

**Veränderung des Glykolipidmusters
in Thylakoiden von Pflanzen und Blaualgen
durch heterologe Expression
bakterieller Glykosyltransferasen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Georg Hölzl

Regen

Hamburg, Dezember 2004

Abkürzungsverzeichnis

ACP	Acyl-Carrier-Protein
A. dest.	lat. <i>Aqua destillata</i> = destilliertes Wasser
Amp ^S	Ampicillin-sensitiv
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> = Rinderserum-Albumin
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DIG	Digoxigenin
EDTA	engl. <i>ethylene diamine tetra acetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	engl. <i>expressed sequence tag</i> = exprimierte Sequenz
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
Gcs	Glukosylceramid-Synthase
HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare

Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
LB	Luria-Bertani broth
LHCI	engl. <i>light harvesting complex I</i> (Lichterntekomplex I)
LHCII	engl. <i>light harvesting complex II</i> (Lichterntekomplex II)
mol%	Mol-Prozent (Prozentangabe auf die Stoffmenge bezogen)
MS	Massenspektrometrie
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
nptII	Neomycin-Phosphotransferase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Messwellenlänge von 600 nm
ORF	engl. <i>open reading frame</i> = offener Leserahmen
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Rif ^R	Rifampicin-Resistenz
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sn	stereospezifische Nummerierung
THF	Tetrahydrofuran
Sm ^R	Streptomycin-Resistenz
Sm ^S	Streptomycin-sensitiv
Sp ^R	Spectinomycin-Resistenz
v/v	Volumen per Volumen
w/v	Gewicht per Volumen

Abkürzung für Lipide

AGM	Acylgalaktosylmonoacylglycerol
CL	Cardiolipin
DAG	Diacylglycerol
GlcCer	Glukosylceramid
GalCer	Galaktosylceramid
MGM	Monogalaktosylmonoacylglycerol
NBD-Cer	D-erythro-N[6-amino-N-4'(7nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolo)-hexanoyl]ceramid
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
SQD	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
α GalD	α -Galaktosyldiacylglycerol
α Gal β GalD	α -Galaktosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galaktosyldiacylglycerol
α GlcD	α -Glukosyldiacylglycerol
β GalD	β -Galaktosyldiacylglycerol
β Gal β GalD	β -Galaktosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galaktosyldiacylglycerol
β GlcD	β -Glukosyldiacylglycerol
β Glc β GalD	β -Glukosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galaktosyldiacylglycerol
β Glc β GlcD	β -Glukosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glukosyldiacylglycerol
β Glc(1 \rightarrow 3) β GlcD	β -Glukosyl-(1 \rightarrow 3)- β -glukosyldiacylglycerol

Abkürzungen für Gene und deren Produkte

Abkürzungen von Genen und deren Produkten entsprechen den Vorschlägen des „genetic nomenclature guide“ (Stewart, 1995).

1	EINLEITUNG.....	4
1.1	Glycerolipide in photosynthetischen Membranen von Chloroplasten und Blaualgen.....	6
1.2	Struktur plastidärer Glycerolipide	8
1.3	Biosynthese von Galaktolipiden in Pflanzen	9
1.3.1	Lipidvorstufen zur Glycerolipidsynthese mit unterschiedlicher Herkunft	9
1.3.2	Galaktolipid-Biosynthese, Lokalisation der Enzyme und „Lipid-Trafficking“	11
1.3.3	Galaktolipid-Biosynthese in Blaualgen.....	14
1.4	Funktion von Galaktolipiden.....	16
1.4.1	Strukturelle Matrix und Bilayer-destabilisierende Eigenschaften von β GalD.....	16
1.4.2	Proteinimport.....	18
1.4.3	Photosynthese.....	19
1.4.4	Phosphatmangel	23
1.5	Problemstellung, Ziel und Strategie	25
2	MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1	Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien.....	27
2.2	Organismen und Vektoren	29
2.2.1	Bakterien und Hefen.....	29
2.2.2	Pflanzen.....	30
2.2.3	DNA und Vektoren	30
2.3	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen und Bakterien	38
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.5	Synthese eines künstlichen Gens aus Oligonukleotiden.....	40
2.6	DNA-Sequenzierung.....	43
2.7	Enzymatische Modifikation von DNA	44
2.7.1	Restriktion von DNA	44
2.7.2	Phosphorylierung von freien DNA-5'-Enden	44
2.7.3	Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA.....	45
2.7.4	Auffüllreaktion zur Beseitigung von DNA-Überhängen	45
2.7.5	Ligation	45
2.8	Gelelektrophorese von DNA.....	46
2.9	Reinigung von DNA.....	47
2.10	Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	47
2.10.1	Klonierung von ORF-Sequenzen	49
2.10.2	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	50
2.11	Methoden beim Arbeiten mit <i>E. coli</i>	52
2.11.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	52
2.11.2	Transformation von <i>E. coli</i>	53
2.11.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	54
2.11.4	Funktionale Expression in <i>E. coli</i>	54

2.11.5	Präparation von Gesamtmembranen	56
2.12	Methoden beim Arbeiten mit <i>A. tumefaciens</i>	56
2.12.1	Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	56
2.12.2	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	57
2.12.3	Konstrukte zur Deletion des putativen <i>gcs</i> -Gens und für Promotorstudien in <i>A. tumefaciens</i>	59
2.12.4	Expressionskonstrukte und funktionale Expression in <i>A. tumefaciens</i>	62
2.12.5	Präparation von Gesamtmembranen	62
2.13	Methoden beim Arbeiten mit <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	62
2.13.1	Kultivierung von <i>Synechococcus</i>	63
2.13.2	Transformation von <i>Synechococcus</i>	64
2.13.3	Transformationskonstrukte und heterologe Genexpression in <i>Synechococcus</i>	64
2.14	Methoden beim Arbeiten mit <i>P. pastoris</i>	65
2.14.1	Kultivierung von <i>P. pastoris</i>	65
2.14.2	Transformation von <i>P. pastoris</i>	66
2.14.3	Transformationskonstrukte und funktionale Expression in <i>P. pastoris</i>	67
2.14.4	Präparation von Gesamtmembranen	68
2.15	Methoden beim Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	69
2.15.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	69
2.15.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	70
2.15.3	Transformationskonstrukte und funktionale Expression in <i>S. cerevisiae</i>	70
2.15.4	Präparation von Gesamtmembranen	71
2.16	Methoden beim Arbeiten mit <i>P. patens</i>	72
2.16.1	Kultivierung von <i>P. patens</i>	72
2.16.2	Transformation von <i>P. patens</i>	73
2.16.3	Konstrukte zur Transformation von <i>P. patens</i>	73
2.17	Methoden beim Arbeiten mit <i>A. thaliana</i>	75
2.17.1	Kultivierung von <i>A. thaliana</i>	75
2.17.2	Transformation von <i>A. thaliana</i>	75
2.17.3	Konstrukte zur Transformation von <i>A. thaliana</i>	76
2.18	Lipidanalytik.....	77
2.18.1	Isolierung von Gesamtlipiden	77
2.18.2	Dünnschichtchromatographie.....	78
2.18.3	Präparative Reinigung von Lipidkomponenten.....	79
2.18.4	Acetylierung von Lipiden.....	80
2.18.5	Darstellung und GLC-Analyse von Fettsäuremethylestern.....	80
2.18.6	NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie	81
2.19	Isolierung von Chloroplasten und Envelopes aus Pflanzen.....	81
2.20	Proteinbestimmung nach Bradford	82
2.21	Enzymtests	83
2.22	Southern-Blot-Analysen.....	84
2.23	Computergestützte Sequenzauswertung	87

3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	88
3.1	Bereitstellung von Glykosyltransferasen.....	88
3.1.1	Bereits klonierte bakterielle Glykosyltransferasen.....	88
3.1.2	Verifizierung einer β GalD-Synthase aus <i>Physcomitrella</i>	89
3.1.3	Synthese einer optimierten Polynukleotidsequenz.....	92
3.1.4	Isolierung neuer Glykosyltransferasen aus verschiedenen Bakterien	93
3.1.4.1	BLAST Datenbanksuche.....	93
3.1.4.2	Klonierung, Transformation und Expression der putativen bakteriellen Glykosyltransferasen in <i>P. pastoris</i> , <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	96
3.1.4.3	Charakterisierung neuer bakterieller Glykosyltransferasen	98
3.1.4.3.1	Prozessive Galaktosyl-/Glukosyltransferasen aus <i>A. tumefaciens</i> und <i>M. loti</i> synthetisieren eine Reihe von neuen Glykosylglycerolipiden und Glykosylceramiden	98
3.1.4.3.2	Identifizierung von zwei α -Glukosyltransferasen aus <i>D. radiodurans</i> und <i>T. maritima</i> ..	112
3.1.4.3.3	Identifizierung einer β -Galaktosyl- und einer β -Glukosyltransferase aus <i>C. aurantiacus</i>	114
3.2	Manipulation der Glykolipidbiosynthese in verschiedenen Organismen durch Gen- Inaktivierung und heterologe Expression von Glykosyltransferasen.....	121
3.2.1	Unbekannte Funktion der Gcs in <i>A. tumefaciens</i>	121
3.2.2	Die Deletion einer β GalD-Synthase und die Expression heterologer Glykosyltransferasen in <i>Physcomitrella</i> führten zu keiner Veränderung im Glykolipidmuster.....	127
3.2.3	Die Expression bakterieller Glykosyltransferasen verändert das Glykolipidmuster in <i>Synechococcus</i>	129
3.2.4	Die Expression einer bakteriellen Glykosyltransferase führt zur Veränderung des Glykolipidmusters in <i>A. thaliana</i>	135
3.3	Abschließender Überblick über die Ergebnisse der Expression der bereitgestellten ORFs in den verschiedenen Organismen.	143
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	145
5	LITERATUR	147
6	ANHANG	159

1 Einleitung

Lipide sind neben Proteinen die Grundbausteine der Membranen aller lebenden Organismen. Neben der Erfüllung spezifischer Funktionen spielen Sie eine wichtige Rolle als Strukturelemente. Membranlipide können je nach ihrem hydrophoben Grundgerüst in drei Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet Glycerolipide, Sphingolipide und Sterole / Sterol-Derivate, die in Abhängigkeit von ihrer Kopfgruppe auch in Glykolipide und Phospholipide unterteilt werden.

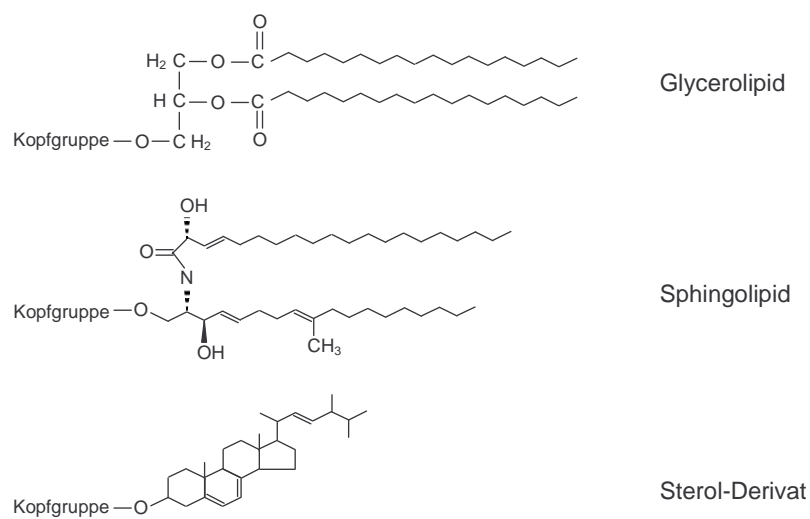


Abb. 1 Strukturen verschiedener Membranlipide am Beispiel eines Glycerolipids, eines Sphingolipids und eines Sterol-Derivats.

Glycerolipide enthalten Glycerol als Grundgerüst, das an der *sn*-1- und *sn*-2-Position mit Fettsäuren verestert ist. Die polare Kopfgruppe besteht aus unterschiedlichen Komponenten und befindet sich an der *sn*-3-Position des Glycerols. Wird die Kopfgruppe aus einem oder mehreren Zuckern gebildet, so spricht man von Glykoglycerolipiden. Die global häufigsten Glykoglycerolipide sind die Galaktolipide der Pflanzen mit einem oder zwei Galaktoseresten. Die Kopfgruppe der Phosphoglycerolipide besteht aus einem Phosphatrest, der mit der *sn*-3-Position des Glycerols verestert ist und an dem in der Regel zusätzlich verschiedene andere Reste gebunden sind.

Der Grundbaustein der Sphingolipide ist ein langkettiger, aliphatischer Aminoalkohol (Sphingobase). Dieser trägt stets eine Aminogruppe an seinem C2-Atom und je eine OH-Gruppe an C1 und C3. Durch Acylierung, Hydroxylierung, Desaturierung, Methylierung, Phosphorylierung und Glykosylierung dieser Sphingobase erhält man eine große Zahl von unterschiedlichen Derivaten. Sphingolipide sind typische eukaryote Lipide, die in Prokaryoten nur selten nachgewiesen werden konnten (Olsen et al., 2001).

Auch Sterole kommen insbesondere in Eukaryoten vor. Neben den freien Sterolen findet man Sterolester, Sterolglykoside und acylierte sowie phosphatidylierte Sterolglykoside, wie zum Beispiel bei *Helicobacter* (Shimomura et al., 2004).

Die große Vielfalt dieser Membranlipide lässt vermuten, dass sie neben der Funktion als Membranbausteine und Matrix für die Proteine weitere spezifische Funktionen haben. Diese spezifischen Funktionen stehen vermutlich im Zusammenhang mit der hydrophilen Kopfgruppe.

Den komplexen Kohlenhydratstrukturen, wie sie zum Beispiel in Glykoproteinen und Glykolipiden vorkommen, kann man spezifische Funktionen zuweisen. So werden Sekret- und Plasmamembranproteine durch spezielle Kohlenhydratmarker an ihr Ziel gebracht. Die Information über den Bestimmungsort ist dabei in der Zuckerstruktur codiert (Stryer, 1990). Zuckerstrukturen spielen auch eine Rolle bei der Zell-Zell-Erkennung und bei der Immunabwehr (Stryer, 1990).

Demgegenüber gibt es jedoch nur wenig Information über die spezifische Funktion der Zucker von einfach gebauten Glykolipiden. Von Glykosylceramiden weiß man, dass sie eine entscheidende Rolle in der Zell-Differenzierung und in Zell-Zell-Interaktionen in tierischen Zellen spielen (Bosio et al., 1998; Yamashita et al., 1999). Intrazellulär sind Glukosylceramide zur Sortierung melanosomaler Proteine in den Golgi-Komplex verantwortlich (Sprong et al., 2001). Sterolglukosid (SG) ist essentiell bei der Degradation von Peroxysomen in Hefen (Oku et al., 2003). Sulfatiertes Galaktosylceramid und sulfatiertes Monogalaktosylalkylacylglycerol (Seminolipid) spielen eine kritische Rolle in der Myelin-Funktion und der Spermatogenese (Honke et al., 2002). Eine komplette Auflistung des Vorkommens und von möglichen Funktionen von Glykoglycerolipiden ist ausführlich an anderer Stelle dargestellt (Mannock et al., 2004).

Das Wissen über die spezifischen Funktionen von Glykolipiden weist jedoch noch große Lücken auf. Ein Weg zur Erkennung dieser spezifischen Funktionen der Glykolipide besteht in der Erzeugung von Mutanten, die in der Synthese eines Glykolipids gestört sind. Untersuchungen der Phänotypen dieser Mutanten sollen dann die Funktionen dieses Lipids erklären. Ein nachfolgender Schritt wäre die Komplementation der Mutante mit alternativen Lipiden. Auf diese Weise kann der Organismus zum Beispiel mit neuen Glykolipiden ausgestattet und so Veränderungen in der Kopfgruppe der Glykolipide vorgenommen werden. Untersuchungen der komplementierten Mutanten können dann Hinweise auf die spezifische Funktion der nativen Lipide geben.

Das Thema dieser Arbeit war, einen Beitrag zur Aufklärung der spezifischen Funktion der Glykoglycerolipide der Membranen von photosynthetisch aktiven Organismen zu leisten. Dieser Beitrag umfasste den Austausch der Galaktolipide in den Thylakoiden durch alternative Glykolipide durch die heterologe Expression bakterieller Glykosyltransferasen.

1.1 Glycerolipide in photosynthetischen Membranen von Chloroplasten und Blaualgen

(Murata et al., 1998; Siegenthaler, 1998; Wada et al., 1998)

Die primären Prozesse der Photosynthese, wie Lichtabsorption, Excitonenleitung, photochemische Reaktionen, Elektronentransport und Synthese von ATP, laufen in den Thylakoiden von Chloroplasten und Blaualgen ab (Murata et al., 1998). Für den Ablauf dieser Prozesse ist ein hoher Grad an molekularer Organisation der beteiligten Komponenten erforderlich. Mehrere an diesen Prozessen beteiligte (Chlorophyll-) Protein-Komplexe sind dabei transmembran eingebettet oder peripher an die Membran gebunden. Die asymmetrische Verteilung dieser Proteinkomponenten verleiht den Thylakoidmembranen spezielle vektorielle Eigenschaften, die für die Konservierung und Umwandlung von Lichtenergie notwendig sind. Eine ebenfalls wichtige Komponente der Thylakoidmembranen sind die Glycerolipide. Die beiden Galaktolipide β -Galaktosyldiacylglycerol (β GalD) und α -Galaktosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galaktosyldiacylglycerol (α Gal β GalD) bilden dabei mit 50 bzw. 30 % den Hauptanteil am Gesamtlipidgehalt der Chloroplastenmembranen (Siegenthaler, 1998). Neben diesen beiden neutralen Glycerolipiden sind noch zwei weitere bei neutralem pH-Wert geladene Glycerolipide von Bedeutung. Das ist einerseits Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQD) mit einem Anteil von 5 % und andererseits Phosphatidylglycerol (PG) mit einem Anteil von 10 % an den Gesamtchloroplastenlipiden. Die Lipidzusammensetzung der Blaualgen ähnelt der Lipidzusammensetzung der Chloroplasten von höheren Pflanzen (Wada et al., 1998). β GalD macht dabei etwas mehr als 50 % aus, die Menge an α Gal β GalD, PG und SQD variiert je nach Lipid-Spezies zwischen 5 und 25 %. Blaualgen synthetisieren zusätzlich das in sehr geringen Mengen detektierbare β -Glukosyldiacylglycerol (β GlcD). Die in anderen Organismen häufig vorkommenden Phospholipide wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Cardiolipin (CL) fehlen in den Thylakoiden der Pflanzen und Blaualgen.

Tabelle 1 Gegenüberstellung der Lipidkomposition von Thylakoidmembranen in Pflanzen und Blaualgen am Beispiel von Spinat und *Synechocystis* (nach Siegenthaler, 1998; Wada et al., 1998).

Lipid	Spinat mol%	<i>Synechocystis</i> mol%
β GalD	52	62
α Gal β GalD	31	14
SQD	5	18
PG	12	6

Alle diese Lipide sind durch eine große Zahl von molekularen Spezies gekennzeichnet. Die Vielfalt liegt dabei in der Länge der Fettsäuren und deren Desaturierungsgrad. Des Weiteren sind die Lipide asymmetrisch sowohl lateral als auch transversal in den Thylakoidmembranen verteilt (Abb. 2). In dieser Hinsicht spielen sie möglicherweise eine spezifische Rolle bei der Photosynthese.

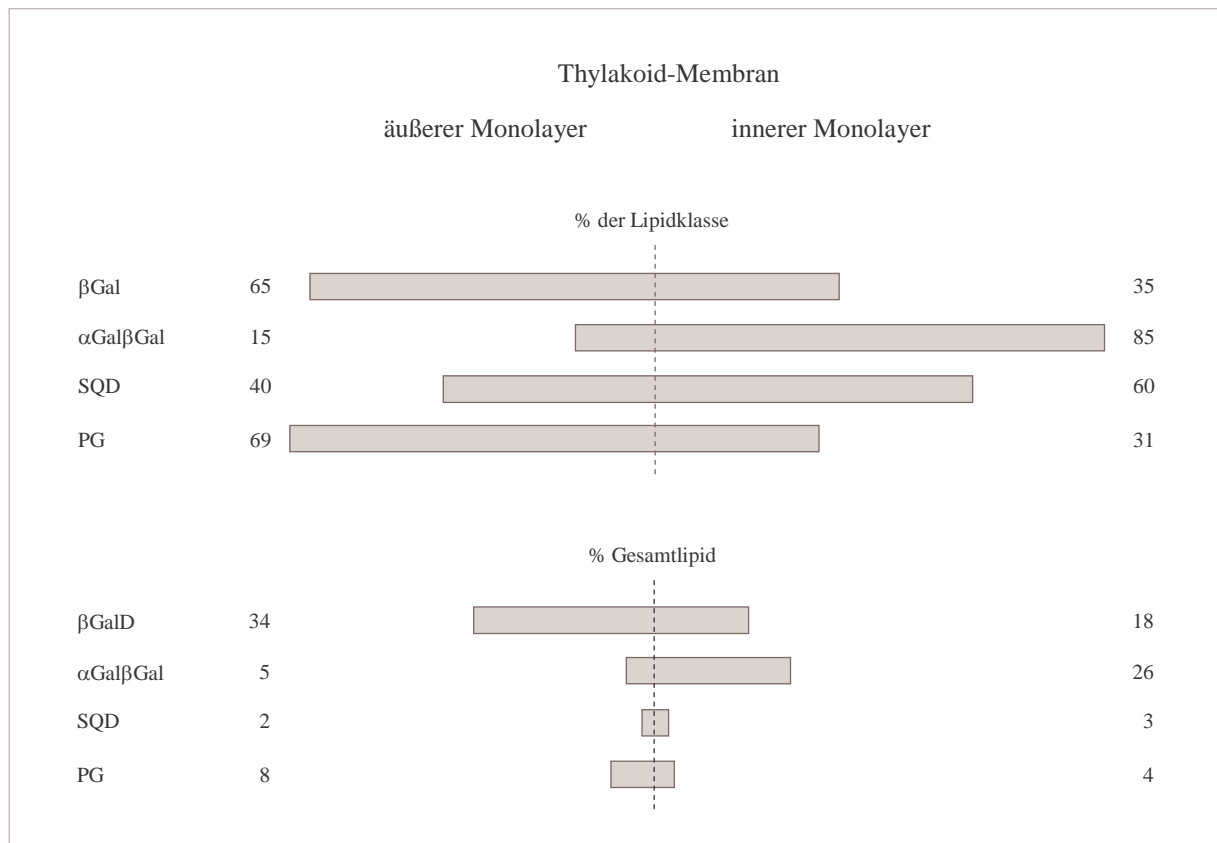


Abb. 2 Lipidzusammensetzung des äußeren und inneren Monolayers der Thylakoidmembran (nach Siegenthaler, 1998). Der Anteil der Lipide in den einzelnen Monolayern ist in mol% des jeweiligen Lipids oder des Gesamtlipidgehalts der Thylakoidmembran angegeben.

Weitere Unterschiede in der Lipidzusammensetzung zeigen sich im Vergleich der verschiedenen Membransysteme der Chloroplasten. Der äußere Envelope ist gekennzeichnet durch einen hohen Anteil an αGalβGalD und einen verminderten Anteil an βGalD. Außerdem findet man hier PC, dessen Herkunft vermutlich extraplastidären Ursprungs ist. Der innere Envelope enthält dagegen anteilmäßig viel βGalD und ist der Lipidzusammensetzung der Thylakoide sehr ähnlich (Siegenthaler, 1998). Durch die große Fläche, die von den Thylakoidmembranen gebildet wird, entfallen etwa 90 % der Chloroplastenlipide auf dieses Membransystem. Die restlichen 10 % verteilen sich auf die Membranen des inneren und äußeren Envelopes. Wichtige Funktionen der Envelope-Membranen sind der Import von Proteinen und Lipiden sowie die Biosynthese der plastidären Glycerolipide.

1.2 Struktur plastidärer Glycerolipide

Bei dem am häufigsten vorkommenden Galaktolipid β GalD (1,2-Diacyl-3-O-[β -D-galaktopyranosyl]-*sn*-glycerol) ist der Galaktoserest in β -anomere Konfiguration an die *sn*-3-Position des Glycerols gebunden.

Die Kopfgruppe des α Gal β GalD (1,2-Diacyl-3-O-[α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-galaktopyranosyl]-*sn*-glycerol) enthält zwei Galaktosereste, wobei die innere Galaktosyl-Untereinheit wie beim β GalD eine β -anomere Struktur besitzt. Der äußere Galaktoserest ist dagegen in einer α -anomeren (1 \rightarrow 6)-Verknüpfung an den inneren Galaktoserest gebunden.

Die Kopfgruppe des SQD (1,2-Diacyl-3-O-[6-desoxy-6-sulfo- α -D-glukopyranosyl]-*sn*-glycerol), bestehend aus einer D-6-Desoxy-glukose mit einem Sulfonsäurerest am C6-Atom, ist in α -anomere Konfiguration an die *sn*-3-Position des Glycerols gebunden.

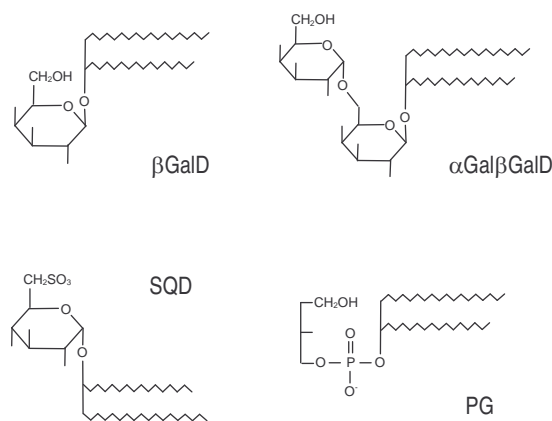


Abb. 3 Schematische Darstellung plastidärer und cyanobakterieller Membranlipide

1.3 Biosynthese von Galaktolipiden in Pflanzen

1.3.1 Lipidvorstufen zur Glycerolipidsynthese mit unterschiedlicher Herkunft

Ein charakteristisches Merkmal der pflanzlichen Galaktolipide ist ihr hoher Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. So kann bei einigen Spezies der Anteil der α -Linolensäure (18:3) bis zu 95 % des Gesamtfettsäuregehalts ausmachen (Whitaker, 1986). Die häufigste Galaktolipidspezies ist daher β GalD mit 18:3-Fettsäuren an der *sn*-1- und der *sn*-2-Position des Glycerols. Es gibt eine Gruppe von Pflanzen, die fast ausschließlich Galaktolipide mit diesem Fettsäuremuster synthetisieren (Heinz, 1977). Daneben findet man eine weitere Gruppe von Pflanzen, die in größeren Mengen Galaktolipide mit 16:3-Fettsäuren synthetisieren (Heinz, 1977). Die Verteilung von 16:3-Fettsäuren ist sehr spezifisch. Diese Fettsäure findet man im β GalD fast ausschließlich an der *sn*-2-Position. Aufgrund dieser Fettsäureverteilung mit 18:3 an *sn*-1 und *sn*-2 oder 18:3 an *sn*-1 und 16:3 an *sn*-2 unterscheidet man zwei Gruppen von Pflanzen, die entweder als 18:3- oder als 16:3-Pflanzen bezeichnet werden. Das Fettsäureprofil der erstgenannten Gruppe ist dabei typisch für eukaryote Lipide; das Fettsäuremuster der zweiten Gruppe hat Ähnlichkeit mit der Fettsäureverteilung von prokaryoten Lipiden, wie zum Beispiel der von Blaualgen mit C-16-Fettsäuren an der *sn*-2-Position (Heinz, 1977). Mit Bezug zu dieser Fettsäureasymmetrie bezeichnet man die Lipide auch als eukaryote bzw. prokaryote Lipide. Abgesehen von β GalD findet man diese unterschiedlichen Fettsäuremuster auch in anderen Chloroplastenlipiden. Dabei ist der Anteil von pro- und eukaryoten Spezies im Vergleich der verschiedenen Lipide sehr variabel. In Spinat hat zum Beispiel die Hälfte des β GalD prokaryote Struktur, in α Gal β GalD hingegen liegt der prokaryote Anteil bei 10-15 % (Bishop et al., 1985). Unterschiede findet man auch bei SQD von höheren Pflanzen, wobei 18:3-Pflanzen fast ausschließlich SQD mit eukaryotem Fettsäuremuster (16:0 an *sn*-1, 18:3 an *sn*-2) und 16:3-Pflanzen SQD mit prokaryotem Fettsäuremuster (16:0 an *sn*-1 und *sn*-2 oder 18:3 an *sn*-1 und 16:0 an *sn*-2) aufweisen (Bishop et al., 1985; Siebertz et al., 1979). Die Vorstufen für die eukaryoten Chloroplastenlipide werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und importiert. PG ist bei allen Pflanzen typisch prokaryotisch mit einer ungewöhnlichen Δ^3 -trans-16:1-Fettsäure an *sn*-2 (Dorne et al., 1989).

Durch diese unterschiedlichen Fettsäuremuster der Chloroplastenlipide wurde nahe gelegt, dass ihr Vorkommen auf verschiedene Biosynthesewege zurückzuführen ist. So gibt es entsprechend der Unterscheidung von eukaryoten und prokaryoten Lipiden einen eukaryoten und einen prokaryoten Syntheseweg. Diese zwei Synthesewege werden verschiedenen Kompartimenten zugeordnet und führen jeweils zur Bildung von Phosphatidsäure (PA). PA des Chloroplasten fließt in den prokaryoten Biosyntheseweg, PA des ER fließt in den eukaryoten Weg. In beiden Fällen ist PA die Vorstufe zur Synthese der prokaryoten und eukaryoten Chloroplastenlipide. Unabhängig von den beiden Biosynthesewegen für PA ist der Ort der Synthese von Fettsäuren das Stroma der Chloroplasten. Die

Biosynthese ist ACP-abhängig unter Beteiligung von mehreren 3-Ketoacyl-ACP-Synthasen (Ohlrogge et al., 1995). Im Stroma findet auch der erste Desaturierungsschritt der ACP-gebundenen 18:0-Fettsäure an C9 durch eine lösliche Stearoyl-ACP-Desaturase statt (Harwood, 1996; Heinz, 1993). Die weitere Verwendung der Fettsäuren hängt nun davon ab, ob sie hydrolysiert und damit als freie Fettsäuren exportiert werden oder in gebundener Form im Chloroplasten bleiben. Die für den Export bestimmten Fettsäuren (hauptsächlich C18) werden durch eine lösliche Acyl-ACP-Thioesterase hydrolysiert. Der Exportmechanismus konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Schon im äußeren Envelope erfolgt die Bildung von Acyl-CoA durch eine Acyl-CoA-Synthetase. Die Fettsäuren stehen somit zur weiteren Glycerolipidbiosynthese außerhalb des Chloroplasten für Acyltransferasen im ER zur Verfügung (Block et al., 1983; Joyard et al., 1977; Joyard et al., 1981).

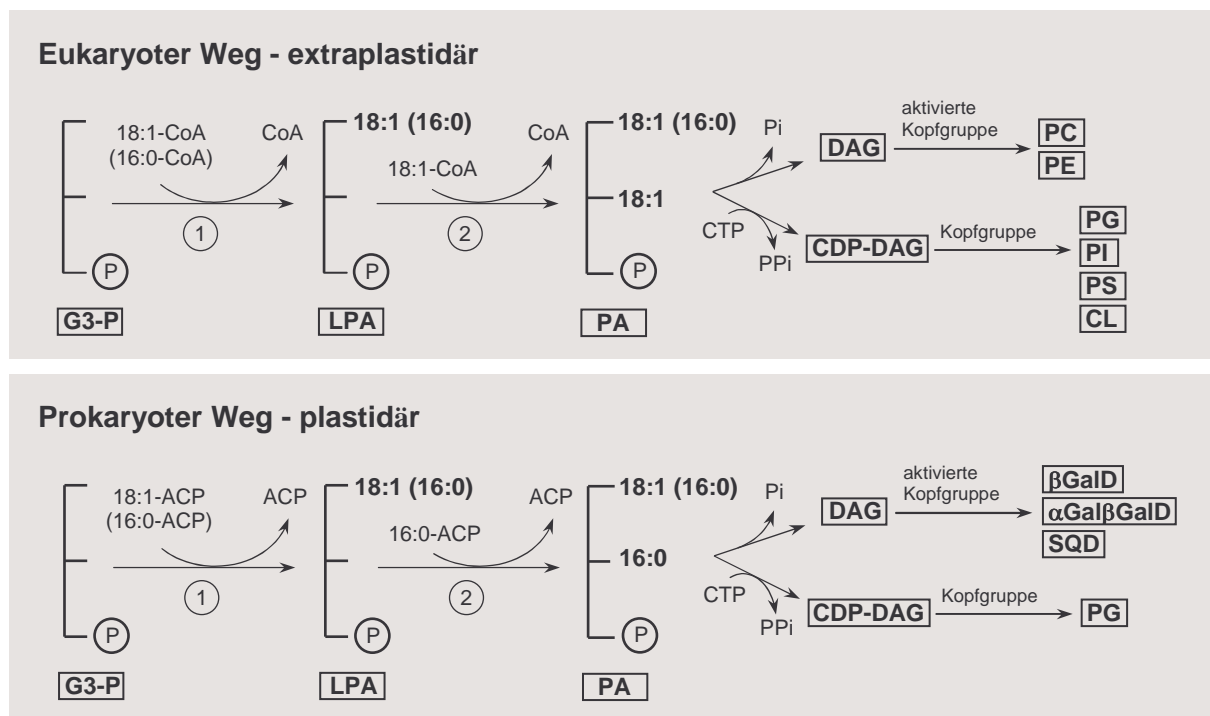


Abb. 4 Eukaryoter und prokaryoter Weg zur Biosynthese von Glycerolipiden (nach Ohlrogge et al., 1995). CDP-DAG, Cytidindiphosphatdiacylglycerol; G3-P, Glycerol-3-phosphat; LPA, Lyso-Phosphatidsäure; PS, Phosphatidylserin.

In den Chloroplasten erfolgt die Glycerolipidbiosynthese durch die Übertragung der ACP-gebundenen Fettsäuren auf Glycerol-3-phosphat (Abb. 4, Reaktion 1). Der Transfer der ersten Fettsäure, in den meisten Fällen 18:1, auf die *sn*-1-Position von Glycerol-3-phosphat (Frentzen et al., 1998; Frentzen et al., 1983) wird durch eine lösliche Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase katalysiert, die mit der inneren Envelope-Membran assoziiert ist (Joyard et al., 1977). Das daraus resultierende Produkt, lyso-PA, wird durch eine Envelope-gebundene Acylglycerol-3-phosphat-Acyltransferase (Joyard et al., 1977) mit einer weiteren Fettsäure an der *sn*-2-Position verestert (Abb. 4, Reaktion 2) (Frentzen et al., 1998; Frentzen et al., 1983). Dieses Enzym ist spezifisch für 16:0-Fettsäuren. Es entsteht PA mit einer

prokaryotischen Struktur, mit 18:1 an *sn*-1 und 16:0 an *sn*-2. Des Weiteren wird in geringen Mengen PA mit 16:0 an beiden *sn*-Positionen gebildet, das in die Synthesewege von SQD und PG mündet.

PA ist nun die Vorstufe zur Synthese von prokaryotem PG (Andrews et al., 1985) und zur Bildung von Diacylglycerol (DAG). Letzteres entsteht durch Dephosphorylierung durch eine membrangebundene PA-Phosphatase (Joyard et al., 1977; Joyard et al., 1979). Die Aktivität der PA-Phosphatase in 18:3-Pflanzen ist sehr schwach (Heinz et al., 1983) und kann daher nicht genug DAG bereitstellen, um mit der vollen Syntheserate der Glycerolipide in den Chloroplasten mithalten zu können. Das könnte die Erklärung sein, warum 18:3-Pflanzen so wenig prokaryote Galakto- und Sulfolipide enthalten. Ob die niedrige Aktivität an der niedrigen Expression liegt oder durch andere Regulationsmechanismen bedingt ist, kann zurzeit nicht beantwortet werden.

1.3.2 Galaktolipid-Biosynthese, Lokalisation der Enzyme und „Lipid-Trafficking“

Die Biosynthese der beiden Galaktolipide β GalD und α Gal β GalD vollzieht sich in den Envelope-Membranen der Chloroplasten. Da die Vorstufen dieser Lipide in verschiedenen Kompartimenten synthetisiert werden (ER, innere und äußere Envelope-Membranen), ist ein koordinierter intra- und interorganeller Transport der beteiligten Lipide und Vorstufen erforderlich. Für die Biosynthese unterschiedlicher Galaktolipidspezies sind verschiedene Galaktolipid-Synthasen mit unterschiedlicher Lokalisation und Spezifität verantwortlich.

Die β GalD-Synthase ist verantwortlich für die Synthese von β GalD, indem durch eine UDP-Gal-abhängige Reaktion der Transfer von Galaktose auf DAG katalysiert wird (Miège et al., 1999; Shimojima et al., 1997). Inzwischen wurden mehrere β GalD-Synthasen aus verschiedenen Pflanzen (Gurke, Spinat, *Arabidopsis*) kloniert und charakterisiert (Awai et al., 2001; Jorasch et al., 2000; Miège et al., 1999; Shimojima et al., 1997), wobei verschiedene Isoformen innerhalb einer Spezies auftreten können. So konnten bei *A. thaliana* drei β GalD-Synthasen (MGD1, MGD2, MGD3) identifiziert werden (Awai et al., 2001; Jorasch et al., 2000). Daraus kann man schließen, dass auch andere Pflanzen mehrere β GalD-Synthasen kodieren können. Die verschiedenen Isoformen werden aufgrund von Unterschieden in ihrem N-terminalen Bereich in zwei Gruppen eingeteilt. MGD1 aus *Arabidopsis* sowie die β GalD-Synthasen aus Gurke und Spinat gehören zum Typ A; MGD2 und MGD3 aus *A. thaliana* sind Enzyme des Typs B. MGD1 ist durch ein N-terminales Chloroplasten-Leaderpeptid mit einer Länge von etwa 100 Aminosäuren ausgestattet (Awai et al., 2001; Miège et al., 1999; Shimojima et al., 1997). Dieses Leaderpeptid ist wichtig für den Import des Enzyms in die Chloroplasten und wird nach dem Import durch eine Peptidase abgespalten. MGD2 und MGD3 zeigen ein kürzeres N-terminales Peptid mit etwa 40 Aminosäuren, für das aber keine Funktion im Sinne eines Chloroplasten-Leaderpeptids nachgewiesen werden konnte (Awai et al., 2001). Für den Import in die Chloroplasten ist allein die Proteinstruktur von MGD2 und MGD3 ausreichend.

Durch die Untersuchung einer „Knock out“-Mutante konnte gezeigt werden, dass MGD1 den Hauptanteil des plastidären β GalD synthetisiert und bevorzugt im prokaryoten Weg aktiv ist (Jarvis et al., 2000). Dieses Enzym weist auch *in vitro* die höchste Aktivität im Vergleich zu den beiden anderen β GalD-Synthasen auf (Awai et al., 2001). Für die bevorzugte Aktivität im prokaryoten Weg spricht die Lokalisation im inneren Envelope mit prokaryotem DAG als Substrat. Dieses Enzym selektiert aber nicht zwischen prokaryotem oder eukaryotem DAG. MGD2 und MGD3 sind im äußeren Envelope lokalisiert und haben Zugang zu eukaryotem DAG, wobei sie für diese Spezies eine höhere Affinität aufweisen als für prokaryotes DAG (Awai et al., 2001). Im Gegensatz zu MGD1 ist die Expression dieser beiden Enzyme zum größten Teil auf nicht-grüne Organe oder auf bestimmte Entwicklungsstadien beschränkt. Bei Phosphatmangel ist jedoch ihre Aktivität erhöht, während sich unter diesen Bedingungen die Aktivität von MGD1 kaum verändert (Awai et al., 2001).

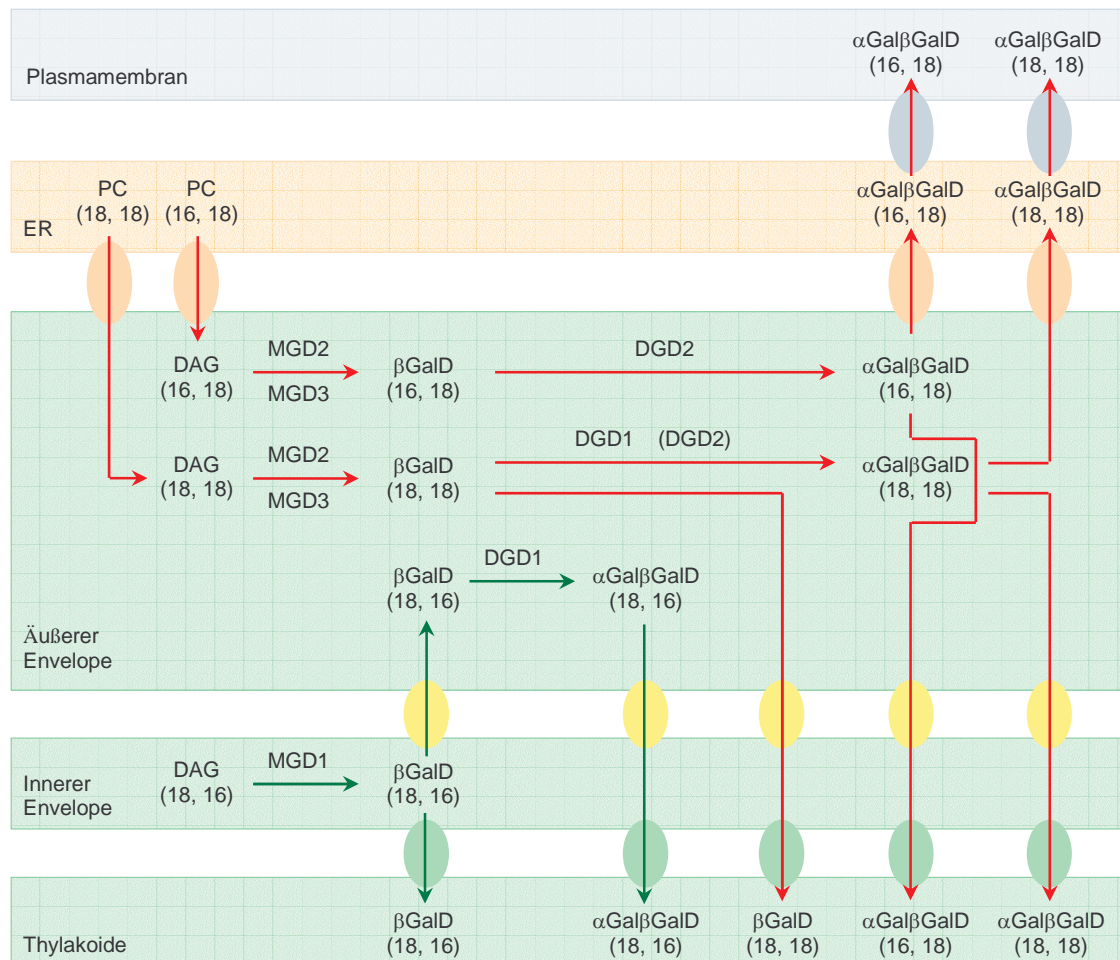


Abb. 5 Schematische Darstellung der Biosynthesewege von β GalD und α Gal β GalD in *Arabidopsis* (modifiziert nach Kelly et al., 2004). Die Synthese von β GalD erfolgt im inneren und äußeren Envelope mit Lipidvorstufen aus dem prokaryoten und eukaryoten Weg. α Gal β GalD wird nur im äußeren Envelope hauptsächlich aus Vorstufen aus dem ER synthetisiert. Grüne und rote Pfeile repräsentieren den prokaryoten und eukaryoten Syntheseweg. Die Nummern in Klammern stehen für die Kettenlänge der Fettsäuren an *sn*-1 und *sn*-2 des Glycerols. Die Ovale zwischen den verschiedenen Membranen sollen Transportvorgänge symbolisieren, die noch weitgehend unverstanden sind.

Für den zweiten Galaktosylierungsschritt bei der Biosynthese von α Gal β GalD wurden lange Zeit mehrere Alternativen diskutiert. Eine Serie von *in vitro*-Versuchen führten zum Postulat einer galaktolipidabhängigen prozessiven Galaktolipid:Galaktolipid-Galaktosyltransferase. Dieses Enzym überträgt dabei den Galaktoserest von β GalD auf ein zweites Molekül β GalD und synthetisiert somit höher-glykosylierte Galaktolipide (Heemskerk et al., 1990; van Besouw et al., 1978; Xu et al., 2003). Bisher konnte aber die Aktivität dieser Galaktosyltransferase weder *in vivo* nachgewiesen (Cline et al., 1983; Dorne et al., 1982; Kelly et al., 2003) noch das entsprechende Gen kloniert werden. Daher ist der Beitrag dieses Enzyms zur Galaktolipid-Biosynthese weiterhin nicht geklärt.

Erste Erfolge zur Aufklärung der Biosynthese von α Gal β GalD ergaben sich mit der Identifizierung einer *Arabidopsis*-Mutante mit stark reduziertem α Gal β GalD-Anteil. Es gelang, das inaktivierte Gen zu isolieren und als α Gal β GalD-Synthase (DGD1) zu charakterisieren (Dörmann et al., 1999; Dörmann et al., 1995). Außerdem konnte durch Sequenzähnlichkeit mit DGD1 eine zweite α Gal β GalD-Synthase (DGD2) identifiziert werden (Kelly et al., 2002). Beide Enzyme katalysieren in einer UDP-Gal-abhängigen Reaktion die Galaktosylierung von β GalD (Kelly et al., 2002; Kelly et al., 2003). DGD1 synthetisiert mit 90 % den Hauptanteil von α Gal β GalD, während der Rest auf die Aktivität von DGD2 zurückzuführen ist. Diese DGD2-Aktivität erhöht sich allerdings unter bestimmten Wachstumsbedingungen. So wird bei Phosphatmangel in größeren Mengen extraplastidäres α Gal β GalD synthetisiert, um Phospholipide durch Glykolipide zu ersetzen (Härtel et al., 2000; Kelly et al., 2002). Beide Enzyme sind in der äußeren Envelope lokalisiert. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrem N-terminalen Teil. DGD1 ist mit einem Leaderpeptid ausgestattet, das für die Insertion in die äußere Chloroplastenmembran erforderlich ist (Froehlich et al., 2001). DGD2 besitzt ein kurzes N-terminales Peptid mit unbekannter Funktion.

Die Biosynthese der Galaktolipide und deren Vorstufen erfolgt in mehreren subzellulären Kompartimenten. Für den dafür erforderlichen Lipidtransport zwischen den verschiedenen inter- und intraorganellen Membransystemen gibt es derzeit nur Vermutungen. So wurde vorgeschlagen, dass DGD1 am Lipidtransport zwischen innerem und äußerem Envelope beteiligt ist (Dörmann et al., 2002; Dörmann et al., 1999). Am Weitertransport zu den Thylakoiden könnte ein Protein (vesicle-inducing protein in plastids 1, VIPP1) beteiligt sein, das die Bildung von Membran-Vesikeln im Stroma des Chloroplasten initiiert, mit denen der Lipidtransport dann erfolgen kann (Kroll et al., 2001). Die schwierigste Frage betrifft jedoch den Austausch der Lipidvorstufen zwischen ER und Chloroplast und den Export von α Gal β GalD in extraplastidäre Membranen. Es wird angenommen, dass es zu Membraninteraktionen der verschiedenen Organellen kommt und die Membranflächen dabei in Kontakt zueinander treten (Kelly et al., 2004). Es gibt Hinweise für die Existenz eines Lipidtransportkomplexes in der äußeren Envelope-Membran des Chloroplasten. Ist dessen Funktion

gestört, werden im Chloroplasten nur noch Lipide mit prokaryoter Struktur synthetisiert (Xu et al., 2003).

Als Vorstufen für eukaryotes DAG zur Synthese von eukaryoten Galaktolipiden und SQD werden vermutlich Phosphatidylcholin (PC) und lyso-PC angesehen, die aus dem ER in die Chloroplasten importiert werden müssen (Mongrand et al., 2000).

Die Desaturierung der Fettsäuren der plastidären Glycerolipide erfolgt durch lipidgebundene Desaturasen (Heinz, 1993).

1.3.3 Galaktolipid-Biosynthese in Blaualgen

(Wada et al., 1998)

Blaualgen sind Gram-negative Bakterien, die aufgrund ihrer Morphologie in zwei Gruppen von einzelligen und filamentösen Stämmen eingeteilt werden. Die Membranen der Blaualgen sind denen der Chloroplasten von Pflanzen und Algen mit innerer und äußerer Envelope-Membran und Thylakoidmembranen strukturell ähnlich. Der Envelope von Blaualgen besteht aus einer äußeren Membran und der Cytoplasmamembran, getrennt durch eine Peptidoglykanschicht. Die Zellen enthalten außerdem intrazelluläre Membranen, die auch hier als Thylakoide bezeichnet werden. Cyanobakterien betreiben in ähnlicher Weise wie die Pflanzen oxygene Photosynthese. Auch ihre Lipidzusammensetzung ähnelt der Lipidzusammensetzung der Chloroplasten. Es treten jedoch einige Unterschiede in der Biosynthese der cyanobakteriellen Membranlipide auf.

Blaualgen enthalten in geringen Mengen β GlcD, das bei Pflanzen nicht vorkommt (Feige et al., 1980; Sato et al., 1982). Es macht nur 1 % der Gesamtglycerolipide aus, kann aber bei *Synechocystis* unter photoheterotrophen Bedingungen in Anwesenheit von Glukose auf bis zu 12 % ansteigen (Sato, 1994). β GlcD wird durch den Transfer von Glukose auf DAG in einer UDP-Glukose-abhängigen Reaktion synthetisiert. Diese UDP-Glukose:DAG-Glukosyltransferase-Aktivität wurde sowohl in den Thylakoid- als auch in den Plasmamembranen gefunden (Omata et al., 1986). β GlcD wird anschließend in einer stereochemischen Isomerisierung am C4-Atom der Glukose durch eine Epimerase in β GalD umgewandelt (Sato et al., 1982). α Gal β GalD wird durch Transfer von Galaktose auf β GalD synthetisiert, wobei der Donator nicht bekannt ist.

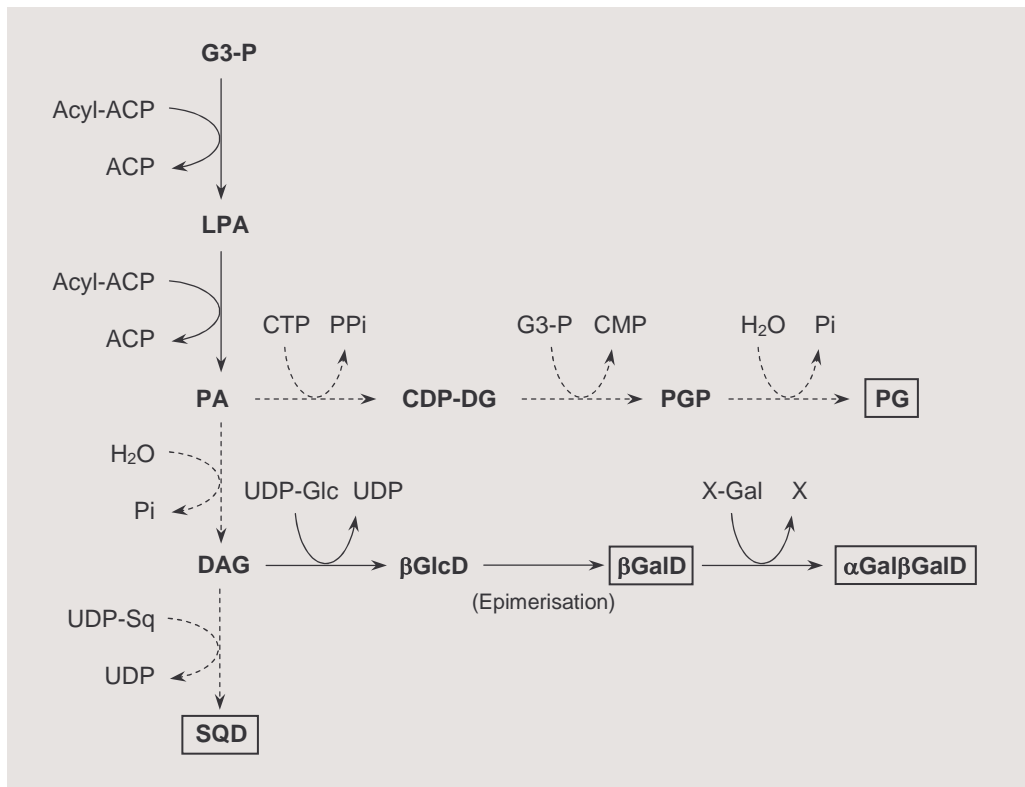


Abb. 6 Schema zur Synthese von Glycerolipiden in Blaualgen (nach Wada et al., 1998). Durchgehende Pfeile repräsentieren Reaktionen, die biochemisch belegt sind. Gestrichelte Pfeile stehen für Reaktionen, die aufgrund des Vorkommens entsprechender Gene in *Synechocystis* angenommen werden. UDP-Sq, UDP-Sulfoquinovose; CDP-DAG, Cytidindiphosphat-DAG; G3-P, Glycerol-3-phosphat; LPA, lyso-PA; PGP, Phosphatidylglycerol-3-phosphat.

Aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung wurden Cyanobakterien in vier Gruppen eingeteilt (Kenyon, 1972; Kenyon et al., 1972). Die erste Gruppe enthält gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren (z. B. *Synechococcus*); die übrigen Gruppen enthalten zusätzlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die für jede Gruppe charakteristisch sind. Wie oben schon angesprochen, sind die meisten molekularen Spezies der Blaualgen-Glycerolipide dadurch gekennzeichnet, dass eine C18-Fettsäure an der *sn*-1-Position und eine C16-Fettsäure an der *sn*-2-Position des Glycerols verestert ist (Heinz, 1977).

Die Acyltransferasen der Blaualgen sind denen der Chloroplasten ähnlich. Dabei ist die Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase spezifisch für C18-Fettsäuren und die Monoacylglycerol-3-phosphat-Acyltransferase spezifisch für C16-Fettsäuren (Lem et al., 1984). Die Synthese der Fettsäuren erfolgt durch Fettsäure-Synthasen mit ACP als Co-Faktor (Stumpf, 1987).

Die Desaturierung der Fettsäuren findet ausschließlich in lipidgebundener Form durch verschiedene Desaturasen statt (Wada et al., 1998), wobei die erste Doppelbindung durch eine $\Delta 9$ -Desaturase eingefügt wird (Sakomoto et al., 1994).

1.4 Funktion von Galaktolipiden

Die lamellare Organisation von biologischen Membranen stellt eine strukturelle Matrix zur Insertion und Assoziation der verschiedenen Proteine bereit und kontrolliert die Permeabilität von organischen Molekülen, Wasser und Ionen. Das Funktionieren dieser Membranen erfordert ein kritisches Verhältnis verschiedener Lipide mit speziellen Eigenschaften. In photosynthetischen Membranen von Chloroplasten und Blaualgen sind die beiden Galaktolipide β GalD und α Gal β GalD die häufigsten Lipide. Alleine schon ihre Dominanz begründet die primäre Funktion dieser Lipide bei der Bildung dieser Matrix als Stellfläche für Proteine. Darüber hinaus scheinen sie auch spezifischere Funktionen zu erfüllen. Diese spezifischen Funktionen betreffen die Photosynthese, den Import von Proteinen und die Anpassung an bestimmte Stress-Situationen.

1.4.1 Strukturelle Matrix und Bilayer-destabilisierende Eigenschaften von β GalD

Die Lipide in biologischen Membranen sind in einer Lamellar- oder Bilayer-Struktur organisiert. Unter bestimmten Bedingungen können aber Phasenübergänge mit der Bildung nicht-lamellarer Strukturen auftreten. Im Folgenden sind einige Hauptstrukturen dargestellt, die Chloroplastenlipide bilden können.

- Lamellare flüssig-kristalline (L_α) Phase
- Lamellare Gel- (L_β) Phase
- Revers-hexagonale (H_{II}) Phase

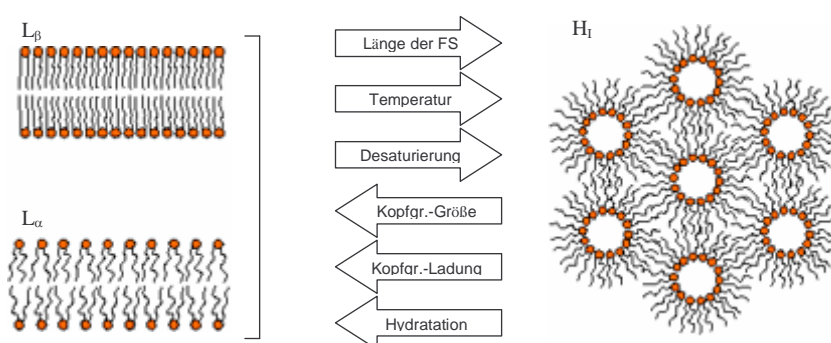


Abb. 7 Schematische Darstellung verschiedener Strukturen von Lipidphasen (modifiziert nach Bruce, 1998). Die beiden lamellaren Phasen L_β (Gelphe) und L_α (flüssigkristalline Phase), die unter bestimmten Bedingungen ineinander übergehen können, werden von Bilayer-stabilisierenden Lipiden (α Gal β GalD, SQD und PG) gebildet. Die hexagonale Phase H_{II} wird von Bilayer-destabilisierenden Lipiden (β GalD) bevorzugt. In den Pfeilen sind Faktoren angegeben, die durch Erhöhung zu Phasenübergängen in die angegebene Pfeilrichtung führen können (Rilfors et al., 1984).

β GalD ist ein Bilayer-destabilisierendes Lipid, das in Wasser unter bestimmten Bedingungen keine lamellaren Strukturen, sondern Micellen oder röhrenähnliche Strukturen ausbildet, wobei die polare Kopfgruppe nach innen zeigt. Dieser Zustand wird als revers-hexagonale (H_{II}) Phase bezeichnet und tritt bei Raumtemperatur auf. Je nach Fettsäuren erfolgt bei Abkühlung unter 0 °C der Phasenübergang in die lamellare Gel-Phase (L_{α}) (Shipley et al., 1973).

Eine Erklärung für die Bildung verschiedener Phasen liefert zum Beispiel das Konzept von der molekularen Gestalt von Lipiden (Israelachvili, 1992; Israelachvili et al., 1980). Nach diesem Konzept bilden konisch geformte Moleküle eine H_{II} -Phase, Lipide mit einem zylindrischen Aussehen formen Bilayer bzw. L_{α} -Phasen. Die molekulare Form des Lipids ist dabei abhängig vom Verhältnis zwischen der Größe der polaren Kopfgruppe und der Länge und dem Sättigungsgrad der Acyl-Ketten. Dieses Konzept erklärt, warum β GalD mit seiner kleinen Kopfgruppe und den langen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine konische Gestalt annimmt und daher eine H_{II} -Phase bildet. α Gal β GalD mit seiner größeren Kopfgruppe nimmt dagegen eine eher zylindrische Form an und bildet daher eine L_{α} -Phase in Wasser. Weiterhin bilden SQD, PG und höher-glykosylierte Glykosyldiacylglycerole (Curatolo, 1987) hauptsächlich L_{α} -Phasen und sind damit zusammen mit α Gal β GalD Bilayer-stabilisierende Lipide.

Die meisten Membranen enthalten mindestens ein Lipid, das in Wasser nicht-lamellare Phasen bildet. Das ist zum Beispiel PE im ER oder β GalD im Chloroplasten-Envelope und in den Thylakoiden (Cullis et al., 1979). Diese Bilayer-destabilisierenden Lipide sind dabei in großer Zahl vertreten und können mehr als die Hälfte des Gesamtlipidgehalts in diesen Membranen ausmachen. Die Fähigkeit dieser Membranen, trotz des hohen Anteils an Bilayer-destabilisierenden Lipiden lamellare Strukturen auszubilden, hängt daher stark von der Interaktion mit Proteinen ab, die durch ihre Integration eine Bilayer-Struktur erzwingen (Simidjiev et al., 2000). Dieser hohe Anteil an Bilayer-destabilisierenden Lipiden ist wichtig, um die Stabilität der Membran in einem kritischen Grenzbereich zu halten (Gounaris et al., 1983; Rietveld et al., 1995) und damit den Ablauf von biologischen Prozessen in der Membran zu ermöglichen (Wikström et al., 2004). Diese biologischen Prozesse umfassen zum Beispiel die Abschnürung von Vesikeln zum Lipidtransport, die Fusion von Membranen (Selstam, 1998) und die Insertion von Leaderpeptiden (siehe unten). Außerdem ist die Organisation der Thylakoide mit den gekrümmten Membranstrukturen auf den hohen Gehalt von β GalD zurückzuführen. Untersuchungen an dem zellwandlosen Bakterium *Acholeplasma laidlawii* zeigten, dass die Biosynthese des Bilayer-stabilisierenden α -Glukosyldiacylglycerols (α GlcD) und des Bilayer-destabilisierenden Diglukosyldiacylglycerols streng reguliert wird (Berg et al., 2001; Vikström et al., 2000). Ob ein ähnlicher Regulationsmechanismus in Pflanzen existiert, ist nicht klar.

Abschließend sei jedoch bemerkt, dass die gerade besprochenen Eigenschaften nicht die Notwendigkeit spezifischer Zucker-Kopfgruppen begründen. So ist zum Beispiel nicht klar, warum in

den plastidären Glykolipiden Galaktose in der Kopfgruppe enthalten ist. Es stellt sich die Frage, ob nicht das epimere β GlcD, das ebenfalls Bilayer-destabilisierende Eigenschaften besitzt, diese Funktionen genauso gut erfüllen könnte.

1.4.2 Proteinimport

Der Chloroplast als semi-autonomes Organell ist in der Lage, einen Teil seiner Proteine selbst zu synthetisieren. Die meisten der Chloroplastenproteine werden jedoch im Cytosol als Präproteine synthetisiert und müssen posttranslational importiert werden. Viele dieser Proteine haben dabei eine N-terminale Verlängerung, ein so genanntes Chloroplasten-Leaderpeptid, das für den Proteinimport in den Chloroplasten verantwortlich ist. Im Inneren des Chloroplasten erfolgt dann eine Prozessierung des Präproteins zu dem reifen Protein durch Abspaltung des N-terminalen Leaderpeptids. Die Informationen zum Import sind dabei im Leaderpeptid und zum Teil auch im reifen Protein selber kodiert. Die verschiedenen Ziele der unterschiedlichen Proteine sind innere und äußere Envelope-Membran, Thylakoidmembran, Chloroplasten-Stroma und Thylakoid-Lumen (Keegstra et al., 1999). Je nach Bestimmungsort gibt es unterschiedliche Formen von „Targeting-Signalen“.

Leaderpeptid mit „Stroma-Targeting-Domäne“	→	Stroma
Leaderpeptid mit „Stroma-Targeting-Domäne“ + Information im reifen Protein	→	Thylakoid- oder innere Envelope-Membran
Leaderpeptid, das nicht abgespalten werden kann	→	äußere Envelope-Membran
zweites „Targeting-Signal“ (wird abgeschnitten)	→	Thylakoid-Lumen

Die verschiedenen Leaderpeptide zeigen kaum Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz und weisen keine offensichtlichen Konsensusmerkmale auf. Sie variieren beträchtlich in ihrer Länge und zeigen auch keine regelmäßigen sekundären oder tertiären Strukturen und werden deshalb auch als flexible Peptide bezeichnet (von Heijne et al., 1991).

Der Transport über die Envelope-Membran vollzieht sich in drei Stufen. Im ersten Schritt assoziiert das Präprotein reversibel mit dem Plastiden, vermutlich durch Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionen. In einem zweiten Schritt kommt es zu einer stabilen Assoziation mit der Import-Maschinerie. Im dritten Schritt erfolgt die komplette Translokation des Präproteins mit der Akkumulation der prozessierten Form im Inneren des Chloroplasten (Keegstra et al., 1999; Soll et al., 2004). Für Bindung und Import sind viele Proteinkomponenten erforderlich.

Der Chloroplast ist das einzige Organell, dessen Membranen auf der cytosolischen Seite β GalD und α Gal β GalD exponieren. Außerdem hat die äußere Envelope-Membran einen sehr hohen Lipid/Protein Anteil von 3,0 (Block et al., 1983). Diese speziellen Eigenschaften sind somit einzigartig und daher möglicherweise von Bedeutung für den Proteinimport in den Chloroplasten. In Modellsystemen mit Lipid-Bilayern oder Monolayern wurde beobachtet, dass Transitpeptide von Chloroplasten-Präproteinen spezifisch in Membranen inserieren, die Lipide des äußeren Chloroplasten-Envelopes enthalten (Pinnaduwege et al., 1996; van 't Hof et al., 1991; van 't Hof et al., 1993). Dabei wurde in Experimenten mit synthetischen Transitpeptiden (oder Fragmenten von diesen) von Ferredoxin und der kleinen Untereinheit der RUBISCO gezeigt, dass diese in Monolayer inserieren, die β GalD, SQD oder PC enthalten (van 't Hof et al., 1991; van 't Hof et al., 1993). Außerdem kann das künstliche Präprotein der kleinen Untereinheit der RUBISCO nur in Anwesenheit von β GalD mit künstlichen Liposomen interagieren (Pinnaduwege et al., 1996). Die höchste Aktivität wurde dabei bei einem β GalD-Gehalt von 20 % beobachtet. Dies war auch der maximale Anteil zur Erzeugung eines stabilen Bilayers und entspricht ungefähr dem Anteil von β GalD im äußeren Envelope. Für den Transport von Proteinen könnte also auch die Bilayer-destabilisierende Natur des β GalD von Bedeutung sein.

Abgesehen von diesen Modellsystemen wurde *in vivo* nur bei *E. coli* ein Zusammenhang zwischen Proteintransport und Lipidzusammensetzung der Plasmamembran gezeigt. Mutanten mit Defekten in der PE- und PG-Synthese zeigten einen gestörten Proteinexport, was als direkter Beweis für die Beteiligung von Phospholipiden im Plasmamembrantransport in *E. coli* gilt (Rietveld et al., 1995).

Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der Galaktolipide für den Proteinimport ist die *dgd1*-Mutante von *Arabidopsis* mit stark reduziertem α Gal β GalD-Gehalt (Dörmann et al., 1995). Die Chloroplasten dieser Mutante sind zwar in der Lage, Proteine des äußeren Envelopes zu importieren, zeigen aber Defekte beim Import von Präproteinen in das Innere des Chloroplasten.

Diese Experimente haben gezeigt, dass Interaktionen mit Lipiden, speziell auch mit Galaktolipiden, offensichtlich beim Import von Präproteinen in die Chloroplasten von Bedeutung sind.

1.4.3 Photosynthese

Die oxygene Photosynthese spielt sich in den Thylakoiden der Chloroplasten und Blaualgen ab (Siegenthaler, 1998). Diese unterscheidet sich in mehreren Merkmalen von der anoxygenen Photosynthese bei Bakterien vor allem in Bezug auf den Elektronendonator (H_2O), die Freisetzung von molekularem Sauerstoff sowie die Lichterntekomplexe.

An der oxygenen Photosynthese sind die zwei großen Protein-Cofaktor-Komplexe Photosystem II (PSII) und Photosystem I (PSI) beteiligt, die in der Thylakoidmembran eingebettet sind und in Serie arbeiten. PSII besteht aus Lichtsammel-Komplexen (LHCII), dem Reaktionszentrum und dem

wasseroxidierenden Komplex (WOC). Durch eine Lichtreaktion werden dabei die Elektronen von Wasser über mehrere Zwischenschritte (Mn-Zentrum, Z, P680, Ph, Q_A , Q_B) letztendlich auf Plastochinon übertragen. Dieser Prozess liefert Elektronen und Protonen und setzt Sauerstoff frei. Die Elektronen werden zum Cytochrom-b/f-Komplex geleitet, der zum Aufbau eines Protonengradienten beiträgt, und fließen dann weiter über Plastocyanin zum PSI. Auch PSI besitzt einen Lichtsammel-Komplex (LHCI) und wird durch Licht angeregt, wobei die Elektronen über mehrere Zwischenschritte (A_0 , A_1 , Fe-S-Proteine, Fd, Fp) zur Reduktion von $NADP^+$ verwendet werden.

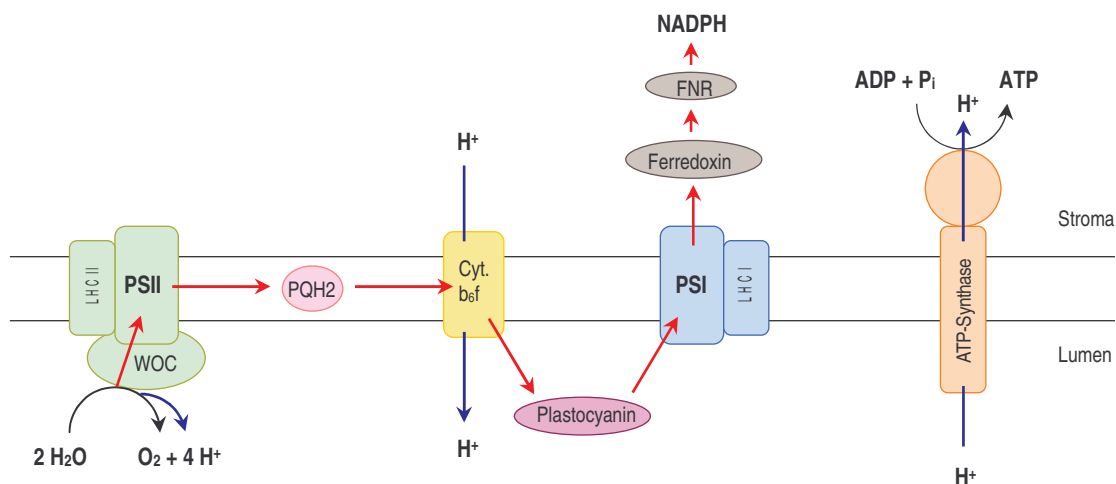


Abb. 8 Schematische Darstellung der Komponenten der Photosynthese und des Elektronenflusses (modifiziert nach Dörmann et al., 2002). Rote Pfeile symbolisieren den Weg der Elektronen über die verschiedenen Protein-Komplexe in der Thylakoidmembran, blaue Pfeile markieren den Weg der Protonen; PQH2, reduziertes Plastochinon; FNR, Ferredoxin- $NADP^+$ -Reduktase.

Die Aufgabe der Membran bzw. der Lipide ist dabei die Bereitstellung der Matrix zur Einbettung dieser Prozesse (Aufbau einer elektrochemischen Potentialdifferenz).

Die Erfüllung dieser Aufgaben erklärt aber nicht die spezielle Lipidzusammensetzung der Thylakoidmembranen und den hohen Anteil an β GalD und α Gal β GalD. Man darf annehmen, dass diese Galaktolipide auch eine spezifische Funktion bei der Photosynthese erfüllen, die möglicherweise von den entsprechenden Lipiden mit alternativen Zucker-Kopfgruppen nicht erfüllt werden kann. So betreiben Blaualgen einen höheren Aufwand zur Synthese von β GalD, indem sie zuerst β GlcD synthetisieren und dies dann in einem zweiten Schritt zu β GalD epimerisieren.

Eine spezielle Eigenschaft der Thylakoidmembranen ist ihr hoher Proteinanteil. Viele der darin enthaltenen Proteinkomplexe bilden Superkomplexe (Kirchhoff et al., 2002), wobei die Proteinfläche 70 % der Gesamtmembranfläche einnimmt. Der Rest der Fläche von 30 % besteht aus Lipiden, die jedoch zu 60 % in einer Art Solvatisierungshülle an diese Proteinkomplexe gebunden und daher in

ihrer Bewegungsfreiheit stark eingeschränkt sind. Die Lipide sind dabei wichtig, um die Proteinkomplexe durch nicht-kovalente, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zu stabilisieren (Páli et al., 2003). Somit sind diese Lipide nicht nur passive Komponenten, sondern sie spielen auch eine spezifischere Rolle jenseits ihrer Funktion als Matrix in Bilayer-Membranen.

Einen Hinweis auf die funktionelle Rolle der Membranlipide und Lipid-Protein-Interaktionen können Kristallstrukturen geben. Viel versprechend sind dabei Studien von fest gebundenen Lipiden, die weniger mobil sind und mit Proteinen co-kristallisieren.

Rhodobacter sphaeroides ist zwar ein Bakterium mit anoxygener Photosynthese und zeigt nicht die typische Lipidzusammensetzung der Chloroplasten und Blaualgen (Benning, 1998). Dennoch sind die Aussagen zur Kristallstruktur des bakteriellen Reaktionszentrums möglicherweise in der Hinsicht allgemeingültig, dass eine spezielle Lipidstruktur erforderlich ist, um bestimmte Funktionen zu erfüllen. Der photosynthetische Proteinkomplex von *R. sphaeroides* kristallisierte unter anderem mit den drei Lipiden CL, PC und Glukosylgalaktosyldiacylglycerol (Camara-Artigas et al., 2002). Diese Lipide befinden sich an der Oberfläche und interagieren mit hydrophoben Aminosäuren. PC und das Glykolipid sind dabei in engem Kontakt mit den Co-Faktoren und haben möglicherweise Einfluss auf die unterschiedliche Energetik des Elektronentransports über die beiden Zweige der Co-Faktoren. Die unterschiedliche Energetik ist primär für die Asymmetrie im Elektronentransfer verantwortlich. Diese Studie zeigt, dass die beteiligten Membranlipide kritisch für die Funktion des bakteriellen Reaktionszentrums von *R. sphaeroides* sind.

Die Kristallstruktur des PSI von Blaualgen zeigt die Assoziation von drei Phospholipid-Molekülen und einem β GalD-Molekül mit diesem Komplex. Es handelt sich dabei um integrale Lipide, die wichtig sind für die Funktion des PSI (Jordan et al., 2001). Spezifische Lipid-Protein-Interaktionen wurden auch in kristallisierten LHCII-Komplexen von Pflanzen festgestellt (Nussberger et al., 1993). Die Bildung von 2-dimensionalen oder 3-dimensionalen Kristallen erfolgte nur in Gegenwart von α Gal β GalD. Dieses Lipid bindet an den isolierten Komplex, kann aber durch milde Detergenzien leicht wieder entfernt werden. PG bindet stärker und ist direkt an der Bildung von trimeren LHCII-Komplexen beteiligt. Beide Lipide sind somit von Bedeutung für die Kristallisation und die strukturelle Integrität des LHCII-Komplexes.

Mit immunologischen Methoden wurde nachgewiesen, dass β GalD an den Kernkomplex des PSI von Pflanzen und Blaualgen und an den LHCI von Pflanzen gebunden ist (Makewicz et al., 1996) und möglicherweise, neben PG, eine funktionelle Rolle spielen könnte.

In einer erst kürzlich erfolgten Kristallisation des LHCII-Komplexes von Pflanzen kamen weitere Details zu Tage (Liu et al., 2004). Zwei Moleküle α Gal β GalD vermitteln durch Wasserstoffbrückenbindung ihrer Kopfgruppen den Kontakt zwischen zwei benachbarten trimeren LHCII-Komplexen. Die Acyl-Ketten zeigen dabei zum Membraninneren und stehen in Wechselwirkung mit den Pigmenten des LHCII. Daraus resultierend wurde ein Modell einer nicht-

photochemischen Ableitung von Lichtenergie basierend auf der Struktur von Lipid-Protein-Komplexen vorgeschlagen. Dabei ist die α Gal β GalD-vermittelte Aggregation von trimeren LHCII-Komplexen möglicherweise beim Ableiten von Lichtenergie von Bedeutung, indem der Energietransfer von einem Trimer zum benachbarten Trimer erfolgen kann.

Weiterhin wurde in *in vitro*-Experimenten gezeigt, dass PG, α Gal β GalD und β GalD, obwohl nicht erforderlich für die Bildung, eine stabilisierende Wirkung auf den rekonstituierten LHCII-Komplex in Bezug auf thermische Denaturierung haben (Reinsberg et al., 2000).

Ein weiterer Weg, die spezifische Rolle von Thylakoidlipiden im Hinblick auf die Funktion von Proteinkomplexen zu untersuchen, verfolgt einen genetischen Ansatz. Sehr erfolgreich war die Untersuchung von Mutanten mit genetisch induzierten Veränderungen ihrer Lipidzusammensetzung. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Effekte *in vivo* studiert werden können.

Eine SQD-freie Mutante der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* zeigte ein beeinträchtigtes PSII. Die Untersuchungen zeigten, dass SQD mit dem Kern- und dem LHCII-Komplex assoziiert und somit für die Funktion des PSII verantwortlich ist (Sato et al., 1995). Auch bei *Arabidopsis* ist ein gewisser Anteil von anionischen Lipiden (SQD, PG) in den Thylakoiden für die Aktivität des PSII (Yu et al., 2003) und für das photoautotrophe Wachstum wichtig. Auch die SQD-freie Mutante der Blaualge *Synechocystis* zeigte verminderte PSII-Aktivität (Aoki et al., 2004). Im Gegensatz dazu war die PSII-Aktivität in der SQD-Null-Mutante von *Synechococcus*, einer weiteren Blaualge, nicht beeinträchtigt (Aoki et al., 2004; Güler et al., 1996). Diese Beispiele zeigen, dass es artspezifische Unterschiede bei der Interaktion von Chloroplastenlipiden, zumindest von SQD, mit Komponenten des Photosyntheseapparates gibt.

Anhand der bereits erwähnten *dgd1*-Mutante von *A. thaliana* konnten Aufschlüsse über die strukturelle Bedeutung von α Gal β GalD für die Photosynthese gewonnen werden. Der Anteil an α Gal β GalD in dieser Mutante beträgt nur 10 % im Vergleich zum Wildtyp und ist auf eine Mutation im *DGD1*-Gen zurückzuführen (Dörmann et al., 1995). Diese kleinwüchsigen Pflanzen zeigen eine veränderte Thylakoid-Ultrastruktur und eine verminderte Photosyntheseaktivität, einhergehend mit einer stark veränderten Thylakoid-Organisation bezüglich der Protein-Komplexe und Pigmente (Dörmann et al., 1995; Härtel et al., 1997; Reifarh et al., 1997). Die Mutante enthält weniger Chlorophyll, das Mengenverhältnis von PSII zu PSI ist vermindert und der Wasseroxidations-Komplex ist in seiner Funktion modifiziert. Eine weitere *Arabidopsis*-Mutante (*mgd1*) mit reduziertem β GalD-Gehalt zeigt ebenfalls einen deutlichen Phänotyp mit Zwergwuchs, veränderter Chloroplasten-Ultrastruktur und stark vermindertem Chlorophyllgehalt (Jarvis et al., 2000). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das eingeschränkte Wachstum dieser Mutanten auf Fehlfunktionen im Photosyntheseapparat oder auf die verminderte Fähigkeit dieser Pflanzen zur Synthese der Chloroplastenlipide zurückzuführen ist.

In vitro-Untersuchungen über die Beteiligung von Lipiden am Xanthophyll-Zyklus brachten weitere Erkenntnisse über die Funktion von Galaktolipiden zutage. Der Xanthophyll-Zyklus ist ein Mechanismus der Pflanzen zum Schutz gegen die schädlichen Auswirkungen von zuviel Licht. Die beteiligten Pigmente und Enzyme sind in den Thylakoidmembranen lokalisiert. Bei starkem Licht wird dabei durch die Violaxanthin-Deepoxidase Violaxanthin über die Zwischenstufe Anthraxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert. Bei Schwachlicht erfolgt die Umkehrung dieses Prozesses durch die Zeaxanthin-Epoxidase. Es konnte gezeigt werden, dass zur Deepoxidation die Anwesenheit von β GalD notwendig ist (Jahns et al., 2001; Morosinotto et al., 2002), α Gal β GalD spielt dabei keine Rolle. In späteren Experimenten wurde gezeigt, dass auch PE den gleichen Effekt hat wie β GalD (Latowski et al., 2004). Bei Anwesenheit von PC konnten wiederum keine Auswirkungen auf die Enzymaktivität beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass die Bilayer-destabilisierenden Eigenschaften von β GalD für die Deepoxidase-Aktivität entscheidend sind.

Alle diese Beispiele haben gezeigt, dass Galaktolipide für die strukturelle Integrität und Funktion der Membran verantwortlich sind, Proteinkomplexe stabilisieren und spezifische Funktionen ausüben.

1.4.4 Phosphatmangel

Obwohl das anionische Phospholipid PG in deutlich geringeren Mengen in den Thylakoiden vorkommt als die beiden Galaktolipide, ist dieses Lipid in einer bestimmten kritischen Menge doch essentiell für photosynthetisch aktive Organismen (Frentzen, 2004; Sato et al., 2000; Yu et al., 2003).

Viele Organismen haben Anpassungen entwickelt, um auf bestimmte Stress-Situationen in ihrer Umgebung zu reagieren und damit ihr Überleben zu sichern. Phosphat ist häufig der limitierende Faktor für das Wachstum dieser Organismen, so dass sie eine Strategie entwickelt haben, das vorhandene Phosphat sparsam zu nutzen. Die einzellige Alge *C. reinhardtii* erhöht ihren Sulfolipidgehalt, um damit einen Teil ihrer Phospholipide zu ersetzen (Riekhof et al., 2003). *Sinorhizobium meliloti* ersetzt ebenfalls teilweise seine Membran-Phospholipide durch phosphatfreie Glycerolipide (Geiger et al., 1999). Ein weiteres Beispiel ist *R. sphaeroides*, der bei Phosphatmangel alle seine Phospholipide, mit Ausnahme von PG, reduziert und dafür die Synthese von Sulfolipid steigert (Benning et al., 1993). Diese Organismen sind somit in der Lage, bei Phosphatmangel den abnehmenden Gehalt an Phospholipiden durch SQD zu kompensieren. Das so eingesparte Phosphat wird für andere wichtige zelluläre Prozesse eingesetzt. Diese Strategie findet man ebenfalls bei Blaualgen und Pflanzen, wobei auch im umgekehrten Fall ein Mangel an SQD durch PG kompensiert werden kann (Aoki et al., 2004; Güler et al., 1996; Härtel et al., 1998).

Pflanzen sind außerdem in der Lage, bei Phosphatmangel die Phospholipide teilweise durch extraplastidäres α Gal β GalD zu ersetzen (Härtel et al., 2000). Es wurde in extraplastidären Membranen

und vor allem in Wurzeln nachgewiesen und enthält einen sehr hohen Anteil an C16-Fettsäuren an der *sn*-1-Position des Glycerols, an der *sn*-2-Position findet man fast nur C18-Fettsäuren (Härtel et al., 2000). Die *dgd1*-Mutante, die nur noch etwa 8 % des α Gal β GalD vom Wildtyp synthetisiert (Dörmann et al., 1995), akkumuliert bei Phosphatmangel bis zu 55 % an α Gal β GalD, kann aber dennoch nicht den verminderten α Gal β GalD-Gehalt in den Chloroplasten kompensieren (Härtel et al., 2000; Härtel et al., 2001). Dieses α Gal β GalD ist daher eher dazu bestimmt, extraplastidäre Phospholipide zu ersetzen (Andersson et al., 2003). Versuche mit Hafer haben gezeigt, dass unter Phosphatmangel alle Phospholipide, außer PA in den Sprossen, abnahmen und nach 4 Wochen der Anteil von α Gal β GalD bis zu 46 % in den Sprossen und bis zu 70 % in den Wurzeln akkumulierte (bezogen auf die Gesamt-Membranglycerolipide der Plasmamembran). Das neutrale, Bilayer-stabilisierende α Gal β GalD kann dabei verschiedene Phospholipide ersetzen, einschließlich anionische und Bilayer-destabilisierende. Warum α Gal β GalD diese Funktion übernehmen kann, bleibt vorerst ein Rätsel. Auch β GalD und SQD wären zur Erfüllung dieser Funktionen geeignet, kommen aber extraplastidär nicht vor.

Die Synthese des extraplastidären α Gal β GalD in *A. thaliana* erfolgt durch die beiden α Gal β GalD-Synthasen DGD1 und DGD2 (Abb. 5) (Kelly et al., 2002; Kelly et al., 2003). Das erforderliche β GalD wird nur durch die beiden β GalD-Synthasen MGD2 und MGD3 bereitgestellt, die durch Phosphatmangel induziert werden (Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2004).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Tabakblätter und BY2-Zellen unabhängig von Phosphatmangel Digalaktosyldiacylglycerol (12 mol% bzw. 15 mol% des Gesamtlipidgehalts) in ihren Plasmamembranen akkumulieren (Mongrand et al., 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Phosphatmangel in Pflanzen α Gal β GalD nur gemeinsam mit SQD Phospholipide bis zu einem bestimmten Grad ersetzen kann. Der Wirkungsbereich von SQD ist dabei auf die Plastiden beschränkt; α Gal β GalD substituiert die Phospholipide in extraplastidären Membranen.

1.5 Problemstellung, Ziel und Strategie

Zurzeit ist nicht klar, warum in plastidären Membranen von Pflanzen nur Galaktosyldiacylglycerole, aber zum Beispiel keine Glukosyldiacylglycerole auftreten. Entsprechendes gilt für die Blaualgen, die eine ähnliche Lipidzusammensetzung wie die Chloroplasten aufweisen. Es ist daher eine offene Frage, ob das Vorkommen dieser speziellen Galaktose-Kopfgruppe tatsächlich funktionale Gründe hat, sodass im Falle der Plastiden das Vorkommen der Galaktolipide vorwiegend phylogenetisch bedingt ist.

Ein Weg zur Aufklärung der Funktion von Membranlipiden ist die Erzeugung von Deletionsmutanten entsprechender Glykosyltransferasen. Auf diese Weise konnten wichtige Erkenntnisse zur Funktion und Biosynthese der entsprechenden Lipide gewonnen werden. So haben zum Beispiel die beiden Mutanten *dgd1* und *mgd1* von *A. thaliana* zur Aufklärung des Biosynthesewegs und einiger Funktionen der plastidären Galaktolipide beigetragen (Dörmann et al., 2002; Kelly et al., 2004). Da Galaktolipide bei Pflanzen und Blaualgen in großer Menge vorkommen, kann aber nicht eindeutig geklärt werden, ob einige der beobachteten Auswirkungen nur die Folge ihrer quantitativen Reduktion sind, oder ob auch Funktionen betroffen sind, die im Zusammenhang mit der spezifischen Struktur der Kopfgruppe stehen. Zur Klärung dieser Frage sind Deletionsmutanten nicht geeignet. Ein Verständnis der spezifischen Funktion einer Lipidkopfgruppe ist vielmehr von Versuchen zu erwarten, die zu einem Austausch dieser nativen Lipidklasse durch eine andere führen.

Der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz sieht daher vor, die natürlichen Galaktolipide durch andere Glykolipide zu ersetzen, die sich zum Beispiel nur in der epimeren (z. B. Galaktose oder Glukose) oder anomeren (α oder β) Konfiguration ihrer Kopfgruppe, oder im Falle von Diglykosyldiacylglycerol, in der Verknüpfung der beiden Monomeren unterscheiden. Durch die Untersuchung der Phänotypen von Blaualgen, Moosen und höheren Pflanzen können dann eventuell spezifischen Funktionen der nativen Galaktolipide in diesen Organismen abgeleitet werden.

Diese Strategie erforderte daher geeignete Glykosyltransferasen, wobei nur wenige in klonierter Form aus verschiedenen Bakterien zur Verfügung standen. Um die Diversität zu erhöhen, wurden über Datenbanksuchläufe zunächst weitere ORF-Sequenzen putativer bakterieller Glykosyltransferasen identifiziert. Diese ORFs wurden kloniert und zur funktionellen Annotation in verschiedenen Wirten exprimiert. Anhand detaillierter Strukturanalysen der neu gebildeten Glykolipide konnten auf diese Weise einige neue Glykosyltransferasen charakterisiert werden. Weiterhin wurde die Sequenz der prozessiven β -Glukosyltransferase aus *Staphylococcus aureus* in ihrer Codon-Auswahl der Codon-Häufigkeit von Pflanzen angepasst.

Durch Transformation mit all den zur Verfügung stehenden Sequenzen sollten in den nachfolgend aufgeführten Organismen neue Glykolipide erzeugt werden:

Agrobacterium tumefaciens

Die Untersuchungen an *A. tumefaciens* wurden in diese Arbeit integriert, da dieser Organismus eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu Glukosylceramid-Synthasen besitzt. Dieser Organismus sollte auf das Vorkommen von Glykolipiden untersucht und anschließend das Gen deletiert werden.

Physcomitrella patens

Das Moos *P. patens* besitzt wie die höheren Pflanzen β GalD und α Gal β GalD, wobei die entsprechenden Gene noch nicht kloniert waren. Es standen jedoch zwei cDNA-Klone einer putativen β GalD- und α Gal β GalD-Synthase zur Verfügung, deren Annotationen funktional verifiziert werden mussten. Zunächst war geplant, diese Gene mit Hilfe der homologen Rekombination zu deletieren. In einem nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die heterologe Expression von bakteriellen Glykosyltransferasen erfolgreich in *Physcomitrella* durchgeführt werden kann.

Blualgen

Da die Sequenzen der β GlcD- und der α Gal β GalD-Synthase von Blualgen nicht bekannt waren und diese Organismen mehrere Kopien von Epimerasen zur Konvertierung von β GlcD zu β GalD besitzen, konnten keine entsprechenden Deletionsmutanten erzeugt werden. Stattdessen sollten durch Expression heterologer Glykosyltransferasen zusätzlich neue Glykolipide synthetisiert werden. Als Expressionswirt wurde der Stamm R2-PIM8 der Blualge *Synechococcus* sp. PCC7942 verwendet, der eine chromosomale Integrationsplattform besitzt (van der Plas et al., 1990). Durch homologe Rekombination kann gezielt Fremd-DNA in diesen Lokus inseriert werden.

Pflanzen

Bei *A. thaliana* sind alle Gene der Galaktolipid-Biosynthese kloniert. Da die zielgerichtete Insertions-Mutagenese in höheren Pflanzen wegen der geringen Erfolgsaussichten kaum Anwendung findet, musste auch hier auf die Deletion der entsprechenden Gene verzichtet und stattdessen mit „post-transcriptional gene silencing“ (Smith et al., 2000; Vaucheret et al., 2001) versucht werden, die Inaktivierung von MGD1 bzw. DGD1 herbei zu führen. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf der heterologen Expression der bakteriellen Glykosyltransferasen liegen. Da diese Enzyme in den Chloroplasten aktiv werden müssen, wurden die ORF-Sequenzen am 5'-Ende mit einer Chloroplasten-Leadersequenz fusioniert.

Als Ergebnis der ausgedehnten Untersuchungen an 19 neuen Glykosyltransferase-ORFs konnten tatsächlich 3 Sequenzen identifiziert werden, deren Expression (inklusive einer bereits charakterisierten bakteriellen Glykosyltransferase) in Blualgen und/oder höheren Pflanzen zu neuen Glykolipidkomponenten in Thylakoidmembranen führte.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Chemikalien

Geräte

Kühlzentrifuge	5810 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Centrikon H-401	Kontron
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1075	Kontron
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Tischzentrifuge	Rotana	Hettich
Elektrophoresekammer	Horizon 11-14	Gibco BRL
Elektroporator	Electroporator 2510	Eppendorf
Netzgeräte	PS304	Life Technologies
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Photometer	20 GENESYS™	Spectronic
UV-Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Bioimager	BAS-1000	RAYTEST
Hybridisierungsöfen	OV2	Biometra
Ultraschallbad	BRANSONIC 220	B. Braun
Wasserheizbäder	THERMOMIX™ MM	B. Braun
Sterilbank	DLF/BSS4	Woerden
Brutschränke		Heraeus und WTB Binder
Heizplatte/Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA
Vortexschüttler	REAX 2000	Heidolph
Thermo-Cycler	PRIMUS	MWG Biotech
	T Gradient	Biometra
Ultra-Turrax	TP 18/10	IKA
Thermo-Schüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
UV-Crosslinker	UVC 500	Hofer
UV-Transilluminatoren	UVT-28M	Herolab
	MultiImage™ Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Szintillationszähler	„LS 6000 IC“	Beckmann
Ultraschallstab	LABSONIC 2000	B. Braun
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE120	BÜCHI
DC-Tauchgerät	Chromatogram Immersion Device	CAMAG
Kieselgel-Platten	Kieselgel 60, 20 x 20 cm, 0,25 mm	Merck
HPTLC-Platten	Kieselgel 60, 20 x 10 cm	Merck
Membranen	Qiabrane Nylon	Qiagen
	Nylon Membranen	Boehringer
Röntgenfilm	HYPERFILM™-MP, 18 x 24 cm	Amersham
Videoprinter	429 K	Herolab
Säulen		

Die Dokumentation von Nukleinsäuregelen erfolgte mit dem „AlphaDigiDoc™ Gel Documentation & Image Analysis System“ (Alpha Innotech Corporation, CA), das auch zur Detektion und Dokumentation von fluoreszenzmarkierten Lipiden auf Kieselgelplatten diente. Die Detektion radioaktiv markierter Lipide auf Kieselgelplatten erfolgte mittels eines Phosphorimagers (BAS-1000 Bio Imaging Analyzer, Fuji), die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit der PC-BAS Software (TINA 2.0). Das automatische Auftragen von Lipid-Proben auf Kieselgelplatten erfolgte mit Hilfe des „Automatic TLC Sampler 4“ (CAMAG). Nach der Veraschung der Lipide auf den Kieselgelplatten wurden die Intensitäten der entsprechenden Banden mit dem „TLC Scanner 3“ (CAMAG) gemessen.

Verbrauchsmaterial, Enzyme, Chemikalien und Isotope

Handelsübliche Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen, Detergenzien, Nährmediengrundstoffe, Kohlenhydrate, Vitamine, Aminosäuren und Antibiotika wurden von den Firmen 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) bezogen.

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. Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) geliefert. PVDF-Membranen stammten von Schleicher & Schüll (Dassel). 3MM-Papier wurde von Whatman Ltd (Mainstone, England) bezogen.

2.2 Organismen und Vektoren

2.2.1 Bakterien und Hefen

Organismus	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF' (Bullock et al., 1987)	$\Delta(\text{mcrA})$ 183, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10(tetr)]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) (Novagen, Madison)	recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 λ Δ [lac-proAB] (F-traD36 proAB lacIqZ Δ M15) (λ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)
<i>Escherichia coli</i> C41(DE3) (Miroux et al., 1996)	Genotyp unbekannt
<i>E. coli</i> SURE® Competent Cells (Stratagene)	e14-(McrA-) (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]. (McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr-, HsdR-), endonuclease (endA) deficient, and recombination (recB recJ) deficient. SURE cells contain the lacIqZ.M15 gene on the F' episome, allowing blue-white screening for recombinant plasmids
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHVC58C1 ein Derivat des Stammes EHA 101 (Hood et al., 1986)	Rif ^R
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 strain R2-PIM8 (van der Plas et al., 1990)	Amp ^S , Sm ^R , Met ⁻
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVScI (Invitrogen)	MAT α , his3- Δ 1, leu2, trp1-289, ura3-52
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 334 (Hovland et al., 1989)	MAT α , pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3,112, reg1-501, gal1
<i>Pichia pastoris</i> JC308 Δ ugt51 (Hillig et al., 2003)	ade1, arg4, his4, AOX1 Δ ugt51::URA3
<i>Pichia pastoris</i> JC308 Δ ugt51/ Δ gcs (Hillig et al., 2003)	ade1, arg4, his4, AOX1 Δ ugt51::URA3 Δ gcs::Sh ble

2.2.2 Pflanzen

Physcomitrella patens (Hedw.) BSG

Für diese Arbeit wurde das Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. (Blasenmützenmoos) verwendet. Der Wildtyp stammte aus der Sammlung des genetischen Arbeitsbereiches der Universität Hamburg und geht auf den Stamm 16/14 zurück, der von H. L. K. Whitehouse in Gransden Wood, Huntigdonshire (England) gesammelt und von Engel (1968) aus einer Spore subkultiviert wurde.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.

In dieser Arbeit wurden die beiden Ökotypen Wassilewskija und Columbia verwendet.

2.2.3 DNA und Vektoren

Tabelle 2 Quellen genomischer DNA

Organismus	Anmerkung
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	bezogen von DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany
<i>Chlorobium tepidum</i>	bezogen von DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	bezogen von DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Arbeitsgruppe Prof. Heinz (ATHVC58C1)
<i>Mesorhizobium loti</i>	bezogen von DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Stamm R1 von Karl O. Stetter, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum, Universität Regensburg, D-93053 Regensburg, Germany, zur Verfügung gestellt
<i>Thermotoga maritima</i>	genomische DNA von Karl O. Stetter, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum, Universität Regensburg, D-93053 Regensburg, Germany, zur Verfügung gestellt
<i>Nicotiana tabaccum</i>	Pflanzen der Arbeitsgruppe Prof. Heinz
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pflanzen der Arbeitsgruppe Prof. Heinz
<i>Physcomitrella patens</i>	Pflanzen der Arbeitsgruppe Prof. Heinz

Tabelle 3 ORFs von putativen oder heterologen Glykosyltransferasen und cDNA-Klone

ORF oder interne Bez.	GenBank-Accession-Nr.	Bezeichnung in Datenbank bzw. Verwendung	Organismus	Referenz
dr1076	NP_294800	cell wall synthesis protein, putative	<i>D. radiodurans</i>	-
dr1225	NP_294949	mannosyltransferase, putative	<i>D. radiodurans</i>	-
tm0744	NP_228553	conserved hypothetical protein	<i>T. maritima</i>	-
tm0622	NP_228431	lipopolysaccharide biosynthesis protein, putative	<i>T. maritima</i>	-
ywaG	NP_268295	lipopolysaccharide biosynthesis protein	<i>L. lactis</i>	-
ct1882	NP_662759	glycosyl transferase	<i>C. tepidum</i>	-
ct0548	NP_661448	glycosyl transferase	<i>C. tepidum</i>	-
ct0225	NP_661130	glycosyl transferase	<i>C. tepidum</i>	-
ct0226	NP_661131	glycosyl transferase	<i>C. tepidum</i>	-
chlo2029	ZP_00019031	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo2030	ZP_00019032	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo2464	ZP_00019463	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo0149	ZP_00017194	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo1337	ZP_00018349	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo1537	ZP_00018547	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo1567	ZP_00018577	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo1798	ZP_00018802	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
chlo4056	ZP_00021004	hypothetical protein	<i>C. aurantiacus</i>	-
AGR_C_3323	NP_354792	ceramide glucosyltransferase	<i>A. tumefaciens</i>	-
mlr5650	NP_106273	ceramide glucosyltransferase	<i>M. loti</i>	-
Sa-GlcT	AAV00990	prozessive β -Glukosyltransferase aus <i>S. aureus</i> (<i>ugt106B1</i>) in pET24d: Plasmid pEsay24	<i>S. aureus</i>	(Jorasch et al., 2000)
Al-GlcT	AF349769	α GlcD-Synthase aus <i>A. laidlawii</i> in pCR-Script Vektor (Stratagene) von Åke Wieslander, Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Sweden	<i>A. laidlawii</i>	(Berg et al., 2001)
Bb-GalT	AE001150	α GalD-Synthase* aus <i>B. burgdorferi</i> B31 (Gen: BB0454) in pCR-Script Vektor (Stratagene): Plasmid pY454 von S. Bergström, Dept. of Molecular Biology, Umeå University, Sweden	<i>B. burgdorferi</i>	-
At-MGD1	AF241797	MGD1 Synthase aus <i>A. thaliana</i> in pET24d: Plasmid pEMGD2	<i>A. thaliana</i>	(Jorasch, 1999)
ppMGDS	-	putative β GalD-Synthase (38_ck21-g07) aus <i>P. patens</i> , von BASF zur Verfügung gestellt, in pBluescript II SK- (Stratagene)	<i>P. patens</i>	-
ppDGDS	-	putative α Gal β GalD-Synthase (pp004059130) aus <i>P. patens</i> von BASF zur Verfügung gestellt, in pBluescript II SK- (Stratagene)	<i>P. patens</i>	-

*nach Mitteilung von Herrn Dr. Bergström handelt es sich bei dem ORF BB0454 aus *Borrelia burgdorferi* um eine α GalD-Synthase.

Tabelle 4 Vektoren zur Klonierung

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pGEM-T	Amp ^R	Promega
pUC18	Amp ^R	(Yanish-Perron et al., 1989)
pUC19	Amp ^R	(Yanish-Perron et al., 1989)
pBluescript II SK-	Amp ^R	Stratagene
pBK-CMV	Kan ^R	Stratagene
pTrcHis2 C	Amp ^R	Invitrogen
pET-24d	Kan ^R	Novagen, Madison
pCambia2200	Cm ^R , Kan ^R	CAMBIA, Canberra, Australia
pLH7000	Sm ^R /Sp ^R , pat	(Hausmann et al., 1999)
pFP1-3	Amp ^R , Kan ^R	(Götz et al., 1999)
pPIC3.5	Amp ^R , HIS4	Invitrogen
pYES2 (URA+)	Amp ^R , URA3	Invitrogen
pESC-Leu	Amp ^R , LEU2	Stratagene
pEsay24	Kan ^R	(Jorasch et al., 2000)
pRT101neo	Amp ^R , <i>nptII</i>	(Girke, 1998)
pUSPOCS		(Abbadi et al., 2004)

Tabelle 5 Rekombinante Plasmide - Klonierung von PCR-Produkten in pUC18 (durch M. Leipelt)

Insert	Forw.-Primer Rev.-Primer	Template	Anmerkung	rekombinante Plasmide
1 AGR_C_3323	Agro1 Agro2	genomische DNA	ORF der putativen Gcs aus <i>A. tumefaciens</i>	pUCAGRO
2 mlr5650	Meso1 Meso2	genomische DNA	ORF der putativen Gcs aus <i>M. loti</i>	pUCMESO
3 agro1	AGROK AGROE	genomische DNA	2100 bp Promotor-Region der putativen Gcs von <i>A. tumefaciens</i> , mit den Schnittstellen: 5'-KpnI / 3'-EcoRV	p18agro1
4 agro2	AGRO2N AGRO2S	genomische DNA	600 bp 3'-Ende der putativen Gcs von <i>A. tumefaciens</i> , mit den Schnittstellen: 5'-NotI / 3'-SacI	p18agro2
5 AGR_C_3323	AgroN AgroB	pUCAGRO	ORF der putativen Gcs aus <i>A. tumefaciens</i> , mit den Schnittstellen: 5'-NcoI / 3'-BamHI	pUCNagroB
6 Sa-GlcT	STA STAS	pEsay24 ¹	β-Glukosyltransferase aus <i>S. aureus</i> , mit den Schnittstellen: 5'-EcoRV / 3'-SmaI	p18Staph
7 SS	STREPS STREPN	pLH7000 ²	Sm ^R /Sp ^R -Kassette, mit Schnittstellen: 5'-SmaI / 3'-NotI	p18SS

¹ (Jorasch, 1999); ² (Hausmann et al., 1999)

Tabelle 6 Rekombinante Plasmide - Klonierung von PCR-Produkten (diese Arbeit)

	Insert	Forw.-Primer Rev.-Primer	Template	Anmerkung	rekombinante Plasmide
1	dr1076	GH13b GH14b	genomische DNA	ORF	pGdr1076
2	dr1225	GH49 GH50	genomische DNA	ORF	pGdr1225
3	tm0744	GH55 GH56	genomische DNA	ORF	pGtm0744
4	tm0622	GH57 GH58	genomische DNA	ORF	pGtm0622
5	ywaG	GH47 GH48	genomische DNA	ORF	pGywaG
6	dr1076	GH71dr1076F GH71dr1076R	pGdr1076	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	pGdr1076-2
7	dr1225	GH69dr1225F GH69dr1225R	pGdr1225	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18dr1225
8	tm0744	GH69tm0744F GH69tm0744R	pGtm0744	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18tm0744
9	ct1882	GH74ct1882F GH74ct1882R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18ct1882
10	ct0548	GH74ct0548F GH74ct0548R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18ct0548
11	ct0225	GH74ct0225F GH74ct0225R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18ct0225
12	ct0226	GH74ct0226F GH74ct0226R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18ct0226
13	chlo2029	GH74chlo2029F GH74chlo2029R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo2029
14	chlo2030	GH74chlo2030F GH74chlo2030R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo2030
15	chlo2464	GH74chlo2464F GH74chlo2464R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo2464
16	chlo0149	GH74chlo0149F GH74chlo0149R	genomische DNA	kein PCR-Produkt erhalten	nicht kloniert
17	chlo1337	GH74chlo1337F GH74chlo1337R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo1337
18	chlo1537	GH74chlo1537F GH74chlo1537R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo1537
19	chlo1567	GH74chlo1567F GH74chlo1567R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo1567
20	chlo1798	GH74chlo1798F GH74chlo1798R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo1798
21	chlo4056	GH74chlo4056F GH74chlo4056R	genomische DNA	ORF mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18chlo4056
22	Al-GlcT	GH23 GH24	Plasmid	α GlcD-Synthase aus <i>A. laidlawii</i> (Berg et al., 2001) in pCR-Script Vektor, erhalten von A. Wieslander, Schweden; in pUC19 (SalI-blunt) kloniert	p19Al-GlcT
23	Al-GlcT	GH23 GH24	Plasmid	Zwischenklonierung der α GlcD-Synthase aus <i>A. laidlawii</i> in p18MCS2 (SnaBI), um Sequenz mit den Schnittstellen 5'-AvrII / 3'-BamHI zu versehen	p18Al-GlcT
24	Bb-GalT	GH27	Plasmid	α GalD-Synthase aus <i>B. burgdorferi</i> in pCR-Script	p19Bb-GalT

		GH28		Vektor, erhalten von S. Berg, Schweden; in pUC19 (Sall-blunt) kloniert	
25	Bb-GalT	GH27 GH28	Plasmid	Zwischenklonierung der α GalD-Synthase aus <i>B. burgdorferi</i> in p18MCS2 (SnaBI), um Sequenz mit den Schnittstellen 5'-AvrII / 3'-BamHI zu versehen	p18Bb-GalT
26	Sa-GlcT	GH29 GH30	pEsay24	Glukosyltransferase aus <i>S. aureus</i> (Jorasch et al., 2000); in pUC19 (Sall-blunt) kloniert	p19Sa-GlcT
27	Sa-GlcT	GH29 GH30	pEsay24	Zwischenklonierung der Glukosyltransferase aus <i>S. aureus</i> in p18MCS2 (SnaBI), um Sequenz mit den Schnittstellen 5'-AvrII / 3'-BamHI zu versehen	p18Sa-GlcT
28	syn1	GH69saysynF GH69saysynR	synthetische Sequenz Version 1	synthetische Polynukleotidsequenz Version 1 (diese Arbeit) homolog zur Proteinsequenz der β -Glukosyltransferase aus <i>S. aureus</i> , mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18syn1
29	Teil-Sequenzen	GH65f-20 GH65r-20 GH65f-21 GH65r-21 GH65f-22 GH65r-22 GH65f-23 GH65r-23 GH65f-24	p18syn1	Korrektur der fehlerhaften Polynukleotidsequenz in p18syn1	
30	syn2	GH69saysynF GH69saysynR	synthetische Sequenz Version 2	synthetische Polynukleotidsequenz Version 2 (diese Arbeit), mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18syn2
31	syn3-teil	GH69saysynF GH69syn3R	p18syn2	Korrektur der fehlerhaften Polynukleotidsequenz in p18syn2	p18syn3-teil
32	syn3	GH69saysynF GH69saysynR	synthetische Sequenz	synthetische Polynukleotidsequenz Version 3 (diese Arbeit), mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI versehen	p18syn3
33	Nsyn3	Gh75syn3F GH69saysynR	p18syn2	synthetische Polynukleotidsequenz Version 3, mit Schnittstellen: 5'-NcoI-AvrII / 3'-BamHI	p18Nsyn3
34	BnptIIIH	GH75nptIIF GH75nptIIR	pFP1 (Götz)	nptII-Kassette, mit Schnittstellen: 5'-BamHI / 3'-HindIII	p18BnptIIIH
35	AGR_C_3323	GH69agroF GH69agroR	pUCAGRO (leipelt)	ORF der putativen Gcs aus <i>A. tumefaciens</i> , mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18agro
36	mlr5650	GH69mesoF GH69mesoR	pUCMESO (leipelt)	mit Schnittstellen: 5'-AvrII / 3'-BamHI	p18meso
37	ppMGDS	CH6 CH7	Plasmid (BASF)	cDNA einer putativen β GalD-Synthase von <i>P. patens</i> , mit Schnittstellen: 5'-NcoI / 3'-BamHI	p19ppMGDS
38	ppDGDS	GH1 GH2	Plasmid (BASF)	cDNA einer putativen α Gal β GalD-Synthase von <i>P. patens</i> , mit Schnittstellen: 5'-BamHI / 3'-XbaI, PCR-Produkt restringiert	pBK-CMVppDGDS
39	nptII-pcr-H	GH21 GH22	pRT101neo (Girke, 1998)	nptII-Kassette mit den Schnittstellen 5'-HindIII / 3'-SmaI-HindIII	
40	dgd1-sense	GH35 GH36	genomische DNA	Fragment der DGD1 aus <i>A. thaliana</i> mit Intron am 3'-Ende, mit den Schnittstellen 5'-BamHI / 3'-StuI	p18dsense
41	dgd1-antisense	GH37 GH38	genomische DNA	Fragment der DGD1 aus <i>A. thaliana</i> ohne Intron mit den Schnittstellen 5'-NheI / 3'-StuI	p18dantisense
42	mgd1-sense	GH69msF Gh69msR	genomische DNA	Fragment der MGD1 aus <i>A. thaliana</i> mit Intron am 3'-Ende, mit den Schnittstellen 5'KpnI / 3' „1/2 SmaI“	p18msense
43	mgd1-antisense	GH69maF Gh69maR	genomische DNA	Fragment der MGD1 aus <i>A. thaliana</i> ohne Intron 5'-PacI / 3'-SmaI	p18mantisense
44	Leadernt	GH69Leade-ntF GH69Leader-ntR2	genomische DNA	Nucleotid-Sequenz des Chloroplasten-Transitpeptides der MGD1 aus Tabak, mit den Schnittstellen 5'-ApaI / 3'-AvrII	p18Leadernt

45	$\Delta 6$ Des	GH25 GH26	genomische DNA	2300 bp Fragment der $\Delta 6$ -Desaturase aus <i>P. patens</i> , mit den Schnittstellen 5'-HpaI / 3'-HpaI	pUCd6
46	ppMGDSg	CH6 GH18	genomische DNA	genomische Sequenz der β GalD-Synthase aus <i>P. patens</i> , mit den Schnittstellen 5'-NcoI / 3'-EcoRI	p18ppMGDSg
47	ppDGDSg	GH1 GH16	genomische DNA	genomische Sequenz der α Gal β GalD-Synthase aus <i>P.</i> <i>patens</i> , mit den Schnittstellen 5'-BamHI / 3'-XbaI	p18ppDGDSg
48	Leaderpp	GH19 GH20	pBKMGD	Leadersequenz der putativen β GalD-Synthase aus <i>P.</i> <i>patens</i> (~375 bp) mit den Schnittstellen 5'-NcoI / 3'- BstZ17I-XbaI in pRT101neo (siehe Tabelle 4) (NcoI/XbaI) kloniert	pRTL
49	MCS1	MCS1-F MCS1-R	kein Template	Sequenz mit wichtigen Klonierungsschnittstellen, beide Oligonucleotid-Sequenzen sind komplementär zueinander, mit 5'-Überhang kompatibel zu BamHI- Überhang	p18MCS1
50	MCS2	MCS2-F MCS2-R		beide Primer überlappen sich am 3'-Ende und sind gleichzeitig Template, Sequenz mit wichtigen Klonierungsschnittstellen	p18MCS2

Anmerkung:

Alle PCR-Produkte sind mit glatten Enden in die linearisierten Vektoren kloniert, falls nicht anders angegeben. Rekombinante Plasmide mit dem Präfix „p18“ bzw. „pUC“ resultieren aus pUC18; „p19“ leitet sich von pUC19 und „pG“ von pGEM-T ab.

Tabelle 7 Vektoren zur Transformation und Expression

ORF	Transformations- bzw. Expressionsvektoren für						
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumef.</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Synechococcus</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. patens</i>
dr1076	p19dr1076		pPdr1067		pTndr1076 ¹	pCMsLdr1076	
dr1225	p19dr1225		pPdr1225		pTndr1225	pCMsLdr1225 ²	
tm0744	p18tm0744		pPtm0744		pTntm0744	pCMsLtm0744	
tm0622	p18tm0622		pPtm0622				
ywaG	p18ywaG		pPywaG				
ct1882	p18ct1882			pYct1882	pTnct1882	pCMsLct1882	
ct0548	p18ct0548			pYct0548	pTnct0548	pCMsLct0548 pCDsLct0548	
ct0225	p18ct0225			pYct0225	pTnct0225	pCMsLct0225 pCDsLct0225	
ct0226	p18ct0226			pYct0226	pTnct0226	pCMsLct0226 pCDsLct0226	
chlo2029	p18chlo2029			pYchlo2029 pEchlo2029	pTnchlo2029	pCMsLchlo2029 pCDsLchlo2029	
chlo2030	p18chlo2030			pYchlo2030	pTnchlo2030	pCMsLchlo2030 pCDsLchlo2030	
chlo2464	p18chlo2464			pYchlo2464	pTnchlo2464	pCMsLchlo2464 pCDsLchlo2464	
chlo1337	p18chlo1337			pYchlo1337	pTnchlo1337	pCMsLchlo1337	
chlo1537	p18chlo1537			pYchlo1537	pTnchlo1537	pCMsLchlo1537	
chlo1567	p18chlo1567			pYchlo1567	pTnchlo1567	pCMsLchlo1567	
chlo1798	p18chlo1798			pYchlo1798	pTnchlo1798	pCMsLchlo1798	
chlo4056	p18chlo4056			pYchlo4056	pTnchlo4056	pCMsLchlo4056	
Al-GlcT	p19Al-GlcT				pTnAl-GlcT	pCMsLalMGDS	pUCd6Lmaln ³ pUCd6maln
Bb-GalT	p19Bb-GalT				pTnBb-GalT	pCMsLbbMGDS	pUCd6Lmbbn pUCd6mbbn
Sa-GlcT	p19Sa-GlcT	pTnVSa-GlcT			pTnSa-GlcT	pCMsLsaDGlcDS pCDsLsaDGlcDS	pUCd6Lsayn pUCd6sayn
At-GlyT	pTnAt-GlyT pETAt-GlyT	pTnVAt-GlyT	pPICAGRO (M. Leipelt)		pTnAt-GlyT	pCMsLagro pCDsLagro	
MI-GlyT	pTnMI-GlyT	pTnVMI-GlyT			pTnMI-GlyT	pCMsLmeso	
syn3	pTnsyn3			pYsyn3	pTnsyn3	pCDsLsyn3	
ppMGDS	p19ppMGDS pETppMGDS (Claudia Hörmle)						
ppDGDS	pBK-CMV- ppDGDS pETppDGDS			pYppDGDS			
AtMGD1				pEMGD2 (Jorasch, 1999)			

Anmerkung:

- ¹ Konstrukte (beginnend mit ‚pTn‘) können durch homologe Rekombination in eine künstliche Insertionsplattform (van der Plas et al., 1990) in *Synechococcus* (Stamm R2-PIM 8) inserieren. Die Konstrukte enthalten eine zusätzliche Kan^R-Kassette.
- ² Transformationsvektoren mit „post-transcriptional gene silencing“-Konstrukt für die MGD1 oder DGD1 und den ORF einer (putativen) Glykosyltransferase mit Chloroplasten-Leadersequenz. Die Transkription erfolgt jeweils unter einem 35S-Promotor.
- ³ Transformationsvektoren für *P. patens* zur genomischen Integration der entsprechenden Glykosyltransferase mit oder ohne Chloroplasten-Leadersequenz unter der Kontrolle eines 35S-Promotors zusammen mit einer Kan^R-Kassette. Die genomische Sequenz der $\Delta 6$ -Desaturase dient als linker und rechter flankierender Bereich zwecks Insertion an diesen Locus.
- ⁴ Expressionsvektoren für *A. tumefaciens* mit „pVS1“-Replikationsursprung aus pCAMBIA 2200, mit zusätzlicher Kan^R-Kassette

Tabelle 8 „Knock out“-Konstrukte

Vektor	Beschreibung
pBa1na5	Knock out-Konstrukt der putativen Gcs aus <i>A. tumefaciens</i> , bestehend aus dem linken flankierenden Bereich (Promoter-Bereich, 3'-Ende abgeschnitten, ~1400 bp), gefolgt von einer nptII-Kassette in antisense-Richtung und dem rechten flankierenden Bereich (3'-Ende der putativen <i>gcs</i> -Sequenz, ~780 bp)
pBa1saySSa2	Reporter-Gen-Konstrukt zur Aktivitätsbestimmung des putativen <i>gcs</i> -Promotors, bestehend aus dem linken flankierenden Bereich (gesamter <i>gcs</i> -Promotor-Bereich, ~2100 bp), der Glukosyltransferase aus <i>S. aureus</i> , einer Sm ^R /Sp ^R -Kassette und dem rechten flankierenden Bereich (3'-Ende der putativen <i>gcs</i> -Sequenz, ~600 bp)
pMGDSko	„Knock out“-Konstrukt der β GalD-Synthase aus <i>P. patens</i> mit genomischen β GalD-Synthase-Sequenzabschnitten als flankierende Bereiche, unterbrochen durch eine Kan ^R -Kassette
pDGDSko	„Knock out“-Konstrukt einer putativen α Gal β GalD-Synthase aus <i>P. patens</i> mit der genomischen Sequenz als flankierende Bereiche, unterbrochen durch eine Kan ^R -Kassette

2.3 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen und Bakterien

Zur Isolierung von genomischer DNA sowohl aus Pflanzen als auch aus Bakterien (Tabelle 2) wurde das „GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit“ der Firma Sigma benutzt. Die von der DSMZ oder von Prof. Stetter bezogenen Kulturen wurden direkt, d.h. ohne vorherige Kultivierung, zur DNA-Isolierung verwendet. Ansonsten erfolgte die Ernte der Zellen durch Sedimentation der Flüssigkulturen.

Die Pflanzen- oder die Bakterienzellen wurden zuerst durch Zermörsern in flüssigem N₂ aufgebrochen, dann mit einem Lysepuffer bei 65 °C lysiert, die Zellfragmente präzipitiert und die Proben gefiltert. Das gefilterte Lysat wurde auf Säulchen gegeben, um die DNA an eine Silica-Membran zu binden. Die DNA wurde dann mit einer Waschlösung gewaschen und mit A. dest. eluiert.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die PCR wurde dazu benutzt, um Sequenzen aus genomischer DNA oder aus Plasmiden für die Klonierung zu amplifizieren. Die meisten der amplifizierten Sequenzen wurden dabei auch gleichzeitig mit geeigneten Restriktionssequenzen versehen, indem die Primer mit entsprechenden Überhängen synthetisiert wurden.

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde hauptsächlich die „high-fidelity“ DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu-DNA-Polymerase) verwendet. In einigen Ausnahmefällen, bei denen die Amplifikation mit der Pfu-DNA-Polymerase erfolglos war, wurde die Taq-DNA-Polymerase eingesetzt.

Die Template-Konzentration war abhängig von der jeweiligen DNA-Polymerase. Für proofreading-Polymerasen wurden 1-10 ng Plasmid-DNA und 100-500 ng genomische DNA eingesetzt, für die Taq-DNA-Polymerase reichte weniger aus. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen LIFE TECHNOLOGIES und Sigma-ARK als Lyophilisat bezogen und in A. dest. zu 100 pmol/μl als Stammlösung und zu 10 pmol/μl als Gebrauchslösung angesetzt. Um die Spezifität der Primer-Bindung zu erhöhen, wurde dem Ansatz 2 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Der PCR-Reaktionsansatz betrug 50 μl.

PCR-Reaktionsansatz (50 µl)

1-10 ng / 100-500 ng	Plasmid-DNA / genomische DNA
5 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)
5 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)
5 µl	PCR-Puffer (10 x)
1 µl	DMSO
1 µl	dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid)
1 µl	DNA-Polymerase (5 Units/µl)

Die PCR-Bedingungen wurden folgendermaßen eingestellt:

PCR-Programm

1	95 °C	1 min	Denaturierung
2	94 °C	30 sec	Denaturierung
3	$T_m - 5$ °C	30 sec	Annealing
4	72 °C	1 min/kb (Taq), 2 min/kb (Pfu)	Elongation
5	72 °C	10 min	Elongation

30-35 Zyklen der Schritte 2-4

Die Annealing-Temperatur der Primer ist abhängig von deren Länge und der Basenzusammensetzung. Sie wird wie folgt berechnet: Für alle Cytosin- und Guaninreste werden jeweils 4 °C und für alle Adenin- und Thyminreste jeweils 2 °C angenommen. Die Summe dieser Werte wird als die mittlere Schmelztemperatur (T_m) bezeichnet (Suggs et al., 1981). Vermindert um 5 °C erhält man die Annealing-Temperatur des jeweiligen Primers. Unterscheiden sich die Annealing-Temperaturen der beiden Primer, so wird stets die niedrigere von beiden genommen. Die Elongationszeit ist abhängig von der DNA-Polymerase und von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Für die Taq-DNA-Polymerase wird für den Einbau von 1000 Nukleotiden 1 min angesetzt, für proofreading-DNA-Polymerasen berechnet man 2 min pro 1000 Basen.

Die PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese (2.8) und mit den entsprechenden Kits (2.9) gereinigt und zur Klonierung verwendet.

Kolonie-PCR

Kolonie-PCR wurde eingesetzt, um transformierte Organismen auf die Anwesenheit der entsprechenden Konstrukte zu untersuchen. Diese Methode führte schnell zum Ergebnis und machte die aufwendige Isolierung von DNA aus diesen Organismen überflüssig.

Diese Methode funktioniert im Prinzip wie oben beschrieben, wobei anstatt der DNA ein Teil der Bakterien-Kolonie zum Ansatz gegeben wurde. Dabei wurde ausschließlich die Taq-DNA-Polymerase verwendet und die Reaktion in einem Volumen von 20 µl durchgeführt.

Reaktionsansatz (20 µl)	1/10 µl	Bakterien-Kolonie
	2 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)
	2 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)
	2 µl	PCR-Puffer (10 x)
	0,4 µl	DMSO
	0,4 µl	dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid)
	0,4 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 Units/µl)

Alle Schritte des PCR-Programms wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Proben wurden anfänglich allerdings 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen besser aufzuschließen. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte über Gelelektrophorese (2.8).

2.5 Synthese eines künstlichen Gens aus Oligonukleotiden

Der Grund für die Synthese eines künstlichen Gens war die Erfolglosigkeit bei den Versuchen zur Expression der prozessiven β -Glukosyltransferase (*ugt106B1*) aus *S. aureus* (Jorasch et al., 2000) in Pflanzen (diese Arbeit, Gaude, 2001). Die Ursache für das Scheitern ist vermutlich auf die unterschiedliche Häufigkeit der Codons in den kodierenden Sequenzen der beiden Organismen zurückzuführen. Daher wurde die Synthese einer künstlichen Polynukleotidsequenz beschlossen, die von der Aminosäuresequenz der prozessiven β -Glukosyltransferase aus *S. aureus* ausgehend an die Codon-Häufigkeit des *A. thaliana*-Genoms angepasst ist. Zur Konstruktion dieser Sequenz wurden 37 Oligonukleotide mit einer Länge von 51 bis 54 Basen synthetisiert (Sigma-ARK). Diese Oligonukleotide repräsentieren in ihrer Gesamtheit die zu synthetisierende, komplette Polynukleotidsequenz. Benachbarte Oligonukleotide sind komplementär zueinander und überlappen sich dabei in einer Länge von 20 Basen. Die vollständige Sequenz wurde in mehreren sich wiederholenden Schritten durch Synthese von Teilsequenzen erzeugt, die zu immer größeren Sequenzen fusioniert wurden (Abb. 9).

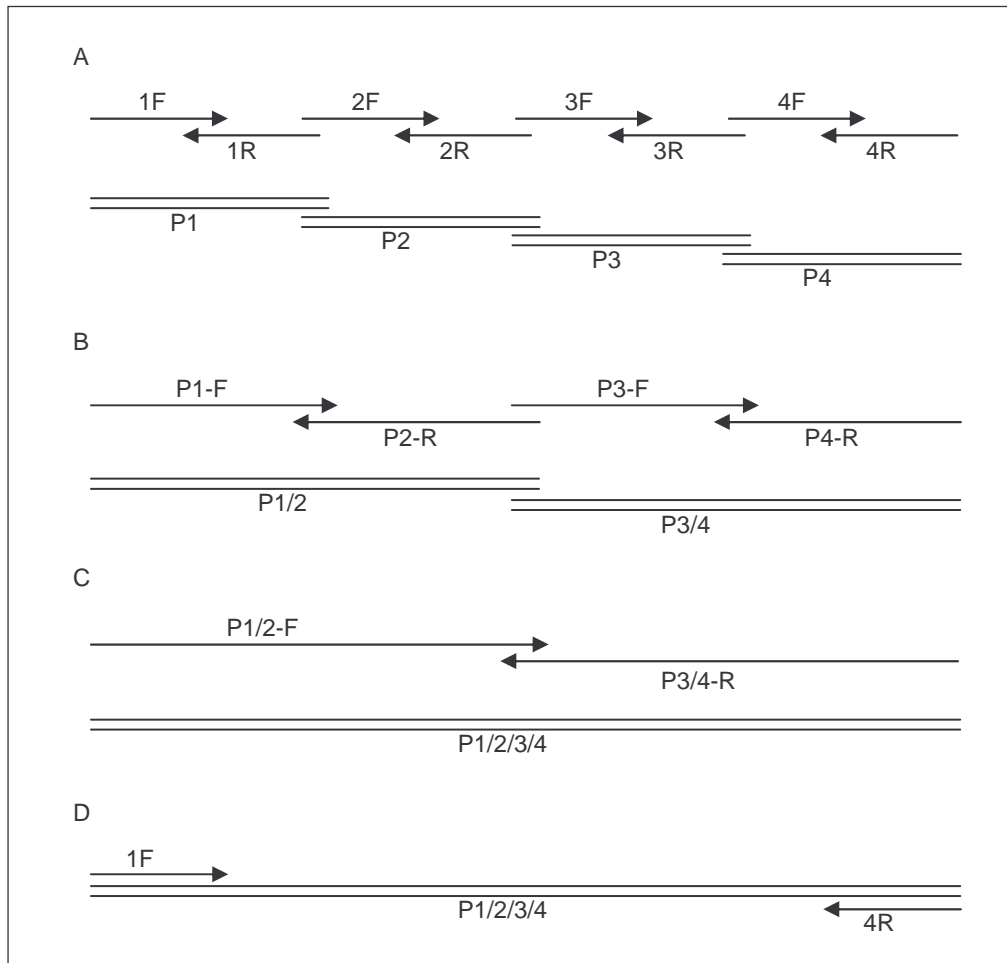


Abb. 9 Schematische Darstellung der schrittweisen Synthese einer Polynukleotidsequenz. Zur Synthese wurden Oligonukleotide eingesetzt, die in ihrer Gesamtheit die komplette Polynukleotidsequenz ergeben und sich an ihren Enden überlappen. Benachbarte Fragmente sind komplementär zueinander. Die Fragmente sind durch Pfeile dargestellt, die in 5'→3'-Richtung zeigen. Doppelsträngige DNA ist durch Doppellinien dargestellt. (A) Im ersten Schritt wurden je zwei sich überlappende komplementäre Fragmente (1F/1R ... 4F/4R) durch Synthese von Doppelsträngen (P1 ... P4) fusioniert. (B) In einem zweiten Schritt wurden je zwei sich überlappende Teilfragmente aus Schritt 1 zur weiteren Fusionierung in einem Ansatz vereinigt. Dabei können nur Teilsequenzen, die sich in ihren 3'-Enden überlappen (P1-F/P2-R, P3-F/P4-R), zu Doppelsträngen (P1/2, P3/4) synthetisiert werden. (C) In einem dritten Schritt wurden die neuen Fragmente (P1/2-F, P3/4-R) auf die gleiche Weise fusioniert (P1/2/3/4) wie in Schritt 2. (D) Vervielfältigung des Fragments aus Schritt 3 durch PCR mit den entsprechenden Primern (1F, 4R). Durch Wiederholung dieser letzten beiden Schritte, d. h. der Fusion zweier Teilfragmente mit anschließender Amplifikation, wurden die Fragmente zu immer größeren Sequenzen vereinigt, bis die komplette synthetische Sequenz vorlag.

Schritt 1

Im ersten Schritt wurden je zwei Oligonukleotid-Sequenzen, die sich an ihren 3'-Enden überlappen, in einem Reaktionsansatz vereinigt. Die Ansätze ähnelten einem gewöhnlichen PCR-Ansatz (2.4). Beide Oligonukleotide dienten dabei sowohl als Primer als auch als Template. Somit konnte mit Hilfe der Pfu-DNA-Polymerase ein vollständiger Doppelstrang synthetisiert und damit die Sequenz entsprechend auf etwa 80 bp (50 + 50 – 20) verlängert werden (Abb. 9A).

Reaktionsansatz (50 µl)	10 µM	Forward-Sequenz
	10 µM	Reverse-Sequenz
	5 µl	PCR-Puffer (10 x)
	1 µl	DMSO
	1 µl	dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid)
	1 µl	Pfu-DNA-Polymerase (5 Units/µl)

Die Bedingungen wurden folgendermaßen eingestellt:

Elongations-Programm

1	94 °C	30 sec	Denaturierung
2	50 °C	30 sec	Annealing
3	72 °C	1 min	Elongation

Die Schritte 1-3 wurden 10 x ausgeführt

Schritt 2

Für den zweiten Schritt wurde jeder Ansatz halbiert. Je zwei dieser halbierten Ansätze wurden vereinigt, deren DNA-Fragmente sich an ihren Enden überlappen. Da die Ansätze alle erforderlichen Reagenzien enthielten, konnte die Reaktion wie in Schritt 1 beschrieben, erneut gestartet werden. Nach der Denaturierung dienten wiederum zwei Einzelstränge, die sich überlappten, sowohl als Template als auch als Primer. Da jedoch die Synthese nur in 5'→3'-Richtung erfolgt, wurden nur diejenigen Stränge verlängert, die sich an ihren 3'-Enden überlappen. Die so synthetisierten Doppelstränge mit einer Länge von 140 bp (80 + 80 – 20) (Abb. 9B) wurden über Gelelektrophorese gereinigt (2.8).

Schritt 3

Im dritten Schritt wurde wiederum so verfahren wie in Schritt 1 beschrieben. Dazu wurden die Proben der gereinigten DNA-Fragmente halbiert und je zwei der halbierten Proben, deren Fragmente sich an ihren Enden überlappen, in einem Ansatz (50 µl) vereinigt. Die Synthese von Doppelsträngen, die nun eine Länge von etwa 260 bp (140 + 140 + 20) hatten, erfolgte dabei wiederum nur an den Fragmenten, die sich an ihren 3'-Enden überlappten (Abb. 9C).

Schritt 4

Um für weitere Schritte die Menge von vollständigen Doppelsträngen zu erhöhen, wurden diese Fragmente mit einer PCR vervielfältigt (Abb. 9D). Dazu dienten die Fragmente aus Schritt 3 als Template, indem 5 % des Ansatzes entnommen und zu einem PCR-Reaktionsansatz gegeben wurden.

Als Primer wurden diejenigen Oligonukleotide verwendet, die zu den 3'-Enden der beiden Einzelstränge des zu amplifizierenden Fragments komplementär waren.

PCR-Programm

1	95 °C	1 min	Denaturierung
2	94 °C	30 sec	Denaturierung
3	72 °C	1 min 30 sec	Annealing + Elongation
5	72 °C	10 min	Elongation

Die Schritte 2+3 wurden 30 x ausgeführt

Das resultierende PCR-Produkt wurde über Gelelektrophorese gereinigt (2.8) und, wie beschrieben, zur weiteren Elongation verwendet. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde nach allen weiteren Elongationsschritten eine PCR mit den gerade verlängerten Fragmenten durchgeführt. Alle weiteren Schritte entsprechen den Schritten 3 und 4. Die komplette Sequenz wurde in pUC18 (SmaI) mit glatten Enden kloniert (Tabelle 6, Zeile 28) und sequenziert (2.6).

Korrektur von Fehlern

Zur Korrektur von Fehlern in der künstlichen Polynukleotidsequenz, zustande gekommen durch fehlerhafte Oligonukleotide oder durch fehlerhafte Synthese, wurde folgendes Verfahren angewandt: Es wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, das in der Nähe des Fehlers band und an seinem 5'-Ende die richtige Sequenz aufwies. Zusammen mit dem entsprechenden Reverse-Primer wurde dann die korrigierte Teilsequenz amplifiziert, wobei die fehlerhafte Sequenz als Template diente. Außerdem wurde eine weitere Sequenz amplifiziert, die sich mit der korrigierten überlappte. Beide Teilsequenzen wurden dann, wie oben beschrieben, in einem gemeinsamen Ansatz fusioniert. Somit konnten mehrere Fehler korrigiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Fehlerkorrektur war gegeben, wenn geeignete Schnittstellen in der Sequenz vorhanden waren. Dabei wurde das fehlerhafte Fragment herausgeschnitten und durch ein Fragment ersetzt, das durch PCR korrigiert wurde. Alle so entstandenen Versionen dieser künstlichen Sequenz wurden durch Sequenzierung überprüft.

2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde nach der Methode von Sanger et al. (1977) mit institutseigenen Geräten oder von der Firma AGOWA in Berlin durchgeführt

Die nicht-radioaktive Sequenzierung nach der Methode von Sanger et al. (1977) beruht auf der Verwendung von Didesoxynukleotiden, die aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe nach dem Einbau zum Abbruch der DNA-Polymerase-Kettenreaktion für diesen Strang führen. Die hier angewandte

Cycle-Sequencing-Methode mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Reaktionsansatz (20 µl)	3,0 µl	DNA-Matrize (~ 600 ng)
	3,0 µl	„Big Dye“
	7,0 µl	„half term“-Puffer
	1,5 µl	Sequenzierungsprimer
	5,5 µl	A. dest.

Programm

1	96 °C	2 min	Denaturierung
2	96 °C	30 sec	Denaturierung
3	50 °C	15 sec	Annealing
4	60 °C	4 min	Elongation

25 Zyklen der Schritte 2-4

Zur Reinigung wurden die Ansätze mit 80 µl A. dest., 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,8 – 8,2) und 250 µl Ethanol (abs., RT) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18 °C, 21.500 x g) wurde das Pellet nach vorsichtiger Entfernung des Ethanols getrocknet. Die anschließende Sequenzanalyse wurde unter Verwendung eines „ABI Prism 377 DNA Sequencers“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durch Frau Ulrike Peters im Haus durchgeführt.

2.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.1 Restriktion von DNA

Die hydrolytische Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB) nach Angaben des Herstellers.

2.7.2 Phosphorylierung von freien DNA-5'-Enden

Chemisch synthetisierte Oligonukleotide enthalten am 5'-Ende keinen Phosphatrest, was die Effizienz der Klonierung von PCR-Produkten und von anderen künstlichen Fragmenten herabsetzt. Die Amplifikate wurden dabei mit der Pfu- (Stratagene) oder Vent-Polymerase (NEB) synthetisiert. Außerdem ist die Ligation solcher Sequenzen mit Vektoren unmöglich, deren Enden zur Verhinderung einer Zirkularisierung dephosphoryliert wurden. Daher wurden 5'-hydroxy-DNA-Fragmente vor ihrer Ligation mit dephosphorylierter Vektor-DNA in einer Phosphorylierungs-Reaktion phosphoryliert. Die „T4 Polynucleotide Kinase“ (NEB) ist ein Enzym, das den Transfer von Phosphatresten mit ATP

als Phosphat-Donator auf das 5'-Ende von Nukleotid-Sequenzen katalysiert. Die Durchführung der Phosphorylierungs-Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Abbruch der Reaktion geschah entweder durch Abkühlung des Ansatzes, durch Zugabe von Probenpuffer zur anschließenden Gelelektrophorese (2.8) oder durch sofortige Reinigung der DNA.

2.7.3 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA

Zur Verhinderung der Zirkularisierung von linearisierter Vektor-DNA mit glatten Enden oder mit Enden, die kompatible Überhänge aufweisen, war die Entfernung der endständigen 5'-Phosphat-Gruppe erforderlich. Diese Dephosphorylierung erfolgte mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, NEB). Da dieses Enzym in verschiedenen Restriktions-Puffern aktiv ist, wurde in den meisten Fällen die Dephosphorylierung der restringierten Vektor-DNA im Restriktionsansatz ohne Pufferaustausch durchgeführt. Falls erforderlich, wurden zuvor die Restriktionsenzyme durch Hitzebehandlung inaktiviert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 0,5 Units pro μg Vektor-DNA bei 37 °C durchgeführt und nach 1 h beendet. Der Abbruch geschah entweder durch Einfrieren des Ansatzes, durch Zugabe von Probenpuffer zur anschließenden Gelelektrophorese (2.8) oder durch sofortige Reinigung der DNA.

2.7.4 Auffüllreaktion zur Beseitigung von DNA-Überhängen

In einigen Fällen waren zur Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA, die durch Restriktion 5'- oder 3'-Überhänge aufwiesen, glatte Enden erforderlich. Zur Entfernung dieser Überhänge standen dabei verschiedene DNA-Polymerasen zur Verfügung, die entweder Überhänge auffüllten oder durch eine Exonuklease-Aktivität die überstehenden Basen entfernten. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Auffüllen von 5'-Überhängen und zur Entfernung von 3'-Überhängen wurde die „DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment“ (NEB) verwendet. Da dieses Enzym in den meisten Restriktionspuffern aktiv ist, wurde die Reaktion nach Beendigung der Restriktion im gleichen Ansatz durchgeführt. Die Inkubation erfolgte unter Zugabe von 1 Unit Enzym pro μg DNA und einem dNTP-Mix (Endkonzentration 200 μM) bei 25 °C für 15 min. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von EDTA (Endkonzentration 10 mM) bei 75 °C für 20 min gestoppt.

2.7.5 Ligation

Zur Ligation von linearisierter Vektor-DNA mit einem oder zwei DNA-Fragmenten wurde die „T4 DNA Ligase“ (NEB) benutzt. Dieses Enzym katalysiert die Verbindung von glatten und kohäsiven Enden. Das Verhältnis der eingesetzten Menge an Vektor-DNA zu den einzelnen DNA-Fragmenten betrug 1:3 bis 1:5. Die DNA-Konzentration wurde dabei entweder mit Hilfe eines UV-Photometers

bestimmt oder in den meisten Fällen abgeschätzt, indem ein definiertes Volumen der DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und nach kurzem Lauf die einzelnen Banden miteinander verglichen wurden. Die Ligationsansätze hatten ein Volumen von 10 oder 20 µl. Pro Ansatz wurde 1 µl Ligase (400 Units pro 1 µl) eingesetzt. Das zur Ligation erforderliche ATP war bereits im Ligase-Puffer enthalten. Ligationsansätze, die DNA mit überhängenden Enden enthielten, wurden 10 min bei RT oder 4 h bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert; Ligationsansätze mit DNA mit glatten Enden wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Eine alternative Methode war die Ligation mit dem „Quick Ligation™ Kit“ (NEB). Diese Ligation konnte nach 5 min bei 25 °C beendet werden, unabhängig davon, ob DNA mit überhängenden oder glatten Enden eingesetzt wurde. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl bestand aus 10 µl „Quick Ligase“-Puffer, Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:3 bis 1:5 und 1 µl „Quick Ligase“.

Die Ligation oder „Quick Ligation“ wurde beendet, indem die Ansätze eingefroren oder auf Eis gestellt und ohne Verzögerung zur Transformation von *E. coli* (2.11.2) benutzt wurden.

2.8 Gelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese wurde angewandt zur präparativen Isolierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten, zur Analyse von DNA-Restriktionsansätzen und zur quantitativen Abschätzung von DNA-Mengen. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 0,8 %, 1,0 % oder 1,2 % verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in 1 x TBE-Puffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen in eine Flachbettkammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels nach etwa 1 h wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer vermischt und aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Kammer bei 80-100 V und 40-100 mA in 1 x TBE-Puffer.

Zur Visualisierung der DNA im Agarosegel wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt. Nach der ersten Methode wurde dem heißen und noch flüssigen Gel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,01 µg/ml zugesetzt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem Transilluminator (Herolab) bei 304 nm detektiert. Die Dokumentation erfolgte mit einem Videoprinter. Nach der zweiten Methode wurden die Proben vor dem Auftragen 10 min mit „SYBR® Green I“ (Molecular Probes, Leiden) inkubiert, das dem Probenpuffer zugesetzt wurde. Dazu wurde eine 100fache Stocklösung des „SYBR® Green I“ 1:6 in 5 x DNA-Probenpuffer verdünnt und 1/5 Volumen dieses Probenpuffers mit den DNA-Proben vermengt. Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente mit einem Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und mit der „AlphaDigiDoc™ System 1000“-Software analysiert.

TBE-Puffer (1 x)	89 mM	Tris-Base
	89 mM	Borsäure
	2 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,3)
Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/ml	Ethidiumbromid in A. dest.
DNA-Probenpuffer (5 x) nachschaun	40 % (w/v)	Glycerol
	100 mM	Na ₂ -EDTA
	0,05 %	Brom-Phenol-Blau

DNA-Längenstandard: 1 kb-DNA-Leiter (MBI Fermentas)

Fragmente: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp

2.9 Reinigung von DNA

Zur Reinigung von enzymatisch behandelten DNA-Fragmenten und Vektoren und von PCR-Produkten standen mehrere Kits zur Verfügung. Mit Hilfe des „Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen wurde DNA nach den Angaben des Herstellers DNA aus Agarosegelen eluiert (2.8). Daneben diente das „PCR Purification Kit“ (Qiagen) dazu, um DNA von Salzen und Enzymen der verschiedenen Reaktionsansätze zu reinigen. Diese Verfahren beruhen darauf, Einzel- und Doppelstrang-DNA in Gegenwart hoher Salz-Konzentrationen an eine Silica-Membran zu binden, durch spezielle Puffer anschließend die DNA zu waschen und zum Schluss die saubere DNA mit Tris-Puffer oder A. dest. zu eluieren.

Zur Reinigung und zur Konzentrierung der DNA wurden spezielle Filter-Säulchen der Firma Millipore benutzt. Hier wird die DNA mit A. dest. verdünnt und über eine Membran gefiltert. Die gereinigte DNA wurde mit A. dest. von der Membran abgewaschen.

2.10 Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten wurde das pUC-System (in einigen Fällen auch pGEM-T-Vektoren) benutzt. pUC18- und pUC19-Vektoren sind „high copy“-Plasmide und mit 2686 bp ziemlich klein. Die Vektoren enthalten den 5'-terminalen Teil des *lacZ*-Gens, das für das N-terminale Fragment einer β -Galaktosidase codiert. Dieses Fragment, das durch die Induktion mit IPTG (2.11.1) synthetisiert wird, ermöglicht die alfa-Komplementation mit der defekten β -Galaktosidase des Expressionswirts. In Anwesenheit von X-Gal (2.11.1) im Medium kommt es dann zur Bildung von blauen Kolonien. Durch Insertion von DNA in die „Multiple Cloning Site“, die sich im *lacZ*-Gen befindet, wird das N-terminale Fragment der β -Galaktosidase inaktiviert und die alfa-Komplementation verhindert. Daher bilden Bakterien, die rekombinante Plasmide tragen, weiße Kolonien. Die Selektion geschieht mit Ampicillin.

Die ORF-Sequenzen und DNA-Fragmente wurden mit Primern amplifiziert, deren Überhänge die geeigneten Schnittstellen enthielten. Nach der Amplifikation der verschiedenen Sequenzen erfolgte in den meisten Fällen eine Zwischenklonierung des PCR-Produktes in den entsprechenden Klonierungsvektoren. Durch Restriktion wurden die entsprechenden Fragmente aus diesen Klonierungsvektoren freigesetzt und zur weiteren Klonierung und Erzeugung der verschiedenen Expressions-, Transformations- und „Knock out“-Konstrukte verwendet. Um die Fragmente in diese Vektoren einsetzen zu können, wurden Polylinker kreiert und die Vektoren damit ausgestattet.

Polylinker-Sequenz: MCS2

5'-AGATCTAGCTAGCTGGGCCAAAGGCCTTTATCCTAGGTTTATACGTACGGATCCGACTAGTCCATGG-3'

Die in dieser Sequenz enthaltenen Schnittstellen sind:

BglII-NheI-ApaI-StuI-AvrII-SnaBI-BamHI-SpeI-NcoI

BglII und NcoI ermöglichen die Freisetzung des Polylinkers aus dem Klonierungsvektor. ApaI und AvrII sind zur Insertion der Chloroplasten-Leadersequenz vorgesehen. Die StuI-Schnittstelle ermöglicht dabei auch eine Insertion von DNA mit glatten Enden. AvrII und BamHI dienen zur Klonierung des jeweiligen ORF, der sich im fortlaufenden Leseraster an die Leadersequenz anschließt. Mit SnaBI können Inserts mit glatten Enden in das offene Leseraster eingefügt werden. NheI, AvrII und SpeI bilden nach der Restriktion kompatible Enden, sodass die Inserts bei Bedarf eliminiert werden können und der Vektor wieder zirkularisiert werden kann. Außerdem bilden die Schnittstellen verschiedene Alternativen für den Fall, dass die zu inserierenden Fragmente bereits eine dieser Schnittstellen enthalten.

ORF-Sequenzen erhielten die Schnittstellen 5'-AvrII und 3'-BamHI,

Chloroplasten-Leadersequenzen wurden mit 5'-ApaI und 3'-AvrII ausgestattet.

Polylinker-Sequenz: MCS1

5'-gatcTGGTACCCCGGCCTTAATTAAG-3'

Die in dieser Sequenz enthaltenen Schnittstellen sind: KpnI-SmaI-PacI

Der 5'-Überhang (gatc) dieses Fragments ist zum Überhang einer mit BamHI verdauten Sequenz kompatibel. Er kann mit der BamHI-Schnittstelle in pUC18 oder pCAMBIA ligieren, wobei diese ligierte Stelle von BamHI nicht mehr erkannt wird, was für die weitere Klonierung von Bedeutung ist.

KpnI und PacI ermöglichen die Insertion von Konstrukten zur Gen-Inaktivierung, die entsprechend mit 5'-KpnI und 3'-PacI ausgestattet sind. SmaI bietet eine alternative Schnittstelle und ermöglicht eine Klonierung mit glatten Enden.

Die Organismen, aus denen ORF-Sequenzen oder DNA-Fragmente isoliert wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt. Als Template für die Amplifikation diente genomische DNA. Tabelle 3 zeigt die verschiedenen ORFs der in dieser Arbeit untersuchten putativen bakteriellen Glykosyltransferasen. Weiterhin standen zwei cDNA-Klone, zwei bereits charakterisierte Glykosyltransferasen und eine weitere Glykosyltransferase, bei der es sich nach Dr. Bergström um eine α GalD-Synthase handelt, zur Verfügung (Tabelle 3). Die Klonierungsvektoren sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die in dieser Arbeit durch Klonierung von PCR-Produkten entstandenen rekombinanten Plasmide, die lediglich zur Subklonierung dieser Sequenzen dienten, sind in Tabelle 6, die durch Martina Leipelt subklonierten PCR-Produkte in Tabelle 5 zu sehen. Diese beiden Tabellen zeigen die Bezeichnung des ORF oder Inserts, das zur Amplifikation benutzte Primer-Paar, die Art des Templates, das resultierende rekombinante Plasmid sowie eine kurze Erläuterung. Eine Auflistung der Primer-Sequenzen befindet sich im Anhang.

2.10.1 Klonierung von ORF-Sequenzen

Die ORFs in Zeile 9-21 wurden mit Primern, die Schnittstellen enthielten, auf genomischer DNA amplifiziert und in pUC18 (SmaI) kloniert. Um diese Vektoren auch zur Expression nutzen zu können, erfolgte die Insertion in das offene Leseraster des *lacZ*-Gens.

Da die Amplifikation mit einer „proofreading DNA Polymerase“ erfolglos war, wurden die ORFs in Zeile 1-5 (Tabelle 6) zunächst mit Primern ohne Überhänge mit der Taq-DNA-Polymerase amplifiziert und in pGEM-T in das offene Leseraster des *lacZ*-Gens kloniert (für die spätere Expression). Um einige dieser ORFs (Tabelle 6, Zeile 6-8) mit Schnittstellen zu versorgen, erfolgte eine erneute Amplifikation mit entsprechenden Primern und anschließende Klonierung in pUC18 (SmaI).

Die beiden ORFs in Zeile 35 und 36 (Tabelle 6) wurden ebenfalls durch Amplifikation mit entsprechenden Schnittstellen versehen und in pUC18 (SmaI) inseriert. Als Template dienten die entsprechenden rekombinanten Plasmide von Martina Leipelt (Tabelle 5, Zeilen 1, 2).

Die Amplifikation der ORFs in den Zeilen 22, 24 und 26 (Tabelle 6) erfolgte mit Primern ohne Schnittstellen, wobei Plasmide als Template dienten. Die Klonierung erfolgte in das offene Leseraster des *lacZ*-Gens in pUC19 (mit aufgefüllter SalI-Schnittstelle) zur späteren Expression. Um diese ORF-Sequenzen für weitere Klonierungen zu nutzen, wurden die Amplifikate in den Vektor p18MCS2 (Tabelle 6, Zeile 50) kloniert (SnaBI) und auf diese Weise mit den gewünschten Schnittstellen ausgestattet (Tabelle 6, Zeilen 23, 25, 27).

Die Amplifikation der ORFs der beiden cDNA-Klone (Tabelle 6, Zeilen 37, 38) erfolgte mit Primern, die jedoch andere Schnittstellen als die meisten der verwendeten Primer aufwiesen. Als Template diente Plasmid-DNA. Die Klonierung erfolgte entweder mit glatten Enden in pUC19 (SalI, aufgefüllt) in den offenen Leserahmen des *lacZ*-Gens oder gerichtet mit den Schnittstellen BamHI/XbaI in pBK-CMV. Beide Plasmide wurden für die spätere Expression verwendet.

Die ORF-Sequenzen in Tabelle 5 wurden von Frau Leipelt amplifiziert und kloniert. Die ORFs in den Zeilen 1 und 2 wurden in pUC18 (SmaI) in den offenen Leserahmen des *lacZ*-Gens kloniert, jedoch nicht mit Schnittstellen versehen. Der ORF in Zeile 5 wurde durch Amplifikation mit den Schnittstellen NcoI/BamHI versehen und in pUC18 (SmaI) kloniert. Der ORF in Zeile 6 erhielt durch Amplifikation die Schnittstellen EcoRV/SmaI und wurde ebenfalls in pUC18 (SmaI) inseriert.

Das Expressionskonstrukt pETppDGDS enthält den ORF der putativen α Gal β GalD-Synthase aus *P. patens* und ist das Ligationsprodukt aus pET-24d (SalI/NotI) und dem Insert des Vektors pBK-CMVppDGDS (Tabelle 6, Zeile 38) freigesetzt mit SalI/NotI. pETppMGDS (von Claudia Hörnle) enthält den ORF der putativen β GalD-Synthase von *P. patens* (amplifiziert mit den Primern CH6 und CH7, mit NcoI/BamHI in pET-24d inseriert). Das Konstrukt pETAt-GlyT wurde von M. Leipelt durch Ligation des ORFs (NcoI/BamHI) aus pUCNagroB (Tabelle 5, Zeile 5) mit dem Vektor pET-24d (NcoI/BamHI) konstruiert.

2.10.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Weitere DNA-Fragmente, die amplifiziert und kloniert wurden, sind ebenfalls in Tabelle 6 zu sehen. Das Fragment in Zeile 28 repräsentiert die erste Version der künstlichen Glukosyltransferase-Sequenz (2.5). Mit entsprechenden Primern wurde diese Sequenz mit den gewünschten Schnittstellen versehen und in pUC18 (SmaI) in das offene Leseraster des *lacZ*-Gens kloniert. In Zeile 28 sind verschiedene Teilsequenzen zu sehen, deren Gesamtheit ebenfalls die künstliche Polynukleotidsequenz darstellen. Diese Teilsequenzen sind das Ergebnis der Korrektur von falschen Basen der Version 1. Diese Teilsequenzen wurden nicht zwischenkloniert, sondern in mehreren Schritten wie beschrieben (2.5) fusioniert, wodurch Version 2 (Zeile 30) entstand. Diese wurde, wie Version 1, mit Schnittstellen versehen und in pUC18 kloniert. Das Fragment in Zeile 31 ist eine durch PCR korrigierte Teilsequenz

der Version 2, die zusätzlich mit Schnittstellen versehen wurde, um die fehlerhafte Teilsequenz in Version 2 durch Restriktion zu ersetzen. Die Zwischenklonierung erfolgte in pUC18.

Das Fragment in Zeile 34 repräsentiert ebenfalls die künstliche Polynukleotidsequenz Version 3, jedoch ausgestattet mit einer weiteren Schnittstelle (NcoI) am 5'-Ende, die für spätere Klonierungen erforderlich ist. In den Zeilen 34 und 39 sind zwei Sequenzen von Kan^R-Kassetten dargestellt, die durch Primer mit entsprechenden Schnittstellen amplifiziert wurden. Die Kasette in Zeile 34 wurde in pUC18 (SmaI) zwischenkloniert, das PCR-Produkt in Zeile 39 wurde ohne Zwischenklonierung restringiert und weiter verwendet. Die Fragmente in den Zeilen 40-43 wurden zur Klonierung von Konstrukten zur Inaktivierung der Enzymaktivität von MGD1 oder DGD1 in *A. thaliana* benutzt. Die Amplifikation erfolgte auf genomischer DNA zur Isolierung eines Fragments, das entweder nur Teile eines Exons umfasste oder noch zusätzlich das nachfolgende Intron enthielt. Diese Fragmente wurden in pUC18 (SmaI) zwischenkloniert und besaßen die entsprechenden Schnittstellen. Zur Klonierung von „Knock out“-Konstrukten für *Physcomitrella* wurden die genomischen Sequenzen der $\Delta 6$ -Desaturase sowie der putativen β GalD-Synthase und α Gal β GalD-Synthase, ausgestattet mit entsprechenden Schnittstellen, amplifiziert und in pUC18 (SmaI) zwischenkloniert (Zeilen 45-47). Die Chloroplasten-Leadersequenz der putativen β GalD-Synthase von *Physcomitrella* wurde auf cDNA amplifiziert und das restringierte PCR-Produkt in pRT101neo (NcoI/XbaI) inseriert (Zeile 48). Die Chloroplasten-Leadersequenz aus Tabak wurde auf genomischer DNA mit entsprechenden Schnittstellen amplifiziert und mit pUC18 (SmaI) ligiert (Zeile 44).

Das Polylinker-Fragment MCS1 wurde aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden, die komplementär zueinander waren, durch eine Annealing-Reaktion erzeugt. Die beiden Einzelstränge (Endkonzentration jeweils 5 mM) wurden bei fallender Temperatur, beginnend mit 70 °C (1 min), dann 60 °C (3 min), 50 °C (5 min) und zuletzt 40 °C (5 min), in einem Ansatz (20 μ l) mit A. dest. inkubiert. Die Synthese des Polylinkers MCS2 erfolgte in einer PCR bei 45 °C Annealing-Temperatur und 10 Zyklen. Beide Polylinker wurden in pUC18 zwischenkloniert (Zeilen 49, 50).

Die Sm^R/Sp^R-Kasette sowie die flankierenden Bereiche der Konstrukte zur Inaktivierung der putativen Glukosylceramid-Synthase (Gcs) in *A. tumefaciens* wurden von M. Leipelt mit entsprechenden Schnittstellen versehen, amplifiziert und in pUC18 (SmaI) zwischenkloniert (Tabelle 5, Zeilen 3, 4, 7).

2.11 Methoden beim Arbeiten mit *E. coli*

2.11.1 Kultivierung von *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *E. 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), Chloramphenicol (30 µg/ml Endkonzentration) oder Kanamycin (30 µg/ml Endkonzentration) steril zugesetzt. Die Antibiotika wurden als tausendfach konzentrierte Stammlösung in A. dest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Bei Klonierungen in die Vektoren pUC18, pUC19 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 25 g/l LB-Broth (Duchefa), zusammengesetzt aus 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl
1,5 % (w/v) Agar (AppliChem) für Platten
der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 7,5 eingestellt

SOB-Medium 20 g/l Bacto-Pepton (Difco)
5 g/l Hefeextrakt (Difco)
0,6 g/l NaCl
0,18 g/l KCl
2 ml 1 M MgSO₄
2 ml 1 M MgCl₂
MgSO₄ und MgCl₂ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben

SOC-Medium 20 g/l Bacto-Pepton (Difco)
5 g/l Hefeextrakt (Difco)
0,5 g/l NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgSO₄
10 mM MgCl₂
20 mM 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 $OD_{600} = 1$ einer Zelldichte von $1-2 \times 10^9$ Zellen/ml.

Dauerkulturen

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

2.11.2 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen zur Transformation erfolgte nach einer Methode von Inoue et al. (1990). Hierzu wurden 200 ml SOB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180 – 200 rpm) bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (4.000 x g, 10 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen wurden in 80 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Nach einer weiteren 10-minütigen 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 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

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

Zur Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit maximal 20 μ l Ligationsansatz oder Plasmid-DNA versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einem Hitzeschock von 90 sec bei 42 °C ausgesetzt und dann erneut für 1-2 min auf Eis gestellt. Zur Etablierung der Plasmide und zur Regeneration der Zellen wurden die Ansätze mit 800 μ l SOB-Medium versetzt und 40 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurde ein Aliquot dieses Ansatzes auf LB-Selektivmedien ausplattiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet.

Für Transformationen mit Ligationsprodukten, die größer als 12.000 bp waren, wurden kommerziell erhältliche kompetente *E. coli*-Zellen („SURE[®] strain“, Stratagene) benutzt und nach Angaben des Herstellers transformiert.

2.11.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von kleineren Mengen Plasmid-DNA wurde die modifizierte Methode von Riggs et al. (1986) angewendet. Dazu wurde eine Übernacht-Kultur (2 ml) abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Zum Aufschließen der Zellen wurde das Pellet in 200 µl BF-Puffer mit Lysozym (1 mg/ml) resuspendiert und kurz inkubiert (1-2 min). Um beim anschließenden Erhitzen einen Überdruck in den Reaktionsgefäßen zu verhindern, wurden zuvor die Deckel mit einer Kanüle eingestochen. Das Erhitzen im Thermoblock bei 95 °C oder im kochenden Wasserbad dauerte 1 min, gefolgt von einer sofortigen Abkühlung auf Eis. Um Zelltrümmer, Proteine und genomische Bakterien-DNA zu entfernen, wurden die Ansätze 30 min bei 13.000 rpm (Biofuge) abzentrifugiert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Überführung der Überstände in neue Gefäße mit je 480 µl IS-Mix. Nach kurzer Ruhe von 1-2 min wurde die präzipitierte Plasmid-DNA für 20 min bei 13.000 rpm (Biofuge) sedimentiert. Nach dem Entfernen der Überstände wurden die Pellets mit je 500 µl 70 % Ethanol unter mehrmaligem Schwenken gespült, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierte DNA getrocknet, anschließend in 80 µl H₂O aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

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

Lysozym-Lösung	20 mg/ml	Lysozym
	wird bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch zugegeben	

IS-Mix	400 µl	Isopropanol
	80 µl	Ammoniumacetat (5M)

In Einzelfällen wurde zur Präparation von Plasmid-DNA das „Nucleospin[®] Plasmid Kit“ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11.4 Funktionale Expression in *E. coli*

Zur Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der putativen Glykosyltransferasen aus Bakterien und der putativen βGalD- und αGalβGalD-Synthase aus *P. patens* wurde eine funktionale Expression in *E. coli* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das pUC-System, das pET-System der Firma Novagen (Heidelberg) und das pTrc-System der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA) eingesetzt. In einigen Fällen wurde die Expression auch mit den pGEM-T-Vektoren (Promega, Mannheim) durchgeführt. Die verschiedenen *E. coli*-Stämme mit den unterschiedlichen Vektor-Systemen wurden, mit Ausnahme des zugesetzten Antibiotikums, unter gleichen Bedingungen zur funktionalen

Expression kultiviert. Dazu wurde aus einer Übernacht-Vorkultur (1,5 ml) eine 50 ml-Hauptkultur angeimpft, ca. 3-4 h bei 37 °C inkubiert, bei einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,8 mit 0,4 mM IPTG induziert und nach 4 h durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 x g geerntet.

Funktionale Expression im pUC-Vektor-System

Das pUC-System wurde, wie schon besprochen (2.10), zur Subklonierung verschiedener DNA-Fragmente benutzt. Es wurde aber auch zur funktionalen Expression in *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die Expression dieser Vektoren erfolgt unter dem *lacZ*-Promotor, wobei der zu exprimierende ORF in das offene Leseraster des *lacZ*-Gens eingefügt sein muss, um ein funktionales Protein zu erhalten. Bei dem resultierenden Protein handelt es sich um ein Fusionsprotein, mit einigen N-terminalen Aminosäuren aus dem N-terminalen Fragment der β -Galaktosidase. Als Expressionswirt für dieses System wurde *E. coli* XL1-Blue benutzt. Die Selektion erfolgte mit Ampicillin.

Funktionale Expression im pTrc-Vektor-System

Das pTrc-System wurde wegen des *trc-* (*trp-lac*) Promotors (Egon et al., 1983) ausgewählt, der ein hohes Expressions-Niveau garantiert. Der *trc*-Promotor enthält die -35-Region des *trp*-Promotors zusammen mit der -10-Region des *lac*-Promotors (Brosius et al., 1985; Egon et al., 1983). Um die Expression unabhängig vom gewählten Wirtsorganismus zu regulieren, ist der Vektor zusätzlich mit dem Gen ausgestattet, das für den *lac*-Repressor (*laqI^r*) kodiert. Dieser bindet an den *lac*-Operator (*lacO*), der dem *trc*-Promotor nachgeschaltet ist, um die Transkription des Zielgens zu unterdrücken. Die Expression des Zielgens wird mit IPTG induziert. Die Selektion erfolgt mit Ampicillin. Als Expressionswirt für dieses System wurde *E. coli* XL1-Blue benutzt.

Funktionale Expression im pET-Vektor-System

Im pET-Vektor-System erfolgt die Transkription der DNA durch die T7-RNA-Polymerase. Dazu ist in allen Vektoren dem Polylinker ein T7-Promotor vorgeschaltet, von dem aus die Transkription in Richtung Insert startet. Da die Expression des klonierten Gens nur in Gegenwart der T7-RNA-Polymerase stattfinden kann, wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und C41(DE3) verwendet, denen das Gen für dieses Enzym ins Genom integriert wurde. Das Gen steht unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und ist mit IPTG induzierbar. Die hier verwendeten pET-Vektoren erlaubten eine Selektion mit Kanamycin.

2.11.5 Präparation von Gesamtmembranen

Zunächst wurden die Zellen einer Überexpressionskultur (25 ml) 10 min bei 5.000 x g sedimentiert und auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer 1 gewaschen und in 2 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte das Aufbrechen der Zellwand mit Hilfe eines Ultraschallstabes. Diese Behandlung umfasste 8 Zyklen mit je 10 sec Beschallung, gefolgt von einer kurzen Abkühlungsphase, um eine Überhitzung der Suspension zu vermeiden. Zur Abtrennung von Zellfragmenten und intakt gebliebenen Zellen wurde der Bakterienextrakt 1 min bei 7.000 rpm (Biofuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 5 ml Puffer 2 verdünnt. Die Sedimentation der Membranen erfolgte durch Zentrifugation des verdünnten Überstandes in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g für 30 min. Der Überstand aus dieser Zentrifugation, in dem sich lösliche Proteine befanden, wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 2 ml Puffer 2 gewaschen, um noch verbliebene Reste des Überstandes zu beseitigen. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer 2 resuspendiert und die so erhaltene Membranfraktion für Enzymtests eingesetzt.

Puffer 1	50 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	15 % (v/v)	Glycerol
	0,5 mg/ml	Lysozym
Puffer 2	50 mM	Tris-HCl (pH 8,2)
	7 % (v/v)	Glycerol

2.12 Methoden beim Arbeiten mit *A. tumefaciens*

Das pflanzenpathogene Bakterium *A. tumefaciens* ist in der Lage, Pflanzen zu infizieren und eigene DNA ungerichtet ins pflanzliche Genom zu integrieren. Dieser Organismus wird daher als genetisches Werkzeug zur Transformation von Pflanzen eingesetzt. Diese Methode fand Anwendung in dieser Arbeit, um *A. thaliana* zu transformieren.

Neben dieser Anwendung wurden Experimente mit genetisch veränderten Zellen von *A. tumefaciens* zur funktionalen Charakterisierung von nativen Glykosyltransferasen durchgeführt.

2.12.1 Kultivierung von *A. tumefaciens*

Zellen von *A. tumefaciens* Stamm ATHVC58C1, einem Derivat des Stammes EHA 101 (Hood et al., 1986), freundlicherweise bereitgestellt von Dr. J. Dettendorfer, KWS, Einbeck, wurden auf festen oder flüssigen Vollmedien, hauptsächlich in YEP oder LB (siehe 2.11.1) bei 28 °C mit Rifampicin (80 µg/ml Endkonzentration) angezogen. Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180-200 rpm) oder Rotation belüftet.

Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme oder von Deletionsmutanten wurde dem Medium Chloramphenicol (50 µg/ml Endkonzentration) oder Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration) steril zugesetzt. Zellen für Promotorstudien wurden mit Streptomycin (300 µg/ml Endkonzentration) und Spectinomycin (100 µg/ml Endkonzentration) selektiert.

Die Antibiotika wurden als tausendfach konzentrierte Stammlösung in A. dest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Dauerkulturen

Zum Anlegen einer Dauerkultur wurde eine 24 h-Kultur der Zellen mit dem gleichen Volumen 70 % (w/v) Glycerol (autoklaviert) gemischt und bei -70 °C gelagert.

Transformationskulturen

Zur Transformation von *A. thaliana* wurde zunächst *A. tumefaciens* mit den entsprechenden Pflanzen-Transformationsvektoren transformiert. Aus diesen transgenen Zellen wurden 2 ml-Vorkulturen angezogen und damit 50 ml-Hauptkulturen angeimpft. Das Wachstum beider Kulturen dauerte jeweils 24 h. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 x g und RT. Die Zellen wurden in Transformationsmedium (siehe 2.17.2) für *A. thaliana* resuspendiert und unverzüglich zur Transformation verwendet.

YEP	10 g/l	Pepton
	10 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	15 g/l	Micro-Agar für Platten
		pH 7,2

2.12.2 Transformation von *A. tumefaciens*

Transformation durch Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde eine Hauptkultur (500 ml) mit 10 ml einer Übernacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Vor dem Ernten der Zellen wurde die Hauptkultur zunächst für 15 bis 30 min auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4.000 x g für 15 min. Der Überstand wurde verworfen, das Zell-Pellet in 400 ml sterilem H₂O resuspendiert und diese

Suspension 15 min auf Eis gehalten. Diese Schritte wurden wiederholt. Das Pellet wurde in 0,5 bis 1 ml sterilem Glycerol (10 %) resuspendiert. Aliquots von 40 μ l wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit maximal 5 μ l DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die DNA musste dabei frei von Salzen sein. Die inkubierten Zellen wurden im Anschluss in vorgekühlte Elektroporations-Küvetten überführt. Jeweils eine Küvette wurde in den Küvettenhalter des Elektroporator inseriert. Dabei war darauf zu achten, dass keine Bläschen in dem Zell-Gemisch enthalten waren. Der angelegte Puls betrug 12,5 kV/cm, das entsprach 2400 V/2 mm in den entsprechenden Küvetten. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen für 2 min auf Eis gestellt und anschließend zur Regeneration in 1 ml SOB-Medium (siehe 2.11.1) für 4 h bei 28 °C inkubiert. Aliquots dieser Transformationsansätze wurden auf Selektivplatten ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

Transformation mit der „freeze thaw“-Methode

Obwohl die „freeze thaw“-Methode (An et al., 1988) eine niedrige Transformationshäufigkeit aufweist (ungefähr 10³ Transformanten pro μ g DNA), handelt es sich hierbei um eine schnelle und zuverlässige Methode. Diese Methode wurde dazu benutzt, um *A. tumefaciens* mit vorgefertigten Plasmiden zu transformieren, entweder zur Genexpression in *A. tumefaciens* oder zum Zwecke der Transformation von *A. thaliana*.

Zur Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde eine 50 ml-Kultur mit 2 ml einer Übernacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 angezogen. Vor dem Ernten der Zellen wurde die Kultur zunächst für kurze Zeit auf Eis gekühlt. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4.000 x g und 10 min. Der Überstand wurde verworfen, das Zell-Pellet in 1 ml 20 mM CaCl₂ resuspendiert und diese Suspension in 0,1 ml-Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt. Die Zellen waren jetzt bereit zur Transformation oder konnten in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70 °C gelagert werden.

Zur Transformation wurde den frischen oder schockgefrorenen Zellen 1 μ g Plasmid-DNA zugesetzt, wobei die frischen Zellen anschließend für 15 sec in flüssigem N₂ schockgefroren wurden. Dann wurden die Zellen bei 37 °C für 5 min inkubiert, im Anschluss mit 1 ml YEP-Medium versetzt und weitere 2-4 h bei 28 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Diese Zeitspanne erlaubt es den Bakterien, die entsprechenden Antibiotika-Resistenzgene zu exprimieren. Danach wurden Aliquots dieser Bakteriensuspension auf YEP-Selektivplatten ausplattiert und im Dunkeln bei 28 °C für 2-3 Tage inkubiert. Einzelne Kolonien wurden auf weitere Selektivplatten überimpft und durch Kolonie-PCR (2.4) überprüft.

2.12.3 Konstrukte zur Deletion des putativen *gcs*-Gens und für Promotorstudien in *A. tumefaciens*

Die Insertion von Fremd-DNA ins Genom von *A. tumefaciens* erfolgte über homologe Rekombination. Dazu wurde das Bakterium mit rekombinanter DNA transformiert. Diese bestand aus der Fremd-DNA und zwei flankierenden Sequenzen, die homolog zu dem Locus waren, der durch Insertion dieser Fremd-DNA unterbrochen werden sollte. Die Transformation mit der aus den entsprechenden Plasmiden freigesetzten rekombinanten DNA wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Eine schematische Darstellung der Gen-Deletion und der Inserierung des Reportergens ist in Abb. 10 zu sehen.

Die Zellen dieser Insertionsmutanten wurden unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen angezogen, durch Zentrifugation bei 8.000 x g für 30 min geerntet und für Lipidanalysen eingesetzt.

Deletion des putativen *gcs*-Gens

Die Deletion des putativen *gcs*-Gens in *A. tumefaciens* wurde durch die Integration einer Kan^R-Kassette an diesen Gen-Lokus in umgekehrter Orientierung zum *gcs*-Gen etabliert. Dabei wurden Teile des putativen Promotors (~700 bp) und des ORF (384 bp) durch diese Selektionskassette ersetzt. Das entsprechende Transformationskonstrukt bestand dabei aus dem 5'-Ende der Promotor-Sequenz und dem 3'-Ende des ORF der putativen Gcs, die beide zusammen eine Kan^R-Kassette flankierten. Die vollständige putative Promotor-Sequenz (2100 bp), der Gcs-ORF und die Kan^R-Kassette sind in den Vektoren p18agro1 (Tabelle 5, Zeile 3), p18agro (Tabelle 6, Zeile 35) und p18BnptIIH (Tabelle 6, Zeile 34) zwischenkloniert. Die weitere Klonierung erfolgte in pBluescript (KpnI/SpeI) in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dem daraus resultierenden Vektor pBa1na5 (Tabelle 8). pBa1na5 entstand durch Ligation von pBa1n (EcoRV/SpeI) mit dem am 5'-Ende verkürzten ORF der putativen Gcs aus p18agro. Zur Verkürzung dieses ORF wurde der Vektor p18agro zunächst mit AscI linearisiert, wobei sich die entsprechende Schnittstelle im Gcs-ORF befand. Der Überhang an dem nun verkürzten 5'-Ende des Gcs-ORF wurde anschließend aufgefüllt. Die so geglättete Schnittstelle ermöglichte die spätere Ligation mit der glatten Schnittstelle des Vektors pBa1n. Zuvor jedoch erfolgte die vollständige Freisetzung des am 5'-Ende verkürzten und geglätteten Gcs-ORF durch eine weitere Restriktion mit SpeI. pBa1n (nicht in den Tabellen aufgeführt) ist das Ligationsprodukt von pBluescript (KpnI/SalI) mit den zwei Inserts aus p18agro1 (KpnI/HindIII) und der Kan^R-Kassette aus p18BnptIIH (HindIII/SalI). Die Freisetzung des Deletionskonstrukts aus pBa1na5 erfolgte mit KpnI/SacI.

Konstrukte für Studien zum Promotor des putativen *gcs*-Gens

Die Promotorstudien erfolgten mit Hilfe der prozessiven β -Glukosyltransferase von *S. aureus* (*ugt106B1*) (Jorasch et al., 2000), dessen ORF als Reportergen hinter den putativen *gcs*-Promotor inseriert wurde. Zu diesem Zweck wurden etwa 600 bp am 5'-Ende der *gcs*-Gensequenz durch die Sequenz der heterologen Glukosyltransferase zusammen mit einer $\text{Sm}^{\text{R}}/\text{Sp}^{\text{R}}$ -Kassette ersetzt. Die Glukosyltransferase wurde dabei exakt in den Lokus des ersetzten Gcs-ORF inseriert. Der Vektor für die *ugt106B1*-Insertion wurde in mehreren Schritten mit aufeinander folgenden Integrationen von vier Fragmenten in pBluescript (KpnI/EcoRV) erzeugt. Um den Umfang dieser Arbeit nicht zu sehr auszuweiten, werden die einzelnen Schritte nicht weiter erläutert. Die Fragmente wurden durch Restriktion aus p18agro1, p18Staph, p18SS und p18agro2 mit den angegebenen Enzymen (Tabelle 5, Zeilen 3, 6, 7 und 4) freigesetzt. Der resultierende Vektor pBalsaySSa2 (Tabelle 8) wurde zur Freisetzung des Transformationskonstrukts mit KpnI/SacI verdaut.

Überprüfung der Insertionen mit PCR

Die Insertion der Fremd-DNA in den Lokus des *gcs*-Gens wurde mit Kolonie-PCR (2.4) überprüft. Bei sehr großen zu amplifizierenden Bereichen (größer als 3.000 bp) erfolgte der Einsatz der „Herculase^R Enhanced DNA Polymerase“ (Stratagene) nach Angaben des Herstellers, ansonsten wurde die Taq-DNA-Polymerase (NEB) verwendet.

Um die Deletion des *gcs*-Gens und die Insertion der Kan^R-Kassette zu überprüfen, wurden folgende Primer-Paare benutzt.

12F/16R	Amplifikation im 5'-Bereich zur Überprüfung der korrekten Insertion der Fremd-DNA
15F/15R	Amplifikation im 3'-Bereich der Fremd-DNA
12F/15R	Amplifikation über den komplett betroffenen Bereich

Die Primer-Paare (12F/16R und 15F/15R) sind so gewählt, dass einer der beiden Primer im Genom und folglich außerhalb der entsprechenden flankierenden Sequenz und der andere an der inserierten Fremd-DNA bindet. Beide Primer sind dabei gegenläufig. Somit kommt es nur im Falle einer Integration dieser Fremd-DNA in den entsprechenden Lokus zur Bildung der entsprechenden PCR-Produkte. Die beiden Primer 12F/15R binden außerhalb der von der homologen Rekombination betroffenen Bereiche und amplifizieren die DNA des betreffenden Lokus, die sich nach erfolgreicher Rekombination von der entsprechenden Wildtyp-DNA unterscheidet. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mit Gelelektrophorese (2.8).

Entsprechendes gilt auch für die Insertion der *ugt106B1*-Sequenz von *S. aureus* inklusive der Sm^R/Sp^R-Kassette, überprüft durch folgende Primer-Paare.

- | | |
|---------|---|
| 12F/12R | Amplifikation im 5'-Bereich zur Überprüfung der korrekten Insertion der Fremd-DNA |
| 13F/13R | Amplifikation im 3'-Bereich der Fremd-DNA |
| 14F/14R | Amplifikation über den komplett ersetzten Bereich vom 5'- zum 3'-Ende |

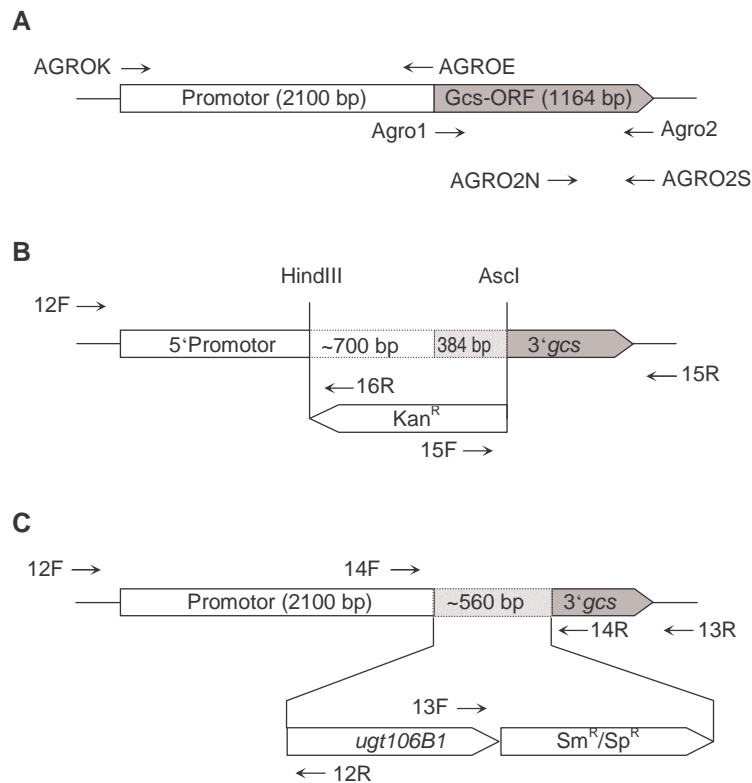


Abb. 10 Schematische Darstellung der Konstrukte, die zur Deletion des *gcs*-Gens in *A. tumefaciens* und zur Expression der heterologen Glukosyltransferase aus *S. aureus* führen. (A) Anordnung der putativen Promotor-Region gefolgt vom ORF der putativen Gcs im Wildtyp. Mit den Primer-Paaren AGROK/AGROE, Agro1/Agro2 und AGRO2N/AGRO2S wurden die Promotor-Sequenz, der Gcs-ORF und ein 600 bp-Fragment am 3'-Ende des Gcs-ORF amplifiziert. (B) Die Deletion erfolgte durch Insertion einer Kan^R-Kassette im Locus des *gcs*-Gens. Die 5'-Sequenz des Promotors und die 3'-Sequenz des Gcs-ORF wurden als flankierende Sequenzen zur Insertion einer Kan^R-Kassette durch homologe Rekombination benutzt. Diese Insertion sollte zur Deletion des 5'-Endes des Gcs-ORF und der angrenzenden 3'-Promotor-Sequenz führen, wobei 384 bzw. 700 bp betroffen sind. Die Primer-Paare 12F/16R, 15F/15R und 12F/15R wurden zur Verifizierung der korrekten Insertion des Deletionskonstrukts benutzt. (C) Das Konstrukt für die Promotorstudien bestand aus dem *ugt106B1*-Gen von *S. aureus* und einer Sm^R/Sp^R-Kassette. Die Promotor-Sequenz von 2100 bp und das amplifizierte 3'-Ende des Gcs-ORF von 600 bp dienten als flankierende Sequenzen. Die Insertion erfolgte durch homologe Rekombination. Die Deletion des 5'-Endes des Gcs-ORF von 560 bp sollte zur Inaktivierung möglicher Gcs-Aktivität führen. Die Primer-Paare 12F/12R, 13F/13R, und 14F/14R wurden zur Verifizierung der korrekten Insertion dieses Konstruktes benutzt.

2.12.4 Expressionskonstrukte und funktionale Expression in *A. tumefaciens*

Expressionskonstrukte für *A. tumefaciens*

Zur Erzeugung stabiler Expressionsvektoren in *A. tumefaciens* wurde die Sequenz des Replikations-Ursprungs „pVS1 rep“ aus pCambia2200 mit BstZ17I/HincII ausgeschnitten und in die mit BstZ17I linearisierten Vektoren pTnSa-GlcT, pTnAt-GlyT und pTnMl-GlyT eingesetzt. Die Beschreibung dieser Vektoren erfolgt unter Punkt 2.13.3. Daraus resultierten die Expressionsvektoren pTnVSA-GlcT, pTnVAt-GlyT und pTnVMl-GlyT (Tabelle 7), die zur Transformation mit der „freeze-thaw“-Methode benutzt wurden.

Funktionale Expression in *A. tumefaciens*

Zur funktionalen Expression der beiden putativen Gcs-Sequenzen aus *A. tumefaciens* und *M. loti* sowie der prozessiven β -Glukosyltransferase aus *S. aureus* als Kontrolle wurden 50 ml-Kulturen aus Vorkulturen angeimpft, die 24 h kultiviert wurden. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 1,0 mit 0,4 mM IPTG und wurde nach 15 h durch Zentrifugation der Zellen bei 8.000 x g für 30 min beendet.

2.12.5 Präparation von Gesamtmembranen

Zunächst wurden die Zellen einer 25 ml-Kultur, die bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 2,0 gewachsen war, 15 min bei 5.000 x g sedimentiert und auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden, wie für *E. coli* beschrieben, durchgeführt (siehe 2.11.5). Die erhaltene Membranfraktion wurde für Enzymtests eingesetzt.

2.13 Methoden beim Arbeiten mit *Synechococcus* sp. PCC7942

Blualgen sind als prokaryotische Modellsysteme zur Untersuchung der oxygenen Photosynthese attraktiv, denn sie sind genetisch leicht zu manipulieren. Von besonderem Interesse sind dabei die *Synechococcus*-Stämme R2-PIM8 und R2-PIM9 (van der Plas et al., 1990) mit einer genomischen Integrationsplattform. Der Transfer von Konstrukten erfolgt durch homologe Rekombination mit stabiler Integration dieser Fremd-DNA ins Genom. Die Integrationsplattform befindet sich im *MetF*-Gen von *Synechococcus*, das sich ohne Wachstumsbeeinträchtigung inaktivieren lässt, wenn dem Medium Methionin zugegeben wird. Zur Etablierung dieser Integrationsplattform wurde ein DNA-Fragment in dieses *MetF*-Gen integriert, das aus Teilsequenzen des *E. coli*-Vektors pBR322 generiert wurde und im Falle von R2-PIM8 eine Sm^R-Kassette trägt (van der Plas et al., 1990). Diese Teilsequenzen bestehen aus einem Fragment der Amp^R-Kassette, die in dieser Form inaktiv ist, sowie

der Replikationsursprungs-Sequenz. Die Sm^R -Kassette wird von beiden Teilsequenzen flankiert. Durch die Transformation mit Derivaten von pBR322 können diese Vektoren mit den entsprechenden homologen Bereichen dieser Integrationsplattform rekombinieren und beliebige Fremd-DNA inserieren. Durch dieses Rekombinationsereignis wird die Sm^R -Kassette deletiert und das Fragment der Amp^R -Kassette wieder vervollständigt und somit aktiviert. Der anfängliche Sm^R/Amp^S -Phänotyp wandelt sich daher nach erfolgreicher DNA-Integration in diese Plattform in einen Sm^S/Amp^R -Phänotyp um.

2.13.1 Kultivierung von *Synechococcus*

Synechococcus sp. PCC7942 Stamm R2-PIM8 (van der Plas et al., 1990) wurde bei 25 °C und 16 h Licht ($40 \mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$) in BG-11 Flüssig- und Festmedium kultiviert; dabei wurden die Flüssigkulturen mit 100 rpm geschüttelt. Zur Kultivierung dieses Stammes war die Zugabe von Methionin erforderlich, das den Medien steril zugesetzt wurde (30 mg/l Endkonzentration). Untransformierte Stämme von R2-PIM8 wurden in Medien mit Streptomycin (5 $\mu g/ml$ Endkonzentration) kultiviert. Die Selektion von transformierten Stämmen erfolgte mit Ampicillin (0,5 $\mu g/ml$ Endkonzentration) und Kanamycin (10 $\mu g/ml$ Endkonzentration). Die Antibiotika wurden als tausendfach konzentrierte Stammlösung in A. dest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

„trace metal mix“ (1000 x)	2,86 g	H ₃ BO ₃
	1,81 g	MnCl ₂ • 4 H ₂ O
	0,22 g	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O
	0,39 g	Na ₂ MO ₄ • 2 H ₂ O
	0,0079 g	CuSO ₄ • 5 H ₂ O
	0,0494 g	Co(NO ₃) ₂ • 6 H ₂ O
BG-11 (100 x)	149,6 g	NaNO ₃
	7,5 g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
	3,6 g	CaCl ₂ • 2 H ₂ O
	0,6 g	Citronensäure
	1,1 ml	0,25 M Na-EDTA pH 8,0
	100,0 ml	„trace metal mix“
BG-11 (1 x)	10,0 ml	BG-11 (100 x)
	5,0 ml	1 M TES, pH 8,0
	1,0 ml	189 mM Na ₂ CO ₃
	1,0 ml	175 mM K ₂ HPO ₄
	* 1,0 ml	6 mg/ml Ammoniumeisen(II)citrat

BG-11 Agarplatten	A	300,0 ml	H ₂ O
		9,0 g	Bacto-Agar
	B	300,0 ml	H ₂ O
		6,0 ml	BG-11 (100 x)
		3,0 ml	1 M TES, pH 8,0
		0,6 ml	189 mM Na ₂ CO ₃
		0,6 ml	175 mM K ₂ HPO ₄
		*	0,6 ml
		2,8 g	Na ₂ S ₂ O ₃ • 5 H ₂ O

* separat autoklavieren und erst nach dem Abkühlen dazugeben, dunkel lagern.
A und B separat autoklavieren, auf 60 °C abkühlen lassen, mischen und Platten gießen

2.13.2 Transformation von *Synechococcus*

Die Transformation von *Synechococcus* sp. PCC7942 Stamm R2-PIM8 wurde wie beschrieben (van der Plas et al., 1990) in leicht abgeänderter Form durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Kultur auf einer Platte angeimpft und eine Woche unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit Flüssigmedium von der Platte abgewaschen, durch Zentrifugation konzentriert (1-2 x 10⁹ Zellen pro ml) und in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt. Zu den Zellen wurde dann ohne Verzögerung 5 µl Plasmid-DNA gegeben und die Zellsuspension 4 h im Licht inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektivplatten ausplattiert und 2-3 Wochen inkubiert. Einzelne Kolonien dieser Transformation wurden auf neue Selektivplatten überführt. Mit der Integration der Vektor-DNA ist die Wiederherstellung der Ampicillin-Resistenz verbunden. Die erfolgreiche Integration von Fremd-DNA in die Integrationsplattform kann weiterhin getestet werden, indem die Transformanten auf Platten mit Streptomycin ausgestrichen werden. Der durch die Integration bedingte Verlust der Streptomycin-Resistenz führt zu einem Absterben der Zellen.

2.13.3 Transformationskonstrukte und heterologe Genexpression in *Synechococcus*

Konstrukte zur Transformation von *Synechococcus*

Die Konstrukte zur Transformation von *Synechococcus* beruhen auf dem pTrc-Vektor-System von Invitrogen (beschrieben unter 2.11.4) und enthalten den pBR322-Ursprung sowie eine Amp^R-Kassette. Beide Elemente sind notwendig, um durch homologe Rekombination in die Insertionsplattform von *Synechococcus* R2-PIM8 zu integrieren. Um neben der Ampicillin-Selektion eine zusätzliche Selektionsmöglichkeit zu erhalten, wurden diese Vektoren mit einer Kan^R-Kassette ausgestattet.

Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit der Selektion von falsch positiven Transformanten reduziert werden (Geerts et al., 1995).

Da der pTrc-Expressionsvektor keine geeigneten Schnittstellen zur Klonierung mit AvrII/BamHI besitzt, wurde zunächst das Konstrukt pTnsyn3 erstellt, das neben der Funktion als Expressionsvektor auch gleichzeitig als Stammvektor zur Klonierung der übrigen ORFs dienen sollte. Dazu wurde der Vektor pTrcHis2 C mit NcoI/HindIII linearisiert und in einem Schritt mit den Inserts aus p18BnptIIH (BamHI/HindIII) und p18Nsyn3 (NcoI/BamHI) ligiert. p18BnptIIH enthält das PCR-Produkt einer Kan^R-Kassette mit den Schnittstellen 5'-BamHI und 3'-HindIII; p18Nsyn3 enthält die oben beschriebene synthetische Polynukleotidsequenz mit den Schnittstellen 5'-NcoI-AvrII / 3'-BamHI (Tabelle 6, Zeilen 33, 34). Somit ermöglicht die Restriktion von pTnsyn3 mit AvrII und BamHI das Ausschneiden der synthetischen Sequenz und die Insertion verschiedener ORFs in diesen Stammvektor. Die resultierenden Expressionsvektoren sind in Tabelle 7 dargestellt.

Heterologe Genexpression in *Synechococcus*

Für die Expression in *Synechococcus* wurde, wie für *E. coli* beschrieben (2.11.4), das pTrc-System ausgewählt. Dabei standen die Regulation der Expression und das hohe Expressions-Niveau im Vordergrund. Die Anzucht von *Synechococcus* sp. PCC7942 R2-PIM8 mit den integrierten Expressionskassetten erfolgte in 50 ml-Kulturen. Die 2-tägige Induktion der Zellen erfolgte nach etwa 2-3 Wochen mit 0,5 mM IPTG (Geerts et al., 1995) und wurde durch die Ernte der Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min beendet.

2.14 Methoden beim Arbeiten mit *P. pastoris*

2.14.1 Kultivierung von *P. pastoris*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *P. pastoris* wurden auf festem oder in flüssigem Vollmedium (YPD, YPG) oder Minimalmedium (MD, MM) bei 30 °C angezogen. Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (120-150 rpm) oder Rotation belüftet. Zur Kultivierung der „Knock out“-Stämme JC308 *Augt51* und JC308 *Augt51/Agcs* in Minimalmedien war zusätzlich die Zugabe von Arginin, Adenin und des Antibiotikums Zeozin (100 µg/ml Endkonzentration) erforderlich.

Dauerkulturen

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden *P. pastoris*-Kulturen 48 h in einem Volumen von 15 ml angezogen und je 1 ml dieser Kulturen mit dem gleichen Volumen 70 % (w/v) Glycerol (autoklaviert) gemischt und bei -70 °C gelagert.

YPD	1 % (w/v)	Hefeextrakt (Difco)
	2 % (w/v)	Bacto-Pepton (Difco)
	2 % (w/v)	Glukose
	2 % (w/v)	Bacto-Agar (Difco) für Platten
		Die Glukose wurde als sterilfiltrierte Lösung nach dem Autoklavieren dazugegeben
YPG	1 % (w/v)	Hefeextrakt (Difco)
	2 % (w/v)	Bacto-Pepton (Difco)
	1 % (w/v)	Glycerol
	2 % (w/v)	Bacto-Agar (Difco) für Platten
		alle Zutaten autoklavieren
MD/MM	100 ml	134 g/l YNB (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase, mit Ammoniumsulfat / ohne Aminosäuren)
	2 ml	0,02 % (w/v) Biotin
	100 ml	20 % (w/v) Glukose (MD) oder 5 % Methanol (MM)
	20 g	Bacto-Agar (Difco) für Platten
	ad. 1000 ml	A. dest
	20 ml	2 g/l Arginin
	20 ml	1 g/l Adenin

2.14.2 Transformation von *P. pastoris*

Zur Transformation von *Pichia* wurde die PEG1000-Methode modifiziert nach Cregg et al. (1998) durchgeführt. Von einer Übernacht-Vorkultur wurde eine Hauptkultur (100 ml) in YPD mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Nach Erreichen einer Zelldichte mit einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 wurden die Zellen bei RT mit 3.000 x g für 10 min sedimentiert. Nach dem Lösen des Pellets in 50 ml Puffer A wurden die Zellen unter identischen Bedingungen erneut sedimentiert und das Pellet in 4 ml Puffer A aufgenommen und mit 240 µl DMSO zu einer Endkonzentration von 5,7 % (v/v) versetzt. Diese Zellsuspension wurde in Aliquots von 200 µl in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Puffer A	1 M	Sorbitol
	10 mM	Bicine, pH 8,4 mit NaOH
	3 %	Ethylenglycol
		Dieser Puffer wurde sterilfiltriert

Zur Transformation wurden die noch gefrorenen kompetenten Zellen mit bis zu 50 µg linearisierter DNA (maximal 20 µl) versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Diese Zell-Suspension wurde mehrmals durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Im Anschluss wurden die Zellen vorsichtig mit 1,5 ml Puffer B vermennt und nach 1 h Inkubation bei 30 °C bei 2.000 x g bei RT für 15 min sedimentiert. Das Zell-Pellet wurde in 1,5 ml Puffer C resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden nun in 200 µl Puffer C aufgenommen. Die resultierende Zell-Suspension wurde auf Selektivplatten ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

Puffer B	40 % (w/v)	Polyethylenglycol 1000 (Sigma)
	0,2 M	Bicine, pH 8,4 mit NaOH
		Dieser Puffer wurde sterilfiltriert

Puffer C	0,15 M	NaCl
	10 mM	Bicine, pH 8,4 mit NaOH
		Dieser Puffer wurde sterilfiltriert

2.14.3 Transformationskonstrukte und funktionale Expression in *P. pastoris*

Konstrukte zur Transformation von *P. pastoris*

Zur funktionalen Expression der putativen Glykosyltransferasen in *P. pastoris* wurden die ORFs in den Vektor pPIC3.5 (Invitrogen) kloniert. Dieser Vektor ist charakterisiert durch einen induzierbaren *AOXI*-Promotor (Cregg et al., 1988), einen *HIS4*-Selektionsmarker zur Selektion in *P. pastoris* und eine Amp^R-Kassette zur Selektion in *E. coli*.

Die Klonierung der entsprechenden PCR-Produkte (Tabelle 5, Zeile 1; Tabelle 6, Zeilen 1-5) erfolgte mit glatten Enden in die SnaBI-Schnittstelle von pPIC3.5. Die resultierenden Expressionsvektoren sind in Tabelle 7 aufgelistet. Der Vektor pPICAGRO wurde zur Transformation des Stammes JC308 *Augt51/AgcS* benutzt, die übrigen Vektoren dienten zur Transformation des Stammes JC308 *Augt51*.

Bei den hier verwendeten Vektoren handelt es sich um integrative Vektoren, aus denen durch wahllose Rekombinationen die Integration an beliebiger Stelle im Genom der Hefe erfolgen kann. Der Vektor kann jedoch an unterschiedlichen Stellen geschnitten und somit die Integration des Konstruktes beeinflusst werden. Der hier angestrebte Phänotyp war *His4⁺/Mut^s*, für den die Insertion der Fremd-DNA in den *AOXI*-Lokus erfolgen musste, sodass die Zellen wieder ein intaktes *HIS4*-Gen aufweisen müssen. Um Zellen mit diesem Phänotyp zu erhalten, erfolgte die Selektion zunächst auf MD-Medium

(ohne Histidin), dabei wurde nicht zwischen *Mut*^s- und *Mut*⁺-Phänotypen selektiert. Zur Unterscheidung dieser beiden Phänotypen erfolgte die Ausplattierung von Einzelkolonien parallel auf MM- und MD-Platten. Diejenigen Zellen, die nur auf MD-Medium gut wuchsen, enthielten mit größter Wahrscheinlichkeit die Expressionskassette am *AOXI*-Genort. Die Kolonien konnten nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C anhand ihres geringeren Wachstums identifiziert werden.

Funktionale Expression in *P. pastoris*

Zur Funktionalen Expression in den *P. pastoris*-Stämmen JC308 *Augt51* und JC308 *Augt51/Agcs* wurden die Zellen in einer Vorkultur in YPG angezogen. Nach 24-36 h wurde damit eine Hauptkultur beimpft, die nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1-2 mit 0,5 % Methanol induziert wurde. Die Induktion dauerte 20-24 h. Die Expression erfolgte unter dem starken *AOXI*-Promotor, der durch Glukose reprimiert wird. Die zur Expression in beiden *Pichia*-Stämmen verwendeten Vektoren sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Ernte der Zellen erfolgte 20 h nach der Induktion durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min.

2.14.4 Präparation von Gesamtmembranen

Zunächst wurden die Zellen einer 25 ml-Expressionskultur 10 min bei 5.000 x g sedimentiert und auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer 1 (siehe 2.11.5, jedoch ohne Zugabe von Lysozym) gewaschen und in 5 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Das Aufbrechen der Zellwand geschah mit Hilfe von Glasperlen (2-3 g, Durchmesser 0,4 mm). Dazu wurde das Zell-Gemisch 30 sec auf dem Vortexschüttler geschüttelt und für weitere 30 sec auf Eis gestellt. Diese Behandlung umfasste 10 Zyklen. Die Zellfragmente mit den Glasperlen wurden durch Zentrifugation (1 min, 2.800 x g) entfernt. Anschließend wurde der abgenommene Überstand mit 8 ml Puffer 2 (siehe 2.11.5) verdünnt. Die Sedimentation der Membranen erfolgte durch Zentrifugation des verdünnten Überstandes in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g für 30 min bei 4 °C. Der Überstand aus dieser Zentrifugation, in dem sich lösliche Proteine befinden, wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 2 ml Puffer 2 gewaschen, um noch verbliebene Reste des Überstandes zu beseitigen. Das Pellet wurde in 800 µl Puffer 2 resuspendiert und die so erhaltene Membranfraktion für Enzymtests eingesetzt.

2.15 Methoden beim Arbeiten mit *S. cerevisiae*

2.15.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* wurden auf festem oder in flüssigem Vollmedium (YPD, siehe 2.14.1) oder Minimalmedium (CMdum) bei 30 °C angezogen. Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180-200 rpm) oder Rotation belüftet.

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

Uracil, Histidin, Tryptophan und Leucin sind nicht enthalten.
Die Substanzen wurden vermischt und mit einem Mörser pulverisiert.

CMdum	1,16 g/l	Dropout Powder (siehe unten)
	2 % (w/v)	Glukose oder Raffinose
	0,67 % (w/v)	YNB (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase, mit Ammoniumsulfat / ohne Aminosäuren)
	2 % (w/v)	Bacto-Agar (Difco) für Platten
	20 mg/l	Histidin
	60 mg/l	Leucin
	40 mg/l	Tryptophan
	20 mg/l	Uracil

Glukose oder Raffinose sowie die Aminosäuren und Basen, die nicht zur Selektion bestimmt sind, wurden als sterilfiltrierte Lösungen nach dem Autoklavieren dazugegeben.

Zur Selektion von transformierten Zellen wurde dem Medium kein Leucin oder Uracil zugesetzt. Bei Expressionsversuchen wurde die Glukose im Minimalmedium durch Raffinose ersetzt, da Glukose den P_{GALI}-Promotor der Hefe-Expressionsvektoren pYES2 und pESC reprimiert (Lohr et al., 1995).

2.15.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Herstellung elektrokompetenter Hefe-Zellen wurden 500 ml YPD-Medium mit 10 % (v/v) Glycerol mit 5 ml einer Übernachtskultur der Hefen angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 1,3-1,5 bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4.000 x g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem A. dest. resuspendiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert 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) Glycerol aufgenommen und in Aliquots von 65 µl bei -70 °C eingefroren. Um eine möglichst hohe Überlebensrate zu erreichen, wurden die Zellen langsam eingefroren, indem die Behälter in Tücher eingewickelt wurden.

Zur Herstellung elektrokompetenter Hefe-Zellen, die bereits ein Plasmid trugen (pEchlo2029, 2.15.3), erfolgte die Kultivierung in CMdum-Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle und 10 % (v/v) Glycerol, wobei die Vorkultur 24 h inkubiert wurde. Alle weiteren Schritte wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Für die Transformation wurde ein Aliquot elektrokompetenter Hefezellen bei RT aufgetaut und mit maximal 5 µl möglichst salzfreier DNA vermengt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Küvette überführt und einem Spannungspuls von 1.500 V (für eine 2 mm Küvette) oder 750 V (für eine 1 mm Küvette) ausgesetzt. Im Anschluss wurde unverzüglich 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol dazugegeben und diese Zellsuspension für 2 min auf Eis abgekühlt. Zum Schluss wurden die Zellen 1 min bei 3.000 rpm (Biofuge) abzentrifugiert, in ca. 100 µl 1 M Sorbitol + 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert, auf Selektivplatten ausplattiert und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.15.3 Transformationskonstrukte und funktionale Expression in *S. cerevisiae*

Konstrukte zur Transformation von *S. cerevisiae*

Zur funktionalen Expression der putativen Glykosyltransferasen wurden die ORFs in die Hefevektoren pYES2 und pESC-Leu kloniert, wobei letzterer nur in einigen Fällen benutzt wurde.

Da pYES2 nicht die zur Klonierung der ORFs notwendigen Schnittstellen hatte, wurde zunächst ein Stammvektor erzeugt. Dazu wurde der mit KpnI/BamHI linearisierte Vektor pYES2 mit dem Insert aus dem rekombinanten Plasmid p18ct1882 (Tabelle 6, Zeile 8) ligiert, das zuvor ebenfalls mit KpnI/BamHI restringiert wurde. Da dieses Insert eine AvrII-Schnittstelle besaß, konnten nun alle weiteren Klonierungen mit dem resultierenden Stammvektor durch Ersetzen des Inserts nach

AvrII/BamHI-Restriktion durchgeführt werden. Auf diese Weise entstanden die meisten der für die Expression in *S. cerevisiae* benutzen Vektoren (Tabelle 7).

Weiterhin wurde der Vektor pEchlo2029 (Tabelle 7) erzeugt, um eine Coexpression in Hefe zu ermöglichen. Die Klonierung erfolgte durch Linearisierung des Vektors pESC-Leu mit SpeI/BglII und Freisetzung des ORF aus p18chlo2029 (Tabelle 6, Zeile 13) durch AvrII/BamHI mit anschließender Ligation. Der Verdau mit diesen Enzymen führt zu kompatiblen Enden an den entsprechenden DNA-Strängen, was diese Ligation ermöglichte.

pYppDGDS (Tabelle 7) entstand durch Insertion eines PCR-Produktes, das aus dem cDNA-Klon der putativen α Gal β GalD-Synthase aus *P. patens* amplifiziert wurde (Tabelle 6, Zeile 38), in den mit BamHI/XbaI linearisierten Vektor pYES2.

Funktionale Expression in *S. cerevisiae*

Zur funktionalen Expression der putativen α Gal β GalD-Synthase aus *P. patens* (in pYppDGDS) und von MGD1 aus *A. thaliana* (in pEMGD2 von P. Jorasch) wurde der Stamm 334 verwendet. Die Expression der übrigen ORF-Sequenzen erfolgte im Stamm INVScI. In der Tabelle 7 sind alle zur Transformation verwendeten Vektoren aufgelistet. Die Verwendung unterschiedlicher Stämme war dabei nicht von Bedeutung.

Die Zellen wurden in Minimalmedium (CMdum) mit Raffinose angezogen. Die Größe der Vor- und Hauptkulturen richtete sich dabei nach der benötigten Menge. Die Zugabe von Leucin oder Uracil war abhängig vom Selektionsmarker der entsprechenden Expressionsvektoren, wobei Derivate von pYES2 die Uracil-Auxotrophie und Derivate von pESC-Leu die Leucin-Auxotrophie der verwendeten Hefe-Stämme kompensieren. Die Vorkultur wurde 24 h kultiviert. Die Induktion der Hauptkultur wurde mit 2 % Galaktose nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1-2 gestartet und 20 h durchgeführt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 x g.

2.15.4 Präparation von Gesamtmembranen

Die Prozedur zur Präparation von Gesamtmembranen ist die gleiche wie für *P. pastoris* beschrieben (siehe 2.14.4). Die Membranfraktionen wurden für Enzymtests eingesetzt.

2.16 Methoden beim Arbeiten mit *P. patens*

2.16.1 Kultivierung von *P. patens*

Die Kultivierung von *P. patens* erfolgte in einem modifizierten Knop-Flüssig- oder Festmedium (Reski et al., 1985). Dabei wurden die Kulturen in einer Phytokammer bei 25 °C unter einer Lichtstärke von $55 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (Weißlicht, Philips TL, 65 W/25) und einem Licht/Dunkelwechsel von 16/6 Stunden inkubiert.

Knop-Flüssigmedium	0,25 g/l	KH_2PO_4^*
	0,25 g/l	KCl^*
	0,25 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}^*$
	1,0 g/l	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}^*$
	12,5 mg	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}^*$

* aus 100 x konzentrierten Stammlösungen mit 1 N KOH vorsichtig auf pH 5,6-5,8 einstellen, autoklavieren

Knop-Festmedium	10 g	Oxid-Agar (Unipath, Basingstoke, England) pro Liter Knop-Flüssigmedium
		autoklavieren

Um *P. patens* auf Festmedium zu kultivieren, wurden einzelne Moospflanzen auf Knop-Festmedium gesetzt und die verschlossenen Platten mit Parafilm abgedichtet. Alle 2-3 Monate erfolgte ein Umsetzen der Pflanzen auf frisches Festmedium. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben, die mit Silikonkappen (Bellco, Vineland, New Jersey) steril abgedeckt waren, inkubiert und zur Durchlüftung dauerhaft bei 100 rpm geschüttelt. Zur Vermehrung der Moospflanzen wurden die Pflanzen alle 14 Tage mit einem sterilen Ultra-Turrax-Stab zerkleinert und in frisches Knop-Flüssigmedium überführt. Die Vermehrung wurde dabei nach folgendem Schema durchgeführt.

1. 20 ml-Kultur mit einigen Moospflanzen versetzt (100 ml-Kolben)
2. 20 ml-Kultur mit 30 ml frischem Medium versetzt (100 ml-Kolben)
3. 50 ml-Kultur mit 70 ml frischem Medium versetzt (250 ml-Kolben)
4. 120 ml-Kultur mit 120 ml frischem Medium versetzt (500 ml-Kolben)
5. 240 ml-Kulturen geteilt und mit jeweils 120 ml frischem Medium versetzt (500 ml-Kolben)

Die Ernte der Pflanzen erfolgte 14 Tage nach dem letzten Umsetzen mittels Filtration durch Nylongaze (100 μm , Züricher Beuteltuchfabrik). Zur späteren Isolierung von genomischer DNA (siehe Kapitel 2.21) wurden die geernteten Pflanzen sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.16.2 Transformation von *P. patens*

Die Transformation von *P. patens* wurde anhand von Protoplasten von Prof. Dr. Ralf Reski und Mitarbeitern in Freiburg durchgeführt.

2.16.3 Konstrukte zur Transformation von *P. patens*

P. patens bietet die Möglichkeit, durch homologe Rekombination gezielt rekombinante DNA ins Genom zu integrieren (Schaefer et al., 1997). Die Effektivität dieser gerichteten DNA-Integration erreicht dabei einen Wert von 90 %, vergleichbar mit Werten, die für Hefen beobachtet wurden und übertrifft damit deutlich die Rate der gezielten/zufälligen DNA-Integration bei höheren Pflanzen (Schaefer, 2001; Schaefer et al., 1997).

In *P. patens* sollten daher durch homologe Rekombination einerseits die Gene der putativen βGalD - und $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$ -Synthase deletiert werden. Andererseits sollte die Integration von rekombinanter DNA mit den Sequenzen heterologer Glykosyltransferasen in den Lokus der $\Delta 6$ -Desaturase (Girke et al., 1998) als Insertionsplattform erfolgen. Die damit verbundene Deletion dieses Gens hat unter den angegebenen Laborbedingungen keine Auswirkungen auf das Wachstum.

Klonierung der Konstrukte zur Gen-Deletion der putativen βGalD - und $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$ -Synthase

Die Gen-Deletionen der putativen βGalD - und $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$ -Synthase sollten durch Insertion einer Selektionskassette in den jeweiligen Lokus erfolgen. Dabei dienten die genomischen DNA-Sequenzen der putativen βGalD - und $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$ -Synthase als homologe Sequenzen, die je eine Kan^{R} -Kassette flankierten. Die Primer zur Amplifikation der genomischen Sequenzen der beiden putativen Galaktolipid-Synthasen wurden aus den jeweiligen cDNA-Sequenzen abgeleitet und die resultierenden PCR-Produkte in pUC18 zwischenklontiert (Tabelle 6, Zeilen 46, 47). Zur Insertion der Kan^{R} -Selektionskassette (Tabelle 6, Zeile 39) wurden die Sequenzen der βGalD - und $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$ -Synthase mit *Ava*I (mit anschließendem Auffüllen der Enden) bzw. mit *Stu*I in etwa zwei gleich große Fragmente geschnitten und mit dem Amplifikat der Selektionskassette mit glatten Enden ligiert. Die resultierenden rekombinanten Plasmide sind in Tabelle 8 gezeigt. Die Freisetzung der Deletionskonstrukte aus den Plasmiden erfolgte mit *Eco*RI (pMGDSko) oder *Bam*HI (pDGDSko).

Klonierung der Expressionskonstrukte mit der $\Delta 6$ -Desaturase als genomische Integrationsplattform

Als Insertionsplattform zur Expression von heterologen Glykosyltransferasen in *P. patens* sollte der Locus der $\Delta 6$ -Desaturase dienen, wobei dieses Gen für *P. patens* nicht essentiell ist (Girke et al., 1998). Die Konstrukte zur Transformation bestanden dabei aus zwei Fragmenten der $\Delta 6$ -Desaturase, die den ORF einer heterologen Glykosyltransferase mit oder ohne Chloroplasten-Leadersequenz und eine Kan^R-Kassette zur späteren Selektion flankierten. Die Fusionierung der ORFs der heterologen Glykosyltransferasen mit der Chloroplasten-Leadersequenz diente dem Zweck, die mit dem Leader-Peptid exprimierten Glykosyltransferasen in den Chloroplasten zu importieren.

Die Herstellung der Konstrukte soll hier nur im Prinzip erläutert werden, wobei die verwendeten DNA-Fragmente in Tabelle 6 (Zeilen 39, 45-48) aufgeführt sind. Zur Konstruktion wurde zunächst ein Vektor kloniert, bestehend aus einer Expressionskassette mit 35S-Promotor und Terminator (beide Elemente aus pRT101neo restringiert, Tabelle 4) und einer Kan^R-Kassette. Es wurden Konstrukte mit Leadersequenz und Konstrukte ohne Leadersequenz hergestellt. Für den ersten Fall wurde dafür die genomische Chloroplasten-Leadersequenz der putativen β GalD-Synthase aus *P. patens* hinter den 35S-Promotor der Expressionskassette kloniert. In beiden Fällen wurden dann verschiedenen ORF-Sequenzen in die Expressionskassetten eingesetzt. Die Inserierung der jeweiligen ORF-Sequenzen in die Kassetten mit Leadersequenz erfolgte in das fortlaufende Leseraster der Leadersequenz. Zur Fertigstellung der Konstrukte mussten diese noch mit den genomischen Sequenzen der $\Delta 6$ -Desaturase flankiert werden. Dazu wurde das klonierte genomische Fragment der $\Delta 6$ -Desaturase in zwei Hälften geschnitten und durch Ligation die zuvor aus den Klonierungsvektoren freigesetzten Expressionskassetten inseriert. Die daraus resultierenden rekombinanten Plasmide zur Transformation und Expression in *P. patens* sind in Tabelle 7 gezeigt. Die Transformationskonstrukte konnten mit HpaI freigesetzt werden.

2.17 Methoden beim Arbeiten mit *A. thaliana*

2.17.1 Kultivierung von *A. thaliana*

Die Kultivierung von *A. thaliana* erfolgte auf Erde in einer Phytokammer mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16/6 Stunden bei 23 und 18 °C und einer Lichtstärke von 55 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (Weißlicht, Philips TL, 65 W/25)

2.17.2 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* wurde mit Hilfe von *A. tumefaciens* modifiziert nach der „Floral dip“-Methode von Clough et al. (1998) durchgeführt. Es handelt sich hier um eine vereinfachte Methode, die im Gegensatz zur Vakuum-Infiltration (Bechtold et al., 1993) darauf beruht, die Infloreszenzen der Pflanzen in eine Lösung zu tauchen, die neben *A. tumefaciens* nur noch Sucrose und das Benetzungsmittel „Silwet L-77“ enthält. Diese Methode erfordert deutlich weniger Zeit und Aufwand als die Vakuum-Infiltration, und die Samen-Ausbeute ist höher, da die Pflanzen weniger gestresst werden. Die Transformationsraten sind bei beiden Methoden vergleichbar.

Für die Transformation wurden je 4 Pflanzen zusammen in 8 x 8 cm große Töpfe gesetzt und kultiviert, bis sich die primären Infloreszenzen zeigten. Um die Samenausbeute zu erhöhen, wurden diese Primär-Triebe abgeschnitten und die Pflanzen somit zur Bildung von mehreren sekundären Infloreszenzen angeregt. Die Pflanzen waren zur Transformation geeignet, wenn sie sich im Anfangsstadium ihrer Blüte befanden. Die Infloreszenzen hatten dabei eine Höhe von 2-10 cm, wobei die meisten Knospen noch geschlossen waren. Die Pflanzen wurden dabei nicht, wie oben angegeben, in das Transformationsmedium getaucht, sondern das Medium wurde mit Hilfe eines Pinsels auf alle Teile der Blütenstände reichlich und durch grobes Betupfen aufgetragen. Alle 4 Pflanzen eines Topfes wurden mit dem gleichen Konstrukt transformiert. Nach dieser Prozedur wurden die Pflanzen für einen Tag mit einer Haube abgedeckt, um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen, was zur Steigerung der Transformationsrate beiträgt. Nach fünf Tagen erfolgte eine Wiederholung der gesamten Prozedur. Die Pflanzen wurden unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Kurz vor der Samenreife wurde über alle Pflanzen eines Topfes eine Papiertüte gestülpt, um abfallende Samen aufzufangen. Nachdem alle Schoten braun geworden waren, wurden die Fruchtsände in den Papiertüten abgeschnitten, einige Tage getrocknet und dann die Samen geerntet.

Transformationsmedium für *A. thaliana*

5 %	Sucrose
0,05 %	Silwet L-77 (OSi Specialties, Inc., Danbury, CT, USA)
	<i>A. tumefaciens</i> (siehe 2.12.1 Transformationskultur)

Zelldichte von *Agrobacterium* im Transformationsmedium etwa bei OD₆₀₀ von 1,0

Zur Selektion von transgenen Pflanzen wurden die geernteten Samen der transformierten Pflanzen sterilisiert und auf Selektivplatten ausgebracht. Zur Sterilisation wurde etwa 1 g der Samen 1 min mit Ethanol (absolut) und nach dessen Abgießen für 6-8 min mit einer Lösung aus NaOCl (6 %) + Triton X-100 (0,04 %) behandelt. Nach dem Abgießen dieser Lösung wurden die Samen 4-5-mal mit sterilem H₂O gespült. Um die Samen besser ausplattieren zu können, wurden sie in steriler Agarose (0,1 %) aufgenommen und dann auf Selektivplatten verteilt. Zur Selektion wurde dem Medium Kanamycin (40 µg/ml Endkonzentration) zugegeben. Die Inkubation erfolgte in einer Phytokammer bei 25 °C und einer Lichtstärke von 55 µE x m⁻² x s⁻¹ (Weißlicht, Philips TL, 65 W/25) sowie einem Licht/Dunkelwechsel von 16/6 Stunden. Nach der Selektion von 2-3 Wochen wurden die kanamycinresistenten Pflanzen auf Erde umgesetzt.

Selektionsplatten für <i>A. thaliana</i>	4,4 g/l	1 x MS Gamborg bs – Vitamine
	0,5 g/l	MES pH 5,8
	0,8 %	Plant-Agar

vorsichtig 20 min im Schnellkochtopf autoklavieren

2.17.3 Konstrukte zur Transformation von *A. thaliana*

Zur Expression von (putativen) Glykosyltransferasen in *A. thaliana* wurden Vektoren erzeugt, die einerseits ein Konstrukt zur Inaktivierung von MGD1 oder DGD1 und andererseits eine Expressionskassette mit dem jeweiligen ORF inklusive Chloroplasten-Leadersequenz tragen. Die Expressionskassette sollte somit zur Synthese eines Fusionsproteins führen, das aus der jeweiligen Glykosyltransferase mit einem N-terminalen Chloroplasten-Leaderpeptid besteht.

Klonierung des Transformationsvektors

Als Transformationsvektor wurde pCambia2200 verwendet, dessen T-DNA-Insertion in Pflanzen die Selektion mit Kanamycin ermöglicht. In *E. coli* und *A. tumefaciens* erfolgte die Selektion mit Chloramphenicol.

Dieser Vektor wurde mit zwei Expressionskassetten ausgestattet, bestehend aus je einem 35S-Promotor und einem dazugehörigen OCS-Terminator. Der 35S-Promotor wurde aus pRT101neo amplifiziert (Primer nicht angegeben), der OCS-Terminator durch Restriktion aus pUSPOCS (Abadi et al., 2004) freigesetzt. Die genaue Vorgehensweise der Klonierung soll hier nicht näher erläutert werden. Um geeignete Schnittstellen zur Klonierung zur Verfügung zu haben, wurde in jede der beiden Expressionskassetten ein entsprechender Polylinker MCS1 oder MCS2 eingesetzt (Tabelle 6, Zeilen 49, 50). Der resultierende Transformationsvektor ist pCMCS1-2. Der Polylinker MCS1 war

dazu bestimmt, das entsprechende Konstrukt zur Gen-Inaktivierung aufzunehmen; in den Polylinker MCS2 wurde der jeweilige ORF mit Chloroplasten-Leadersequenz inseriert.

Klonierung der Konstrukte zur Gen-Inaktivierung

Die Konstrukte zur Gen-Inaktivierung mit „post-transcriptional gene silencing“ von DGD1 und MGD1 von *A. thaliana* bestanden jeweils aus einem genomischen DNA-Fragment, das einmal in sense- und einmal in antisense-Orientierung kloniert und durch eine Intron-Sequenz getrennt wurde (Smith et al., 2000). Die daraus resultierenden Konstrukte wurden in den Polylinker MCS1 des Transformationsvektors eingesetzt. Die entsprechenden Sequenzen wurden durch Amplifikation aus genomischer DNA isoliert (Tabelle 6, Zeilen 40-43). Die Konstruktion dieser Elemente soll hier nicht näher erläutert werden.

Klonierung der Expressionskonstrukte

Zur Klonierung der Expressionskonstrukte wurde zunächst die Chloroplasten-Leadersequenz aus p18Leadernt (Tabelle 6, Zeile 44) in den Polylinker MCS2 durch Restriktion mit ApaI/AvrII eingesetzt. Anschließend erfolgte die Klonierung der jeweiligen ORFs durch AvrII/BamHI. Die Schnittstellen waren so gewählt, dass die ORF-Sequenzen in das fortlaufende Leseraster der Leadersequenz inseriert sind. Die resultierenden Transformationsvektoren sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Buchstabenfolgen ‚Ds‘ oder ‚Ms‘ in den Bezeichnungen der Vektoren stehen dabei für DGD1-„Gene silencing“ oder für MGD1-„Gene silencing“. Da mit zunehmender Größe der Fragmente die Klonierungen immer schwieriger wurden, erfolgte deren Durchführung oft in mehreren Zwischenschritten in pUC18. Eine ausführliche Beschreibung würde daher den Rahmen dieser Arbeit sprengen, so dass hier nur das Klonierungsprinzip angegeben wurde.

2.18 Lipidanalytik

2.18.1 Isolierung von Gesamtlipiden

(Siebertz et al., 1979)

Für die Lipidextraktion wurden frisch geerntete Bakterien- und Hefenkulturen und frische oder eingefrorene Pflanzenteile verwendet. Das Zell- oder Pflanzenmaterial wurde mit etwas A. dest. versetzt und unverzüglich für 10 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Die sedimentierten Zellen, bzw. die abgetropften Pflanzenteile wurden in einer ersten Extraktion mit Chloroform/Methanol (1:2) mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die zweite Extraktion erfolgte mit Chloroform/Methanol (2:1) unter den gleichen Bedingungen wie die erste Extraktion. Die Trennung

von Zellen und Lösungsmittel erfolgte jeweils durch Zentrifugation. Nach Vereinigung der beiden Extrakte wurde der Gesamtextrakt entweder direkt auf ein Verhältnis Chloroform/Methanol/NaCl (0,45 %) (2:1:0,75) eingestellt oder bei größeren Mengen zuvor eingeengt und dann im angegebenen Lösungsmittelgemisch wieder aufgenommen. Zur besseren Phasentrennung wurde der Gesamtextrakt zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und eingeengt. Die Lipide wurden entweder in Chloroform aufgenommen und anschließend über Säulenchromatographie fraktioniert oder in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen und zur Analyse über Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt oder bei -20 °C gelagert.

2.18.2 Dünnschichtchromatographie

Die Lipidextrakte wurden zur Trennung in ihre Einzelkomponenten auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm, Merck; HPTLC-Platten) in einer Bandbreite von 0,5 – 1,0 cm entweder per Hand oder mit Hilfe des automatischen „TLC sampler“ (CAMAG) aufgetragen und in einem der angegebenen Laufmittel (Tabelle 9) entwickelt. Mit Hilfe von Referenzsubstanzen erfolgte die Zuordnung der separierten Lipidbanden. Um die Lipide auf den entwickelten Kieselgelplatten zu detektieren, wurden die Platten mit verschiedenen Reagenzien entweder durch Besprühen (A, B, C) oder durch Eintauchen (D) behandelt. Zur präparativen Analyse der Lipide wurden die Platten ausschließlich mit ANS besprüht und die entsprechenden Komponenten unter UV-Licht markiert. Für andere Nachweise erfolgt der Einsatz der übrigen Reagenzien (B, C, D).

A	ANS	0,2 % (w/v)	Anilinnaphthalinsulfonsäure in Methanol führt zu Fluoreszenz aller hydrophoben Komponenten unter UV-Licht (366 nm)
B	α-Naphthol / Schwefelsäure	8 g 20 ml 30 ml	α -Naphthol in 250 ml Methanol A. dest. konz. H ₂ SO ₄ unter Rühren in Eisbad zugeben färbt Glykolipide nach Erhitzen rot
C	Phosphatid-Reagenz	1 Vol. Lsg. 1 1 Vol. Lsg. 2	(40,1 g Molybdänoxid in 1 l 25 N H ₂ SO ₄) (1,78 g pulv. Molybdän in 500 ml Lsg. 1 + 2 Vol. A. dest.) färbt alle Phospholipide blau
D	Kupfersulfat-Lösung	10 % (v/v) 8 % (v/v)	CuSO ₄ Phosphorsäure färbt alle Lipide nach dem Erhitzen auf 175 °C schwarz

Tabelle 9 Laufmittel für die DC zur analytischen und präparativen Trennung von Glykolipiden und acetylierten Glykolipiden.

Laufmittel	Verhältnis (v:v)	zu trennende Lipide
Chloroform/Methanol	85:15	Monoglykosyldiacylglycerol /* Glykosylceramid / (Di-,Tri-)glykosyldiacylglycerol
Hexan/THF/Isopropanol/H ₂ O**	50:0.5:35:3	α GalD / α GlcD / β GalD / β GlcD
Hexan/THF/Isopropanol/ H ₂ O	40:0.4:50:8	β Glc β GlcD / β Glc β GalD / β Gal β GalD / Triglykosyldiacylglycerol
Hexan/THF/Isopropanol/ H ₂ O	40:0.4:50:10	Tri-(glukosyl/galaktosyl)-diacylglycerol / reines Trigalaktosyldiacylglycerol
Hexan/THF/Isopropanol/H ₂ O	50:0.5:45:0.75	GlcCer / GalCer, β Glc(1 \rightarrow 3) β GlcD
Chloroform/Hexan/THF/ Isopropanol/Methanol/H ₂ O	35:35:0.35:40:5:4	β Glc(1 \rightarrow 3) β GlcD / GalCer
Chloroform/Methanol	85:15	GlcCer-1 / GlcCer-2
Diethylether		acetylierte Glykolipide

* Die Komponenten links und rechts von dem Zeichen ,/' werden voneinander getrennt.

**Das Laufmittel [Hexan/THF 99:1]/Isopropanol/ H₂O 40:50:10 wurde von Frau Ott (Arbeitsgruppe Heinz) entwickelt und in abgewandelter Form in dieser Arbeit eingesetzt.

THF = Tetrahydrofuran

2.18.3 Präparative Reinigung von Lipidkomponenten

Säulenchromatographie

Mit Hilfe der Säulenchromatographie wurden Gesamtlipidextrakte fraktioniert. Dazu wurden entsprechend der Lipidmenge zwei verschiedene Größen (100 mg / 1 ml; 500 mg / 6 ml) von „SPE SI-1“-Säulchen (Phenomenex, CA) benutzt, die mit Chloroform äquilibriert und mit dem in Chloroform aufgenommenen Gesamtlipidextrakt (2.18.1) beladen wurden. Die Elution der Neutrallipid-Fraktion erfolgte mit Chloroform, die Glykolipide wurden mit Aceton/Isopropanol (9:1) und die Phospholipide mit Methanol eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden eingengt und die Lipide in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen. Ein Aliquot davon wurde chromatographiert und der Rest für die weitere Analyse verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Die Isolierung und Reinigung von Glykolipiden erfolgte über die präparative Dünnschichtchromatographie. Dazu wurde, entsprechend der eingesetzten Lipidmenge, der Lipidextrakt auf der gesamte Breite einer oder mehrere Kieselgelplatten aufgetragen. Diese wurden im entsprechenden Laufmittel entwickelt (Tabelle 9), anschließend mit ANS (2.18.2) besprüht und die gewünschten Lipide unter UV-Licht markiert. Die markierten Stellen wurden mit einem Spatel abgekratzt. Das isolierte Kieselgel wurde in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad beschallt oder über Nacht bei 4 °C extrahiert. Durch Zugabe von 0,75 Volumen 0,45 % (w/v) NaCl wurde der Lipidextrakt gewaschen und nach Zentrifugation die untere, organische Phase entnommen. Nach deren Einengung wurden die Glykolipide in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen. Ein Aliquot davon wurde zur Überprüfung der Reinheit chromatographiert und der Rest für weitere Analysen verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.18.4 Acetylierung von Lipiden

Zur Strukturanalyse von Glykolipiden mit der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie (MS) wurden diese acetyliert. Die vom Lösungsmittel befreiten Lipide wurden zu je 20-25 mg mit 0,5 ml Pyridin (trocken) und 0,25 ml Essigsäureanhydrid über Nacht im Dunkeln inkubiert. Die Entfernung dieser Reagenzien erfolgte durch zweimalige Zugabe von 5 ml Isopropanol mit nachfolgendem Eindampfen des Lösungsmittelgemisches. Nach Aufnahme der acetylierten Glykolipide in Chloroform wurden diese über präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt (2.18.3)

2.18.5 Darstellung und GLC-Analyse von Fettsäuremethylestern

Die Darstellung der Fettsäuremethylester (FAME) für die gaschromatographische Analyse erfolgte durch saure Methanolyse. Hierfür dienten die von Kieselgelplatten abgekratzten Lipidfraktionen als Ausgangsmaterial. Das Material wurde möglichst wasserfrei in ein Pyrex-Röhrchen überführt und mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan versetzt und 1 h bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die entstandenen FAME mit 2-4 ml Petrolether extrahiert. Nicht derivatisierte freie Fettsäuren wurden durch Waschen mit jeweils dem gleichen Volumen 100 mM NaHCO₃ und A. dest. entfernt. Die Petroletherphase wurde jeweils in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde sie mit Na₂SO₄ (in einer mit Watte gestopften Pasteurpipette) getrocknet, unter Argon eingeengt und für die Verwendung in der gaschromatographischen Analyse in 100-200 µl Petrolether aufgenommen.

GC-Bedingungen	Säule	DB23, 30 m, 0,252 mm, 0,25 µm Film (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen)
	Trägergas	Stickstoff 5.0
	Detektor	Flammenionisationsdetektor
	Gaschromatograph	Hewlett-Packard 6850

2.18.6 NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie

Die Aufklärung der Struktur der isolierten und acetylierten Glykolipide erfolgte durch Prof. Dr. U. Zähringer am Forschungszentrum Borstel mittels NMR-Spektroskopie und MS.

2.19 Isolierung von Chloroplasten und Envelopes aus Pflanzen

Die Isolierung von Chloroplasten und Envelopes aus Spinat und *Arabidopsis* wurde in modifizierter Form nach Tietje (1998) wie folgt durchgeführt:

Isolierung von Chloroplasten

Zunächst wurden 300 g frisches Pflanzenmaterial zusammen mit 1 l Eiswasser und 1 l Isoliermedium II (2 x) in einem Mixer zerkleinert. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4 °C durchgeführt. Der Pflanzenbrei wurde anschließend durch Gaze (Miracloth) gefiltert, das Filtrat auf 6 Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 2.300 x g 4 min sedimentiert. Die Pellets wurden mit etwas Waschpuffer vorsichtig gewaschen und in je 2 ml Waschpuffer durch vorsichtiges Aufziehen mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Die Trennung der Chloroplasten von den übrigen Zellfragmenten und Thylakoiden geschah über einen Percollgradienten. Dieser Percollgradient bestand aus 12 ml einer 80 % Percoll-Lösung, die mit 18 ml einer 40 % Percoll-Lösung überschichtet wurde, auf die die Chloroplastensuspension aufgetragen wurde. Nach Zentrifugation bei 4.000 x g für 5 min befanden sich die Chloroplasten in der untersten Schicht, die in ein neues Gefäß überführt und mit Isoliermedium II versetzt wurde. Durch Zentrifugation bei 3.000 x g für 4 min wurden die Chloroplasten sedimentiert und in wenig Isoliermedium II resuspendiert.

Isolierung von Envelopes

Zur Gewinnung von Envelopes mussten die Chloroplasten zunächst durch Zugabe des 10-20 fachen Volumens Schockpuffer lysiert werden. Die Trennung der Envelopes von den freigesetzten Thylakoiden geschah durch Auftragen der Lösung (je 10 ml) auf einen Sucrosegradienten, bestehend aus 12 ml 0,93 M Sucrose (in Schockpuffer) überschichtet mit 8 ml 0,60 M Sucrose (in Schockpuffer) pro Zentrifugenröhrchen (40 ml). Durch Zentrifugation bei 200.000 x g für 15 min erfolgte die

Trennung der Envelopes von den Thylakoiden, wobei die Envelopes als gelbe Bande im Sucrosegradienten zu erkennen waren. Diese Bande wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen, mit Schockpuffer versetzt und erneut bei 200.000 x g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 50-100 µl 10 mM Tricine resuspendiert.

Isoliermedium II (2 x)	660 ml	1 M Sorbitol
	80 ml	1 M Tricine-KOH, pH 8,0
	260 ml	A. dest.
Waschmedium	165 ml	1 M Sorbitol
	5 ml	1 M Tricine-KOH, pH 8,0
	1 ml	1 M MgCl ₂
	329 ml	
Schockpuffer	0,8 ml	1 M MgCl ₂
	2,0 ml	1 M Tricine-KOH, pH 8,0
	197,2 ml	A. dest.
Percoll-Lösung (80 %)	160 ml	Percoll
	20 ml	3,2 M Sorbitol
	8 ml	1 M Tricine-KOH, pH 8,0
	12 ml	A. dest.
Percoll-Lösung (40 %)	80 ml	Percoll
	80 ml	Waschmedium
	20 ml	3,2 M Sorbitol
	8 ml	1 M Tricine-KOH, pH 8,0
	12 ml	A. dest.

2.20 Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford, 1976)

Bradford-Reagenz	100 mg	Serva Blau (in 50 ml 96 % Ethanol)
	100 ml	85 % Phosphorsäure
	850 ml	A. dest

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden 50 µl Probe mit 950 µl Bradfordreagenz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der OD₅₉₅ gegen 950 µl Bradfordreagenz gemischt mit 50 µl A. dest als Referenz. Der Proteingehalt wurde dann anhand einer Eichgeraden bestimmt, die mit BSA-Standardlösungen (1,25 / 2,5 / 5 / 7,5 µg) vor jeder Messreihe neu erstellt wurde.

2.21 Enzymtests

Zur Charakterisierung der in *E. coli*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* exprimierten Proteine wurden verschiedene Enzymtests durchgeführt. Ebenso wurden Enzymtests zum Nachweis möglicher Glykosyltransferaseaktivität in *A. tumefaciens* durchgeführt. Das jeweilige Protein wurde in Form von Zell- oder Membranfraktionen (2.11.5, 2.12.5, 2.14.4, 2.15.4) zum Reaktionsansatz gegeben. Weiterhin wurden Enzymtests auch mit Chloroplasten-Envelopes (2.19) durchgeführt. Die Tests wurden in einem Volumen von 100 µl in Puffer 2 (2.11.5) durchgeführt und für 1-2 h bei 30 °C inkubiert.

Der Abbruch der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 3 ml Chloroform/Methanol (2:1) und 0,75 ml 0,45 % NaCl. Die aus der organischen Phase gewonnenen Lipide wurden über DC in den entsprechenden Lösungsmitteln (Tabelle 9) getrennt. Als Standards dienten verschiedene nicht-radioaktiv markierte Glykolipide. Die Detektion und Dokumentation der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe des „BAS-1000 BioImaging Analyzer“ (RAYTEST). Zur Messung von Radioaktivität kam außerdem ein Szintillationszähler (Beckmann) zum Einsatz. NBD-Cer-Fluoreszenz (siehe unten) wurde mit dem „AlphaDigiDoc™ Gel Documentation & Image Analysis System“ (Alpha Innotech Corporation, CA) detektiert und dokumentiert.

Enzymtests mit radioaktiv markierten UDP-Zuckern

Standardtests mit radioaktiv markierten UDP-Zuckern wurden mit UDP-[¹⁴C]Glukose (150.000 dpm, spezifische Aktivität 10 GBq/mmol, Endkonzentration 2,5 µM) oder UDP-[¹⁴C]Galaktose (150.000 dpm, spezifische Aktivität 10,9 GBq/mmol, Endkonzentration 2.3 µM) durchgeführt.

In einigen Tests war die Zugabe weiterer Substrate (βGalD, βGlcD oder SG) erforderlich. Die jeweilige Endkonzentration dieser möglichen Akzeptoren im Reaktionsansatz lag bei 1 mM. Diese Substanzen wurden zuvor in Ethanol solubilisiert. Die Endkonzentration von Ethanol im Reaktionsansatz war nicht höher als 5 %.

Enzymtests mit fluoreszierendem Ceramid

Enzymtests mit D-erythro-N[6-amino-N-4'(7nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolo)-hexanoyl]-ceramide (NBD-Cer) (Matreya, Inc.; Endkonzentration 0,01 µg/µl) enthielten neben diesem unter UV-Licht fluoreszierenden Lipid zusätzlich nicht radioaktiv markierte UDP-Glukose (UDP-Glc) oder UDP-Galaktose (UDP-Gal) (Endkonzentration je 500 µM). Die Zugabe von NBD-Cer erfolgte in gelöster Form in Ethanol, dessen Endkonzentration im Reaktionsansatz nicht höher als 5 % war.

Enzymtests mit radioaktivem β GalD

Standardtests zum Nachweis von möglicher Galaktosyltransferase-Aktivität der putativen α Gal β GalD-Synthase aus *P. patens* enthielten radioaktives β GalD, das zuvor synthetisiert wurde. Zur Synthese wurde UDP-[14 C]Galaktose mit einer spezifischen Aktivität von 10,9 GBq/mmol verwendet.

Reaktionsansatz zu den Enzymtests mit radioaktiv markiertem β GalD

50.000 dpm	[14 C] β GalD
3 μ l	NaCholat (100 mM)
ad. 50 μ l	A. dest.
	5 min im Ultraschallbad solubilisieren
50 μ l bzw. 4 μ l	Zellfraktion bzw. Envelopes
	1 min im Ultraschallbad solubilisieren
10 μ l	10 x MES (350 mM), pH 6,5
1 μ l	MgCl ₂ (1 M)
	Inkubation 3h bei RT

Reaktionsansatz zur Synthese von radioaktiv markiertem β GalD

2 μ l	Envelopes
10 μ l	10 x Hepes (350 mM), pH 7,5
1,53 μ M	UDP-[14 C]Galaktose
4 μ l	MgCl ₂ (0,1 M)
ad. 100 μ l	A. dest.
	Inkubation 3 h bei RT

2.22 Southern-Blot-Analysen

Restriktion und Gelelektrophorese

Für die Southern-Blot-Analysen wurden je 15 μ g genomische DNA von *A. thaliana* mit 40 Units verschiedener Restriktionsenzyme über Nacht bei 37 °C verdaut. Die DNA-Fragmente wurden anschließend in einem 0,75 % Agarosegel in TAE-Puffer mit 30 V für 6 h bei RT aufgetrennt. Als Längenstandard diente hierbei eine 1 kb-Leiter (Geneo BioProducts, Hamburg). Die Vollständigkeit des Verdauens wurde am UV-Transilluminator überprüft und durch das „AlphaDigiDoc™ Gel Documentation & Image Analysis System“ (Alpha Innotech Corporation, CA) dokumentiert.

TAE-Puffer (50 x)	484,0 g	Tris-Base
	114,2 ml	Eisessig
	200,0 ml	0,5 M EDTA
	ad. 2 l	A. dest.

DNA-Transfer auf eine Nylonmembran

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

- Inkubation des Gels für 8 min in 250 mM HCl, um die DNA zu depurinieren
- Spülen des Gels für 1 min in A. dest.
- 2 x Inkubation des Gels in Denaturierungslösung für 30 min bei RT
- Spülen des Gels für 1 min in A. dest.
- 2 x Inkubation des Gels in Neutralisierungslösung für 30 min
- Äquilibrierung des Gels in 20 x SSC

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

- eine Lage Whatman-3M-Papier, dessen Enden in 20 x SSC tauchen
- das Gel mit der Oberseite auf das Whatman-Papier legen
- die Nylonmembran auflegen
- 3 Lagen Whatman-Papier
- 10-20 cm Zellstoffpapier
- eine Glasplatte mit einem leichten Gewicht zum Abschluss

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. dest. gewaschen und in der Prähybridisierung eingesetzt.

Denaturierungspuffer	40,0 g	NaOH
	175,3 g	NaCl
	ad. 2 l	A. dest.
Neutralisierungspuffer	121,1 g	Tris-Base
	360,0 g	Eisessig
	ad. 2 l	A. dest.
		pH 7,2 mit HCl einstellen
SSC (20 x)	350,6 g	NaCl
	176,4 g	Natriumcitrat
	ad. 2 l	A. dest.
		pH 7,0 mit NaCl oder NaOH einstellen

Herstellung der 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 das entsprechende Plasmid verwendet.

Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen

Die Membran wurde zunächst in 25 ml der Hybridisierungslösung „DIG Easy Hyb“ (Roche) für 2 h bei 42 °C prähybridisiert. Bevor die Sonde zur „DIG Easy Hyb“-Hybridisierungslösung gegeben wurde, wurde sie 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über Nacht im Hybridisierungsöfen. Für eine Membran wurde 1 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 100 ml 2 x Waschlösung unter leichtem Schwenken gewaschen. Dazu wurde die Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen genommen und in eine Schale überführt. Es folgten zwei stringente Waschschriffe für je 15 min bei 68 °C im Hybridisierungsöfen 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

Detektion

Die Membran wurde nach den stringenten Waschschriffen 1 min in Maleinsäurepuffer äquilibriert und dann 2 h 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 Waschschriffe zu je 15 min bei RT in Maleinsäurepuffer abgewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran für 2 min in Detektionspuffer äquilibriert und danach 5 min bei 37 °C im Hybridisierungsöfen 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 24 h auf die Membran aufgelegt wurde. Die Entwicklung des Filmes erfolgte maschinell.

Maleinsäurepuffer 0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5 mit NaOH-Plätzchen einstellen

10 x Blocking-Lösung 10 % (w/v) Blocking Reagent in Maleinsäurepuffer

Antikörperlösung 20 μl Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragment konjugiert mit alkalischer Phosphatase, 750 Units/ml) in 200 ml 2 x Blocking-Lösung

Detektionspuffer	0,1 M	Tris/HCl pH 9,5
	0,1 M	NaCl
CSPD®-Lösung	2 µl 25 mM 3-(4-Methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2']-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1 ^{3,7}]decan]-4-yl)phenylphosphat, Dinatriumsalz in 2 ml Detektionslösung	

2.23 Computergestützte Sequenzauswertung

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)	(Higgins et al., 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) <i>In silico</i> -Klonierungen

3 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Manipulation der Glykolipidbiosynthese in *A. tumefaciens*, *P. patens*, *Synechococcus* und *A. thaliana*. Dabei sollten die nativen Glykolipide mit Hilfe eines genetischen Ansatzes durch alternative Glykolipide ersetzt werden, die sich in Details der Glykolipid-Kopfgruppe von den nativen Glykolipiden unterscheiden. Der genetische Ansatz konzentrierte sich dabei auf die entsprechenden Glykosyltransferasen, die den jeweils letzten Schritt in der Biosynthese der nativen und der neuen Glykolipide katalysieren. Die Kenntnis der entsprechenden Gensequenzen ist für dieses Vorgehen unumgänglich.

3.1 Bereitstellung von Glykosyltransferasen

Die Bereitstellung von Glykosyltransferasen war die Voraussetzung zur Manipulation der Glykolipidbiosynthese in den ausgewählten Organismen. In dieser Hinsicht war es einerseits notwendig, die nativen Glykosyltransferase-Sequenzen zu kennen, um die entsprechenden Konstrukte zur Gen-Inaktivierung in den zu manipulierenden Organismen herzustellen. Auf der anderen Seite wäre die Verfügbarkeit von möglichst vielen Glykosyltransferasen mit unterschiedlichen Zuckerspezifitäten von Vorteil, um die erfolgreiche Expression von mindestens einer dieser heterologen Glykosyltransferasen in den zu manipulierenden Organismen zu gewährleisten. Die meisten der ausgewählten Sequenzen kodierten für putative Glykosyltransferasen, für deren Charakterisierung zunächst die Expression in *E. coli*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* erfolgte.

3.1.1 Bereits klonierte bakterielle Glykosyltransferasen

Zu Beginn der Arbeit standen drei bakterielle Glykosyltransferasen mit unterschiedlichen Zuckerspezifitäten zur heterologen Expression zur Verfügung. Eines dieser Enzyme ist die prozessive β -Glukosyltransferase aus *S. aureus*, die ausgehend von DAG bis zu drei Glukosereste in β -Konfiguration transferieren kann (Jorasch et al., 2000). Die Zucker sind dabei (1 \rightarrow 6)-verknüpft, wobei das Hauptprodukt bei der heterologen Expression β -Glukosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glukosyldiacylglycerol (β Glc β GlcD) ist. Diese Glukosyltransferase scheint daher gut geeignet zu sein, um das native Galaktolipid α Gal β GalD der Pflanzen und Blaualgen durch das alternative Glukolipid β Glc β GlcD zu ersetzen. Eine weitere in dieser Arbeit verwendete Glykosyltransferase ist die α -Glukosyltransferase aus *A. laidlawii* (Berg et al., 2001), die α GlcD synthetisiert. Die dritte Glykosyltransferase stammte aus *B. burgdorferi* und sollte α -Galaktosyldiacylglycerol (α GalD) synthetisieren (lt. Korrespondenz mit Dr. Bergström). Die Expression dieses ORF in *E. coli* und *S. cerevisiae* zur Überprüfung der

Enzymaktivität war jedoch erfolglos (Daten nicht gezeigt). Unabhängig davon wurden die beiden letzt genannten α -Glykosyltransferasen dafür eingesetzt, das native β GalD der Pflanzen und Blaualgen durch α GlcD oder α GalD zu ersetzen.

3.1.2 Verifizierung einer β GalD-Synthase aus *Physcomitrella*

Wie alle Pflanzen synthetisiert auch das Moos *P. patens* β GalD und α Gal β GalD. Die entsprechenden Gene zur Synthese dieser Galaktolipide waren jedoch nicht bekannt, wobei aber deren Kenntnis für die Erzeugung von Lipid-Mutanten erforderlich war. Aus EST-Sequenzierungsprogrammen (BASF-AG) standen cDNA-Klone einer putativen β GalD und α Gal β GalD-Synthase zur Verfügung. Die Verifizierung dieser Sequenzen stand am Anfang der Arbeiten und war Voraussetzung für die spätere Klonierung von Konstrukten zur Deletion dieser Gene in *P. patens*.

Zur Verifizierung der putativen β GalD-Synthase wurde die cDNA amplifiziert und in pUC19 als Expressionsvektor für *E. coli* kloniert (Tabelle 6, Zeile 37). *E. coli* XL1-Blue wurde dann mit dem Konstrukt p19ppMGDS (Tabelle 7) transformiert und die Expression durchgeführt (2.11.4). Die Lipidextrakte der geernteten Zellen wurden fraktioniert und die Glykolipidfraktionen mit Hilfe von DC aufgetrennt (2.18). Durch Besprühen mit α -Naphthol-Schwefelsäure und anschließendem Veraschen wurden die Glykolipide sichtbar gemacht. Der Lipidextrakt der Expressionskultur enthielt dabei eine Glykolipidkomponente, die in der Kontrolle nicht vorhanden war. Anhand der Referenzlipide β GalD und β GlcD konnte die neue Komponente als β GalD identifiziert werden. Eine eindeutige Bestätigung dieses Ergebnisses erfolgte durch Strukturanalysen des isolierten und acetylierten Glykolipids durch Prof. Dr. U. Zähringer (Daten nicht gezeigt). Die detaillierte Struktur ist in Abb. 26 zu sehen.

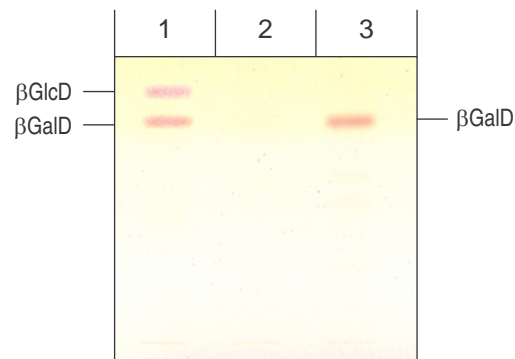


Abb. 11 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Glykolipidfraktion einer *E. coli*-Expressionskultur. Die Glykolipide wurden in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 50:0,5:35:3 aufgetrennt, mit α -Naphthol-Schwefelsäure besprüht und verascht. Die Expression der putativen β GalD-Synthase aus *P. patens* führte in *E. coli* XL1-Blue zur Synthese von β GalD.

Spur 1: Standards

Spur 2: Kontrolle

Spur 3: Synthese von β GalD durch Expression der putativen β GalD-Synthase aus *Physcomitrella*.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden zusätzlich Enzymtests mit Zellfraktionen entsprechender Expressionskulturen durchgeführt. Dazu wurde einerseits die oben beschriebene Expressionskultur verwendet, andererseits wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem Expressionsvektor pETppMGDS (von Claudia Hörnle kloniert), einem Derivat des starken Expressionsvektors pET-24d, transformiert und eine zweite Expressionskultur herangezogen. Die Enzymtests wurden mit radioaktiv markierter UDP-Gal, wie beschrieben (2.21), durchgeführt. Die radioaktiven Lipide wurden mittels DC aufgetrennt und mit Hilfe von Referenzlipiden zugeordnet. Dabei konnte in beiden Expressionskulturen die Synthese von β GalD beobachtet werden.

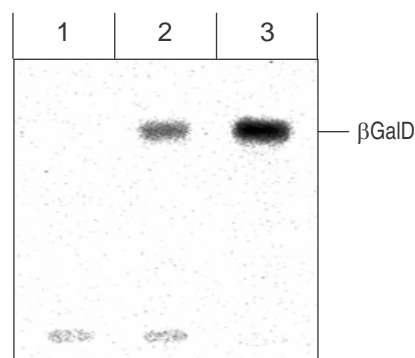


Abb. 12 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukten. Die Enzymtests wurden mit radioaktiv markierter UDP-Gal durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in Chloroform/Methanol 85:15, wobei nicht-radioaktives β GalD als Referenzlipid diente. Anhand des R_f -Wertes dieses veraschten Standards konnte das radioaktive Lipid als β GalD identifiziert werden.

Spur 1: Kontrolle

Spur 2: Inkubation mit Zellfraktionen von *E. coli* XL1-Blue

Spur 3: Inkubation mit Zellfraktionen von *E. coli* BL21(DE3)

Anhand der Lipidanalysen, der Strukturdaten und der Enzymtests konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem cDNA-Klon um eine UDP-Gal-abhängige, nicht-prozessive β GalD-Synthase handelt (Jorasch et al., 2000). Durch Vergleich der aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz (535 Aminosäuren) mit β GalD-Synthasen aus verschiedenen Organismen zeigten sich starke Ähnlichkeiten (Daten nicht gezeigt) im Hinblick auf die β GalD-Synthasen vom Typ A (Awai et al., 2001). Dabei sind, verglichen mit MGD1 aus *Arabidopsis* (Awai et al., 2001; Jorasch et al., 2000) oder Tabak (durch BLAST Datenbanksuche), mindestens 50 % der Aminosäuren identisch. Außerdem enthält die abgeleitete Aminosäuresequenz eine N-terminale Verlängerung. Man darf annehmen, dass es sich hier, wie bei den β GalD-Synthasen vom Typ A, um ein Chloroplasten-Leaderpeptid handelt (Shimajima et al., 1997).

Um die Funktion der putativen α Gal β GalD-Synthase zu verifizieren, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die jedoch nicht zum gewünschten Erfolg führten (Daten nicht gezeigt). Die Enzymtests umfassten einerseits die Coexpression des cDNA-Klons mit je einer β GalD-Synthase in *E. coli* und *S. cerevisiae*. Die benutzten Expressionsvektoren (Tabelle 7) für *E. coli* XL1-Blue waren pBK-CMVppDGDS und p19ppMGDS; *S. cerevisiae* enthielt die Vektoren pEMGD2 (Jorasch et al., 2000) und pYppDGDS. Die Inkubation der Zellextrakte erfolgte mit UDP-[14 C]Galaktose. Andererseits wurden Enzymtests mit *E. coli* BL21(DE3) unter Verwendung des starken pET-Vektor-Systems (2.11.4) durchgeführt (pETppDGDS, Tabelle 7), wobei als radioaktive Komponente markiertes β GalD verwendet wurde. Als Positiv-Kontrolle wurden Enzymtests mit isolierten Chloroplasten-Envelopes aus Spinat durchgeführt (2.19, 2.21). Die verschiedenen Enzymtests zeigten zwar eine Aktivität bezüglich der exprimierten β GalD-Synthasen, aber eine Synthese von α Gal β GalD durch die putative α Gal β GalD-Synthase aus *Physcomitrella* konnte nicht beobachtet werden. In den Positiv-Kontrollen wurde dagegen α Gal β GalD gebildet.

Das in den Enzymtests verwendete radioaktive β GalD wurde durch Inkubation der Chloroplasten-Envelopes mit radioaktiver UDP-Gal hergestellt (2.21).

Die positiven Ergebnisse der Enzymtests mit den isolierten Envelopes zeigten, dass die Versuchsbedingungen für die Synthese von α Gal β GalD geeignet sein sollten. Durch Coexpression einer β GalD-Synthase zusammen mit einer α Gal β GalD-Synthase durch eine andere Arbeitsgruppe war andererseits bereits die Synthese von α Gal β GalD in *E. coli* demonstriert worden (Kelly et al., 2003). Die Ursachen für die nicht nachweisbare Aktivität der putativen α Gal β GalD-Synthase aus *Physcomitrella* wurden nicht weiter untersucht.

Somit konnte im Gegensatz zur β GalD-Synthase die putative α Gal β GalD-Synthase nicht identifiziert werden. Beide Sequenzen sollen jedoch dazu verwendet werden, die entsprechenden Deletionskonstrukte zu erzeugen und damit die eventuellen Enzymaktivitäten in *Physcomitrella* zu eliminieren. Diese Elimination könnte dann möglicherweise weitere Aufschlüsse über die jeweiligen Enzyme geben und möglicherweise auch zeigen, ob es sich hier doch um eine α Gal β GalD-Synthase handelt.

3.1.3 Synthese einer optimierten Polynukleotidsequenz

Zunächst standen nur die drei oben dargestellten bakteriellen Sequenzen zur Expression in Pflanzen und Blaualgen zur Verfügung. Wie weiter unten beschrieben, führte die Expression dieser bakteriellen Sequenzen nicht zur Akkumulation von neuen Glykolipiden. Daher wurde beschlossen, eine künstliche Polynukleotidsequenz zu synthetisieren, die der Codon-Häufigkeit des Genoms von *A. thaliana* angepasst war. Als Basissequenz diente die Aminosäuresequenz der prozessiven β -Glukosyltransferase aus *S. aureus* (Jorasch et al., 2000). In einem ersten Schritt wurde jede Aminosäure durch jenes Codon repräsentiert, das in *A. thaliana* in Bezug auf die jeweilige Aminosäure am häufigsten vorkommt. Entsprechende „Codon-Usage“-Tabellen von verschiedenen Organismen sind auf der Internetseite <http://www.kazusa.or.jp> veröffentlicht. In einem zweiten Schritt wurden dann alle Codons ausgetauscht, die an ihrer zweiten und dritten Position das Dinukleotid CG oder TA enthielten. Diese Sequenzen an den entsprechenden Positionen des Triplets werden in den meisten Eukaryoten einschließlich Pflanzen vermieden (Murray et al., 1989). Außerdem wurden Kombinationen von Codons vermieden, bei denen das dritte Nukleotid des vorausgehenden Triplets und das erste Nukleotid des folgenden Triplets von T-A oder C-G besetzt waren (De Amicis et al., 2000).

Die auf diese Weise entworfene Polynukleotidsequenz war die Basis für die Ableitung einer Serie von sich überlappenden Oligonukleotiden, die in ihrer Gesamtheit die künstliche, aber optimierte Sequenz repräsentieren. Wie beschrieben (2.5), wurden diese Nukleotidfragmente dann zur Synthese der künstlichen Sequenz benutzt. Ähnliche Strategien zur Synthese von künstlichen Polynukleotiden wurden bereits beschrieben (Bambot et al., 1993; Fuhrmann et al., 1999; Shevchuk et al., 2004). Die vollständig synthetisierte Sequenz wurde zwischenkloniert und sequenziert, mit dem Ergebnis, dass in der Sequenz sechs Fehler in Form von Deletionen und Basenaustauschen vorhanden waren. Die Sequenz wurde entsprechend korrigiert (2.5) und ein weiteres Mal sequenziert, wobei erneut zwei Fehler aufgetreten waren. Es folgte eine weitere Korrektur. Dabei wurde aber nur eine der beiden fehlerhaften Basen korrigiert, die zu einem Aminosäureaustausch geführt hätte. Auch die dritte Version enthielt eine fehlerhafte Base, was eindeutig auf einen fehlerhaften Primer zurückzuführen war. Auch die übrigen Fehler konnten in einigen Fällen auf fehlerhafte Oligonukleotide zurückgeführt werden. Durch die fehlerhafte Base in der dritten Version wird das Codon TAC zu TGC abgewandelt,

was zum Austausch der aromatischen Aminosäure Tyrosin durch die schwefelhaltige Aminosäure Cystein an Position 67 der Aminosäuresequenz führt. Dieser Austausch kann für die Struktur und Funktion des Proteins kritisch sein, aber an dieser Stelle wurde auf eine weitere Korrektur verzichtet.

Alle drei Versionen wurden zur Expression in *E. coli* benutzt; die dritte Version wurde außerdem in *S. cerevisiae* exprimiert. Das zu erwartende Produkt β Glc β GlcD oder andere neue Glykolipide konnten jedoch in keinem dieser Fälle detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die durch die Fehler verursachten Aminosäureaustausche in der Proteinsequenz sein, die möglicherweise zu einem Verlust der Enzymaktivität geführt haben könnten. Es könnte auch daran liegen, dass die für die Expression in Pflanzen optimierte Sequenz nicht für die Expression in *E. coli* oder *S. cerevisiae* geeignet war. Die dritte Version dieser Sequenz wurde zur Transformation von *A. thaliana* und *Synechococcus* benutzt.

3.1.4 Isolierung neuer Glykosyltransferasen aus verschiedenen Bakterien

Zur Manipulation der Glykolipidbiosynthese in Pflanzen und Blaualgen standen nun drei bakterielle Glykosyltransferasen mit bekannten Spezifitäten sowie eine künstliche Polynukleotidsequenz zur Verfügung (siehe oben). Da zu diesem Zeitpunkt schon bekannt war, dass die Expression der drei bakteriellen Glykosyltransferasen in Pflanzen nicht erfolgreich war (siehe unten), wurde die Isolierung weiterer bakterieller Glykosyltransferasen angestrebt.

3.1.4.1 BLAST Datenbanksuche

Zur Entdeckung neuer bakterieller Glykosyltransferasen wurden verschiedene BLAST-Suchläufe in der „GenBank“-Datenbank durchgeführt (Altschul et al., 1990). Einerseits dienten die beiden bakteriellen Glykosyltransferasen aus *A. laidlawii* (α -Glukosyltransferase) und *S. aureus* (prozessive β -Glukosyltransferase) (Berg et al., 2001; Jorasch et al., 2000) als Suchsequenzen, wobei aus dieser Datenbankabfrage 18 ORF-Sequenzen mit unbekannter Funktion resultierten. Auf der anderen Seite wurden mit Hilfe der Gcs aus *Homo sapiens* (Ichikawa et al., 1996) zwei weitere bakterielle Sequenzen, die als putative Gcs bezeichnet wurden, ermittelt (von Martina Leipelt). Die Ergebnisse dieser Datenbanksuche sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Darin ist jeder identifizierte ORF mit der zugehörigen „Genbank-Accession-Nummer“ und der vermuteten Funktionsbezeichnung der putativen Glykosyltransferase sowie der Spender-Organismus wiedergegeben.

Die Suche ergab zwei ORF-Sequenzen von *Deinococcus radiodurans*, zwei von *Thermotoga maritima*, eine von *Lactococcus lactis*, vier von *Chlorobium tepidum*, neun von *Chloroflexus aurantiacus* und je eine putative Gcs-Sequenz von *A. tumefaciens* und *M. loti*. Die meisten Sequenzen

wurden dabei als putative Glykosyltransferasen oder als hypothetische Proteine annotiert. Vierzehn der entsprechenden Polypeptide zeigten Homologie zu retendierenden Glykosyltransferasen mit einer Identität von 16-25 % zur α -Glukosyltransferase von *A. laidlawii*, und vier zeigten Homologie zu invertierenden Glykosyltransferasen mit einer Identität von 14-20 % zur β -Glukosyltransferase von *S. aureus*. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten ließen sich die 18 Sequenzen einer bestimmten Gruppe von retendierenden (α -) oder invertierenden (β -) Glykosyltransferasen zuordnen (Tabelle 10). Die hier angesprochenen Glykosyltransferasen repräsentieren dabei Mitgliedglieder der Glykosyltransferase-Familien 4 (GT4) bzw. 28 (GT28), abgelegt in der „CAZy“-Datenbank zur Klassifikation von Glykosyltransferasen und verwandten Proteinen (Coutinho et al., 1999) (Carbohydrate-Active Enzymes Server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>).

Aufgrund der Zugehörigkeit zu einer dieser Gruppen bzw. anhand ihrer Aminosäuresequenzen ist es jedoch nicht möglich, auf Substrat-Spezifitäten von Glykosyltransferasen sowie auf Prozessivität und andere Details zu schließen. Beispiele hierfür sind MGD1 aus *A. thaliana* und die prozessive β -Glukosyltransferase aus *S. aureus*. Beide Enzyme sind in ihrer Aminosäuresequenz homolog und Mitglieder der GT28, zeigen aber sehr unterschiedliche Substrat-Spezifitäten und synthetisieren unterschiedliche Produkte (Jorasch et al., 2000). Daher kann mit Ausnahme der Anomerie der Zuckerverknüpfung, keine Aussage über die sonstigen Eigenschaften der putativen Glykosyltransferasen getroffen werden.

Die Sequenzen mit der Bezeichnung dr1225, tm0744, tm0622, ywaG, ct1882, ct0548, ct0225, ct0226 sind der Familie GT4 zugeordnet, die Sequenz dr1076 ist in GT28 zu finden, und die Sequenzen von *C. tepidum* sind bisher in keiner Glykosyltransferase-Familie vertreten. Laut Korrespondenz mit Prof. Henrissat können die ORF-Sequenzen chlo2029, chlo2030 und chlo2464 der GT28 und die verbleibenden sechs ORFs der GT4 zugeordnet werden.

Tabelle 10 Ähnlichkeiten (in %) von (putativen) Glykosyltransferasen zur α -Glukosyltransferase von *A. laidlawii*, zur β -Glukosyltransferase von *S. aureus* oder zur Gcs aus *H. sapiens*.

GT4		GT28		GT21	
(putative) Glykosyl- transferase	α -Glukosyl- transferase <i>A. laidlawii</i>	(putative) Glykosyl- transferase	β -Glukosyl- transferase <i>S. aureus</i>	(putative) Glykosyl- transferase	Gcs <i>H. sapiens</i>
dr1225	23	dr1076	20	AGR_C_3323	24
tm0744	25	chlo2029	19	mlr5650	23
tm0622	20	chlo2030	19		
ywaG	25	chlo2464	14		
ct1882	20				
ct0548	16				
ct0225	16				
ct0226	16				
chlo0149	16				
chlo1337	19				
chlo1537	20				
chlo1567	17				
chlo1798	17				
chlo4056	16				
α -Galaktosyl- transferase <i>B. burgdorferi</i>	28	MGD1* <i>A. thaliana</i>	22	Gcs <i>Gossypium</i> <i>arboreum</i>	9

* Sequenz der MGD1 ohne N-terminales Leaderpeptid

Die beiden Polypeptid-Sequenzen aus *A. tumefaciens* und *M. loti* zeigten 24 % bzw. 23 % Identität zur menschlichen Gcs, untereinander waren sie zu 60 % identisch. Die kürzlich aus Pilzen und Pflanzen charakterisierten Enzyme zeigten sogar noch geringere Ähnlichkeit zur menschlichen Gcs (9-21 %) (Leipelt et al., 2001). Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit wurden diese beiden ORFs der GT21 zugeordnet. Wie alle Mitglieder dieser Familie enthalten sie eine putative N-terminale Transmembran-Domäne und ein „D₁,D₂,D₃(Q/R)XXRW“-Motiv (Marks et al., 2001). Zuvor wurde gezeigt, dass dieses Motiv charakteristisch für prozessive β -Glykosyltransferasen der GT2 ist (Saxena et al., 1995). Obwohl alle Gcs-Sequenzen dieses Motiv aufweisen (Leipelt et al., 2001; Marks et al., 2001), konnte jedoch bei keinem der bisher charakterisierten Mitglieder von GT21 Prozessivität nachgewiesen werden. Die Sequenzen von *A. tumefaciens* und *M. loti* wurden anhand ihrer Sequenzähnlichkeit mit anderen Mitgliedern von GT21 als putative Ceramidglukosyltransferasen annotiert. Angesichts der Tatsache, dass bisher keine Glykosylceramide und auch keine Glykoglycerolipide in *A. tumefaciens* oder *M. loti* nachgewiesen wurden (Wilkinson, 1988), ist es verwunderlich, dass diese Organismen Sequenzen enthalten, die für eine putative Gcs codieren. Daher ist es auch nicht überraschend, dass ein enzymatischer Nachweis ihrer Funktion bisher noch nicht erbracht war. Somit war es ein Ziel dieser Arbeit, die mögliche Funktion von putativen Glykolipiden in *A. tumefaciens* aufzudecken. Mit der

Annahme, dass es sich in beiden Fällen um Glykosyltransferasen handelt, war zudem geplant, diese beiden Sequenzen ebenfalls zur Glykolipidbiosynthese in Pflanzen und Blaualgen zu nutzen.

3.1.4.2 Klonierung, Transformation und Expression der putativen bakteriellen Glykosyltransferasen in *P. pastoris*, *E. coli* und *S. cerevisiae*

Zur Isolierung der 20 durch Datenbanksuche erhaltenen ORF-Sequenzen aus den verschiedenen Bakterien wurden Primer abgeleitet und die ORF-Sequenzen durch PCR aus der genomischen DNA der jeweiligen Organismen amplifiziert (weitere Details siehe 2.10). Bis auf den ORF chlo0149 konnten alle Sequenzen amplifiziert werden. Die Amplifikate wurden in verschiedenen Klonierungsvektoren zwischenkloniert und konnten anhand von geeigneten Schnittstellen aus diesen Plasmiden wieder freigesetzt und in Expressionsvektoren inseriert werden. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass sie an keinen weiteren Stellen im Plasmid oder den jeweiligen ORF-Sequenzen vorkamen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die beiden Restriktionsenzyme unter gleichen Reaktionsbedingungen aktiv waren, um sie in einem gemeinsamen Reaktionsansatz verwenden zu können. Alle ORF-Sequenzen wurden mit den gleichen Schnittstellen, AvrII am 5'-Ende und BamHI am 3'-Ende, versehen. Diese Strategie vereinfachte erheblich die Klonierung dieser Vielzahl von Sequenzen und die Erzeugung der vielen Expressionsvektoren für die unterschiedlichen Expressionswirte. In dieser Arbeit sind nur die rekombinanten Plasmide gezeigt, die zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten erzeugt wurden oder die fertigen Konstrukte beinhalten. Die aus den Zwischenschritten entstandenen Plasmide sind nicht aufgeführt.

Die Amplifizierung der ORF-Sequenzen aus *D. radiodurans* war mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, was zum Teil auf den hohen GC-Gehalt von über 65 % (White et al., 1999) zurückzuführen sein dürfte. Erst nach vielen vergeblichen Versuchen mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und durch Auswahl von geeigneten Primer-Bindestellen in der Umgebung des jeweiligen ORF, wo der GC-Gehalt niedriger war, gelang schließlich die Amplifikation. Die isolierten Sequenzen zeigten jedoch beträchtliche Abweichungen zu den veröffentlichten Sequenzen in den Datenbanken. Diese Abweichungen dürften somit ein weiterer Grund für die Schwierigkeiten bei der Amplifikation gewesen sein, da die Primer nicht gut binden konnten. Bezüglich des ORF dr1225 lagen die Unterschiede bei 15 %, der Unterschied im Hinblick auf den ORF dr1076 lag bei 12 %. Laut Korrespondenz mit Dr. Reinhard Rachel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. O. Stetter in Regensburg handelte es sich bei *D. radiodurans*, von dem die genomische DNA stammt, um den Stamm R1. Von diesem Stamm wurden auch die Sequenzdaten veröffentlicht (White et al., 1999). Außerdem wurde die Amplifikation und anschließende Sequenzierung der Sequenzen wiederholt, sodass es zurzeit keine Erklärung für diese gravierenden Abweichungen gibt (Sequenz des amplifizierten ORF dr1225 ist im Anhang aufgeführt).

Weitere Sequenzierungen wurden von den ORF-Sequenzen tm0744 und tm0622 aus *T. maritima* durchgeführt, wobei die Ergebnisse mit den offiziellen Daten in den entsprechenden Sequenz-Datenbanken übereinstimmten. Auch die Richtigkeit der ORFs aus *A. tumefaciens* (AGR_C_3323) und *M. loti* (mlr5650) konnte durch Sequenzierung bestätigt werden (Martina Leipelt). Die ORF-Sequenzen aus *Chloroflexus* und *Chlorobium* wurden mittels Restriktionsanalysen überprüft.

Zur Expression dieser ORF-Sequenzen wurden verschiedene Expressionswirte benutzt. Einer dieser Expressionswirte ist die Hefe *P. pastoris*. Dieser Organismus enthält keine Glykoglycerolipide, synthetisiert aber konstitutiv Glukosylceramid (GlcCer) und Sterolglukosid (SG). Daher ist *Pichia* ein geeigneter Wirt zur Expression von Glykosyltransferasen, die DAG, Sterole oder Ceramide als Glykosyl-Akzeptor benötigen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mutanten von *Pichia* benutzt, die entweder nur noch GlcCer synthetisieren (Stamm JC308 Δ ugt51) oder völlig frei von Glykolipiden sind (Stamm JC308 Δ ugt51/ Δ gcs) (Hillig et al., 2003). Die glykolipidfreie *Pichia*-Mutante wurde zur Transformation mit dem ORF der putativen Gcs aus *A. tumefaciens* benutzt. Die andere *Pichia*-Mutante, die noch GlcCer synthetisiert, wurde mit den Konstrukten der ORFs aus *D. radiodurans* (dr1076, dr1225), *T. maritima* (tm0744, tm0622) und *L. lactis* (ywaG) transformiert (Tabelle 7). Drei dieser ORFs (AGR_C_3323, dr1225, tm0744) konnten dabei mit Erfolg durch die Detektion von neuen Glykolipiden in beiden *Pichia*-Mutanten exprimiert werden (siehe unten).

Als weiteres Expressionssystem für alle putativen Glykosyltransferasen wurde *E. coli* mit den Stämmen XL1-Blue oder C41(DE3) (Miroux et al., 1996) verwendet. In der Tabelle 7 sind neben weiteren Konstrukten die rekombinanten Plasmide von allen isolierten ORFs (Tabelle 3) zur Expression in *E. coli* aufgelistet. Von den 19 Sequenzen führte nur die Expression der beiden ORFs aus *A. tumefaciens* (AGR_C_3323) und *M. loti* (mlr5650) zur Detektion von neuen Glykolipiden (siehe unten).

Als dritter Expressionswirt diente die Hefe *S. cerevisiae*, die ebenfalls keine Glykolipide in nachweisbaren Mengen synthetisiert. Dieser Organismus wurde mit den insgesamt 12 klonierten ORFs aus *Chloroflexus* und *Chlorobium* transformiert (Tabelle 7). Es war anzunehmen, dass einige dieser putativen Glykosyltransferasen möglicherweise Monoglykosyldiacylglycerol als Substrat benötigen, wie dies für die Diglukosyldiacylglycerol-Synthase aus *A. laidlawii* (Edman et al., 2003) und für DGD1 und DGD2 aus *Arabidopsis* (Kelly et al., 2003) gezeigt worden war. Daher wurden zusätzlich verschiedene ORFs (ct0225, ct0226, ct0548, ct1882, chlo2030) zusammen mit einer β GalD-Synthase (siehe unten) in einem Hefe-Stamm coexprimiert. Durch Einzel- und Coexpression wurden zwei weitere neue Glykosyltransferasen (chlo2029, chlo2030) entdeckt.

Die Isolierung von 19 ORF-Sequenzen und deren Expression in *P. pastoris*, *E. coli* und *S. cerevisiae* führte letztendlich zur Entdeckung von 6 neuen Glykosyltransferasen, deren Charakterisierung nachfolgend beschrieben ist.

3.1.4.3 Charakterisierung neuer bakterieller Glykosyltransferasen

3.1.4.3.1 Prozessive Galaktosyl-/Glukosyltransferasen aus *A. tumefaciens* und *M. loti* synthetisieren eine Reihe von neuen Glykosylglycerolipiden und Glykosylceramiden

Akkumulation zahlreicher neuer Glykolipide durch Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* in *P. pastoris*

Einer der Wirte zur Expression der putativen Gcs-Sequenz aus *A. tumefaciens* (ORF AGR_C_3323) war die glykolipidfreie Doppelmutante von *P. pastoris* JC308 $\Deltaugt51/\Delta gcs$. Zur Analyse der Glykolipide in den transformierten Zellen wurde der hergestellte Lipidextrakt zunächst durch Säulenchromatographie fraktioniert und dann über DC aufgetrennt (2.18.2). Diese Auftrennung brachte zahlreiche neue Glykolipide zum Vorschein, die mit Glykosylceramid- und Glykosylglycerolipid-Standards cochromatographierten (Abb. 13). Um die Struktur dieser Lipide zu bestimmen, wurden die verschiedenen Komponenten isoliert, acetyliert und mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und MS von Prof. Dr. U. Zähringer analysiert (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise konnten die folgenden neun Komponenten identifiziert werden, bei denen die Zucker, falls nichts anderes angegeben, (1→6)-verknüpft sind: βGlcD , βGalD , zwei GlcCer-Spezies, $\beta\text{Glc}(1\rightarrow3)\beta\text{GlcD}$, GalCer, $\beta\text{Glc}\beta\text{GlcD}$, $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$, $\beta\text{Gal}\beta\text{GalD}$. Die Strukturen dieser Glykolipide sind in Abb. 26 dargestellt.

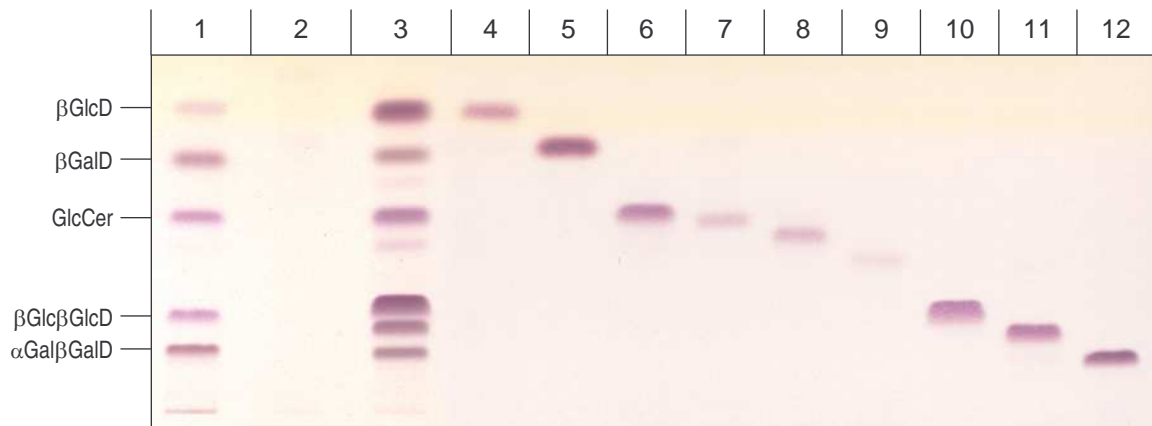


Abb. 13 Synthese von Glykosyldiacylglycerolen und Glykosylceramiden durch Expression der Gcs-Sequenz aus *A. tumefaciens* in der glykolipidfreien Doppelmutante *P. pastoris* JC308 $\Delta gcs/\Deltaugt51B1$. Die Glykolipidfraktion aus den transformierten *Pichia*-Zellen wurde über DC in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/Methanol/H₂O 35:35:0,35:40:5:4 analysiert. Die Glykolipide wurden durch Besprühen mit α -Naphthol-Schwefelsäure sichtbar gemacht. Im Gegensatz zur Kontrolle (Spur 2) enthielt die Glykolipidfraktion der transformierten Zellen (Spur 3) eine Vielzahl von neuen Glykolipiden. Die Spuren 4-12 zeigen die unterschiedlichen, über präparative DC isolierten Glykolipide.

Spur 1: Standards

Spur 2: Kontrolle

Spur 3: Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* in *P. pastoris*

Spur 4: β GlcD

Spur 5: β GalD

Spur 6: GlcCer (Spezies 1)

Spur 7: GlcCer (Spezies 2)

Spur 8: β Glc(1 \rightarrow 3) β GlcD

Spur 9: GalCer

Spur 10: β Glc β GlcD

Spur 11: β Glc β GalD

Spur 12: β Gal β GalD

Die Strukturen der isolierten Glykolipide demonstrieren, dass das exprimierte Enzym eine außergewöhnlich breite Substrat-Spezifität sowohl im Hinblick auf den Zucker-Donator als auch bezüglich des lipophilen Akzeptors aufweist. Die Gcs aus *A. tumefaciens* ist in der Lage, in *Pichia* sowohl Glukose- als auch Galaktose-Donatoren zu nutzen und somit in promiskuitiver Weise β -verknüpfte Glykoside zu bilden. Bei den Donatoren handelt es sich wahrscheinlich um UDP-Glc und UDP-Gal. Die Zuckerreste werden auf eine Vielzahl von lipophilen Akzeptoren wie zum Beispiel DAG, Ceramid, β GlcD und β GalD übertragen, wobei nur DAG und Ceramid in untransformierten Zellen vorkommen. Die Akzeptanz von DAG und Glykosyldiacylglycerolen kennzeichnet die Gcs aus *A. tumefaciens* als prozessive Glykosyltransferase. Die Synthese der (1 \rightarrow 6)-verknüpften Diglykosyldiacylglycerole durch eine native Enzymaktivität in *Pichia* kann ausgeschlossen werden. Dies zeigt die Expression der humanen Gcs in *Pichia*, die ebenfalls zur Synthese von β GlcD führte, ohne dass weitere Glykosylierungsprodukte detektiert werden konnten (Leipelt et al., 2001). Falls die Synthese des ungewöhnlichen (1 \rightarrow 3)-verknüpften Diglukosyldiacylglycerols tatsächlich auf die Aktivität der Gcs aus *A. tumefaciens* zurückzuführen wäre, würde dies die breite Spezifität dieses Enzyms unterstreichen. Zurzeit gibt es jedoch noch keinen eindeutigen Beweis dafür, dass das β Glc(1 \rightarrow 3) β GlcD ein Produkt der Gcs aus *A. tumefaciens* ist.

Synthese von höher glykosylierten Glykosylglycerolipiden durch Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* und *M. loti* in *E. coli*

Um die Daten der Gcs-Expression in *Pichia* in einem alternativen Expressionssystem zu bestätigen, wurde die Gcs aus *A. tumefaciens* zusätzlich in *E. coli* XL1-Blue und C41(DE3) exprimiert. Wie die meisten Bakterien, enthält *E. coli* keine Ceramide. Dieses bakterielle System dürfte außerdem eher den Expressionsbedingungen des natürlichen Wirts *A. tumefaciens* entsprechen und somit *E. coli* als einen geeigneten Wirt für die Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* ausweisen. *E. coli* XL1-Blue diente auch zur funktionalen Expression der Gcs aus *M. loti*.

Von den transformierten Zellen wurden Lipidextrakte hergestellt, über Säulen fraktioniert und die Glykolipidfraktionen über DC aufgetrennt (2.18.2). Die Expression der beiden Gcs-Sequenzen führte auch in den transformierten *E. coli*-Zellen zur Akkumulation verschiedener neuer Glykolipide. Die Glykolipidmuster zeigten aber Unterschiede im Vergleich der beiden Transformanten zueinander und zu dem Glykolipidmuster der *Pichia*-Transformanten (Abb. 13). Wie zu erwarten, waren keine Glykosylceramide in den bakteriellen Glykolipidfraktionen vorhanden. Darüber hinaus konnten auch keine Monoglykosyldiacylglycerole detektiert werden. Die Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* in *E. coli* C41(DE3) führte zu Synthese einer einzigen Glykolipidkomponente in einer sehr geringen Menge. Diese Komponente chromatographierte mit einem R_f -Wert ähnlich dem des pflanzlichen α Gal β GalD-Standards. Aufgrund der geringen Menge ist aber die entsprechende Bande in der Abbildung (Abb. 14) kaum zu sehen. Der Grund für das Fehlen von Galaktolipiden liegt wahrscheinlich darin, dass dieser *E. coli*-Stamm, wie schon früher beobachtet (Jorasch, 1999), nicht in der Lage ist, genügend UDP-Gal bereitzustellen. Die Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* führte dagegen in *E. coli* XL1-Blue zur Synthese von zwei Glykolipiden (Abb. 14). Die stärkere der beiden Banden chromatographierte ähnlich wie der pflanzliche α Gal β GalD-Standard, die schwächere Bande chromatographierte zwischen den beiden Referenzlipiden α Gal β GalD und β Glc β GlcD. Bei beiden Komponenten dürfte es sich um β Gal β GalD und β Glc β GalD handeln, die bereits bei der Expression in *Pichia* identifiziert wurden. Die Expression der Gcs aus *M. loti* in *E. coli* führte zu einem komplexeren Muster von neuen Glykolipiden (Abb. 14). Ähnlich wie die Gcs von *A. tumefaciens* katalysiert auch dieses Enzym die Synthese von β Gal β GalD und β Glc β GalD. Darüber hinaus kam es aber auch zur Bildung von weiteren Glykolipiden, die in zwei getrennten Banden mit R_f -Werten von Triglykosyldiacylglycerolen chromatographierten. Das Glykolipidmuster dieser transformierten *E. coli*-Zellen war das gleiche, das auch transformierte Zellen von *A. tumefaciens* als drittem Expressionswirt für diese beiden Enzyme zeigten (siehe folgender Abschnitt). Zur Strukturanalyse wurden deshalb nur die neuen Glykolipide aus transformierten *A. tumefaciens*-Zellen herangezogen.

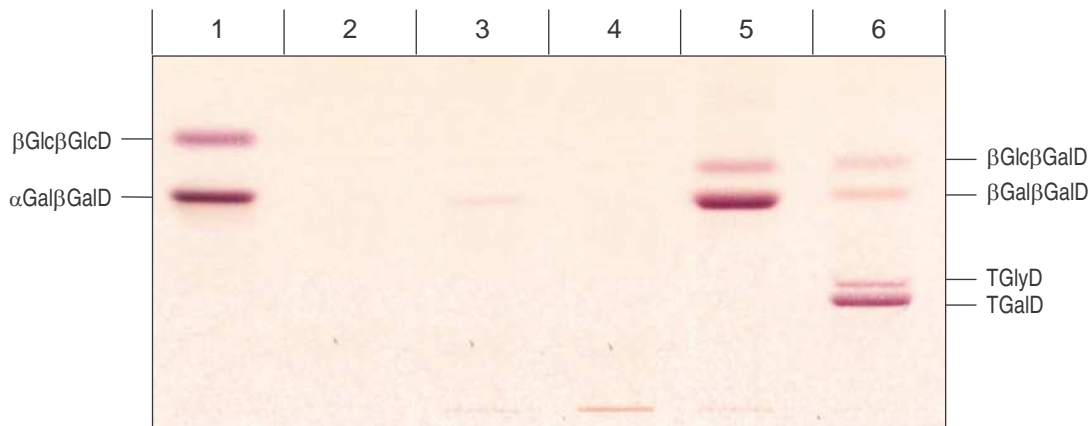


Abb. 14 Synthese von Glykosyldiacylglycerolen in verschiedenen Stämmen von *E. coli*, die die Gcs-Sequenz von *A. tumefaciens* oder *M. loti* exprimieren. Die Gcs-Sequenz von *A. tumefaciens* wurde in C41(DE3) und XL1-Blue, die Gcs-Sequenz von *M. loti* nur in XL1-Blue exprimiert. Die Glykolipidfraktionen dieser Stämme wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:10 getrennt und die Glykolipide durch Besprühen mit α -Naphthol-Schwefelsäure sichtbar gemacht. Die Expression in dem Stamm C41(DE3) (Spur 3) führte zur Synthese einer nur sehr geringen Menge an Glykolipiden. Bei der entdeckten Komponente dürfte es sich um β Gal β GalD handeln, das aber in der gezeigten Abbildung kaum sichtbar ist. Die Expression in XL1-Blue war mit der Bildung einer Reihe von neuen Glykolipiden erfolgreicher. Die Expression der Gcs-Sequenz aus *A. tumefaciens* (Spur 5) führte zur Synthese von β Gal β GalD und β Glc β GalD, die Expression der Gcs aus *M. loti* (Spur 6) ergab verschiedene Glykolipide, die vorläufig als β Gal β GalD, β Glc β GalD, Triglykosyldiacylglycerol (TGlyD) und Trigalaktosyldiacylglycerol (TGalD) identifiziert wurden. Die Glykolipidfraktionen der Kontrollen zeigten keine Glykolipide (Spur 2, Spur 4).

Spur 1: Standards

Spur 2: *E. coli* C41(DE3) als Kontrolle

Spur 3: Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* in *E. coli* C41(DE3)

Spur 4: *E. coli* XL1-Blue als Kontrolle

Spur 5: Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* in *E. coli* XL1-Blue

Spur 6: Expression der Gcs aus *M. loti* in *E. coli* XL1-Blue

Überexpression der beiden bakteriellen Gcs-Sequenzen in *A. tumefaciens* führt zur prozessiven Synthese von Di- und Triglykosyldiacylglycerolen.

Die beiden bakteriellen Gcs-Sequenzen zeigten bei ihrer heterologen Expression in pro- und eukaryoten Wirten eine bemerkenswert breite Spezifität. Die nativen Funktionen dieser zwei Gcs-Enzyme in ihren natürlichen Wirten sind trotz dieser Ergebnisse weiterhin unklar. Deshalb war die Überexpression dieser Gcs-Sequenzen in *A. tumefaciens* vorgesehen. Zu diesem Zweck wurde ein Expressionsvektor für *A. tumefaciens* konstruiert, der aus einem *E. coli*-Expressionsvektor (pTrc) bestand und die Replikationsursprungs-Sequenz pVS1 aus pCambia2200 zur stabilen Etablierung dieses Vektors in *Agrobacterium* enthielt. Die Genexpression wird dabei durch einen starken induzierbaren Promotor kontrolliert. *A. tumefaciens*-Zellen wurden mit Vektoren, die entweder die Gcs-Sequenz aus *A. tumefaciens* oder die Gcs-Sequenz aus *M. loti* enthalten, transformiert. Die Glykolipidfraktionen der beiden Transformanten zeigten dabei das gleiche Muster (Abb. 15), das schon zuvor bei der Expression der beiden Gcs-Sequenzen in *E. coli* beobachtet wurde (Abb. 14). Die Glykolipidkomponenten wurden isoliert, acetyliert und von Prof. Dr. U. Zähringer analysiert (Daten

nicht gezeigt). Die Strukturen dieser Lipide sind in Abb. 26 dargestellt. Die zwei Diglykosyldiacylglycerole aus beiden Transformanten wurden als β Gal β GalD und β Glc β GalD identifiziert; β Glc β GlcD konnte dagegen nicht entdeckt werden. Die Expression der Gcs aus *M. loti* führte zusätzlich zur Bildung von Triglykosyldiacylglycerolen, die als dominierende Komponenten auftraten. Die Hauptkomponente unter diesen Lipiden wurde als Trigalaktosyldiacylglycerol identifiziert. Die Bande mit der etwas höheren Mobilität war ein Gemisch aus reinem Triglukosyldiacylglycerol sowie Diglukosylgalaktosyldiacylglycerol und Glukosylgalaktosylglukosyldiacylglycerol.

Wie schon bei der Expression der Gcs in *E. coli* aufgefallen war, zeigten die zwei bakteriellen Gcs-Enzyme bei der Expression in Bakterien eine Präferenz für den Transfer von Galaktosylresten, da galaktosehaltige Glykolipide (β Gal β GalD und Trigalaktosyldiacylglycerol) vorherrschend waren. Lipide, die nur Glukosereste in ihrer Kopfgruppe enthielten (β Glc β GlcD), wurden dagegen nicht detektiert. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen zur Gcs-Expression in *Pichia* (Abb. 13) mit Glukolipiden als vorherrschende Komponenten. Deshalb kann man vermuten, dass die natürliche Aktivität dieser Gcs in *Agrobacterium* die prozessive Bildung von β Gal β GalD und β Glc β GalD sein dürfte.

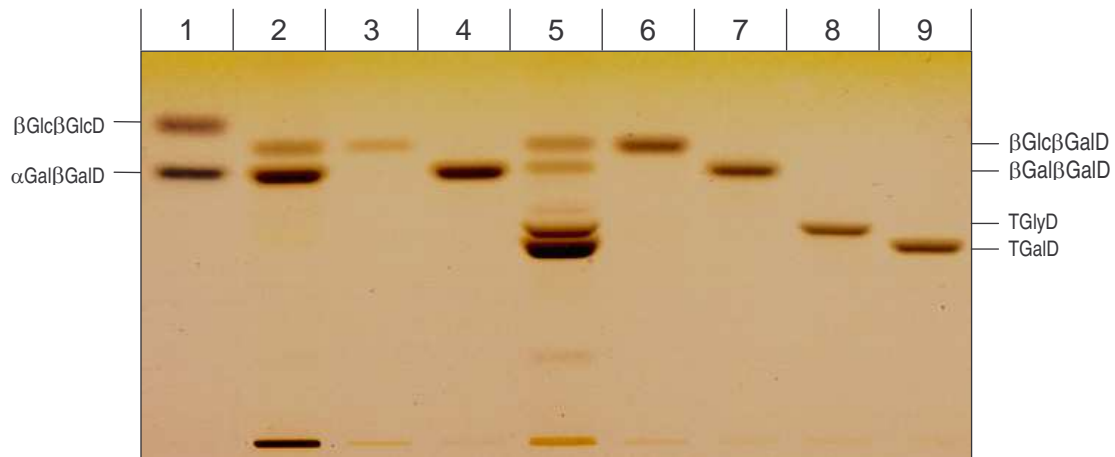


Abb. 15 Synthese von Glykosyldiacylglycerolen durch Überexpression der Gcs-Sequenz aus *A. tumefaciens* oder *M. loti* in *Agrobacterium*. Die Glykolipidfraktionen von transformierten *A. tumefaciens*-Zellen wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:10 getrennt. Die Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* (Spur 2) führte zur Synthese von β Glc β GalD und β Gal β GalD, die nach ihrer Isolierung in den Spuren 3 und 4 dargestellt sind. Durch die Expression der Gcs aus *M. loti* (Spur 5) wurden zusätzliche Glykolipide synthetisiert, die in zwei getrennten Banden chromatographierten. Die obere Bande enthielt verschiedene Triglykosyldiacylglycerole (TGlyD), die untere Bande bestand aus Trigalaktosyldiacylglycerol (TGalD). Die isolierten Komponenten sind in den Spuren 6-9 zu sehen. Der Wildtyp enthielt keine entsprechenden Glykolipide in detektierbaren Mengen (hier nicht gezeigt).

Spur 1: Standards

Spur 2: Expression der Gcs aus *A. tumefaciens* in *Agrobacterium*

Spur 3: gereinigtes β Glc β GalD aus der Glykolipidfraktion in Spur 2

Spur 4: gereinigtes β Gal β GalD aus der Glykolipidfraktion in Spur 2

Spur 5: Expression der Gcs aus *M. loti* in *Agrobacterium*

Spur 6: gereinigtes β Glc β GalD aus der Glykolipidfraktion in Spur 5

Spur 7: gereinigtes β Gal β GalD aus der Glykolipidfraktion in Spur 5

Spur 8: gereinigtes Triglykosyldiacylglycerol aus der Glykolipidfraktion in Spur 5

Spur 9: gereinigtes Trigalaktosyldiacylglycerol aus der Glykolipidfraktion in Spur 5

Zusammenfassend sind nochmals die Produkte aus der Expression der beiden bakteriellen Gcs-Sequenzen in verschiedenen Wirten dargestellt (Abb. 16). Ausgehend von DAG oder Ceramid wurden prozessiv bis zu drei Zuckerreste transferiert, wobei sowohl Galaktose als auch Glukose in der Kopfgruppe zu finden war. Das Diglykosyldiacylglycerol β Gal β GlcD und einige der möglichen Triglykosyldiacylglycerol-Spezies wurden nicht detektiert. Die Abbildung Abb. 16 verdeutlicht die Prozessivität und die breite Substrat-Spezifität im Hinblick auf Zucker-Donator und -Akzeptor.

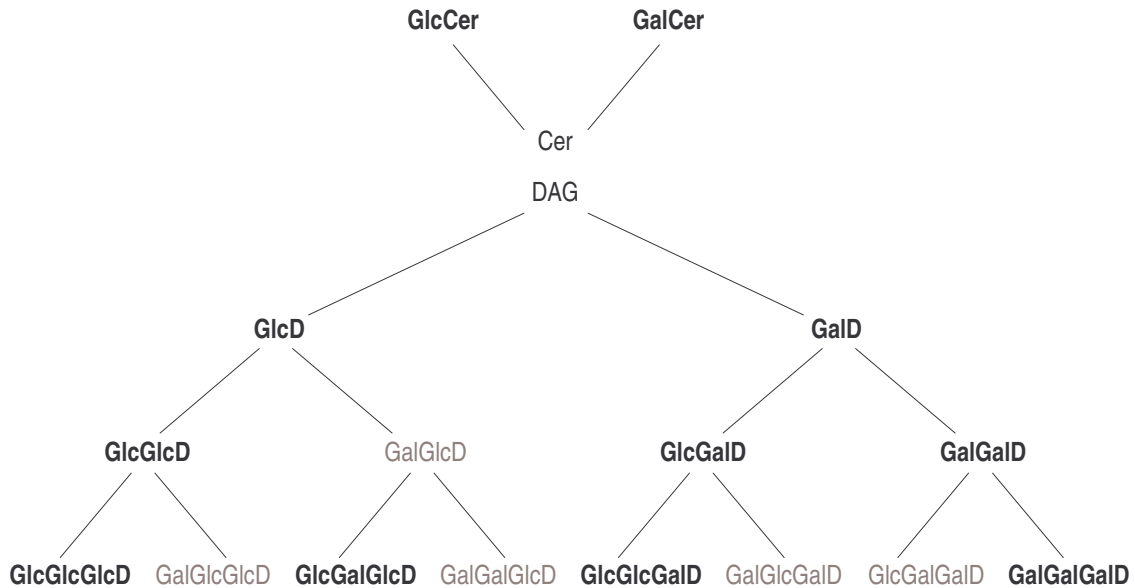


Abb. 16 Produkte der *Gcs*-Expression in verschiedenen Wirten. DAG und Ceramid (Cer) waren die primären Zucker-Akzeptoren. Die fett markierten Glykolipide konnten identifiziert werden, die grau markierten Glykolipide wurden nicht detektiert. Alle Zuckerreste haben β -anomere Konfiguration und liegen in Di- und Triglykosylresten in (1 \rightarrow 6)-Verknüpfung vor.

Enzymtests zeigen die Präferenz der *Gcs* für UDP-Gal gegenüber UDP-Glc

Um die tatsächlichen Zucker-Donatoren zu identifizieren und die Promiskuität der *Gcs*-Enzyme im Hinblick auf diese Donatoren zu bestätigen, wurden *in vitro*-Enzymtests mit der *Gcs* aus *A. tumefaciens* durchgeführt. Als Enzymquelle wurden Membranfraktionen von transformierten *Pichia*- und *E. coli*-Zellen benutzt. Als das bessere Expressionssystem im Vergleich zu XL1-Blue diente der *E. coli*-Stamm C41(DE3). Die limitierende Menge von UDP-Gal in diesem Stamm ist für diese Versuche ohne Bedeutung, da die Zucker-Nukleotide zum Reaktionsansatz hinzu gegeben wurden.

Die Aktivität der in *P. pastoris* exprimierten *Gcs* wurde durch Enzymtests mit radioaktiven UDP-Zuckern charakterisiert (2.21). Dazu wurden die sedimentierten und gewaschenen Membranfraktionen mit UDP-[14 C]Glukose oder UDP-[14 C]Galaktose ohne Zusatz eines lipophilen Akzeptors inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lipide extrahiert, über DC aufgetrennt und nachfolgend ihre Radioaktivität mit einem Phosphorimager detektiert. In Kontrolltests mit Membranen von untransformierten *Pichia*-Zellen wurden keine radioaktiven Glykolipide entdeckt (Abb. 17). In den Enzymtests mit Membranen von transformierten Zellen, die mit radioaktiver UDP-Glc inkubiert wurden, konnten fünf radioaktiv markierte Komponenten nachgewiesen werden (Abb. 17). Im Vergleich mit Referenzlipiden wurden diese Komponenten als β GlcD, β GalD, β Glc β GalD sowie als zwei verschiedene GlcCer-Spezies identifiziert (Abb. 17). Das Vorkommen von Galaktoseresten in den Kopfgruppen kann durch das Vorhandensein einer Epimeraseaktivität in der Membranfraktion erklärt

werden, die einen Teil der UDP-[¹⁴C]Glukose zu UDP-[¹⁴C]Galaktose konvertiert. βGlcβGalD kann außerdem durch die Glykosylierung von nicht radioaktivem βGalD in den Membranfraktionen entstanden sein.

In den entsprechenden Enzymtests, die mit UDP-[¹⁴C]Galaktose durchgeführt wurden, konnte die Inkorporation von deutlich mehr Radioaktivität in die Lipide beobachtet werden; das Lipidmuster war hingegen ähnlich. Die Galaktolipide waren die dominierenden Komponenten; die Glukolipide waren dagegen nur schwach markiert. Die Hauptkomponenten wurden als βGalD, GalCer, βGlcβGalD und βGalβGalD identifiziert. Eine zweite GalCer-Spezies mit sehr schwacher Radioaktivität konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Im Vergleich zu den Lipidextrakten der entsprechenden *Pichia*-Zellen zeigte sich hier eine deutliche Präferenz der Gcs für die Synthese von Galaktolipiden.

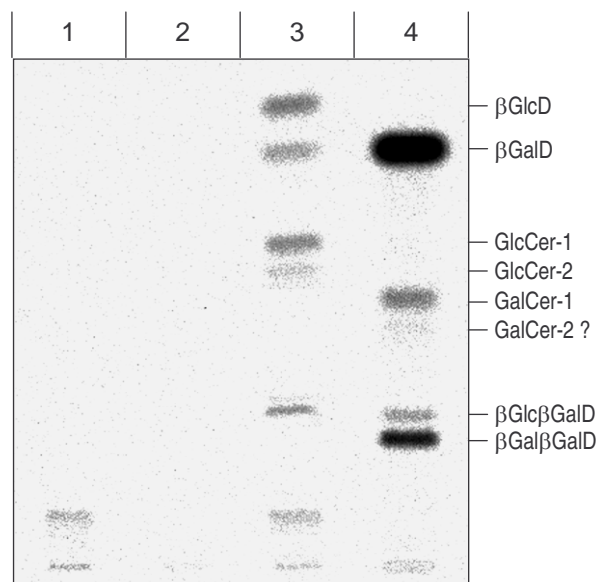


Abb. 17 *In vitro*-Synthese von Glykosyldiacylglycerolen und Glykosylceramiden durch Membranen von *P. pastoris* JC308 $\Delta gcs/\Delta ugt51B1$, die die Gcs-Sequenz von *A. tumefaciens* exprimieren. Die Membranfraktionen wurden mit UDP-[¹⁴C]Glukose oder UDP-[¹⁴C]Galaktose inkubiert. Die Auftrennung der radioaktiv markierten Glykolipide erfolgte über DC. Die Inkubation mit UDP-[¹⁴C]Glukose führte zur Bildung βGlcD, βGalD, GlcCer-1, GlcCer-2 und βGlcβGalD (Spur 3). Die Inkubation mit radioaktiver UDP-Gal führte zur Bildung von βGalD, βGlcβGalD, βGalβGalD, GalCer (GalCer-1) und möglicherweise einer weiteren Spezies von GalCer (GalCer-2) (Spur 4). Die Kontrollen zeigten keine entsprechenden Glykolipide. Die Auftrennung der lipophilen Komponenten erfolgte in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/Methanol/H₂O 35:35:0,35:40:5:4. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers detektiert. βGlcD, βGalD, GlcCer, GalCer, βGlcβGalD und das pflanzliche αGalβGalD wurden als nichtradioaktive Standards benutzt und durch Besprühen mit α-Naphthol-Schwefelsäure im Anschluss an die Detektion der Radioaktivität durch Erhitzen sichtbar gemacht.

Spur 1: Kontrolle mit UDP-[¹⁴C]Glukose
 Spur 2: Kontrolle mit UDP-[¹⁴C]Galaktose
 Spur 3: Gcs mit UDP-[¹⁴C]Glukose
 Spur 4: Gcs mit UDP-[¹⁴C]Galaktose

Um diese Schlussfolgerungen zu bestätigen, wurden die Ergebnisse eines zweiten Expressionssystems herangezogen, indem zusätzliche Enzymtests mit der in *E. coli* C41(DE3) exprimierten Gcs von *A. tumefaciens* durchgeführt wurden. Dazu wurden Membranfraktionen von transformierten Zellen präpariert und für zwei Serien von Experimenten eingesetzt.

Die erste Serie bestand aus Enzymtests mit radioaktiv markierten UDP-Zuckern. Die markierten Produkte (Abb. 18) waren ähnlich zu denen, die in Enzymtests mit Membranfraktionen von *Pichia* entdeckt wurden (Abb. 17). Durch Inkubation mit radioaktiver UDP-Glc entstand β GlcD (Abb. 18). Die Inkubation mit radioaktiver UDP-Gal führte zur Bildung mehrerer Produkte, deren Radioaktivität auch deutlich höher war. Durch Cochromatographie wurden diese als Acylgalaktosylmonoacylglycerol (AGM), Monogalaktosylmonoacylglycerol (MGM) (Heinz, 1996; Heinz et al., 1974), β GalD und β Gal β GalD identifiziert, wobei die beiden letzt genannten die Hauptkomponenten darstellten. Die beiden zusätzlichen Komponenten AGM und MGM, die nicht in den Enzymtests mit *Pichia*-Membranfraktionen beobachtet wurden, dürften durch Transacylierungsreaktionen entstanden sein.

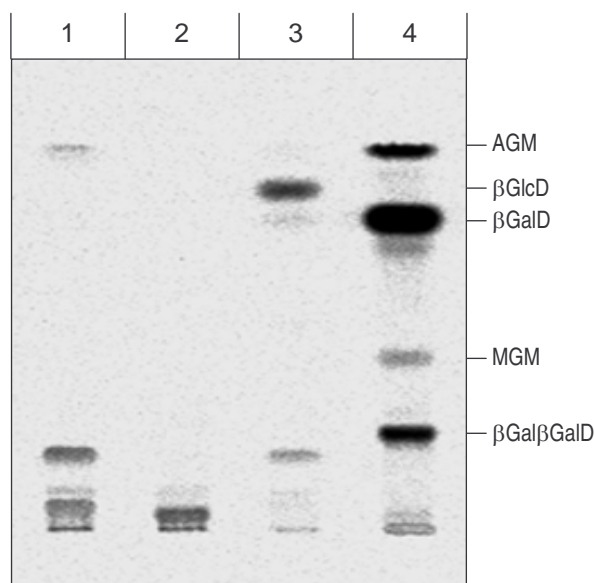


Abb. 18 *In vitro*-Synthese von Glykosyldiacylglycerolen durch Membranen von *E. coli* C41(DE3)-Zellen, die die Gcs-Sequenz von *A. tumefaciens* exprimieren. Die Membranfraktionen wurden mit radioaktiver UDP-Glc oder UDP-Gal inkubiert und die lipophilen Reaktionsprodukte über DC in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/Methanol/H₂O 35:35:0,35:40:5:4 aufgetrennt. Radioaktive UDP-Glc führte zur Synthese von β GlcD (Spur 3); radioaktive UDP-Gal führte zu Bildung von β GalD, β Gal β GalD, und zwei zusätzlichen Komponenten, die mit MGM und AGM chromatographierten (Spur 4). Abgesehen von Hintergrundmarkierung von nicht identifizierten Komponenten zeigten die Kontrollen keines der identifizierten Reaktionsprodukte. Die Identifizierung erfolgte anhand von R_f -Werten durch Vergleich mit den Standards β GlcD, β GalD, α Gal β GalD, MGM und AGM.

Spur 1: Kontrolle mit UDP-[¹⁴C]Glukose

Spur 2: Kontrolle mit UDP-[¹⁴C]Galaktose

Spur 3: Gcs mit UDP-[¹⁴C]Glukose

Spur 4: Gcs mit UDP-[¹⁴C]Galaktose

Wie durch die Expression in *Pichia* gezeigt, dienen auch Ceramide als lipophiler Akzeptor für die Gcs aus *A. tumefaciens*. Da aber *E. coli* keine Ceramide enthält, wurden in einer zweiten Serie von Enzymtests Ceramide eingesetzt, um deren Funktion als lipophilen Akzeptor für das Gcs-Enzym aus *A. tumefaciens* zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurde ein fluoreszierendes Ceramid (NBD-Cer) mit Membranfraktionen von *E. coli* C41(DE3) und mit UDP-Glc oder UDP-Gal inkubiert (2.21). Nach der Inkubation wurden die lipophilen Komponenten über DC getrennt und die Fluoreszenzen detektiert. Abgesehen vom Substrat wurden zwei fluoreszierende Komponenten entdeckt. Das Produkt im Reaktionsansatz mit UDP-Glc cochromatographierte mit einem Glukosyl-NBD-Cer Standard (Jorasch, 1999) (Abb. 19). Analog dazu wurde das Produkt im Reaktionsansatz mit UDP-Gal als Galaktosyl-NBD-Cer identifiziert. Für diese Komponente existierte zwar kein entsprechendes Referenzlipid, aber die Zuweisung war in guter Übereinstimmung mit der niedrigeren Mobilität von Galakto- verglichen mit Glukocerebrosiden bei identischem Ceramid-Rückgrat. Die Synthese dieser beiden Glykosylceramide bestätigt somit die Glykosylceramidsynthese-Aktivität dieses Enzyms, die schon vorher aufgrund der Akkumulation von Gluko- und Galaktocerebrosiden in *Pichia*-Zellen abgeleitet wurde, die dieses Enzym exprimierten.

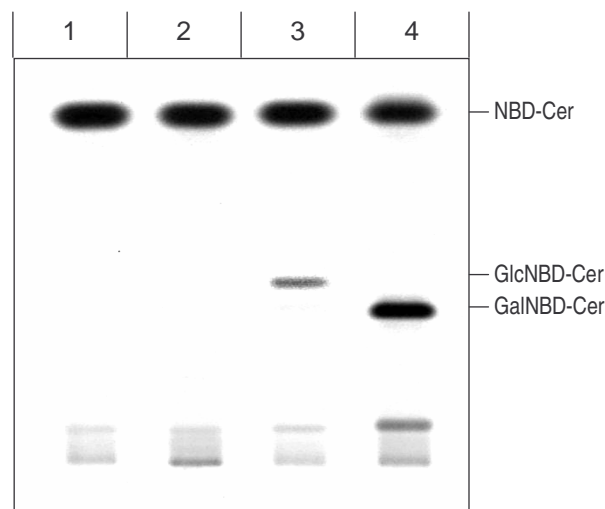


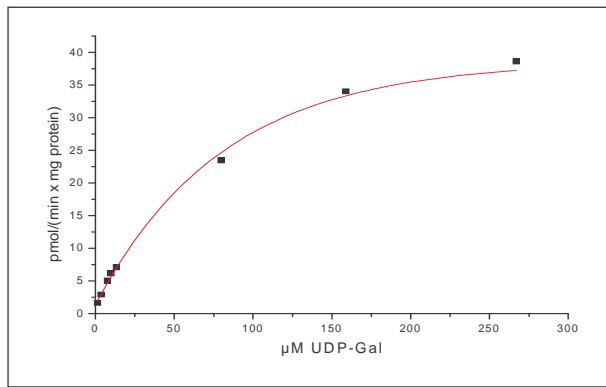
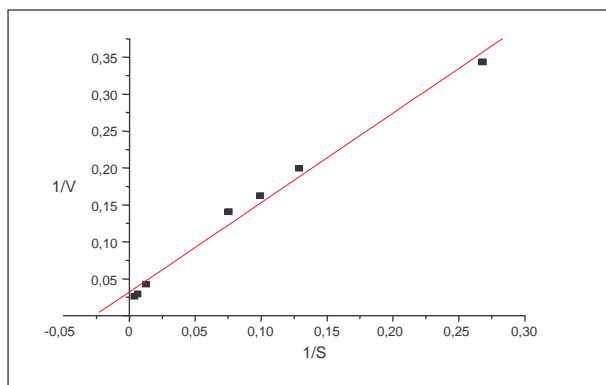
Abb. 19 *In vitro*-Synthese von Glykosylceramiden durch Membranen von *E. coli* C41(DE3)-Zellen, die die Gcs-Sequenz von *A. tumefaciens* exprimieren. Die Membranfraktionen wurden mit fluoreszierendem Ceramid (NBD-Cer) und unmarkierter UDP-Glc oder UDP-Gal inkubiert und die lipophilen Reaktionsprodukte über DC in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/Methanol/H₂O 35:35:0,35:40:5:4 aufgetrennt. UDP-Glc führte zur Synthese von Glukosyl-NBD-Cer (GlcNBD-Cer) (Spur 3), UDP-Gal führte zu Bildung von Galaktosyl-NBD-Cer (GalNBD-Cer) (Spur 4). Die Kontrollen zeigten keine entsprechenden Glykosylceramide. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch GlcNBD-Cer als Standard.

Spur 1: Kontrolle mit UDP-Glc
 Spur 2: Kontrolle mit UDP-Gal
 Spur 3: Gcs mit UDP-Glc
 Spur 4: Gcs mit UDP-Gal

Kinetische Daten untermauern die Präferenz für UDP-Gal

In den meisten Experimenten war zu beobachten, dass beide Gcs-Enzyme eine Präferenz für UDP-Gal gegenüber UDP-Glc aufwiesen (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19). Um ein genaueres Bild dieser Spezifität zu erhalten, wurden kinetische Messungen zur Bestimmung der Affinität des Enzyms für die zwei Zucker-Nukleotide durchgeführt. Normalerweise wird die Ermittlung von K_M -Werten von Glykosyltransferasen für UDP-Glc und UDP-Gal mit einem Überschuss an Akzeptor-Substrat durchgeführt. Da aber Membranfraktionen als Enzymquelle benutzt wurden und die Zugabe von DAG oder Ceramid nicht ohne den Einsatz von Detergenzien möglich ist, wurde für diese Zwecke eine vereinfachte Methode angewandt. Dazu wurde nur die Konzentration der Zucker-Nukleotide in Gegenwart von konstant gehaltenen Mengen von Membranprotein variiert. Damit blieb auch der lipophile Akzeptor konstant, wenngleich er nicht im Überschuss vorhanden war. Die daraus resultierenden K_M - und V_{max} -Werte sind somit nur für Vergleichszwecke geeignet.

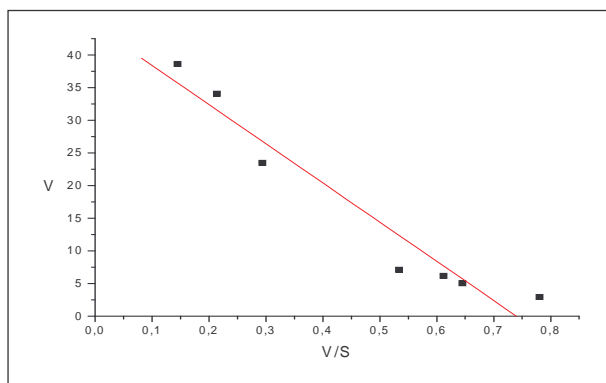
Zur Durchführung der Enzymtests wurden Membranfraktionen aus Zellen von *E. coli* C41(DE3), die die Gcs aus *A. tumefaciens* exprimierten, mit unterschiedlichen Konzentrationen von UDP-Glc oder UDP-Gal inkubiert (2.21). Nach der Inkubation wurde die Radioaktivität aller lipophilen Reaktionsprodukte mit einem Szintillationszähler gemessen. In den Ansätzen mit radioaktiver UDP-Gal wurde genügend Radioaktivität in die Lipide eingebaut, wohingegen in den Reaktionsansätzen mit radioaktiver UDP-Glc unter den gleichen Bedingungen die Messwerte für eine verlässliche Auswertung zu niedrig waren. Mit UDP-Gal wurde eine typische Michaelis-Menten-Kinetik beobachtet (Abb. 20), die Substratkonzentrationen von 38-44 μM UDP-Gal bei halbmaximaler Geschwindigkeit ($V_{max}/2$) ergaben. Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass die in *E. coli* exprimierten Gcs-Enzyme eine deutlich höhere Affinität für UDP-Gal als für UDP-Glc haben. Dies deckt sich mit der Beobachtung einer höheren Akkumulation von Galaktolipiden im Vergleich zu Glukolipiden in Zellen, die dieses Enzym exprimieren.

**Michaelis-Menten****Lineweaver-Burk**

$$y = 1,211x + 32,084$$

$$K_M = 38 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 32 \text{ pmol} / (\text{min} \cdot \text{mg Protein})$$

**Eadie-Hofstee**

$$y = -0,060 + 44,380$$

$$K_M = 44 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 60 \text{ pmol} / (\text{min} \cdot \text{mg Protein})$$

Abb. 20 Affinität der Gcs aus *A. tumefaciens* für UDP-Gal, dargestellt nach Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee. Membranfraktionen von *E. coli* C41(DE3) mit der Gcs aus *A. tumefaciens* wurden mit verschiedenen Konzentrationen radioaktiver UDP-Gal bei konstanter Proteinmenge und ohne Zugabe eines externen lipophilen Akzeptors inkubiert. Der Einbau der Radioaktivität in Glykolipide wurde mit einem Szintillationszähler gemessen. Die Abbildung zeigt die gemessene Radioaktivität umgerechnet in pmol/(min•mg Protein) bei verschiedenen Konzentrationen von UDP-Gal. Nach Eadie-Hofstee und Lineweaver-Burk ergibt sich für die maximale Geschwindigkeit (V_{\max}) ein Wert zwischen 30 und 60 pmol/(min•mg Protein) und für die Substratkonzentration bei halber V_{\max} ein Wert von 38-44 μM .

Die Gcs-Enzyme aus *A. tumefaciens* und *M. loti* sind prozessive Galaktosyl-/Glukosyl-Transferasen, die sowohl Glykosylglycerolipide als auch Glykosylceramide synthetisieren

Mit der Charakterisierung der Gcs-Enzyme aus *A. tumefaciens* und *M. loti* konnten zum ersten Mal bakterielle Vertreter der GT21 charakterisiert werden. Trotz einer deutlichen Sequenz-Homologie zu anderen Mitgliedern dieser Gruppe unterscheiden sich die beiden Enzyme jedoch in drei wesentlichen Merkmalen von den bekannten eukaryotischen Gcs-Enzymen. Diese Merkmale sind die Zucker-Akzeptor-Spezifität, die Zucker-Donator-Spezifität und die Prozessivität.

Die Gcs-Enzyme von Tieren, Pilzen und Pflanzen übertragen einen Zuckerrest auf Ceramid (Ichikawa et al., 1998; Ichikawa et al., 1996; Kohyama-Koganeya et al., 2004; Leipelt et al., 2001; Wu et al., 1999), die beiden bakteriellen Gcs-Enzyme nutzen jedoch DAG als Akzeptor-Molekül. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass sich DAG und Ceramid strukturell sehr ähnlich sind und dass *A. tumefaciens* und *M. loti* offensichtlich keine Ceramide bilden (siehe unten). Eine starke Expression der humanen Gcs und der beiden bakteriellen Gcs in der Hefe *P. pastoris*, die sowohl DAG als auch Ceramid enthält, offenbarte eine breite Spezifität im Hinblick auf den Glykosyl-Akzeptor. Während die humane Gcs hauptsächlich Ceramide und in geringem Ausmaß auch DAG glykosylierte (Leipelt et al., 2001), synthetisierte die Gcs aus *A. tumefaciens* überwiegend Glykosyldiacylglycerole und in kleinerer Menge Glykosylceramide (diese Arbeit). Die aus Baumwolle klonierte Gcs ist gekennzeichnet durch die Synthese von Glykosylceramiden und Sterolglykosiden (Hillig et al., 2003). Breite Akzeptor-Spezifität im Hinblick auf DAG und Ceramid ist ein Merkmal vieler anderer Glykosyltransferasen (Jorasch et al., 1998; Jorasch et al., 2000).

Das zweite Merkmal, das diese beiden Gcs von den übrigen Mitgliedern in GT21 unterscheidet, ist ihre Donator-Spezifität. Während alle eukaryoten Gcs-Enzyme UDP-Glc nutzen, bevorzugen die beiden bakteriellen Gcs-Enzyme UDP-Gal. Mit *in vitro*-Enzymtests wurde gezeigt, dass die K_M der Gcs aus Säugetieren für UDP-Glc 200 mal niedriger ist als für UDP-Gal (Sprong et al., 1998; Wu et al., 1999). Weil die eukaryote Gcs-Aktivität *in vivo* immer zur Synthese von GlcCer aber niemals zu GalCer führt, wurden diese Enzyme als GlcCer-Synthasen bezeichnet (Ichikawa et al., 1996; Leipelt et al., 2001; Sprong et al., 1998; Wu et al., 1999). Obwohl es in dieser Arbeit nicht möglich war, für die bakteriellen Gcs-Enzyme eine K_M für UDP-Glc zu bestimmen, konnte doch mit *in vitro*-Enzymtests gezeigt werden, dass die beiden Enzyme sowohl Galaktose als auch Glukose übertragen, wobei die Präferenz auf Seiten der Galaktose liegt.

Eine breite Substrat-Spezifität eines Enzyms bezüglich Donator und Akzeptor ist ein interessantes Phänomen im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus und die Struktur des Reaktionszentrums, was aber nicht Thema dieser Arbeit war. Dieses Merkmal kann aber Konsequenzen für die biologische Funktion des Enzyms haben. Für die meisten prokaryoten Organismen dürfte die „Verwechslung“ des

Zucker-Akzeptors durch die Gcs nicht von Bedeutung sein, da sie nur DAG enthalten. Im Gegensatz dazu enthalten eukaryote Organismen aber DAG und Ceramid, die beide in unterschiedlicher Weise in den Stoffwechsel eingebunden sind. Daher würde man von solchen Organismen erwarten, dass die entsprechenden Gcs-Enzyme streng spezifisch gegenüber dem Akzeptor sind bzw. eine räumliche Trennung von Enzym und „falschem“ Substrat gewährleistet ist. Diese Annahme ist allgemein übertragbar auf andere Enzyme, die DAG oder Ceramid als Substrat verwenden. Da aber viele dieser eukaryoten Enzyme offensichtlich nicht strikt spezifisch sind (Leipelt et al., 2001; Tadano-Aritomi et al., 2003), ist es wahrscheinlicher, dass in den meisten dieser Fälle die Enzyme nur in bestimmten intrazellulären Membransystemen anzutreffen sind und damit ihr Zugriff auf das „richtige“ Substrat beschränkt ist.

Im Gegensatz zu dieser breiten Akzeptor-Spezifität zeigen die meisten Glykosyltransferasen eine strikte Spezifität gegenüber dem Zucker-Donator. Zum Beispiel benutzen Eukaryoten zwei verschiedene Enzyme zur Synthese von Glukosyl- und Galaktosylceramid (Ichikawa et al., 1996; Schulte et al., 1993). Daher ist die Übertragung von alternativen Zuckerresten auf das Akzeptor-Molekül, insbesondere der Transfer von Glukosyl- oder Galaktosylresten wie in dieser Arbeit anhand der bakteriellen Gcs-Enzyme demonstriert, eine der wenigen Ausnahmen von dieser Regel. Ein anderes Beispiel für diese Ausnahme ist die Glykosyltransferase LpsB von *Sinorhizobium meliloti*, deren natürliche Aktivität der Transfer von Glukose sein dürfte. Diese Glykosyltransferase ist in der Lage, eine Mutante von *Rhizobium leguminosarum* zu komplementieren, deren orthologe und hoch selektive Mannosyltransferase LpcC defekt ist (Kanipes et al., 2003). Eine weitere Ausnahme ist die α 1,4-N-Acetylhexosaminyltransferase aus tierischem Gewebe, die den Transfer von N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin katalysiert (Lind et al., 1998; Pedersen et al., 2003).

Das dritte Merkmal, das die bakteriellen Gcs-Enzyme von den anderen Mitgliedern in GT21 abhebt, ist ihre Prozessivität. Während die eukaryoten Gcs-Enzyme ausschließlich monoglykosylierte Lipide synthetisieren, übertragen die beiden bakteriellen Vertreter zusätzlich bis zu zwei Zuckerreste in Folge auf Monoglykosyldiacylglycerol, wobei die Zucker β (1 \rightarrow 6)-verknüpft sind. In Übereinstimmung mit ihrer Prozessivität enthält die Aminosäuresequenz der beiden bakteriellen Enzyme ein „D₁D₂D₃(Q/R)XXRW“-Motiv, das zuvor als charakteristisches Merkmal von prozessiven β -Glykosyltransferasen der Familie GT2, wie zum Beispiel der Zellulose-Synthase oder der Chitin-Synthase, beschrieben wurde (Campbell et al., 1998; Saxena et al., 1995). Interessanterweise zeigen auch eukaryote GT21-Mitglieder dieses Motiv in einer mehr oder weniger kompletten Form, das für die Enzymaktivität essentiell ist (Leipelt et al., 2001; Marks et al., 2001). Somit kann man annehmen, dass dieses Motiv zwar erforderlich, aber nicht ausreichend ist, um die Prozessivität der bakteriellen Glykosyltransferasen aus GT21 zu erklären.

Prozessivität ist ein häufiges Merkmal auch von anderen Lipid-Glykosyltransferasen, zum Beispiel von Enzymen aus *Bacillus subtilis* oder *S. aureus* in GT28. Diese Glykosyltransferasen (YpfP) synthetisieren β GlcD, β Glc β GlcD und Triglukosyldiacylglycerol, die als Membranlipide und Glykolipid-Anker für Lipoteichonsäuren dienen (Jorasch et al., 1998; Jorasch et al., 2000; Kiriukhin et al., 2001). Auch Pflanzen enthalten eine hypothetische Galaktosyltransferase-Aktivität, die für die Synthese von Di-, Tri- und Tetragalaktosyldiacylglycerolen mit β -verknüpften Galaktoseresten verantwortlich ist (Kelly et al., 2003; Xu et al., 2003). Darüber hinaus gibt es mehrere höher glykosylierte Derivate von Ceramiden, DAG und Sterolen in Pflanzen und Pilzen, die vermuten lassen, dass es weitere, bisher unbekannte prozessive Lipid-Glykosyltransferasen gibt (Heinz, 1996; Sperling et al., 2004). Trotz des ubiquitären Vorkommens der Produkte von prozessiven Lipid-Glykosyltransferasen sind die Funktionen dieser Produkte größtenteils unbekannt. Eine Ausnahme sind Sitosterol-Cellodextrine, die als Vorstufe für die Zellulosebiosynthese in Pflanzen angesehen werden (Peng et al., 2002).

3.1.4.3.2 Identifizierung von zwei α -Glukosyltransferasen aus *D. radiodurans* und *T. maritima*

Durch die Expression der ORFs dr1225 aus *D. radiodurans* und tm0744 aus *T. maritima* in der SG-freien Mutante von *P. pastoris* JC308 Δ ugt51 konnten neue Glykolipide isoliert werden. Zur Analyse dieser Glykolipide wurden Lipidfraktionen von den transformierten Zellen aufbereitet und die Glykolipidfraktionen über DC aufgetrennt (2.18.2). Diese Auftrennung führte in beiden Fällen zur Detektion eines Glykolipids, das mit α GlcD cochromatographierte und nicht in der Kontrolle vorkam (Abb. 21). Eine weitere Komponente ist das native GlcCer dieser *Pichia*-Mutante. Zur Strukturbestimmung wurden die neuen Glykolipide isoliert, acetyliert und mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und MS von Prof. Dr. U. Zähringer analysiert (Daten nicht gezeigt). Beide Glykolipide wurden als α GlcD identifiziert, dessen Struktur in Abb. 26 dargestellt ist.

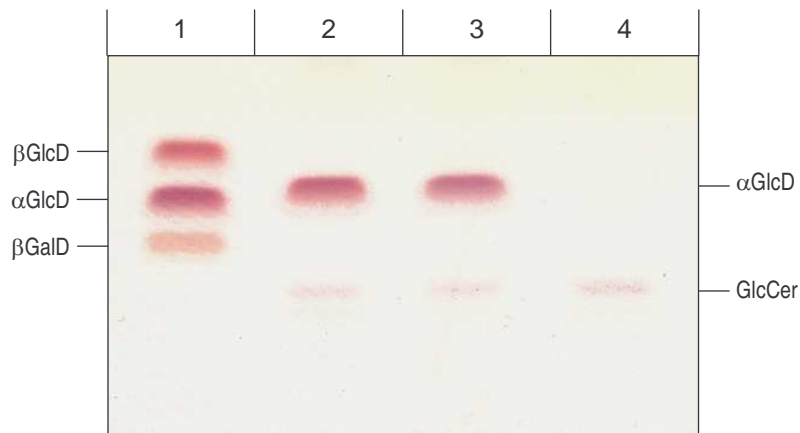


Abb. 21 Synthese von α GlcD in *P. pastoris* JC308 Δ ugt51 durch die Expression von Glykosyltransferasen aus *D. radiodurans* und *T. maritima*. Die Glykolipidfraktionen von transformierten *P. pastoris*-Zellen wurden über DC in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 25:50:0,5:40:1 aufgetrennt. GlcCer ist ein natives Glykolipid dieser *Pichia*-Mutante.

Spur 1: Standards

Spur 2: Expression der Glykosyltransferase dr1225 aus *D. radiodurans*

Spur 3: Expression der Glykosyltransferase tm0744 aus *T. maritima*

Spur 4: Kontrolle

Zusätzliche Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung dieser beiden Glykosyltransferasen wurden nicht durchgeführt. Da diese Enzyme in ihrer Aminosäuresequenz ähnlich sind zur α GlcD-Synthase aus *A. laidlawii* (Berg et al., 2001), darf man annehmen, dass es sich auch hier um nicht-prozessive α GlcD-Synthasen handelt, die in einer UDP-Glc-abhängigen Reaktion die Glukosylierung von DAG katalysieren.

D. radiodurans enthält neben mehreren ungewöhnlichen Glykolipiden und Glykophospholipiden auch α GlcD (Carbonneau et al., 1984; Huang et al., 1995; O'Leary et al., 1988). Die neu identifizierte α GlcD-Synthase dr1225 aus *D. radiodurans* wäre somit ein guter Kandidat für das Enzym zur Synthese des nativen α GlcD.

Weiterhin enthält auch das hyperthermophile Bakterium *T. maritima* Glykolipide, die in ihrer Struktur sehr ungewöhnlich sind. Bei diesen Glykolipiden handelt es sich um Diglukosyldiacylglycerole, die durch eine (1→4)-Bindung der beiden α -Glukosereste gekennzeichnet sind (Manca et al., 1992). Die entsprechenden Gene und die Enzyme zur Synthese dieser Lipide sind bisher nicht bekannt. Die in dieser Arbeit identifizierte α GlcD-Synthase tm0744 wäre auch hier ein geeigneter Kandidat für das Enzym zur Synthese der Vorstufe dieser ungewöhnlichen Diglukosyldiacylglycerole in *T. maritima*.

3.1.4.3.3 Identifizierung einer β -Galaktosyl- und einer β -Glukosyltransferase aus *C. aurantiacus*

Glykosyltransferasen aus *C. aurantiacus* synthetisieren β GalD, β GlcD, β Glc β GlcD und β Glc β GalD

Durch die Expression der putativen Glykosyltransferasen chlo2029 und chlo2030 aus *C. aurantiacus* konnten in *S. cerevisiae* zwei weitere Glykosyltransferasen identifiziert werden. Dazu wurden Glykolipidfraktionen aus transformierten Zellen von *S. cerevisiae* aufbereitet und über DC analysiert (2.18.2). Die Expression der Glykosyltransferase chlo2029 führte zur Synthese von β GalD (Abb. 22). In der Glykolipidfraktion von Zellen, die die Glykosyltransferase chlo2030 exprimierten, konnten geringe Mengen von β GlcD und β Glc β GlcD identifiziert werden (Abb. 22). Die drei neuen Glykolipide kamen in den Kontrollen nicht vor.

Da es auch Glykosyltransferasen gibt, die Monoglykosyldiacylglycerol als Akzeptor benötigen (Dörmann et al., 1995; Edman et al., 2003), wurden in weiteren Experimenten verschiedene putative Glykosyltransferasen zusammen mit der β GalD-Synthase chlo2029 aus *C. aurantiacus* in *S. cerevisiae* coexprimiert. Auf diese Weise konnte eine weitere Enzymaktivität identifiziert werden. Die mit den ORFs chlo2029 und chlo2030 transformierten Zellen akkumulierten dabei zusätzlich zu den oben beschriebenen Lipiden das neue Glykolipid β Glc β GalD (Abb. 22), das in der Kontrolle nicht vorkam.

Zur Bestimmung der Struktur dieser neuen Glykolipide wurden die entsprechenden Komponenten isoliert, acetyliert und von Prof. Dr. U. Zähringer analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Strukturen der als β GalD, β GlcD, β Glc β GlcD und β Glc β GalD identifizierten Lipide sind in Abb. 26 dargestellt.

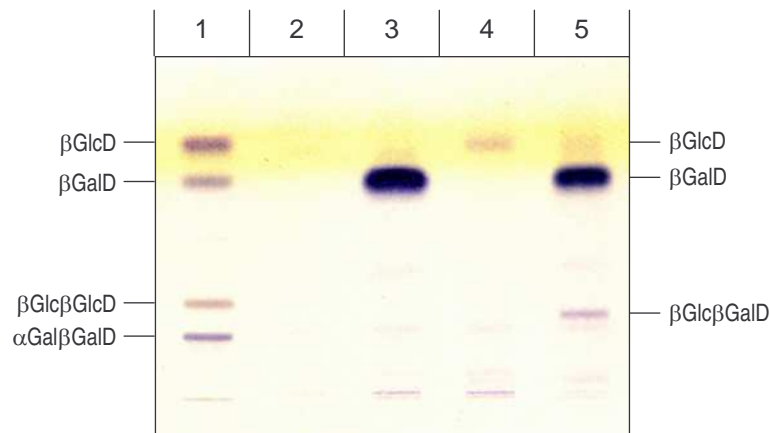


Abb. 22 Synthese neuer Glykosyldiacylglycerole in *S. cerevisiae* durch die Expression von Glykosyltransferasen aus *C. aurantiacus*. Die Glykolipidfraktionen aus transformierten *S. cerevisiae*-Zellen wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:5 aufgetrennt. Die Expression des ORF chlo2029 führte zur Synthese von βGalD (Spur 3). Die Expression des ORF chlo2030 führte zur Detektion geringer Mengen von neuen Glykolipiden, die in der Abbildung kaum zu sehen sind (Spur 4) und durch Aufreinigung größerer Mengen der entsprechenden Lipidextrakte als βGlcD und βGlcβGlcD identifiziert wurden (nicht gezeigt). Die Coexpression beider ORFs in einem Organismus resultierte in der Bildung eines zusätzlichen Glykolipids βGlcβGalD durch die Aktivität der Glykosyltransferase chlo2030 (Spur 5). Keines dieser Glykolipide kam in der Kontrolle vor.

Spur 1: Standards

Spur 2: Kontrolle

Spur 3: Expression der Glykosyltransferase chlo2029

Spur 4: Expression der Glykosyltransferase chlo2030

Spur 5: Coexpression der Glykosyltransferasen chlo2029 und chlo2030

Die Strukturen der untersuchten Lipide demonstrieren, dass es sich bei beiden Enzymen um β-Glykosyltransferasen handelt. Der ORF chlo2029 codiert somit für eine nicht-prozessive βGalD-Synthase. Der ORF chlo2030 codiert für eine β-Glukosyltransferase, die in der Lage ist DAG, βGlcD und βGalD zu glukosylieren.

Enzymtests zeigen eine breite Akzeptor-Spezifität beider Glykosyltransferasen

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Lipidanalysen und zur weiteren Charakterisierung wurden zusätzlich *in vitro*-Enzymtests durchgeführt. Als Enzymquelle dienten Membranen von Zellen von *S. cerevisiae*, die entweder beide Glykosyltransferasen getrennt oder zusammen in einem Organismus exprimierten.

Zunächst wurde in radioaktiven Enzymtests die Spezifität der beiden Enzyme gegenüber dem Zucker-Donator untersucht. Dazu wurden die Membranen mit UDP-[¹⁴C]Glukose oder UDP-[¹⁴C]Galaktose und mit DAG als endogenem Akzeptor inkubiert. Die Zugabe von radioaktiver UDP-Gal zu den Membranen mit der exprimierten Galaktosyltransferase chlo2029 führte zur Bildung von βGalD (Abb. 23). Daneben konnte noch eine schwächere radioaktive Komponente entdeckt werden, die mit MGM cochromatographierte und vermutlich ein Abbauprodukt von radioaktivem βGalD ist. Die Inkubation

mit radioaktiver UDP-Glc resultierte in der Bildung einer geringen Menge β GlcD. Ein weiteres Produkt aus dieser Probe chromatographierte mit β GalD und dürfte auf eine Rest-Epimeraseaktivität in der Membranfraktion zurückzuführen sein, die UDP-Glc zu UDP-Gal konvertiert. Diese Resultate charakterisieren dieses von ORF chlo2029 kodierte Enzym als UDP-Gal-abhängige Galaktosyltransferase.

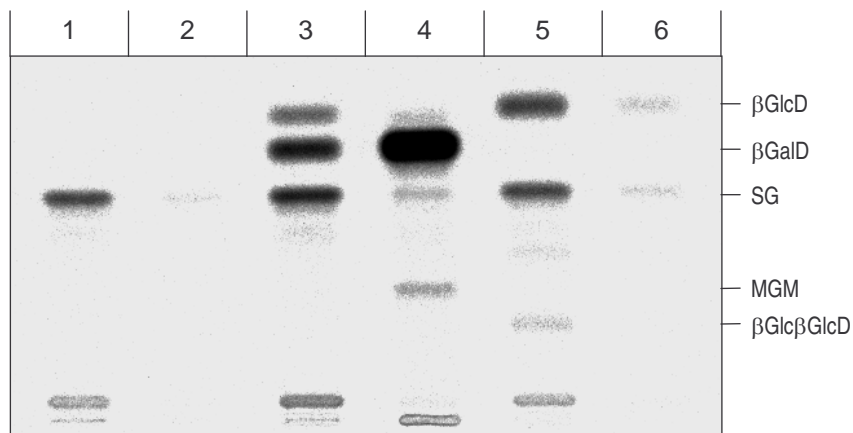


Abb. 23 *In vitro*-Enzymtests zur Untersuchung der Zucker-Nukleotid-Spezifität der beiden Glykosyltransferasen aus *C. aurantiacus*. Membranfraktionen von transformierten Zellen von *S. cerevisiae*, die den ORF chlo2029 oder chlo2030 exprimierten, wurden jeweils mit UDP- ^{14}C Glukose oder UDP- ^{14}C Galaktose inkubiert. Die lipophilen Reaktionsprodukte wurden über DC in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/Methanol/ H_2O 35:35:0,35:40:5:4 aufgetrennt; die Radioaktivität wurde mit einem Phosphorimager detektiert. Die verschiedenen Komponenten wurden anhand von nicht radioaktiven Referenzsubstanzen identifiziert. Inkubation der Glykosyltransferase chlo2029 mit radioaktiver UDP-Gal führte zur Bildung von β GalD und einer schwächeren Komponente, bei der es sich vermutlich um MGM als Abbauprodukt von radioaktivem β GalD handelt (Spur 4). Durch Inkubation der gleichen Membranfraktion mit radioaktiver UDP-Glc kam es zur Bildung von β GlcD (Spur 3). Die zusätzliche Synthese von β GalD wird auf eine Rest-Epimeraseaktivität in den Membranen zurückgeführt. Die Zugabe von radioaktiver UDP-Glc zu Membranfraktionen mit chlo2030 führte zur Detektion von β GlcD und β Glc β GlcD mit sehr schwacher Radioaktivität (Spur 5). Inkubation mit UDP-Gal führte nicht zur Bildung von Galaktolipiden (Spur 6). Die kaum detektierbaren Glukolipide in diesem Ansatz sind wieder auf eine Epimeraseaktivität zurückzuführen. Die neuen Glykolipide kamen nicht in den Kontrollen mit dem Leervektor vor. Eine weitere radioaktive Komponente, die vor allem in den Ansätzen mit radioaktiver UDP-Glc beobachtet werden konnte, cochromatographierte mit SG und ist auf eine Enzymaktivität in *S. cerevisiae* zurückzuführen.

- Spur 1: Kontrolle mit UDP- ^{14}C Glukose
- Spur 2: Kontrolle mit UDP- ^{14}C Galaktose
- Spur 3: Glykosyltransferase chlo2029 mit UDP- ^{14}C Glukose
- Spur 4: Glykosyltransferase chlo2029 mit UDP- ^{14}C Galaktose
- Spur 5: Glykosyltransferase chlo2030 mit UDP- ^{14}C Glukose
- Spur 6: Glykosyltransferase chlo2030 mit UDP- ^{14}C Galaktose

Die durch den ORF chlo2030 kodierte Glykosyltransferase führt durch Zugabe von UDP-Glc zur Synthese von geringen Mengen β GlcD und β Glc β GlcD. UDP-Gal wird von dieser Glykosyltransferase nicht als Substrat akzeptiert. Die Ergebnisse zeigen, dass dieses Enzym in der Lage ist, in geringem Umfang DAG und Monoglykosylglycerolipide in einer UDP-Glc-abhängigen

Reaktion zu glukosylieren. Sie decken sich mit den Lipidanalysen und kennzeichnen dieses Enzym als β -Glukosyltransferase.

In allen Enzymtests konnte eine Komponente beobachtet werden, die mit dem Standard SG cochromatographierte und einer nativen Enzymaktivität in *S. cerevisiae* zugeschrieben wird (Warnecke et al., 1999).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die beiden bakteriellen Glykosyltransferasen auf ihre Akzeptor-Spezifität hin überprüft. In einem ersten Experiment wurden Enzymtests mit radioaktiv-markierten Zucker-Nukleotiden und nicht-radioaktiven, lipophilen Akzeptor-Molekülen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Membranfraktionen mit der β -Glukosyltransferase chlo2030 mit UDP- $[^{14}\text{C}]$ Glukose und nicht radioaktivem βGlcD , βGalD und SG inkubiert. Die Zugabe dieser Akzeptoren führte in allen drei Fällen zu deren Glykosylierung und damit zur Bildung von $\beta\text{Glc}\beta\text{GlcD}$, $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ und Steroldiglukosid (Abb. 24). Keine dieser Komponenten befand sich in den Kontrollen. Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen wurden weitere Komponenten synthetisiert, die zuvor schon beobachtet und beschrieben wurden. Unterschiedliche Intensitäten von Banden in verschiedenen Enzymtests sind auf Variationen in den Reaktionsbedingungen und vor allem auf die Unterschiede in der Expositionszeit zur Detektion der Radioaktivität zurückzuführen.

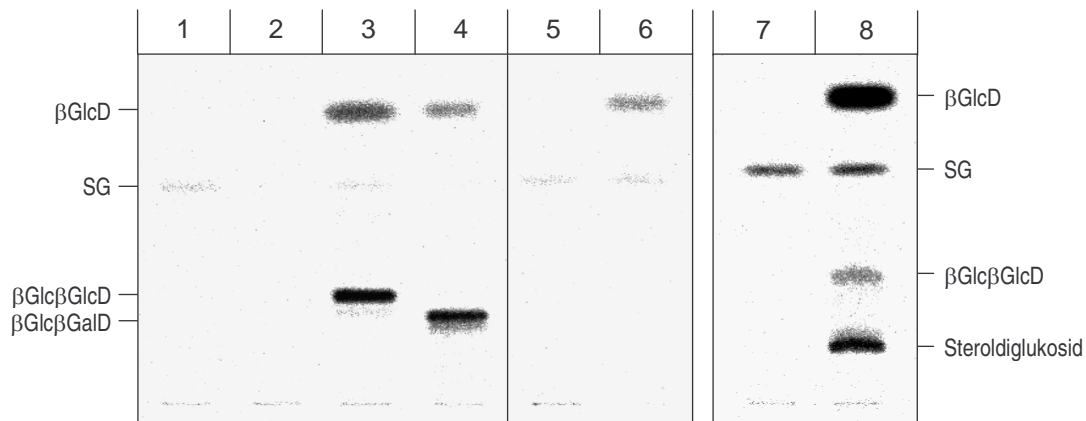


Abb. 24 Breite Akzeptor-Spezifität der Glykosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus*. Membranfraktionen von transformierten Zellen von *S. cerevisiae* wurden mit UDP- ^{14}C Glukose und den nicht markierten exogenen Akzeptoren β GlcD, β GalD und SG inkubiert. Eine weitere Inkubation erfolgte zur Kontrolle mit Ethanol anstatt mit lipophilen Akzeptoren. Die lipophilen Reaktionsprodukte wurden über DC in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/Methanol/ H_2O 35:35:0,35:40:5:4 aufgetrennt; die Radioaktivität wurde mit einem Phosphorimager detektiert. Alle drei Akzeptoren wurden glukosyliert und führten zur Bildung von β Glc β GlcD, β Glc β GalD und Steroldiglukosid. Die verschiedenen Reaktionsprodukte wurden bis auf das glukosylierte SG anhand von Referenzlipiden identifiziert. Die neu gebildeten Glykolipide sind nicht in den Kontrollen enthalten. Die sonstigen Reaktionsprodukte wurden bereits beschrieben (Abb. 23).

Spur 1: Leervektor + β GlcD

Spur 2: Leervektor + β GalD

Spur 3: Glykosyltransferase chlo2030 + β GlcD

Spur 4: Glykosyltransferase chlo2030 + β GalD

Spur 5: Leervektor + Ethanol

Spur 6: Glykosyltransferase chlo2030 + Ethanol

Spur 7: Leervektor + SG

Spur 8: Glykosyltransferase chlo2030 + SG

Um zu testen, ob die beiden Glykosyltransferasen chlo2029 und chlo2030 auch Ceramid als alternativen Akzeptor glykosylieren, wurden außerdem Enzymtests mit fluoreszierendem NBD-Cer durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Membranfraktionen von Zellen, die entweder eine der beiden Glykosyltransferasen oder beide zusammen exprimieren, mit NBD-Cer und UDP-Glc oder UDP-Gal inkubiert. Beide Enzyme waren in der Lage, NBD-Cer zu glykosylieren (Abb. 25). Die Galaktosyltransferase chlo2029 synthetisierte durch Inkubation mit UDP-Gal Galaktosyl-NBD-Cer. Die Inkubation mit UDP-Glc führte bei der Glukosyltransferase chlo2030 zur Bildung von Glukosyl-NBD-Cer. Um zu testen, ob dieses Enzym auch höher-glykosylierte Ceramide synthetisieren kann, wurde die Membranfraktion von Zellen, die beide Glykosyltransferasen exprimierten, mit UDP-Glc und UDP-Gal inkubiert. Es entstand glukosyliertes und galaktosyliertes NBD-Cer, die entsprechenden Diglykoside wurden jedoch nicht entdeckt.

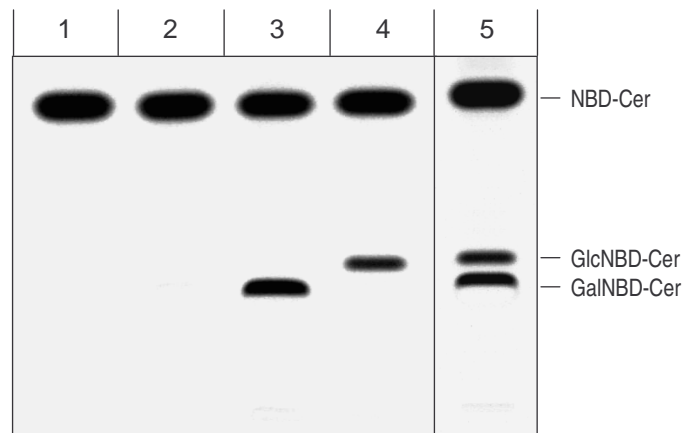


Abb. 25 Breite Akzeptor-Spezifität der beiden Glykosyltransferasen aus *C. aurantiacus*. Membranfraktionen von Zellen, die den ORF chlo2029 oder chlo2030 oder beide zusammen exprimierten, wurden mit NBD-Cer als lipophilem Akzeptor und mit UDP-Glc oder UDP-Gal inkubiert. Die lipophilen Reaktionsprodukte wurden über DC in Chloroform/Hexan/THF/Isopropanol/Methanol/H₂O 35:35:0,35:40:5:4 aufgetrennt und die Fluoreszenzen detektiert. Durch Zugabe von UDP-Gal zur Membranfraktion mit chlo2029 wurde GalNBD-Cer synthetisiert (Spur 3). Die Inkubation der Membranfraktion mit der Glykosyltransferase chlo2030 mit UDP-Glc führte zur Synthese von GlcNBD-Cer (Spur 4). Die Bildung beider Produkte erfolgte durch Zugabe von UDP-Glc und UDP-Gal zu der Membranfraktion von Zellen, die beide Glykosyltransferasen coexprimierten; es wurden aber keine höher glykosylierten Produkte entdeckt (Spur 5). Die Kontrollen enthielten keines dieser neuen Glykolipide

Spur 1: Leervektor + UDP-Gal

Spur 2: Leervektor + UDP-Glc

Spur 3: Galaktosyltransferase chlo2029 + UDP-Gal

Spur 4: Glukosyltransferase chlo2030 + UDP-Glc

Spur 5: chlo2029 + chlo2030 + UDP-Gal + UDP-Glc

Zusammenfassend konnten mit den *in vitro*-Enzymtests die Ergebnisse der Lipidanalysen bestätigt werden. Die β -Galaktosyltransferase chlo2029 katalysiert die Synthese von β GalD. Sie ist aber in der Lage, *in vitro* NBD-Cer zu galaktosylieren und mit einer sehr geringen Affinität auch UDP-Glc als Donator zu nutzen und β GlcD zu synthetisieren. Die β -Glukosyltransferase chlo2030 ist spezifisch für UDP-Glc, hat aber eine breite Akzeptor-Spezifität. Sie glukosyliert zum Beispiel β GalD, β GlcD, DAG, NBD-Cer und SG.

Putative Funktion der beiden β -Glykosyltransferasen in *C. aurantiacus*

Sowohl die β -Galaktosyltransferase chlo2029 als auch die β -Glukosyltransferase chlo2030 von *C. aurantiacus* dürften an der Biosynthese von Glykolipiden in diesem photosynthetisch aktiven, anoxygenen Bakterium beteiligt sein. Dieser Organismus enthält β GalD und Diglykosyldiacylglycerol mit Galaktose und Glukose als Kopfgruppe (Kenyon et al., 1974; Knudsen et al., 1982; Pierson et al., 1974), sodass die beiden charakterisierten Glykosyltransferasen als geeignete Kandidaten zur Synthese dieser beiden Glykolipide in Fragen kommen würden. Die Galaktosyltransferase chlo2029 ist außerdem die erste β GalD-Synthase, die aus Bakterien kloniert wurde.

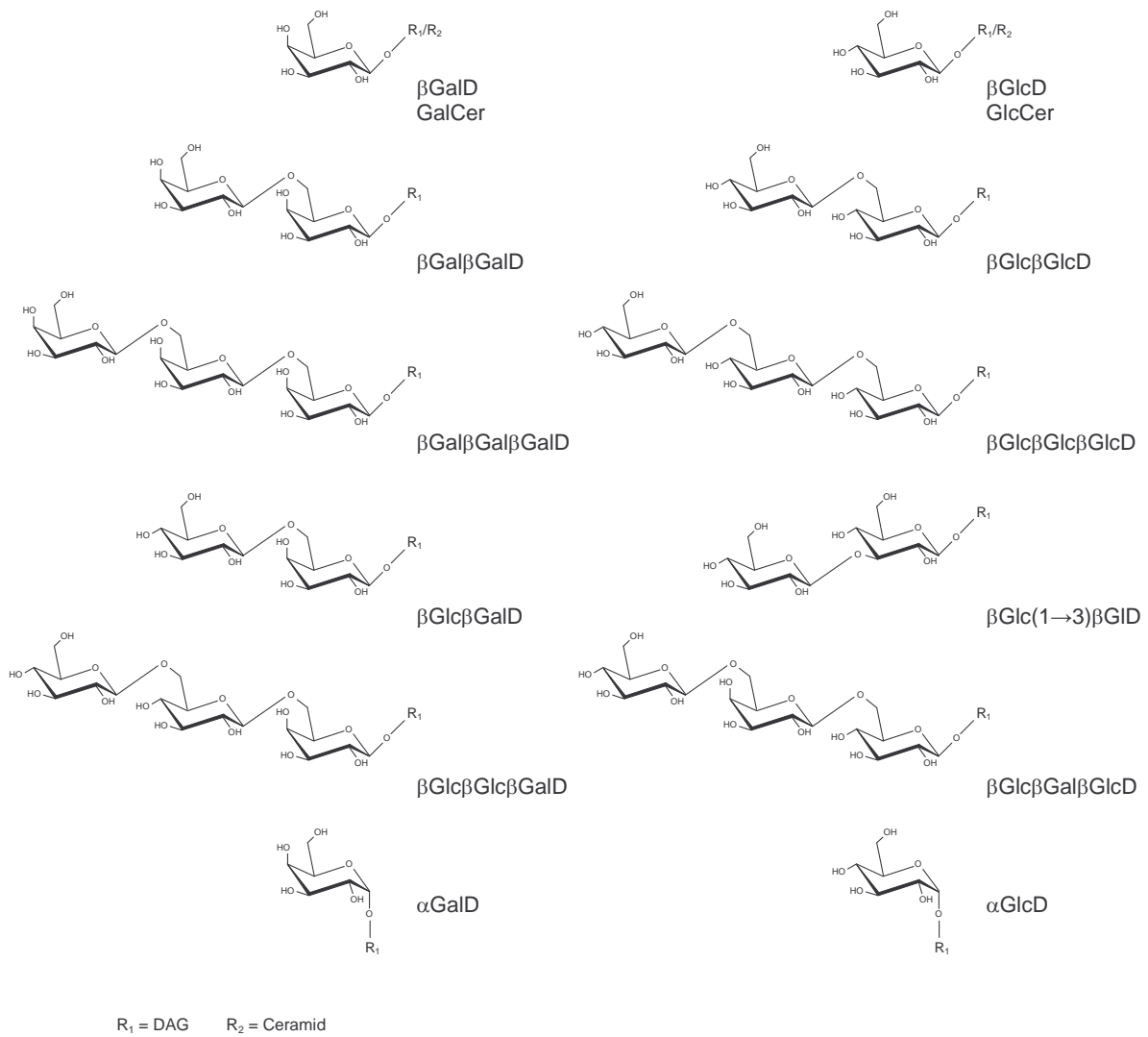


Abb. 26 Kopfgruppen von Glykolipiden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isoliert und durch Strukturanalysen (NMR-Spektroskopie und MS) identifiziert wurden.

3.2 Manipulation der Glykolipidbiosynthese in verschiedenen Organismen durch Gen-Inaktivierung und heterologe Expression von Glykosyltransferasen

Die Manipulation der Glykolipidbiosynthese erfolgt durch Inaktivierung der nativen Gene zur Glykolipidbiosynthese bei gleichzeitiger Expression heterologer Glykosyltransferasen. Auf diese Weise können native durch alternative Glykolipide ersetzt werden. Die Organismen, in denen die Glykolipidbiosynthese manipuliert werden sollte, waren *A. tumefaciens*, *P. patens*, *Synechococcus* und *A. thaliana*.

Zur Inaktivierung der betreffenden Gene der Glykolipidbiosynthese war es erforderlich, diese Gene zu analysieren. Durch die funktionale Expression in verschiedenen Organismen konnten eine β GalD-Synthase aus *Physcomitrella* (3.1.2) und die Gcs aus *Agrobacterium* (3.1.4.3.1) charakterisiert werden. Obwohl nicht verifiziert, sollte auch die putative α Gal β GalD-Synthase aus *Physcomitrella* in diese Experimente einbezogen werden. Bei *Arabidopsis* sind die benötigten Gen-Sequenzen von MGD1 und DGD1 in entsprechenden Datenbanken veröffentlicht. Die Gensequenzen, die für die entsprechenden Enzyme zur Glykolipidbiosynthese in *Synechococcus* kodieren, waren zu dieser Zeit nicht bekannt. Fast alle der hier beschriebenen ORFs putativer und charakterisierter Glykosyltransferasen wurden für eine heterologe Expression in Pflanzen und Blaualgen eingesetzt (Tabelle 7).

3.2.1 Unbekannte Funktion der Gcs in *A. tumefaciens*

Ein Hinweis auf die Funktion der Gcs in *A. tumefaciens* kann das Vorkommen von Glykolipiden sein. Wie bereits gezeigt, besitzt *A. tumefaciens* ein Gen, das für eine Gcs kodiert und bei Überexpression zur Synthese von β Gal β GalD und β Glc β GalD führt (3.1.4.3.1). Dieses *gcs*-Gen sollte inaktiviert werden, um anhand von möglichen Auswirkungen dieser Inaktivierung Rückschlüsse auf die native Funktion der Gcs zu erhalten.

A. tumefaciens enthält keine „normalen“ Glykolipide in detektierbaren Mengen

Von *A. tumefaciens*-Zellen wurden Lipidextrakte hergestellt und diese dann auf das Vorkommen von Glykolipiden untersucht. Anhand von DC konnten aber keine Glykolipide im Gesamtlipidextrakt entdeckt werden. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass sehr geringe Mengen von Glykolipiden der Detektion entgangen sind, wurde der Lipidextrakt über Säulenchromatographie in eine Neutrallipid-, Glykolipid- und Phospholipid-Fraktion getrennt. Die isolierten Fraktionen wurden in sehr geringen Mengen Lösungsmittel wieder aufgenommen und erneut über DC analysiert. In keiner dieser drei Fraktionen konnten jedoch Glykolipide detektiert werden. Die Nachweisgrenze dieser Glykolipide lag bei etwa 1 % im Gesamtlipidextrakt.

Deletion der Gcs in *A. tumefaciens* zeigt keine sichtbaren Auswirkungen

Um herauszufinden, ob das *gcs*-Gen aus *A. tumefaciens* an der Ausbildung des Lipidmusters dieses Bakteriums beteiligt ist, wurde dieses Gen durch homologe Rekombination mit einer Kan^R-Kassette deletiert (2.12.3). Die Deletion betraf den 5'-Bereich des *gcs*-ORF (384 bp) und die angrenzende Region des putativen *gcs*-Promotors (~700 bp) (Abb. 10 B). Mit Hilfe von Kolonie-PCR (2.4) und anschließender Gelelektrophorese der PCR-Produkte (2.8) wurde die korrekte Deletion überprüft (Abb. 27). Die erste von drei Amplifikationen betraf den genomischen Bereich am 5'-Ende der Kan^R-Kassette, die zweite betraf das 3'-Ende mit angrenzendem genomischen Bereich, während die dritte Amplifikation über den gesamten Bereich der durch homologe Rekombination inserierten DNA erfolgte, wobei die Primer außerhalb dieses Bereiches banden (2.12.3). Die erwarteten Banden lagen bei 1,6 kb, 1,5 kb bzw. 3,7 kb.

Die Amplifikationen 1 und 2 führten beim Wildtyp erwartungsgemäß zu keinem PCR-Produkt (Abb. 27). Da bei der Amplifikation 3 beide Primer in einem Genombereich banden, der nicht von der homologen Rekombination betroffen war, wurde somit auch beim Wildtyp ein entsprechendes PCR-Produkt von 3,6 kb amplifiziert (Abb. 27). Um diese Bande vom PCR-Produkt der Deletionsmutante mit 3,7 kb zu unterscheiden, wurden beide PCR-Produkte mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Durch Verdau mit *AscI* resultierten beim Wildtyp zwei Banden von 2,5 kb und 1,1 kb (Abb. 27). Da diese Schnittstelle nicht in der entsprechenden DNA der Deletionsmutante vorkam, wurde deren PCR-Produkt von 3,7 kb nicht geschnitten.

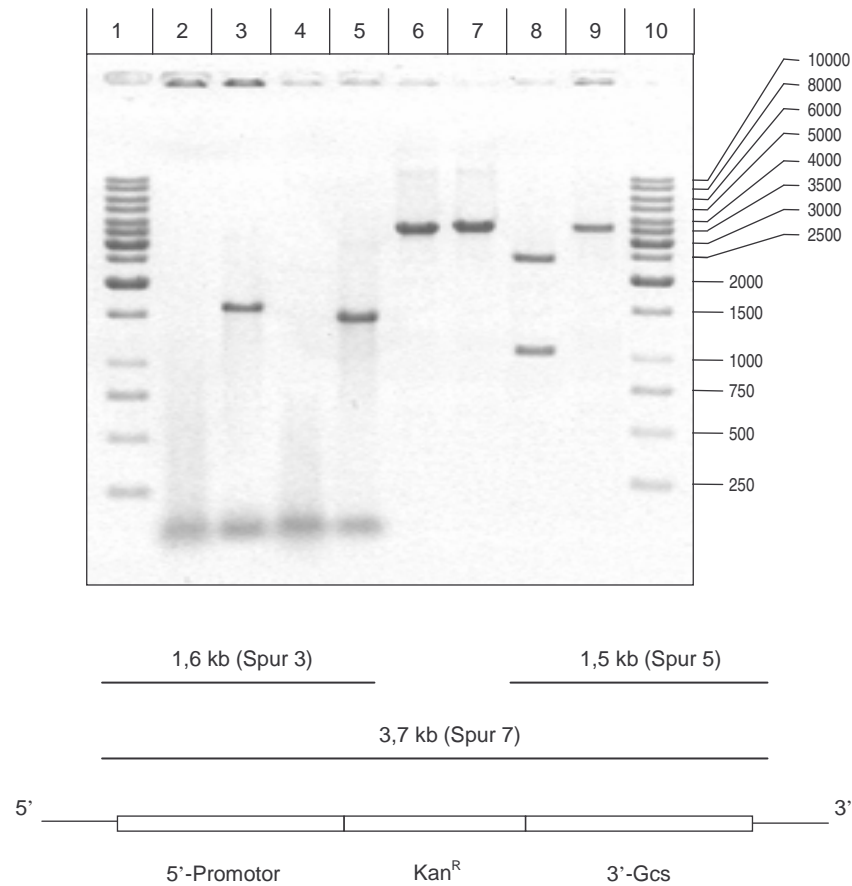


Abb. 27 Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Überprüfung der Deletion der Gcs in *A. tumefaciens*. Durch Kolonie-PCR wurden die angrenzenden Abschnitte der von der Deletion betroffenen Region amplifiziert und die resultierenden PCR-Produkte über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Amplifikation erfolgte über den 5'-Bereich, den 3'-Bereich und den Gesamtbereich der betroffenen Region. Zur Unterscheidung von Wildtyp und Deletionsmutante wurden die beiden PCR-Produkte von 3,6 kb bzw. 3,7 kb von dem jeweiligen Gesamtbereich mit AscI verdaut.

Spur 1: 1 kb-Leiter

Spur 2: Wildtyp-Kontrolle zu Spur 3

Spur 3: Amplifikation des 5'-Bereichs, PCR-Produkt mit 1,6 kb

Spur 4: Wildtyp-Kontrolle zu Spur 5

Spur 5: Amplifikation des 3'-Bereichs, PCR-Produkt mit 1,5 kb

Spur 6: Amplifikation über den gesamten betroffenen Bereichs beim Wildtyp mit PCR-Produkt von 3,6 kb

Spur 7: Amplifikation über den gesamten betroffenen Bereichs bei der Mutante mit PCR-Produkt von 3,7 kb

Spur 8: geschnittenes PCR-Produkt des Wildtyps mit zwei Banden mit 2,5 kb und 1,1 kb

Spur 9: ungeschnittenes PCR-Produkt der Deletionsmutante

Spur 10: 1 kb-Leiter

Der Lipidextrakt dieser Deletionsmutante wurde, wie oben beschrieben, durch Säulenchromatographie fraktioniert und jede der resultierenden Lipidfraktionen anschließend über DC analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp konnten aber keine Veränderungen festgestellt werden. Aus diesen Experimenten kann man schließen, dass Glykolipide höchstens in Spuren in dem mit Chloroform/Methanol gewonnenen Lipidextrakt vorhanden sein können. Außerdem ist das Fehlen der Gcs und deren Produkte für *A. tumefaciens* nicht letal.

Die natürliche Gcs-Aktivität liegt bei *in vitro*-Enzymtests unter der Nachweisgrenze

Da die Eliminierung der Gcs in *A. tumefaciens* keine Aufschlüsse über ihre Aktivität gebracht hatte, sollte mit Hilfe von *in vitro*-Enzymtests versucht werden, zumindest eine Enzymaktivität nachzuweisen. Wie bereits gezeigt wurde, konnten *in vitro*-Enzymtests mit der heterolog exprimierten Gcs aus *A. tumefaciens* erfolgreich durchgeführt werden (3.1.4.3.1). Somit besteht die Möglichkeit, auch die Gcs-Aktivität in *Agrobacterium* zu bestimmen. Dazu wurden Membranfraktionen von *A. tumefaciens*-Zellen präpariert und mit NBD-Cer und UDP-Gal inkubiert. In der Probe mit dem Wildtyp von *A. tumefaciens* konnte kein galaktosyliertes NBD-Cer nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die die Gcs aus *A. tumefaciens* überexprimierten (2.12.4) und GalNBD-Cer synthetisierten (Abb. 28). Die Deletionsmutante von *A. tumefaciens* wurde als Negativ-Kontrolle benutzt, in der erwartungsgemäß keine entsprechenden Glykolipide detektiert wurden.

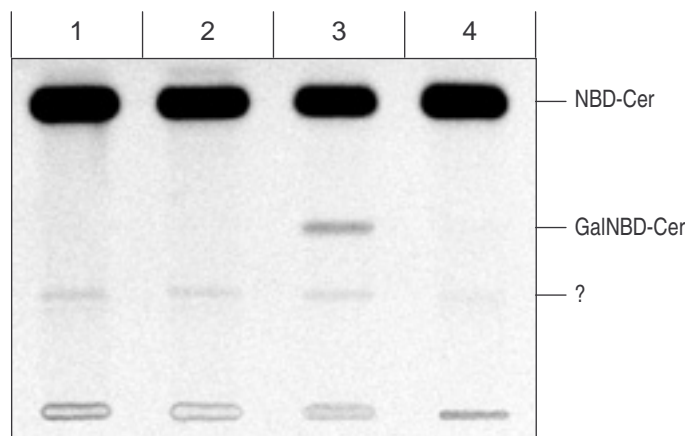


Abb. 28 *In vitro*-Synthese von GalNBD-Cer durch Membranfraktionen von *A. tumefaciens*. Die Membranfraktionen wurden mit NBD-Cer und UDP-Gal inkubiert. Die lipophilen Reaktionsprodukte wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:6 aufgetrennt und die Fluoreszenzen detektiert. Ein unidentifiziertes Produkt (?) taucht in geringen Mengen in allen Fraktionen auf.

Spur 1: Membranen von Wildtyp-Zellen

Spur 2: Membranen der Deletionsmutante als Negativ-Kontrolle

Spur 3: Membranen von Zellen, die die Gcs aus *A. tumefaciens* überexprimieren, dienen als Positiv-Kontrolle

Spur 4: NBD-Cer

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Enzymaktivität in den Wildtyp-Zellen unter der Nachweisgrenze lag.

Der *gcs*-Promotor ist bei der *in vivo*-Kultur von *A. tumefaciens* aktiv

Mögliche Ursachen für den negativ ausgegangenen Nachweis von Produkten der Gcs-Aktivität könnten darin liegen, dass der Promotor nur eine sehr niedrige Transkription dieses Gens zulässt, oder dass die Transkription unter den gegebenen Wachstumsbedingungen reprimiert ist. Diese möglichen Ursachen wurden überprüft, indem der ORF des *gcs*-Gens durch die heterologe β -Glukosyltransferase aus *S. aureus* (*ugt106B1*) ersetzt wurde, die dann als Reporter-Gen dienen sollte, um die Aktivität des

gcs-Promotors zu bestimmen. In einem vorausgehenden Experiment konnte durch die Biosynthese von β Glc β GlcD gezeigt werden, dass diese β -Glukosyltransferase in *A. tumefaciens* aktiv ist, wenn sie unter einem starken Promotor exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

Der ORF dieser β -Glukosyltransferase wurde nach diesem Experiment mit einem nachfolgenden Selektionsmarker (Sm^R/Sp^R -Kassette) genau an die Stelle des Startcodons des zu ersetzenden *Gcs*-ORF eingefügt (2.12.3). Die Integration dieser Fremd-DNA erfolgte wiederum durch homologe Rekombination und wurde über Kolonie-PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Dabei führte jedoch nur die Amplifikation im 5'-Bereich der betroffenen Region zu einem PCR-Produkt. Dieses Ergebnis war aber ausreichend für die Bestätigung, dass sich die Sequenz der heterologen β -Glukosyltransferase am richtigen Lokus befand.

Diese genetische Manipulation sollte die transformierten Zellen von *A. tumefaciens* dazu veranlassen, die heterologe β -Glukosyltransferase unter Kontrolle des *gcs*-Promotors zu exprimieren. Um dies zu überprüfen, wurden die Lipide aus dieser Mutante präpariert und über DC analysiert. In der Glykolipidfraktion dieser Mutante konnte β Glc β GlcD nachgewiesen werden (Abb. 29). Das Vorkommen dieses Glykolipids in den transformierten Zellen zeigt, dass der *gcs*-Promotor tatsächlich aktiv ist. Folglich kann auch angenommen werden, dass das *gcs*-Gen unter Laborbedingungen im Wildtyp von *A. tumefaciens* transkribiert wird.

In einem weiteren Experiment wurde *A. tumefaciens* auch mit der *Gcs* aus *M. loti* transformiert. Die Vorgehensweise war wie für die β -Glukosyltransferase aus *S. aureus* beschrieben (Daten und Konstrukte nicht angegeben). In diesen transformierten Zellen konnten jedoch keine neuen Glykolipide entdeckt werden (Abb. 29). Die Aktivität der bakteriellen *Gcs*-Enzyme ist daher in *A. tumefaciens* so gering, dass die Biosynthese ihrer Produkte unter der Nachweisgrenze der beschriebenen Versuche liegt.

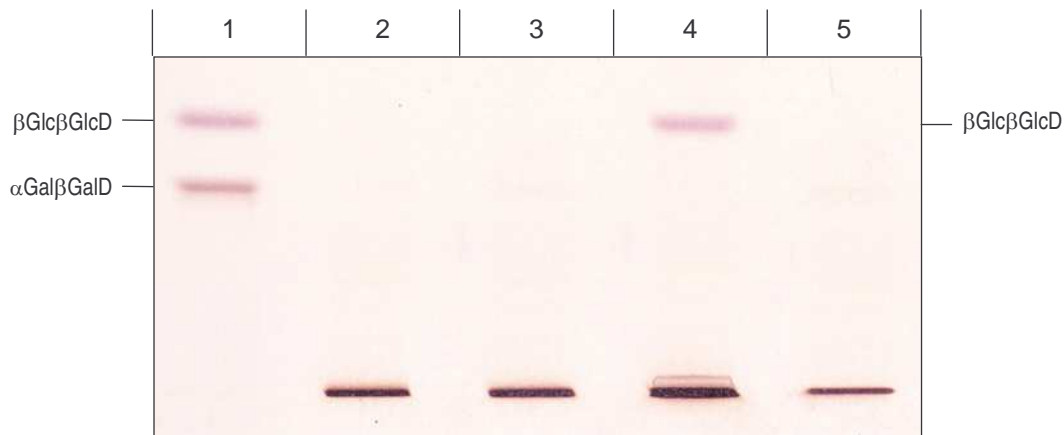


Abb. 29 Glykolipidfraktionen des Wildtyps und verschiedener Mutanten von *A. tumefaciens*. Die Gesamtlipidextrakte der verschiedenen Stämme wurden über Säulenchromatographie fraktioniert und die resultierenden Glykolipidfraktionen über DC in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:8 aufgetrennt.

Spur 1: Standards

Spur 2: Wildtyp

Spur 3: *gcs*⁻-Mutante von *A. tumefaciens*

Spur 4: Expression der β -Glukosyltransferase aus *S. aureus* unter Kontrolle des *gcs*-Promotors mit Synthese von β Glc β GlcD

Spur 5: Expression der Gcs aus *M. loti* unter Kontrolle des *gcs*-Promotors

Obwohl die Enzymaktivität der Gcs aus *A. tumefaciens* charakterisiert werden konnte (3.1.4.3.1), bleibt die biologische Funktion dieser Glykosyltransferase in *A. tumefaciens* weiterhin unklar. Die Deletion des *gcs*-Gens in *A. tumefaciens* war nicht letal, wobei die Deletionsmutanten unter den angegebenen Laborbedingungen wuchsen wie der Wildtyp. Obwohl der *gcs*-Promotor aktiv war, konnte das entsprechende Produkt der Gcs im Wildtyp weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen werden. Deshalb kann man annehmen, dass nur Spuren des Gcs-Produkts in *A. tumefaciens* synthetisiert werden. Diese geringen Anteile könnten aber ausreichen, um biologische Funktionen zu erfüllen, wie zum Beispiel die Beteiligung an Signal-Kaskaden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Expression unter den gegebenen Laborbedingungen sehr niedrig ist, aber unter veränderten Bedingungen steigt (z. B. Stress, Infektion von Pflanzen). Das könnte dann zur Synthese von ausreichenden Mengen der entsprechenden Glykolipide führen, um ihre Funktion als Membrankomponenten zu erfüllen oder zum Beispiel als Vorstufen für Zellwand-Polymere zu dienen. In der Tat gibt es bei den *Rhizobiaceae* und verwandten Bakterien manche Arten, die ihre Lipidzusammensetzung ändern, wenn Sauerstoffmangel herrscht, wie dies in Symbiose mit Pflanzen der Fall ist. Zum Beispiel akkumuliert *Bradyrhizobium japonicum* das Phospholipid PI (Tang et al., 1998). *Sinorhizobium meliloti* und *R. sphaeroides* reagieren auf Phosphatmangel mit der Synthese von SQD (Benning et al., 1995; Geiger et al., 1999). Während der Interaktion mit Pflanzen akkumuliert *Rhizobium leguminosarum* Diglykosyldiacylglycerol, das umgekehrt, verschiedene für die Symbiose relevante morphologische Veränderungen in der Wirtspflanze auslöst (Orgambide et al., 1994).

Zu erwähnen sei noch, dass *A. tumefaciens* 54 Glykosyltransferasen in unterschiedlichen Familien besitzt, wobei die Gcs die einzige Sequenz in GT21 ist (Coutinho et al., 1999) (Carbohydrate-Active Enzymes Server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>). Entsprechendes gilt auch für die GCS aus *M. loti*. Das deutet darauf hin, dass das Vorkommen dieser Sequenzen nicht redundant sein dürfte.

Angesichts dieser Daten bietet die Charakterisierung der Gcs aus *A. tumefaciens* und *M. loti* eine Grundlage für Studien zur Funktion von Glykolipiden in parasitischen oder symbiotischen Bakterien. Dazu muss der Phänotyp der Mutanten noch genau untersucht werden.

3.2.2 Die Deletion einer β GalD-Synthase und die Expression heterologer Glykosyltransferasen in *Physcomitrella* führten zu keiner Veränderung im Glykolipidmuster

P. patens sollte dazu dienen, die Funktion von Galaktolipiden (β GalD, α Gal β GalD) zu untersuchen. Dazu sollten zunächst die mooseigenen Galaktosyltransferasen inaktiviert und danach die heterologe Expression bakterieller Glykosyltransferasen etabliert werden.

Von den zwei putativen Galaktolipid-Synthasen konnte ein cDNA-Klon als β GalD-Synthase verifiziert werden (3.1.2). Die Verifizierung des zweiten cDNA-Klons als α Gal β GalD-Synthase war erfolglos. Trotzdem wurden beide Sequenzen zur Herstellung von Deletionskonstrukten benutzt, um die entsprechenden Enzyme in *Physcomitrella* zu inaktivieren.

Die Transformation der Protoplasten und die nachfolgende Identifizierung der entsprechenden Mutanten wurden von Dr. Hauke Holtorf (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Reski) an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg durchgeführt.

Nach der Transformation mit dem Konstrukt zur Inaktivierung der β GalD-Synthase konnten 4 von 96 untersuchten Mutanten als Deletionsmutanten identifiziert werden. Bei der Deletion der putativen α Gal β GalD-Synthase wurden 15 Deletionsmutanten aus einer Anzahl von 96 Mutanten identifiziert. Die Identifizierung erfolgte über PCR. Das Protonema, das als Jugendstadium der Moose (Reski, 1998) in Form einer filzartigen grünen Kolonie wuchs, begann bei den Deletionsmutanten der β GalD-Synthase vom Zentrum beginnend nach außen hin abzusterben (Daten nicht gezeigt). Diese Merkmale zeigten sich auch in abgeschwächter Form bei den Deletionsmutanten der putativen α Gal β GalD-Synthase. Dieser Prozess vollzog sich aber sehr langsam, sodass sich an diesen Protonemata adulte

Moospflanzen entwickeln konnten. Diese adulten Moospflanzen-Mutanten zeigten im Gegensatz zu den Protonemata keinen Unterschied zum Wildtyp. Die nachfolgende Analyse der Glykolipide zeigte ebenfalls keine Reduktion im Galaktolipidgehalt (Daten nicht gezeigt).

Das Genom von *P. patens* ist bisher noch nicht durchsequenziert. Die Ergebnisse lassen aber vermuten, dass *Physcomitrella*, wie höhere Pflanzen (Awai et al., 2001; Dörmann et al., 1995; Kelly et al., 2002), mehrere Isoenzyme zur Galaktolipid-Biosynthese besitzt. So wie bei *A. thaliana* die Expression vor allem der Typ B-Synthasen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und den verschiedenen Geweben variiert (Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2004), so könnte auch bei *Physcomitrella* die identifizierte β GalD-Synthase in einem frühen Entwicklungsstadium aktiv sein. In den adulten Moospflanzen könnte dann eine zweite Enzymaktivität dominieren. Die Suche in den EST-Datenbanken brachte weitere Fragmente zum Vorschein, die homolog zu den entsprechenden Galaktolipid-Synthasen waren (Daten nicht gezeigt) und somit die Annahme von der Existenz weiterer Enzyme zur Galaktolipid-Biosynthese in *Physcomitrella* stützen.

Die DGD2 bei *A. thaliana* wird vor allem bei Phosphatmangel exprimiert (Kelly et al., 2002). Untersuchungen an Moos-Mutanten unter Stressbedingungen wurden nicht durchgeführt, könnten aber möglicherweise weitere Aufschlüsse über die Funktion vor allem der putativen α Gal β GalD-Synthase in *P. patens* geben.

Die Transformation von Protoplasten mit verschiedenen heterologen Glykosyltransferasen führte ebenfalls zur Identifizierung von entsprechenden Mutanten (Daten nicht gezeigt). Die verwendeten Glykosyltransferasen waren die α -Glukosyltransferase aus *A. laidlawii* (Berg et al., 2001), die α -Galaktosyltransferase aus *B. burgdorferi* (lt. Korrespondenz mit Dr. Bergström) und die β -Glukosyltransferase aus *S. aureus* (Jorasch et al., 2000), die jeweils mit und ohne N-terminalem Chloroplasten-Leaderpeptid exprimiert wurden. Die verschiedenen Entwicklungsstadien dieser Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp keinen sichtbar abweichenden Phänotyp. Auch durch eine anschließende Analyse der Lipide konnten keine neuen Glykolipide detektiert werden. Man kann daraus schließen, dass die entsprechenden Gene oder Enzyme nicht aktiv waren. Im gleichen Zeitraum wurden Experimente mit *Arabidopsis*-Mutanten durchgeführt, die durch Transformation des Wildtyps mit Konstrukten von Glykosyltransferasen aus *S. aureus* und *B. subtilis* (Jorasch et al., 1998; Jorasch et al., 2000) hergestellt wurden. Dabei konnte ebenfalls keine Enzymaktivität festgestellt und so gut wie keine Transkription und Translation dieser bakteriellen Gene nachgewiesen werden (Gaude, 2001). Die Moospflanzen wurden nicht weiter untersucht. Es ist aber anzunehmen, dass ähnliche Mechanismen wie in *Arabidopsis* die Expression der bakteriellen Gene in *Physcomitrella* unterbinden. Der plausibelste Grund wäre die Degradation der mRNA durch das so genannte „post-transcriptional gene silencing“ (Vaucheret et al., 2001), das manchmal in transformierten Pflanzen beobachtet wird

und zur Inaktivierung des Transgens führt (Finnegan et al., 1994). Ein weiterer Grund könnte die unterschiedliche Codon-Präferenz in Pflanzen und Bakterien sein. So wären die Pflanzen nicht in der Lage, für synonyme Codons, die häufig im Bakteriengenom, aber eher selten in Pflanzen vorkommen, die entsprechenden tRNAs in ausreichender Menge bereit zu stellen.

Abschließend betrachtet haben die Ergebnisse der Deletion der β GalD-Synthase und der putativen α Gal β GalD-Synthase in *P. patens* gezeigt, dass diese Gene nicht für die Hauptenzymaktivität zur Galaktolipid-Biosynthese in diesem Organismus kodieren und folglich noch weitere unbekannte Gene der Galaktolipid-Biosynthese vorhanden sein müssen. Außerdem war die heterologe Expression von bakteriellen Glykosyltransferasen erfolglos. Aus diesen Gründen war es in Anbetracht der für eine Doktorarbeit zur Verfügung stehenden Zeit schwierig, die für *Physcomitrella* ausgearbeitete Strategie einer induzierbaren Inaktivierung und Expression weiter zu verfolgen. Im Anschluss an diese Experimente wurde daher begonnen, nach weiteren bakteriellen Glykosyltransferasen zu suchen, diese zu charakterisieren und parallel dazu Blaualgen und Pflanzen zu transformieren.

3.2.3 Die Expression bakterieller Glykosyltransferasen verändert das Glykolipidmuster in *Synechococcus*

Da bei Blaualgen die Gene der Galaktolipid-Biosynthese nicht bekannt waren, und diese Organismen außerdem mehrere Sequenzen von Epimerasen besitzen, wobei vielleicht eine davon zur Konvertierung von β GlcD zu β GalD verantwortlich ist, wurde auf die aufwendige Deletion der entsprechenden Gene verzichtet. Stattdessen wurde nur die Transformation der Blaualge *Synechococcus* mit heterologen Glykosyltransferasen durchgeführt.

18 von 21 Konstrukten führten zur erfolgreichen Transformation von *Synechococcus*

Zur Expression verschiedener charakterisierter und putativer Glykosyltransferasen sowie des synthetischen Gens in *Synechococcus* Stamm R2-PIM8 (van der Plas et al., 1990) wurden 21 Vektoren mit den entsprechenden Sequenzen konstruiert (Tabelle 7), um die Blaualgen zu transformieren. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Platten mit Kanamycin und Ampicillin (2.13). Kanamycin-Resistenz wird durch die entsprechende Resistenzkassette auf dem Transformationsvektor vermittelt, während die Ampicillin-Resistenz durch die Rekombination des Konstrukts mit der Integrationsplattform wiederhergestellt wird (van der Plas et al., 1990). Die Streptomycin-Resistenz, die durch die entsprechende Resistenzkassette in der Integrationsplattform vermittelt wird, geht durch die korrekte Insertion der Fremd-DNA verloren.

Die meisten Transformationen konnten erfolgreich durchgeführt werden. Transformationsversuche mit den Vektoren pTnAt-GlyT, pTnMl-GlyT und pTnSa-GlcT (Tabelle 7) blieben dagegen auch nach zweimaliger Wiederholung erfolglos. Die Überprüfung der Mutanten auf Integration der jeweiligen ORF-Sequenzen erfolgte mit Kolonie-PCR (2.4) (Tabelle 6, Zeilen 6-22, 24 und 32). Durch späteres Ausstreichen der Kolonien auf Platten mit Streptomycin zeigte sich, dass die Zellen ihre Streptomycin-Resistenz nicht verloren hatten. Trotzdem wurden die durch Kolonie-PCR als positiv getesteten Zellen für Lipidanalysen angezogen. Die Untersuchung der Zellen auf neue Glykolipide war in den meisten Fällen erfolglos, aber ein paar Transformanten zeigten ein Glykolipidmuster, das von den Kontrollen abwich. Die neu synthetisierten Glykolipide wurden isoliert, acetyliert und ihre Struktur von Prof. Dr. U. Zähringer analysiert.

Vier bakterielle Glykosyltransferasen führten zu einem veränderten Glykolipidmuster in *Synechococcus*

In den Transformanten, die unterschiedliche α GlcD-Synthasen aus *D. radiodurans* (dr1225), *T. maritima* (tm0744) und *A. laidlawii* (Al-GlcT) exprimierten, wurden α GlcD und α GalD detektiert (Abb. 30). Der Anteil des neuen Galaktolipids war dabei höher als der des Glukolipids. Die Synthese von α GalD dürfte auf die Epimerisierung von α GlcD durch eine Epimeraseaktivität in Blaualgen zurückzuführen sein, die normalerweise β GlcD zu β GalD konvertiert (Sato et al., 1982). Mit der Akkumulation der beiden neuen Glykolipide ging eine Reduktion des Anteils von nativem β GalD einher.

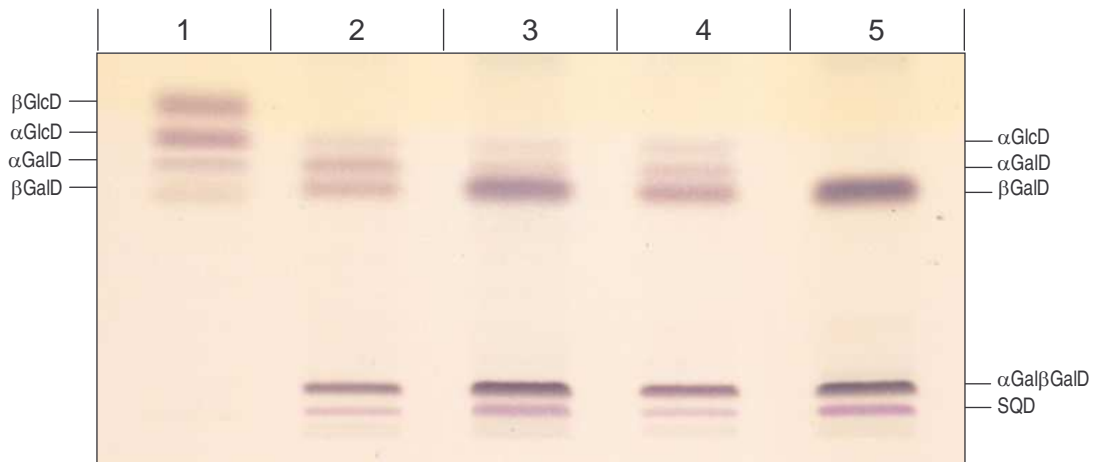


Abb. 30 Neue Glykolipide in *Synechococcus*-Mutanten, die verschiedene heterologe α GlcD-Synthasen exprimieren. Die Glykolipidfraktionen von Zellen mit den α GlcD-Synthasen aus *D. radiodurans* (dr1225), *T. maritima* (tm0744) und *A. laidlawii* wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 50:0,5:35:3 aufgetrennt. Die Expression führte in allen drei Fällen zur Synthese von α GlcD, das teilweise durch eine native Epimerase zu α GalD epimerisiert wurde. Das native β GalD war reduziert.

Spur 1: Standards

Spur 2: α GlcD-Synthase aus *D. radiodurans* (dr1225)

Spur 3: α GlcD-Synthase aus *T. maritima* (tm0744)

Spur 4: α GlcD-Synthase aus *A. laidlawii*

Spur 5: Kontrolle

Für eine quantitative Analyse der beobachteten Unterschiede zwischen Transformanten und nicht transformierten Zellen wurden die relativen Anteile der Glykolipide berechnet, indem die Intensitäten der veraschten Banden densitometrisch gemessen wurden. Die aufgetragenen Mengen von Lipiden lagen dabei in einem Bereich, in dem der Messwert linear mit der aufgetragenen Lipidmenge anstieg. Die folgenden Ergebnisse basieren dabei auf den neutralen Glykolipiden, d. h. PG und SQD wurden nicht berücksichtigt.

Für die Untersuchungen wurden *Synechococcus*-Zellen mit der α GlcD-Synthase aus *D. radiodurans* (dr1225) verwendet. Obwohl α GlcD das unmittelbare Produkt dieser α GlcD-Synthase-Aktivität ist, lag sein Anteil nur bei 5 % (Abb. 32). Demgegenüber wurde für α GalD ein Anteil von 35 % ermittelt, der im Bereich des verbliebenen nativen β GalD lag, das nur noch mit 34 % vertreten war. Damit war der Anteil des nativen β GalD in den Transformanten auf die Hälfte des Wertes der Kontroll-Zellen (65 %) reduziert. Weniger stark war das native α Gal β GalD von den Veränderungen betroffen, indem der Anteil dieses Lipids in den Transformanten im Vergleich zu den Kontroll-Zellen nur leicht (von 35 % auf 26 %) reduziert war.

Auch die Expression der β -Glukosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus* beeinflusste die Glykolipidbiosynthese in Blaualgen. In den entsprechenden Transformanten wurde ein hoher Anteil

von $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ detektiert (Abb. 31). Dieses Lipid wurde offensichtlich durch den Transfer eines Glukoserestes auf das native βGalD synthetisiert. Das native Intermediat βGlcD stand wahrscheinlich für eine effiziente Glykosylierung zu $\beta\text{Glc}\beta\text{GlcD}$ durch die heterologe Glukosyltransferase nicht zur Verfügung. Die Akkumulation von $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ führte zur Reduktion des Anteils von nativem $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$.

In Lipidextrakten von Zellen, die mit dem synthetischen Gen transformiert wurden, wurde eine sehr schwache Glykolipidbande beobachtet. Diese Komponente chromatographierte mit dem R_f -Wert von $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$, konnte aber wegen ihrer geringen Menge nicht identifiziert werden. Es ist aber durchaus denkbar, dass diese Glykosyltransferase bzw. das Original aus *S. aureus* (Jorasch et al., 2000) mit seiner breiten Akzeptor-Spezifität auch βGalD als Substrat nutzen kann. Das eventuell zu erwartende $\beta\text{Glc}\beta\text{GlcD}$ wurde nicht detektiert. Es bleibt daher eine offene Frage, ob die von dem synthetischen Gen kodierte Glykosyltransferase überhaupt aktiv war.

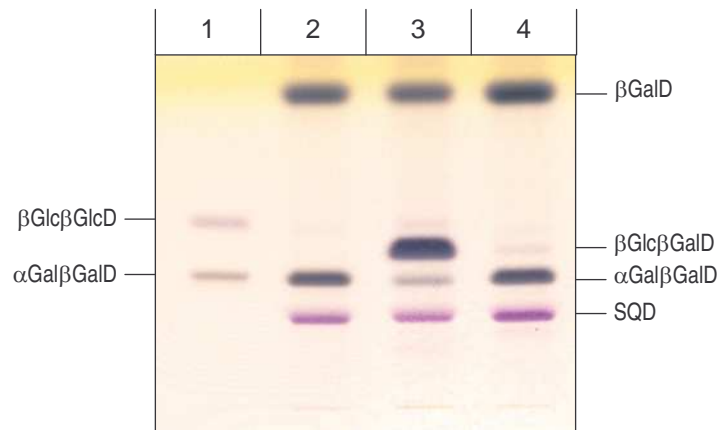


Abb. 31 Neue Glykolipide in *Synechococcus*-Mutanten, die zwei verschiedene heterologe β -Glykosyltransferasen exprimieren. Die Glykolipidfraktionen von Zellen mit der β -Glukosyltransferase aus *C. aurantiacus* (chlo2030) oder mit der synthetischen β -Glukosyltransferase wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/ H_2O 40:0,4:50:9 aufgetrennt. Die Expression der β -Glukosyltransferase chlo2030 führte zur Synthese von $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ durch Glukosylierung von βGalD und zur Reduktion des nativen $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$. Die Zellen mit der synthetischen β -Glukosyltransferase enthielten eine Komponente, die mit dem R_f -Wert von $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ chromatographierte, aber nicht als solches identifiziert werden konnte.

Spur 1: Standards

Spur 2: Kontrolle

Spur 3: β -Glukosyltransferase aus *C. aurantiacus* (chlo2030)

Spur 4: synthetische β -Glukosyltransferase

Die densitometrischen Untersuchungen zur Expression der β -Glukosyltransferase chlo2030 zeigten deutliche Veränderungen aufgrund des Austauschs des nativen $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$ durch das neue $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ (Abb. 32). Mit 59 % war das neue Glykolipid die dominierende Komponente in den

transformierten Zellen. Das native α Gal β GalD ging dabei von 35 % in den Kontroll-Zellen auf 5 % in den Transformanten zurück. Der Anteil des β GalD sank von 65 % auf 36 %.

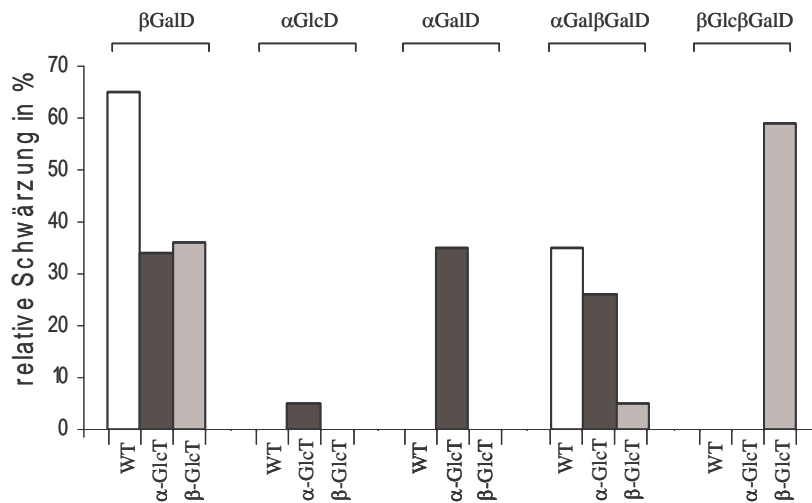


Abb. 32 Densitometrischer Vergleich der Glykolipidmuster in Wildtyp und Transformanten von *Synechococcus*. Aus Kulturen des Wildtyps und zwei Stämmen, die heterologe Glykosyltransferasen exprimierten, wurden Glykolipidextrakte präpariert und von jedem Extrakt verschiedene Mengen auf DC-Platten aufgetragen. Nach der Auftrennung wurden die Lipide durch Veraschung visualisiert und die Intensitäten der Banden auf der DC-Platte mit dem „TLC Scanner“ von CAMAG gemessen. Die Intensitäten der Banden sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Sie repräsentieren anteilige Werte, die relativ zur Summe der verschiedenen neutralen Glykolipide einer Probe auf den DC-Platten berechnet wurden. Weiße Balken: Wildtyp-Kontrollen; schwarze Balken: Transformanten mit der α -Glukosyltransferase dr1225 aus *D. radiodurans*; graue Balken: Transformanten mit der β -Glukosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus*. Die Laufmittel waren Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:7 oder 50:0,5:35:3.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die heterologe Expression verschiedener bakterieller Glykosyltransferasen eine signifikante qualitative und quantitative Veränderung des Glykolipidmusters in Blaualgen bewirkt. Die Expression von drei α GlcD-Synthasen führte zur Synthese von α GlcD und α GalD bei gleichzeitiger Reduktion des nativen β GalD. Die Expression einer β -Glukosyltransferase führte zur Synthese von β Glc β GalD und einer Reduktion des nativen α Gal β GalD.

Unterschiedliche Einflüsse der bakteriellen Glykosyltransferasen auf *Synechococcus*

Die Expression von α GlcD-Synthasen führte in *Synechococcus* neben der Synthese von α GlcD zur Bildung von α GalD und zur Reduktion des nativen β GalD. Aufgrund des Vorkommens von α GalD, das in den Spenderorganismen der exprimierten α GlcD-Synthasen fehlt (Carbonneau et al., 1984; Huang et al., 1995; Manca et al., 1992; Wieslander et al., 1977) und in *Pichia*-Transformanten nicht detektiert wurde (siehe oben), kann man folgern, dass die Epimerase der Blaualgen sowohl

Glykolipide mit β -anomeren Zucker-Kopfgruppen als auch deren α -anomere Alternativen akzeptiert. Dies dürfte auch für die Δ^9 -Fettsäure-Desaturase der Blaualgen zutreffen (Wada et al., 1998), indem keine Unterschiede im Desaturierungsgrad zwischen Fettsäuren von nativen und neuen Glykolipiden festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Der terminale Glukoserest von β Glc β GalD wird anscheinend nicht von der Epimerase akzeptiert, was die Beobachtungen der Synthese von α Gal β GalD in Blaualgen durch Transfer eines Galaktosylrestes auf β GalD bestätigt (Sato et al., 1982).

Unabhängig davon führte die Akkumulation von α GalD in *Synechococcus*-Transformanten nicht zu einer Zunahme des Anteils der gesamten Monoglykosyldiacylglycerole, da gleichzeitig ein ähnlich großer Anteil des nativen β GalD reduziert wurde. Dies deutet auf eine unveränderte und limitierende Synthese des DAG-Akzeptors oder auf andere Regulationsmechanismen hin. So wurde für *A. laidlawii* ein Regulationsmechanismus beschrieben, der das Verhältnis zwischen Bilayer-stabilisierenden und Bilayer-destabilisierenden Lipiden in einem bestimmten Gleichgewicht hält (Berg et al., 2001; Edman et al., 2003). Durch die starke Aktivität der β -Glukosyltransferase chlo2030 konnte zwar das native α Gal β GalD reduziert werden, das Verhältnis zwischen Bilayer-stabilisierenden zu Bilayer-destabilisierenden Lipiden ist jedoch stark zugunsten der Bilayer-stabilisierenden Lipide verschoben.

In den untersuchten Organismen wurde keines der beiden nativen Galaktolipide vollständig durch ein neues Glykolipid ersetzt. Dies könnte daran liegen, dass die verbleibende Aktivität der entsprechenden Enzyme nicht weiter herunter reguliert werden kann. Der restliche Anteil der nativen Galaktolipide ist demnach ausreichend, um das Wachstum der transformierten Zellen unter den gegebenen Laborbedingungen zu gewährleisten.

Die Kristallstrukturen in zunehmender Zahl demonstrieren, dass sowohl β GalD als auch α Gal β GalD an verschiedenen Stellen von Proteinkomplexen der Thylakoidmembranen gebunden sind, und auf diese Weise wahrscheinlich zur Stabilisierung der Proteinstruktur beitragen sowie für einen effizienten Transport von Excitonen und Elektronen zwischen diesen Komplexen sorgen (Jordan et al., 2001; Liu et al., 2004; Makewicz et al., 1996). Falls daher ein vollständiger Austausch der nativen Galaktolipide in Blaualgen überhaupt realisierbar wäre, so könnte das durch Austausch der Blaualgen-Epimerase oder der β GlcD-Synthase durch die β -Glukosyltransferase chlo2030 bzw. die α GlcD-Synthase dr1225 ermöglicht werden. Dies würde aber die Identifizierung der nativen Gene voraussetzen.

Zukünftige Studien können zeigen, ob der umfassende Austausch der Galaktolipide, mit dem in der vorliegenden Arbeit begonnen wurde, spezifische Auswirkungen auf Funktionen der Photosynthese hat.

3.2.4 Die Expression einer bakteriellen Glykosyltransferase führt zur Veränderung des Glykolipidmusters in *A. thaliana*

In *A. thaliana* sollten durch „post-transcriptional gene silencing“ die Aktivitäten von MGD1 und DGD1 so weit wie möglich vermindert und gleichzeitig durch die Expression heterologer Glykosyltransferasen neue Glykolipide akkumuliert werden. Letzteres stand dabei zunächst im Vordergrund.

Eine von 21 verschiedenen Glykosyltransferasen führte in *Arabidopsis* zu einem veränderten Glykolipidmuster

Insgesamt wurde *A. thaliana* mit 29 verschiedenen Vektoren transformiert. Diese Transformationsvektoren enthielten eine Kasette mit dem Konstrukt zur Inaktivierung von MGD1 oder alternativ eine Kasette zur Inaktivierung von DGD1 und außerdem eine der 21 verschiedenen ORF-Sequenzen. Acht der insgesamt 21 ORF-Sequenzen waren in beiden alternativen Transformationsvektoren enthalten, was zu insgesamt 29 Transformationsvektoren führte. Die Transformation von *A. thaliana* war mit allen 29 Konstrukten erfolgreich. Die Untersuchung der transformierten Pflanzen auf ein verändertes Glykolipidmuster wurde durch DC der Lipidextrakte durchgeführt, die aus je einem Blatt hergestellt wurden. Für jedes Konstrukt wurden auf diese Weise im Durchschnitt 10 Pflanzen untersucht.

Die Konstrukte zum „post-transcriptional gene silencing“ von MGD1 und DGD1 führten nicht zum Erfolg. Die entsprechenden Pflanzen zeigten in ihrem Wachstum und in ihrem Galaktolipidgehalt keine erkennbaren Abweichungen zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Anhand von PCR mit genomischer DNA als Template konnte die Integration der entsprechenden Gen-Inaktivierungs-Konstrukte ins Genom von transformierten Pflanzen von *A. thaliana* bestätigt werden. Die Gründe für die offensichtlich erfolglosen Versuche zur Inaktivierung der beiden Galaktosyltransferasen wurden nicht weiter untersucht.

Nur Pflanzen, die mit der β -Glukosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus* transformiert wurden, zeigten ein verändertes Glykolipidmuster. Mehrere transgene Pflanzen konnten selektioniert werden, die eine unterschiedlich starke Akkumulation des neuen Glykolipids β Glc β GalD aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Bei keiner dieser transgenen Pflanzen konnte unter den gegebenen Laborbedingungen ein verändertes Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Dies ist möglicherweise nicht überraschend, da ein ähnliches Diglykosyldiacylglycerol mit einem Glukosylrest in der Kopfgruppe in nicht unbedeutenden Mengen in bestimmten Geweben von Leguminosen vorkommt (Gaude et al., 2004).

Eine der Pflanzen mit dem größten Anteil von β Glc β GalD wurde für weitere Versuche verwendet. Die aus Selbstbestäubung hervorgegangenen Nachkommen dieses Primärtransformanten spalteten sich in

drei Gruppen auf. Von 176 untersuchten Pflanzen zeigten 49 das Lipidmuster des Wildtyps, 41 Pflanzen zeigten deutlich weniger $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ im Vergleich zum Primärtransformanten und 86 Pflanzen zeigten mit viel $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ das gleiche Lipidmuster wie der Primärtransformant (Abb. 33). In dieser letzten Gruppe war, wie beim Primärtransformanten, der Anteil des $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ sogar höher als der Anteil des nativen $\alpha\text{Gal}\beta\text{GalD}$. Die Synthese von geringen, unter der Nachweisgrenze befindlichen Mengen von βGlcD und $\beta\text{Glc}\beta\text{GlcD}$ in transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen kann nicht ausgeschlossen werden. Die Struktur von $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ wurde mit NMR-Spektroskopie und MS durch Prof. Dr. U. Zähringer analysiert (Daten nicht gezeigt). Die schematische Darstellung der Struktur der Kopfgruppe ist in Abb. 26 zu sehen.

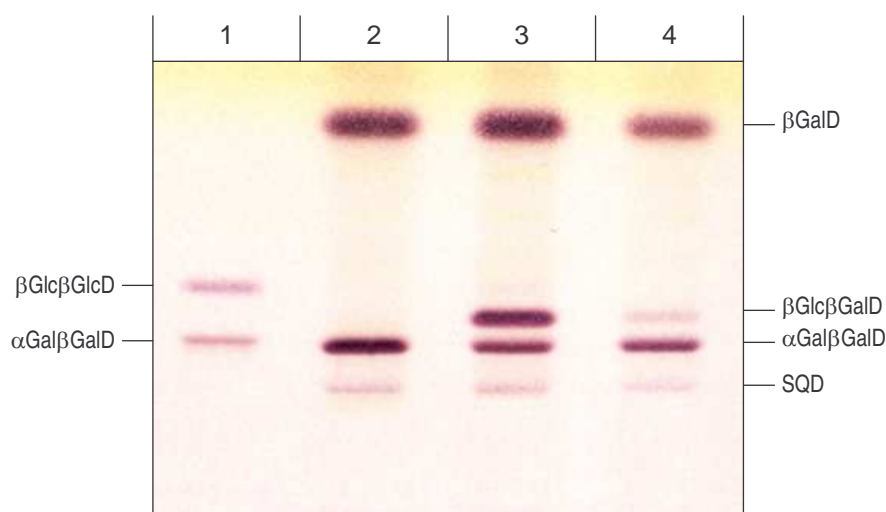


Abb. 33 Synthese neuer Glykolipide durch die Expression einer bakteriellen β -Glukosyltransferase in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen. Die Glykolipidfraktionen von zwei verschiedenen Nachkommen eines Primärtransformanten mit der β -Glukosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus* wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/ H_2O 40:0,4:50:9 aufgetrennt. Eine Gruppe von Nachkommen synthetisierte deutlich mehr $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ als die zweite Gruppe und glich in ihrem Lipidmuster dem Primärtransformanten. Eine dritte Gruppe (nicht gezeigt) zeigte das Lipidmuster des Wildtyps.

Spur 1: Standards

Spur 2: Wildtyp

Spur 3: Nachkomme mit viel $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ (Gruppe 1)

Spur 4: Nachkomme mit wenig $\beta\text{Glc}\beta\text{GalD}$ (Gruppe 2)

Lokalisation der bakteriellen β -Glukosyltransferase chlo2030 in den Chloroplasten von *A. thaliana*

Um zu zeigen, dass neben der erfolgreichen Expression in *A. thaliana* (siehe oben) auch die Insertion dieser heterologen Glykosyltransferase in die Chloroplasten erfolgt war und damit zur Veränderung des Glykolipidmusters der Thylakoide führte, wurden Lipidanalysen mit isolierten Chloroplasten durchgeführt. Bei der Isolierung der Chloroplasten wurden Pflanzen mit „viel“ und „wenig“

β Glc β GalD gemischt (Abb. 33). Das Lipidmuster der Chloroplasten aus den transgenen Pflanzen (Abb. 34) war ähnlich wie das Lipidmuster von ganzen transgenen Pflanzen (Abb. 33).

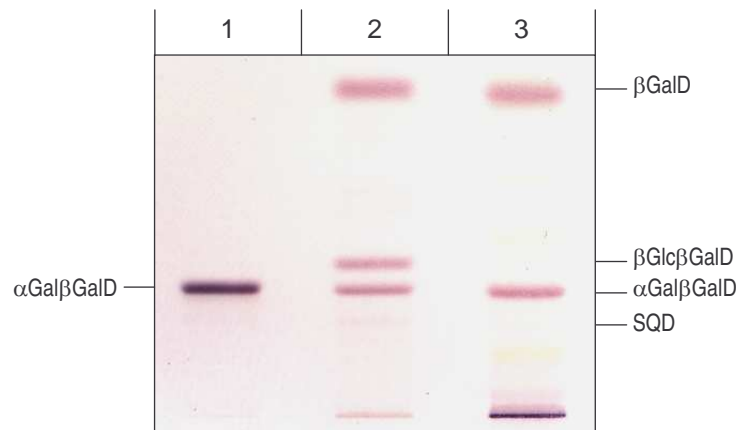


Abb. 34 Lokalisation des neuen Glykolipids in den Chloroplasten. Gesamtlipidextrakte aus Chloroplasten von Pflanzen mit der β -Glukosyltransferase chlo2030 wurden über DC in Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:9 aufgetrennt. Die Chloroplasten der transgenen Pflanzen enthalten β Glc β GalD, das in den Chloroplasten des Wildtyps nicht vorkommt.

Spur 1: Standard

Spur 2: Chloroplasten aus transgenen Pflanzen

Spur 3: Chloroplasten des Wildtyps

Akkumulation von β Glc β GalD führt zur Reduktion des nativen α Gal β GalD in *Arabidopsis*

Wie in Abb. 33 zu sehen ist, übertrifft in einer Gruppe von transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen der Anteil von β Glc β GalD den des nativen α Gal β GalD. Um dies zu bestätigen, wurden densitometrische Untersuchungen (wie oben beschrieben) durchgeführt. Für diese Experimente wurden beide Gruppen von Pflanzen herangezogen (Gruppe 1: viel β Glc β GalD; Gruppe 2: wenig β Glc β GalD). Der Anteil des neuen Glykolipids in der Gruppe 1 ist dabei mit 27 % fast doppelt so hoch wie der Anteil des verbliebenen α Gal β GalD (15 %), das im Vergleich zum Wildtyp (29 %) auf die Hälfte reduziert ist. Die Zusammensetzung der Galaktolipide der Pflanzen der Gruppe 2 ist ähnlich wie im Wildtyp, wobei der zusätzliche Anteil des β Glc β GalD bei 9 % liegt. Der Anteil des β GalD ist in beiden Gruppen leicht reduziert.

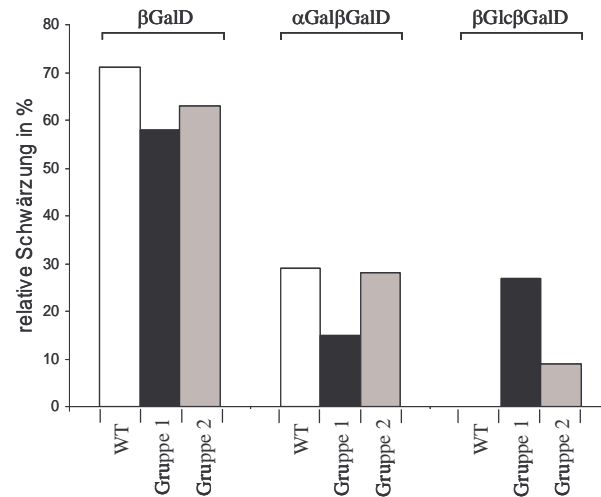


Abb. 35 Densitometrischer Vergleich der Glykolipidmuster von Wildtyp und Transformanten von *Arabidopsis*. Aus dem Wildtyp und zwei verschiedenen Gruppen von transgenen Pflanzen, die sich durch die Menge des synthetisierten βGlcβGalD unterscheiden, wurden Glykolipidfraktionen hergestellt. Die weitere Verfahrensweise zur Ermittlung der relativen Menge erfolgte wie oben beschrieben. Weiße Balken: Wildtyp-Kontrollen; schwarze Balken: Transformanten der Gruppe 1 mit viel βGlcβGalD; graue Balken: Transformanten der Gruppe 2 mit wenig βGlcβGalD. Das benutzte Laufmittel war Hexan/THF/Isopropanol/H₂O 40:0,4:50:7.

Die β-Glukosyltransferase chlo2030 hat im Vergleich mit den αGalβGalD-Synthasen in *Arabidopsis* Zugang zu anderen Substraten

Die Untersuchung des Fettsäureprofils könnte Aufschlüsse über den Zugang der β-Glukosyltransferase chlo2030 zu verschiedenen Substraten geben. Zu diesem Zweck wurden die Fettsäuren jeder Lipid-Spezies als Fettsäuremethylester über GLC aufgetrennt und quantifiziert (von Frau Hellmeyer). Dabei wurde nur eine Messreihe durchgeführt. Bei Vergleich der quantitativen Daten mit den relativen Werten der densitometrischen Untersuchungen wurden sehr gute Übereinstimmungen festgestellt. Daher kann angenommen werden, dass diese Werte zuverlässig sind und den Anforderungen dieses Vergleichs genügen. In dieser Auswertung wurden nur die dominanten Fettsäuren (16:0, 16:3, 18:2, 18:3) berücksichtigt und wiederum nur der Wildtyp und die beiden Gruppen von transgenen Pflanzen von *A. thaliana* herangezogen (Gruppe 1: viel βGlcβGalD; Gruppe 2: wenig βGlcβGalD).

Bei dem Vergleich der drei verschiedenen Pflanzen untereinander zeigten sich Ähnlichkeiten der Fettsäuremuster in den nativen Galaktolipiden (Tabelle 11). Kleinere Abweichungen zeigten nur die Pflanzen der Gruppe 1 mit einer leichten Abnahme von 16:3 bzw. Zunahme von 18:3 in βGalD. Umgekehrt ist in αGalβGalD eine leichte Zunahme der 16:0 bzw. leichte Abnahme der 18:3 zu beobachten.

Vergleicht man das heterolog synthetisierte βGlcβGalD mit den beiden nativen Galaktolipiden in den transgenen Pflanzen, so zeigen sich deutliche Unterschiede in den Fettsäuremustern (Tabelle 11). Das neue Diglykosyldiacylglycerol ähnelt dabei weder dem βGalD noch dem αGalβGalD. Die Messwerte

für die verschiedenen Fettsäuren in β Glc β GalD liegen zwischen den Werten der beiden nativen Galaktolipide. Am deutlichsten zeigt sich dies durch den Vergleich der Werte der C16-Fettsäuren. Diese Unterschiede lassen annehmen, dass die heterologe β -Glukosyltransferase chlo2030 und die native(n) α Gal β GalD-Synthase(n) auf verschiedene Substrate zugreifen. Im Hinblick auf die C16-Fettsäuren war β Glc β GalD durch das Vorkommen von großen Mengen von 16:3 gekennzeichnet, während in α Gal β GalD hauptsächlich 16:0 detektiert wurden. Die Fettsäure 16:0 kann in Abhängigkeit vom eukaryoten oder prokaryoten Ursprung des Lipids an *sn*-1 bzw. an *sn*-2 vorkommen. Das in Pflanzen synthetisierte Tri- und Tetragalaktosyldiacylglycerol ist im Gegensatz zum α Gal β GalD ebenfalls durch 16:3 an *sn*-2 gekennzeichnet (Siebertz et al., 1979; Xu et al., 2003).

Dieser Unterschied im Fettsäureprofil der beiden Lipide α Gal β GalD und β Glc β GalD lässt vermuten, dass sich die Hauptaktivität der β -Glukosyltransferase chlo2030 im inneren Envelope befindet und ein Substrat nutzt, zu dem die α Gal β GalD-Synthasen keinen Zugang haben. Umgekehrt könnte aber die β -Glukosyltransferase einen eingeschränkten Zugang zu den Substraten der α Gal β GalD-Synthasen haben. Genauere Aussagen über die Lokalisation der heterologen Glykosyltransferase können aber nur durch Positionsanalysen der Fettsäuren gemacht werden, die noch nicht abgeschlossen sind.

Tabelle 11 Fettsäureprofile der Glykolipide des Wildtyps und transgener Pflanzen von *Arabidopsis*. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil der einzelnen Fettsäuren bezogen auf die jeweilige Lipid-Spezies

Fettsäure	Wildtyp			Gruppe 1			Gruppe 2		
	β GalD	α Gal β GalD	β Glc β GalD	β GalD	α Gal β GalD	β Glc β GalD	β GalD	α Gal β GalD	β Glc β GalD
16:0	2	15	0	4	20	7	2	16	9
16:3	25	2	0	21	3	14	27	2	15
18:2	3	7	0	3	7	4	3	7	6
18:3	69	75	0	72	69	75	69	74	70

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Durch die Transformation mit der Sequenz der β -Glukosyltransferase aus *C. aurantiacus* gelang die erfolgreiche Expression einer bakteriellen Glykosyltransferase in *A. thaliana*. Durch die Fusion mit einem N-terminalen Chloroplasten-Leaderpeptid konnte dieses Enzym in den Chloroplasten importiert und so das Glykolipidmuster der Thylakoiden sichtbar verändert werden. Die Akkumulation des neuen Glykolipids β Glc β GalD führte dabei in einigen transgenen Pflanzen zu Anteilen, die die Höhe des nativen α Gal β GalD des Wildtyps erreichten. Der Anteil des α Gal β GalD war dabei in der transgenen

Pflanze um die Hälfte reduziert. Die Unterschiede im Fettsäureprofil zwischen β Glc β GalD und den nativen Galaktolipiden legen eine Lokalisation der α Gal β GalD-Synthase und der β -Glukosyltransferase chlo2030 in verschiedenen Membransystemen und einen Zugriff auf unterschiedliche Spezies von β GalD nahe.

Die Sequenz der β -Glukosyltransferase chlo2030 liegt in 5 Kopien im Genom von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen vor

Um Informationen über die Anzahl der Kopien des ORF chlo2030 in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zu erhalten, wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt (von Frau Bräcker). Dazu wurde genomische DNA aus drei verschiedenen Pflanzen der Gruppen 1 und 2 isoliert und mit EcoRV oder BamHI verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und geblottet. Die Enzyme wurden so gewählt, dass sie nicht im ORF oder in der Leadersequenz schnitten. Zur Hybridisierung dienten DIG-markierte DNA-Sonden, die entweder dem ORF chlo2030 oder der verwendeten Leader-Sequenz entsprachen. Aus dem Verdau mit EcoRV resultierten 5 Fragmente mit einer Größe von 2,5 bis 10,0 kb (Abb. 36). Durch Verdau mit BamHI traten 3 Banden mit einer Größe im Bereich von 5,0 bis 7,0 kb auf. Durch eine längere Laufzeit wurden 4 Banden aufgetrennt (Daten nicht gezeigt). Das zu erwartende fünfte Fragment konnte entweder nicht von einem ähnlich großen Fragment getrennt werden, oder es wurde von der schwachen Bande in Abb. 36 repräsentiert, die deutlich größer als 10,0 kb war. Die Verwendung der Sonden für den ORF chlo2030 und die Leadersequenz führten in beiden Fällen zu den gleichen Ergebnissen. Sie zeigen, dass der ORF chlo2030 zusammen mit der Leadersequenz in 5 Kopien im Genom der entsprechenden Pflanzen vorlag. Ein Unterschied zwischen Pflanzen der Gruppen 1 oder 2 konnte nicht festgestellt werden.

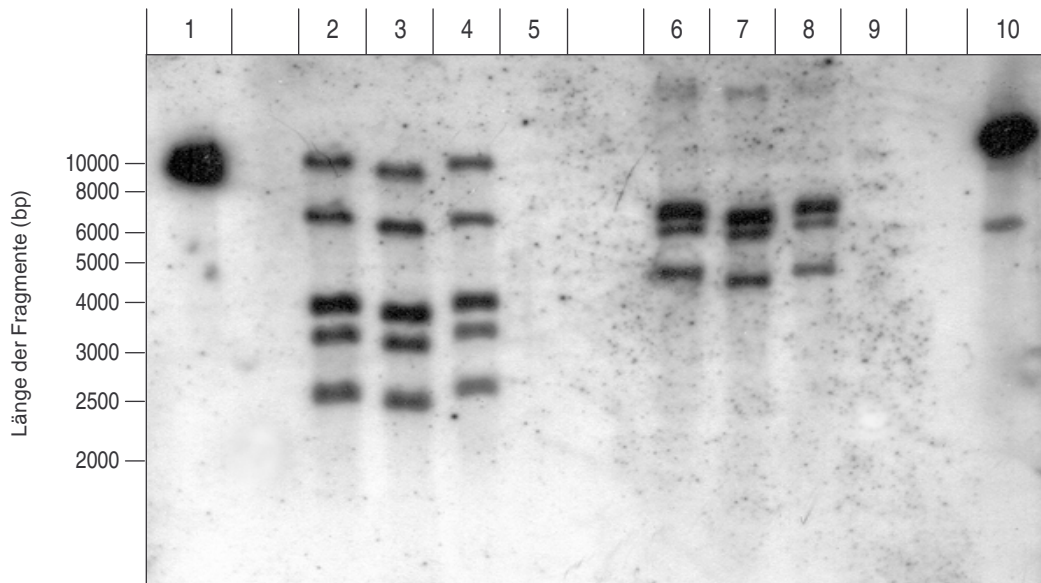


Abb. 36 Southern-Blot-Analyse der genomischen DNA von Pflanzen mit der β -Glukosyltransferase chlo2030. Proben genomischer DNA von zwei verschiedenen Pflanzen der Gruppe 1 und einer Pflanze der Gruppe 2 wurden mit EcoRV oder BamHI verdaut, über ein Agarosegel (1 %) aufgetrennt und mit der DIG-markierten Sonde des ORF chlo2030 hybridisiert. Der Röntgenfilm zeigt 5 Banden durch den Verdau mit EcoRV und 3 Banden durch den Verdau mit BamHI. Aus letzterem Verdau resultierten mindestens vier Fragmente, die zum Teil ähnliche Größe hatten und in dieser Abbildung nicht getrennt sind. Die entsprechenden Banden aus beiden Restriktionsansätzen wurden beim Wildtyp nicht entdeckt.

Spur 1: Plasmid pCDsLchlo2030 als Kontrolle
 Spur 2: Pflanze der Gruppe 1 (EcoRV)
 Spur 3: Pflanze der Gruppe 1 (EcoRV)
 Spur 4: Pflanze der Gruppe 2 (EcoRV)
 Spur 5: Wildtyp (EcoRV)
 Spur 6: Pflanze der Gruppe 1 (BamHI)
 Spur 7: Pflanze der Gruppe 1 (BamHI)
 Spur 8: Pflanze der Gruppe 2 (BamHI)
 Spur 9: Wildtyp (BamHI)
 Spur 10: Plasmid pCDsLchlo2030 als Kontrolle

Die Nachkommen des ausgewählten Primärtransformanten (siehe oben) zeigten im Hinblick auf das Glykolipidmuster eine Aufspaltung mit einem Verhältnis von 1:2:1. Die Gruppe der Pflanzen mit viel β Glc β GalD war dabei doppelt so groß wie die Gruppen der Pflanzen mit wenig bzw. ohne β Glc β GalD (Abb. 33). Dies entspricht einer Aufspaltung in homozygotem Wildtyp sowie heterozygoten und homozygoten Transformanten (1:2:1), die zu erwarten wäre, wenn der ORF chlo2030 nur durch eine Kopie im Genom der Elternpflanze vertreten wäre. Dabei synthetisierten die so genannten heterozygoten Pflanzen viel und die so genannten homozygoten Pflanzen wenig β Glc β GalD. Die schwächere Aktivität der β -Glukosyltransferase chlo2030 in den homozygoten Pflanzen könnte man dabei auf „post-transcriptional gene silencing“ zurückführen, das durch mehr mRNA ausgelöst werden kann (Vaucheret et al., 2001). Das Vorhandensein von 5 Kopien steht jedoch nicht im Einklang zu der beobachteten Aufspaltung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass nur eine Kopie stark transkribiert wird und die Transkription der übrigen vier Kopien schwach ist. In Pflanzen, die bezüglich der stark

transkribierten Kopie heterozygot sind, würde viel β Glc β GalD akkumulieren. In den entsprechenden homozygoten Pflanzen würde dann durch die weitere Zunahme von mRNA die Aktivität der β -Glukosyltransferase durch „post-transcriptional gene silencing“ wieder vermindert werden (Vaucheret et al., 2001). Eine andere Erklärung wäre eine Insertion der 5 Kopien in enger Nachbarschaft im Genom, sodass durch die starke Kopplung keine Aufspaltung zu erkennen ist.

Komplementation der *dgd1*-Mutante von *A. thaliana* durch Expression der β -Glukosyltransferase *chlo2030*

In einer Kooperation mit Dr. Peter Dörmann konnte der Phänotyp der *dgd1*-Mutante von *A. thaliana* durch Akkumulation von β Glc β GalD teilweise komplementiert werden (Abb. 37). Die *dgd1*-Mutante zeigt durch die Reduktion von α Gal β GalD um 90 % einen Zwergwuchs und Beeinträchtigungen in der Photosynthese (Dörmann et al., 1995). Dörmann und seine Mitarbeiter hatten die β -Glukosyltransferase *chlo2030* in dieser Mutante exprimiert. Die komplementierte *dgd1*-Mutante zeigte durch die Akkumulation von β Glc β GalD ein deutlich besseres Wachstum als die *dgd1*-Mutante und ist dem Wildtyp ähnlich (Abb. 37).

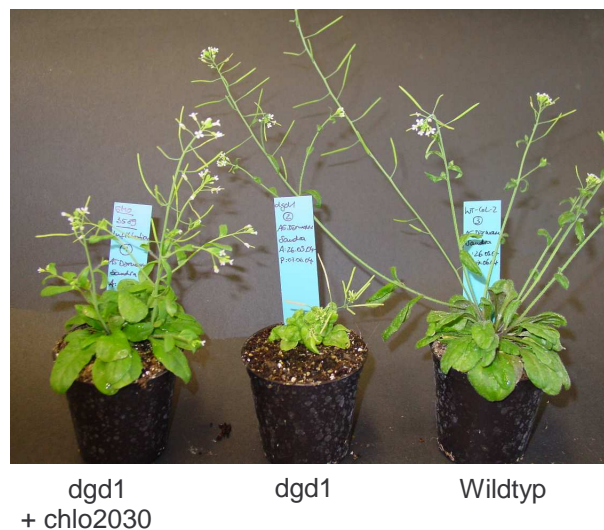


Abb. 37 Komplementation der *dgd1*-Mutante von *A. thaliana* durch die heterologe Expression der β -Glukosyltransferase *chlo2030* aus *C. aurantiacus*.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, zumindest einen Teil des nativen α Gal β GalD durch das alternative β Glc β GalD zu ersetzen. Daten über verschiedene physiologische Untersuchungen liegen noch nicht vor.

β Glc β GalD kann strukturelle Funktionen von α Gal β GalD übernehmen

Durch die Expression einer bakteriellen Glykosyltransferase aus *C. aurantiacus* ist es zum ersten Mal gelungen, die plastidären Glykolipide gezielt durch andere Glykolipide zu ersetzen.

Die Akkumulation des neuen Lipids in transgenen Pflanzen ohne Beeinträchtigung des Wachstums und die Wiederherstellung eines Wildtyp-ähnlichen Phänotyps der komplementierten *dgd1*-Mutante zeigen, dass das neue β Glc β GalD strukturelle Funktionen von α Gal β GalD übernehmen kann.

Ein ähnlicher Ansatz wurde zum Beispiel bei einer *E. coli*-Mutante angewandt. Dabei wurde das fehlende PE in diesem Organismus durch α GalD ersetzt, was zu einer teilweisen Wiederherstellung der ursprünglichen Membranfunktionen führte (Wikström et al., 2004). Weitere Beispiele für den Austausch von Glycerolipiden sind die verschiedenen Experimente mit Organismen, die unter bestimmten Bedingungen Phospholipide durch Sulfolipide und Galaktolipide ersetzen können (Andersson et al., 2003; Benning et al., 1993; Frentzen, 2004; Härtel et al., 1998)

Das Neue des hier beschriebenen Ansatzes besteht darin, dass zum ersten Mal Aussagen über Galaktolipide möglich sind, die über deren Funktion als Strukturkomponente hinausgehen. Durch Untersuchung der Mutanten können so Einblicke über die spezifische Funktion der Galaktose der plastidären Glykolipide gewonnen werden. Durch Messungen der Photosyntheseaktivität kann sich zeigen, ob die komplementierte *dgd1*-Mutante zu einer „normalen“ Photosynthese in der Lage ist (Dörmann et al., 1995; Härtel et al., 1997; Reifarh et al., 1997). Durch Kultivierung der Pflanzen unter Stress-Bedingungen (z. B. Phosphatmangel, verschiedene Lichtintensitäten, Salzstress, etc.) können weitere Details über die spezifische Funktion von α Gal β GalD zum Vorschein kommen.

3.3 Abschließender Überblick über die Ergebnisse der Expression der bereitgestellten ORFs in den verschiedenen Organismen.

In dieser Arbeit wurden 22 verschiedene bakterielle ORFs zur Transformation von *E. coli*, *P. patens*, *S. cerevisiae*, *Synechococcus*, *P. patens* und *A. thaliana* benutzt (Tabelle 12). Zwei dieser ORFs kodierten für bereits charakterisierte Glykosyltransferasen aus *A. laidlawii* und *S. aureus* (Berg et al., 2001; Jorasch et al., 2000). Ein ORF aus *B. burgdorferi* kodierte für eine β GalD-Synthase (lt. Bergström). Die 19 neuen ORFs kodierten für putative Glykosyltransferasen aus *D. radiodurans*, *T. maritima*, *L. lactis*, *A. tumefaciens*, *M. loti*, *C. aurantiacus* und *C. tepidum*. Darüber hinaus wurde noch ein künstlich hergestellter ORF verwendet. Sechs der neu identifizierten bakteriellen Glykosyltransferasen konnten durch Expression in *E. coli* oder in Hefen charakterisiert werden. Vier bakterielle Glykosyltransferasen führten in Blaualgen, aber nur eine in Pflanzen zu einer Veränderung des Glykolipidmusters.

Tabelle 12 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Expression der bereitgestellten bakteriellen ORFs zur Veränderung des Glykolipidmusters in Pflanzen und Blaualgen

ORF	Spender-Organismus	Spezifität	Expressionswirt					
			<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Synechococcus</i>	<i>P. patens</i>	<i>A. thaliana</i>
dr1225	<i>Deinococcus</i>	α Glc	-	+	n. t.	+	n. t.	-
tm0744	<i>Thermotoga</i>	α Glc	-	+	n. t.	+	n. t.	-
Al-GlcT ¹	<i>Acholeplasma</i>	α Glc	+	n. t.	+	+	-	?
chlo2030	<i>Chloroflexus</i>	β Glc	-	n. t.	+	+	n. t.	+
chlo2029	<i>Chloroflexus</i>	β Gal	-	n. t.	+	-	n. t.	-
Sa-GlcT ²	<i>Staphylococcus</i>	β Glc (prozessiv)	+	n. t.	+	?	-	-
AGR_C_3323	<i>Agrobacterium</i>	β Glc/ β Gal (prozessiv)	+	+	n. t.	?	n. t.	-
mlr5650	<i>Mesorhizobium</i>	β Glc/ β Gal (prozessiv)	+	n. t.	n. t.	?	n. t.	-
Bb-GalT ³	<i>Borrelia</i>	α Gal	-	n. t.	-	-	-	-
syn3	synthetisch	β Glc (prozessiv)	-	n. t.	-	?	n. t.	-
dr1076	<i>Deinococcus</i>	unbekannt	-	-	n. t.	-	n. t.	-
tm0622	<i>Thermotoga</i>	unbekannt	-	-	n. t.	-	n. t.	n. t.
ywaG	<i>Lactococcus</i>	unbekannt	-	-	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
ct1882	<i>Chlorobium</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
ct0548	<i>Chlorobium</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
ct0225	<i>Chlorobium</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
ct0226	<i>Chlorobium</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
chlo0149	<i>Chloroflexus</i>	unbekannt	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
chlo1337	<i>Chloroflexus</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
chlo1537	<i>Chloroflexus</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
chlo1567	<i>Chloroflexus</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
chlo1798	<i>Chloroflexus</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
chlo2464	<i>Chloroflexus</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-
chlo4056	<i>Chloroflexus</i>	unbekannt	-	n. t.	-	-	n. t.	-

¹(Berg et al., 2001)²(Jorasch et al., 2000)³(lt. Korrespondenz mit Bergström)

+ neues Glykolipid detektiert

n. t. nicht transformiert

- kein neues Glykolipid detektiert

? keine Transformanten erhalten

4 Zusammenfassung

Galaktolipide sind wichtige Membranbestandteile der Thylakoide von Pflanzen und Blaualgen, bei denen sie bis zu 80 % des Gesamtlipidgehalts dieser Membranen ausmachen. Diese Glykolipide sind Strukturelemente der Lipidmatrix für die Einbettung von Proteinen, sie sind am Proteinimport in die Organelle beteiligt, sie tragen zur Faltung und Stabilisierung von Proteinen bei, und sie spielen durch ihre Assoziation mit mehreren Proteinkomplexen der Thylakoidmembran eine Rolle bei der Photosynthese. Die Lipidzusammensetzung der Thylakoidmembranen ist bei Pflanzen und Blaualgen in hohem Maße konserviert, wobei Glykolipide mit alternativen Kopfgruppen ausgeschlossen sind. Dies deutet darauf hin, dass Galaktolipide spezifische Funktionen erfüllen, die mit der besonderen Konfiguration ihrer Kopfgruppen verbunden sind.

Zur Aufdeckung der Funktionen von Galaktolipiden standen bisher Mutanten von Genen der Galaktolipid-Biosynthese zur Verfügung, die durch eine starke Reduktion des Anteils des jeweiligen Galaktolipids gekennzeichnet sind. Die weitgehende Entfernung einer Lipidklasse lässt aber kaum Rückschlüsse auf die spezifischen Funktionen dieser Lipide zu, da die Deletion einer wichtigen Matrixkomponente Auswirkungen implizieren kann, die spezifische Funktionen nicht mehr erkennen lassen.

Ein alternativer Ansatz zielt auf einen Austausch der nativen Galaktolipide durch Glykolipide, die anomere und/oder epimere Kopfgruppen tragen oder im Falle von Diglykosyldiacylglycerolen durch eine andere Verknüpfung der Zuckerreste gekennzeichnet sind. Die Untersuchungen derartiger Mutanten können dann Rückschlüsse auf mögliche spezifische Funktionen von Galaktolipiden erlauben.

Die Realisierung dieses alternativen Ansatzes war Ziel der vorliegenden Arbeit. Dazu sollten auf genetischem Wege die nativen Enzyme der Galaktolipid-Biosynthese in geeigneten Organismen inaktiviert und durch Expression heterologer Glykosyltransferasen aus anderen Quellen ersetzt werden. Letzteres setzte dabei eine Identifizierung und Charakterisierung möglichst vieler neuer Glykosyltransferasen voraus.

Zu Beginn der Arbeit standen zunächst drei bakterielle Glykosyltransferasen (α GlcD-Synthase aus *A. laidlawii*, α GalD-Synthase aus *B. burgdorferi*, β -Glukosyltransferase aus *S. aureus*) zur Verfügung. Über Datenbanksuchläufe wurden weitere 20 Sequenzen von putativen Glykosyltransferasen aus verschiedenen Glykosyltransferase-Familien (GT4, GT21, GT28) identifiziert. Zusätzlich wurde ein für die Expression in Pflanzen optimiertes, künstliches Gen erzeugt, das durch vollständige Umstellung der Codon-Nutzung aus der bakteriellen β -Glukosyltransferase von *S. aureus* erhalten wurde. Durch Expression von 19 ORFs von putativen Glykosyltransferasen und des künstlichen Gens

in den Expressionswirten *E. coli*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* konnten 6 neue Glykosyltransferasen über detaillierte Lipidanalysen und Enzymtests beschrieben werden. Diese Annotation der Enzymfunktionen führte zur Charakterisierung folgender neuer Glykosyltransferasen: je eine Gcs aus *A. tumefaciens* und *M. loti*, die beide durch eine breite Substrat-Spezifität bezüglich Zucker-Donator und -Akzeptor sowie durch ihre Prozessivität gekennzeichnet sind. Weiterhin wurden zwei Enzyme aus *D. radiodurans* und *T. maritima* als α GlcD-Synthasen charakterisiert. Zwei weitere Enzyme aus *C. aurantiacus* wurden als β GalD-Synthase und als Diglykosyldiacylglycerol-synthetisierende β -Glukosyltransferase annotiert.

Die ORFs der auf diese Weise charakterisierten sowie die meisten putativen Glykosyltransferasen wurden für die Transformation von Blaualgen und Pflanzen eingesetzt. Da die Versuche bei *P. patens* nicht zum gewünschten Erfolg führten, konzentrierten sich die nachfolgenden Arbeiten auf die Synthese neuer Glykolipide in *Synechococcus* und *A. thaliana*. Dabei ist es zum ersten Mal gelungen, die Galaktolipide in Blaualgen und Chloroplasten gezielt durch andere Glykolipide zu ersetzen.

In *Synechococcus* führte die Expression von drei α GlcD-Synthasen aus *D. radiodurans*, *T. maritima* und *A. laidlawii* jeweils zur Bildung von α GlcD und α GalD sowie zur Reduktion von β GalD. Die cyanobakterielle Expression der β -Glukosyltransferase aus *C. aurantiacus* resultierte in der Synthese von β Glc β GalD bei gleichzeitiger Reduktion des nativen α Gal β GalD.

In *A. thaliana* führte nur die Expression der β -Glukosyltransferase aus *C. aurantiacus* in Form eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen Chloroplasten-Leaderpeptid zu einem veränderten Glykolipidmuster der Chloroplasten. Die Akkumulation des neuen β Glc β GalD ging einher mit der Reduktion des nativen α Gal β GalD. Außerdem ist es gelungen, den Phänotyp der *dgd1*-Zwergmutante von *A. thaliana* durch die Expression dieser β -Glukosyltransferase weitgehend zu komplementieren und eine Wildtyp-ähnliche Pflanzengröße wiederherzustellen.

Die erfolgreiche Darstellung verschiedener Glykolipid-Mutanten von *Synechococcus* und *A. thaliana* ist ein erster Schritt für Untersuchungen zur Erkennung spezifischer Funktionen von Galaktolipiden in Thylakoiden.

5 Literatur

- Abbadi A., Domergue F., Bauer J., Napier J.A., Welti R., Zähringer U., Cirpus P. and Heinz E. (2004)**
Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated Fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. *Plant Cell*. 16: 2734-2748.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990)**
Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215: 403-410.
- An G., Ebert P., Mitra A. and Ha S. (1988)**
Binary vectors. **In** *Plant Molecular Biology Manual*. Edited by Schilperoort R.A. S. A3/1-A3/19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Andersson M.X., Stridh M.H., Larsson K.E., Liljenberg C. and Sandelius A.S. (2003)**
Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett*. 537: 128-132.
- Andrews J. and Mudd J.B. (1985)**
Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts. Pathways and localization. *Plant Physiol*. 79: 259-265.
- Aoki M., Sato N., Meguro A. and Tsuzuki M. (2004)**
Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *Eur J Biochem*. 271: 685-693.
- Awai K., Maréchal E., Block M.A., Brun D., Masuda T., Shimada H., Takamiya K., Ohta H. and Joyard J. (2001)**
Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 10960-10965.
- Bambot S.B. and Russell A.J. (1993)**
Efficient total gene synthesis of 1.35-kb hybrid alpha-lytic protease gene using the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl*. 2: 266-271.
- Bechtold N., Ellis J. and Pelletier G. (1993)**
In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*. 316: 1194-1199.
- Benning C. (1998)**
Membrane Lipids in Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. **In** *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Edited by Murata N. S. 83-101. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Benning C., Huang Z.H. and Gage D.A. (1995)**
Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch Biochem Biophys*. 317: 103-111.
- Benning C., Beatty J.T., Prince R.C. and Somerville C.R. (1993)**
The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 1561-1565.
- Berg S., Edman M., Li L., Wikström M. and Wieslander Å. (2001)**
Sequence properties of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* Membranes. Recognition of a large group of lipid glycosyltransferases in eubacteria and archaea. *J Biol Chem*. 276: 22056-22063.
- Bishop D.G., Sparace S.A. and Mudd J.B. (1985)**
Biosynthesis of Sulfoquinovosyldiacylglycerol in higher plants: The origin of the diacylglycerol moiety. *Arch Biochem Biophys*. 240: 851-858.

Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. and Douce R. (1983)

The acyl-CoA synthetase and the acyl-CoA thioesterase are located respectively on the outer and on the inner membrane of the chloroplast envelope. FEBS Lett. 153: 377-381.

Block M.A., Dorne A.J., Joyard J. and Douce R. (1983)

Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. J Biol Chem. 258: 13281-13286.

Bosio A., Bussow H., Adam J. and Stoffel W. (1998)

Galactosphingolipids and axono-glia interaction in myelin of the central nervous system. Cell Tissue Res. 292: 199-210.

Bradford M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.

Brosius J., Erfle M. and Storella J. (1985)

Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. Effect on its in vivo activity. J Biol Chem. 260: 3539-3541.

Bruce B.D. (1998)

The role of lipids in plastid protein transport. Plant Mol Biol. 38: 223-246.

Bullock W.O., Fernandez J.M. and Short J.M. (1987)

XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-glucosidase selection. Biotechnique. 5: 376-378.

Camara-Artigas A., Brune D. and Allen J.P. (2002)

Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography. Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 11055-11060.

Campbell J.A., Davies G.J., Bulone V.V. and Henrissat B. (1998)

A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. Biochem J. 329 (Pt 3): 719.

Carbonneau M.A., Rebeyrotte N. and Rebeyrotte P. (1984)

Polar lipids from the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: structural investigations on glucosaminyl and N-acetyl glucosaminyl lipids. Biochimie. 66: 319-330.

Cline K. and Keegstra K. (1983)

Galactosyltransferases involved in galactolipid biosynthesis are located in the outer membrane of pea chloroplast envelopes. Plant Physiol. 71: 366-372.

Clough S.J. and Bent A.F. (1998)

Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16: 735-743.

Coutinho P.M. and Henrissat B. (1999)

Life with no sugars? J Mol Microbiol Biotechnol. 1: 307-308.

Cregg J.M. and Madden K.R. (1988)

Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. Developments in Industrial Microbiology. 29: 33-41.

Cregg J.M., Shen S., Johnson M. and Waterham H.R. (1998)

Classical genetic manipulation. Methods Mol Biol. 103: 17-26.

Cullis P.R. and de Kruijff J. (1979)

Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. Biochim Biophys Acta. 559: 399-420.

Curatolo W. (1987)

The physical properties of glycolipids. *Biochim Biophys Acta*. 906: 111-136.

De Amicis F. and Marchetti S. (2000)

Intercodon dinucleotides affect codon choice in plant genes. *Nucleic Acids Res*. 28: 3339-3345.

Dörmann P. and Benning C. (2002)

Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci*. 7: 112-118.

Dörmann P., Balbo I. and Benning C. (1999)

Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science*. 284: 2181-2184.

Dörmann P., Hoffmann-Benning S., Balbo I. and Benning C. (1995)

Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell*. 7: 1801-1810.

Dorne A.J. and Heinz E. (1989)

Position and pairing of fatty acids in phosphatidylglycerol from pea leaf chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci*. 60: 39-46.

Dorne A.J., Block M.A., Joyard J. and Douce R. (1982)

The galactolipid:galactolipid galactosyltransferase is located on the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Lett*. 145: 30-34.

Edman M., Berg S., Storm P., Wikström M., Vikström S., Öhman A. and Wieslander Å. (2003)

Structural features of glycosyltransferases synthesizing major bilayer and nonbilayer-prone membrane lipids in *Acholeplasma laidlawii* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 278: 8420-8428.

Egon A., Brosius J. and Ptashne M. (1983)

Vectors Bearing a Hybrid *trp-lac* Promoter Useful for Regulated Expression of Cloned Genes in *Escherichia coli*. *Gene*. 25: 167-178.

Feige G.B., Heinz E., Wrage K., Cochems N. and Ponzelar E. (1980)

Discovery of a new glyceroglycolipid in blue-green algae and its role in galactolipid synthesis. **In** *Biogenesis and Function of Plant Lipids*. Edited by Douce R. S. 135-140. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam.

Finnegan J. and McElroy D. (1994)

Transgene inactivation: plants fight back! *Bio/Technol*. 12: 883-888.

Frentzen M. (2004)

Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr Opin Plant Biol*. 7: 270-276.

Frentzen M. and Wolter F.P. (1998)

Molecular biology of acyltransferases involved in glycerolipid synthesis. **In** *Plant Lipid Biosynthesis Fundamentals and Agricultural Applications*. Edited by Harwood J.L. S. 247-272. Cambridge University Press, Cambridge.

Frentzen M., Heinz E., McKeon T.A. and Stumpf P.K. (1983)

Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur J Biochem*. 129: 629-636.

Froehlich J.E., Benning C. and Dörmann P. (2001)

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

Fuhrmann M., Oertel W. and Hegemann P. (1999)

A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*. 19: 353-361.

Gaude N. (2001)

Charakterisierung von Galaktolipiden in transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen nach Überexpression bakterieller Glykosyltransferasen. Diplomarbeit, Max Planck Institut für Melokulare Pflanzenphysiologie, Golm.

Gaude N., Tippmann H., Flemetakis E., Katinakis P., Udvardi M. and Dörmann P. (2004)

The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and *Lotus*. J Biol Chem. 279: 34624-34630.

Geerts D., Bovy A., de Vrieze G., Borrias M. and Weisbeek P. (1995)

Inducible expression of heterologous genes targeted to a chromosomal platform in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. Microbiology. 141 (Pt 4): 831-841.

Geiger O., Rohrs V., Weissenmayer B., Finan T.M. and Thomas-Oates J.E. (1999)

The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. Mol Microbiol. 32: 63-73.

Girke T. (1998)

Funktionale Charakterisierung einer neuartigen Desaturase aus *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.

Girke T., Schmidt H., Zähringer U., Reski R. and Heinz E. (1998)

Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. Plant J. 15: 39-48.

Götz T., Windhövel U., Boger P. and Sandmann G. (1999)

Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. Plant Physiol. 120: 599-604.

Gounaris K., Mannoek D.A., Sen A., Brain A.P.R., Williams W.P. and Quinn P.J. (1983)

Polyunsaturated fatty acyl residues of galactolipids are involved in the control of bilayer/non-bilayer lipid transitions in higher plant chloroplasts. Biochim Biophys Acta. 732: 229-242.

Güler S., Seeliger A., Härtel H., Renger G. and Benning C. (1996)

A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. J Biol Chem. 271: 7501-7507.

Härtel H., Dörmann P. and Benning C. (2000)

DGD1-independent biosynthesis of extraplasmidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 10649-10654.

Härtel H., Dörmann P. and Benning C. (2001)

Galactolipids not associated with the photosynthetic apparatus in phosphate-deprived plants. J Photochem Photobiol B. 61: 46-51.

Härtel H., Lokstein H., Dörmann P., Grimm B. and Benning C. (1997)

Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 115: 1175-1184.

Härtel H., Essigmann B., Lokstein H., Hoffmann-Benning S., Peters-Kottig M. and 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: 205-218.

Harwood J.L. (1996)

Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. Biochim Biophys Acta. 1301: 7-56.

Hausmann L. and Toepfer R. (1999)

Entwicklung von Plasmidvektoren. In Vorträge für Pflanzenzüchtung. Bioengineering für Rapsorten nach Maß. Edited by Toepfer R. S. 155-172. Göttingen.

Heemskerk J.W.M., Storz T., Schmidt R.R. and Heinz E. (1990)

Biosynthesis of Digalactosyldiacylglycerol in Plastids from 16:3 and 18:3 Plants. Plant Physiol. 93: 1286-1294.

Heinz E. (1977)

Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. **In** Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants. Edited by Lichtenhaler H.K. S. 102-120. Springer Verlag, Berlin.

Heinz E. (1993)

Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. **In** Lipid Metabolism in Plants. Edited by Moore Jr. T.S. S. 33-90. CRC Press, Boca Raton, FL.

Heinz E. (1996)

Plant Glycolipids: Structure, Isolation and Analysis. **In** Advances in Lipid Methodology - Three. Edited by Christie W.W. S. 211-332. The Oily Press LTD, Dundee.

Heinz E. and Roughan P.G. (1983)

Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 Plants. *Plant Physiol.* 72: 273-279.

Heinz E., Rullkötter J. and Budzikiewicz H. (1974)

Acyl digalactosyl diglyceride from leaf homogenates. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem.* 355: 612-616.

Higgins D.G. and Sharp P.M. (1988)

CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* 73: 237-244.

Hillig I., Leipelt M., Ott C., Zähringer U., Warnecke D. and Heinz E. (2003)

Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 553: 365-369.

Honke K., Hirahara Y., Dupree J., Suzuki K., Popko B., Fukushima K., Fukushima J., Nagasawa T., Yoshida N., Wada Y. and Taniguchi N. (2002)

Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 4227-4232.

Hood E.E., Helmer G.L., Fraley R.T. and Chilton M.D. (1986)

The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol.* 168: 1291-1301.

Hovland P., Flick J., Johnston M. and Sclafani R.A. (1989)

Galactose as a gratuitous inducer of *GAL* gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene.* 83: 57-64.

Huang Y. and Anderson R. (1995)

Glucosyl diglyceride lipid structures in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol.* 177: 2567-2571.

Ichikawa S. and Hirabayashi Y. (1998)

Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 8: 198-202.

Ichikawa S., Sakiyama H., Suzuki G., Hidari K.I. and Hirabayashi Y. (1996)

Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 12654.

Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990)

High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96: 23-28.

Israelachvili J.N. (1992)

Intermolecular and Surface Forces. Academic Press, San Diego.

Israelachvili J.N., Marcelja S. and Horn R.G. (1980)

Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys.* 13: 121-200.

Jahns P., Wehner A., Paulsen W. and Hobe S. (2001)

De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *J Biol Chem.* 276: 22154-22159.

Jarvis P., Dörmann P., Peto C.A., Lutes J., Benning C. and Chory J. (2000)

Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 8175-8179.

Jorasch P. (1999)

Isolierung, Klonierung und biochemische Charakterisierung neuartiger Diacylglycerol-Glycosyltransferasen aus Bakterien und Pflanzen. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.

Jorasch P., Wolter F.P., Zähringer U. and Heinz E. (1998)

A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1,2-diacylglycerol: expression of *ypfP* in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products. Mol Microbiol. 29: 419-430.

Jorasch P., Warnecke D.C., Lindner B., Zähringer U. and Heinz E. (2000)

Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycolipids, glycolipids, glycosphingolipids and glycosylsterols. Eur J Biochem. 267: 3770-3783.

Jordan P., Fromme P., Witt H.T., Klukas O., Saenger W. and Krauss N. (2001)

Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. Nature. 411: 909-917.

Joyard J. and Douce R. (1977)

Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts. Biochim Biophys Acta. 486: 273-285.

Joyard J. and Douce R. (1979)

Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes. FEBS Lett. 102: 147-150.

Joyard J. and Stumpf P.K. (1981)

Synthesis of long-chain acyl-CoA in chloroplast envelope membranes. Plant Physiol. 67: 250-256.

Kanipes M.I., Kalb S.R., Cotter R.J., Hozbor D.F., Lagares A. and Raetz C.R. (2003)

Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortholog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. Role of the lipopolysaccharide core in symbiosis of *Rhizobiaceae* with plants. J Biol Chem. 278: 16365-16371.

Keegstra K. and Cline K. (1999)

Protein import and routing systems of chloroplasts. Plant Cell. 11: 557-570.

Kelly A.A. and Dörmann P. (2002)

DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. J Biol Chem. 277: 1166-1173.

Kelly A.A. and Dörmann P. (2004)

Green light for galactolipid trafficking. Curr Opin Plant Biol. 7: 262-269.

Kelly A.A., Froehlich J.E. and Dörmann P. (2003)

Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. Plant Cell. 15: 2694-2706.

Kenyon C.N. (1972)

Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. J Bacteriol. 109: 827-834.

Kenyon C.N. and Gray A.M. (1974)

Preliminary analysis of lipids and fatty acids of green bacteria and *Chloroflexus aurantiacus*. J Bacteriol. 120: 131-138.

Kenyon C.N., Rippka R. and Stanier R.Y. (1972)

Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. Arch Mikrobiol. 83: 216-236.

Kirchhoff H., Mukherjee U. and Galla H.J. (2002)

Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone. *Biochemistry*. 41: 4872-4882.

Kiriukhin M.Y., Debabov D.V., Shinabarger D.L. and Neuhaus F.C. (2001)

Biosynthesis of the glycolipid anchor in lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* RN4220: role of YpfP, the diglucosyldiacylglycerol synthase. *J Bacteriol*. 183: 3506-3514.

Knudsen E., Jantzen E., Bryn K., Ormerod J.G. and Sirevåg R. (1982)

Quantitative and Structural Characteristics of Lipids in *Chlorobium* and *Chloroflexus*. *Arch Microbiol*. 132: 149-154.

Kobayashi K., Awai K., Takamiya K. and Ohta H. (2004)

Arabidopsis type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol*. 134: 640-648.

Kohyama-Koganeya A., Sasamura T., Oshima E., Suzuki E., Nishihara S., Ueda R. and Hirabayashi Y. (2004)

Drosophila glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors. *J Biol Chem*. 279: 35995-36002.

Kroll D., Meierhoff K., Bechtold N., Kinoshita M., Westphal S., Vothknecht U.C., Soll J. and Westhoff P. (2001)

VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 4238-4242.

Latowski D., Akerlund H.E. and Strzalka K. (2004)

Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry*. 43: 4417-4420.

Leipelt M., Warnecke D., Zähringer U., Ott C., Müller F., Hube B. and Heinz E. (2001)

Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosylsphingolipids in animals, plants, and fungi. *J Biol Chem*. 276: 33621-33629.

Lem N.W. and Stumpf P.K. (1984)

In vitro fatty acid synthesis and complex lipid metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Physiol*. 71: 134-138.

Lind T., Tufaro F., McCormick C., Lindahl U. and Lidholt K. (1998)

The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem*. 273: 26265-26268.

Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., An X. and Chang W. (2004)

Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*. 428: 287-292.

Lohr D., Venkov P. and Zlatanova J. (1995)

Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *Faseb J*. 9: 777-787.

Makewicz A., Radunz A. and Schmid G.H. (1996)

Comparative immunological detection of lipids and carotenoids on peptides of photosystem I from higher plants and cyanobacteria. *Z Naturforsch [C]*. 51: 319-328.

Manca M.C., Nicolaus B., Lanzotti V., Trincone A., Gambacorta A., Peter-Katalinic J., Egge H., Huber R. and Stetter K.O. (1992)

Glycolipids from *Thermotoga maritima*, a hyperthermophilic microorganism belonging to Bacteria domain. *Biochim Biophys Acta*. 1124: 249-252.

Mannock D.A. and McElhaneey R.N. (2004)

Thermotropic and lyotropic phase properties of glycolipid diastereomers: role of headgroup and interfacial interactions in determining phase behaviour. *Curr Opin Coll Interf Sci*. 8: 426-447.

Marks D.L., Dominguez M., Wu K. and Pagano R.E. (2001)

Identification of active site residues in glucosylceramide synthase. A nucleotide-binding catalytic motif conserved with processive beta-glycosyltransferases. *J Biol Chem.* 276: 26492-26498.

Miège C., Maréchal E., Shimojima M., Awai K., Block M.A., Ohta H., Takamiya K., Douce R. and Joyard J. (1999)

Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur J Biochem.* 265: 990-1001.

Miroux B. and Walker J.E. (1996)

Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.* 260: 289-298.

Mongrand S., Cassagne C. and Bessoule J.J. (2000)

Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Physiol.* 122: 845-852.

Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J.P., Hartmann M., Bonneu M., Simon-Plas F., Lessire R. and Bessoule J.J. (2004)

Lipid Rafts in Higher Plant Cells. *J Biol Chem.* 279: 36277-36286.

Morosinotto T., Baronio R. and Bassi R. (2002)

Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle. *J Biol Chem.* 277: 36913-36920.

Murata N. and Siegenthaler P. (1998)

Lipids in Photosynthesis: An Overview. **In** Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Edited by Murata N. S. 1-20. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Murray E.E., Lotzer J. and Eberle M. (1989)

Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498.

Nussberger S., Dörr K., Wang D.N. and Kühlbrandt W. (1993)

Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol.* 234: 347-356.

Ohlrogge J. and Browse J. (1995)

Lipid biosynthesis. *Plant Cell.* 7: 957-970.

Oku M., Warnecke D., Noda T., Müller F., Heinz E., Mukaiyama H., Kato N. and Sakai Y. (2003)

Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. *Embo J.* 22: 3231-3241.

O'Leary W.M. and Wilkinson S.G. (1988)

Gram-positive bacteria. **In** Microbial lipids. Edited by Wilkinson S.G. S. 117-201. Academic Press, London.

Olsen I. and Jantzen E. (2001)

Sphingolipids in bacteria and fungi. *Anaerobe.* 7: 103-112.

Omata T. and Murata J. (1986)

Glucolipid synthesis activities in cytoplasmic and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol.* 27: 485-490.

Orgambide G.G., Philip-Hollingsworth S., Hollingsworth R.I. and Dazzo F.B. (1994)

Flavone-enhanced accumulation and symbiosis-related biological activity of a diglycosyl diacylglycerol membrane glycolipid from *Rhizobium leguminosarum* Biovar trifolii. *J Bacteriol.* 176: 4338-4347.

Páli T., Garab G., Horváth L.I. and Kóta Z. (2003)

Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cell Mol Life Sci.* 60: 1591-1606.

Pedersen L.C., Dong J., Taniguchi F., Kitagawa H., Krahn J.M., Pedersen L.G., Sugahara K. and Negishi M. (2003)

Crystal structure of an alpha 1,4-N-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem.* 278: 14420-14428.

Peng L., Kawagoe Y., Hogan P. and Delmer D. (2002)

Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science.* 295: 59-60.

Pierson B.K. and Castenholz R.W. (1974)

A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Arch Microbiol.* 100: 5-24.

Pinnaduwege P. and Bruce B.D. (1996)

In vitro interaction between a chloroplast transit peptide and chloroplast outer envelope lipids is sequence-specific and lipid class-dependent. *J Biol Chem.* 271: 32907-32915.

Reifarth F., Christen G., Seeliger A.G., Dörmann P., Benning C. and Renger G. (1997)

Modification of the water oxidizing complex in leaves of the *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochemistry.* 36: 11769-11776.

Reinsberg D., Booth P.J., Jegerschold C., Khoo B.J. and Paulsen H. (2000)

Folding, assembly, and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry.* 39: 14305-14313.

Reski R. (1998)

Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses. *Bot Acta.* 111: 1-15.

Reski R. and Abel W.O. (1985)

Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta.* 165: 354-358.

Riekhof W.R., Ruckle M.E., Lydic T.A., Sears B.B. and Benning C. (2003)

The sulfolipids 2'-O-acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol are absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deleted in SQD1. *Plant Physiol.* 133: 864-874.

Rietveld A.G., Koorengevel M. and de Kruijff B. (1995)

Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of *E. coli*. *Embo J.* 14: 5506-5513.

Riggs K.G. and McLachlan A. (1986)

A simplified screening procedure for large number of minipreparation. *Biotechnology.* 4: 310-313.

Rilfors L., Lindblom G., Wieslander Å. and Christiansson A. (1984)

Lipid bilayer stability in biological membranes. In *Membrane Fluidity*. Edited by Manson L.A. S. 205-245. Plenum, New York.

Sakamoto T., Wada H., Nishida I., Ohmori M. and Murata N. (1994)

$\Delta 9$ acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. *J Biol Chem.* 269: 25576-25580.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989)

Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 5463-5467.

Sato N. (1994)

Effect of exogenous glucose on the accumulation of monoglucosyl diacylglycerol in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol Biochem.* 32: 121-126.

Sato N. and Murata N. (1982)

Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. I. Lipid classes. *Biochim Biophys Acta.* 710: 271-278.

- Sato N., Sonoike K., Tsuzuki M. and Kawaguchi A. (1995)**
Impaired photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Eur J Biochem.* 234: 16-23.
- Sato N., Hagio M., Wada H. and Tsuzuki M. (2000)**
Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 10655-10660.
- Saxena I.M., Brown R.M., Jr., Fevre M., Geremia R.A. and Henrissat B. (1995)**
Multidomain Architecture of beta-Glycosyl Transferases: Implications for Mechanism of Action. *J Bacteriol.* 177: 1419-1424.
- Schaefer D.G. (2001)**
Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 143-150.
- Schaefer D.G. and Zrýd J.P. (1997)**
Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 11: 1195-1206.
- Schulte S. and Stoffel W. (1993)**
Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 10265-10269.
- Selstam E. (1998)**
Development of Thylakoid Membranes with Respect to Lipids. **In** *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Edited by Murata N. S. 209-224. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Shevchuk N.A., Bryksin A.V., Nusinovich Y.A., Cabello F.C., Sutherland M. and Ladisch S. (2004)**
Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res.* 32: e19.
- Shimajima M., Ohta H., Iwamatsu A., Masuda T., Shioi Y. and Takamiya K. (1997)**
Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 333-337.
- Shimomura H., Hayashi S., Yokota K., Oguma K. and Hirai Y. (2004)**
Alteration in the composition of cholesteryl glucosides and other lipids in *Helicobacter pylori* undergoing morphological change from spiral to coccoid form. *FEMS Microbiol Lett.* 237: 407-413.
- ShIPLEY G.G., Green J.P. and Nichols B.W. (1973)**
The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochim Biophys Acta.* 311: 531-544.
- Siebertz H.P., Heinz E., Linscheid M., Joyard J. and Douce R. (1979)**
Characterization of lipids from chloroplast envelopes. *Eur J Biochem.* 101: 429-438.
- Siegenthaler P. (1998)**
Molecular Organization of Acyl Lipids in Photosynthetic Membranes of Higher Plants. **In** *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Edited by Murata N. S. 119-144. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Simidjiev I., Stoylova S., Amenitsch H., Javorfi T., Mustardy L., Laggner P., Holzenburg A. and 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: 1473-1476.
- Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G. and Waterhouse P.M. (2000)**
Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature.* 407: 319-320.
- Soll J. and Schleiff E. (2004)**
Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 198-208.

Sperling P., Warnecke D. and Heinz E. (2004)

Plant sphingolipids. In *Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis*. Edited by Daum G. S. 337-381. Springer, Berlin.

Sprong H., Kruijthof B., Leijendekker R., Slot J.W., van Meer G. and van der Sluijs P. (1998)

UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 273: 25880-25888.

Sprong H., Degroote S., Claessens T., van Drunen J., Oorschot V., Westerink B.H., Hirabayashi Y., Klumperman J., van der Sluijs P. and van Meer G. (2001)

Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J Cell Biol*. 155: 369-380.

Stewart A. (1995)

Genetic Nomenclature Guide. *Trends Genet*. 4-23.

Stryer L. (1990)

Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.

Stumpf P.K. (1987)

The biosynthesis of saturated fatty acids. In *The Biochemistry of Plants*. Edited by Stumpf P.K. S. 121-136. Academic Press, Orlando.

Suggs S.V., Hirose T., Miyake T., Kawashima E.H., Johnson M.J., Itakura K. and Wallace R.B. (1981)

Use of synthetic oligodesoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. In *Developmental Biology Using Purified Genes*. Edited by Fox C.F. S. 683-693. Academic Press, New York.

Tadano-Aritomi K. and Ishizuka I. (2003)

Structure and Function of Sulfoglycolipids in the Kidney and Testis. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 15: 15-27.

Tang Y. and Hollingsworth R.I. (1998)

Regulation of lipid synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: low oxygen concentrations trigger phosphatidylinositol biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*. 64: 1963-1966.

Tietje C. and Heinz E. (1998)

UDP-sulfochinosose:diacylglycerol sulfochinososyltransferase activity is concentrated in the inner membrane of chloroplast envelopes. *Planta*. 206: 72-78.

van Besouw A. and Wintermans J.F. (1978)

Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanisms in galactosylation. *Biochim Biophys Acta*. 529: 44-53.

van der Plas J., Hegeman H., de Vrieze G., Tuyl M., Borrias M. and Weisbeek P. (1990)

Genomic integration system based on pBR322 sequences for the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942: transfer of genes encoding plastocyanin and ferredoxin. *Gene*. 95: 39-48.

van 't Hof R., Demel R.A., Keegstra K. and de Kruijff B. (1991)

Lipid-peptide interactions between fragments of the transit peptide of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and chloroplast membrane lipids. *FEBS Lett*. 291: 350-354.

van 't Hof R., van Klompenburg W., Pilon M., Kozubek A., de Korte-Kool G., Demel R.A., Weisbeek P.J. and de Kruijff B. (1993)

The transit sequence mediates the specific interaction of the precursor of ferredoxin with chloroplast envelope membrane lipids. *J Biol Chem*. 268: 4037-4042.

Vaucheret H., Beclin C. and Fagard M. (2001)

Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci*. 114: 3083-3091.

Vikström S., Li L. and Wieslander Å. (2000)

The nonbilayer/bilayer lipid balance in membranes. Regulatory enzyme in *Acholeplasma laidlawii* is stimulated by metabolic phosphates, activator phospholipids, and double-stranded DNA. *J Biol Chem*. 275: 9296-9302.

von Heijne G. and Nishikawa K. (1991)

Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? FEBS Lett. 278: 1-3.

Wada H. and Murata N. (1998)

Membrane Lipids in Cyanobacteria. In Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Edited by Murata N. S. 65-81. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Warnecke D., Erdmann R., Fahl A., Hube B., Müller F., Zank T., Zähringer U. and Heinz E. (1999)

Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. J Biol Chem. 274: 13048-13059.

Whitaker B.D. (1986)

Fatty-acid composition of polar lipids in fruit and leaf chloroplasts of "16:3"- and "18:3"-plant species. Planta. 169: 313-319.

White O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Hickey E.K., Peterson J.D., Dodson R.J., Haft D.H., Gwinn M.L., Nelson W.C., Richardson D.L., Moffat K.S., Qin H., Jiang L., Pamphile W., Crosby M., Shen M., Vamathevan J.J., Lam P., McDonald L., Utterback T., Zalewski C., Makarova K.S., Aravind L., Daly M.J., Fraser C.M. and et al. (1999)

Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. Science. 286: 1571-1577.

Wieslander Å. and Rilfors L. (1977)

Qualitative and quantitative variations of membrane lipid species in *Acholeplasma laidlawii* A. Biochim Biophys Acta. 466: 336-346.

Wikström M., Xie J., Bogdanov M., Mileykovskaya E., Heacock P., Wieslander Å. and Dowhan W. (2004)

Monoglucosyldiacylglycerol, a foreign lipid, can substitute for phosphatidylethanolamine in essential membrane-associated functions in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 279: 10484-10493.

Wilkinson S.G. (1988)

Gram-negative bacteria. In Microbial lipids. Edited by Wilkinson S.G. S. 299-488. Academic Press, London.

Wu K., Marks D.L., Watanabe R., Paul P., Rajan N. and Pagano R.E. (1999)

Histidine-193 of rat glucosylceramide synthase resides in a UDP-glucose- and inhibitor (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropan-1-ol)-binding region: a biochemical and mutational study. Biochem J. 341 (Pt 2): 395-400.

Xu C., Fan J., Riekhof W., Froehlich J.E. and Benning C. (2003)

A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*. Embo J. 22: 2370-2379.

Yamashita T., Wada R., Sasaki T., Deng C., Bierfreund U., Sandhoff K. and Proia R.L. (1999)

A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 9142-9147.

Yanish-Perron C., Vieira J. and Porath J. (1989)

Improved M13 cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33: 103-109.

Yu B. and Benning C. (2003)

Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. Plant J. 36: 762-770.

6 Anhang

Oligonukleotidsequenzen

(Die Teil-Sequenzen zur Synthese des synthetischen Gens sind hier nicht aufgeführt)

Bezeichnung des Oligonukleotids	5'→3'-Sequenz
GH1	CGGGATCCCGCGATGCGGGAGTCTGAGCCT
GH2	GCTCTAGAGCTACCAACCATAAAACAAT
GH13b	ATGGCTCGCCAACATCGTCTTC
GH14b	GTAAGGCAGGCCGATATACAG
GH16	TCTAGAAAACCTCAAACATCGAAGAGT
GH18	GAATTCGGCAGGAGAGAAGCAATTTAT
GH19	CATGCCATGGATTGTTCTGTGGAGTTGGCA
GH20	GCTCTAGAGTATACTTTCCCATTTGGCTGTTGGCTGATG
GH21	CCCAAGCTTGTCAACATGGTGGAGCACGACACT
GH22	CCCAAGCTTCCCGGGTCACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAG
GH23	ATGAGAATTGGTATTTTTTCGGAAGCG
GH24	CTACTTTTTATTCAATTTTTTGTATTTTTATC
GH25	GTAAACATCGACGTCGAGCACATTGCC
GH26	GTAACTGGTGGTAGCATGCTGCT
GH27	ATGAAAGTCGCAATATTTACAG
GH28	CAGCCCATTTGTTTTGTGCC
GH29	ATGGTACTCAAATAAAAAG
GH30	TTATTTAACGAAGAATCTTGC
GH35	CGGGATCCTTTGCAAATGCAAGAGCCAAC
GH36	AAGGCCTGAAAACATAAGAAACCAGAAAGC
GH37	CTAGCTAGCCTTTGCAAATGCAAGAGCC
GH38	AAGGCCTTTCCTGGGTAAAAGGAGATTT
GH47	ATGAGAGTTGGACTTTTTACAG
GH48	TTAGGATTGACCCCATTAGTC
GH49	ATGAACCCTCTGAGAATCGG
GH50	CCTTTCCTGATTCAACATCTG
GH55	ATGAACATAGCGATGTTTCAGC
GH56	TCACCTCCAGATTCTGTCTTC
GH57	ATGATCAAAGTACTTCACATC
GH58	TCAGAGAACATTTCCCTTAATG
GH65f-20	ATGGTCACCCAGAACAAGAAG
GH65r-20	GACAGTGGCCACAGGGATGTTGATGTTGAACTGCTC
GH65f-21	GTTCAACATCAACATCCCTGTGGCCACTGTCATGAC

GH65r-21 GGCCACATAGTACCTCGTCGAGTACGGTGTGATCCAG
GH65f-22 GAACTGGATCACACCGTACTCGACGAGGTAATG
GH65r-22 GGAGACACCAAATGCACCAGCAGACATGAGGATGG
GH65f-23 GCTGGTGCATTTGGTGTCTCCAAGGGATTTGACAC
GH65r-23 GCTATGACCAATGAGATCAAGGAGATCACGGCAG
GH65f-24 CTTGATCTCATTGGTCATAGCTCCCAGCCTCAGGAA
GH69msF GGTACCTGAATTAAGAAGGGAGC
Gh69msR GGGCCTTAACCTATGACATAAAG
GH69maF TTAATTAATGAATTAAGAAGGGAGC
Gh69maR CCCTGGACAGGGATTTTC
GH69Leader-ntF GGGCCCATGATGCAGCATTCTTCTTC
GH69Leader-ntR2 ACCTAGGATAAGCACCTTTTTTCGGAGG
GH69dr1225F ATCCTAGGTATGAACCTCTGAGAATC
GH69dr1225R GGATCCTCACCGGCCATACGCGG
GH69tm0744F ATCCTAGGTATGAACATAGCGATGTTTCAG
GH69tm0744R GGATCCTCACCTCCAGATTCTGTCTC
GH69saysynF ATCCTAGGTATGGTCACCCAGAACAAG
GH69saysynR GGATCCTTACTTGACAAAGAACCCTAG
GH69syn3R TGTACATGTTCTGAACTTGAAGCTGTTG
GH71dr1076F ATCCTAGGTATGGCTCGCCAACATCGTC
GH71dr1076R GGATCCGTAAGGCAGGCCGATATAC
GH74ct1882F ATCCTAGGTATGAAGGTAGCCTTGTATGC
GH74ct1882R GGATCCTCACCGTCTGGCTTTGGCGGC
GH74ct0548F ATCCTAGGTATGTTTTGCAAGGTCATGAAAAT
GH74ct0548R GGATCCCTACTGAGCTTTGCGCTCG
GH74ct0225F ATCCTAGGTATGGCCGCCGAAGCCCTC
GH74ct0225R GGATCCTCACGTGCCTTTTTTTTCGATC
GH74ct0226F ATCCTAGGTATGGCCGCCGCAAGCTTT
GH74ct0226R GGATCCTCATCGTTTTCGCCGCCAC
GH74chlo2029F ATCCTAGGTATGACTAATGCTATGAATCG
GH74chlo2029R GGATCCTTATGATCCCCCAACCGG
GH74chlo2030F ATCCTAGGTATGGGAGATAGATCTATGCC
GH74chlo2030R GGATCCTTAGTCATGGCGGTGACTC
GH74chlo2464F ATCCTAGGTATGTCGATCAGTCAAACGC
GH74chlo2464R GGATCCTCATGCTGAACTCCTCGAT
GH74chlo0149F ATCCTAGGTATGAACGCTACCCATCCAC
GH74chlo0149R GGATCCTCAGGTTGGCCCAAAAATTTTTG
GH74chlo1337F ATCCTAGGTATGCGTATCGCGTTGATTTG
GH74chlo1337R GGATCCTCACCCGCGGCCAGGAAC
GH74chlo1537F ATCCTAGGTATGCGCATCGCTTTTCTTG
GH74chlo1537R GGATCCTCAACCACGTGTGACGGT
GH74chlo1567F ATCCTAGGTATGCGCATTCTCATCCCTTC
GH74chlo1567R GGATCCTTATGGTTGCTTTGACTGGC
GH74chlo1798F ATCCTAGGTATGATTCGTTTTGCAATCGATG
GH74chlo1798R GGATCCTCAGAATCGTCTGATTAACCTG
GH74chlo4056F ATCCTAGGTATGTCTGGGACCTGGCTC

GH74chlo4056R	GGATCCTCAGTTAGTTTGCAGGACAG
Gh75syn3F	CCATGGTCCTAGGTATGGTCACCC
GH75nptIIF	GGATCCCACGCTGCCGCAAGCACT
GH75nptIIR	AAGCTTAACCCCAGAGTCCCGCTC
MCS1-F	GATCTGGTACCCCGGGCCTTAATTAAG
MCS1-R	CTTAATTAAGGCCCGGGTACCA
MCS2-F	AGATCTAGCTAGCTGGGCCCAAAGGCCTTTATCCTAGGTTTA
MCS2-R	ACCATGGACTAGTCGGATCCGTACGTATAAACCTAGGATAAAG
CH6	TTTCCATGGATTGTTCTGTGGAGTTG
CH7	TTTGGATCCCTAAATAAGCCCTCTG
Agro1	ATGGGAGTGGAAGTGGCCAGCATG
Agro2	TTATTCCGCAGGCGGACCCGCCAG
Meso1	ATGGAAGTCACTCTCATAGCCGCC
Meso2	TCAGGCGCGCGACGACGCCTCTTC
AgroN	CCATGGGAGTGGAAGTGGCCAGCA
AgroB	GGATCCTTATTCCGCAGGCGGACC
AGROK	GGTACCGGAATCAGTTGACCGGTG
AGROE	GATATCTCCCAAGCTTTCGGCGGT
AGRO2N	GCGGCCGCTGGCTCGCAGGGCCGC
AGRO2S	GAGCTCTTATTCCGCAGGCGGACC
STA	GATATCGTGGTTACTCAAAATAAA
STAS	CCCGGGTATTTAACGAAGAATCT
STREPS	CCCGGGTATGCGCTCACGCAACTG
STREP_N	GCGGCCGCATTATTTGCCGACTAC
12F	CGTCAAACCGTTACCAAGATG
12R	TATGACCGTTACCGAATGAGC
13F	AAGAGATTTATGGAAAGGTTCC
13R	TCAGCTTCCGGCGTAACTC
14F	CGAATTCCATGGAATCGATTG
14R	ACAACATCGATTTGCCCTGTG
15F	GAGAACCTGCGTGCAATCC
15R	ACTGACTTCAGGTGAGAGTC
16R	TATCAGGACATAGCGTTGGC

Polynukleotidsequenz des synthetischen Gens (Version 3)

(Die unterstrichene Base führt zu einem Aminosäureaustausch)

ATGGTCACCCAGAACAAGAAGATCCTCATCATCACTGGCTCCTTTGGCAATGGTCCACATGCAGGTCAC
 CCAGTCCATTGTCAACCAGCTCAATGACATGAACTTGGACCATCTCTCTGTCAATTGAGCATGATCTCT
 TCATGGAGGCTCATCCCATCCTCACCTCCATCTGCAAGAAGTGGTACATCAACAGCTTCAAGTGCCTTC
 AGGAACATGTACAAGGGCTTCTACTACTCCAGGCCGGACAAGCTGGACAAGTGCTTCTACAAGTACTA
 TGGGCTCAACAAGCTCATCAACCTCCTCATCAAGGAGAAGCCGGATCTCATCCTCCTCACCTTCCCGA
 CACCTGTCATGTCTGTCCTCACTGAGCAGTTCAACATCAACATCCCTGTGGCCACTGTCATGACTGAC
 TACAGGCTCCACAAGAAGTGGATCACACCGTACTCGACGAGGTACTATGTGGCCACCAAGGAGACGAA
 GCAGGACTTCATTGATGTGGGAATTGATCCCTCCACTGTCAAGGTCACTGGAATCCCAATTGACAACA
 AGTTTGAGACACCGATCAACCAGAAGCAGTGGCTCATTGACAACAAGTGGACCCGGACAAGCAGACC
 ATCCTCATGTCTGCTGGTGCATTTGGTGTCTCCAAGGGATTTGACACGATGATCACTGACATCCTTGC
 CAAGTCTGCCAATGCTCAGGTGGTCAATGATCTGTGGCAAGTCCAAGGAGTTGAAGAGGTCCCTCACTG
 CCAAGTTCAGCTCACCAGGATGTACCTCATCCTTGGTTACACCAAGCACATGAATGAGTGGATGGCT
 AGCTCCAGCTCATGATCACCAAGCCAGGTGGAATCACCATCACTGAGGGCTTTGCCAGGTGCATTCC
 CATGATCTTCTCAACCCTGCTCCAGGTGAGGAGCTTGAGAAATGCTTTCTACTTTGAGGAGAAGGGCT
 TTGGCAAGATTGCTGACACTCCTGAGGAGGCCATCAAGATTGTGGCTTCCCTCACCAATGGCAATGAG
 CAGCTCACGAACATGATCAGCACGATGGAGCAGGACAAGATCAAGTACGCTACCCAGACCATCTGCCG
 TGATCTCCTTGATCTCATTGGTCAATAGCTCCAGCCTCAGGAAATCTATGGCAAGGTGCCCTTGTATG
 CTAGGTTCTTTGTCAAGTAA

Polynukleotidsequenz des ORFs dr1225

amplifiziert aus genomischer DNA von *D. radiodurans* – mit Abweichungen zur entsprechenden Sequenz in GenBank.

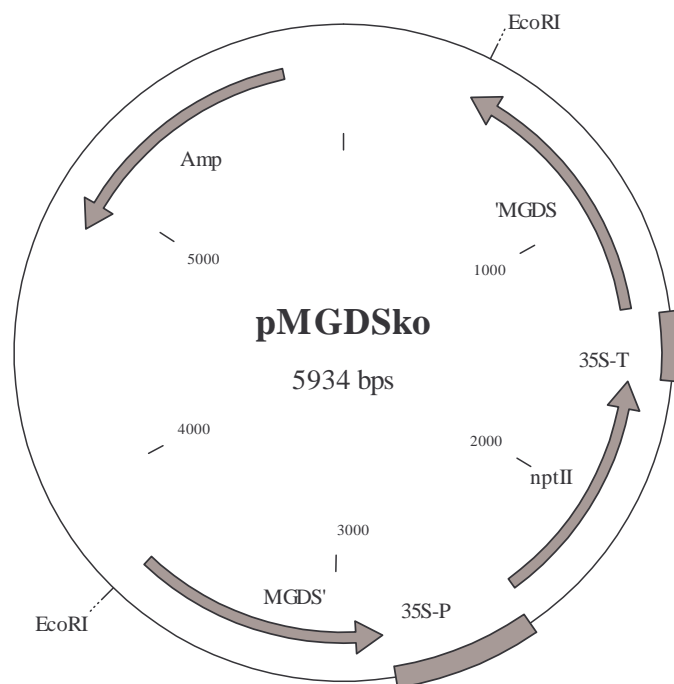
ATGAACCCTCTGAGAATCGGCCTGTTTACCGACACCTTCTCCCCGACCAGAACGGCATCGTGACCAG
 CGTCTGCCTGCTGAGCGACGAGCTTCGCGCCCTGGGACACCGGGTGGATGTGGTTCGCCCCGAGTTTC
 CCGAGCATCTCGACCCGCGCGCCGACGTGCGCCGGGTGGCGAGCGTGCCTTATCCGCTGCTGCCGACC
 TACCGGCTGGCGTGGCCACCCGCAAGTCTTTCGAGCAGCGCTACGACGTGGTCCACACCCACACGCC
 GCTGACTCTGGGCCTGGCCGGGGCGCGGCTGGCCCGCAAGTGGCGGGTGCCGCACGTGGCGACCTACC
 ACACCCATCTGGAGGCCTACACCCACTACGTGCCAGGCATGACGCAGCTCAACCGCGCCGTTCACTTC
 ATGCCAGAGTCGTCGGGCGGCTCTACGGCGAGGCCGACGCCGTATCACGCCGACGGCGGGCACCCCT
 GGACACGCTGCGGCAGGCCGGAATCGAGGACGCCGTGGTGAATCCCACCAGCATCGACCCGGCGGTCC
 TGGAAGCCGCTCCGCCATCGCCGACCCCTGGCCCTCCGGCACGCGCCGGCTGCTCACGGTGGGGCGG
 CTGGCCCGGAAAAGCGCTTCGATCTGGTGTCTGACGCGCTCGCGCAGCTTCCGGCGCCACCTCGT
 GATGCTGGGAGAAGGCCGGAACGTGCCACCTCGAGGACCACGCCGAGCGGCTGGGGGTCTCGGGGC
 GCGTCACCTTCGTGGGTGTGCGGCCCTGGACCGAAATCGGGGCGTACTACCGCCTCGCCGAGCTGTTT
 GTCTTCGCCTCGGACACCGAGACGCAGGGGCTGGTGTCTGCAAGAAGCGCAACTCATGGGTGTGCCGGT
 GGTGCGGTGGGCGCCCGGGCACCCCTGACCGGCGTGCAGAGCGGCTACAGCGGCTATCTGGTGCCTC
 CCGGCGACGTGGCCGGGCTGGTGGGGCGGTGCTGGAGCTGCTGAGCAGTCCCGCCGAGCACCAGCGT
 TTTTCCGGCAGGCCCGCAATTCGGGGGACGGACCACGCCCGCGGGGTGGCGCGGCAGGTGCTGGC
 GGTGTACGCCCGGGTGTGGGCCGGTCCGACCTTACTCTGCCGGGTCTGGTCCAGGGGGCGGCGGAGG
 AAGGCGATCATCCCCGAAATACCCCGCGTATGGCCGGTGA

Transformationskonstrukte

Stellvertretend für die zahlreichen Konstrukte zur Transformation von *A. tumefaciens*, *P. patens*, *Synechococcus* und *A. thaliana* wurde jeweils ein entsprechendes Konstrukt ausgewählt. Der Unterschied zwischen diesen und den nicht gezeigten Plasmiden besteht nur in der Verwendung unterschiedlicher ORFs. Die Konstrukte zur Transformation von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *P. pastoris* sind nicht aufgeführt, ebenso wenig alle Konstrukte zur Subklonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten.

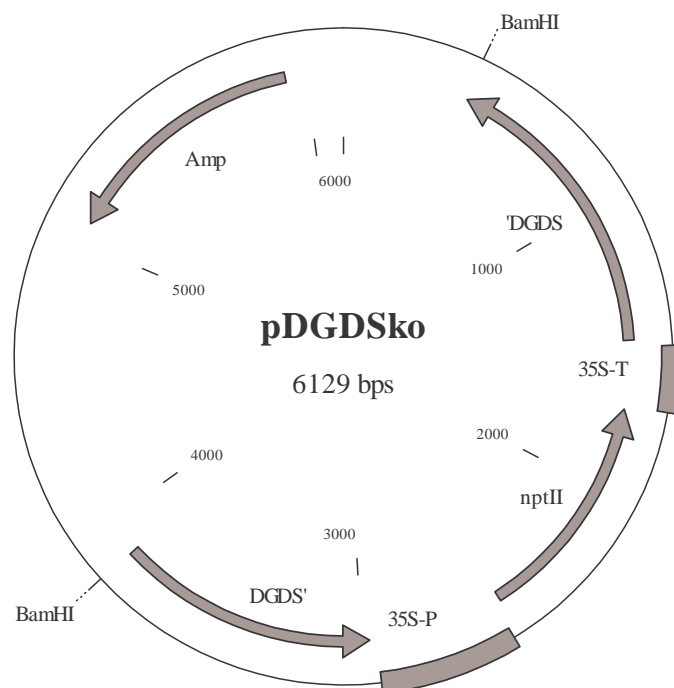
Konstrukt : pMGDSkozur Deletion der β GalD-Synthase in *P. patens*

Merkmale	Beschreibung
'MGDS	5'-Fragment der β GalD-Synthase aus <i>P. patens</i>
35S-T	35S-Terminator
nptII	Kanamycin-Resistenz
35S-P	35S-Promotor
MGDS'	3'-Fragment der β GalD-Synthase aus <i>P. patens</i>
Amp	Ampicillin-Resistenz



Konstrukt : pDGDSkozur Deletion der putativen α Gal β GalD-Synthase in *P. patens*

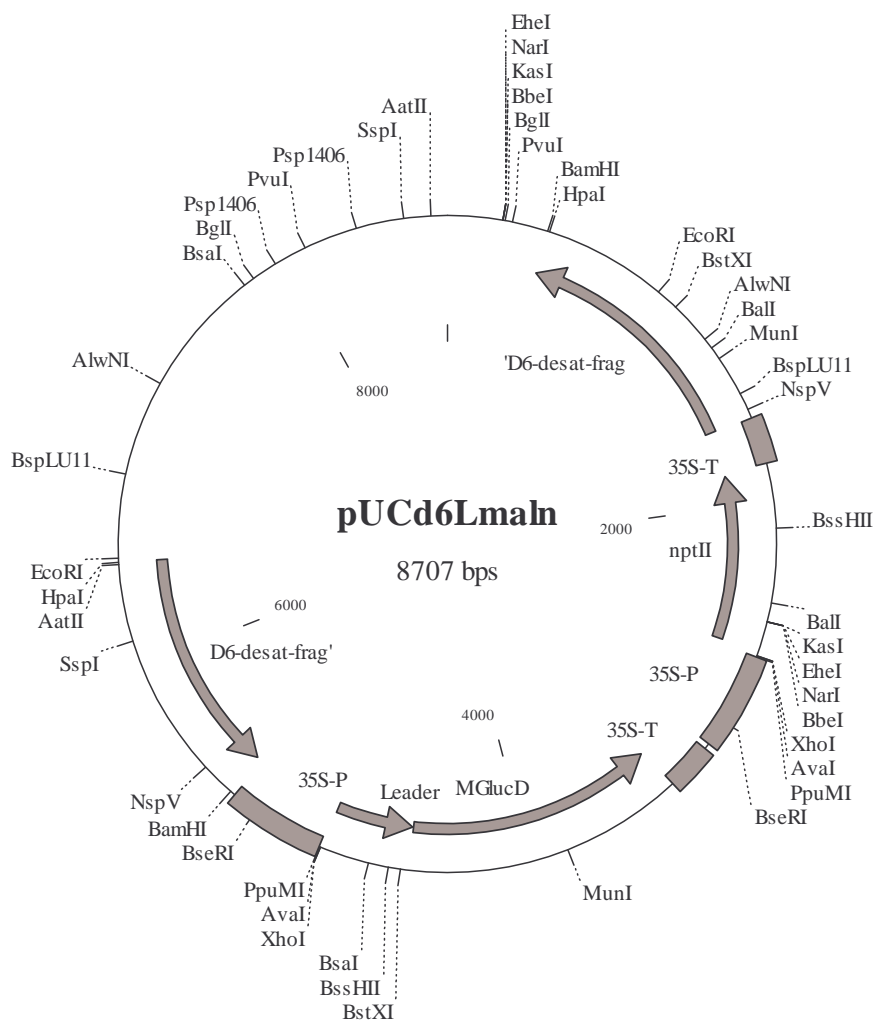
Merkmale	Beschreibung
'DGDS	5'-Fragment der putativen α Gal β GalD-Synthase aus <i>P. patens</i>
35S-T	35S-Terminator
nptII	Kanamycin-Resistenz
35S-P	35S-Promotor
DGDS'	3'-Fragment der putativen α Gal β GalD-Synthase aus <i>P. patens</i>
Amp	Ampicillin-Resistenz



Konstrukt : pUCd6Lmaln

zur Expression der α GlcD-Synthase aus *A. laidlawii* als Fusionsprodukt mit einer Chloroplasten-Leadersequenz in *P. patens* mit der $\Delta 6$ -Desaturase als Insertionsplattform

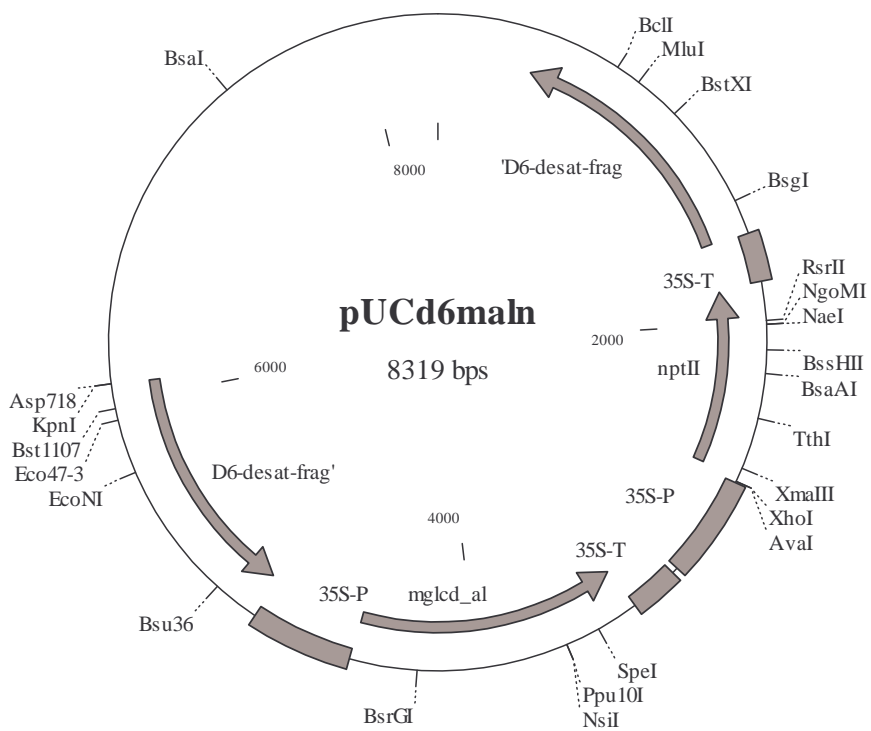
Merkmale	Beschreibung
'D6-desat-frag	5'-Fragment der $\Delta 6$ -Desaturase aus <i>P. patens</i>
35S-T	35S-Terminator
nptII	Kanamycin-Resistenz
MGlucD	α GlcD-Synthase aus <i>A. laidlawii</i>
Leader	Chloroplasten-Leadersequenz
D6-desat-frag'	3'-Fragment der $\Delta 6$ -Desaturase aus <i>P. patens</i>



Konstrukt : pUCd6maln

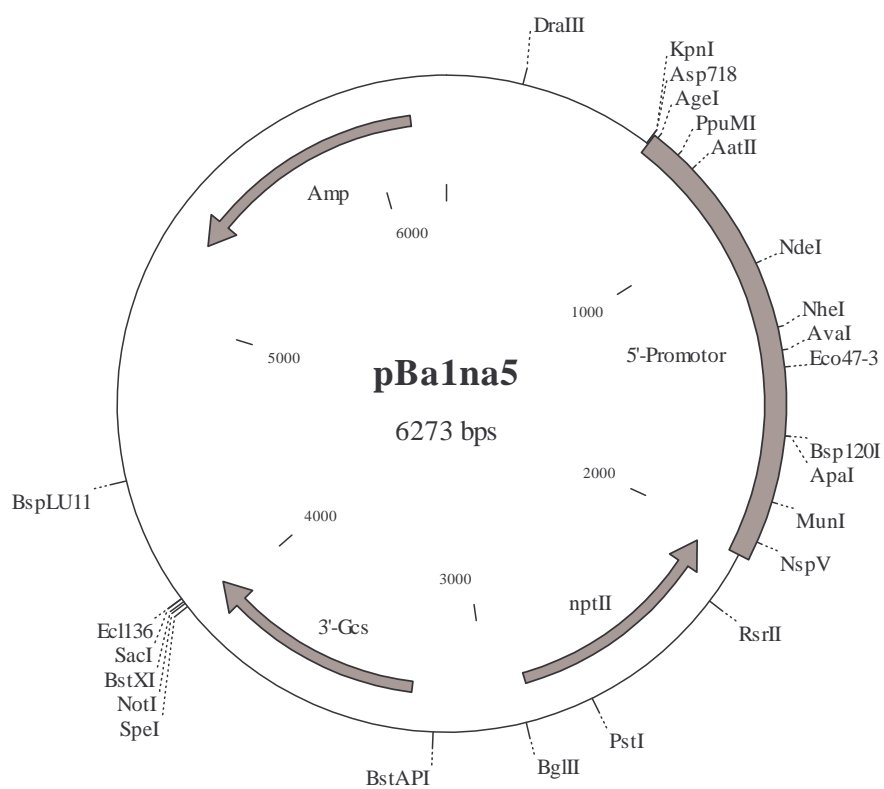
zur Expression der α GlcD-Synthase aus *A. laidlawii* in *P. patens* mit der $\Delta 6$ -Desaturase als Insertionsplattform

Merkmale	Beschreibung
'D6-desat-frag	5'-Fragment der $\Delta 6$ -Desaturase aus <i>P. patens</i>
35S-T	35S-Terminator
nptII	Kanamycin-Resistenz
mgldc_al	α GlcD-Synthase aus <i>A. laidlawii</i>
D6-desat-frag'	3'-Fragment der $\Delta 6$ -Desaturase aus <i>P. patens</i>



Konstrukt : pBa1na5zur Deletion der Gcs in *A. tumefaciens*

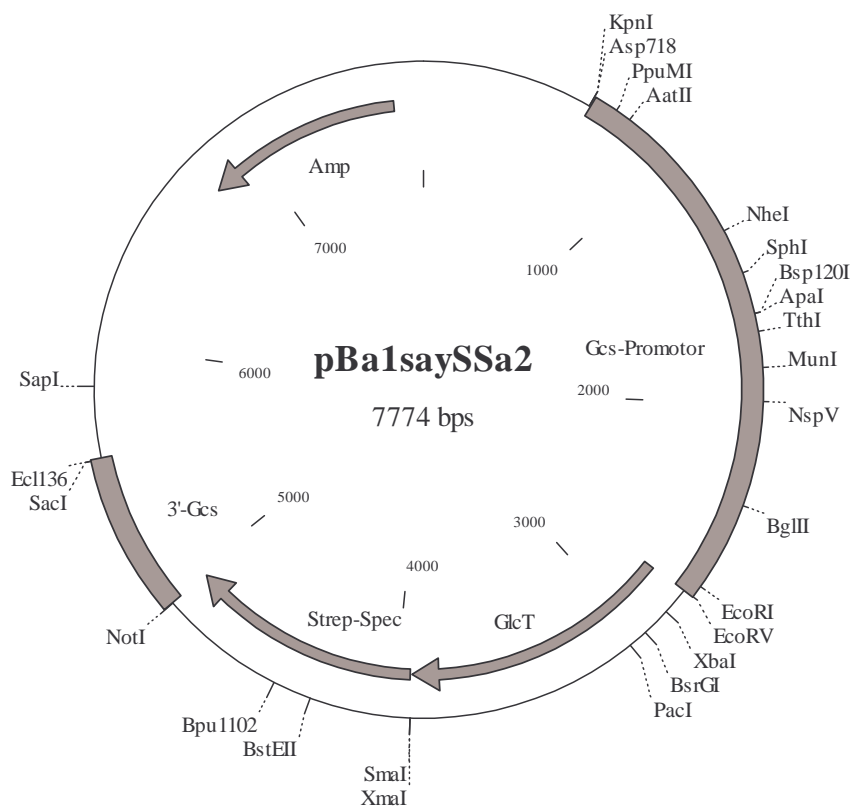
Merkmale	Beschreibung
5'-Promotor	5'-Bereich des Gcs-Promotors als linker flankierender Bereich
nptII	Kanamycin-Resistenz
3'-Gcs	3'-Bereich des Gcs-ORF als rechter flankierender Bereich
Amp	Ampicillin-Resistenz



Konstrukt : pBa1saySSa2

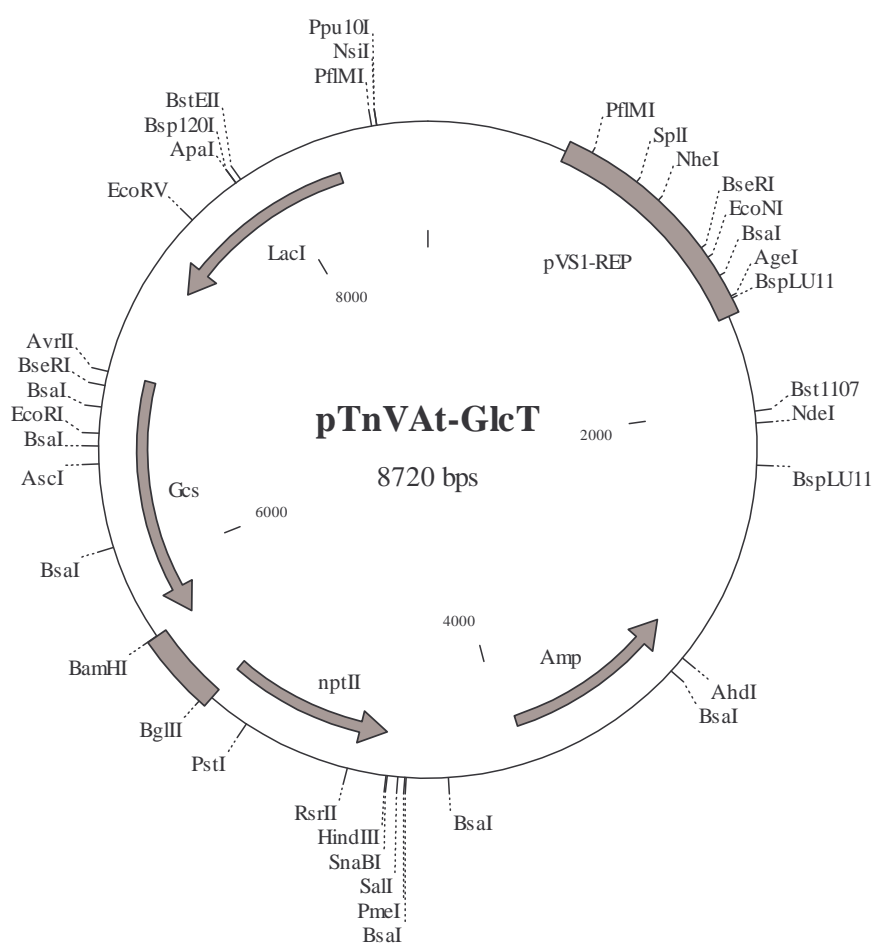
zur Expression der β Glukosyltransferase aus *S. aureus* als Reporter-Gen unter dem nativen *gcs*-Promotor in *A. tumefaciens*

Merkmale	Beschreibung
Gcs-Promotor	5'-Bereich des Gcs-Promotors als linker flankierender Bereich
GlcT	β Glukosyltransferase aus <i>S. aureus</i> als Reporter-Gen
Strep-Spec	Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz
3'-Gcs	3'-Bereich des Gcs-ORF als rechter flankierender Bereich
Amp	Ampicillin-Resistenz



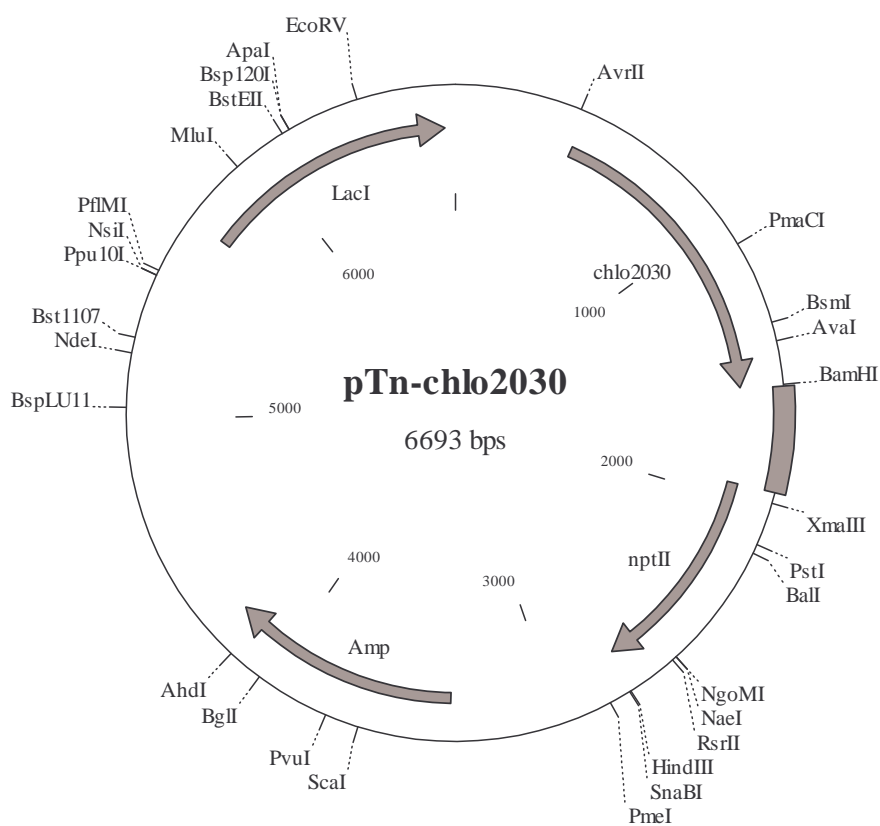
Konstrukt : pTnVAt-GlcTzur Überexpression der Gcs in *A. tumefaciens*

Merkmale	Beschreibung
pVS1-REP	Replikationsursprung zur Etablierung des Plasmids in <i>A. tumefaciens</i>
Amp	Ampicillin-Resistenz
nptII	Kanamycin-Resistenz
Gcs	Gcs aus <i>A. tumefaciens</i>
LacI	<i>LaqI^l</i> -Gen zur Synthese des Repressors



Konstrukt : pTnchlo2030zur Expression der β -Glukosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus* in *Synechococcus*

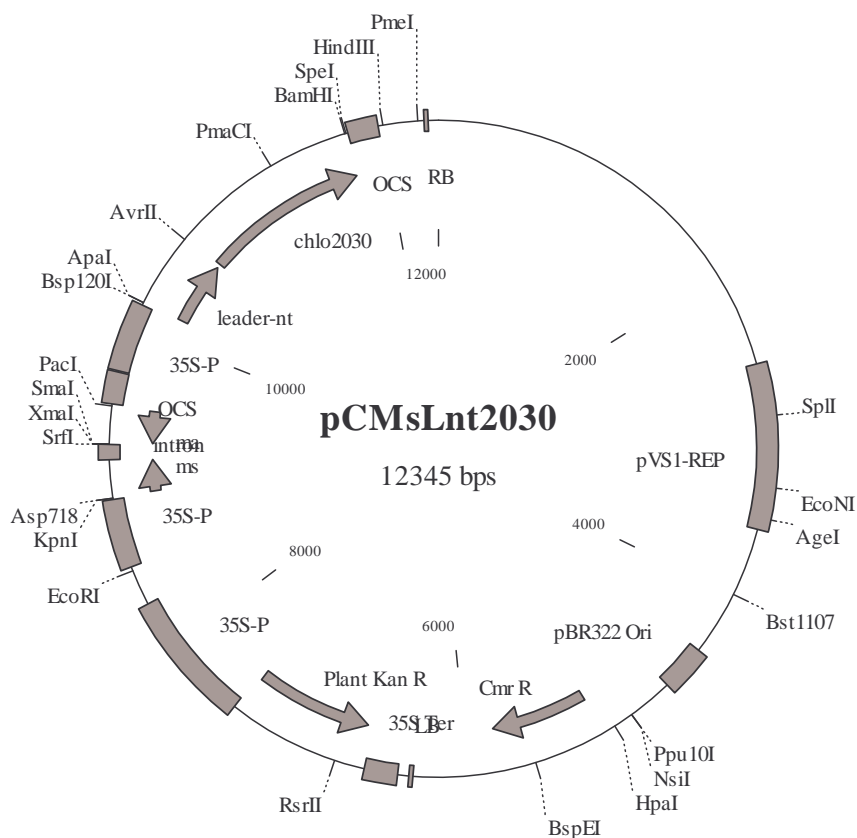
Merkmale	Beschreibung
chlo2030	β -Glukosyltransferase chlo2030 aus <i>C. aurantiacus</i>
Amp	Ampicillin-Resistenz
nptII	Kanamycin-Resistenz
LacI	<i>LaqI^q</i> -Gen zur Synthese des Repressors



Konstrukt : pCMsLnt2030

zur Transformation von *A. thaliana* mit Kassetten zur Gen-Inaktivierung von MGD1 und zur Expression der β -Glukosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus* als Fusionsprotein mit einem Chloroplasten-Leaderpeptid

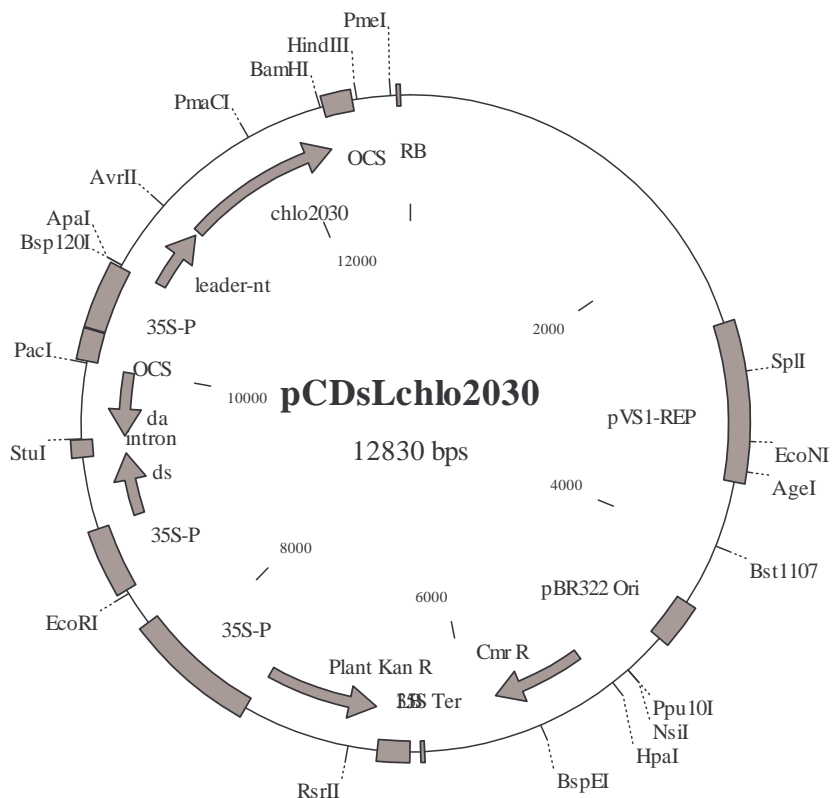
Merkmale	Beschreibung	Merkmale	Beschreibung
pVS1-REP	Replikationsursprung für <i>A. tumefaciens</i>	Cmr R	Chloramphenicol-Resistenz für Bakterien
pBR322 Ori	Replikationsursprung für <i>E. coli</i>	35S Prom	35S-Promotor
35S Ter	35S-Terminator	OCS	OCS-Terminator
Plant Kan R	Kanamycin-Resistenz für Pflanzen	ms	sense-Fragment von MGD1
LB	Left Border	intron	Intron
RB	Right Border	ma	antisense-Fragment von MGD1
leader-nt	Chloroplasten-Leadersequenz	chlo2030	β -Glukosyltransferase chlo2030 aus <i>C. aurantiacus</i>



Konstrukt : pDMsLnt2030

zur Transformation von *A. thaliana* mit Kassetten zur Gen-Inaktivierung von DGD1 und zur Expression der β -Glukosyltransferase chlo2030 aus *C. aurantiacus* als Fusionsprotein mit einem Chloroplasten-Leaderpeptid

Merkmale	Beschreibung	Merkmale	Beschreibung
pVS1-REP	Replikationsursprung für <i>A. tumefaciens</i>	Cmr R	Chloramphenicol-Resistenz für Bakterien
pBR322 Ori	Replikationsursprung für <i>E. coli</i>	35S Prom	35S-Promotor
35S Ter	35S-Terminator	OCS	OCS-Terminator
Plant Kan R	Kanamycin-Resistenz für Pflanzen	ds	sense-Fragment von DGD1
LB	Left Border	intron	Intron
RB	Right Border	da	antisense-Fragment von DGD1
leader-nt	Chloroplasten-Leadersequenz	chlo2030	β -Glukosyltransferase chlo2030 aus <i>C. aurantiacus</i>



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 2000 bis Dezember 2004 im Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Heinz durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Heinz für die interessante Themenstellung und die Ermöglichung dieser Arbeit. Seine vielen Anregungen und Vorschläge haben wesentlich für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Dr. D. Warnecke bedanke ich mich ganz besonders für die intensive Betreuung. Seine Ideen und Vorschläge sowie seine Diskussionsbereitschaft waren stets sehr hilfreich für die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Zähringer (Forschungszentrum Borstel) bedanke ich mich für die Strukturaufklärung der in dieser Arbeit gereinigten Lipide.

Bei Herrn Prof. Dr. K. O. Stetter und Herrn Dr. Reinhard Rachel (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg) bedanke ich mich für den freundlicherweise zur Verfügung gestellten Mikroorganismus *D. radiodurans* bzw. die Bereitstellung von genomischer DNA aus *T. maritima*.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. S. Bergström (Universität Umeå) und Herrn Prof. Å. Wieslander (Universität Stockholm) für die Überlassung eines Klons der α GalD-Synthase aus *B. burgdorferi* bzw. der α GlcD-Synthase aus *A. laidlawii*.

Für die Transformation von *P. patens* bedanke ich mich bei Herrn Dr. H. Holtorf und Herrn Prof. Dr. R. Reski (Albert-Ludwigs Universität Freiburg).

Bei Frau W. Hellmeyer bedanke ich mich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Isolierung und Reinigung von Lipiden und für die Herstellung von FAME und deren Analyse über GLC. Mein Dank gilt auch Frau G. Bräcker für die Durchführung der Southern-Blot-Analysen.

Schließlich bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und das kollegiale und freundschaftliche Arbeitsklima.