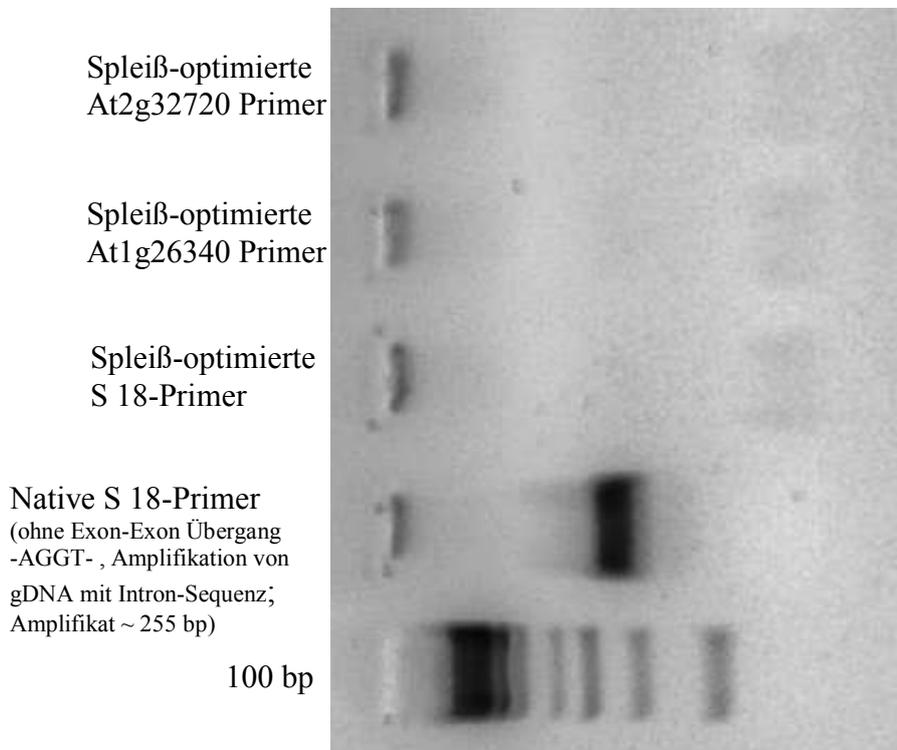


Anhang C

Überprüfung der Spleißstellenoptimierung des Primeraufbaus

- PCR auf genomische DNA von Arabidopsis-Samen (DAF 13) -

PCR-Parameter: 38 Zyklen – 95°C, 45 s Initiale Denaturierung - 95°C, 45 s Denaturierung - 59°C, 30 s Anlagerung – 72°C, 30 s Synthese (gen. DNA nach RNase-Behandlung eingesetzt).



Anhang D

– Sequenzen –

Gegensinn-Konstrukte

Äußere Primerpaare für klassischen Antisense (Fettdruck)

Innere Primerpaare für IR-Hairpin Antisense und um Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden (unterstrichen und Fettdruck; 3' Primer komplementär). Rote Pfeilköpfe markieren Spleißstellen.

Cytochrom b5 (*Brassica oleracea*)

Acc.-Nr.: M87514 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Kodierende Sequenz:

ATGGCTTCAGAGAAG AAGGTTCTAGGTTTCGAAGAAGTTTCGCAGCACAACAAAACCAAGGATTG
TTGGCTTATTATCTCCGGCAAGGTCTATGATGTGACCCCTTTCATGGATGATCATCCCGGTGGCGAT
GAAGTGTTATTGTCCTCAACAGGGAAAGATGCTACGAATGACTTTGAAGACGTTGGTCACAGCGAC
ACCGCGAGGGACATGATGGAGAAGTACTACATTGGCGAGATCGATTTCGTCTACTGTTCCAGCGACA
AGGAC ATACGTTGCACCAAGTGCAACCCGCGTACAACCAAGACAAGACACCAGAATTCATGATCAA
GATCCTTCAGTTCTTGTTCGAATCTTGATCTTGGGTCTTGCTCTCGTCCGTCAGTATACTAAGA
AAGAGTAG

Cytochrome b₅ (*Arabidopsis thaliana*)

1.) Chromosomenlocus: At1g26340 (www.tigr.org)

Kodierende Sequenz:

ATGCCGACACTCACAAAGCTTTATTCCATGGAAGAAGCCGCAACTCACACAAGCAAGAT
GACTGCTGGGTCGT**CATCGACGGCAAGGTCTATGA**TGTATCCTCTTATATGGATGAGCAT
CCTGGAGGAGATGATGTGCTTCTTGCTGTCGCAGGCAAAGATGCAACGGATGATTTTGAA
GACGCAGGGCACAGCAAAGATGCTAGGGAAGTATTTTATTGGCGAGCTA
GATGAATCTTCTTACCGGAAATACCTGAGCTTAAGATCTACAAGAAGGACCAGCCACAA
GACTCTGTTCAGAAGCTTTTTGACTTGACAAAGCAGTATTGGGTTGTTCTGTCTCCATT
ATCACCATCTCTGTAGCGGTTAGTGTCTTGTCTCTCGCAAGACTTAA

3.) Chromosomenlocus: At2g32720 (www.tigr.org)

Kodierende Sequenz:

ATGGGAGACGAAGCAAAGATCTTCACTCTTTCAGAAAGTTTCAGAGCATAATCAAGCTCAT
GACTGTTGGATTGTC**ATCAATGGAAAGGTGTACAATGTG**ACCAAGTTTCTTGAAGACCAT
CCAGGTGGGGACGATGTTCTTGTCTTCAACAGGTAAGGATGCAACGGATGATTTTGAG
GACGTGGGTCACAGCGAGAGTGCAAGAGAAATGATGGAGCAGTACTACGTAGGAGAGATT
GATCCAACAACAATACCAAAGAAAGTCAAATACACACCTCCTAAACAGCCTCACTACAAT
CAAGACAAGACCTCTGAATTCATAATCAAGCTCCTCCAGTTCCTCGTACCCCTTGCCATT
CTTGGTTTAGCAGTCGGAATCCGTATCTACACCAAATCAGGGTAG

3'UTR = 202 Nukleotide

F-Primer = GCTTCTTTTTTTCTGAGCAT

R-Primer = AAGGCAAAAACACCAACAAGAC

4.) Chromosomenlocus: At2g46650 (www.tigr.org)

Kodierende Sequenz:

ATGGCGAATCTAATTTTCGTTTCACGATGTGGCTAAACATAAGTGCAAGAACGATTGTTGG
ATTCTC**ATCCATGGAAAGGTCTATGAC**ATCAGCACTTTCATGGACGAACATCCCGGAGGT
GACAATGTTCTCTCGCCGTCACCGGGAAAGACGCGTCGATCGATTTCGAAGATGTGAAC
CATAGCAAAGATGCCAAGGAGCTAATGAAGAAATACTGTATCGGTGACGTTGACCAGTCA
ACGGTTCCGGTGACGCAACAGTATATTCCGCGTGGGAGAAGGAATCTACGGCGGGCGGAA
CAACTAAAGAAGAATCTGGAAAGAAGCTGCTTATCTACTTAATTCCTCTCTTGATACTC
GGCGTTGCTTTCGCTCTCAGATTCTACAACAACAAGTAG

5.) Chromosomenlocus: At5g48810 (www.tigr.org)

Kodierende Sequenz:

**ATGGGCGGAGACGGAAAAGTTTTACCTTGTCCGAGGTTTCTCAGCACAGTAGCGCCAAG
GATTGTTGGATCGTCATCGACGGCAAGGTTTATGATTGTGACAAAGTTCTTGGATGATCAT
CCTGGTGGTGTAGAGGTTATCTTGACTTCTACAGGGAAAGATGCGACCGATGATTTCCGAG
GATGTGGGACATAGTTCGACTGCGAAAGCCATGCTAGATGAGTACTATGTGGGTGATATT
GACACAGCTACTGTCCGGTTAAAGCTAAGTTTGTGCCTCCTACGTCGACGAAAGCCGTG
GCTACTCAGGATAAGAGCTCGGATTTTTGTTATTAAGCTCCTTCAGTTCCTTGTTCCTACTT
CTAATCTTAGGCTTGGCTTTTCGGCATTTCGGTACTACACTAAGACCAAGGCTCCTTCTTCT
TGA**

6.) Chromosomenlocus: At5g53560 (www.tigr.org)

ATGTCTTCAGATCGGAAGGTTCTAAGTTTTGAAGAAGTTTCAAAGCACAAACAAAATAAG
GATTGTTGGCTTATTATTTCCGGCAAGGTTGATGATGTGACTCCATTCATGGATGATCAT
CCTGGAGGCGATGAAGTCTTGTGCTCAACAGGGAAAGATGCTACAAATGATTTTGAA
GACGTTGGTCACAGCGACACTGCAAGGGACATGATGGACAAATATTTTATTGGTGTGAGATT
GATTCGTCTAGTGTCCAGCAACTAGGACATACGTTGCACCACAGCAACCAGCCTACAAC
CAAGACAAGACACCAGAATTCATTATCAAGATTCTTCAGTTCCTTGTTCGGATCTTGATC
TTGGGATTGGCTCTTGTGCTCCGTCCTACTATACCAAGAAAGACTAG

3'UTR = 129 Nukleotide

F-Primer = AAGAAGCCAAAGGCTTGTCTT

R-Primer = GGTTTCGTAATTTCAACAAGAATC

RT-PCR KalibrierungssequenzAus: **40 S-ribosomales S18-Protein (RPS18B - *Arabidopsis thaliana*)**Chromosomenlocus: At1g34030 (www.tigr.org)

ATGTCTCTGGTTGCAAATGAGGAGTTTCAGCACATTTTTCGCGTGTGCTCAACTAACGTT
GATGGTAAGCAAAAGATTATGTTTGCCTTACCTCTATCAAAGGATTGGAAGGAGATTG
GCCAACATTGTCTGCAAGAAAGCCGATGTCGACATGAACAAGAGGGCTGGTGTGAGTTATCT
GCAGCTGAGATTGACAACCTCATGACTATTGTTGCAAACCAAGACAGTTCAAGATTCCA
GACTGGTTTTTGAACAGACAGAAAGATTACAAGGATGGGAAGTACTCTCAAGTTGTCTCC
AATGCCCTTGACATGAAGCTCAGGGATGATCTTGAGCGTCTCAAGAAAATCAGAAACCAT
CGTGGTCTGAGACATTACTGGGGTCTCCGTGTTTCGTGGACAACACACCAAGACAACCTGGT
CGCAGAGGAAAGACTGTTGGTGTGTCTAAGAAGCGTTAA

Expressions-Konstrukte

Verwendete Primer unterstrichen in Fettdruck (3' Primer komplementär)

Cytochrom b5 (*Rattus norvegicus*)Accession-No.: D13205 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

**ATG GCCGAGCAGTCAGACAAGGATGTGAAGTACTACTCTGGAGGAGATTCAGAAGCACAAA
GACAGCAAGAGCACCTGGGTGATCCTACATCATAAGGTGTACGATCTGACCAAGTTTCTC
GAAGAGCATCCTGGTGGGGAAGAAGTCCTAAGAGAGCAAGCTGGGGGTGATGCTACTGAG
AACTTTGAGGACGTCGGGCACTCTACGGATGCACGAGAAGTGTCCAAAACATACATCATC
GGGAGCTCCATCCAGATGACAGATCAAAGATAGCCAAGCCTTCGAAACCCTTATCACT
ACTGTCGAGTCTAATTCCAGTTGGTGGACCAACTGGGTGATCCCAGCCATCTCAGCCCTG
GTGGTAGCTCTGATGTATCGCCTCTACATGGCAGAAGATTAA**

Cytochrom b5-Membrananker (w.o.) ---> für Einzeldexpression

**ATGATCACTACTGTGAGTCTAATTCAGTTGGTGGACCAACTGGGTGATCCCAGCCAT
CTCAGCCCTGGTGGTAGCTCTGATGTATCGCCTCTACATGGCAGAAGATTAA**

Cytochrom P450 - Isoform 1 (*Candida maltosa*)Acc.-Nr.: X51931 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ATGGCTATAGAACAAATTATTGAAGAAGTACTTCCTTACTTAACTAAATGGTACACCATT
 ATATTTGGTGCAGCTGTCACCTACTTTTTATCTATCGCTCTAAGAAATAAATTTTACGAA
 TATAAATTGAAATGTGAAAATCCAGTATACTTTCAAGATGCTGGTTTGTGGTATTCCA
 GCTTTAATCGATATCATTAAAGTTAGAAAAGCAGGTCAATTAGCCGACTATACTGATACT
 ACTTTTGATAAATATCCAAACCTCTCTCTTACATGACTGTTGCTGGTGT TTTGAAAATT
 GTTTTTACAGTCGATCCAGAAAATATCAAAGCTGTTTTAGCTACCCAATT TAATGATTTT
 GCTTTAGGTGCCAGACATGCTCACTTTGATCCATTGTTGGGTGATGGTATTTTCACTTTG
 GATGGTGAAGGTTGGAAACATAGTAGAGCTATGTTGAGACCACAATTTGCCAGAGAACAA
 ATTGCTCATG TTAAAGCTTTAGAACCACACGTTCAAATCTTGGCTAAACAAATTAATTA
 AACAAGGGTAAAACCTTTTGATTTACAAGAATTATTCTTCAGATTTACCGTTGATACCGCT
 ACTGAATTTTTGTTTGGTGAGTCCGTCACAGTTTGTACGATGAAAAATTGGGCATTCT
 GCTCCAAACGATATCCAGGTAGAGAAAATTCGCTGAAGCTTCAACACTTCCCAACAT
 TATTTAGTACCAGAACTTACAGTCAAATCTTTTACTGGTTAACTAACCTAAAGAATTC
 AGAGATTGTAATGCTAAAGTCCATAAATTAGCTCAATATTTCTGTTAACACTGCTTTAAAT
 GCCACTGAAAAAGAAGTTGAAGAAAAATCTAAAGGTGGTTATGTTTTCTTGTATGAATTG
 GTTAAACAACTAGAGATCCAAAAGTTTTGCAAGATCAATTATTAACATTATGGTTGCC
 GGTAGAGATACCACTGCAGGTTTATTGTCTTTTGTATGTTTGAATTGGCCAGAAACCCA
 AAGATTTGGAACAAATTGAGAGAAGAAGTTGAAGTTAATTTTCGGATTGGGTGACGAAGCC
 AGAGTTGACGAAATTTCTTTTGAACCTTTGAAGAAATGTGAATACTTGAAGCTGTCTTG
 AATGAACTTTAAGAATGTATCCTTCCGTCCTCAATTAATTTTCAGAACTGCTACTAGAGAT
 ACAACATTACCAAGAGGTGGTGGTAAAGATGGTAACTCTCCTATCTTTGTTCCAAAAGGT
 TCTTCTGTTGTTTACTCTGTTTACAAAACCTCATAGATTGAAGCAATTCTATGGTGAAGAC
 GCTTATGAATTCAGACCAGAAAAGATGGTTTGAACCAAGTACCAGAAAATTGGGTTGGGCT
 TATCTTCCATTCAATGGTGGTCCAAGAATTTGTTTGGGTCAACAATTTGC TTTGACTGAA
 GCTTCATATGTTATTGCCAGATTGGCTCAAATGTTTGAACATTTGGAATC TAAAGATGAA
 ACTTACCCACCAACAAATGTATTTCATCTTACCATGAACCATAACGAAG**GGTGTTTTTATT**
CTGCTAAATAG

PEX 15 (*Saccharomyces cerevisiae*)

Acc.-Nr.: Z74786/YOLO44w (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ATGGCTGCAAGTGAGATAATGAACAATCTGCCTATGCATTCCCTCGATTCTTCTCTAAGGGATTTA
 CTTAACGATGACTTATTCATTGAAAGTGATGAATCGACCAAGTCGGTAAATGATCAGAGGAGTGAA
 GTATTTCAAGAATGTGTGAACCTTTTCATAAAAAGAGATATCAAGGATTGCCTAGAAAAAATGTCT
 GAGGTTGGATTATTGATATTACCGTTTTCAAGTCCAACCCTATGATATTAGATTTATTTGTCAGCG
 CC TGTGATATTATGCCAGCTTTACCAAATTAGGTTTAAACTGCAGAGTGAGATTTTGAATAT TT
 TCACGTTAGATACCCCTCAATGTATTGAGACAAGAAAAATTATTCTCGGTGACCTCAGTAAACTTTT
 GGTCAATCAATAAATTCTTTTCGATGCTGTATCAAGGTTATTAGTTTAACTTAACTGATCACACCGA
 ACAAGAAGAAAAAATCTGGAGCTTGAATCCATAATGAGTGATTTCAATTTTCGTATACATAACGAA
 AATGAGGACAACTATAGATGTAGTTGGCTTACAAGAATTAATCGAGATATTCATCTTTTCAGGTGAA
 GGTAAAACCTGCATCATAAAAAACCTCACCGAATATGTATTGGGCGCTTTGCAAAAACATTACCTAA
 GTTATCTCAACCCTAAAGGGCCTTTACTTATCTAAAGATGTTTCCATAGAGGATGCTATTCTGAAC
 TCAATAGATAATAAAAATACAAAAAGATAAGGCGAAGTCTAAAGGTAACAAAGAGGAGTGAAAC
 AGAAAATACACCAATTTTACGAGCCTATGTTACACAATAGTAGTGAAGAACAGGTTAAGGTTGAGG
 ATGCGTTTAAATCAACGCACCTCTACTGATAGTACTCCAGAGTACTGGAACGGCGCCCCGTA
 AAAACAATGATATTACTGTTCTGGCTGGTTTCAATTTGGGCTGCTTGAAGCATATTTTCAAGAA
 GTGTGCTGAACAAAACGGACTTCTGCTCACAGGTCTGCTGCTACTCTTATGTTTGAAAAAATATA
 AGTCATTGATGGCAATTTTCAAACATGTTCCAGCGGCCTTTCACTGTATACCCCCAGATTGTAGG
 GTTGCT**AAAACTTCTAGCGAGTATATGA**

Diacylglycerol-Kinase (DAGK - *Escherichia coli*)

Acc.-Nr.: K00127 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ATGGCCAATAATACCACTGGATTCACCCGAATTATCAAAGCTGCTGGCTATTCCTGGAAAGGTTT
 ACGCGCTGCATGGATCAACGAAGCGGCTATCCGTCAGGAAGCGTAGCGGTATTGTTGGCGGTGGT
 CATCGCCTGCTGGCTGGATGTGGACGCGATTACCCGCGTGTCTTATCAGCTCCGTGATGCTGGT
 ATGATTGTGAAATCCTCAATAGCGCCATCGAAGCAGTGGTTGACCGAATTGGCTCTGAATACCAT
 GAGCTTTCCGGACGCGCAAAAGATATGGGATCCGCTGCGGTGCTGATTGCCATTATCGTCGCCGTG
 ATTACCTGGTGCATT**CTGTTATGGTTCGATTTTGGATAA**

MID1/DMF1-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe*Acc.-Nr.: Y07599 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ATGAAAGAGCAAGAGTTCTCATATAGAGAAGCAAAGATGTGTCTCTTGACTCTAAAGGCTTAG
 AAAACAGTTTTCTTTCTTCTCCAAATCGAGAAAAAACACCCCTTTTTTTTTGAGGGTAACAGTAATGA
 AACCTCGGGATATGATCAAACAAAAAATTTACACATGGAGATGGCGATATGTCCCTTGAAACCT
 TTCGGAACATAACGTTGCGACAGATCTTTTAGAGTCACTTGATTTAAGAAGCATGTATATGCATGG
 CTATGGGCACCTCGATTATCTTTTTCTTCTCAACATAGTCTGATAATCGTAAAAGAATGAGTAGT
 ACATCAGTGTTTAAGAGGATTAATTCCGAGGAAGAAGGTCGCATTCCTAGTTTGACGTACTCGGCA
 GGAACATGAACCTCGACAAGTTCTTCTACTGCGTCTTTGAAAGGTGCTGATATTGTTGCAGATTATG
 AACATTTAATCCGGATCAAATTTAGCTGAATTATCCTTTGACCGCTCAAATCGTCTCGCAAGA
 GGGCGGTAGAAGTAGCAGAATTTAGTCGAGCTAAGACAATGTCTCCGTTGGAATACACTGTTCAAC
 ATCCATATCAATCCCATAATGAACTGTCTACAAACCCAGCCCGAGCAAGAGCTGGAAGCGTTCCCA
 ACTTGGCTCGCATACCATCTGATGTCAAGCCCGTACCTCCAGCACATCTATCTGCATCTTCTACTGT
 AGGTCCAAGGATTCTTCTAGTCTTCCCAAAGATACCACAGAGGACAATCCAGCGTTGGAAGGGT
 CGAAACGACGGCGTCTCTCGATATGGATTATAAACCTTTAGAACCTTTAGCTCCCATTCCAGGAAGC
 CCCTGTTGAAGATACTTCAGAGCCTTTTTCTTCCAGTCCAGAGGCCACCTTAGACGACTCAGATATC
 TCTACAGAAAGTCTTCGTA AAAAGGTTTTGGCCAAGATGGAAGCAAACGGATTTCCAGTGGATCT
 TCCTATGCTAGTACACTTAGGAAAGTTATGATTTCTCTGAGCTTTCCCTTCCCACCAACGGTAAAG
 ACTATGATGAGTTATACCTTCAATCTTCCCGTAATTCAGAACCTGAGATTTCTACTATTATCAATGA
 TTCTTTACAACAGGAAAATATGGATGAGGATATTAGTGCCACTTCAATTCCGAAATCTCAGGCCGC
 CTATGGTCATGGATCTGTAACGTATCATGAAGTCCCGATACAATCAACTCTGCTTCCGTTGGGA
 TATAGTATATCTAGTCAACGTGGTTCGTATAAAAAGCAGTTCTACCATTGACAATTTGAGTGTCTATT
 TAAGTCTGAAGATTTACGTCACCCATCAATGCAACCCGTACCAGGAACGAAGCGTACTTATAGTA
 ATTATTGTGAAAATGAGCCAAACAAGTCTAGCCAAAGTTTAGTCAGTTCTGAGTCCATAACGTCG
 AAGGATGGAATTATTCGAAACTGGTACAGTAGGTTTTTACGACCCTAGTGCCGAGATATCCGCCA
 GCATTGATGAACTTAGGCAGTCTACGCCTGTAGCCAGAGATAGCGAACTTTAAGTCGTGCACATT
 CCTTTGATTTGAATCGCCTTGATCTTCCAAGTCAGGATAAGAGTACGTCTTACGAAGTCCCGAATGG
 TACTGAAAATCAATCACACGTCCTGTTACTTCTCTTGGATTTGTGAATGAAACATTTTTTTGAAGAG
 AAACCAAAGGCGCCCTTGCCACTTGGTTCGTTTTATATACATTTGAACAGCATTTTGAATATTTTGA
 TAAGTGAAGTCCATTACCTATCAAGATAATAGTTAATACGCCTACGCAAAATATGCAGCTTCCTT
 GGCAAGCTGTTAATGGGAATAATAGGTTGGACCATGATTTTGTCTTTTTCATGTTGACGATAACTTTAA
 AGTGAGTTTTATGTTTTCTTGACATCCCTATTGAGGACAAGTCCAACGGTTCGAAAGGAGTATCTGCT
 ACAAAGACGTTTCAAACGGTAAGCCTGCTGAAACGAAATCCAAAGCTAGGAAATTTTTTTGACAA
 GCTTTTCAACCGACGCAAAAAGAGAAAACTCAACAAGGCTGCTGCAGTTGAGAATTCAAAGGCTA
 AGAAGTCAGTGGTTATCAAGAAAGTCTCGGGTACTGCTACGTTAAATTTGGGTAATGTCAAAGACA
 GTTGTTTTTGAAAGGCTTTCAACGTAGAAATACCCATCATTTCCAGAGGCTTCTTGGAAAGCGATTCC
 TGAAAAAATAAACTCTATAGGGAAACGTACACTTGGTAATCTAACTTTGACTTGTGTTGATATTCCT
 GAGCTTTCGGTTCAGAGCAGGAATTGCCATTTACCTTAGAACAAGCTACGATGGACTTGGCAGAC
 GTTAGAAGTAACATCTATATAATGAGGGATACTTGTATAGATTGGAAGATTCATCTATTCGAAGA
 CGTTTTGTCGTTTTACGCTCAAAGCAGCTGAATTTTTATGCTGAAAAAGGTGGGCAATATTTGGATA
 CTTTTCAGCTTTCTAAGACAGTAGTTTCAATCCCAATGGTAAATTTTTTTCAGAGGCAGTTTCAAACCT
 CGGTCTAGTAGCTGGAATATTGGCTACATCTGTTGATAGAAGGCATGTTTCAGTTGTTTGGGACTCT
 AAAAAGGTTTGCCAAAAATGGCTTCAGGTGATGAATTCACGCTCGTTTGTCTAGATAGGGGTACT
 GAGAAATTATGGTTACAAGAATACGTGAATTTTATGGCTTAATATCTGA

Cytochrom P450-Reduktase (CPR - *Candida maltosa*)Acc.-Nr.: X76226 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ATGGCATTAGATAAATTAGATTTATATGTCATCATAGTATTGGCAGTTGCAGTAGCTGCTTATTTCC
 GCCAAAAATCAATTCCTTGATCAACCTCAAGATACTGGTTTCCTTTCTAATGATACCGCTGGTGGTA
 ACTCCAGAGATATCTTGGAAACATTAAGAAGAATAATAAAAAATACATTATTACTATTTGGGTCTC
 AAACCTGGTACTGCTGAAGATTATGCTAATAAATTAAGTAGAGAAATTCATTCAAGATTTGGTTTAA
 AAACATATGGTTGCAGATTTTCCGATTACGATTTGGACAATTTCCGGTGATATTCCAAATGATATCTT
 GTTTTCTTTATTGTGCTACTTACGTTGAAGGGGAACCAACTGATAATGCAGACGAATTCATACT
 TGGTTAACTGATGAAGCTGATACTTTGAGTACCTAAGATACACTGTTTTCGGTTTGGGTAACCTCTA
 CTTATGAGTTTTACAATGCCATTGGTAGAAAATTTGACAGATTATTGGAAGAAAAAGGTGGTGAAA
 GATTTGCCGATTACGGTGAAGGTGATGATGGTACTGGAACCTTTGGATGAAGATTTCTTGACTTGGAA
 AAGATAACGTGTTTGAATACTTTGAAGAATGATTTGAATTTTGAAGAAAGAGAATTGAAATACGAAC
 CAAATGTCAAATTGACTGAACGTGATGATTTAACTGTTGACGATAGCGAAGTTTCTTTGGGTGAAC
 CAAACAAGAAGTATATCCAATCTGAAGAAATTGATTTGACTAAAGGTCCATTTGACCATACCCATC
 CTTACTTGGCTAAAATCTCCAAAACCTAGAGAATTTTGTCTTCCAAGGAAAGAAACTGTGTTTCATG

TCGAATTTGATGTTTCTGAATCCAATTTGAAATACACTACCGGTGATCATTAGCTGTTTGGCCATC
 CAATTCTGACGAAAATATTGCCAAATTCATTAAATGTTTTGGTTTAGACGATAAAAATTAACACTGTT
 TTCGAATTAAGCTTTAGATTCCACTTATCAAATCCCATTCCCAAACCAATCACTTATGGCGCCG
 TTGTTAGACATCATTGGAAATTTCTGGTCCAGTTTCTAGACAATTTCTTTTGGCTATTGCTGGTTTT
 GCTCCTGATGAAGAAACCAAGAAGACTTTTACCAGAATTGGTAATGATAAACAAGAATTTGCTAAC
 AAAATCACTCGTAAGAAATTGAATGTTGCCGATGCCTTGTGTTTGCATCCAATGGTAGACCATGG
 TCTGATGTTCCTTTTGAATTTATTATTGAAAATGTCCCACTTACAACCACGTTATTATTCTATTTT
 TTCATCTTCTTTGAGTGAAAAACAACCATTAATATCACTGCTGTTGTCGAAGTTGAAGAAGAAGC
 CGATGGTAGAGCAGTTACTGGTGTGCTTACCAACTTGTGAAAAACATTGAAATCGAACAAAACAA
 AACCGGTGAAAAACAGTTGTTTACGATTTAAGTGGTCCAAGAAATAAGTTTAAACAAATTCAA
 GTTACCAGTTTATGTCAGAAGATCCAATTTCAAATTAACAAAAATACTACTCCGGTGATTTTG
 ATTTGGTCCAGGTACTGGTGTGGCTCCATTGAGAGGTTTCGTTAGAGAAAGAGTCCAACAGTTAAG
 AATGGTGTAAATGTTGGTAAAACCGTTTTATTCTACGGTGTAGAAACGAACATGACGACTTTTTGT
 ATAAACAAGAATGGTCTGAATATGCTTCCGTATTGGGTGAAAATTTGAAATGTTTACTGCCTTCTC
 AAGACAAGATCCAAGTAAGAAAGTTTATGTTCAAGATAAAAATGCTGAAAATAGCAAAGTTGTCA
 ATGATTTATTAACGAAGGTGCTATTATTTATGTTTGTGGTGTAGCCAGTAGAATGGCTAGAGATGT
 TCAAAGCACCATTGCAAAGATTGTTGCCAACACAGAGAAATTCAGAAGATAAAGCTGTTGAAT
 TGGTCAAATCTTGGAAAGTTCAAACAGATACCAAGAAGATGTTTGGTAG

Phosphatidylcholinsynthase (PCSI - *Sinorhizobium meliloti*)

Acc.-Nr.: AF155772 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ATGAAGTTCTTCAATTACAGACGCGTTCCTTACGCGGAAATACGCGCCTTTCCGTGCATATCCTCA
 CAGCGTCCGGATCGTTCCTGGCCTTTCTCGGTGTCGTCGCTGCGGCAGAGCACCGCTTCGTGACAT
 GTTCTGGTGGCTCGGTCTGGCCTTGCTCGTCGACGGCATCGACGGGCCGATCGCCGCAAGGTCCA
 GGTCAAGGAGGTGCTGCCCAACTGGTCCGGCGATACGCTCGACAACGTCATCGACTACGTGACCTA
 TGTGCTGCTGCCGGCCTTCGCGCTCTACCAGAGCGGCATGATCGGCGAACCTGGTCTGTTGTTGGC
 CGCCGGCGCATCGTGGTTTCCAGCGCTATCTACTATGCGGACATGGGAATGAAGACGGACGAGTA
 TTTCTTTTCCGGATTTCCGGTCTGCTGGAATATGGTCTGCTTACCCTTTTTGTGATCCAGGCGAGCG
 AAGTCACTGCATCGATTGTCGTTTTCTATCGGTGATATTGACGTTCTGCGCATCAACTTCTGCA
 TCCGGTGCCTGTGAAAAGGCTGAGGCCGCTCAATCTCGGCATCTTCTCGTCTGGTGGTCTCGG
 AATGTATGCGTTGCTCCTGCATTTGAGACCCCGCCCTGGGTAGTGGTGGGCGTCTGGCAACCGG
 GCTTTACCTCTACGTCATCGTTTCATACTGCAGATCTTCCGAAACTCGGGCGTGCCTGA

GFP-Sequenz aus pCATgfp

ATGGGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGTAATTAGATGGTGTGTT
 AATGGGCACAAATTTTCTGTGAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTT
 AAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTTCTTGGCCAACTTGTCACTACTTTCTGTTATG
 GTGTACAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGC
 CTGAGGGATACGTACAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACTACAAGACACGTGCT
 GAAGTCAAGTTTGAAGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGA
 GGACGGAAACATCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACCTCAACTCCCACAACGTATACATCACTGC
 AGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCG
 TTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACA
 ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCC
 TTTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAATGCGGCCGCTCT
 AG

Cytochrom b5-Membrananker (*Rattus norvegicus*) ---> für Fusion mit GFP und YFPF

ATCACTACTGTGAGTCTAATTCCAG TTGGTGGACCAACTGGGTGATCCCAGCCAT
 CTCAGCCCTGGTGGTAGCTCTGATGTATCGCCTCTACATGGCAGAAGATTAA

Prozessive β -Glukosyltransferase (YFPF oder DGDS - *Staphylococcus aureus*)

Acc.-Nr.: Y14370 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ATGGTTACTCAAATAAAAAGATATTGATTACTGGCTCATTCCGGTAACGGTCATATGC
 AAGTTACACAGAGTATCGTTAATCAACTAATGATATGAATCTAGACCATTTAAGCGTCA
 TTGAGCACGATTTATTTATGGAAGCTCATCCAATTTTACTTCTATTTGTAATAAATGGT
 ATATCAATAGCTTTAAATATTTAGAAATATGTACAAAGGGTTTTATTACAGCCGCCAG
 ATAAACTAGACAAATGTTTTACAAATACTATGGACTTAATAAGTTAATTAATTTATTGA

TAAAAGAAAAGCCAGATTTAATATTATTAACGTTTCCTACACCAGTTATGTCGGTACTAA
CTGAGCAATTTAACATTAATATTCCAGTTGCTACAGTGATGACAGACTATCGCTTACATA
AAAAGTGGATTACGCCGATTCAACAAGATATTATGTGGCAACAAAAGAAACGAAACAAG
ACTTCATAGACGTAGGTATTGATCCTTCAACAGTTAAAGTGACAGGTATTCCTATTGATA
ACAAATTTGAAACGCCTATTAATCAAAAAGCAGTGGTTAATAGACAACAACCTTAGATCCAG
ATAAGCAAACCTATTTTAATG TCAGCTGGTGCATTTGGTGTATCTAAAGGTTTTGACACGA
TGATTACTGATATATTAGCGAAAAGTGCAAATGCACAAGTAGTTATGATTTGTGGTAAGA
GCAAAGAGCTAAAGCGTTCTTTAACAGCTAAGTTTAAATTAACGAGAATGTATTTGATTC
TAGGTTATACCAAACACATGAATGAATGGATGGCATCAAG TCAACTTATGATTACGAAAC
CTGGTGGTATCACAATAACTGAAGGTTTCGCCGTTGTATTCCAATGATTTTCCTAAATC
CTGCACCTGGTCAAGAGCTTGAAAATGCCTTTTACTTTGAAGAAAAAGGTTTTGGTAAAA
TCGCTGATACTCCAGAAGAAGCAATAAAAAATTGTAGCAAGTTTAACTAACGGTAATGAGC
AATTAACATAACATGATTAGTACAATGGAACAAGATAAAAATTAAGTATGCTACACAGACAA
TATGTCGAGACTTACTTGATTTAATCGGTCATTCATCACAACCACAAGAGATTTATGGAA
AGGTTCCCTTTATATGCAAGATTCTTCGTTAAATAA

Anhang E1

Fettsäureverteilung der Cytochrom b5-Attenuationslinien transgener Saat aus *Arabidopsis thaliana*

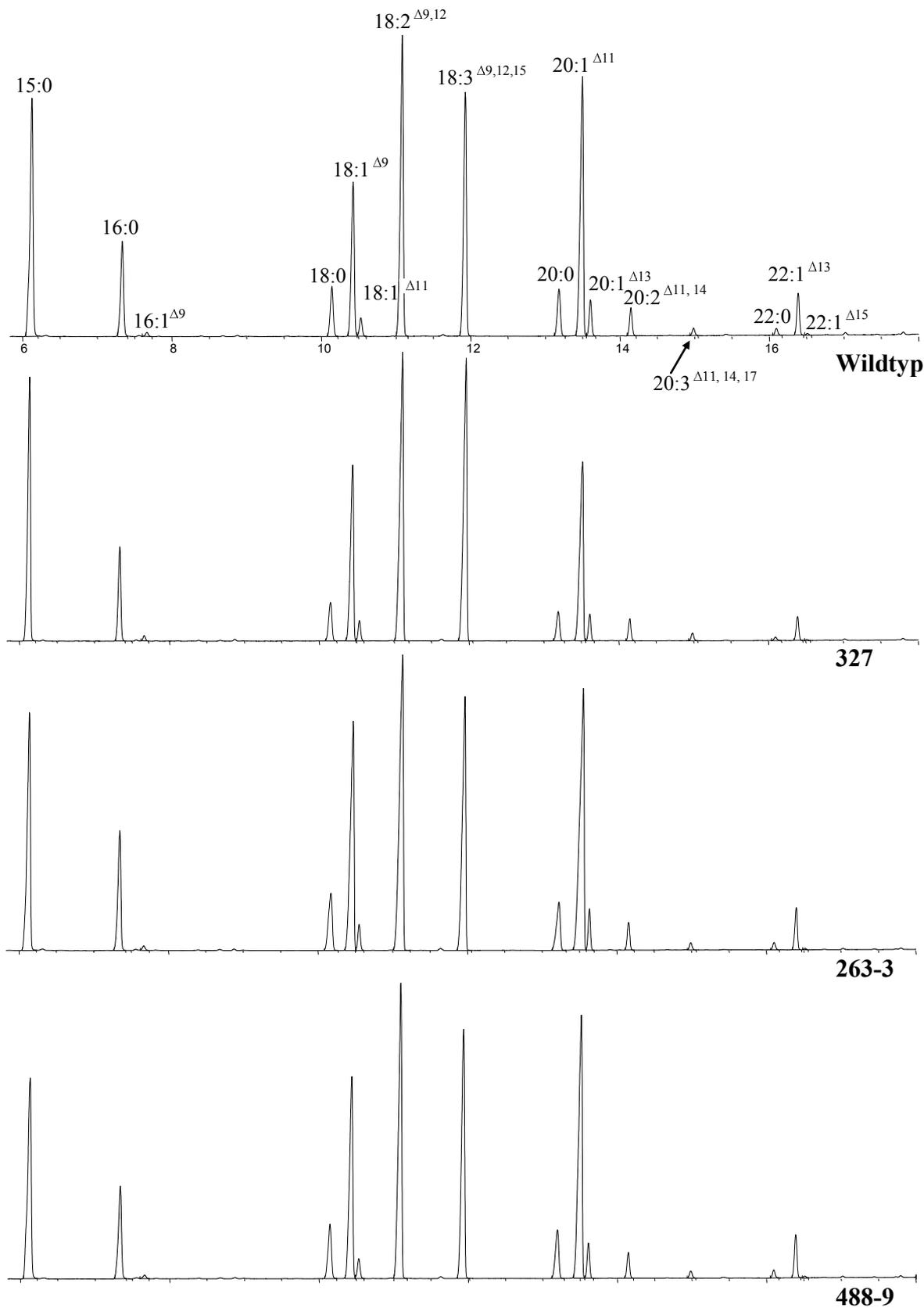
Analyse der TAG-Fraktion von 100 mg Samen

Alle Angaben in Mol-%

	WT	263-1	263-3	263-4	263-7	263-9	263-10	263-11	263-12	327	488-6	488-7	488-8	488-9	488-10	488-12
16:0	7,36	6,61	7,01	7,03	6,77	7,07	7,07	7,11	6,67	6,29	6,72	7,12	6,61	6,87	6,74	
16:1Δ9	0,29	0,28	0,25	0,30	0,27	0,28	0,35	0,33	0,31	0,35	0,27	0,28	0,26	0,28	0,26	
18:0	3,93	4,08	4,35	4,69	4,22	4,25	4,35	4,13	4,00	3,23	4,15	4,23	4,16	4,39	4,92	
18:1Δ9	12,14	12,94	16,45	13,73	13,22	12,15	14,04	13,79	14,66	14,49	14,12	14,41	15,09	13,56	16,88	
18:1Δ11	1,34	1,32	1,28	1,38	1,38	1,45	1,43	1,36	1,23	1,30	1,22	1,27	1,22	1,35	1,27	
18:2Δ9,12	22,98	22,63	22,43	23,76	23,37	24,89	23,91	24,65	22,55	25,45	22,34	23,43	21,89	23,80	22,88	
18:3Δ9,12,15	18,39	17,31	16,71	16,72	16,77	16,99	17,47	16,79	16,64	24,41	17,53	17,42	17,89	17,05	16,07	
20:0	3,81	4,23	3,56	4,39	3,96	4,02	3,81	3,46	3,53	2,39	3,92	3,58	3,81	4,06	3,89	
20:1Δ11	21,36	21,81	21,73	20,18	22,14	20,57	20,25	19,36	21,49	16,46	22,04	21,31	21,88	20,98	20,96	
20:1Δ13	2,42	2,58	1,63	2,48	2,34	2,50	2,28	2,20	1,97	1,67	2,20	2,02	2,02	2,32	1,91	
20:2Δ11,14	1,93	1,86	1,40	1,66	1,82	2,02	1,61	1,65	1,51	1,49	1,69	1,63	1,55	1,65	1,30	
20:3Δ11,14,17	0,52	0,49	0,38	0,40	0,44	0,46	0,42	0,44	0,44	0,51	0,47	0,42	0,45	0,41	0,33	
22:0	0,49	0,57	0,39	0,55	0,48	0,55	0,46	0,39	0,41	0,25	0,49	0,42	0,47	0,52	0,43	
22:1Δ13	2,92	3,15	2,15	2,71	2,70	2,69	2,43	2,24	2,45	1,63	2,74	2,34	2,59	2,63	2,06	
22:1Δ15	0,12	0,14	0,08	0,12	0,11	0,13	0,14	0,09	0,12	0,08	0,11	0,11	0,12	0,13	0,10	
Gesamt-Fettsäure [μMol] pro 100 mg Saat =	35,7	38,7	44,5	34,3	41,8	38,1	35,5	34,4	38,8	36,9	40,6	39,7	42,1	37,3	41,9	

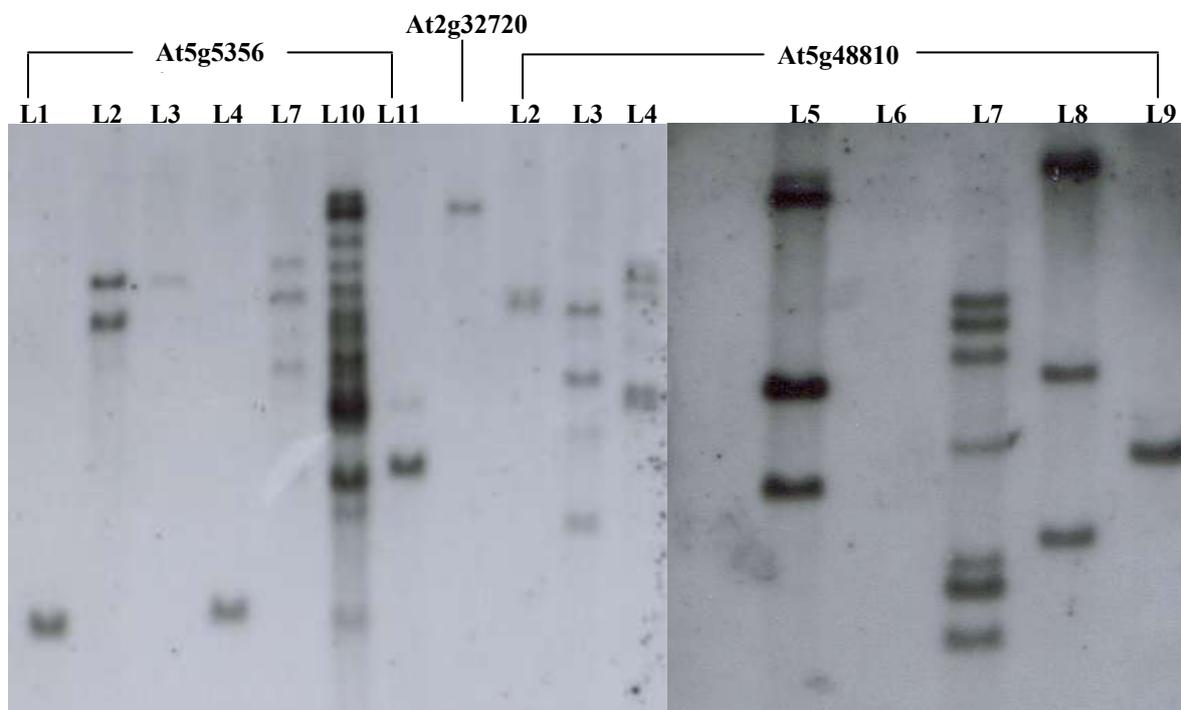
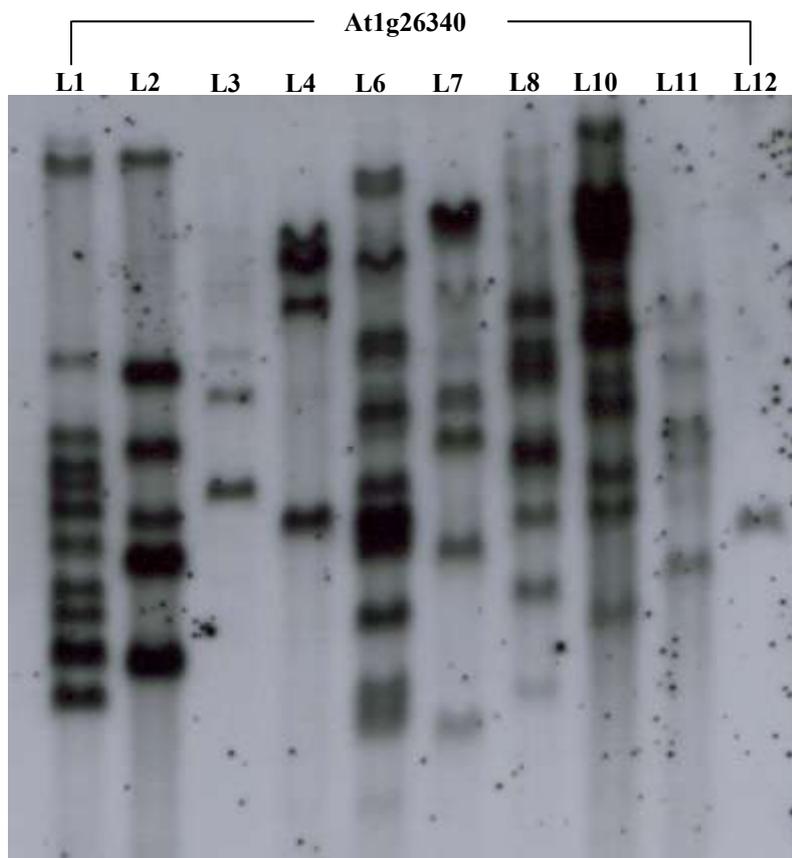
Anhang E2

Fettsäureprofile von vier Linien aus E1



Anhang F

Southern-Untersuchung der Attenuationslinien der Cytochrome b_5 von Arabidopsis:
At5g53560, At5g48810, At2g32720 und At1g26340



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Laufzeit des Drittmittelprojektes NAPUS 2000 von November 1999 bis September 2004 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Heinz durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Heinz für die Überlassung der überaus interessanten und anspruchsvollen Themenstellung sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Sein großes Interesse am Thema Membranhomöostase und seine unzähligen Anregungen trugen letztlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Zu großem Dank bin ich auch Herrn PD Dr. H. Quader verpflichtet, für alle Ratschläge in elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Verfahren und für die Übernahme des schriftlichen Zweitgutachtens.

Besonders in der Startphase waren die vielen Einarbeitungshilfen in molekularbiologische Techniken durch Frau Dr. P. Jorasch und Herrn Dr. M. Fulda für mich eine unverzichtbare Stütze.

Wichtig waren für mich ebenfalls die Ratschläge und Tipps rund um die GC/DC-Anwendungen von Dr. A. Abbadi, Dr. F. Domergue, Dr. M. Leipelt und C. Ott

Für die Bereitstellung von Gensequenzen für Expressionsstudien möchte ich ferner Dr. Q. Wang, Dr. G. Hölzl, Dr. A. Abbadi und Dr. P. Jorasch danken.

Eine hilfreiche Einweisung in die Blotting-Handhabung verdanke ich G. Bräcker und Dr. J. Kirsch.

Für das mühselige Geschäft der Transformation und Selektion von Leinpflanzen für Vergleichsuntersuchungen bedanke ich mich bei Frau A. Fahl.

Für die freundliche Überlassung transgener Rapssaaten für Vergleichsuntersuchungen danke ich Prof. Dr. S. Stymne und Dr. K. Dixelius.

Eine sehr große Hilfe für Hefeexpressions-Versuche war die Überlassung eines geeigneten Membran-Proliferationskonstrukts durch Prof. Dr. W-H. Schunck und Dr. R. Menzel.

Ferner danke ich Dr. J. Orsini für die Rapstransformation, der >Norddeutschen Pflanzenzucht - Hans Georg Lembke KG< sowie der >Deutschen Saatenveredelung< für Inanzuchtnahme, Selektion und Vermehrung transgener Rapssaaten.

Zu guter Letzt möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung im Arbeitskreis bei allen Heinzelmännchen bedanken und für die gute Zusammenarbeit in der EM-Abteilung bei Irmis und Elke.