

**Die Funktion der putativen alkalischen Ceramidase ACER1 innerhalb
des Sphingolipidstoffwechsels in *Arabidopsis thaliana***

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

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von
Carolin Markus geb. Hohn

Bonn, im Juli 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Dörmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber

Tag der Promotion: 13.10.2015

Erscheinungsjahr:2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Lipide	1
1.1.1	Sphingolipide	2
1.1.1.1	Struktur der Sphingolipide in Pflanzen.....	3
1.1.1.2	Biosynthese der Sphingolipide in Pflanzen	5
1.1.1.3	Funktionen der einzelnen Pflanzensphingolipidklassen	6
1.1.1.4	Funktion der Ceramidase	7
1.2	Zielsetzung.....	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Geräte.....	10
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3	Chemikalien	11
2.1.4	Lipide	12
2.1.5	Enzyme und Kits	12
2.1.6	Primer	12
2.1.7	Vektoren	14
2.1.8	Bakterien-, Hefe- und Insektenstämme	14
2.1.9	Pflanzenmaterial.....	15
2.1.10	Medien, Puffer und Lösungen	15
2.1.11	Antibiotika	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Allgemeine molekularbiologische Arbeiten	18
2.2.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
2.2.1.2	Sequenzierungen und Sequenzanalysen	18
2.2.1.3	Klonierungsstrategien	19
2.2.1.4	Analyse von DNA mithilfe von Restriktionsenzymen	20
2.2.1.5	DNA Agarose-Gelelektrophorese	20
2.2.1.6	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....	20
2.2.1.7	Isolierung von RNA aus Pflanzen mit TRIzol, cDNA Synthese und semiquantitative RT-PCR.....	21
2.2.1.10	Anfertigung von Dauerkulturen von Bakterien und Hefen	21
2.2.2	Methoden beim Arbeiten mit Arabidopsis.....	22

2.2.2.1 Anzucht.....	22
2.2.2.2 Transformation durch floral dipping	22
2.2.2.3 Isolation genomischer DNA aus Arabidopsisblättern.....	22
2.2.2.4 Identifizierung von T-DNA Insertionslinien	23
(Genotypisierung).....	23
2.2.2.5 Kreuzung.....	23
2.2.2.6 Mikrosomenpräparation aus Blättern.....	23
2.2.3 Methoden beim Arbeiten mit <i>N. benthamiana</i>	24
2.2.3.1 Anzucht.....	24
2.2.3.2 Transformation.....	24
2.2.3.3 Mikrosomenpräparation	24
2.2.4 Methoden beim Arbeiten mit <i>E. coli</i>	24
2.2.4.1 Anzucht.....	24
2.2.4.2 Transformation.....	25
2.2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	25
2.2.9.2 Expression von heterologem Protein mit pET22b(+)	26
2.2.5 Methoden beim Arbeiten mit <i>P. pastoris</i>	26
2.2.5.1 Anzucht.....	26
2.2.5.2 Transformation.....	26
2.2.5.3 Induktion der heterologen Genexpression in <i>P. pastoris</i>	27
2.2.5.4 Mikrosomenpräparation	28
2.2.6 Methoden beim Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.6.1 Anzucht.....	28
2.2.7.2 Transformation.....	28
2.2.7.3 Mikrosomenpräparation aus Hefen	29
2.2.8 Methoden beim Arbeiten mit <i>S. frugiperda</i>	29
2.2.8.1 Zellkultur von <i>S. frugiperda</i>	29
2.2.8.2 Anfertigung von Dauerkulturen	30
2.2.8.3 Induktion der heterologen Expression von ACER1 in <i>S. frugiperda</i>	30
2.2.8.4 Mikrosomenpräparation aus <i>S. frugiperda</i>	30
2.2.9 Biochemische Methoden.....	31
2.2.9.1 BCA-Test	31
2.2.9.2 SDS-PAGE und Western Blot	31
2.2.9.2 Ceramidase-Enzymtest.....	31
2.2.9.3 Alexander-Färbung von Pollen	32

2.2.9.6	Extraktion von Sphingolipiden aus Pflanzen	32
2.2.9.7	Extraktion von Lipiden aus Hefen.....	33
2.2.9.8	Reinigung von Lipiden durch Festphasentrennung (SPE).....	34
2.2.9.9	Bedingungen und Auswertung der LC-MS/MS.....	34
2.2.9.9	Bedingungen und Auswertung und der Direktinfusion MS/MS.....	35
2.2.9.5	Datenanalyse	36
2.2.10	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Arabidopsis	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Sequenzanalysen	37
3.2	Ceramidase-Enzymtests mit ACER1 in heterologen Systemen	38
3.2.1	Heterologe Expression von ACER1 in <i>E. coli</i>	38
3.2.1.2	Expression mit pQE-80L.....	39
3.2.1.2	Expression mit pET22-b(+)......	39
3.2.3	Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	41
3.2.3.1	Fütterungstest in <i>S. cerevisiae</i>	42
3.2.4	Quantifizierung von Ceramid in <i>S. cerevisiae</i> mittels Q-TOF Direkt-Infusion MS/MS.....	43
3.2.5	Ceramidase-Enzymtests mit Proteinextrakten aus <i>P. pastoris</i>	44
3.2.6	Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus <i>N. benthamiana</i>	45
3.2.7	Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus <i>S. frugiperda</i>	46
3.3	Ergebnisse von Arbeiten mit Arabidopsis	49
3.3.1	Expressionsanalyse von <i>ACER1</i> in verschiedenen Geweben.....	49
3.3.2	Isolation der T-DNA Insertionslinien <i>acer1-1</i> und <i>acer1-2</i>	49
3.3.3	Analyse der T-DNA Insertionslinien <i>acer1-1</i> und <i>acer1-2</i>	50
3.3.3.1	Pollenvitalitätstest.....	51
3.3.3.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	52
3.3.3.3	Samenanalyse.....	52
3.3.4	Komplementation der T-DNA Insertionslinie <i>acer1-1</i>	55
3.3.5	Überexpression von <i>ACER1</i> in Arabidopsis unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors.....	57
3.3.6	Silencing von <i>ACER1</i> mittels RNAi-(RNA Interferenz-)Expression.....	57
3.3.7	Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus Arabidopsisblättern	59
3.3.8	Quantifizierung von Ceramid und Glukosylceramid in Arabidopsisblättern.....	60
3.3.8.1	Ceramid	61
3.3.8.2	Glukosylceramid	63
4	Diskussion.....	65
4.1	Expression von ACER1 beeinflusst die Pollen- und Pflanzenentwicklung.....	65

4.2	ACER1 spielt eine Rolle in der Pflanzenentwicklung	67
4.3	Unterschiedliche Expressionslevel von ACER1 beeinflussen den Glukosylceramidgehalt ...	68
4.4	Heterologe Expressionen von <i>ACER1</i> deuten auf eine reverse Ceramidase-Aktivität hin....	70
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis.....	77

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BCA	Bicinchoninsäure, bicinchonic acid
BSA	Albumin von Rinderserum, bovine serum albumin
cDNA	Komplementäre DNA, complementary DNA
Cer	Ceramid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, ethylenediamintetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	Fettsäure, fatty acid
FW	Frischgewicht, fresh weight
GC	Gaschromatographie
GlcCer	Glukosylceramid
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LCB	Langkettige Base, long chain base
LCFA	Langkettige Fettsäure, long chain fatty acid
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
OD ₆₀₀	Optische Dichte einer Probe bei einer Wellenlänge von 600
ORF	Offener Leserahmen, open reading frame
P	Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
Q-TOF	Quadrupol-Flugzeit, quadrupole time-of-flight
RNA	Ribonukleinsäure, ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SM	Sphingomyelin
SPE	Festphasentrennung, solid phase extraction
T-DNA	Transfer DNA
Tab.	Tabelle
ÜN	Übernacht
v/v	Volumen pro Volumen
VLCFA	Sehr langkettige Fettsäure, very long chain fatty acid
w/v	Masse pro Volumen, weight per volume
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
YNB	Stickstoffgrundlage für Hefen, yeast nitrogen base

Hinweis zu Abkürzung von Lipidnamen

Fettsäuren werden X:Y abgekürzt, wobei X für die Anzahl der Kohlenstoffatome und Y für die Anzahl der Doppelbindungen steht.

Sphingolipide werden dX:Y-x:y oder tX:Y-x:y abgekürzt, wobei X für die Anzahl der Kohlenstoffatome und Y für die Anzahl der Doppelbindungen in der langkettigen Base steht und x und y für die Anzahl der Kohlenstoffatome bzw. für die Anzahl der Doppelbindungen in der Fettsäure. Die Buchstaben d und t stehen für die Anzahl der Hydroxy-Gruppen (d, 2; t, 3) in der langkettigen Base.

1 Einleitung

1.1 Lipide

Was sind Proteine? Es sind aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle. Diese Frage ist leicht zu beantworten. Fragt man allerdings: ‚Was sind Lipide?‘ so ist die Antwort nicht so klar definiert. Der Begriff Lipide ist eine Sammelbezeichnung für Moleküle, die sich in ihrer Struktur stark unterscheiden können. Allerdings haben sie eine Eigenschaft gemein: sie sind aufgrund ihrer geringen Polarität löslich in lipophilen Lösemitteln. Unter den Begriff Lipide fallen daher viele Stoffe, deren Grundbausteine die Fettsäuren sind, aber auch viele Pigmente und Sekundärmetabolite, die nicht mit der Fettsäuresynthese in Verbindung stehen. Durch die zelluläre Kompartimentierung der Lipide ist ihr Metabolismus in Eukaryoten, insbesondere in Pflanzen, komplexer als in Prokaryoten, auch wenn die meisten grundlegenden Reaktionen wie die Fettsäurebiosynthese in allen Organismen vorkommen. Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die vielfältigen Aufgaben der Lipide in Pflanzen.

Tabelle 1-1: Funktionen von Lipidmolekülen in höheren Pflanzen (nach Buchanan, Grissem, Jones „Biochemistry & Molecular Biology Of Plants“)

Funktion	Lipide
Membranstrukturkomponenten	Glycerolipide, Sphingolipide, Sterole
Speicherstoffe	Triacylglycerole, Wachse
Stoffe, die in Elektronentransferreaktionen aktiv sind	Chlorophyll sowie andere Pigmente, Ubiquinon, Plastoquinone
Photoprotektion	Carotinoide
Membrenschutz gegen freie Radikale	Tocopherole
Wasserabdichtung und Oberflächenschutz	LCFA und VLCFA und deren Derivate (Kutin, Suberin, Wachse), Triterpene
<u>Proteinmodifikationen:</u>	
Acylierung (von Membranankern)	vor allem 14:0 und 16:0 Fettsäuren
Prenylierung (von Membranankern)	Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphate
anderer Membranankerkomponenten	Phosphatidylinositol, Ceramide
Glykosylierung	Dolichol
<u>Signaling:</u>	
Intern	Abcisinsäure, Gibbereline, Brassinosteroide, 18:3 Fettsäurevorstufe von Jasmonaten, Inositolphosphate, Diacylglycerole, Sphingolipide
Extern	Jasmonate, volatile Insektenlockstoffe
Abwehr- und Antifeeding-Komponenten	Latex und Harzkomponenten

Obwohl den Lipiden eine Vielzahl an Funktionen zukommt, ist ihr Anteil in der Gesamtmasse der Pflanze sehr gering. In Abbildung 1-1 ist die Zusammensetzung eines Arabidopsisblattes

dargestellt. Den größten Anteil an der Gesamtmasse (Trockengewicht) machen die Kohlenhydrate mit 58,7 % aus, gefolgt von den Proteinen mit 19,4 %. Nach Mineralien mit 9 % und sonstigen Bestandteilen mit 7 % folgen die Lipide, die nur 5,9 % der Blattmasse ausmachen. Hauptbestandteil der Lipide in einem Arabidopsisblatt sind die Glycerolipide mit 56,4 %, sie sind essentielle Membranbestandteile (z.B. Phospholipide und Glykolipide) und Energiespeicher (Triacylglycerole) des Blattes. Die zweithäufigsten Lipide in Arabidopsisblättern sind die Chlorophylle mit 25,9 %, Pigmente, welche für die Photosynthese benötigt werden. Die Kutinmonomere der Kutikula dienen als Schutzschicht gegen biotische und abiotische Stresse und machen 6,3 % der Blattlipide aus. Sphingolipide machen mit 1,3 % nur einen sehr geringen Teil der Blattlipide aus.

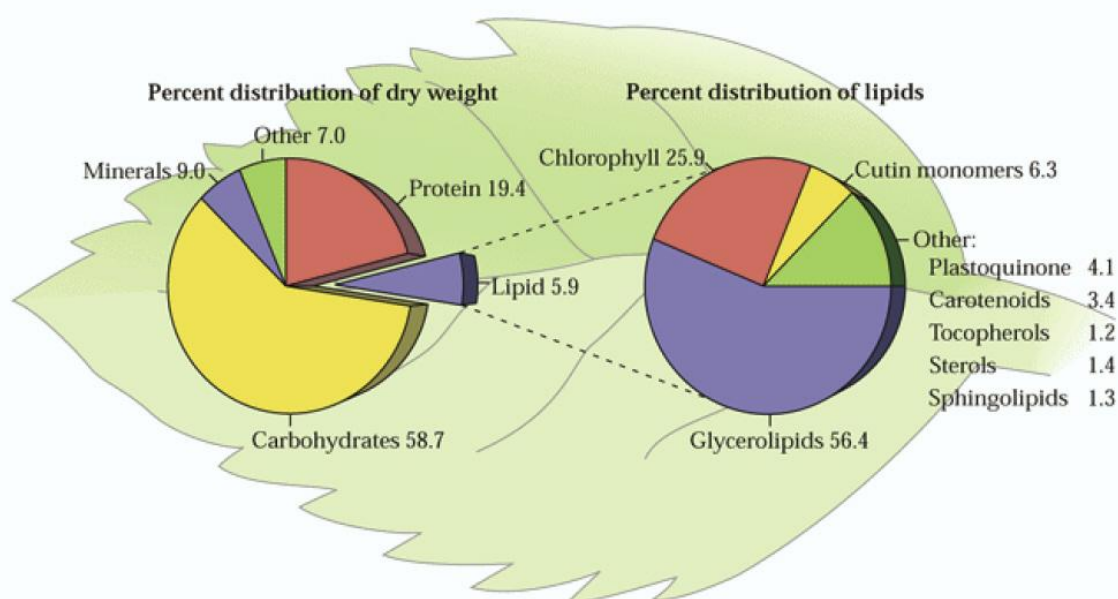


Abbildung 1-1: Verteilung der Zellbestandteile und Lipidklassen eines Arabidopsisblattes. Die Zellbestandteile sind relativ zum Trockengewicht dargestellt. Die Lipide sind relativ zum Gesamtlipidgehalt dargestellt. (Aus Buchanan, Grissem, Jones „Biochemistry & Molecular Biology of Plants“)

1.1.1 Sphingolipide

Wie in Abbildung 1-1 gezeigt sind von den Lipiden in einem Arabidopsisblatt nur 1,3 % den Sphingolipiden zugeordnet. Durch ihren geringen Anteil und auf Grund ihrer dabei hohen Komplexität sind Sphingolipide eine oft unbeachtete Lipidklasse. Erst im letzten Jahrzehnt hat man ihnen in Tieren und Hefen, aber auch in der Pflanzenwelt größere Aufmerksamkeit geschenkt. Dies geschah nicht zuletzt durch eine an Leistungskraft stetig zunehmende Analytik. Dabei wurden Sphingolipide schon im Jahr 1884 von dem deutschen Mediziner J. L. W. Thudichum erstmals durch fraktionierte Kristallisation aus menschlichem Gehirn isoliert (Thudichum, 1884). Aufgrund ihrer für ihn rätselhaften Eigenschaften benannte er sie nach der Sphinx aus der griechischen Mythologie. Bis vor wenigen Jahren waren sie vor allem als strukturgebende Bestandteile von Zellmembranen

bekannt, wo sie bei Pflanzen bis zu 26 % der Lipide ausmachen. Mittlerweile werden ihnen auch andere Funktionen zugeschrieben z.B. in der Zellproliferation, im Signalling und in der gametophytischen und sporophytischen Zellviabilität.

1.1.1.1 Struktur der Sphingolipide in Pflanzen

Sphingolipide sind nicht mit einem Glycerol verestert sind. Der Grundbaustein, aus dem die komplexen Sphingolipide aufgebaut sind, ist Ceramid. Ceramid besteht aus einer langkettigen Base (Englisch long-chain base, LCB), die über eine Amidbindung mit einer langkettigen Fettsäure (Englisch fatty acid, FA) verbunden ist.

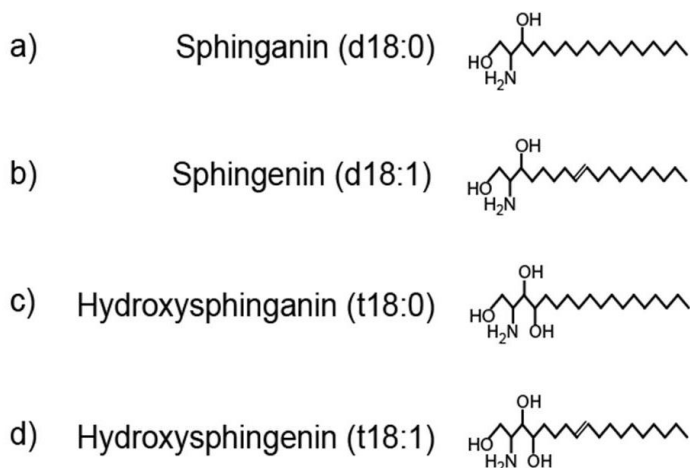


Abbildung 1-2: Strukturen der häufigsten LCBs in Arabidopsis mit Namen und Kurzschrift-Kennzeichnung nach Lynch und Dunn, 2004.

Die LCB besteht vorwiegend aus 18 Kohlenstoffatomen und ist charakterisiert durch eine Hydroxygruppe am C1 und C3 Atom sowie eine Aminogruppe am C2 Atom (siehe Abb. 1-2). Diese nicht weiter modifizierte LCB wird Sphinganin (Dihydrosphingosin) genannt (Abb. 1-2 a) und wird d18:0 abgekürzt, da es eine gesättigte LCB mit 18 Kohlenstoffatomen und zwei Hydroxygruppen ist. Bei Sphingenin (Abb. 1-2 b) befindet sich am achten Kohlenstoffatom eine Doppelbindung, es wird daher d18:1 abgekürzt. In Pflanzen befindet sich die Doppelbindung meistens in der $\Delta 8$ -trans Position, im Gegensatz zu Säugetieren (Sphingosin, $\Delta 4$ -trans). Hydroxysphinganin (Phytosphingosin, t18:0) ist dagegen eine gesättigte LCB, die eine zusätzliche Hydroxygruppe am vierten Kohlenstoffatom besitzt (Abb. 1-2 c). Hydroxysphingenin (t18:1) ist die ungesättigte Form von Hydroxysphinganin, die Doppelbindung befindet sich wie bei d18:1 am achten Kohlenstoffatom (Abb. 1-2 d). Um ein Ceramid zu bilden, wird die Aminogruppe der LCB mit einer langkettigen Fettsäure acyliert.

Die Fettsäuren der Sphingolipide werden wie an folgenden Beispielen benannt:

18:0 : gesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen

h16:1 : einfach ungesättigte, einfach hydroxylierte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen

Die Kettenlänge der Fettsäure variiert dabei zwischen C16 und C28, wobei zu erwähnen ist, dass auch ungerade Kettenlängen vorhanden sind (Lynch und Dunn 2004, König et al. 2012). Die Fettsäure besitzt normalerweise eine Hydroxygruppe am C2 Atom (α Position) und zusätzlich kann eine Doppelbindung an der ω -9 Position vorhanden sein (Imai et al. 2000).

Diese N-acyl-LCB ist das Rückgrat der Sphingolipide und daher der Grundbaustein für die Synthese von komplexen Sphingolipiden (Abb. 1-3). Ungefähr 90 % der Sphingolipide in Pflanzen gehören zu diesen komplexen Sphingolipiden und besitzen eine polare Kopfgruppe, die mit dem C1 Atom der LCB verbunden ist. Diese polare Kopfgruppe in Verbindung mit dem unpolaren Ceramid macht die amphipatischen Eigenschaften der komplexen Sphingolipide aus (Markham und Jaworski 2007, Markham et al. 2006)

Die Sphingolipide der Pflanzen werden oft in vier Gruppen unterteilt: Glykosylinositolphosphorylceramide (GIPC), Glukosylceramide (GlcCer), Ceramide (Cer) und freie langkettige Basen (Englisch long-chain bases, LCBs). Sie alle werden im Sphingolipidstoffwechsel synthetisiert bzw. ineinander umgewandelt.

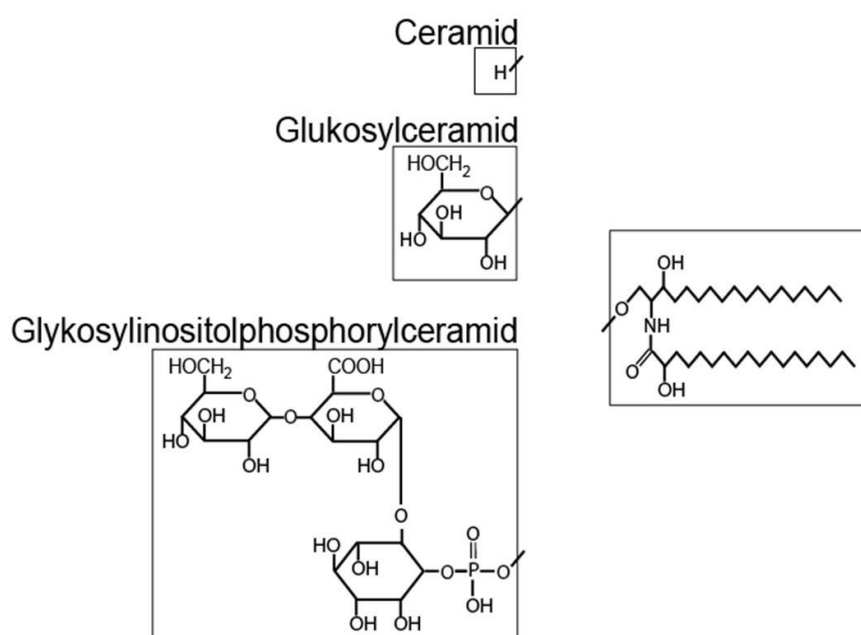


Abbildung 1-3: Molekulare Strukturen von Pflanzensphingolipiden (modifiziert nach Pata et al. 2010)

1.1.1.2 Biosynthese der Sphingolipide in Pflanzen

In den letzten Jahren wird der Stoffwechselweg der Sphingolipide immer detaillierter aufgeklärt. Dieser Stoffwechselweg in Pflanzen ist schematisch in Abbildung 1-4 dargestellt.

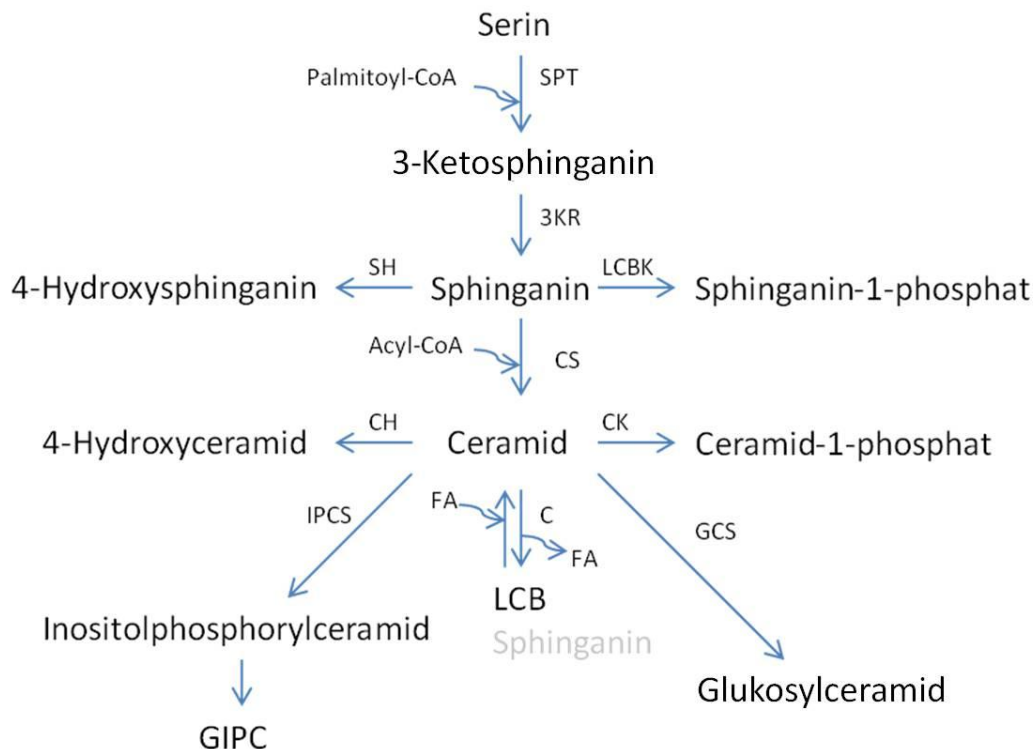


Abbildung 1-4: Der Sphingolipid-Stoffwechsel in Pflanzen (modifiziert nach Lynch und Dunn, 2004). 3KR: Ketosphinganimreduktase, C: Ceramidase, CH: Ceramidhydroxylase, CK: Ceramidkinase, CS: Ceramidsynthase, FA: Fettsäure, GCS: Glukosylceramidsynthase, IPCS: Inositolphosphorylceramidsynthase, LCB: langkettige Base, LCBK: langkettige Base-Kinase, SH: Sphinganimhydroxylase, SPT: Serinpalmitoyltransferase.

Die erste Reaktion der Sphingolipidbiosynthese ist die Kondensation von Serin mit Palmitoyl-CoA durch die Serinpalmitoyltransferase (SPT). Das dadurch entstandene 3-Ketosphinganim wird durch die 3-Ketosphinganimreduktase (3KR) sofort in die LCB Sphinganim umgewandelt. Es kann nun durch die Sphinganimhydroxylase (SH) in 4-Hydroxysphinganine umgewandelt werden (Wright et al 2003; Chen et al. 2008) oder durch eine LCB-Kinase (LCBK) kann Sphinganim-1-phosphat entstehen. Um Ceramide und komplexe Sphingolipide zu synthetisieren, wird Sphinganim durch die Ceramidsynthase (CS) unter Verwendung von Acyl-CoA in Ceramid umgewandelt. Ist Ceramid gebildet, kann das C4-Atom durch eine Ceramidhydroxylase (CH) hydroxyliert werden. Das Ceramid kann auch durch die Ceramidkinase (CK) zu Ceramidphosphaten modifiziert werden (Liang et al. 2003). Wenn das Ceramid nicht als Baustein für komplexe Sphingolipide dient, kann es durch die Aktivität einer Ceramidase (C) in seine LCB und FA hydrolysiert werden.

Ceramide können auch auf einem Acyl-CoA unabhängigen Weg gebildet werden. Dies geschieht durch die Acylierung der Aminogruppe einer LCB mit einer freien FA (Merill, 2002; Spassieva und Hille, 2003; Sperling und Heinz, 2003, Lynch und Dunn, 2004). Diese Reaktion wird

durch die reverse Aktivität einer Ceramidase katalysiert (siehe Abbildung 1-5). Außerdem können Ceramide von komplexeren Sphingolipiden freigesetzt werden (Reaktion in Abbildung 1-4 nicht dargestellt).

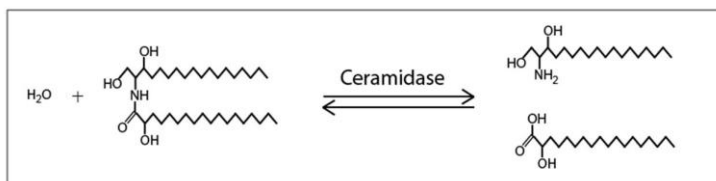


Abbildung 1-5: Die Reaktion der Ceramidase, beispielhafte Darstellung mit dem Molekül d18:0-h18:0

Zur Bildung von Glukosylceramiden (GlcCer), welche ca. 30 % der Sphingolipide in Arabidopsisblättern ausmachen (Markham und Jaworski, 2007, Markham et al. 2006), wird durch die Glukosylceramidsynthase (GCS) ein Glukoserest an ein Ceramid angehängt. Generell wird angenommen, dass Glukosylceramide im endoplasmatischen Retikulum oder in der Plasmamembran synthetisiert werden (Bromley et al. 2003, Hillig et al. 2003).

Die Synthese von Inositolphosphorylceramid wird durch die IPC-Synthase (IPCS) im Golgi Apparat katalysiert (Wang et al. 2008). Durch eine Glykosylierung entsteht die zweite komplexe Sphingolipidstoffklasse, die Glykosylinositolphosphorylceramide (GIPC).

Während GIPC vorwiegend aus 4-Hydroxy-LCB bestehen, die mit VLCFA (Englisch very long chain fatty acids, sehr langkettige Fettsäuren) verknüpft sind, werden GlcCer vor allem aus nicht hydroxylierten LCBs und Palmitinsäure synthetisiert. Dies ist ein Hinweis auf eine Gabelung des Stoffwechselwegs während der Ceramidsynthese (Sullard et al. 2007; Markham und Jaworski, 2007).

1.1.1.3 Funktionen der einzelnen Pflanzensphingolipidklassen

Die Glykosylinositolphosphorylceramide (GIPC) sind eine Hauptform von komplexen Sphingolipiden in Pflanzen und Pilzen, aber sie kommen nicht in Tierzellen vor (Obeid et al. 2002, Warnecke und Heinz, 2003, Worrall et al. 2003) und es wird angenommen, dass sie in der Plasmamembran lokalisiert sind (Lynch und Dunn, 2004; Worrall et al. 2003, Sperling et al. 2005). Es sind sehr polare anionische Sphingolipide, welche sowohl als GPI Anker in Membrandomänen oder *Lipid Rafts* (Englisch für Lipidflöße) als auch in den frühen Entwicklungsstufen einer Symbiose eine Rolle spielen (Bhat und Panstruga, 2005, Borner et al. 2005).

Während GIPC also nur in Organismen vorkommen, die eine Zellwand bilden, kommen Glukosylceramide (GlcCer) in den meisten eukaryotischen Organismen und in einigen Bakterien vor (Warnecke und Heinz, 2003). Sie dienen der Membranstabilität, der Membranpermeabilität und der Pathogenese, sowie der *Chilling/Freezing*-Toleranz (Cahoon und Lynch, 1991, Imai et al. 1995, Lynch und Stepokus, 1987) und Trockenstress-Toleranz (Warnecke und Heinz, 2003).

Ceramide (Cers) sind durch ihr zehnfach geringeres natürliches Vorkommen in Pflanzen im Vergleich zu den GlcCer und GIPC am schlechtesten dokumentiert. Liang et al. zeigte 2003, dass Ceramid in Pflanzen programmierten Zelltod induzieren kann, während der Zelltod durch Ceramid-1-phosphat abgedämpft werden kann. Townley et al. zeigte 2005, dass die synthetischen C2- und C6-Ceramide sowie natürlich vorkommende Ceramide mit einer Hydroxyfettsäure zu vermehrtem programmierten Zelltod in Arabidopsis führten.

Die vierte Klasse der Pflanzensphingolipide stellen die LCBs dar. Diese können auch phosphoryliert sein. Sie sind potentielle Mediatoren von zellulären Reaktionen (Ng et al. 2001, Coursol et al. 2003, 2005, Xiong et al. 2008). Ein erhöhter Gehalt an LCB beeinflusst den programmierten Zelltod (PCD) in Pflanzen, während Sphingosin-1-phosphat *pro survival*-Aktivität aufweist und Ceramid-induzierte Apoptose unterdrückt.

Aus diesen Funktionen lässt sich schließen, dass die dynamische Balance der zellulären Konzentration der Sphingolipide das Zellschicksal reguliert.

1.1.1.4 Funktion der Ceramidase

Das Wissen über die Funktion von Ceramidasen stammt hauptsächlich von Arbeiten mit Tierzellen und Hefen (Mao et al. 200a,b, Mao und Obeid, 2008). Ceramidasen werden in Tierzellen als die Hauptregulatoren der Ceramid-induzierten Apoptose angesehen (Choi et al. 2003, Hannun und Obeid, 2008). Sie sind Schlüsselenzyme, die in der Regulation von Ceramid und 4-Sphingenin (Sphingosin, das tierische Δ^4 -trans Isomer von Sphingenin) und daher auch von Sphingosin-1-phosphat (S1P) involviert sind. Es wurde gezeigt, dass diese drei Sphingolipidmetabolite wichtige bioaktive Mediatoren von Zellprozessen wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Überleben sind (Spiegel und Milstien, 2003, Hannun und Obeid, 2008, Mao und Obeid, 2008).

Ceramidasen hydrolysieren die N-Acyl-Bindung zwischen der LCB und der FA eines Ceramids. In vielen Organismen wurden bereits Ceramidasen charakterisiert. Sie variieren in ihrer subzellulären Lokalisation, ihrer Substratspezifität und ihrem pH-Optimum. Generell werden Ceramidasen nach ihrem pH-Optimum unterteilt. Das bedeutet, dass es saure, neutrale und alkalische Ceramidaseklassen gibt. In Tabelle 1-2 sind einige Ceramidasen aufgelistet, die bereits identifiziert und deren pH-Optimum bestimmt wurde. Da sie die Verfügbarkeit von Ceramid und LCBs durch ihre Enzymaktivität regulieren, werden sie als Schlüsselmodulatoren von zellulären Prozessen und Signalling bezeichnet (El Bawab et al. 2002, Tani et al. 2005, Mao und Obeid, 2008). Im Vergleich zu der Situation in Tieren und Hefe ist im Pflanzenreich die Funktion der Ceramidasen noch nicht so weit erforscht.

Tabelle 1-2: Ceramidasen verschiedener Organismen und deren pH-Optimum

Organismus	pH-Optimum	Quelle
Mensch	4,5	Okino et al. 2003
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	Tada et al. 2009
Reis	5,5	Pata et al. 2008
Mensch	7,5	Galadari et al. 2006
Rattengehirn	7,5	Thayyullathil et al. 2011
Rattengehirn	8	El Bawab et al. 1999
Maus	8	Mao et al. 2003
Drosophila	8	Yang et al. 2010
Mensch	8,5	El Bawab et al. 2000
Mensch	8,5	Sun et al. 2010
Mensch	9	Mao et al. 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	Okino und Ito, 1998
Hefe	9,5	Mao et al. 2000a
Hefe	10	Mao et al. 2000b

Pata et. al identifizierte und charakterisierte 2008 die erste pflanzliche Ceramidase (Pata et al. 2008). Er analysierte das Gen Os01g43520 in Reis (*Oryza sativa*) und identifizierte es als eine neutrale Ceramidase. Die Sequenzanalysen zeigten zudem, dass es im Pflanzenreich keine Proteine gibt, die eine Sequenzähnlichkeit zu sauren Ceramidasen aufweisen.

1.2 Zielsetzung

Die Ceramidase katalysiert die Hydrolyse von Ceramid (Cer) in die langkettige Base (LCB) und die freie Fettsäure (FA). Bisherige Untersuchungen zu diesem Enzym beschränken sich überwiegend auf Mikroorganismen und Tiere. Im Genom von Arabidopsis konnten vier Ceramidasegene durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Ceramidasen anderer Organismen identifiziert werden. Dabei zeigen drei Gene Sequenzähnlichkeit zu neutralen Ceramidasen und ein Gen ähnelt den bereits identifizierten alkalischen Ceramidasen. In dieser Arbeit soll die Funktion dieser potentiell alkalischen Ceramidasen in Arabidopsis untersucht werden. Ceramidasen wird eine wichtige Rolle im Sphingolipidstoffwechsel zugesprochen.

Zur Realisierung dieses Projekts soll anhand von T-DNA Insertionslinien die Funktion der einzelnen Gene untersucht werden. Eine veränderte Expressionsrate soll mit Überexpressions- und *Silencing*konstrukten hervorgerufen und die transgenen Linien charakterisiert werden. Zur weiteren Untersuchung der Genfunktion sollen die Proteine in verschiedenen heterologen Systemen (u.a. *N. benthamiana*) exprimiert werden. Diese Experimente sollen Aufschluss darüber geben, in welcher Weise die Funktion der Gene den Sphingolipidstoffwechsel beeinflusst. Eventuelle Veränderungen der Fertilität sollen durch eine reziproke Kreuzung und Untersuchungen der Pollen sowie der Schoten festgestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

6530 Accurate-mass quadrupole time-of-flight (Q-TOF) LC/MS	Agilent, Böblingen (D)
Autoklav	Tuttnauer Systec, Kirchseeon-Buch (D)
Binokulares Mikroskop SZX16	Olympus, Hamburg (D)
Fluoreszenz-Illuminator X-Cite120Q	EXFO, Ontario (CA)
Heizblock	Bioer, Hangzhou (CHN)
Homogenisierer Precellys 24	PeQlab, Erlangen (D)
Inkubationsschüttler Multitron 28570	INFORS, Einsbach (D)
Inkubator Kelvitron T	Thermo Scientific Heraeus, Waltham (USA)
Kamera D700	Nikon, (J)
Kamera DP72 für Mikroskope	Olympus, Hamburg (D)
Laufkammer für Gelelektrophorese	Cti, Idstein (D)
Lichtmikroskop BH-2	Olympus, Hamburg (D)
Micro Pulser Electroporator	Bio-Rad, München (D)
Photometer Specord 205	Analytik Jena, Jena (D)
Probenkonzentrator	Techne (Bibby Scientific), Stone (UK)
Schwingmühle MM400	Retsch, Haan (D)
Spektrophotometer Nanodrop 1000	PeQlab, Erlangen (D)
Sterilbank Modell 1.8	Holten Lamin Air, Allerød (DK)
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen (D)
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Vortexer Genie 2V	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waage LabStyle 204	Mettler Toledo, Gießen (D)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge 5430R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg (D)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1 mm Elektroporationsküvette	PeQlab, Erlangen (D)
Bottle top Filter	Millipore, Billerica (USA)
DC Platte Si 250, mit Konzentrierungszone	J.T. Baker, Phillipsburg, (USA)
Deckgläschen, 24 mm x 60 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen (D)
Glaseinsätze flach für Probenröhrchen	Agilent, Böblingen (D)
Glaskugeln (4,25 - 6 mm)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Glaspipetten	Brand, Wertheim (D)
Glasröhrchen, 6 ml	Fisher Scientific, Schwerte (D)
Glasröhrchen, 6 ml mit Schraubverschluss	Agilent, Böblingen (D)
Keramikkugeln („SAZ-Perlen“)	Mühlmeier, Bärnau (D)
Kryobox „Mr. Frosty“	Fisher Scientific, Schwerte (D)

Kryoröhrchen	Brand, Wertheim (D)
Mikrodialysemembran, 0,025 µm, Ø 13 mm	Millipore, Billerica (USA)
Mikroliterpipettenspitzen	Labomedic, Bonn (D)
Miracloth	Calbiochem, Darmstadt (D)
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen (D)
Petrischalen 94 x 16 mm	Greiner bio-One, Frickenhausen (D)
Pflanzenkultivierungsschalen	Pöppelmann, Lohne (D)
Plastik-Einmalküvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchsschlag (D)
Probenröhrchen	Duratec, Hockenheim (D)
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäße, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
SPE Silikasäulen, Strata Si-1 500 g	Phenomenex, Aschaffenburg (D)
Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße	Schleicher und Schuell, Dassel (D)
Teflonsepten für Schraubverschluss	Schmidlin, Neuheim (CH)
Töpfe zur Pflanzenkultivierung, 10 cm	Pöppelmann, Lohne (D)
Topferde	Gebrüder Patzer, Sinntal-Jossa (D)
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Vermiculit, Korngröße 2-3 mm	Rolfs, Siegburg (D)

2.1.3 Chemikalien

Alle hier nicht erwähnten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D), Merck, Darmstadt (D) und Duchefa, Haarlem (NL) bezogen.

Aceton	Prolabo VWR, Darmstadt (D)
Acetosyringon	Labomedic, Bonn (D)
Agar	BD, Heidelberg (D)
Agarose	PeQlab, Erlangen (D)
Ameisensäure	VWR, Darmstadt (D)
Bacto-Agar	BD, Heidelberg (D)
Bacto-Pepton	BD, Heidelberg (D)
Borsäure	Grüssing, Filsum (D)
Chloralhydrat	AppliChem, Darmstadt (D)
Complete EDTA-free Protease Inhibitor	
Cocktail Tabletten	Roche, Basel (CH)
EDTA	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt (D)
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg (D)
Formaldehyd	AppliChem, Darmstadt (D)
Glukose	AppliChem, Darmstadt (D)
Glycerol	AppliChem, Darmstadt (D)
IPL-41 Insektenmedium	PAN-Biotech, Aidenbach (D)
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt (D)
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt (D)
Methanol	J.T. Baker, Phillipsburg (USA)
Phenol	VWR, Darmstadt (D)

Silwet Gold	Rolfs, Siegburg (D)
X-Gal	AppliChem, Darmstadt (D)
Yeastolat	Invitrogen, Darmstadt (D)
YNB	BD, Heidelberg (D)

2.1.4 Lipide

Alle Lipide wurden über die Firmen Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA), Matreya LLC, Pleasant Gap (USA) Larodan, Malmö (S) und Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D) bezogen.

2.1.5 Enzyme und Kits

Alle Enzyme wurden über die Firmen Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D), Fermentas, St. Leon-Rot (D), DNA Cloning Service, Hamburg (D) und Invitrogen, Darmstadt (D) bezogen.

Kits

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	DNA Cloning service, Hamburg (D)
Superscript III system RT-PCR Kit	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt (D)
High-Speed Plasmid Mini Kit	DNA Cloning service, Hamburg (D)
TRIzol Reagent	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt (D)

2.1.6 Primer

Die folgenden synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec Seraing, (B) und Integrated DNA Technologies, Leuven (B) hergestellt.

Primer zur Genotypisierung der Pflanzen

BN108	5'-CCGAAATTTGGATCAGTATGC	AT4G22330	SAIL_750_B06_LP
BN109	5'-TAAGAAGTTTCACAGACGCGG	AT4G22330	SAIL_750_B06_LP
BN110	5'-TCTATCAGCTCCAGCAAATGG	AT5G58980	SALK_020682_LP
BN111	5'-AGTAACGAGGATGCCATTTCC	AT5G58980	SALK_020682_LP
BN116	5'-TCTCCACCAGTGTAACGTCC	AT1G07380	SALK_054725_LP
BN117	5'-TTTTATTCTCAGCGTTCCTG	AT1G07380	SALK_054725_LP
BN118	5'-TTATGCTCGTATTGGAATGGC	AT2G38010	SALK_033707_LP
BN119	5'-AGGAATTCAGCAACAACATGC	AT2G38010	SALK_033707_LP
BN120	5'-ATTTACGCTTCGAACCGTTTC	AT2G38010	SALK_050305_LP
BN121	5'-TGCATACTTAATCGGAGTCGG	AT2G38010	SALK_050305_LP
BN124	5'-GCATACTGATCCAAATTCGG	AT4G22330	GABI_336G01_LP
BN125	5'-TTCTCATTGTGGAATTCCTCTG	AT4G22330	GABI_336G01_LP
BN300	5'-TTTCAGGGATTCTCCATTCG	AT5G58980	SALK_020138_LP
BN455	5'-TGAAGTGGTAATATCGACGGC	AT5G58980	SAIL_595_G04_LP
BN456	5'-TCAAGATTTGATGGAAATGG	AT5G58980	SALK_020138_LP
BN457	5'-AGTAACGAGGATGCCATTTCC	AT5G58980	SAIL_552_E11_LP

BN458	5'-TCTATCAGCTCCAGCAAATGG	AT5G58980	SAIL_552_E11_RP
BN459	5'-TGGAAGACTGGTTTGAACGAG	AT5G58980	SAIL_595_G04_RP
BN1198	5'-TCTTGGATGCTGGTGTAACC	AT1G07380	WISCDXSLOX366H4_041_LP
BN1199	5'-AAAATCAAATGCTCCTGGTCC	AT1G07380	WISCDXSLOX366H4_041_RP
LB1	5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC		T-DNA SYNGENTA
BN78	5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC		T-DNA SALK
BN142	5'-CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC		T-DNA GABI KAT
BN1200	5'-AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC		T-DNA WISC

Primer für die semiquantitative RT-PCR

BN120	5'-ATTTACGCTTCGAACCGTTTC	At2g38010	LP
BN121	5'-TGCATACTTAATCGGAGTCGG	At2g38010	RP
BN297	5'-CCGAAGTACAATGCCCACTT	At4g22330	LP
BN298	5'-GCAGAAGACACGGTCACAGA	At4g22330	RP
BN299	5'-CACCTGTTGTTGCGGATATG	At5g58980	LP
BN300	5'-TTTCAGGGATTCTCCATTCG	At5g58980	RP
BN303	5'-ACCGGACAAGAAACAAATCG	At1g07380	LP
BN304	5'-CGGGAGCTCAGCTTTTTATG	At1g07380	RP

Primer für Klonierungen (mit der dazugehörigen Schnittstelle)

BN386	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAAGTACAATGCCCACTT	
BN387	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCAGAAGACACGGTCACAGA	
BN408	5'-GCAGGTGACTGGATTTTGGT	
BN409	5'-TCTCAACGCAATCGTTTTTG	
BN423	5'-ACTAGTATGGCAGATGGGATATCGAGC	<i>SpeI</i>
BN424	5'-GTCGACTCATTGTGTTTTTGGCTTCTCG	<i>SalI</i>
BN750	5'-GCGGATCCATGGCAGATGGGATATCGAGC	<i>BamHI</i>
BN1009	5'-TTGTGCGACTTGTGTTTTTGGCTTCTCGA	<i>SalI</i>
BN1337	5'-GCGGTACCTCAGTGGTGGTGGTGGT	<i>KpnI</i>

2.1.7 Vektoren

Tabelle 2-1: Vektoren

Vektor	Stock-Nr.	Merkmal	Resistenz	Referenz
19K	bn203	P19 Protein, Koinfiltration <i>N. benthamiana</i>	Rifampicin, Kanamycin	Jörg Kudla, Universität Münster (D)
pDONR207	bn96	Gateway Donor Vektor <i>S. cerevisiae</i>	Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe (D)
pDR196	bn143	Expressionvektor	Ampicillin	Rentsch et al. 1995
pET22b(+)	pd54	<i>E. coli</i> Expressionsvektor Vektor für Baculovirus	Ampicillin	Merck, Darmstadt (D)
pFastBac1	bn338	Expressionssystem	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe (D)
pFGCGW-des- red	bn79	Gateway RNAi Vektor mit DsRed Marker	Kanamycin	Edgar B. Cahoon, University of Nebraska-Lincoln (USA)
pGEM-T Easy	-	Klonierungsvektor	Ampicillin	Promega, Mannheim (D)
pJET1.2	-	Klonierungsvektor	Ampicillin	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
pLDsRed	bn100	Expressionsvektor mit DsRed Marker <i>P. pastoris</i>	Streptomycin, Spectinomycin	Georg Hölzl, Universität Bonn (D)
pPIC3.5	bn341	Expressionvektor Plasmid mit cDNA von	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe (D)
RAFL09-74-E03	bn89	<i>At4g22330</i>	Ampicillin	Riken (J)

2.1.8 Bakterien-, Hefe- und Insektenstämme

Tabelle 2-2: Bakterien-, Hefe- und Insektenstämme

Stamm	Organismus	Referenz
Δ ypc1 Δ ycd1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mao et al. 2000b
BL21(DE3)	<i>Escherichia coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe (D)
C58C1(pGV2260)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Deblaere et al. 1985
DB3.1	<i>Escherichia coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Electro-SHOX	<i>Escherichia coli</i>	Bioline GmbH, Luckenwalde (D)
GS115 his minus	<i>Pichia pastoris</i>	Dirk Warnecke, Uni Hamburg (D)
Sf9 Insektenzellen	<i>Spodoptera frugiperda</i>	AG Konrad Sandhoff, Universität Bonn (D)
XL1 blue	<i>Escherichia coli</i>	Stratagene, Amsterdam (NL)

2.1.9 Pflanzenmaterial

Tabelle 2-3 Pflanzenmaterial

Linie	Quelle	Art
Wildtyp	Volker Knoop, Universität Bonn (D)	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Wildtyp	ABRC, Columbus (USA)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Gabi_336_G01 (<i>acer1-2</i>)	GABI Kat, Uni Bielefeld (D)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Sail_552_E11	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Sail_595_G04	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Sail_750_B06 (<i>acer1-1</i>)	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Salk_020138	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Salk_020682	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Salk_033707	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Salk_050305	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
Salk_054725	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)
WiscDsLox366H4_041	NASC, Loughborough (UK)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-2)

Tabelle 2-4 Zuordnung der Insertionslinien

Gen	Name	Pflanzenlinie
At4g22330	<i>ACER1</i>	Gabi_336_G01, Sail_750_B06
At1g07380	<i>NCER1</i>	Salk_054725, WiscDsLox366H4_041
At2g38010	<i>NCER2</i>	Salk_033707, Salk_050305
At5g58980	<i>NCER3</i>	Sail_552_E11, Sail_595_G04, Salk_020138, Salk_020682

2.1.10 Medien, Puffer und Lösungen

LB-Medium (Bertani, 1951)

25 g/l LB-Broth
1,5 % (w/v) Bacto-Agar für Platten

YEP-Medium

10 g/l Bacto-Pepton
10 g/l Hefe-Extrakt
5 g/l NaCl
15 g/l Bacto-Agar für Platten

YPD-Medium

1 % (w/v) Hefe-Extrakt
2 % (w/v) Bacto-Pepton
2 % (w/v) Glukose
2 % (w/v) Agar für Platten
Die Glukose wurde als sterilfiltrierte Lösung nach dem Autoklavieren dazugegeben.

CMdum-Medium

1,16 g/l Dropout Powder
2 % (w/v) Glukose
0,67 % (w/v) YNB
2 % (w/v) Agar für Platten
20 mg/l Histidin
60 mg/l Leucin
40 mg/l Tryptophan
Glukose, YNB und Aminosäuren wurden als sterilfiltrierte Lösungen nach dem Autoklavieren dazugegeben.

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
 Die Substanzen wurden vermengt und mit einem Mörser pulverisiert.

MM (Minimal-Methanol)-Medium

1,34 % (w/v) YNB
 0,4 µg/ml Biotin
 0,5 % (v/v) Methanol
 20 mg/ml Histidin
 2 % (w/v) Agar für Platten

MG (Minimal-Glukose)-Medium

1,34 % (w/v) YNB
 0,4 µg/ml Biotin
 2 % (w/v) Glukose
 20 mg/ml Histidin
 2 % (w/v) Agar für Platten

CTAB DNA-Extraktionspuffer (200 ml)

16,36 g NaCl
 8 ml 0.5 M EDTA, pH 8,0
 20 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0
 4 g CTAB
 Mit ddH₂O wurde auf 200 ml aufgefüllt.

BF-Puffer

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

10 X TBE-Puffer

1 M Tris
 1 M Borsäure
 0,02 M EDTA

DNA-Ladepuffer (6x)

10 mM Tris-HCl, pH 7,6
 0,03 % (w/v) Bromphenolblau
 0,03 % (w/v) Xylencyanol FF
 60 % (v/v) Glycerol

Disruptionspuffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,9
 10 mM MgCl₂
 1 mM EDTA

5 % (v/v) Glycerol
 0,3 M Ammoniumsulfat

Reaktionspuffer für Enzymtests

pH 4 und pH 5,5
 100 mM Natriumacetat
 1 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 Der pH-Wert wurde mit 100 %iger Essigsäure eingestellt.

pH 7,2 und pH 8,5
 100 mM Tris-HCl
 1 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt.

pH 10
 100 mM Tris-HCl
 1 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt.

IPL-41 Medium (Weiss et al. 1995)

2,463 % (w/v) IPL-41 Insektenmedium (ohne L-Glutamin und NaHCO₃)
 2 % (v/v) Yeastolat (50x)
 0,1 % (v/v) Lipidmix (1000x)
 1 % (v/v) Pluronic-F68 (10 %)
 0,09938 % (w/v) L-Glutamin
 0,035 % (w/v) NaHCO₃
 0,26 % (w/v) NaCl₂
 Der pH-Wert wurde auf 6,4 mit Kaliumhydroxid eingestellt.
 Die Osmolarität von 335 mOsm wurde mit Natriumchlorid eingestellt.
 Das Medium wurde mithilfe eines Bottle top Filters sterilfiltriert.

Freezing-Medium

85 % IPL-41 Medium
 15 % DMSO

FPA50

5 ml 37 % (v/v) Formaldehyd
 5 ml Propionsäure
 90 ml 50 % (v/v) Ethanol

Alexander Färbelösung (Alexander, 1969)

10 ml Ethanol
 1 ml Malachit Grün (1 % (v/v) in Ethanol)
 5 ml Fuchsinäure (1 % (v/v) in ddH₂O)

0,5 ml Orange G (1 % (v/v) in ddH₂O)
 5 g Phenol
 5 g Chloralhydrat
 2 ml Essigsäure
 25 ml Glycerol
 50 ml ddH₂O

Sphingolipidextraktions-Lösungsmittel

Untere Phase von:
 55 % (v/v) Isopropanol
 20 % (v/v) Hexan
 25 % (v/v) ddH₂O

Q-TOF Laufmittel (Wolti et al. 2002)

Chloroform/Methanol/300 mM Ammonium-
 acetat (300:665:35)

2.1.11 Antibiotika

Tabelle 2-5: Antibiotika

Antibiotikum	Stock [mg/ml]	Endkonzentration	
		[µg/ml]	Hersteller
Ampicillin	100	100	Duchefa, Haarlem (NL)
Gentamicin	15	15	Duchefa, Haarlem (NL)
Kanamycin	50	50	Duchefa, Haarlem (NL)
Chloramphenicol	34	34	Labomedic, Bonn (D)
Streptomycin	20	25	Duchefa, Haarlem (NL)
Spectinomycin	20	25	Duchefa, Haarlem (NL)
Rifampicin	60	60	Duchefa, Haarlem (NL)
Geneticin (G418)	50	50	Duchefa, Haarlem (NL)
Tetracyclin	20	20	Duchefa, Haarlem (NL)
Penicillin-Streptomycin	10000 U/ml	100 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe (D)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

DNA Fragmente aus den verschiedenen Organismen wurden mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. DNA-Fragmente für Klonierungen wurden mit der Pfu-Polymerase amplifiziert. Zum Screening von Mutanten-Populationen (Arabidopsis) sowie zur Detektion von Plasmiden durch Kolonie-PCR (*E. coli* und Hefen) wurde die DCS-Polymerase eingesetzt. Die Amplifikationen wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei Arabidopsis wurden ca. 100 ng DNA als Vorlage eingesetzt. Von *E. coli* und Hefen wurde mit einem Zahnstocher Zellmaterial von einer Kolonie genommen und zur Inaktivierung organismeneigener Enzyme in 20 µl ddH₂O ca. 10 min bei 100 °C erhitzt. Es wurden genspezifische Primer (2.1.6) eingesetzt.

Tabelle 2-6: Beispiel eines PCR-Ansatzes

PCR-Reaktionsmix	Volumen	PCR-Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
DCS-Polymerase (5 U/µl)	0,15	Denaturierung	95 °C	3 min	1
10X Puffer B	1,5	Denaturierung	95 °C	30 s	30
25 mM MgCl ₂	1,5	Annealing	58 °C	30 s	
10 mM dNTP Mix	0,3	Elongation	72 °C	1 min	
Forward Primer (10 pmol/µl)	0,9	Elongation	72 °C	15 min	1
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,9				
DNA Template (5-100 ng/µl)	1,5				
ddH ₂ O auf 15 µl	8,25				

2.2.1.2 Sequenzierungen und Sequenzanalysen

Die Sequenzierung diente der Kontrolle von DNA-Sequenzen und von Insertionsstellen in T-DNA-Linien. Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics, Berlin (D) durchgeführt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Sequenzierung erfolgte wie in 2.2.1.6 beschrieben. Plasmide wurden wie in 2.2.4.3 beschrieben zur Sequenzierung aufgereinigt. Die Sequenzanalysen erfolgten mit den Programmen Clone Manager, Si-Ed Software, Cary (USA), Lasergene Software, DNASTar Inc., Madison (USA) sowie FinchTV, Geospiza, Seattle (USA).

2.2.1.3 Klonierungsstrategien

pFGCGW-des-red-ACER1: Konstrukt zum Silencing von At4g22330 in Arabidopsis durch RNAi-Expression

Das Plasmid RAFL09-74-E03 diente als Vorlage zur Amplifizierung der cDNA von *ACER1* mit den Primern bn386/bn387. Das Fragment wurde wie im Gateway Handbuch beschrieben zuerst in den Zwischenvektor pDONR207 kloniert und dann in den Zielvektor pFGCGW-des-red. ligiert

pDR196-ACER1: Konstrukt zur Expression in *S. cerevisiae*

Das Plasmid RAFL09-74-E03 diente als Vorlage zur Amplifizierung der cDNA von *ACER1* mit den Primern bn423/bn424 und somit wurden die Schnittstellen *SpeI* am 5' Ende und *Sall* am 3' Ende eingefügt. Das Fragment wurde in den Zwischenvektor pGEM-T Easy kloniert. Das daraus mit *SpeI* und *Sall* ausgeschnittene Fragment wurde in den mit denselben Enzymen geschnittenen Zielvektor pDR196 kloniert.

pLDsRed-ACER1: Konstrukt zur Überexpression von At4g22330 und zur Komplementierung von T-DNA-Insertionslinien in Arabidopsis

Das Plasmid RAFL09-74-E03 diente als Vorlage zur Amplifizierung der cDNA von *ACER1* mit den Primern bn750/bn424 und somit wurden die Schnittstellen *Bam*HI am 5' Ende und *Sall* am 3' Ende eingefügt. Das Fragment wurde in den Zwischenvektor pGEM-T Easy kloniert. Das daraus mit *Bam*HI und *Sall* ausgeschnittene Fragment wurde in den mit denselben Enzymen geschnittenen Zielvektor pLDsRed-*ACER1* kloniert.

pPIC3.5-ACER1: Konstrukt zur Expression in *P. pastoris*

Das Konstrukt pGEM-T Easy-*ACER1* aus der Zwischenklonierung von pLDsRed-*ACER1* wurde als Vorlage verwendet. Aus dem Zwischenvektor wurde das Fragment mit *Bam*HI und *Not*I ausgeschnitten. Da die Schnittstelle *Not*I auf dem Vektor liegt, wurde auch ein Teil des Vektors ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde in den mit *Bam*HI und *Not*I geschnittenen Vektor kloniert. Die so erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* vermehrt und für die Transformation von *P. pastoris* linearisiert. Die Linearisierung erfolgte mit dem Enzym *Bgl*II.

pET22b(+)-ACER1: Konstrukt zur Expression in *E. coli*

Zunächst diente das Plasmid RAFL09-74-E03 als Vorlage zur Amplifizierung der cDNA von *ACER1*. Durch PCR mit den Primern bn423/ bn1009 wurde die cDNA amplifiziert und somit das Stopcodon entfernt, sowie die Schnittstellen *SpeI* am 5' Ende und *Sall* am 3' Ende eingefügt. Das Fragment wurde in den Zwischenvektor pGEM-T Easy kloniert. Das daraus mit *SpeI* und *Sall*

ausgeschnittene Fragment wurde in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pET22b(+) kloniert.

pFastBac-ACER1-His: Konstrukt zur Expression in *S. frugiperda*

Für die heterologe Expression des Gens *ACER1* in Insektenzellen wurde die Gensequenz ohne Stopcodon aber mit einem His-Tag am 3' Sequenzende in den Vektor pFastBac kloniert.

Durch eine Amplifizierung (Vorlage: *ACER1* in pET22b(+), siehe oben) mit den Primern bn750/bn1337 wurde ein His-Tag am C-Terminus hinzugefügt. Zusätzlich wurde durch diese Amplifizierung am 5' Ende des Fragments eine *Bam*HI Schnittstelle und am 3' Ende eine *Kpn*I Schnittstelle eingefügt. Das Fragment wurde in den Zwischenvektor pJet1.2 kloniert. Das daraus mit *Bam*HI und *Kpn*I ausgeschnittene Fragment wurde in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pFastBac kloniert.

2.2.1.4 Analyse von DNA mithilfe von Restriktionsenzymen

Eine Analyse bzw. ein Verdau mit Restriktionsenzymen diente neben dem Ausschneiden von Fragmenten und der Linearisierung von Vektoren der Verifizierung von Klonierungen. Dafür wurde ein Ansatz von 10 µl mit 1 µl Plasmid-DNA (ca. 500 ng) für 1-3 Stunden inkubiert. Die Art und die Menge des Puffers und des eingesetzten Enzyms bzw. der Enzyme sowie die Temperatur der Restriktion wurden anhand des Serviceprogramms DoubleDigest von Fermentas bestimmt.

2.2.1.5 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR, des Enzymverdau und der extrahierten DNA wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert. Dies geschah mit einem 1 % (w/v) Agarosegel in 1X TBE Puffer mit Ethidiumbromid (5 µg/ml). Die DNA-Proben wurden zuvor mit DNA-Ladepuffer (6x) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Parallel dazu wurde ein Größenmarker (GeneRuler 1kb DNA-Leiter, Fermentas) aufgetragen. Durch eine der Kammergröße entsprechende Spannung (100 – 130 V) wurde die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe erreicht. Das DNA Bandenmuster wurde mithilfe eines UV Transilluminators ausgewertet.

2.2.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel wurden die unter UV-Licht sichtbar gemachten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „Gel/PCR DNA

Fragments Extraction Kit“ aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Anschluss durch das Spektrophotometer Nanodrop 1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.1.7 Isolierung von RNA aus Pflanzen mit TRIzol, cDNA Synthese und semiquantitative RT-PCR

Für die Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial wurde TRIzol verwendet. Alle Schritte wurden wie im TRIzol Reagent Herstellerhandbuch beschrieben durchgeführt. Dabei wurde nur RNase-freie Plastikware verwendet. Zur Zerkleinerung des Blattgewebes (ca. 100 mg) wurde eine Schwingmühle (Retsch) verwendet. Zur Auflösung der RNA wurde ddH₂O verwendet. Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Qualität der RNA wurde mithilfe eines Agarose-Gels, welches mit je 1 µg der RNA-Proben beladen wurde, kontrolliert.

Zur Generierung von cDNA aus RNA wurde das „Superscript III First Strand Synthesis System RT-PCR Kit“ verwendet. Die Durchführung geschah wie im Herstellerhandbuch beschrieben.

Für die semiquantitative RT-PCR wurde die durch die cDNA Synthese gewonnene cDNA mittels PCR amplifiziert (Primer siehe Kapitel 2.1.6) und auf einem Agarosegel die Bandenintensitäten miteinander verglichen. Zum Vergleich des Expressionslevels dienten die Gene Ubiquitin10 (At4g05320) und Actin2 (At3g18780), welche unter verschiedensten Situationen und in unterschiedlichen Gewebe gleich stark exprimiert werden.

2.2.1.10 Anfertigung von Dauerkulturen von Bakterien und Hefen

Zur dauerhaften Lagerung der einzelnen Organismenlinien von Hefen und Bakterien wurden Glycerolstocks angefertigt und bei -80 °C gelagert. Dabei wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 500 µl der jeweiligen Kultur mit 500 µl sterilem 70 % (v/v) Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend sofort bei -80 °C gelagert. Um neue Kulturen anzupflanzen, wurde mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Pipettenspitze Material entnommen und auf einer Petrischale mit dem entsprechenden Medium ausgestrichen oder in ein Reagenzglas mit entsprechendem Medium gegeben. Die Zellen aus der Dauerkultur wurden dann bei einer dem Organismus entsprechenden Temperatur kultiviert.

2.2.2 Methoden beim Arbeiten mit Arabidopsis

2.2.2.1 Anzucht

Arabidopsis wurde unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht) vier bis sechs Wochen auf einer Mischung von Erde und Vermiculit (2:1) angezogen. Die relative Luftfeuchte betrug 55 %, die Temperatur betrug 20 °C. Die Lichtintensität betrug ca. $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.2.2 Transformation durch Floral Dipping

Die Transformation von Arabidopsis erfolgte an vier bis sechs Wochen alten Pflanzen durch *floral dipping*, einer Methode nach Clough und Bent, 1998. Eine 2 ml YEP-Vorkultur von *A. tumefaciens* mit den entsprechenden Antibiotika für pLDsRed-*ACER1* bzw. pFGCGW-des-red-*ACER1* (Kapitel 2.1.11) wurden über Nacht bei 28 °C im Schüttler bei 150 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur von 200 ml YEP angeimpft, welche wieder über Nacht im Schüttler bei 28 °C inkubiert wurde. Die Zellen der Übernachtskultur wurden zentrifugiert (4000 x g, 30 min), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 400 ml 5 %iger Saccharoselösung mit 0,05 % Silwet Gold resuspendiert. Für 5 – 10 Sekunden wurden die Blütenstände der Pflanzen in die *A. tumefaciens*-Lösung getaucht und leicht geschwenkt. Die getauchten Pflanzen wurden 24 h liegend und abgedeckt mit einer Plastikhaube bei geringer Lichtintensität gelagert. Am nächsten Tag wurden die Pflanzen zurück in die Phytokammer gestellt und bis zur Samenreife wachsen gelassen. Die Samen der Pflanzen wurden gesammelt und transgene, rot fluoreszierende Samen mithilfe des binokularen Fluoreszenzmikroskops selektiert. Um die DsRed-Fluoreszenz zu sehen wurde grünes Licht und ein roter Filter verwendet.

2.2.2.3 Isolation genomischer DNA aus Blättern

Zur Extraktion genomischer DNA wurde ein Rosettenblatt von Arabidopsis in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit ca. 15 Keramikugeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Precellys Homogenisierer wurde das Blattmaterial im Anschluss zerkleinert (5000 x rpm, 30 s). 500 µl CTAB Puffer wurden hinzugefügt und im Heizblock mindestens 10 min bei 65 °C inkubiert. Zwischendurch wurden die Proben gevortext. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zur Probe hinzugefügt und gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben zentrifugiert (13000 x g, 5 min). Für die Fällung der DNA wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, in dem bereits 350 µl Isopropanol vorgelegt waren. Die Proben wurden 10-mal geschwenkt und für 5 min auf Eis gestellt. Mit einer Zentrifugation von 10 min bei 13000 g wurde die DNA pelletiert. Nachdem der Überstand

abgeschüttet wurde, wurde das Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und dieser nach einer weiteren Zentrifugation (13000 x g, 5min) komplett entfernt. Die DNA wurde im offenen Reaktionsgefäß getrocknet, in 50 – 100 µl ddH₂O resuspendiert und die Konzentration mit dem Spektrophotometer Nanodrop 1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.2.4 Identifizierung von T-DNA Insertionslinien (Genotypisierung)

Zur Identifizierung von heterozygoten bzw. homozygoten T-DNA Insertionslinien wurden die Pflanzen genotypisiert. Die verwendeten Primerkombinationen zur Identifikation der jeweiligen Linie mittels PCR sind unter in Kapitel 2.1.6 aufgeführt. Neben dem Primerpaar, welches für die T-DNA Insertionslinie spezifisch ist, wurde zusätzlich der Primer verwendet, der auf der jeweiligen T-DNA Insertion liegt.

2.2.2.5 Kreuzung

Zur Kreuzung verschiedener Arabidopsislinien wurden die Pflanzen manuell bestäubt. Von einer jungen Blüte wurde dazu ein Pollenstand entnommen und auf die freipräparierte Narbe einer noch nicht geöffneten Blüte getupft. Anschließend wurde die Narbe zum Schutz vor Austrocknung mit etwas Frischhaltefolie umhüllt und markiert. Innerhalb von 2-3 Tagen war der Erfolg der Kreuzung an der beginnenden Schotenbildung zu erkennen. Um ein normales Wachstum der Schote zu gewährleisten, wurde die Frischhaltefolie nach dem ersten Anzeichen des Wachstums entfernt.

2.2.2.6 Mikrosomenpräparation aus Blättern

Ca. 500 mg Blattmaterial wurden in mehrere 2 ml Reaktionsgefäße mit Glaskugeln (0,25-0,5 mm Durchmesser) gefüllt. Je Reaktionsgefäß wurde 1 ml Disruptionspuffer mit Proteaseinhibitor hinzugefügt und die Proben mit dem Precellys Homogenisierer 5 mal 30 s bei 6500 rpm zerkleinert. Zwischendurch wurden die Proben auf Eis gestellt, um eine Erhitzung über 40 °C zu verhindern. Das zerkleinerte Blattmaterial wurde über Miracloth gefiltert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefüllt und auf 20 ml mit Disruptionspuffer ohne Proteaseinhibitor aufgefüllt. Eine Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 4000 rpm folgte. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen umgefüllt und 2 Stunden bei 42000 g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde im Anschluss einmal mit dem jeweiligen Reaktionspuffer umspült und dann in 1 ml Reaktionspuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Tests (Kapitel 2.2.9.1) bestimmt.

2.2.3 Methoden beim Arbeiten mit *N. benthamiana*

2.2.3.1 Anzucht

N. benthamiana wurde unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht) ca. sechs Wochen auf einer Mischung von Erde und Vermiculit (2:1) angezogen. Die relative Luftfeuchte betrug 55 %, die Temperatur betrug 24 °C. Die Lichtintensität betrug ca. 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.3.2 Transformation

N. benthamiana wurde nach Voinnet et al. 2000 transformiert. *A. tumefaciens* wurde bei 28 °C in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika für pLDsRed-ACER1 bzw. 19K (Kapitel 2.1.11) bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen. Anschließend wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert (4000 x g, 15 min), in 10 mM MgCl_2 und 150 $\mu\text{g/ml}$ Acetosyringon resuspendiert und 3 Stunden inkubiert. Die Bakterienlösungen wurden jeweils auf einen Wert von OD600 = 1 eingestellt und dann gleiche Volumina gemischt. Dann wurde die Bakterienlösung mithilfe einer Spritze ohne Kanüle in den abaxialen Luftraum der Blätter infiltriert. Nach 8 Tagen wurde das transformierte Gewebe mit dem binokularen Fluoreszenzmikroskop wie bei transformierten Arabidopsissamen (2.2.2.2) detektiert. Für die Mikrosomenpräparation wurde das fluoreszierende Blattmaterial mit einem Skalpell ausgeschnitten.

2.2.3.3 Mikrosomenpräparation

Die Mikrosomen wurden wie aus Arabidopsisblättern gewonnen (siehe 2.2.2.4).

2.2.4 Methoden beim Arbeiten mit *E. coli*

2.2.4.1 Anzucht

Die *E. coli* Stämme wurden auf festem oder flüssigem LB-Medium bei 37 °C angezogen. Die Flüssigkulturen wurden dabei geschüttelt (150 rpm) oder durch Rotation belüftet. Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wurden dem Medium Antibiotika (Kapitel 2.1.11) zugesetzt. Bei Klonierungen in den Vektor pGEM-T Easy wurden den Selektionsplatten 200 μM IPTG und 80 $\mu\text{g/l}$ X-Gal (in DMSO gelöst) zugesetzt.

2.2.4.2 Transformation

Hitzeschock-Transformation

Ein 80 µl Aliquot kompetenter Hitzeschockzellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 2 µl Plasmid-DNA versetzt, leicht geschwenkt und 20 min auf Eis inkubiert. Ein Wasserbad oder ein Heizblock wurde auf 42 °C erhitzt und die Zellen für 1,5 min darin erhitzt. Danach wurden die Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt, und zur Regeneration für 45 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Ausplattierung auf Petrischalen mit LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Kapitel 2.1.11) und eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

Elektroschock-Transformation

Bei der Elektroschock-Transformation wird die Probe einem Spannungspuls ausgesetzt, dadurch wird die Membran der Zellen durchlässiger. Um einen Stromfluss durch die Probe zu verhindern, müssen die Zellen und die DNA frei von Salzen sein. Zum Entsalzen der DNA-Probe wurde diese für eine Stunde gegen ddH₂O auf einer Mikrodialysemembran dialysiert.

Ein Aliquot von 10 µl ElectroSHOX kompetenten Zellen wurde aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und mit 40 µl sterilem ddH₂O gemischt. 10 µl salzfreier Ligationsansatz bzw. 2 µl salzfreie Plasmid-DNA wurden hinzupipettiert und das Reaktionsgefäß 10 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette pipettiert und einem Spannungspuls von 1500 V ausgesetzt. Danach wurden unverzüglich 500 µl LB-Medium hinzugegeben und die Proben zur Regeneration für 45 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Ausplattierung auf Petrischalen mit LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Kapitel 2.1.11) und eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

2.2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 2 ml LB-Medium mit der gewünschten Bakterienkultur und dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (13000 x g, 2 min). Plasmid-DNA für die DNA Sequenzierung wurde mit dem „High-Speed Plasmid Mini Kit“ nach Herstellerangaben isoliert. Für alle anderen Zwecke wurde die Plasmid-DNA nach Riggs und McLachlan (1986) isoliert. Hierzu wurde das Pellet in 200 µl BF-Puffer mit 10 µl Lysozym (20 mg/ml) komplett resuspendiert. Die Proben wurden für ca. 45 s in einen 95 °C heißen Heizblock gestellt. (Die Deckel der Reaktionsgefäße mussten wegen des entstehenden Überdrucks gut verschlossen sein oder gegebenenfalls kurz geöffnet werden.) Danach wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation

bei 13000 g für 20 min. In ein neues Reaktionsgefäß wurden 400 µl Isopropanol und 80 µl Ammoniumacetat pipettiert. Der durch die Zentrifugation gewonnene Überstand wurde zu dem Isopropanol-Ammoniumacetatgemisch pipettiert, der Reaktionsansatz wurde durch Schwenken gemischt und bei RT 2 min inkubiert. Eine weitere Zentrifugation von 13000 g für 12 min folgte. Anschließend wurde das entstandene Pellet in 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei 13000 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet wurde getrocknet und in 50 – 200 µl ddH₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des Spektrophotometers Nanodrop 1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.9.2 Heterologe Proteinexpression mit pET22b(+)

Zur Expression in *E. coli* wurden 4 ml der Zellen mit der Leervektorkontrolle pET22b(+) und pET22b(+)-ACER1 in LB Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in 500 ml Medium resuspendiert. Als die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 erreicht hatte, wurde die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1 weiter wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen und in 200 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Lysozym (10 µl einer 10 mg/ml Stocklösung) lysiert. Lysierte Zellen wurden viskos und zogen Fäden. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe von DNaseI (5 µl aus einer 1 mg/ml Stocklösung) hydrolysiert. Die Proben wurden 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um Zellbruchteile abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und in den entsprechenden Reaktionspuffer aufgenommen.

2.2.5 Methoden beim Arbeiten mit *P. pastoris*

2.2.5.1 Anzucht

Die *P. pastoris*-Stämme 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.

2.2.5.2 Transformation

Zur Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*-Zellen wurde eine 50 ml ÜN-Kultur mit YPD-Medium angesetzt. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 1,2 -1,5 wurden die Zellen bei 1500 g für 3 min und bei 4

°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in eiskaltem ddH₂O gewaschen, zuerst mit 50 ml, dann mit 25 ml. Zwischendurch und im Anschluss wurde 3 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem 1 M Sorbitol durch Vortexen resuspendiert und 3 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Das aufgereinigte Pellet wurde dann in 200 µl eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und die Zellen am selben Tag verwendet. Zur Transformation wurden 80 µl der elektrokompetenten Zellen in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette überführt und 20 µl der linearisierten Plasmid-DNA (ca. 10 µg DNA) hinzugefügt. Durch vorsichtiges Anschnippen wurde die Flüssigkeit gemischt und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde anschließend einem Spannungspuls von 750 V ausgesetzt, im Anschluss wurde unverzüglich 1 ml 1 M Sorbitol hinzugegeben. Durch leichtes Schwenken der Küvette wurde die Probe gemischt und anschließend ohne Schütteln bei 28 °C inkubiert. Nach 2,5 Stunden wurden jeweils 100, 150, 200 bzw. 250 µl der Zellsuspension auf 4 Petrischalen mit MG-Medium aufgetragen. Die Kolonien transformierter Zellen wurden nach 2 bis 3 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C sichtbar.

Methanol-Screening

Bei Transformation von *P. pastoris* mit dem pPIC3.5-Vektorsystem ergeben sich zwei Integrationsmöglichkeiten ins Genom. Zum einen kann das Konstrukt doppelt homolog in den AOX1-Lokus integriert sein, was den Verlust der Alkoholoxidaseaktivität zur Folge hat. Zum anderen kann ein einfach homologes Rekombinationsereignis im (punktmutierten) *his4*-Lokus stattgefunden haben. In diesem Fall sind die Transformanten immer noch in der Lage, mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle gut zu wachsen. Es wurden Mut⁺-(methanol utilization plus) und Mut^S-(methanol utilization slow) Transformanten unterschieden. Dazu wurden pro Transformation 52 *P. pastoris*-Kolonien parallel auf MM- und MG-Platten ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Mut^S-Kolonien (also solche, die auf MM deutlich schlechter wuchsen als auf MG) wurden vor einer Lipidanalyse zusätzlich mit Kolonie-PCR überprüft.

2.2.5.3 Induktion der heterologen Genexpression in *P. pastoris*

Die Genexpression mit Hilfe des pPIC3.5-Systems steht unter Kontrolle des AOX1-Promotors, der durch Methanol bei gleichzeitiger Abwesenheit von Glukose induziert wird. Die Zellen einer 100 ml ÜN-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1-3 wurden sedimentiert (3 min, 1500 x g), 1- bis 2-Mal mit MM-Medium gewaschen und in 100 ml MM-Medium resuspendiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Methanol pro 100 ml Kulturvolumen und einer Inkubation (16-24 Stunden) bei 30 °C.

2.2.5.4 Mikrosomenpräparation

Die Zellen der induzierten *P. pastoris*-Kulturen wurden durch eine Zentrifugation bei 3600 g für 4 min geerntet, einmal mit ddH₂O gewaschen und anschließend in ca. 1 ml Disruptionspuffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert. Die Zellen wurden in Mikroschraubröhrchen mit Glaskugeln gefüllt und im Precellys Homogenisierer 5 mal 30 s bei 6500 rpm zerkleinert. Zwischendurch wurden die Proben auf Eis gestellt, um eine Erhitzung über 40 °C zu verhindern. Die Proben wurden in einem auf Eis stehenden 50 ml Reaktionsgefäß vereint und auf 20 ml mit Disruptionspuffer ohne Proteaseinhibitor aufgefüllt. Eine Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 4000 rpm folgte. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 2 Stunden bei 42000 g und 4 °C zentrifugiert. Das so entstandene Mikrosomen-Pellet wurde mit Reaktionspuffer umspült und dann in 1 ml Reaktionspuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Tests (Kapitel 2.2.9.1) bestimmt.

2.2.6 Methoden beim Arbeiten mit *S. cerevisiae*

2.2.6.1 Anzucht

S. cerevisiae-Stämme wurden auf festem oder in flüssigem YPD-Medium oder CMDum-Medium bei 30 °C angezogen. Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180-200 rpm) oder Rotation belüftet.

2.2.7.2 Transformation

Zur Herstellung elektrokompetenter *S. cerevisiae*-Zellen wurde eine 500 ml Kultur aus YPD-Medium mit 10 % (v/v) Glycerol mit 2 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 30 °C im Schüttler inkubiert, bis die OD₆₀₀ 1,3 – 1,5 betrug. Nach einer Zentrifugation (4000 x g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet in 500 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet in 250 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, erneut pelletiert und anschließend in 1 ml 1 M Sorbitol mit 10 % (v/v) Glycerol aufgenommen und in Aliquots von 100 µl bei –80 °C eingefroren.

Zur Transformation wurde ein Aliquot bei RT aufgetaut, mit 5 µl DNA vermengt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette pipettiert und einem Spannungspuls von 750 V ausgesetzt. Dann wurde unverzüglich 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol dazugegeben, vorsichtig gemischt und diese Zellsuspension für 2 min auf Eis abgekühlt.

Die Zellen wurden 1 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, in ca. 100 μ l 1 M Sorbitol mit 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert, auf Petrischalen mit Selektivmedium ausplattiert und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.7.3 Mikrosomenpräparation aus Hefen

Eine 10 ml Vorkultur in CMdum-Medium mit 2 % (w/v) Glukose wurde vorbereitet und über Nacht bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde davon eine Hauptkultur (100 ml CMdum-Medium mit 2 % (w/v) Glukose) angeimpft. Zu Beginn sollte die Hauptkultur eine OD_{600} von 0,1 haben. Die Kultur wurde 48 Stunden bei 30 °C im Schüttler bei 150 rpm wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 3600 g für 4 min geerntet, einmal mit ddH₂O gewaschen und anschließend in ca. 1 ml Disruptionspuffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert.

Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden in Mikroschraubröhrchen mit Glaskugeln gefüllt und im Precellys Homogenisierer 5 mal 30 s bei 6500 rpm zerkleinert. Zwischendurch wurden die Proben auf Eis gestellt, um eine Erhitzung über 40 °C zu verhindern. Die aufgeteilten Proben wurden in einem auf Eis stehenden 50 ml Reaktionsgefäß vereint und auf 20 ml mit Disruptionspuffer ohne Proteaseinhibitor aufgefüllt. Eine Zentrifugation von 10 min 4 °C und 4000 rpm folgte. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 2 Stunden bei 42000 g und 4 °C zentrifugiert. Das so entstandene Mikrosomen-Pellet wurde mit Reaktionspuffer umspült und dann in 1 ml Reaktionspuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Tests (Kapitel 2.2.9.1) bestimmt.

2.2.8 Methoden beim Arbeiten mit *S. frugiperda*

2.2.8.1 Zellkultur von *S. frugiperda*

Die *S. frugiperda* Sf9 Insektenzellen wurden in einer Suspensionskultur aus IPL-41 Medium mit Penicillin und Streptomycin gehalten. Die Zellen wurden in einem mit nicht komplett geschlossenem Schraubverschluss versehenen, 500 ml Erlenmeyerkolben bei 27 °C im Schüttler (125 x rpm) inkubiert. Die Zelldichte der Kultur betrug zwischen 1×10^6 und 6×10^6 Zellen/ml. Sie wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Zellviabilität wurde durch eine Trypan Blau Färbung determiniert. Dafür wurde eine Zellkulturprobe mit einer gleichen Menge an Trypan Blau gemischt, gevortext und für wenige Minuten inkubiert. Anschließend wurde durch die Messung des Verhältnisses zwischen ungefärbten lebenden Zellen und blaugefärbten toten Zellen die Lebensfähigkeit bestimmt.

Die Generierung des P3 Virusstocks, die Optimierung der heterologen Geneexpression sowie die Analyse der rekombinanten ACER1 Proteinexpression wurden von Laura Strubl mithilfe des Benutzerhandbuchs des „Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems“ durchgeführt (Strubl (2012)).

2.2.8.2 Anfertigung von Dauerkulturen

Zur Anfertigung einer Dauerkultur der Sf9-Insektenzellen wurde die Kultur bis zu einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ herangezogen (Bestimmung der Zelldichte siehe Kapitel 2.2.8.1). Damit die Zellen als gefrorene Dauerkulturen dienen konnten, musste die Kultur eine Viabilität von mindestens 98 % haben, d.h. maximal 2 % der Zellen durften tot sein. Die Kulturen wurden in 50 ml Reaktionsgefäßen zentrifugiert (1000 x g, 5 min), der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in so viel *Freezing*-Medium aufgenommen, dass die Zelldichte $1 \cdot 10^7$ betrug. Das Zellpellet wurde durch Auf- und Abpipettieren im *Freezing*-Medium aufgenommen und in vorgekühlte 1 ml Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in eine auf 4 °C vorgekühlte Kyrobox gestellt und 1 Tag bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben in einen flüssigen Stickstofftank überführt und bis zur Wiederverwendung in der Gasphase oberhalb des flüssigen Stickstoffs gelagert. Um die gefrorenen Zellen wieder in Kultur zu bringen wurden sie aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C aufgetaut. Die Außenseiten der Kryoröhrchen wurden mit 80 % (v/v) Ethanol dekontaminiert und die aufgetauten Zellen wurden in einen Erlenmeyerkolben überführt. Je 1 ml aufgetauter Zellen wurde 5 ml IPL-41 Insektenmedium hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden unter Schütteln (120 rpm) bei 27 °C wurden erneut 5 ml Medium hinzugegeben. Das Wachstum und die Sterblichkeit wurden in der folgenden Zeit beobachtet, so dass es abhängig von der Qualität der Zellen 4 bis 7 Tage dauerte, bis die Zellen sich regenerierten.

2.2.8.3 Induktion der heterologen Expression von ACER1 in *S. frugiperda*

200 ml Sf9 Zellkultur wurden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben angezogen und bei einer Zelldichte von 2 bis $2,2 \times 10^6$ Zellen/ml durch Zugabe von 3 MOI (Multiplicity of infection/Multiplizität der Infektion) des P3 Virusstocks infiziert. Die Zellen wurden 48 bis 72 Stunden inkubiert, bis die Viabilität ca. 80 % betrug. Dann wurden die Zellen einer Mikrosomenpräparation unterzogen.

2.2.8.4 Mikrosomenpräparation aus *S. frugiperda*

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500 x g, 5 min, 4 °C) gesammelt und mit ddH₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Disruptionspuffer resuspendiert und mehrere

Mikroschraubröhrchen mit Glaskugeln gefüllt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit dem Precellys Homogenisierer. Es wurde 5 mal 30 s bei 6500 rpm zerkleinert. Zwischendurch wurden die Proben auf Eis gestellt um eine Erhitzung über 40 °C zu verhindern. Die Proben wurden in einem auf Eis stehenden 50 ml Reaktionsgefäß vereint und auf 20 ml mit Disruptionspuffer ohne Proteaseinhibitor aufgefüllt. Eine Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 4000 rpm folgte. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 2 Stunden bei 42000 g und 4 °C zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde einmal vorsichtig mit ddH₂O abgespült und im Anschluss in ddH₂O durch Vortexen und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Tests (Kapitel 2.2.9.1) bestimmt.

2.2.9 Biochemische Methoden

2.2.9.1 BCA-Test

Mithilfe des BCA-Tests kann die Proteinkonzentration einer Probe anhand einer zuvor generierten Eichkurve im Spektrophotometer (z.B. Nanodrop 1000) bestimmt werden. Für den BCA-Test wurden 4,9 ml Bicinchoninsäure (BCA) mit 0,1 ml 5%iger Kupfersulfat-Lösung gemischt. Davon wurden 200 µl zu 25 µl einer Probe pipettiert, gevortext und im Heizblock bei 37 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben anhand einer Eichgeraden mit BSA sofort gemessen.

2.2.9.2 SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE wurde benutzt, um die Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Polyacrylamid-Gele wurden nach Sambrook et al. (2006) gegossen. Ein Proteinmarker (PeqGold Protein Marker III prestained) mit definierten Molekulargewichten wurde verwendet, um die Proteine zu identifizieren. Nachdem die Proteine auf dem Gel der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden sie für den Western blot nach Towbin et al. (1979) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies geschah durch halbtrockenes Blotting in Towbin-Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,1 % (w/v) SDS). Zur Detektion der His-tags wurde das His Detector WesternBlot Kit AP Colorimetric von KPL nach der im Handbuch beschriebenen Anleitung verwendet.

2.2.9.2 Ceramidase-Enzymtest

Der Ceramidase-Enzymtest wurde in Anlehnung an Pata et al. (2008) durchgeführt. Zur Messung der Enzymaktivität von ACER1 nach Expression in *P. pastoris*, *Arabidopsis*, *N. benthamiana* und *S. cerevisiae* wurde in einem Glasröhrchen mit Schraubverschluss 1 mg Protein in 600 µl

Reaktionspuffer mit 25 μM Substrat (in 100 % Ethanol) versetzt. Die Proben wurden gevortext und die Hälfte der Probe (300 μl) wurde abgenommen und in 1 ml Chloroform/Methanol (1:1) überführt. Das restliche Volumen des Ansatzes wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden wieder 300 μl aus dem Glasröhrchen pipettiert und in 1 ml Chloroform/Methanol (1:1) überführt. Um einen Abbau des internen Standards zu verhindern, wurde er erst zur Probe pipettiert, nachdem diese mit Chloroform/Methanol versetzt wurde. Die Proben wurden gevortext und zentrifugiert (5500 x rpm, 5 min). Die untere Lipidphase wurde in ein neues Glasröhrchen übertragen, zur Trockne mit Luft abgeblasen, in Q-TOF Laufmittel aufgenommen und die Substrat- bzw. Produktmenge mithilfe des Q-TOF MS/MS bestimmt. Gemessen wurde die Substratmenge nach Beendigung der Inkubation relativ zur Menge vor der Inkubation.

S. frugiperda-Zellen: Der Enzymtest von Protein aus Insektenzellen wurde wie folgt durchgeführt: In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden x μl einer 1 mg/ml Protein-Lösung zu 400 μl Enzymtest Puffer hinzugefügt. Mit einer Hamiltonspritze wurden x μl 5 μM Ceramid (in 100 % Ethanol) hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und eine Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Chloroform/Methanol (1:1) abgestoppt. Zur späteren Quantifizierung wurde interner Standard hinzupipettiert. Die Proben wurden gevortext und zentrifugiert (1000 x g, 2 min) und die Chloroform-Phase in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Durch erneute Zugabe von 1 ml Chloroform/Methanol (1:1), erneutes Vortexen und Zentrifugieren (1000 x g, 2 min) wurde die Probe ein zweites Mal extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen wurden unter Luftstrom bis zur Trockene eingedampft und in Q-TOF Laufmittel aufgenommen. Mithilfe des Q-TOF MS/MS wurde die Menge des Substrats (Ceramid) und der Produkte (Langkettige Basen) bestimmt.

2.2.9.3 Alexander-Färbung von Pollen

Entwicklungsfähige Pollen können mit der Alexander-Färbung von nicht lebensfähigen Pollen unterschieden werden. Dafür wurden Blütenstände von Arabidopsis geerntet und in FPA50 Lösung 1 h fixiert. Die so fixierten Antheren wurden auf Objektträger gebracht und mit wenigen Tropfen Alexander Färbelösung bedeckt. Nach 15 min konnten die Proben unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Die Wand lebensfähiger Pollen war grün gefärbt, das Cytoplasma violett.

2.2.9.6 Extraktion von Sphingolipiden aus Pflanzen

Ca. 300 bis 500 mg gefrorenes, gemörsertes Blattmaterial wurde in 2 ml Sphingolipidextraktions-Lösungsmittel aufgenommen und mit internem Standard versetzt. Die Probe

wurde für 15 min bei 60 °C extrahiert und zwischendurch gevortext. Im Anschluss wurde die Probe 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben und zu dem Pellet wurden erneut 2 ml Sphingolipidextraktions-Lösungsmittel gegeben. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Pellet nicht mehr grünlich war. Dies erforderte ca. 8 Durchgänge. Die vereinigten Überstände wurden bis zur Trockene unter Luftstrom getrocknet. Im Anschluss wurden 2 ml Chloroform/Methanol (1:1) hinzupipettiert und die Probe wurde gevortext und für einige Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Es wurden 150 µl 1M methanolisches Kaliumhydroxid (KOH) hinzugefügt, die Probe wurde erneut gevortext und zur milden alkalischen Hydrolyse für 2 Stunden bei 40°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde der pH-Wert durch Zugabe von 6 µl 100%iger Essigsäure neutralisiert. Die Neutralisierung wurde mittels eines pH-Teststreifens kontrolliert. Die Proben wurden im Anschluss bis zur Trockene unter Luftstrom eingeeengt, in 2 ml Methanol gelöst, gevortext und bei Bedarf für wenige Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Durch die Zugabe von 2 ml Hexan wurden die Proben von den in der Methanolyse gebildeten Fettsäuremethylestern (FAMES) gereinigt. Die Proben wurden gevortext und 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die obere Hexan-Phase wurde entfernt und es wurden erneut 2 ml Hexan zu den Proben gegeben und der vorherige Schritt wiederholt. Im Anschluss wurde die Methanol-Phase bis zur Trockene unter Luftstrom eingeeengt und die Proben in 2 ml H₂O-gesättigtem Butanol gelöst. Dazu wurde die Probe gevortext und bei Bedarf für wenige Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Danach wurden 2 ml ddH₂O zur Probe gegeben und die Probe gevortext. Dieser Schritt diente der Entsalzung der Probe. Die obere Butanol-Phase wurde in ein neues Gefäß übertragen und bis zu Trockene unter Luftstrom eingedampft, um anschließend in ca. 500 µl Methanol wieder gelöst zu werden. Die Ceramidmengen der Proben wurden mithilfe der LC-MS/MS analysiert. Um die Glukosylceramidmenge und -zusammensetzung zu bestimmen, wurde eine geringe Menge der Probe mit einem gleich großen Teil Q-TOF Laufmittel gemischt und mithilfe Direktinfusion MS/MS analysiert.

2.2.9.7 Extraktion von Lipiden aus Hefen

S. cerevisiae Kulturen (500 ml) wuchsen in CMdum-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 30 °C und 170 rpm. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3200 x g, 10 min) und das Pellet wurde in ca. 20 ml ddH₂O resuspendiert. In einem Wasserbad wurden die Zellen 20 min gekocht. Nach einer Zentrifugation (3200 x g, 5 min) wurde das Wasser entfernt und der interne Standard hinzupipettiert. Es wurden 15 ml Chloroform/Methanol (1:2) hinzugegeben und über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Proben bei 2000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Pellet wurden 15 ml Chloroform/Methanol (1:2) pipettiert. Die Proben wurden gevortext und 6 Stunden geschüttelt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (2000

x g für 5 min) und die Überstände vereinigt. Es wurde 0,5 Volumen 0,9 %ige Natriumchloridlösung hinzugegeben und gevortext. Dann wurde erneut zentrifugiert (2000 x g für 5 min.). Die untere organische Phase wurde unter Luftstrom eingetrocknet und in 1 ml Chloroform gelöst. Der Lipidextrakt wurde einer Festphasentrennung (Kapitel 2.2.9.8) unterzogen.

2.2.9.8 Reinigung von Lipiden durch Festphasentrennung (SPE)

Um Sphingolipide mit Q-TOF MS/MS zu analysieren, muss der Gesamtlipidextrakt einer weiteren Aufreinigung unterzogen werden. Um den Gesamtlipidextrakt zu fraktionieren, wird die Festphasentrennung (SPE, Englisch solid phase extraction) mit Silikasäulen angewandt. Die so gewonnenen Fraktionen sind angereichert mit der gewünschten Lipidklasse und die Proben weisen eine geringere Ionensuppression während der Q-TOF MS/MS Analyse auf. Unter Ionensuppression versteht man die Beeinflussung der Ionisierung eines Moleküls durch zeitgleich in der Ionenquelle vorhandene andere Probenbestandteile. Dies kann zu einer verringerten Anzahl an Ionen führen, die nachfolgend im MS detektiert werden können. Diese Beeinflussung wird durch die Aufreinigung reduziert. Die in Chloroform gelösten Lipidextrakte wurden auf eine mit Chloroform equilibrierte 500 mg Silikasäule appliziert und die unpolaren Lipide wurden mit 6 ml Chloroform eluiert. Im Anschluss wurden mit 6 ml Aceton/Isopropanol (1:1) die Glykolipide und Sphingolipide, und mit 6 ml Methanol die polaren Lipide von der Säule eluiert. Um einen Verlust von Lipiden zu vermeiden, wurde das Probengefäß mit dem jeweiligen Lösungsmittel ausgespült und die so gewonnenen restlichen Lipide auf die Säule appliziert. Für die weiteren Analysen wurden die Lipidextrakte unter Luftstrom getrocknet und in Q-TOF Laufmittel aufgenommen.

2.2.9.9 Bedingungen und Auswertung der LC-MS/MS

Ceramide in Pflanzen wurden per LC-MS/MS gemessen. Dafür wurden die Sphingolipidproben in Methanol aufgenommen und 25 µl der Proben über eine 250 x 4,6 mm, 5 µm, SUPELCOSIL ABZ+Plus Säule aufgetrennt (Markham und Jaworski 2007), bevor sie per Q-TOF MS/MS mit einer Elektrospray Ionisationsquelle (Agilent Jet Stream) analysiert wurden. Die Lipide wurden im MS/MS Modus fragmentiert. Es wurden die Aquisitionsmethoden „Personen/Vera/Cer komplett Ara Markham 40-75 %“ bzw. „Personen/Vera/GIPC komplett Ara Markham 40-75 %“ verwendet. Die Angabe 40-75 % bezieht sich auf den Gradienten des Lösungsmittels B im Laufe einer Probenmessung.

Lösungsmittel A: Tetrahydrofuran/Methanol/5 mM Ammoniumacetat (3:2:5)

Lösungsmittel B: Tetrahydrofuran/Methanol/5 mM Ammoniumacetat (7:2:1)

Die Probenflussrate betrug 0,4 ml/min. Die Flussrate des Vorhangsgases (Sheath gas) betrug 11 l/min und die Temperatur 350 °C. Die Temperatur des Stickstoffgases in der Kollisionszelle betrug 300 °C bei einer Flussrate von 8 Litern pro Minute. Die Kapillarspannung (Vcap) betrug 3500 V. Die Aquisitionsmethoden enthielten die Massen der jeweils gesuchten Lipide bzw. LCBs. Nach der durch die Kollision hervorgerufene Auftrennung wurden die Sphingolipide anhand der Präsenz ihrer LCB Ionen identifiziert. Die Sphingolipide wurden anhand der Peakflächen der MS/MS Massen der LCBs (multiple reaction monitorin) quantifiziert. Als Standard wurde ein Mischung von Standards mit dem Namen „Sphingomix Mouse“ eingesetzt.

Tabelle 2-7: Sphingomix Mouse

Sphingolipid	nmol/μl
d17:1	0.45
d20:0	0.63
12:0-Cer	0.36
12:0-GlcCer	0.27
12:0-SM	0.24
17:0-SM	0.26
d17:1-P	0.11

2.2.9.9 Bedingungen und Auswertung und der Direktinfusion MS/MS

Die Proben der Enzymtests, Glukosylceramide in Pflanzen und Ceramide in *S. cerevisiae* wurden mit einem 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS Massenspektrometer von Agilent analysiert. Es wurde die „nanoflow direct infusion Chip Cube“ Technologie angewendet. Proben wurden in das Q-TOF MS mit Chloroform/Methanol/300 mM Ammoniumacetat (300:665:35) mit einer Flussrate von 1 μl/min appliziert. Abhängig von der Anzahl der zu untersuchenden Ionen wurden 5 bis 15 μl der Probe injiziert. Die Lipide wurden im positiven Modus detektiert und in der Kollisionszelle mit Stickstoffgas fragmentiert. Die Kollisionsenergie betrug 35 V für Ceramide und Glukosylceramide und 20 V für langkettige Basen. Die Temperatur des Stickstoffgases in der Kollisionszelle betrug 300 °C bei einer Flussrate von 8 Litern pro Minute. Die Fragmentorspannung betrug 200 V und die Kapillarspannung (Vcap) betrug 1700 V. Die Massenspektren wurden von 0,732 Sekunden aufsummiert. Die Aquisitionsmethoden enthielten die Massen der jeweils gesuchten Lipide bzw. LCBs. Sie wurden in Relation zu internen Standards bekannter Konzentration quantifiziert. Auch hier wurden die Sphingolipide bzw LCBs anhand der Präsenz der LCB Ionen identifiziert.

2.2.9.5 Datenanalyse

Die Daten wurden mit der Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis Software (Version B.02.00) analysiert und mit Microsoft Excel 2007 weiter bearbeitet. Für statistische Analysen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens 3 biologischen Replikaten bestimmt.

2.2.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Arabidopsis

Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Gewebe und Organellen von Arabidopsislinien wurden durch Michael Melzer am IPK Gatersleben (D) angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalysen

Ceramidasen spielen eine zentrale Rolle im Sphingolipidstoffwechsel, da sie den Grundbaustein Ceramid in eine freie Fettsäure und eine langkettige Base spalten und unter bestimmten Bedingungen auch neu synthetisieren können. In Organismen wie Menschen, Ratten, *Drosophila*, Reis (*O. sativa*) und Hefe (*S. cerevisiae*) wurden Ceramidasen bereits beschrieben (Tab. 1-2, Einleitung). Ceramidasen können nach dem pH-Optimum ihrer Aktivität unterschieden werden. Da Arabidopsis Sphingolipide besitzt (Ceramide, GIPC, LCB und GlcCer), ist es wahrscheinlich, dass ein oder mehrere Proteine die Funktion einer Ceramidase besitzen. Die Aminosäure-Sequenzen bekannter Ceramidasen aus Hefe, Mensch und Reis wurden mit den abgeleiteten Proteinsequenzen des Arabidopsisgenoms verglichen und ähnliche Sequenzen zu einem phylogenetischen Baum zusammengefasst (siehe Abb. 3-1). Der Baum zeigt, dass Arabidopsis ein Gen besitzt (At4g22330, *ACER1*), dessen Proteinsequenz eine hohe Sequenzähnlichkeit zu einer menschlichen und den alkalischen Ceramidasen aus *S. cerevisiae* aufweist. Daneben besitzt Arabidopsis drei weitere Gene (At1g07380, *NCER1*; At2g38010, *NCER2*; At5g58980, *NCER3*), deren abgeleitete Proteinsequenzen sehr ähnlich zueinander sowie zu Ceramidasen aus anderen Organismen sind, die im neutralen pH Bereich ihr Aktivitätsmaximum haben (hier Os01g43520, eine neutrale Ceramidase aus *O. sativa*).

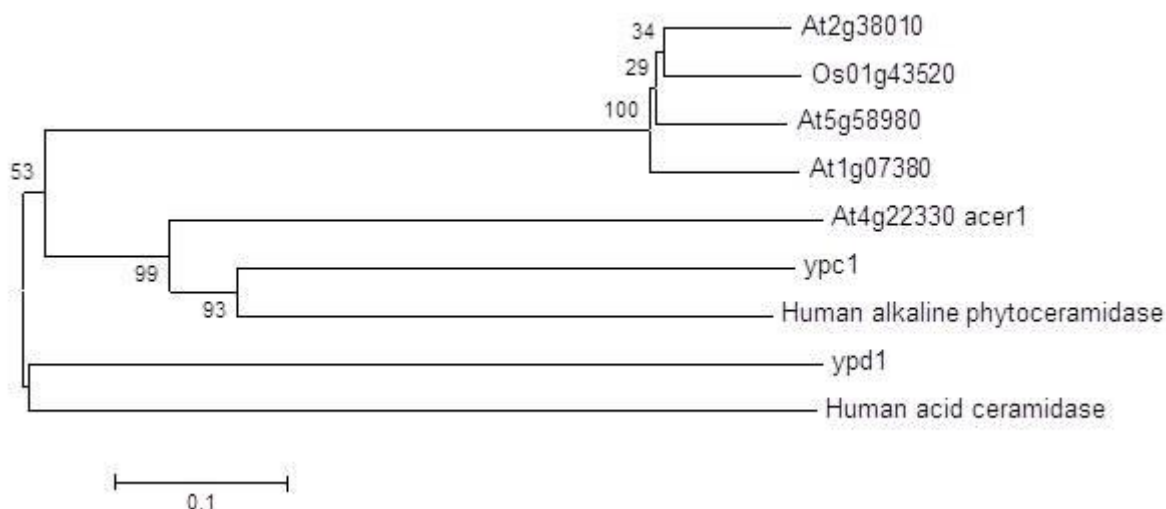


Abbildung 3-1: Phylogenetischer Baum von Ceramidasesequenzen verschiedener Organismen. Der phylogenetische Baum wurde mit Hilfe der neighbor-joining Methode (Saitou und Nei, 1987) mit Proteinsequenzen von Ceramidasen aus Arabidopsis (At3g38010, At5g58980, At1g07380, At4g22330), *O. sativa* (Os01g43520), *S. cerevisiae* (ypc1, ypd1), Mensch (Human alkaline phytoceramide, Human acid ceramide) konstruiert (Mega 5.0). Der Bootstrapwert neben den Verzweigungen wurde aus 1000 Wiederholungen berechnet (Felsenstein, 1985). Die Zweiglänge in der X-Achse repräsentiert die evolutionäre Entfernung, basierend auf der Anzahl der unterschiedlichen Aminosäuren (Nei und Kumar, 2000).

Eine Proteinsequenzanalyse durch den TMHMM Server der Technischen Universität Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) zeigt eine Vorhersage von 5 Transmembrandomänen (Abb. 3-2).

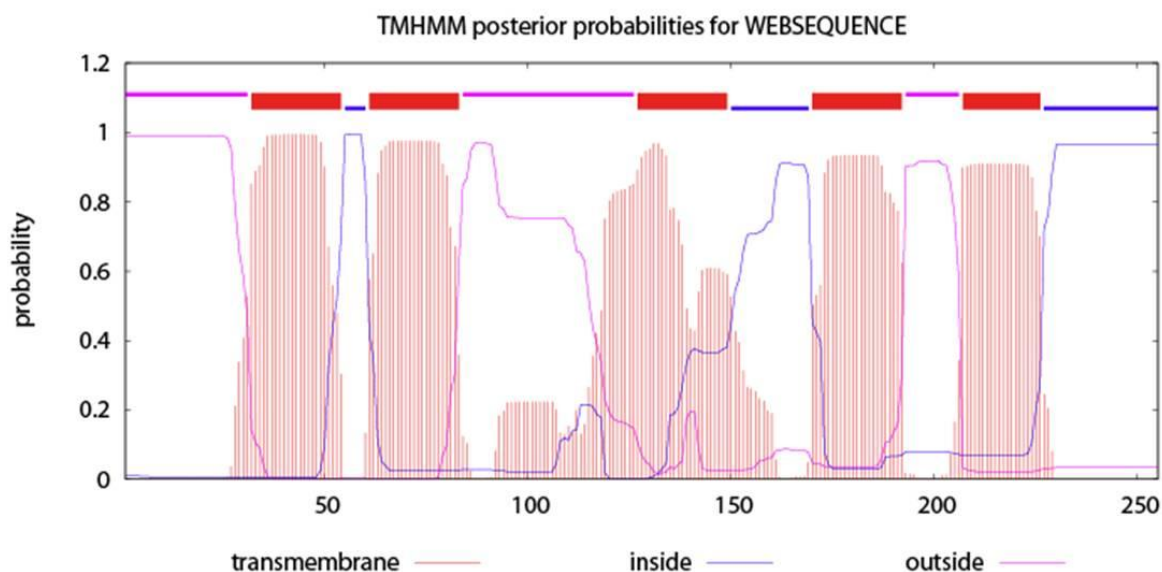


Abbildung 3-2: Vorhersage transmembraner Domänen in der Proteinsequenz von ACER1. x-Achse: Proteinsequenz, y-Achse: Wahrscheinlichkeit einer Transmembrandomäne. (Quelle: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

3.2 Ceramidase-Enzymtests mit ACER1 in heterologen Systemen

Um zu beweisen, dass das Protein ACER1 die Funktion einer Ceramidase hat, wurden Enzymtests nach Expression in heterologen Systemen durchgeführt. Daher wurden aus Organismen, die ACER1 heterolog exprimieren, Proteine extrahiert. Zu diesem Proteinextrakt wurde Ceramid als Substrat der Ceramidase-Reaktion hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von einer Stunde anhand der relativen Ceramidmenge kontrolliert, ob das Substrat gespalten wurde. Wird das Ceramid C12-NBD als Substrat verwendet, kann die hydrolysierte fluoreszierende Fettsäure als Produkt als Bande auf einer Dünnschichtplatte nachgewiesen werden. Die Akkumulation der Produkte bei nicht fluoreszierendem Substrat wurde nicht gemessen, da die Methoden zur Messung freier LCB und freier Fettsäuren per Q-TOF LC-MS/MS erst später entwickelt wurden.

3.2.1 Heterologe Expression von ACER1 in *E. coli*

E. coli ist ein weit verbreitetes System zur heterologen Expression verschiedenster Enzyme. Ein großer Vorteil dieses Systems ist die Einfachheit der Transformation bzw. Anzucht. Hierbei wurden Kulturen der *E. coli* Stämme DB3.1 und BL21(DE3) angezogen und mit den Leervektoren pQE-80L und pET22b(+) bzw. den Vektoren pQE-80L-ACER1 und pET22b(+)-ACER1, welche ACER1

exprimieren, transformiert. Diese Bakterienstämme wurden in Flüssigkulturen angezogen, um nach der Induktion mit IPTG für Ceramidaseanalysen verwendet zu werden.

3.2.1.2 Expression mit pQE-80L

Die Expression von ACER1 in DB3.1-Zellen mit dem Vektor pQE-80L führte nach der Induktion mit IPTG zur Stagnation bzw. Reduzierung der optischen Dichte, also zum Absterben der Bakterien (siehe Abb. 3-3). Dies war bei den Kontrollkulturen mit pQE-80L nicht der Fall.

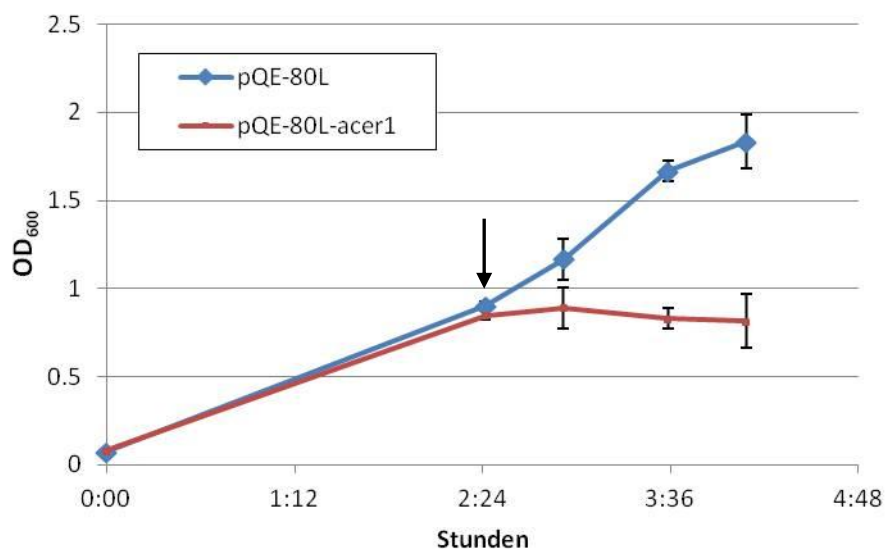


Abbildung 3-3: Wachstumskurve für *E. coli* mit dem Vektor pQE-80L-ACER1 im Vergleich zum Leervektor. Die optische Dichte wurde vor und nach Induktion mit IPTG (schwarzer Pfeil) gemessen. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Messungen. Die X-Achse zeigt Stunden:Minuten.

Da die Kultur pQE-80L-ACER1 nicht genügend Zellen besaß, die geerntet werden konnten, konnten mit diesem System keine Experimente durchgeführt werden.

3.2.1.2 Expression mit pET22-b(+)

Da mit dem pQE80L Vektor-System keine nennenswerte ACER1 Proteinexpression erreicht werden konnten, wurden der Vektor pET22-b(+) und der *E.coli* Stamm BL21(DE3) gewählt. Mit diesem Vektor wird ein ACER1 Fusionsprotein mit einer N-terminalen periplasmatischen Leader-Sequenz exprimiert, so dass das rekombinante Protein nach der Produktion in den periplasmatischen Raum transportiert wird. Dort kann das potentiell toxische Protein den Metabolismus im Zellplasma nicht beeinflussen. Zusätzlich trägt das rekombinante Protein eine C-terminale Fusion mit dem His-Tag. Mit diesem System war das Zellwachstum nach der Induktion nicht beeinträchtigt und es konnte rekombinantes ACER1 Protein aus diesen transgenen *E. coli* Stämmen gewonnen werden. Dieses Protein wurde per SDS PAGE aufgetrennt und die Größe des His-markierten rekombinanten Proteins wurde mit Hilfe eines Westernblots bestimmt (Abb. 3-4).

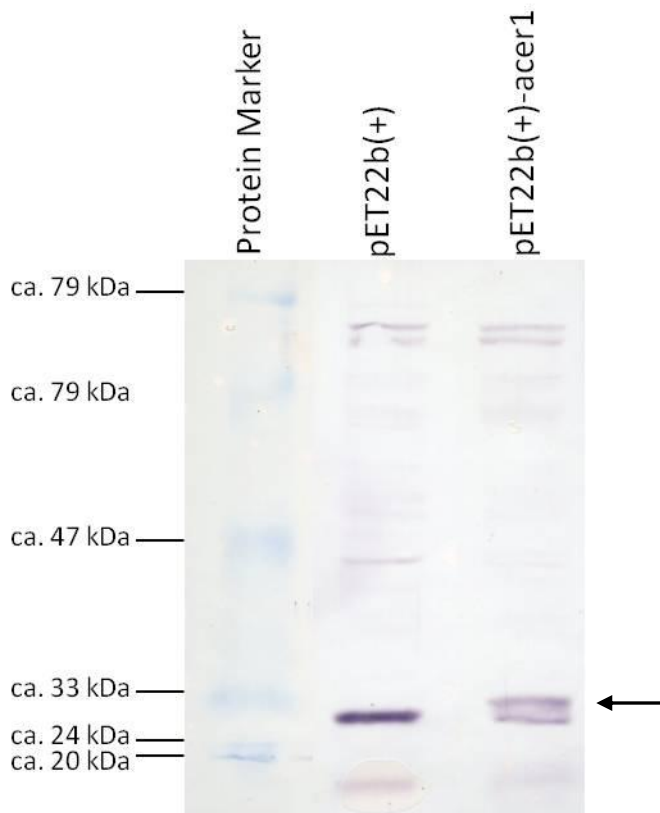


Abbildung 3-4: Westernblot des rekombinanten Proteins von den *E.coli* Kulturen pET-22b(+) bzw. pET22b(+)-ACER1. Der schwarze Pfeil markiert die bei pET22b(+)-ACER1 vorhandene Bande mit einer Größe von ca. 29 kDa. Die Bande bei ca. 26 kDa, welche bei beiden Proben zu sehen ist, stellt eine Interaktion des His-Detektor-Kits mit einem unbekanntem *E. coli* Protein dar.

Es ist eine zusätzliche Bande beim Westernblot (Abb. 3-4) zu erkennen, die auf die Existenz eines neu synthetisierten Proteins hinweist. Die Größe entspricht der Proteingröße von ACER1 (ca. 29 kDa). Daher wurde ein Ceramidasetest durchgeführt. Es wurden Flüssigkulturen der Stämme pET22b(+) bzw. pET22b(+)-ACER1 angezogen und die Proteinexpression induziert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Zu den aufgeschlossenen Zellen wurde das Ceramid C12-NBD gegeben. Dieses Substrat besitzt eine fluoreszierende Markierung (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl, NBD) an der C12-Fettsäure. Nach einer Stunde wurde die Reaktion abgestoppt und die Proben wurden auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen, die Lipide aufgetrennt und die Fluoreszenz durch UV-Licht visualisiert. In Abbildung 3-5 sieht man das Ergebnis des Versuchs.

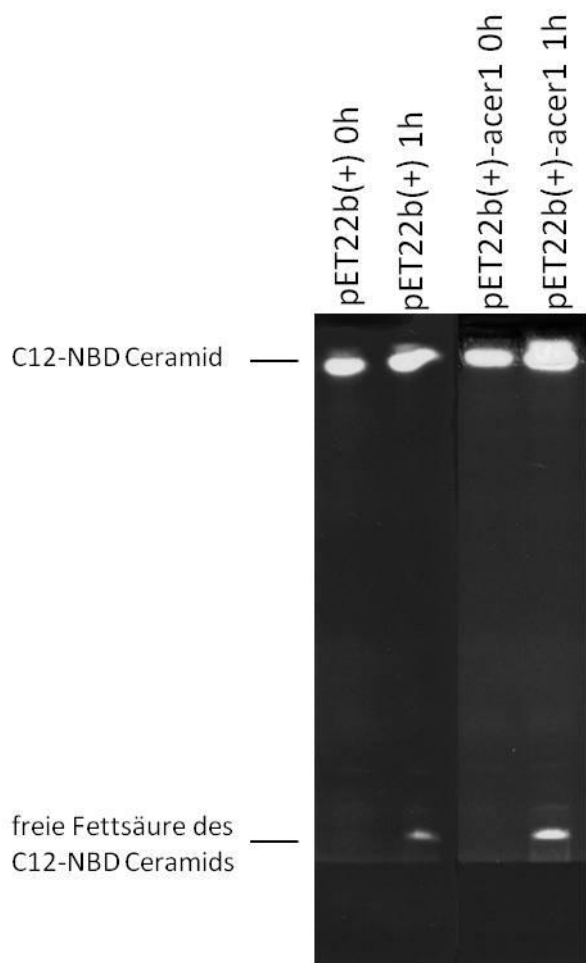


Abbildung 3-5: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte des Ceramidasetests von Protein aus *E. coli* mit dem Vektor pET22b(+)-ACER1. Die Spuren 1 und 2 zeigen die Proben mit pET22b(+) vor (0h) und nach (1h) der Inkubation, die Spuren 3 und 4 zeigen das Konstrukt pET22b(+)-ACER1 vor und nach der Inkubation. Fluoreszierende Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Es zeigt sich, dass sowohl Protein aus den pET22b(+) Zellen als auch Protein aus den pET22b(+)-ACER1 Zellen nach einer Stunde das Ceramid gespalten hat. Die Bande der freien Fettsäure in der Spur von ACER1 nach einer Stunde scheint stärker zu sein als in der von pET22b(+), allerdings ist durch den Versuchsaufbau die Bandenstärke nicht aussagekräftig im Bezug auf die Aktivität des Enzyms. Es bedeutet, dass das Ceramid auch durch *E. coli* eigene Enzyme gespalten wird. Aufgrund dieser hohen Hintergrundaktivität wurde nach einem geeigneteren System zu Expression von ACER1 gesucht.

3.2.3 Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Um die Funktion des Gens ACER1 zu untersuchen, wurde die cDNA in den Stamm $\Delta ypc1\Delta ydc1$ kloniert (pDR196-ACER1). In der Doppelmutante $\Delta ypc1\Delta ydc1$ sind die beiden hefeeigenen alkalischen Ceramidasen YPC1 und YDC1 ausgeschaltet worden. Als Kontrolle dient der Stamm $\Delta ypc1\Delta ydc1$, in den der leere Vektor pDR196 kloniert wurde.

In diesem Assay wurden Flüssigkulturen der Stämme pDR196 und pDR196-ACER1 angezogen und die Proteine mittels Mikrosomenpräparation extrahiert. Pro Reaktion wurde davon 1 mg Gesamtprotein eingesetzt und das Protein wurde in Assaypuffer mit pH-Werten im neutralen (pH 7) sowie im alkalischen (pH 9,1) Bereich resuspendiert. Durch die Zugabe des Substrats d18:1-c17:0, welches in einer geringen Menge Ethanol gelöst war, wurde die Reaktion gestartet. Vor und nach der Inkubation (60 min bei 37 °C) wurde aus den Versuchsproben Lipide extrahiert und der Gehalt an d18:1-c17:0 mittels Direkt-Infusion Q-TOF MS/MS gemessen.

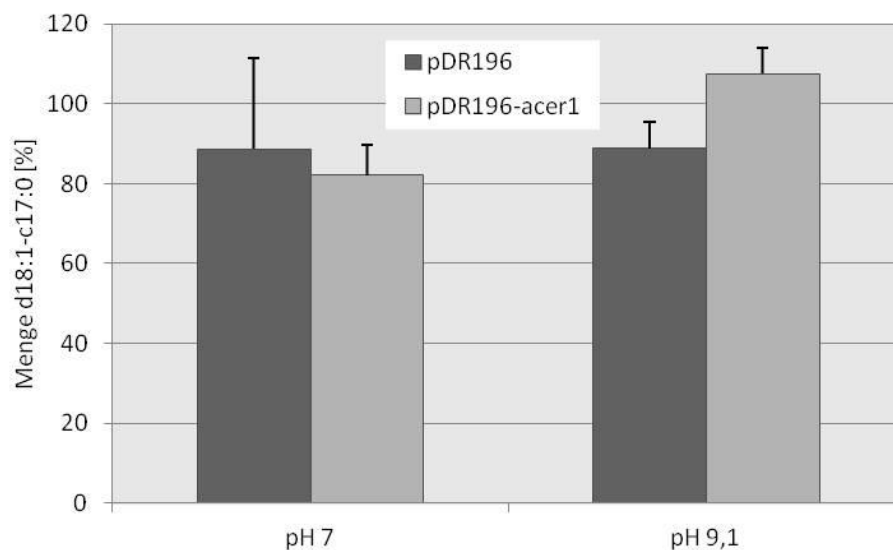


Abbildung 3-6: Enzymaktivitätstest von Protein aus *S. cerevisiae* Kulturen mit pDR196 bzw pDR196-ACER1 bei einem pH-Wert von 7 und 9,1. Dargestellt ist die relative Menge des Substrats (d18:1-c17:0) nach dem Versuch. 100 % ist die Ausgangsmenge des Substrats. Die Messung erfolgte durch Direktinfusion MS/MS. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Messungen.

In Abbildung 3-6 sieht man den relativen Gehalt des Ceramides d18:1-c17:0 nach Abstoppen der Reaktion. Bei einem pH-Wert von 7 war die Menge an d18:1-c17:0 um 10 % reduziert, sowohl den *S. cerevisiae* Kulturen mit dem Vektor pDR196 als auch bei pDR196-ACER1. Bei einem pH-Wert von 9,1 zeigte pDR196 eine Reduktion des Ceramids um knapp 20 %. Im Gegensatz dazu ist bei pDR196-ACER1 die Menge an d18:1-c17:0 höher als zu Beginn und beträgt ca. 110 %.

3.2.3.1 Fütterungstest in *S. cerevisiae*

Enzymaktivität lässt sich auch durch einen Fütterungstest nachweisen, bei dem die Substrate zu einer Flüssigkultur hinzupipettiert werden. Die Hefemutante *Δypc1Δydc1* (mit pDR196 oder pDR196-ACER1) könnte mit einem Ceramid gefüttert werden, um die Ceramidase-Aktivität von ACER1 zu bestimmen. Unter anderem die Ceramidanalysen aus Kapitel 3.2.4 deuten auf eine reverse Ceramidase-Aktivität von ACER1 hin, also auf die Synthese von Ceramid aus einer lankettigen Base

und einer freien Fettsäure. In diesem Experiment soll durch Fütterung mit einer langkettigen Base und freien Fettsäure getestet werden, ob eine reverse Ceramidase Aktivität von ACER1 in *S. cerevisiae* nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurden die gleichen Kulturen wie im vorigen Abschnitt angezogen. Zu den Kulturen wurden die Substrate, also eine langkettige Base (d18:1) und eine freie Fettsäure (c16:0) hinzupipettiert. Die Kulturen wurden weitere 5 Stunden wachsen gelassen und im Anschluss die Lipide aus dem Zellpellet extrahiert. Die Menge an Substrat (d18:1) ist beim Stamm pDR196-ACER1 nach der Inkubation geringer geworden (Abb. 3-7A). Zudem ist die Produktmenge (d18:1-c16:0) erhöht (Abb. 3-7B). d18:1-c16:0 kommt nicht nativ in *S. cerevisiae* vor (Ejsing et al. 2009). Das Ergebnis dieses Versuches muss durch weitere Durchführungen bestätigt werden.

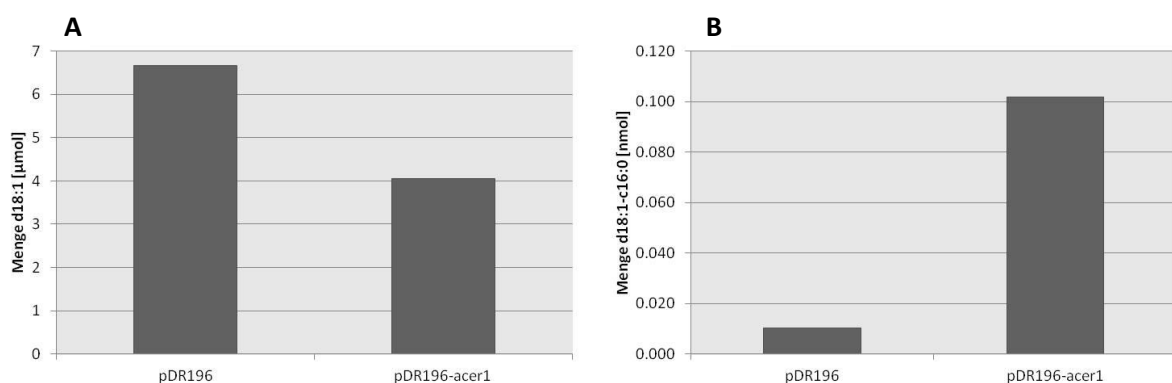


Abbildung 3-7: Vorversuch Fütterungstest zur reversen Ceramidaseaktivität von ACER1 in Hefe. Menge an Substrat (d18:1, A) und Produkt (d18:1-c16:0, B) nach der Inkubation der Hefemutante $\Delta ypc1\Delta ydc1$ mit den Vektoren pDR196 oder pDR196-ACER1. Die Messung erfolgte durch Direktinfusion MS/MS. Es handelt sich um einen Vorversuche und daher um eine Einfachbestimmung. Zur Verifizierung muss der Versuch wiederholt werden.

3.2.4 Quantifizierung von Ceramid in *S. cerevisiae* mittels Q-TOF Direkt-Infusion MS/MS

Die Hefemutante $\Delta ypc1\Delta ydc1$ mit den Vektoren pDR196 und pDR196-ACER1 wurden in Flüssigkulturen bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen, um anschließend die Lipide dieser Kulturen zu extrahieren. Es wurden sowohl der Ceramidgehalt als auch dessen Zusammensetzung untersucht (Abbildung 3-8). Die Menge des am häufigsten in *S. cerevisiae* vorkommenden Ceramids t18:0-h26:0 ist stark erhöht in den pDR196-ACER1 Zellen, während die Mengen vieler Ceramide mit kürzerkettigen Fettsäuren (d18:-h18:0, t18:0-h18:1, t18:0-h20:0, t18:0-c22:0, t18:0-h22:1, t18:0-h22:0, t18:0-h24:0, d18:0-h26:1, t18:0-c26:0, t18:0-h26:1) leicht reduziert sind. Der totale Ceramidgehalt beträgt bei der pDR196 Kontrolle ungefähr 3,5 und bei der pDR196-ACER1 Linie 4,2 nmol/OD600, aber der Unterschied ist nicht signifikant. Es ist also insbesondere ein Unterschied in der Zusammensetzung der Ceramide in ACER1 exprimierenden Hefezellen festzustellen. Der Anstieg an Ceramids t18:0-h26:0 könnte durch eine reverse Ceramidase Aktivität von ACER1 erklärt werden.

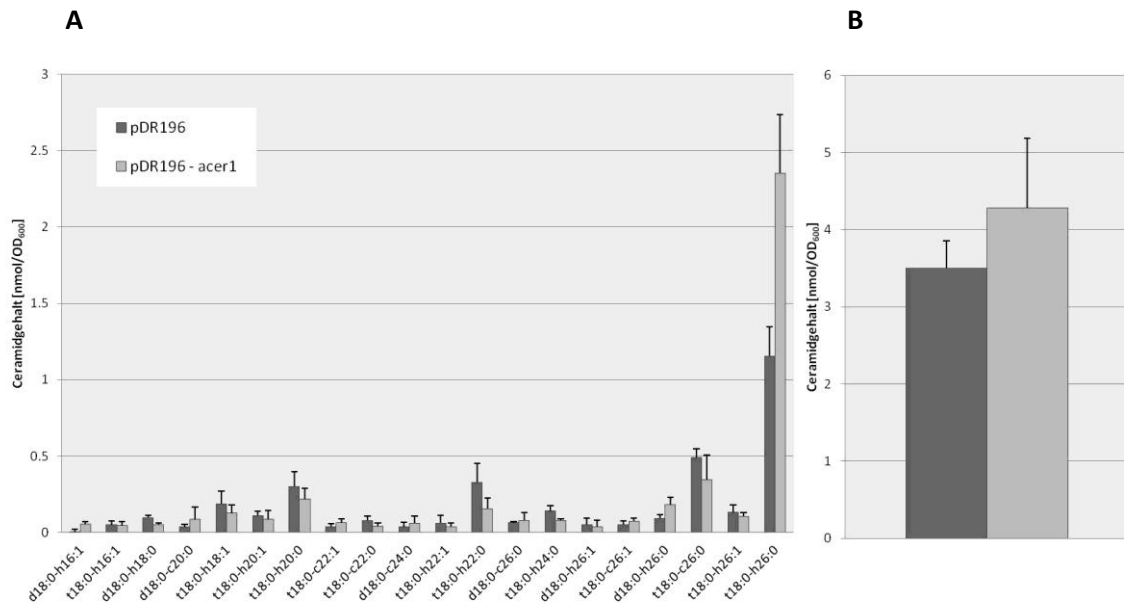


Abbildung 3-8: Ceramidgehalt in *S. cerevisiae* Zellen, die ACER1 exprimieren. ACER wurde in Kulturen mit dem Vektor pDR196 exprimiert, A) die 20 vorherrschenden Ceramide, B) der Gesamtgehalt an Ceramiden. Die Messung erfolgte durch Direktinfusion MS/MS. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 4 Messungen. Dieser Versuch wurde zweimal mit jeweils frischen Kulturen durchgeführt und führte zu ähnlichen Ergebnissen.

3.2.5 Ceramidase-Enzymtests mit Proteinextrakten aus *P. pastoris*

Die Hefe *S. cerevisiae* dient häufig als Modellorganismus zur Analyse eukaryotischer Stoffwechselfvorgänge. *S. cerevisiae* besitzt jedoch kein Glukosylceramid (GlcCer), die Hefe *P. pastoris* dagegen schon. Daher besitzt *P. pastoris* die gesamte Enzymausstattung, die zur GlcCer-Synthese benötigt wird, sie ist dem Modellorganismus Arabidopsis in dieser Hinsicht also ähnlicher. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* werden Expressionskonstrukte in *P. pastoris* stabil ins Genom integriert und liegen nicht als extrachromosomale Plasmide vor. Die cDNA von *ACER1* wurde in den *P. pastoris* Stamm GS115 his minus (freundlicherweise überlassen von Dirk Warnecke, Universität Hamburg) kloniert. Dies geschah mit Hilfe des Vektors pPIC3.5. Flüssigkulturen von *P. pastoris* wurden angezogen und die Proteine mittels Mikrosomenextraktion extrahiert. Pro Reaktion wurde 1 mg Gesamtprotein eingesetzt und das Protein wurde in Assaypuffer mit pH-Werten im neutralen (pH 7) sowie im alkalischen (pH 9) Bereich resuspendiert. Durch Zugabe der 3 Substrate d18:1-c17:0, d18:0-c18:0 bzw. t18:0-c18:0, welche in einer geringen Menge Ethanol gelöst waren, wurden die drei Reaktionen gestartet. Vor und nach der Inkubation (60 min bei 37 °C) wurden aus den Reaktionsansätzen Lipide extrahiert und der Substratgehalt mittels Q-TOF Direkt-Infusion MS/MS gemessen.

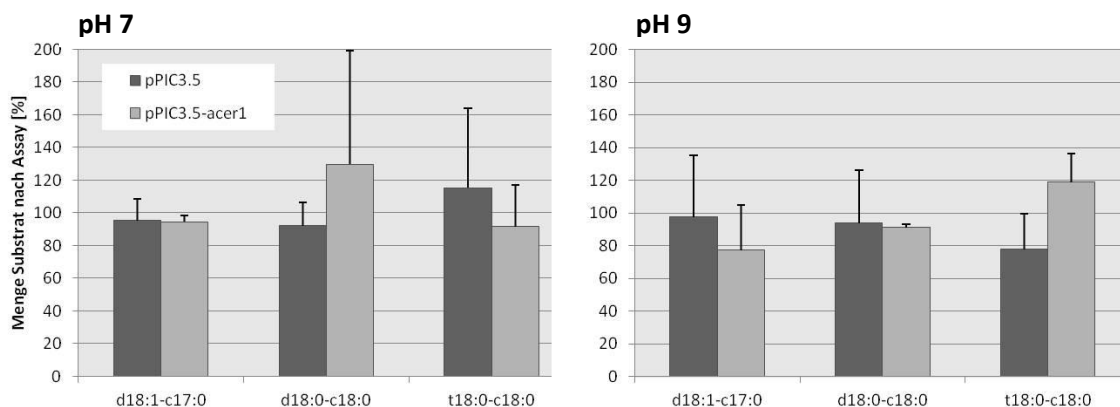


Abbildung 3-9: Enzymtest von *P. pastoris*-Kulturen mit pPIC3.5 und pPIC3.5-ACER1 bei einem pH-Wert von 7 und 9. Dargestellt ist die relative Menge der Substrate (d18:1-c17:0, d18:0-c18:0, t18:0-c18:0) nach Beendigung des Enzymtests. 100 % ist die Ausgangsmenge des Substrats. Die Messung erfolgte durch Direktinfusion MS/MS. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 5 Messungen.

In Abbildung 3-9 sieht man die relative Menge an Ceramid nach einer Inkubation von 60 min. bei 37 °C. Die Werte der Messung variieren stark. Da die Substratmenge nicht eindeutig reduziert ist, deutet dies auf die Abwesenheit der Ceramidase-Aktivität hin. Aus diesem Grund wurde die Arbeit mit *P. pastoris* vorerst eingestellt.

3.2.6 Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus *N. benthamiana*

Ein weiteres System für die heterologe Expression ist *N. benthamiana*. Da es sich hierbei wie bei Arabidopsis um eine dikotyle Pflanze handelt, ist das Expressionssystem durch die hohe Ähnlichkeit zum Ursprungsorganismus geeignet. Das Protein wurde bei diesem System durch den Vektor pLDsRed-ACER1 überexprimiert. Dieser wurde in *A. tumefaciens* durch Infiltration der Blätter in *N. benthamiana* eingebracht. Aus den infiltrierten Blättern wurden die Proteine mittels Mikrosomenpräparation extrahiert. Pro Reaktion wurde 1 mg Gesamtprotein in Assaypuffer mit pH-Werten im neutralen (pH 7) sowie im alkalischen (pH 9,1) Bereich resuspendiert. Durch Zugabe der Substrate d18:1-c17:0, d18:0-c18:0 bzw. t18:0-c18:0, welche in einer geringen Menge Ethanol gelöst waren, wurden die drei Reaktionen gestartet. Vor und nach der Inkubation (60 min bei 37 °C) wurden aus den Reaktionsansätzen Lipide extrahiert und der Gehalt an d18:1-c17:0, d18:0-c18:0 bzw. t18:0-c18:0 mittels Q-TOF Direkt-Infusion MS/MS gemessen.

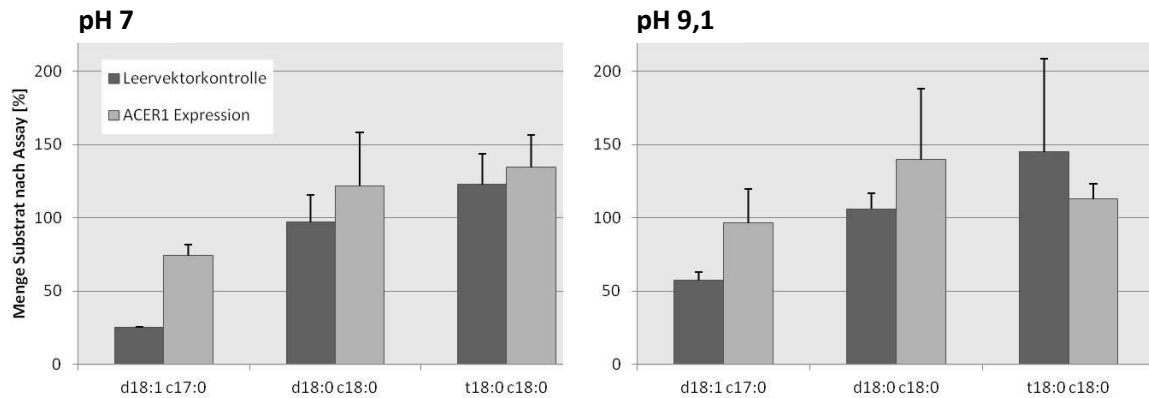


Abbildung 3-10: Enzymtest in *N. benthamiana* bei einem pH-Wert von 7 und 9,1. Dargestellt ist die relative Menge der Substrate (d18:1-c17:0, d18:0-c18:0, t18:0-c18:0) nach dem Versuch. 100 % ist die Ausgangsmenge des Substrats. Die Messung erfolgte durch Direktinfusion MS/MS. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Messungen.

Die Ergebnisse des Enzymassays mit Protein nach Expression in *N. benthamiana* sind in Abbildung 3-10 dargestellt. Vor allem bei der Leervektorkontrolle sieht man eine deutliche Reduzierung des Substrats d18:1-c17:0. Bei pH 7 beträgt die relative Menge dieses Substrats nur noch 20 %, bei einem pH-Wert von 9,1 50 %. Auch die Blätter mit ACER1 Expression zeigen bei pH 7 eine Reduzierung um ca. 25 %. Während die Werte für d18:0-c18:0 und t18:0-c18:0 bei einem pH-Wert von 9,1 um 100 % schwanken, also keine Veränderung festzustellen ist, scheinen die Substrate d18:0-c18:0 und t18:0-c18:0 bei einem pH-Wert von 7 sowohl bei ACER1 Expression als auch bei der Leervektorkontrolle erhöht. Die Leervektorkontrolle zeigt also die höhere Ceramidase-Aktivität bzw. den höheren Substratabbau. Daraus folgt, dass *N. benthamiana* über eine beträchtliche Ceramidase-Hintergrundaktivität verfügt, die durch die ACER1 Expression teilweise unterdrückt wird. Dieses Ergebnis könnte an der Toxizität des neu gebildetet ACER1 Proteins oder an einer reversen Ceramidase-Aktivität von ACER1 liegen. Jedenfalls ist *N. benthamiana* wegen der hohen Hintergrundaktivität für diesen Versuch ungeeignet.

3.2.7 Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus *S. frugiperda*

Ein Nachteil der bakteriellen Expressionssysteme ist die Tatsache, dass Prokaryonten nicht alle Enzyme besitzen, die für die korrekte post-translationale Modifikation benötigt werden. Daher sind viele Proteine funktionsunfähig, wenn sie in einem prokaryotischen System exprimiert werden. Daher wurden eukaryotische Expressionssysteme entwickelt wie Hefen, Pflanzenzellen aber auch Insektenzellen z.B. das Baculovirus Insektenzell Expressions System. Dieses hat, ähnlich wie Hefe, den Vorteil, ein eukaryotisches Umfeld für heterologe Expression zu bieten, welches korrekte posttranslationale Modifikationen ermöglicht. Daher wurde die cDNA von ACER1 in den Baculovirus eingebracht und mit diesem Virus wurden Insektenzellen transfiziert. Diese Insektenzellen wurden kultiviert und daraus Mikrosomen präpariert.

Mit den so gewonnen Proteinen wurde wieder ein Enzymtest durchgeführt. Die Substrate waren d18:1-c17:0, d18:1-h12:0, d18:0-c18:1 und t18:0-c18:0 Ceramide.

Bei diesem Versuchsaufbau wurden die Substrate durch d18:1-h12:0 ergänzt, um zu testen, ob die ACER1 eine Aktivität gegenüber Ceramiden mit mittelkettigen bzw. hydroxylierten Fettsäuren hat. Außerdem wurde d18:1-c18:0 durch d18:1-c18:1 ersetzt, um auch eine Aktivität gegenüber Ceramiden mit ungesättigten Fettsäuren zu untersuchen.

Um den optimalen pH-Wert des Enzyms zu bestimmen, wurden verschiedene pH-Werte getestet. Nach dem Versuch wurde die absolute Menge des Ceramids (des Substrates) bzw. der LCB (des Produkts) bestimmt. Sphingolipide in *S. frugiperda* sind in der Literatur noch nicht beschrieben. Eigene Messungen zeigten, dass die im Ceramidase-Test eingesetzten Ceramid Substrate bzw. die Produkte nicht in den Insektenzellen vorkommen. Daher wurden die Substrate bzw. Produkte nur nach dem Versuch gemessen.

In Abbildung 3-11 sind die Ergebnisse dargestellt. Es wurde für alle Messungen eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Betrachtet man die Ergebnisse der Versuche mit den Substraten d18:1-c17:0 sowie d18:1-h12:0 (Abb. 3-11A-D), so fällt auf, dass bei jedem pH-Wert die Substratmenge nach dem Versuch bei Baculovirus-ACER1 höher ist als bei der Baculovirus Kontrolle. Betrachtet man die LCB d18:1 dieser Versuche, zeigt sich eine höhere Akkumulation bei den Zellen, die nur die Baculoviren Kontrolle exprimieren. Zudem steigt die Menge an an freiem d18:1 mit steigendem pH-Wert. Die Ergebnisse, dass die Gehalte an d18:1-c17:0 und d18:1-h12:0 in ACER1 Proteintests höher, und die an freiem d18:1 geringer sind, könnte auf eine reverse Ceramidase Aktivität von ACER1 hindeuten, wobei d18:1 als bevorzugte LCB als Substrat dienen würde.

Bei den Versuchen mit den Substraten d18:0-c18:1 und t18:0-c18:0 (Abb. 3-11E-H) zeigen sich diese Tendenzen nicht. Die Menge an Ceramid ist nach dem Versuch bei jedem pH-Wert zwischen Baculovirus Kontrolle und Baculovirus-ACER1 ähnlich. Die Menge an LCB ist so gering, dass sie kaum detektierbar ist und große Schwankungen aufweist.

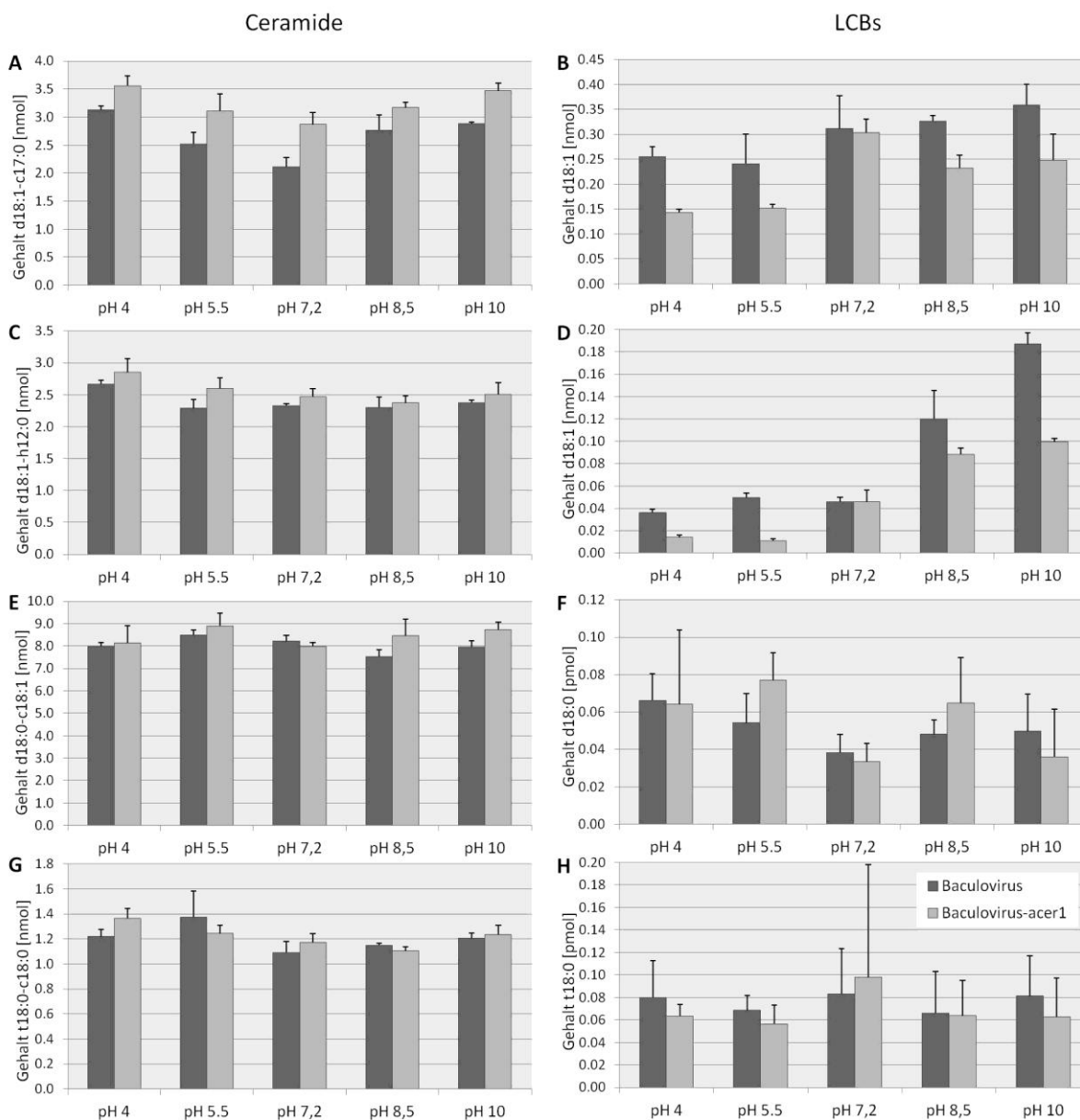


Abbildung 3-11: Ceramidase Ezymtest mit aus *S. frugiperda* isoliertem rekombinanten Protein bei pH-Werten von 4; 5,5; 7,2; 8,5 und 10. Es wurde 1 mg Protein für 1 Stunde inkubiert. Dargestellt ist die absolute Menge an Ceramid (A: d18:1-c17:0, C: d18:1-h12:0, E: d18:0-c18:1, G: t18:0-c18:0) und freie LCBs (B: d18:1, D: d18:1, F: d18:0, H: t18:0), die nach Beendigung des Tests gemessen wurde. Als Kontrolle diente Protein, welches aus Insektenzellen gewonnen wurde, die nur die viralen Proteine exprimieren (Baculovirus leerer Vektor). Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Messungen, gemessen per Direktinfusion MS/MS.

3.3 Ergebnisse von Arbeiten mit Arabidopsis

3.3.1 Expressionsanalyse von *ACER1* in verschiedenen Geweben

Das Gen *ACER1* wird in verschiedenen Geweben von Arabidopsis exprimiert. Genexpressionsanalysen mit Hilfe von Microarrays (AthXpressionist@CSB.DB, The A.thaliana Expression Database) zeigen eine erhöhte Expression in Pollengewebe und in Blüten (Abb. 3-12). Von Laura Strubl durchgeführte RT-PCR Analysen bestätigen die unterschiedliche Expression in verschiedenen Geweben (Strubl, 2012). Auch Wu et al. (2015) detektierte eine hohe Expression von *ACER1* in Pollengewebe.

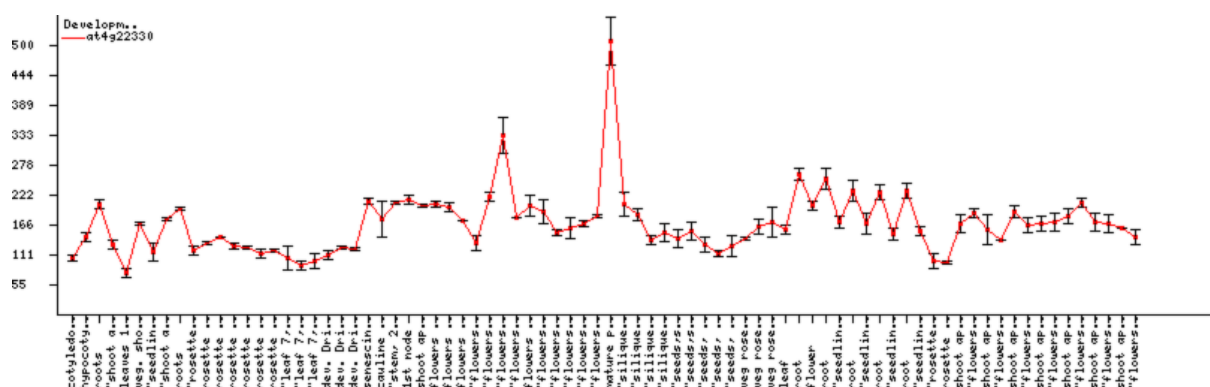


Abbildung 3-12: AtGenExpress-Microarraydaten, Expression von *ACER1* in verschiedenen Organen von Arabidopsis. Die Daten wurden mit der Standard Affymetrix Software GCOS unter Verwendung von einem Richtwert von 100 (tgt100) normalisiert, die Werte zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/>).

3.3.2 Isolation der T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2*

Die Samen von zwei T-DNA Insertionslinien, SAIL 750B06 und Gabi 336G01, die Insertionen am Gen At4g22330 (*ACER1*) tragen, wurden bestellt. Durch die Sequenzierungen der genomischen DNA aus heterozygoten Pflanzen nach PCR mit den entsprechenden Primern wurde die Lage der Insertionsstelle der Linie bestimmt (siehe Abb. 3-13). Die Linie SAIL_750_B06 besitzt (bestätigt anhand eigener Sequenzierungsergebnisse) eine Insertion 289 bp vor dem Startcodon. In der Linie GABI_336G01 ist die Insertion in der 3' untranslatierten Region lokalisiert, genau 45 Nukleotide vom TGA Stopcodon entfernt. Die Samen dieser zwei Insertionslinien wurden ausgesät und die daraus wachsenden Pflanzen durch Genotypisierung mittels PCR auf Homozygotie untersucht. Es wurden bei beiden Linien zunächst über 50 Pflanzen untersucht, aber keine homozygote Pflanze gefunden. Die Pflanzen waren entweder Wildtyp oder heterozygot, die Elternpflanze war daher auch heterozygot. Um festzustellen, aus welchem Grund keine homozygoten Nachkommen gefunden wurden, wurden reziproke Kreuzungen durchgeführt.

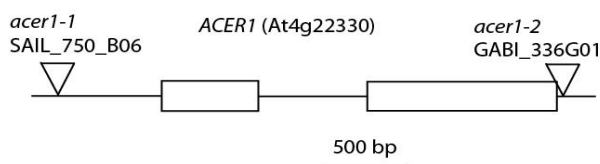


Abbildung 3-13: Schematische Darstellung der Insertionen der beiden T-DNA Insertionslinien von *ACER1*. Exons und Introns sind als Boxen beziehungsweise Linien dargestellt.

3.3.3 Analyse der T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2*

Bei den beiden T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* wurden zunächst keine homozygoten Pflanzen für das Mutantallel gefunden. Diese Veränderung in der Segregation zeigt auf, dass möglicherweise die Insertion gametophytisch letal ist. Daher wurde durch Kreuzen von der heterozygoten T-DNA Insertionslinienpflanze mit dem Wildtyp Col-0 überprüft, ob die Mutation zum Absterben von Pollen oder Ovum führt. Die reziproke Kreuzung wurde in beide Richtungen durchgeführt. Das Schema einer reziproken Kreuzung bei einer pollenletalen Mutation ist in Abbildung 3-14 dargestellt. Das Ergebnis der Kreuzung ist der Tabelle 3-1 zu entnehmen.

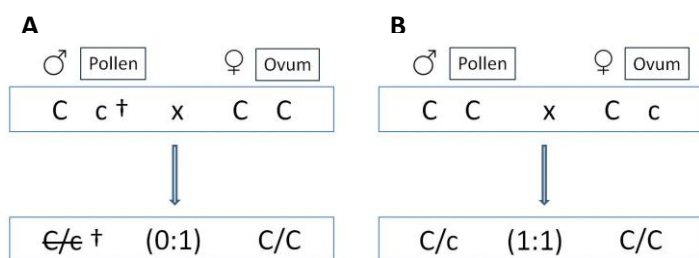


Abbildung 3-14: Schema der reziproken Kreuzung bei einer pollenletalen Mutation. Ist das Merkmal (C) pollenletal, so gibt es bei der Kreuzung von Pollen der heterozygoten Mutante mit dem Ovum des Wildtyps keine heterozygoten Mutanten in der Folgegeneration F1 (A). Wird der Wildtypipollen mit dem Ovum der T-DNA Insertionslinie gekreuzt, so ergibt sich in der Folgegeneration eine gleichmäßige Verteilung von heterozygoten T-DNA-Insertionslinien und dem Wildtyp (B). Bei einer ovumletalen Mutation gibt es bei der Kreuzung von Pollen der heterozygoten T-DNA Insertionslinie mit dem Ovum des Wildtyps eine gleichmäßige Verteilung von heterozygoten T-DNA Insertionslinie und dem Wildtyp in der Folgegeneration F1, wird der Wildtypipollen mit dem Ovum der T-DNA Insertionslinie gekreuzt, so ergibt sich in der Folgegeneration keine heterozygoten T-DNA Insertionslinien (Schema nicht dargestellt).

Tabelle 3-1: Auswertung der reziproken Kreuzungen

parentale Generation		Genotyp F1 Generation	
Ovum	Pollen	heterozygot	Col-0
Col-0	Col-0	0 %	100 %
<i>acer1-1</i>	Col-0	48,6 %	51,4 %
<i>acer1-2</i>	Col-0	42,4 %	57,6 %
Col-0	<i>acer1-1</i>	18,8 %	81,2 %
Col-0	<i>acer1-2</i>	20,8 %	79,2 %

In Tabelle 3-1 sieht man die prozentuale Verteilung der heterozygoten Nachkommen der reziproken Kreuzung. Bei einer Kreuzung von zwei Wildtyp-Pflanzen miteinander gibt es in der F1 Generation nur Wildtypen als Nachkommen. Kreuzt man das Ovum der heterozygoten T-DNA Insertionslinie mit dem Pollen des Wildtyps, so findet man bei beiden Linien ca. 50 % heterozygote Tochterpflanzen. Die Ova der T-DNA Insertionslinien sind daher vollkommen fruchtbar. Wird jedoch der Pollen von der heterozygoten Pflanze genommen und ein Ovum des Wildtyps befruchtet, sinkt die relative Häufigkeit der heterozygoten Nachkommen auf ungefähr 20 %. Bei einer gametophytisch letalen Mutation gäbe es bei einer der zwei Kreuzungsrichtungen allerdings keine heterozygote T-DNA Insertionslinie in der F1 Generation. Da dies hier nicht der Fall ist, sind die T-DNA Insertionen nicht gametophytisch letal. Die Analyse der Pollenfertilität zeigt allerdings auf, dass die Transmission des *acer1-1* oder *acer1-2* Null Genotypes durch den haploiden Pollen stark beeinträchtigt ist. Der Pollen, der das *acer1-1* oder *acer1-2* Mutantenallel trägt, zeigt eine verminderte Effizienz zur Befruchtung eines Ovum und dadurch zur Erzeugung von heterozygoten Nachkommen.

3.3.3.1 Pollenvitalitätstest

Um einen genaueren Einblick in die Vitalität der Pollen der T-DNA Insertionslinien zu erhalten, wurden die Pollenstände des Wildtyps sowie der T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* untersucht. Sie wurden mittels der Alexander Färbung gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert (Abb. 3-15). Die Wildtypantheren beinhalten nur violett gefärbte, d.h. lebensfähige Pollen, während beide T-DNA Insertionslinien grün gefärbte Pollen aufweisen, die sich auch in der Form von den vitalen runden Pollen unterscheiden. Sie sind nicht kugelförmig sondern abgeflacht oder ganz in sich zusammengefallen.



Abbildung 3-15: Alexander Färbung der Antheren aus heterozygoten *acer1-1* und *acer1-2* Pflanzen. Im Vergleich zum Wildtyp, welcher nur lebensfähige Pollen (violett) besitzt, besitzen die Antheren der beiden T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* nichtlebensfähige Pollen (grün).

3.3.3.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Um ein noch genaueres Bild der Pollen von Wildtyp Col-0 und den *acer1-1* und *acer1-2* T-DNA Insertionslinien zu erhalten, wurden diese unter dem Elektronenmikroskop betrachtet (Abb. 3-16). Es bestätigte sich das Bild, dass die beiden T-DNA Insertionslinien anormale Pollen aufweisen. Die Linie *acer1-2* scheint morphologisch mehr beeinträchtigt zu sein als die Linie *acer1-1*, sie weist mehr und stärker geschrumpelte Pollen auf.

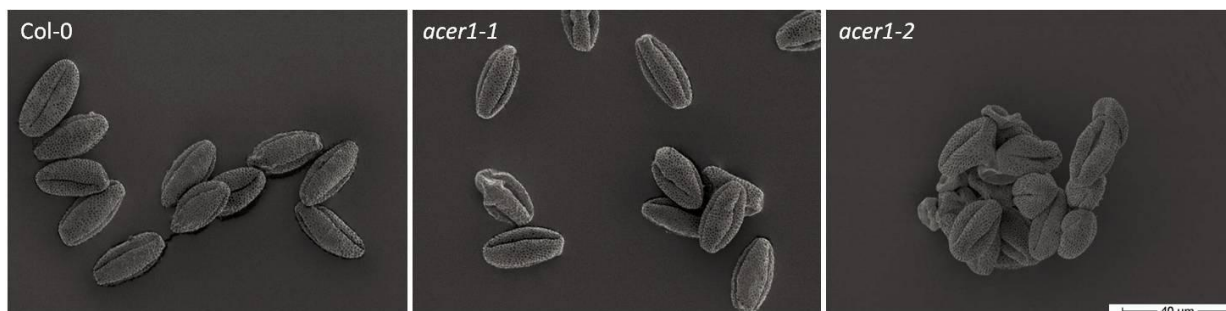


Abbildung 3-16: Rasterelektronen-mikroskopische Aufnahmen von Pollen von Col-0 und den beiden heterozygoten T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2*.

3.3.3.3 Samenanalyse

Die heterozygoten Pflanzen der T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* besitzen fortpflanzungsfähige Pollen und Ovarien, allerdings ist die Vitalität der Pollen eingeschränkt. Da allerdings zunächst keine homozygoten Nachkommen gefunden wurden, könnte es im Laufe der Embryonalentwicklung bzw. Samenentwicklung zu einem Abort der homozygoten Nachkommen kommen. Das bedeutet, dass nach erfolgreicher Befruchtung die Embryonalentwicklung in einem bestimmten Stadium arretiert. Aus diesem Grund wurden die Schoten bzw. die sich darin befindlichen Samen untersucht. In Abbildung 3-17 ist der Unterschied von normalen zu aberranten Samen dargestellt (nach seedgenes.org). Normal entwickelte, noch unreife Arabidopsissamen haben 10 Tage nach Befruchtung eine kräftige grüne Farbe. Aberrante Samen sind kleiner und haben eine hellere Farbe (weißlich bis hellgelb). Zudem zählen unbefruchtete Ova zu aberranten Samen, die anstelle eines normalen Samens einen kleinen weißen Gewebelappen aufweisen. Der Begriff aberrant steht also für abortierte, befruchtete, sowie unbefruchtete Samen. Um festzustellen, wie vital die Samen von heterozygoten Pflanzen der *acer1-1* und *acer1-2* Linien gegenüber dem Wildtyp sind, wurden die Schoten geöffnet und die Anzahl von lebensfähigen (normalen) und aberranten Samen bestimmt (Abb. 3-18). Abortierte, befruchtete Samen sind vor allem bei der Linie *acer1-1* zu finden, während die Linie *acer1-2* vorwiegend unbefruchtete Samen aufweist (Abb. 3-17, Abb. 3-18A).

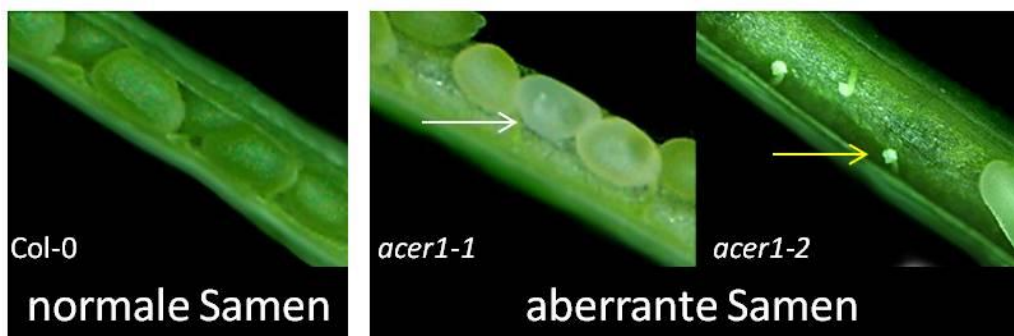


Abbildung 3-17: Normale und abnorme Samen in Wildtypschoten und heterozygoten Schoten von *acer1-1* und *acer1-2*. Normal entwickelte noch unreife Arabidopsissamen (10 Tage nach Befruchtung) haben eine kräftige grüne Farbe. Abnorme Samen sind hellgrün oder weißlich und oft kleiner als normale Samen (weißer Pfeil), vor allem bei der T-DNA Insertionslinie *acer1-1* zu finden; wurde das Ovum nicht erfolgreich befruchtet entwickelt sich kein Samen (gelber Pfeil), vor allem bei der T-DNA Insertionslinie *acer1-2* zu finden.

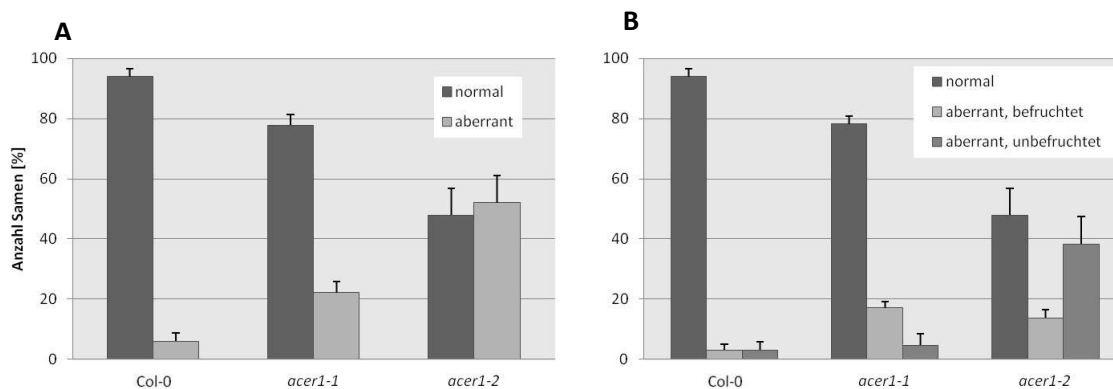


Abbildung 3-18: Samenanalyse in Schoten von Wildtyp und heterozygoten *acer1-1* und *acer1-2* Pflanzen. Dargestellt ist die relative Anzahl der normalen Samen gegenüber abnormer Samen, (A) zusammengefasst sowie (B) aufgeteilt in befruchtete und unbefruchtete Samen 10 Tage nach Befruchtung. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 30 Schoten.

Während der Wildtyp nur 6 % an abnormen Samen aufweist, finden wir bei den beiden T-DNA Insertionslinien mehr. Beide T-DNA Insertionslinien unterscheiden sich voneinander. Während *acer1-1* nur 22 % abnorme Samen besitzt, sind es bei *acer1-2* 52 %. Die T-DNA Insertionslinien unterscheiden sich auch darin, in welchem Stadium die Samen-Entwicklung stoppt. Während bei *acer1-1* überwiegend abortierte, befruchtete Samen auftreten, sind es bei *acer1-2* vor allem unbefruchtete Samen (Abb. 3-18B). Die Entwicklung von Samen bei *acer1-2* scheint in einem früheren Stadium betroffen zu sein als bei *acer1-1*. Bei *acer1-2* kommt es durch die defekten Pollen zu weniger erfolgreichen Befruchtungen, es findet also in vielen Fällen gar keine Embryonalentwicklung statt.

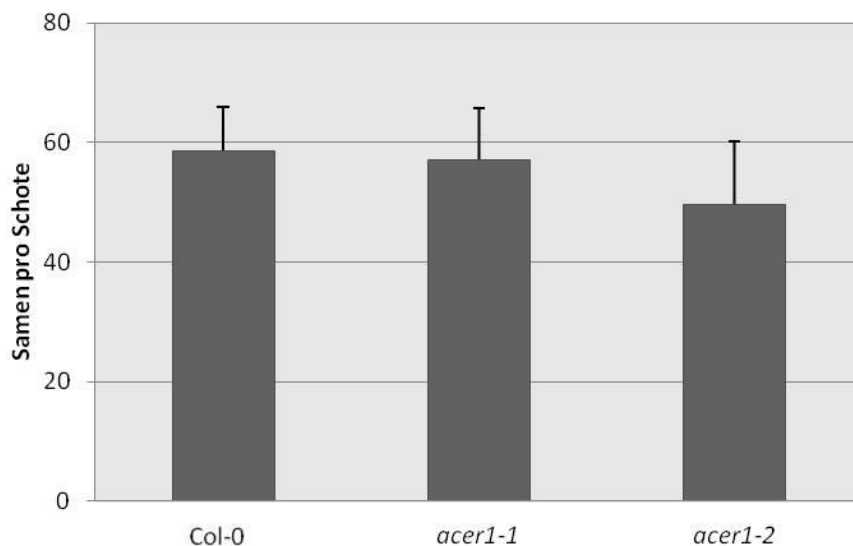


Abbildung 3-19: Anzahl normal entwickelter Samen pro Schote in Wildtyp und heterozygoten T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2*. 10 Tage nach Befruchtung. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 30 Schoten.

Obwohl die Linie *acer1-2* eine leichte Reduzierung der Samenanzahl aufweist, ist die Samenanzahl in einer Schote durch die T-DNA Insertion der Linien *acer1-1* und *acer1-2* nicht signifikant beeinträchtigt, wie in Abbildung 3-19 zu erkennen ist. Das Wachstum und die Entwicklung der heterozygoten Pflanzen weist keinen Unterschied zum Wildtyp auf. Sporophytisch konnte also kein Unterschied der heterozygoten T-DNA Insertionslinien zum Wildtyp festgestellt werden. Allein gametophytisch und während der Samenentwicklung unterscheiden sich die T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* vom Wildtyp und zwar durch die beeinträchtigte Transduktion des Mutantenallels (verringerte Vitalität haploider Mutantenpollen) sowie durch die erhöhte Letalität der Embryonen. Es liegt nahe anzunehmen, dass es sich bei den aberranten Samen in den Schoten einer heterozygoten Linie um die homozygoten Mutanten handelt.

Ein erneutes detailliertes Screening von segregierenden Pflanzen ergab letztendlich die Identifizierung je einer homozygoten Pflanze der T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* (Abb. 3-20). Da durch das Screening nur jeweils eine homozygote Pflanze identifiziert wurde, liegt das Verhältnis weit unter 25 % und entspricht somit nicht der 2. Mendelschen Regel. Die homozygoten Pflanzen zeigen im Vergleich zum Wildtyp einen zwergartigen Wuchs. Die homozygote Pflanze der *acer1-2* T-DNA Insertionslinie ist dabei kleinwüchsiger als die homozygote Pflanze der *acer1-1* T-DNA Insertionslinie. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden keine weiteren Versuche durchgeführt.

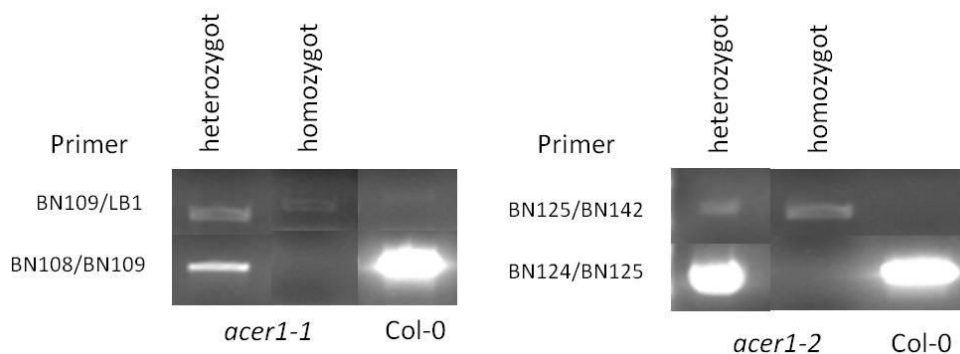


Abbildung 3-20: PCR Analyse zur Genotypisierung der T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2*. BN109/LB1 bzw. BN125/BN142 amplifizieren das Insertfragment, BN108/BN109 bzw. BN124/BN125 amplifizieren das genomische Fragment. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt

3.3.4 Komplementation der T-DNA Insertionslinie *acer1-1*

Durch den Transfer der CDS von *ACER1* in eine heterozygote Pflanze der *acer1-1* T-DNA Insertionslinie wurde eine Komplementation der T-DNA Insertion erzeugt. Dies geschah durch die Klonierung der *ACER1* CDS in den Vektor pLDsRed (pLDsRed-*ACER1*) mit einem 35S Promoter und die anschließende Transformation der heterozygoten T-DNA Insertionslinie *acer1-1*. Die durch DsRed selektierten Transformanten wurden per Genotypisierung (PCR von genomischer DNA) nach Homozygotie für das Gen *ACER1* gescreent. Wie in Abbildung 3-21 zu erkennen ist, konnte eine homozygote *acer1-1* Pflanze identifiziert werden, nachdem die *ACER1* CDS in das Genom integriert wurde (Linie: *acer1-1/acer1-1 35S:ACER1*).

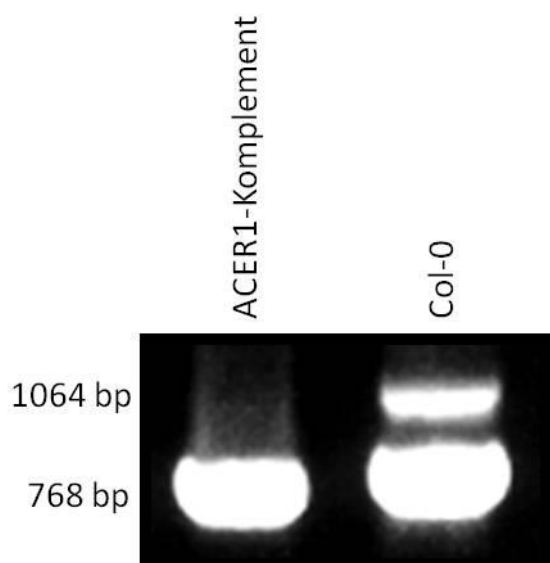


Abbildung 3-21: PCR Analyse von der komplementierten Linie (ACER1-Komplement) und Wildtyp (Col-0). Die heterozygote *acer1-1* T-DNA Insertionslinie wurde mit dem Wildtyp *ACER1* cDNA unter Kontrolle des 35S Promoters transformiert und aus den Nachkommen eine Linie isoliert, die homozygot für die *acer1-1* Mutation ist. Die PCR wurde mit genspezifischen Primern für *ACER1* durchgeführt. 1064 bp: PCR-Produkt in der Größe des Gens, 768 bp: PCR Produkt in der Größe der coding Sequence). Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

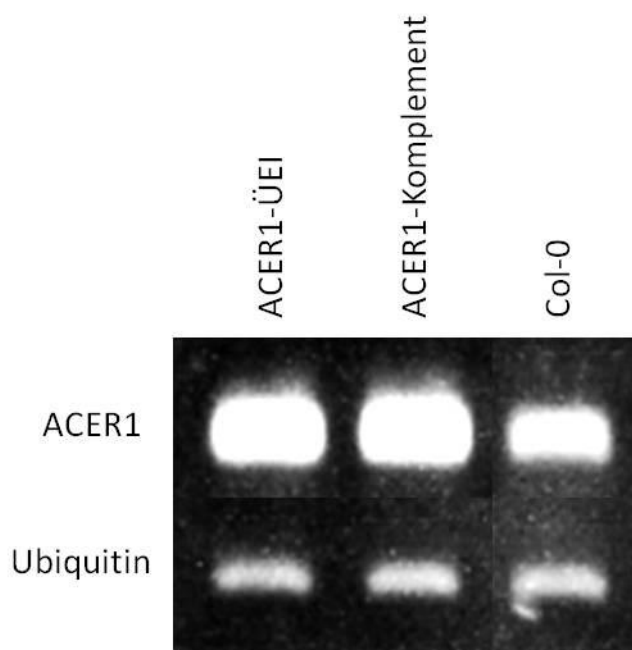


Abbildung 3-22: RT-PCR-Expressionsanalysen einer Überexpressionslinie (*ACER1*-ÜEI, Linie WT 35S:*ACER1*, siehe 3.3.5), der komplementierten T-DNA Insertionslinie (*ACER1*-Komplement) und des Wildtyps (Col-0). Die semiquantitative RT-PCR wurde mit cDNA aus Blättern und genspezifischen Primern für *ACER1* und mit Primern für das housekeeping Gen Ubiquitin durchgeführt. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Ein Expressionvergleich der Linie *ACER1*-Komplement mit einer Überexpressionslinie (Linie: WT 35S:*ACER1*), die in Abschnitt 3.3.5 beschrieben wird, und dem Wildtyp (Abb. 3-22) zeigt, dass *ACER1* in den transgenen Linien viel stärker exprimiert wird als im WT.

Das Wachstum der komplementierten Linie (*acer1-1/acer1-1* 35S:*ACER1* bzw. *ACER1*-Komplement) unterscheidet sich weder vom Wildtyp noch von den heterozygoten T-DNA Insertionslinien (*acer1-1/ACER1*, *acer1-2/ACER1*). Er unterscheidet sich aber von dem homozygoten Pflanzen der T-DNA Insertionslinien, da die komplementierten Pflanzen keinen Zwergwuchs mehr aufweisen sondern einen wildtypähnlichen Phänotyp. Eine Analyse der Pollen der komplementierten Linie wurde von Laura Strubl in unserem Labor durchgeführt (Strubl, 2012). Die Untersuchungen zeigten, dass es immer noch Defizite in der Fertilität gibt. Allerdings ist die Aberrationsrate nicht mehr so hoch wie bei den heterozygoten Linien. Dies kann allerdings daran liegen, dass die komplementierte Linien noch nicht homozygot integriert ist und daher segregiert, bzw. daran dass der 35S Promoter während der Pollenentwicklung nicht zu einer adäquaten Expression von *ACER1* führt.

3.3.5 Überexpression von *ACER1* in *Arabidopsis* unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors

Um aufzuklären, ob eine Überexpression von *ACER1* zu einer Reduktion von Ceramid oder einer sonstigen Veränderung im Sphingolipidmuster führt, wurde *ACER1* in *Arabidopsis* überexprimiert. Dazu wurde das Konstrukt pLDsRed-*ACER1* verwendet, welches den 35S Promoter mit der *ACER1* cDNA enthält und auch zur Komplementierung von *acer1-1* genutzt wurde. Das Konstrukt wurde in *Arabidopsis* Wildtyppflanzen mittels *A. tumefaciens* vermitteltem Gentransfer transferiert. 3 unabhängige Überexpressionslinien wurden generiert. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Expression des Gens *ACER1* bei den 3 transgenen Linien erhöht. Das Wachstum der Überexpressionslinien unterscheidet sich nicht vom Wildtyp, genau wie das der komplementierten Linie (Strubl, 2012). Die Überexpression von *ACER1* könnte zur Verminderung des Ceramidgehalts führen, weil *ACER1* sequenzähnlich zu alkalischen Ceramidasen ist. Veränderungen im Ceramid- bzw. Sphingolipidmuster sollen mit Hilfe von Lipidanalysen aufgezeigt werden. Die Ergebnisse der Messung der Sphingolipide sind in Abschnitt 3.3.8 dokumentiert.

3.3.6 Silencing von *ACER1* mittels RNAi-(RNA Interferenz-)Expression

Um Pflanzen zu untersuchen, die defizient in der Expression von *ACER1* sind, wurde die *ACER1* Expression des Wildtyps mittels Transformation mit einem RNAi-Konstrukt herunter reguliert. Dafür wurde eine kurze Sequenz aus der cDNA von *ACER1* in den RNAi-Vektor pFGCGW-des-red (Edgar Cahoon) kloniert. Mit diesem Konstrukt wurden der Wildtyp mit Hilfe von *A. tumefaciens* transformiert. Die transformierten Samen wurden durch DsRed-Fluoreszenz selektiert und danach ausgesät. Es wurden 3 Linien ausgewählt, die nach Analyse mit semiquantitativer RT-PCR eine Reduktion der Expression des Gens *ACER1* aufweisen (Abbildung 3-23).

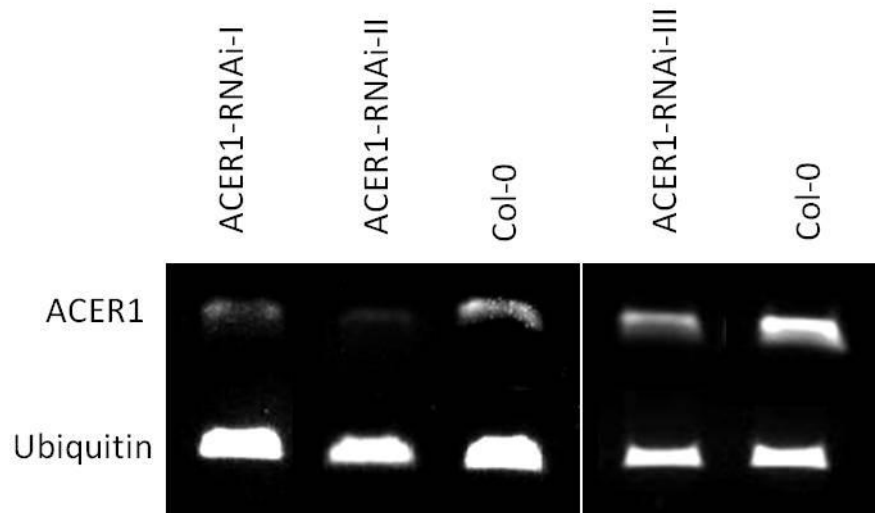


Abbildung 3-23: RT-PCR-Expressionsanalysen von RNAi-Linien (RNAiI – RNAiIII) und dem Wildtyp. Die semiquantitative RT-PCR wurde mit genspezifischen Primern für *ACER1* und dem housekeeping Gen Ubiquitin durchgeführt. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Abbildung zeigt zwei verschiedene Agarose-Gele mit unterschiedlichem Färbungsgrad.



Abbildung 3-24: Wachstum von 3 unabhängigen RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Das Foto zeigt den Wildtyp Col-0 und 3 transgene RNAi-Linien. Die Pflanzen sind 5 Wochen alt.

Die Linien mit herunterregulierter *ACER1* Expression zeigen einen auffälligen Wachstumsphänotyp (Abbildung 3-24). Sie wachsen langsamer und bleiben kleiner als der Wildtyp. Ihre Schoten sind kleiner und beinhalten weniger Samen. Die einzelnen Linien unterscheiden sich auch untereinander. Linie RNAi-II ist am meisten beeinträchtigt. Sie zeigt den kleinsten Wuchs und produziert die wenigsten Samen. Dagegen zeigt Linie RNAi-III einen Wildtyp-ähnlichen Wuchs. Der Wachstumsphänotyp korreliert mit der Reduktion der *ACER1* Genexpression.

3.3.7 Ceramidasetests mit Proteinextrakten aus Arabidopsisblättern

Um festzustellen, ob die Ceramidase-Aktivität im Wildtyp Col-0 nachweisbar ist, wurden aus Blättern Mikrosomen präpariert. Pro Reaktion wurde davon 1 mg Gesamtprotein in Assaypuffer mit pH-Werten im neutralen (pH 7) sowie im alkalischen (pH 9) Bereich resuspendiert. Durch Zugabe des Substrats d18:1-c17:0, welches in einer geringen Menge Ethanol gelöst war, wurde die Reaktion gestartet. Dieses Ceramid, welches in Pflanzen selbst nicht vorkommt, sollte durch Ceramidaseaktivität in seine zwei Bestandteile, eine freie Fettsäure (c17:0) sowie eine Sphingoidbase (d18:1), abgebaut werden. Vor und nach der Inkubation (60 min bei 37 °C) wurden aus den Reaktionsansätzen Lipide extrahiert und der Gehalt an d18:1-c17:0 mittels Direktinfusion MS/MS gemessen. Das relative Verhältnis von Ceramid vor und nach der Inkubation (100 % ist die Menge Ceramid vor der Inkubation) ist in Abb. 3-25 dargestellt.

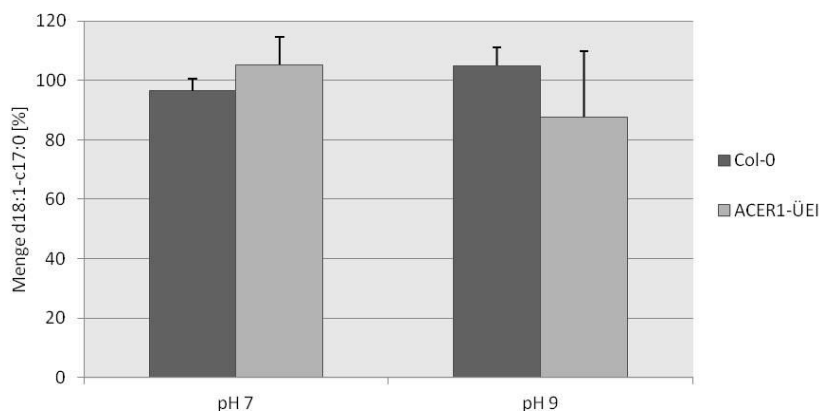


Abbildung 3-25: Enzymtest von Col-0 und einer Überexpressionslinie mit dem Substrat c18:1-c17:0 bei den pH Werten 7 und 9. Dargestellt ist die relative Menge des Substrats (d18:1-c17:0) nach dem Versuch. 100 % ist die Ausgangsmenge des Substrats. Die Messung erfolgte durch Direktinfusion MS/MS. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Messungen.

Nach der Inkubation schwankt der relative Gehalt von Ceramid um 100 %. Daher zeigt sich weder beim Wildtyp noch bei der Überexpressionslinie eine signifikante Reduzierung der Substratmenge. Da die Substratspezifität des Enzyms nicht bekannt ist, wurden in einer weiteren Versuchsreihe weitere Substrate angeboten. In folgendem Versuch wurden neben d18:1-c17:0 auch

d18:0-c18:0 und t18:0-c18:0 als Substrate verwendet. Es wurde genau wie beim vorigen Versuch beschrieben vorgegangen. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 3-26 dargestellt.

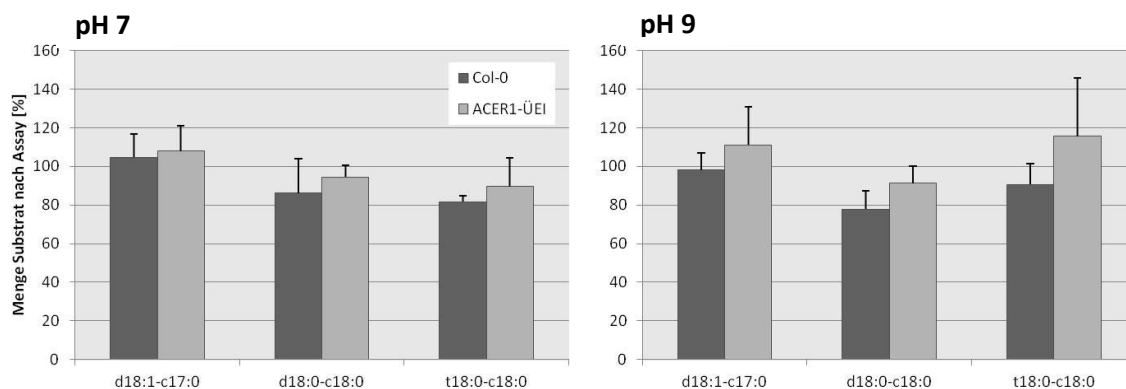


Abbildung 3-26: Enzymaktivitätstest von Wildtyp Col-0 und einer Überexpressionslinie (ACER1-ÜEI) mit 3 verschiedenen Substraten bei pH-Werten von 7 und 9. Dargestellt ist die relative Menge der Substrate (d18:1-c17:0, d18:0-c18:0, t18:0-c18:0) nach dem Versuch. 100 % ist die Ausgangsmenge des Substrats. Die Messung erfolgte durch Direktinfusion MS/MS. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Messungen.

Bei einem pH Wert von 7 zeigte sich keine Reduzierung des Substrats d18:1-c17:0, dafür eine leichte Reduzierung des Substrats d18:0-c18:0 um 10 bis 15 % und t18:0-c18:0 um 15 bis 20 % in Assays mit Proteinen aus Col-0 und ACER1-ÜEI. Bei einem pH-Wert von 9 ist die Menge von d18:1-c17:0 bei der Überexpressionslinie auf ca. 110 % leicht gestiegen. Die Menge an d18:0-c18:0 bei pH 9 ist wie bei einem pH-Wert von 7 leicht reduziert, und zwar um 10 bis 20 %. Während die Menge an Substrat beim Wildtyp nach dem Assay reduziert ist, zeigt sich bei der Überexpressionslinie eine Erhöhung auf knapp 120 %. Bei der Überexpressionslinie fällt auf, dass bei jedem pH-Wert und jedem eingesetztem Ceramid nach dem Versuch mehr Substrat vorhanden ist als beim Wildtyp. Es zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der Aktivität mit Proteinextrakten aus Wildtyp und Überexpressionslinie.

3.3.8 Quantifizierung von Ceramid und Glukosylceramid in Arabidopsisblättern

Es könnte sein, dass die verschiedenen Arabidopsislinien eine Veränderung des Sphingolipidmusters aufweisen. Daher wurden Ceramide und Glukosylceramide aus Blättern isoliert und analysiert.

3.3.8.1 Ceramid

Es wurde sowohl der Gesamtceramidgehalt (Abb. 3-27) als auch der Gehalt der einzelnen Ceramide analysiert (Abb. 3-28). Durch den Verlust der Gewichtsangaben der Wildtyp Col-0 Proben können leider nur beim relativen Gehalt die Werte des Wildtyps angegeben werden. Da sich die komplementierte Linie (*ACER1*-Komplement) ähnlich wie der Wildtyp verhält, dienen die Werte dieser Linie in diesem Fall als Vergleichswert.

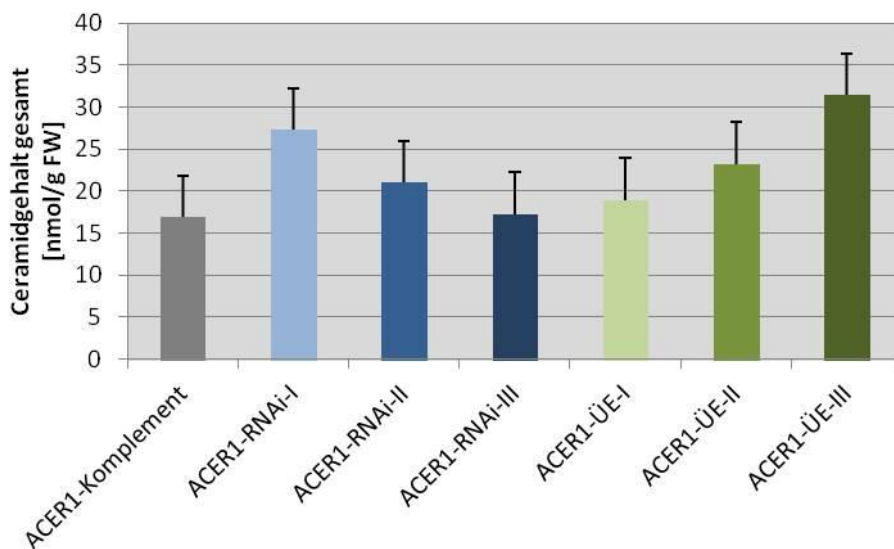


Abbildung 3-27: Ceramidgehalt in Arabidopsisblättern von Linien mit veränderter *ACER1* Expression. Die Messung erfolgte durch LC-MS/MS Analyse von Lipidextrakten aus Blättern. Dargestellt ist die Gesamtmenge in nmol/g FW. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 5 Messungen.

Der Ceramidgehalt der Linien schwankt zwischen 17 und 31 nmol/mg FW. Dabei zeigt sich keine eindeutige Tendenz der jeweiligen Linien. Die Ceramid-Messwerte der RNAi- als auch der Überexpressionslinien sowie die der die komplementierten Linie schwanken in diesem Bereich.

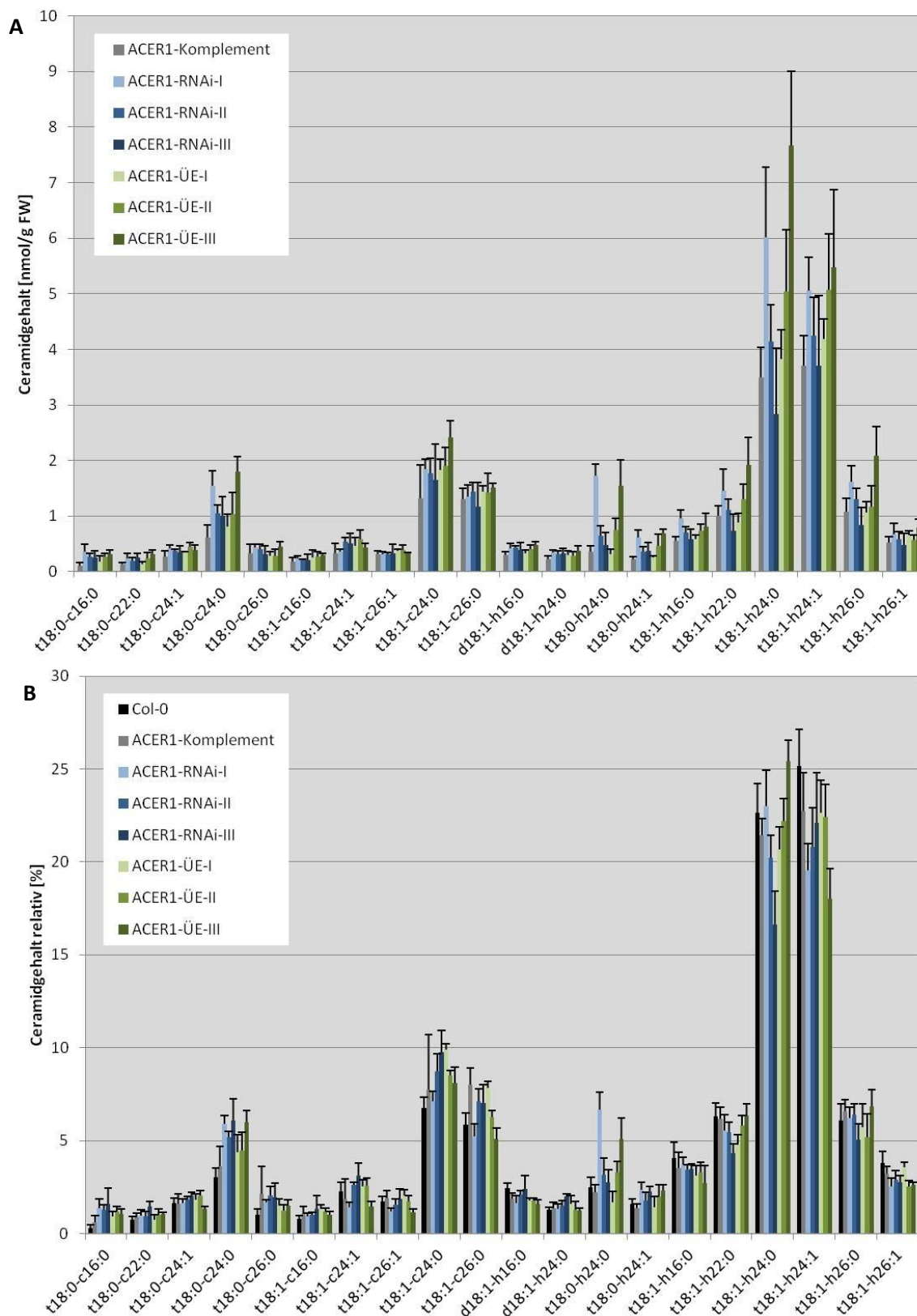


Abbildung 3-28: Molekulare Spezies-Zusammensetzung von Ceramid in Arabidopsisblättern von Linien mit veränderter *ACER1* Expression, dargestellt ist die Menge der 20 häufigsten Ceramide in Arabidopsisblättern in nmol/g FW (A) bzw Prozent (B). Die Messung erfolgte durch LC-MS/MS Analyse von Lipidextrakten aus Blättern. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 5 Messungen.

Auch bei der Betrachtung der 20 häufigsten Ceramide (Abb. 3-28) zeigt sich keine eindeutige Tendenz, sondern Schwankungen zwischen den Linien mit der gleichen genetischen Veränderung. Die Linien RNAi-I und ÜE-III zeigen eine signifikant erhöhte Menge an t18:0-h24:0 im Vergleich zu den anderen Linien, die Linien RNAi-II, RNAi-III, ÜE-I, ÜE-II allerdings nicht. Insbesondere würde man gegenläufige Veränderungen im Ceramid-Gehalt erwarten, d.h. eine Erhöhung in den RNAi-Linien (wegen verringerter Ceramidase-Aktivität).

Betrachtet man die relativen Ceramidmengen der Molekularen Spezies der einzelnen transgenen Linien und des Wildtyps (Abb. 3-28B), fällt auf, dass die Linien sich nicht so sehr in der Komposition unterscheiden, wie sie sich im Gehalt (Abb. 3-28A) unterscheiden. Allerdings fällt auch in der relativen Betrachtung auf, dass RNAi-I und OE-III fast doppelt soviel t18:0-h24:0 besitzen als der WT.

3.3.8.2 Glukosylceramid

Auch bei den Glukosylceramiden wurde sowohl der Gesamtgehalt (Abb. 3-29), als auch der Gehalt der einzelnen Glukosylceramide analysiert (Abb. 3-30).

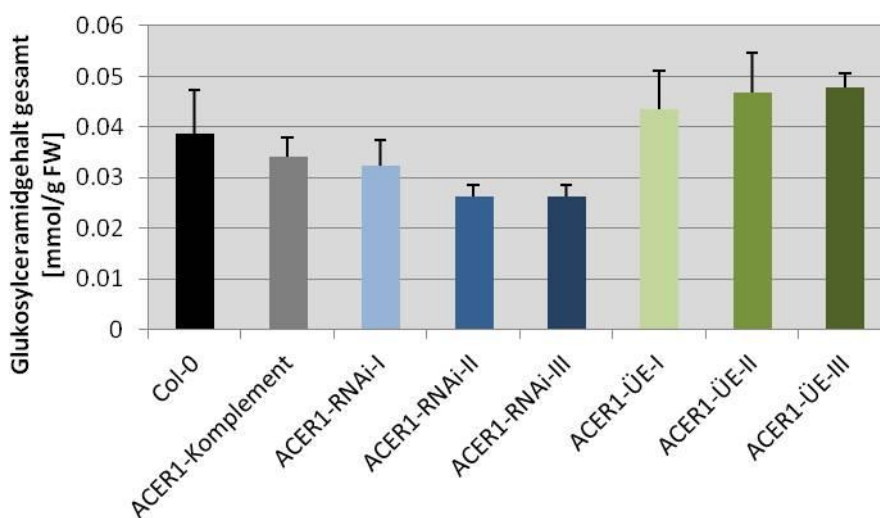


Abbildung 3-29: Glukosylceramidmenge in Arabidopsisblättern von Wildtyp und ACER1-Linien. Dargestellt ist die Gesamtmenge in mmol/g FW, gemessen durch Direktinfusion MS/MS von Lipidextrakten aus Blättern. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 5 Messungen.

Die Auswertung der Gesamtglukosylceramidmenge (Abb. 3-29) zeigt, dass der Gehalt von der genetischen Veränderung abhängig ist. Alle Überexpressionslinien zeigen einen erhöhten, alle RNAi-Linien einen reduzierten Wert im Vergleich zum Wildtyp und zur komplementierten Linie. Diese Feststellung bestätigt sich durch den Blick auf die einzelnen molekularen Spezies der Glukosylceramide (Abb. 3-30).

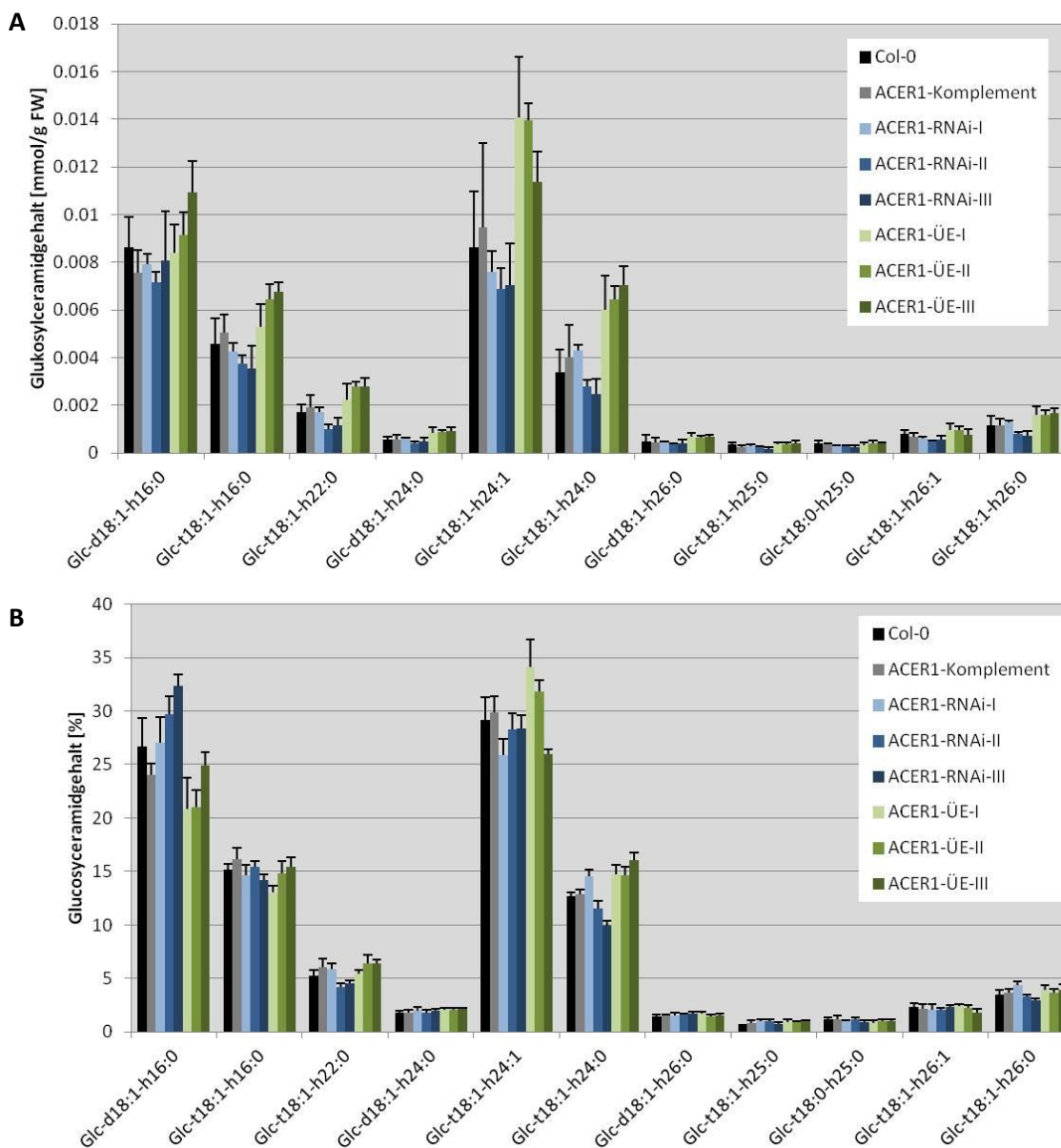


Abbildung 3-30: Glukosylceramidmenge in Arabidopsisblättern von Wildtyp und *ACER1*-Linien. Dargestellt ist die Menge der 11 detektierten Glukosylceramide in Arabidopsisblättern in mmol/g FW (A) bzw Prozent (B), gemessen durch Direktinfusion MS/MS von Lipidextrakten aus Blättern. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von 5 Messungen.

Betrachtet man die relativen Werte (Abb. 3-30B), so zeigt sich keine starke Veränderung im Verteilungsmuster der molekularen Spezies. Glc-d18:1-h16:0, eines der zwei häufigsten Glukosylceramide, ist prozentual in den RNAi-Linien mehr vorhanden als in den Überexpressionslinien. Die einzelnen Linien unterscheiden sich vor allem in der Menge und weniger in der Komposition der molekularen Spezies.

4 Diskussion

Sphingolipide dienen in Säugetieren als Signalmoleküle in der Regulation von Apoptose, Zellproliferation, Zellmigration, Seneszenz und Entzündung und wurden daher bereits intensiv erforscht (Hannun und Luberto, 2000, Hannun und Obeid, 2008). Ceramide sind dabei ein wichtiges Zwischenprodukt in der Sphingolipidbiosynthese (Hannun and Obeid, 2008). Endogene Ceramidegehalte werden durch Enzyme wie Ceramidsynthasen, Ceramidasen, Ceramidkinasen, Glukosylceramidasen und Inositolphosphorylceramidasen reguliert (Chen et al. 2009). Ceramidasen hydrolysieren Ceramide in LCBs und freie Fettsäuren. In Säugetieren agieren sie als Hauptregulatoren in der Sphingolipidhomöostase. Über ihre Rolle in Pflanzen ist bis jetzt wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde die putative alkalische Ceramidase *ACER1* aus *Arabidopsis* untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse geben Einsicht in die komplexe Netzwerk der Synthese und Funktion der Sphingolipide und ihrer Wechselwirkungen in der pflanzlichen Zelle.

4.1 Expression von *ACER1* beeinflusst die Pollen- und Pflanzenentwicklung

ACER1 ist ein *Arabidopsis*gen, welches Sequenzähnlichkeit zu den zwei alkalischen Ceramidasen YPC1 und YPD1 aus *S. cerevisiae* zeigt. Diese beiden Enzyme wurden bereits gut untersucht (Mao et al. 2000a,b). Die Sequenzähnlichkeit zu den alkalischen Ceramidasen aus *S. cerevisiae* deutet auf die Funktion als alkalische Ceramidase hin. Die 5 errechneten Transmembrandomänen und die Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (Marion et al. 2008) deuten darauf hin, dass sich das Enzym in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befindet. Die T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* der potentiell alkalischen Ceramidase sind in der Pollenentwicklung beeinträchtigt. Dies ist der Fall, obwohl die Insertionen vor bzw. nach dem ORF liegt. Codiert *ACER1* für eine alkalische Ceramidase würde dies bedeuten, dass entweder die Akkumulation von Ceramid oder die Abwesenheit der Spaltprodukte, also der langkettigen Base oder der Fettsäure, Ursache für die Beeinträchtigung der Pollenentwicklung von der Linien *acer1-1* und *acer1-2* ist.

Die hohe Expression im Pollengewebe deutet außerdem auf eine Funktion in der Pollenentwicklung in. Wie schon erwähnt, sind die Pollen von den heterozygoten T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* beeinträchtigt. Sie sind aberrant und in der Transmission des *acer1* Mutationen genotypes durch haploide Pollen beeinträchtigt. Daher ist die Vitalität von *acer1* Pollen stark reduziert. Morphologisch kann man den Pollen in zwei verschiedene Klassen einteilen. Es gibt vitalen Pollen, der im Vitalitätstest rund und violett erscheint und aberranten Pollen, der

grünlich, in sich zusammengefallen oder verschrumpelt ist. Diese Aberranz in der Morphologie deutet stark auf eine Befruchtungsunfähigkeit dieses Pollens hin. Der aberrante Pollen ist bei den T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp in erhöhter Menge vorhanden. Nach der 2. Mendelschen Regel müssten in der F1 Generation bei Selbstung einer heterozygoten Pflanze einer T-DNA Insertionslinie 25 % der Nachkommen homozygot für das Mutantallel sein. Daneben müssten 50 % der Pflanzen heterozygot und 25 % homozygot sein. Durch die reduzierte Pollenfertilität zeigt das Segregationsschema von *acer1-1* und *acer1-2* eine veränderte Gewichtung auf, es gibt nur vereinzelt homozygote Nachkommen. Daher wurden auch erst nach einem erneuten detaillierten Screening homozygote Pflanzen identifiziert. Aus diesem Grund konnten diese Mutanten im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr analysiert werden.

Sphingolipide sind Bestandteile des Membransystems der Pflanzenzelle, z.B. der Plasmamembran, des Tonoplasten, der Golgimembranen und des Endoplasmatischen Retikulums (Markham et al. 2006). Kleinste Veränderungen in der Zusammensetzung einer Membran können ihre Permeabilität verändern und sie somit durchlässiger machen. Ein intaktes Membransystem ist allerdings essentiell für das Überleben der Zelle. Hier wäre es interessant zu sehen, ob sich die Membran des Pollens durch die T-DNA Insertion von *acer1-1* und *acer1-2* verändert hat. Eventuell ist auch die Tryphine, eine aus Lipiden bestehende extrazelluläre Pollenschicht, beeinträchtigt. Die Tryphine spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Pollen-Stigma-Kommunikation (Preuss et al. 1993). Ob Sphingolipide Bestandteil der Tryphine sind, ist noch nicht geklärt, das Vorhandensein von Sphingolipiden in Pollen und ihre Zusammensetzung ist allerdings bereits gut untersucht (Luttgeharm et al. 2015).

Der Pollenvitalitätstest zeigte bei den zwei T-DNA Insertionslinien vermehrt aberrante Pollen. Dies könnte auf die veränderte Sphingolipidzusammensetzung in der Plasmamembran der Pollen zurückgeführt werden. Oder darauf, dass die veränderten Mengen der einzelnen Sphingolipidklassen HR (hypersensitive Response) bzw. PCD (Programmed cell death) hervorgerufen haben könnten. Die Arabidopsismutante *acd5* beweist, dass Ceramid HR und den damit verbundenen PCD fördern (Liang et al. 2003). Die *acd5* Mutante ist defizient in der Ceramidkinaseaktivität und zeigt Ceramidakkumulation, erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und frühzeitigen Apoptose-ähnlichen Zelltod.

Bei einer Komplementation bzw. einer Überexpression wird in der Zelle vermehrt mRNA des Gens synthetisiert. Ziel der Erzeugung dieser Linien ist es, eine artifiziell erhöhte Proteinmenge von ACER1 zu produzieren. Die komplementierte Linie sowie die drei Überexpressionslinien zeigten eine durch RT-PCR bestätigte erhöhte Menge an mRNA, sie zeigten allerdings im Wachstum keinen Unterschied zum Wildtyp (Strubl 2012). Auch die von Wu et al. (2015) komplementierte T-DNA Insertion zeigte keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp. Dieses Ergebnis zeigt zudem, dass

die Beeinträchtigung im Wachstum der T-DNA Insertionslinie *acer1-1* nicht auf eine weitere Insertion zurückzuführen ist, die sich eventuell im Genom befindet, sondern durch die Inaktivierung des Gens *ACER1*.

Die Ursachen für diese Ergebnisse müssen noch untersucht werden. Einerseits ist es möglich, dass es in der Zelle eine fehlerhafte bzw. keine erhöhte Proteinsynthese gibt, andererseits könnte es auch trotz erhöhter Proteinsynthese und Aktivität keine Auswirkungen geben. Dies ist möglich, wenn das Protein z.B. durch Regulationsprozesse abgebaut oder inaktiviert wird.

4.2 ACER1 spielt eine Rolle in der Pflanzenentwicklung

Die identifizierten homozygoten Pflanzen der T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* weisen einen starken Zwergwuchs auf. Dieser Phänotyp stimmt mit dem von Wu et al. (2015) beschriebenen für die Linie *acer1-1* überein. Wu et al. dokumentierte eine geringere Statur mit kleineren, schmalen und glänzenden Blättern und kleineren Blüten. Der Phänotyp ähnelt dabei dem der in dieser Arbeit generierten RNAi-Linien. Bei diesen RNAi-Linien ist die Expression des Gens *ACER1* nur reduziert und nicht vollständig inhibiert. Dies ist wahrscheinlich auch bei *acer1-1* und *acer1-2* der Fall. Diese Veränderung der Expression resultiert auch in einem reduzierten Pflanzenwuchs. Laura Strubl zeigte 2012, dass die RNAi Pflanzen einen verzögerten und zwergenartigen Wuchs aufweisen und das maximale Gewicht nur ca. 20 % des Wildtyps entspricht. Laura Strubl zeigte außerdem, dass die Pflanzen durch ihren Zwergwuchs resistenter gegen Trockenstress sind, da die Pflanze aufgrund ihrer geringeren Biomasse weniger Wasser zum Überleben benötigt. Der Phänotyp des reduzierten Wuchses bei einer reduzierten Expression von *ACER1* (sowohl bei der homozygoten T-DNA Insetionslinie *acer1-1* als auch bei eigenen RNAi-Linien) wurde also auch von Wu et al. (2015) beobachtet. Er zeigte außerdem, dass die Überexpression von *ACER1* keine Auswirkung auf das Pflanzenwachstum hat, was sich mit den Ergebnissen aus dieser und Laura Strubls Arbeit deckt.

Vorherige Studien zeigten, dass die Störung des Sphingolipidmetabolismus zu abnormalem Pflanzenwachstum führen kann. Null-Mutanten der Serinpalmitoyltransferase (*SPT*) zeigten Embryoletalität. Speziell die Expressionssuppression der LCB1-Untereinheit von *SPT* resultierte in einer reduzierten Gesamtgröße und gekräuselten Blättern (Chen et al. 2006, Dietrich et al. 2008). Die Ceramidkinasemutante *acd5* akkumuliert Ceramide und zeigt spontanen Zelltod (Liang et al. 2003). Die *fah1 fah2* Mutante, bei der die α -Hydroxylase der Fettsäuren der Ceramide beeinträchtigt ist, akkumuliert nicht-hydroxylierte Ceramide und LCBs und zeigt reduziertes Blatt- und Wurzelwachstum (König et al. 2012). Der Doppelmutante *sbh1 sbh2* fehlt die Aktivität der Hydroxylase der Sphingoidbasen. Dadurch fehlen die Trihydroxy-LCBs und alle davon abgeleiteten

Sphingolipide. Sphingolipide mit einer C16 Fettsäure akkumulieren und es zeigt sich starker Zwergwuchs (Chen et al. 2008). In der *loh1 loh3* Doppelmutante ist die Synthese von VLCFA-Ceramiden blockiert, und dies führt zur Letalität (Markham et al. 2011). Bei der Interpretation der Ergebnisse der *ACER1* RNAi-Linien könnte man analog davon ausgehen, dass durch die geringere Menge an Ceramidase weniger Ceramid gespalten wird, dieses akkumuliert und es dadurch zu HR und PCD kommt (Liang et al. 2003).

4.3 Unterschiedliche Expressionslevel von *ACER1* beeinflussen den Glukosylceramidgehalt

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, zeigen die RNAi-Linien eine verminderte *ACER1* Expression und einen reduzierten Wuchs. Die Überexpressionslinien zeigen eine erhöhte Expression aber unterscheiden sich phänotypisch nicht vom Wildtyp (siehe auch Wu et al. 2015, Strubl 2012). Der gemessene Ceramidgehalt liegt im Bereich der Literaturwerte (Markham und Jaworski, 2009), aber unterliegt großen Schwankungen innerhalb der verschiedenen transgenen Linien. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Gehalt an Ceramid durch sein geringes Vorkommen nur schwer exakt zu bestimmen ist. Die gemessenen Daten zeigen aber, dass der Ceramidgehalt nicht drastisch erhöht sein kann. Es ist höchstens ein geringer Anstieg des Ceramidlevels möglich und dies ist unwahrscheinlich der Grund für das schlechtere Wachstum der RNAi-Linien. Wu et al. detektierte 2015 einen signifikant erhöhten Ceramidgehalt, bei Pflanzen, die eine reduzierte Expression von *ACER1* besitzen. Dabei gab es allerdings keinen Anstieg von Ceramiden mit hydroxylierten Fettsäuren (hCer). Die freie LCB ist t18:0 ist reduziert, wobei auch Ceramide mit den LCB d18:1 und t18:1 akkumulieren. Diese Messungen konnten durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu Wu et al. (2015) wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit der Glukosylceramidgehalt der verschiedenen Linien analysiert. Der Gehalt an Glukosylceramid ist bei einer *ACER1* Überexpression erhöht, bei einer Herunterregulierung reduziert. Das Protein *ACER1* steht also im Zusammenhang mit der Menge an Glukosylceramiden. Dabei zeigt sich keine starke Veränderung in der Zusammensetzung, außer dass sich der Gehalt an Glc-d18:1-h16:0 in den RNAi- und Überexpressionslinien nicht so stark ändert wie der der anderen GlcCer.

Im ersten Augenblick scheint es widersprüchlich, dass der Gehalt an GlcCer bei einer Überexpression von *ACER1* erhöht ist. Sollte *ACER1* tatsächlich für eine Ceramidase codieren, so spaltet es Ceramide und somit den Grundbaustein von GlcCer, und reduziert dadurch die Substratmenge der Glukosylceramidsynthase. Zudem hat Wu et al. (2015) in RNAi-Linien für *ACER1* ein erhöhtes Expressionslevel der Glukosylceramidsynthase GCS detektiert, was einen erhöhten GlcCer-Gehalt in diesen Pflanzen vermuten lassen würde.

Es ist möglich, dass die Veränderung der GlcCer Synthese in den RNAi- und Überexpressionslinien nicht durch Änderungen der gesamten "steady-state" Ceramid-Menge hervorgerufen wird, wie sie durch die Massenspektrometrie gemessen wird, sondern durch Änderungen in lokalen Pools der Ceramidkonzentration oder durch Verschiebungen im Fluss der Ceramid Synthese/Abbau.

Eine weitere Erklärung für den erhöhten Gehalt an GlcCer bei einer Überexpression von ACER1 wäre, dass ACER1 die reverse Aktivität einer Ceramidase aufweist, die für die beiden alkalischen Ceramidasen YPC1 und YPD1 aus *S. cerevisiae* schon in der Literatur beschrieben wurde (Mao et al. 2000a,b). Diese reverse Ceramidase Aktivität ist bei einer Überexpression einer der beiden Hefe-Ceramidasen so effektiv, dass sie die Letalität der *lag1 lac1* Hefe-Doppelmutation der Ceramidsynthesen supprimieren kann (Schorling et al. 2001).

Insgesamt ist der Gehalt an Glukosylceramiden allerdings nur gering erhöht bzw erniedrigt. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass es in Arabidopsis drei Homologe der menschlichen neutralen Ceramidase gibt: *NCER1*, *NCER2* und *NCER3*. Diese drei Gene könnten redundant wirken und die veränderte Expression der potentiell alkalischen Ceramidase im Bezug auf Glukosylceramide teilweise kompensieren. Um diese Redundanz zu untersuchen, könnte man eine Quadrupelmutante von *ACER1*, *NCER1*, *NCER2* und *NCER3* generieren und charakterisieren.

Markham und Jaworski haben 2009 erstmals die Menge an Glukosylceramid in Arabidopsisblättern bestimmt. Vergleicht man nun die in dieser Arbeit generierten Glukosylceramidmenge mit dem von Markham und Jaworski veröffentlichten Werten für Glukosylceramide, liegen diese mindestens eine Zehnerpotenz höher als die Literaturwerte. Der Grund für diese Differenz muss noch identifiziert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Methode zur Extraktion von Glukosylceramide variiert wurde. Der Extraktionsschritt wurde im Vergleich nicht nur dreimal sondern insgesamt ca. 8 mal wiederholt. Glukosylceramide könnten dadurch effizienter extrahiert werden. Zudem setzten Markham und Jaworski 30 mg Arabidopsisblätter ein, in dieser Arbeit betrug das Frischgewicht an Arabidopsisblättern ca. 500 mg.

In Blättern stellen GIPC neben GlcCer die zweite große Klasse an Sphingolipiden dar, deren Grundbaustein Ceramid ist. Daher sollte in weiteren Analysen der Gehalt und die Zusammensetzung der GIPC der einzelnen transgenen Linien bestimmt werden, um festzustellen, ob der Gehalt an komplexen Sphingolipiden generell erhöht ist oder gezielt GlcCer. Die daraus generierten Ergebnisse können genaueren Aufschluss über die Funktion von ACER1 im Sphingolipidstoffwechsel geben.

4.4 Heterologe Expressionen von *ACER1* deuten auf eine reverse Ceramidase-Aktivität hin

Heterologe Expression ist die Expression eines Genes oder dem Teil eines Genes in einem anderen Wirtsorganismus. Die Methode soll in dieser Arbeit den Nachweis liefern, dass das untersuchte Protein *ACER1* die Funktion einer alkalischen Ceramidase hat und dementsprechend Ceramid hydrolysiert.

Heterologe Expression in *E.coli*:

In *E.coli* wurde die cDNA von *ACER1* mit dem Vektor pQE-80L exprimiert. Die Induktion mit IPTG führte zum Absterben der Bakterienkultur. Da die Kultur der Leervektorkontrolle nicht abgestorben ist, scheint das neu synthetisierte Protein *ACER1* für das Absterben verantwortlich zu sein. Offenbar wirkt das Protein *ACER1* toxisch auf den Stoffwechsel von *E.coli*. Das Bakterium besitzt keine eigenen Sphingolipide. Im Reich der Bakterien gibt es nur wenige Ausnahmen an Spezies, die Sphingolipide produzieren z.B. in der Familie der Sphingomonadaceae und Sphingobacteriaceae (Krieg et al. 2010). Es ist möglich, dass *ACER1* enzymatisch aktiv ist und andere Moleküle mit Amidbindungen spaltet, und somit toxisch wirkt.

pET-22b(+) ist ein Vektor, welcher die Toxizität eines heterolog synthetisierten Proteines reduziert, indem das Protein nach seiner Synthese in den periplasmatischen Raum transportiert wird. Dort kann es nicht mehr auf den Stoffwechsel des Bakteriums einwirken. Wird *ACER1* im Vektor pET-22b(+) exprimiert, stirbt die Bakterienkultur nicht ab und es akkumuliert ein Protein in der Größe von *ACER1*. Dies bedeutet, dass der Transport in den periplasmatischen Raum die Toxizität von *ACER1* eingedämmt hat. Zu heterolog exprimierenden aufgeschlossenen *E. coli* Zellen wird als Substrat C12-NBD hinzupipettiert und inkubiert. Die anschließende Auftrennung über eine Dünnschichtplatte zeigt, dass C12-NBD durch die *ACER1* exprimierende Kultur gespalten wird. Eine Hydrolyse des Ceramids kann also nachgewiesen werden. Allerdings wird C12-NBD auch in der Kultur mit der Leervektorkontrolle gespalten. Möglicherweise wird das Substrat durch ein *E. coli* eigenes Enzym gespalten, welches auch die Fähigkeit besitzt, Amidbindungen zu hydrolysieren. Es könnte auch eine nichtenzymatische Hydrolyse der Amidbindung stattfinden. Demnach gibt es eine hohe Hintergrundaktivität und die Ergebnisse dieses Versuchs sind nicht aussagekräftig. Da das rekombinante Protein eine C-terminale Fusion mit einem His-Tag besitzt, könnte man das *ACER1* Protein mit einer Ni²⁺ Säule aufreinigen. Mit dem aufgereinigten Protein könnte man im Anschluss die Ceramidasetests erneut durchführen, um die Hintergrundaktivität zu umgehen.

Homologe Expression in Arabidopsis:

Bei einem alkalischen pH-Wert ist eine ACER1 Aktivität im Wildtyp und eine noch höhere Aktivität in der Überexpressionslinie zu erwarten. Dies soll in diesem Versuch durch den Abbau der Substrate (d18:1-c17:0, d18:0-c18:0, t18:0-c18:0) nachgewiesen werden. Aus Arabidopsisblättern von Wildtyp und einer Überexpressionslinie wurden daher Mikrosomen präpariert. Diese wurden in Puffern mit einem pH Wert von 7 und 9 resuspendiert und anschließend wurde das in Ethanol gelöste Substrat hinzupipettiert. Bei der Überexpressionslinie ist bei allen Substraten und beiden pH Werten nach der Inkubation mehr Substrat vorhanden als beim Wildtyp. Dieser Unterschied ist nicht signifikant, aber deutet darauf hin, dass durch die Überexpression von *ACER1* der Aufbau von Ceramid beeinflusst ist. Ein Abbau des Substrats ist beim Wildtyp bei t18:0-c18:0 im neutralen, sowie bei d18:0-c18:0 im alkalischen Bereich zu erkennen. Dies deutet auch darauf hin, dass neutrale und alkalische Ceramidasen im Wildtyp aktiv sind, eine Überexpression von *ACER1* allerdings dieser Enzymaktivität entgegen wirkt. Weil die Ergebnisse dieses Versuchs nicht signifikant sind, müssen sie in zukünftigen Versuchen bestätigt werden.

Expression in *S. cerevisiae*

Sphingolipidanalyse:

Um die Auswirkung der heterologen Expression von *ACER1* in *S. cerevisiae* zu untersuchen, wurden die Ceramide von dem Stamm pDR196-*ACER1* als auch der Leervektorkontrolle pDR196 der Doppelmutante $\Delta ypc1\Delta ydc1$ in Flüssigkultur gemessen. *S. cerevisiae* besitzt nur Ceramide mit langkettigen bzw. sehr langkettigen Fettsäuren (LCFAs bzw. VLCFAs, Ejsing et al. 2009). In der *ACER1* exprimierenden Doppelmutante ist die Menge fast aller häufig vorkommenden Ceramide reduziert. Eine der Ausnahmen stellt das am häufigsten vorkommende Ceramid t18:0-h26:0 dar, welches in doppelter Menge nachgewiesen wurde. Der Gesamtceramidgehalt ist bei pDR196-*ACER1* im Vergleich zur Leervektorkontrolle leicht erhöht, allerdings nicht signifikant.

Das Ergebnis zeigt, dass *ACER1*, wenn in *S. cerevisiae* exprimiert, zur Bildung von bestimmten Ceramiden führt, während andere Ceramide abgebaut werden. Dies bestärkt die Hypothese, dass *ACER1* zur Ceramidsynthese fähig ist. Die Ceramidanalyse in *S. cerevisiae* lässt zudem die Vermutung zu, dass *ACER1* eine Affinität für bestimmte LCB bzw. FA als Substrat hat. Ein Zusammenhang zwischen LCB, Kettenlänge oder Hydroxylierung der Fettsäure ist nicht erkennbar, daher muss in weiteren Versuchen geklärt werden, wieso bestimmte Ceramide synthetisiert und andere gespalten werden.

Enzymtest:

Für den Enzymtest wurden Mikrosomen aus *S. cerevisiae* Flüssigkulturen extrahiert und die Proteine anschließend in Puffer mit den pH-Werten 7 und 9 resuspendiert. Das Substrat d18:1-c17:0 wurde zu den Proben pipettiert und nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Reaktion abgestoppt. Im Anschluss wurde die relative Substratmenge bestimmt. Bei einem pH-Wert von 7 zeigt sich eine leichte Reduzierung der Substratmenge. Es scheint also, als gäbe es sowohl in der Leervektorkontrolle als auch in der ACER1 exprimierenden Kultur eine Ceramidaseaktivität. Dies war nicht zu erwarten, da der Stamm $\Delta ypc1\Delta ydc1$ mit der Leervektorkontrolle keine funktionsfähigen Ceramidase-Gene besitzt. Die Reduzierung des Substrats wird also durch ein anderes Enzym oder nichtenzymatisch verursacht.

Die Reduzierung der Substratmenge könnte durch eine Umwandlung von Ceramid in ein Mannosylinositolphosphorylceramid (MIPC) zustande gekommen sein. MIPC ist eine bedeutende Sphingolipidklasse in *S. cerevisiae* (Dickson et al. 2006). Das Substrat könnte aber auch durch andere *S. cerevisiae* eigene Enzyme hydrolysiert worden sein.

Auffällig ist das Versuchsergebnis bei der ACER1 exprimierenden *S. cerevisiae* Kultur bei einem pH-Wert von 9,1. Es zeigt sich keine Reduzierung des Substrats, sondern sogar eine Zunahme des Substrats d18:1-c17:0 um 10 %. Diese Ergebnis ist nicht signifikant, könnte aber bedeuten, dass wenn ACER1 in *S. cerevisiae* exprimiert wird, es zu einer Ceramidsynthese kommt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ACER1 zur Ceramidsynthese fähig ist. Dies geschieht bei einem alkalischen pH-Wert, welcher für die eigentliche Funktion als Ceramidase als Optimun vorhergesagt wurde.

Auf Grund der Hinweise auf eine reverse Ceramidase Aktivität von ACER1 wurde ein Fütterungstest durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde den $\Delta ypc1\Delta ydc1$ -Stämmen pDR196 (Leervektorkontrolle) und pDR196-ACER1 nicht das Ceramid, sondern eine freie Fettsäure und eine LCB zu Kulturen der *S. cerevisiae* Stämme gegeben. Es zeigte sich, dass die Menge der LCB d18:1 nach der Inkubation bei der Kultur mit pDR196-ACER1 geringer ist als bei der Leervektorkontrolle. Wird ACER1 in *S. cerevisiae* exprimiert, scheint die LCB d18:1 als Substrat für die Ceramidsynthese-Aktivität zu dienen. Die Messung der Menge an d18:1-c16:0 bekräftigen diese Vermutung. Das Ceramid d18:1-c16:0, welches nicht nativ in *S. cerevisiae* vorkommt, ist bei der Linie mit dem Vektor pDR196-ACER1 um das Zehnfache erhöht im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Das Ergebnis des Fütterungsversuches spricht also wieder für eine reverse Äktivität, es muss jedoch durch Wiederholungen bestätigt werden.

Expressionsanalyse in *P. pastoris*

P. pastoris ist eine Hefe, die neben den Enzymen der Glukosylceramidsynthese auch die Enzyme der GIPC-Synthese besitzt. Daher ähnelt sie dem Ausgangsorganismus Arabidopsis mehr als die Hefe *S. cerevisiae*. Daher wurde sie als weiterer Versuchorganismus ausgewählt. Auch hier sollte ACER1 heterolog exprimiert werden, Mikrosomen wurden präpariert und in Puffern mit einem pH-Wert von 7 und 9 resuspendiert. Anschließend wurde das in Ethanol gelöste Substrat hinzupipettiert, die Proben eine Stunde inkubiert und im Anschluss die relative Menge bestimmt.

Das Versuchsergebnis mit 3 verschiedenen Substraten zeigt weder einen Abbau, noch einen Aufbau an Ceramid. Es zeigt sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen der *P. pastoris*-Kultur mit dem Vektor pPIC3.5-ACER1 und der Leervektorkontrolle. Aus diesem Grund wurde die Arbeit mit *P. pastoris* vorerst eingestellt.

Expressionsanalyse in *N. benthamiana*

N. benthamiana wurde für ACER1 Expressionsanalysen ausgewählt, da es eine dikotyle Pflanze ist und daher dem Stoffwechsel des Ausgangsorganismus Arabidopsis ähnelt. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass das Protein ACER1 korrekt funktioniert. Die Ceramidaseaktivität wurde nach Proteinextraktion aus heterolog exprimierenden Blättern überprüft. Dies geschah durch Mikrosomenpräparation, Resuspension in Puffern mit neutralem und alkalischen pH-Wert und der Zugabe von 3 verschiedenen Ceramiden als Substrat. Nach einer einstündigen Inkubation wurde der relative Substratgehalt bestimmt. Die Leervektorkontrolle zeigt nur für ein Substrat, und zwar für d18:1-c17:0 eine Reduzierung. Während diese Reduzierung im alkalischen Bereich 50 % der Menge ausmacht, sind im neutralen Bereich sogar nur noch ca. 25 % der Ausgangsmenge an Substrat vorhanden. Es ist also auch in der Leervektorkontrolle ein Abbau von Ceramid nachweisbar. Diese Hintergrundaktivität ist vermutlich auf eine oder mehrere *N. benthamiana* Ceramidasen zurückzuführen. Interessant an dieser Stelle ist, dass die Proteine aus den ACER1 exprimierenden Blättern bei beiden pH-Werten einen viel geringeren Abbau von d18:1-c17:0 aufweisen. Auffällig ist auch, dass es bei einer ACER1 Expression in *N. benthamiana* zu einer erhöhten Menge an d18:0-c18:0 kommt. Diese Erhöhung ist nicht signifikant, aber deutet darauf hin, dass durch eine heterologe ACER1 Expression in *N. benthamiana* Ceramid synthetisiert werden kann. Der geringere Abbau von d18:1-c17:0 im Vergleich zur Leervektorkontrolle kann hier durch eine kompensierende Synthese dieses Ceramids erklärt werden. Dies ist wiederum ein Hinweis auf die reverse Aktivität von ACER1.

Expression in *S. frugiperda*

Die Insekten-Zelllinie Sf9 ist ein weiteres weit verbreitetes eukaryotisches System zur heterologen Proteinexpression. Die Induktion der heterologen Expression erfolgte mit dem P3 Stock

des Baculovirus. Das Protein wurde per Mikrosomenpräparation aus den Insektenzellen extrahiert und in Puffer mit einem pH-Wert zwischen 4 und 10 resuspendiert. Die in Ethanol gelösten Ceramide (d18:1-c17:0, d18:1-h12:0, d18:0-c18:1, t18:0-c18:0) wurden als Substrat hinzupipettiert. Nach einer Inkubation bei 30 °C für eine Stunde zeigte sich ein Abbau des angebotenen Substrats, egal ob *ACER1* exprimiert wurde (Baculovirus-*ACER1*) oder nur die viralen Proteine des Baculovirus (Baculovirus). Vor allem bei den Substraten d18:1-c17:0 und d18:1-h12:0 zeigte sich bei Baculovirus-*ACER1* im Vergleich zum Kontrollprotein von Baculovirus eine erhöhte Menge der freien LCB. Bei d18:1-h12:0 ist ein deutlicher Anstieg der LCB d18:1 zu verzeichnen, je alkalischer der pH-Wert wird. Dies ist vor allem bei Protein aus den Insektenzellen der Fall, welche nur die vireneigenen Gene exprimieren. Hier ist der Anstieg doppelt so hoch wie bei Baculovirus-*ACER1*.

Dies widerspricht der Vermutung, dass das aufgereinigte Protein der *ACER1* exprimierenden Insektenzellen durch die Ceramidasefunktion Ceramide spalten kann. Da es nach der Inkubation mehr Ceramid und weniger LCBs gibt, sieht es eher so aus, als würde hier durch die Expression von *ACER1* freies LCB zur Synthese von Ceramid verwendet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass keine Hydrolyseaktivität von *ACER1* als Ceramidase *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Tests geben allerdings viele Hinweise auf eine reverse Aktivität von *ACER1*.

5 Zusammenfassung

Sphingolipide sind eine Lipidklasse, welche in allen Eukaryoten und in einigen Bakterien eine wichtige Rolle als Zellmembranbestandteile spielen und bei vielen Zellprozessen beteiligt sind. Im Vergleich zu einer enormen Menge an Forschungsdaten über bioaktive Sphingolipide in Mensch, Ratte oder Hefe wurde erst in den letzten Jahren dem Sphingolipidstoffwechsel in Pflanzen genauere Beachtung geschenkt. Die chemische Struktur der Sphingolipide unterscheidet sich von den besser bekannten Glycerolipiden durch den Grundbaustein Ceramid. Ceramid besteht aus einer Fettsäure, welche amidisch mit einer langkettigen Base verbunden ist. Als Spaltprodukt spielt die langkettige Base in der Signaltransduktion der Zelle eine wichtige Rolle. Des Weiteren sind Ceramide das Rückgrat für Glukosylceramide und Glykosylinositolphosphorylceramide, den komplexen Sphingolipiden in Pflanzen.

Ceramidasen sind Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels. Sie sind verantwortlich für die Hydrolyse der Amidbindung zwischen der Fettsäure und der langkettigen Base, sie sind also für den Ceramidabbau verantwortlich. In Hefe wurde zudem eine reverse Aktivität alkalischer Ceramidasen festgestellt, also die acyl-CoA unabhängige Ceramidsynthese.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Gen *ACER1* aus Arabidopsis auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene untersucht. Sequenzanalysen zeigen große Ähnlichkeit zu bereits beschriebenen alkalischen Ceramidasen. Sequenzanalysen prognostizieren 5 Transmembrandomänen.

Die zwei heterozygoten T-DNA Insertionslinien *acer1-1* und *acer1-2* weisen eine erniedrigte Transmission des *acer1* Null Genotypes durch den Pollen auf. Die Pollen von *acer1-1* und *acer1-2* sind weniger vital als die des Wildtyps und die Anzahl intakter Samen in den Schoten ist geringer. Durch eine Herunterregulierung der Expression von *ACER1* mittels RNA Interferenz sind die Pflanzen stark in ihrem Wachstum beeinträchtigt, sie weisen einen Zwergwuchs auf. Die Überexpression hat im Gegensatz dazu keine Auswirkung auf das Pflanzenwachstum.

Der Gehalt an Ceramid, das Substrat der Ceramidasen, weist keinen Unterschied auf, wenn *ACER1* überexprimiert oder herunterreguliert ist. Dafür führt *ACER1*-Überexpression zu einem erhöhten Gehalt an Glukosylceramiden, eine Herunterregulierung führt zu einem erniedrigten Gehalt. Enzymtests in verschiedenen heterolog exprimierenden Organismen konnten keine Ceramidaseaktivität von *ACER1* bestätigen. Sie lieferten allerdings viele Hinweise auf eine reverse Ceramidase Aktivität des Enzyms hin, also einen acyl-CoA unabhängige Synthese von Ceramid.

Δypc1Δydc1 ist ein *S. cerevisiae* Stamm, dem die Aktivität der endogenen alkalischen Ceramidasen fehlt. Die Expression von *ACER1* in diesem Stamm führt zu einer Akkumulation von dem meist vorkommenden Hefe-Ceramid t18:0-h26:0, während viele andere Ceramide in geringer Menge

vorhanden sind. *ACER1* hat also eine Affinität für bestimmte Ceramide und scheint auch eine reverse Aktivität zu besitzen.

In Zukunft sollten die GIPC in den transgenen *ACER1* Arabidopsislinien gemessen werden, um einen besseren Überblick über die Beeinträchtigung zu bekommen, wenn die Expression von *ACER1* modifiziert ist.

6 Literaturverzeichnis

- Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**: 293-300
- Bhat R, Panstruga R** (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5-19
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiology* **137**: 104-116
- Bromley PE, Li YO, Murphy SM, Sumner CM, Lynch DV** (2003) Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **417**: 219-226
- Cahoon EB, Lynch DV** (1991) Analysis of glucocerebrosides of rye (*Secale cereale* L. cv Puma) leaf and plasma membrane. *Plant Physiology* **95**: 58-68
- Chen BC, Chang HM, Hsu MJ, Shih CM, Chiu YH, Chiu WT, Lin CH** (2009) Peptidoglycan induces cyclooxygenase-2 expression in macrophages by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 20562-73
- Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM, Cahoon EB** (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *The Plant Cell* **18**: 3576–3593.
- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB** (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 1862-1878
- Choi MS, Anderson MA, Zhang Z, Zimonjic DB, Popescu N, Mukherjee AB** (2003) Neutral ceramidase gene: role in regulating ceramide-induced apoptosis. *Gene* **315**: 113–122
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-43
- Coursol S, Fan L-M, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, Assmann SM** (2003) Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**: 651–654
- Coursol S, Le Stunff H, Lynch DV, Gilroy S, Assmann SM, Spiegel S** (2005) *Arabidopsis* sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiology* **137**: 724–737
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**: 4777-88
- Dickson RC, Sumanasekera C, and Lester RL** (2006) Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Lipid Research* **45**: 447–465

- Dietrich CR, Han G, Chen M, Berg RH, Dunn TM; Cahoon EB** (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal* **54**: 284–298.
- Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, Duchoslav E, Ekroos K, Klemm RW, Simons K, Shevchenko A** (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 2136–2141
- El Bawab S, Bielawska A, Hannun YA** (1999) Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 27948–27955
- El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ, Hannun YA** (2000) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 21508–21513
- El Bawab S, Usta J, Roddy P, Szulc ZM, Bielawska A, Hannun YA** (2002) Substrate specificity of rat brain ceramidase. *Journal of Lipid Research* **43**: 141–148
- Galadari S, Wu BX, Mao C, Roddy P, El Bawab S, Hannun YA** (2006) Identification of a novel amidase motif in neutral ceramidase. *Biochemical Journal* **393**: 687–695
- Hannun YA, Luberto C** (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in Cell Biology* **10**: 73–80
- Hannun YA, Obeid LM** (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 139–150
- Hillig I, Leipelt M, Ott C, Zähringer U, Warnecke D, Heinz E** (2003) Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Letters* **553**: 365–369
- Imai H, Ohnishi M, Kinoshita M, Kojima M, Ito S** (1995) Structure and distribution of cerebroside containing unsaturated hydroxy fatty acids in plant leaves. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 1309–1313
- Imai H, Yamamoto K, Shibahara A, Miyatani S, Nakayama T** (2000) Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxy fatty acids of glucosylceramides by gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids* **35**: 233–236
- König S, Feussner K, Schwarz M, Kaefer A, Iven T, Landesfeind M, Ternes P, Karlovsky P, Lipka V, Feussner I** (2012) Arabidopsis mutants of sphingolipid fatty acid alpha-hydroxylases accumulate ceramides and salicylates. *New Phytologist* **196**: 1086–1097
- Krieg NR, Ludwig W, Whitman WB, Hedlund BP, Paster BJ, Staley JT, Ward N, Brown D, Parte A** (2010) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Vol. **4**: 330–370
- Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT** (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes & Development* **17**: 2636–2641
- Luttgeharm KD, Kimberlin AN, Cahoon RE, Cerny RL, Napier JA, Markham JE, Cahoon EB** (2015) Sphingolipid metabolism is strikingly different between pollen and leaf in Arabidopsis as revealed by compositional and gene expression profiling. *Phytochemistry* **115**: 121–129

- Lynch DV, Dunn TM** (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist* **161**: 677-702
- Lynch DV, Steponkus PL** (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology* **83**: 761-767
- Marion J, Bach L, Bellec Y, Meyer C, Gissot L, Faure JD** (2008) Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **56**: 169-79
- Markham JE, Jaworski JG** (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**: 1304-1314
- Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG** (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 22684-22694
- Markham JE, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hematy K, Marion J, Belcram K, Palauqui JC, Satiat-Jeunemaitre B, Faure JD** (2011) Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**: 2362-2378
- Mao C, Obeid LM** (2008) Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* **1781**: 424-434
- Mao C, Xu R, Bielawska A, Obeid LM** (2000a) Cloning of an alkaline ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. An enzyme with reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 6876-6884
- Mao C, Xu R, Bielawska A, Szulc ZM, Obeid LM** (2000b) Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 31369-31378
- Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawska A, Galadari SH, Obeid LM** (2001) Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 26577-88
- Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawski J, Becker KP, Bielawska A, Galadari SH, Hu W, Obeid LM** (2003) Cloning and characterization of a mouse endoplasmic reticulum alkaline ceramidase: an enzyme that preferentially regulates metabolism of very long chain ceramides. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 31184-91
- Merrill AH Jr** (2002) *De novo* sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25843-25846
- Nei M, Kumar S** (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York
- Ng CKY, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**: 596-599
- Obeid LM, Okamoto Y, Mao C** (2002) Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* **1585**: 163-171

- Okino N, He X, Gatt S, Sandhoff K, Ito M, Schuchman EH** (2003) The reverse activity of human acid ceramidase. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 29948-53
- Okino N, Tani M, Imayama S, Ito M** (1998) Purification and characterization of a novel ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 14368–14373
- Pata MO, Wu BX, Bielawski J, Xiong TC, Hannun YA, Ng CKY** (2008) Molecular cloning and characterization of OsCDase, a ceramidase enzyme from rice. *The Plant Journal* **55**: 1000–1009
- Pata MO, Hannun YA, Ng CK** (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the sphinx. *New Phytologist* **185**: 611-630
- Preuss D, Lemieux B, Yen G, Davis RW** (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes & Development* **7**: 974-985
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425
- Sambrook J, Russell DW** (2006) *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. Cold Spring Harbor Protocols
- Schorling S, Vallée B, Barz WP, Riezman H, Oesterhelt D** (2001) Lag1p and Lac1p are essential for the acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 3417-3427
- Spassieva S, Hille J** (2003) Plant sphingolipids today – are they still enigmatic? *Plant Biology* **5**: 125–136
- Sperling P, Franke S, Lüthje S, Heinz E** (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 1031-1038
- Sperling P, Heinz E** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1632**: 1-15
- Spiegel S, Milstien S** (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology* **4**: 397–407
- Sullards MC, Lynch DV, Merrill AH Jr, Adams J** (2000) Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**: 347–353
- Strubl L** (2012) Recombinant expression and analysis of plant-pathogen interactions of the putative alkaline ceramidase of *Arabidopsis*. Masterarbeit, Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Bonn
- Sun W, Jin J, Xu R, Hu W, Szulc ZM, Bielawski J, Obeid LM, Mao C** (2010) Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *Journal of Biological Chemistry* **285**: 8995-9007
- Tada S, Matsushita-Morita M, Suzuki S, Kusumoto K, Kashiwagi Y** (2009) Characterization of a neutral ceramidase orthologue from *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* **298**: 157-65

- Tani M, Igarashi Y, Ito M** (2005) Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 36592–36600
- Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Szulc ZM, Hannun Y, Galadari S** (2011) Purification and characterization of a second type of neutral ceramidase from rat brain: a second more hydrophobic form of rat brain ceramidase. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* **1811**: 242-52
- Thudichum JLW** (1884) A treatise on the chemical constitution of the brain. Bailliere, Tindall and Cox
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**: 4350-4354
- Townley HE, McDonald K, Jenkins GI, Knight MR, Leaver CJ** (2005) Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biological Chemistry* **386**: 161–166
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang G-L, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S** (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 3163-3179
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC** (2000) A Viral Movement Protein Prevents Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**: 157-167
- Warnecke D, Heinz E** (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**: 919-941
- Weiss SA, Whitford WG, Gorfien SF, Godwin GP** (1995) Insect cell-culture techniques in serum-containing medium. *Methods in Molecular Biology* **39**:65-78
- Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar C, Williams T, Wang X** (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 31994-32002
- Worrall D, Ng CKY, Hetherington AM** (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends in Plant Science* **8**: 317–320
- Wright BS, Snow JW, O'Brien TC, Lynch DV** (2003) Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **415**: 184-192
- Wu JX, Li J, Liu Z, Yin J, Chang ZY, Rong C, Wu JL, Bi FC, Yao N** (2015) The *Arabidopsis* ceramidase AtACER functions in disease resistance and salt tolerance. *The Plant Journal* **81**: 767-80
- Xiong TC, Coursol S, Grat S, Ranjeva R, Mazars C** (2008) Sphingolipid metabolites selectively elicit increases in nuclear calcium concentration in cell suspension cultures and in isolated nuclei of tobacco. *Cell Calcium* **43**: 29–37

Yang Q, Gong ZJ, Zhou Y, Yuan JQ, Cheng J, Tian L, Li S, Lin XD, Xu R, Zhu ZR, Mao C (2010) Role of *Drosophila* alkaline ceramidase (Dacer) in *Drosophila* development and longevity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 1477-90

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Peter Dörmann für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit der Promotion. Ich habe mich stets gut betreut und beraten gefühlt.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima, ich hoffe ich konnte davon auch etwas zurückgeben. Bei vielen möchte ich mich auch für eine einzigartige unvergessliche Zeit bedanken.

Ich danke Michael Melzer für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Schließlich gilt mein Dank auch meiner Familie und meinen Freunden, die mir den nötigen Halt ausserhalb der Wissenschaft gaben.