

**Die Rolle von DGD1 in dem eukaryotischen und
prokaryotischen Galaktolipid-Metabolismus
von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Barbara Kalisch
aus
Haan (Rhld.)

Bonn, Juli 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Dörmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Dorothea Bartels

Tag der Promotion: 18.11.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Lipide in Pflanzen	1
1.1.1	Strukturen der Membranlipide in wässriger Umgebung	2
1.2	Die Galaktolipide	3
1.2.1	Die Biosynthese der Galaktolipide in Pflanzen.....	4
1.2.2	Die Funktion der Galaktolipide.....	7
1.2.3	Charakterisierung und Regulation der Galaktolipid-Synthasen.....	12
1.2.4	Der Ursprung der Galaktolipide.....	13
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
2	MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1	Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.1	Laborausstattung	16
2.1.2	Chemikalien	16
2.1.3	Medien und Antibiotika	18
2.1.4	Antikörper	18
2.1.5	Kits und Enzyme	18
2.1.6	Oligonukleotide.....	19
2.1.7	Vektoren.....	19
2.1.8	Zellstämme	20
2.2	Arbeitsmethoden mit <i>E. coli</i>.....	20
2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	20
2.2.2	Plasmidisolation	21
2.2.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation.....	21
2.2.4	Klonierung der Expressionskonstrukte	23
2.2.5	Expression in <i>E. coli</i>	24
2.3	Arbeitsmethoden mit <i>Agrobacterium fabrum</i>	24
2.3.1	Kultivierung von <i>A. fabrum</i>	24
2.3.2	Herstellung kompetenter <i>A. fabrum</i> Zellen und Transformation	25
2.4	Arbeitsmethoden mit <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.....	25
2.4.1	Kultivierung von <i>C. reinhardtii</i>	25
2.5	Arbeitsmethoden mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2.5.1	Kultivierung von <i>A. thaliana</i>	26
2.5.2	Transformation von <i>A. thaliana</i>	27
2.5.3	Klonierung von DGD1-CTAP in p35-6N	27
2.5.4	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	28
2.5.5	Chlorophyllextraktion und -bestimmung	28
2.5.6	PAM-Fluorometrie.....	29
2.6	Molekularbiologische Methoden	29
2.6.1	Gelelektrophorese.....	29
2.6.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.6.3	Weitere Klonierungsschritte.....	31
2.7	Lipidanalytik	32
2.7.1	Lipidisolation	32
2.7.2	Fraktionierung der Lipide mittels Festphasenextraktion.....	32
2.7.3	Dünnschichtchromatographie.....	32

2.7.4	Lipidquantifizierung durch Messung der Fettsäuremethylester per GC-FID.....	33
2.7.5	Lipidanalytik mit Hilfe des Q-TOF-Massenspektrometers.....	33
2.7.6	Analyse der Verteilung der an <i>sn2</i> gebundenen Fettsäuren in TAG.....	34
2.8	Proteinbiochemische Methoden.....	36
2.8.1	Proteinkonzentrationsmessungen.....	36
2.8.2	SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion.....	36
2.8.3	Proteinextraktion aus Blattmaterial mit Phenol.....	39
2.8.4	Denaturierende Zellysis und renaturierende Reinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie.....	40
2.9	DGDG Synthase Enzymtests.....	42
2.10	Lipidbindungsstudien.....	42
2.10.1	Lipidüberlagerungstest (Lipid-Overlay-Assay) (Wang <i>et al.</i> , 2012).....	42
2.10.2	Liposomenbindungstest.....	43
2.10.3	Liposomen-Aggregations-Test (Liposome Aggregation Assay).....	43
2.10.4	Differentialinterferenzkontrast-Lichtmikroskopie.....	44
2.10.5	Liposomen-Durchlässigkeits-Test („liposome leakage“).....	44
2.10.6	Nachweis von proteininduzierter Membranfusion mit Hilfe von Liposomen mit verschiedenen Inhalten („content mixing“).....	45
2.11	Computergestützte Analytik mittels I-Tasser (Iterative Threading ASSEMBly Refinement) und Protein-Blast.....	47
3	ERGEBNISSE.....	50
3.1	Einfluss von Phosphatmangel auf die Lipidzusammensetzung der <i>dgd1-1</i>- und <i>dgd2-1</i>-Mutante sowie der <i>dgd1-1 dgd2-1</i>-Doppelmutante.....	50
3.2	Charakterisierung der Substratspezifität der DGDG-Synthasen aus „16:3“- und „18:3“-Pflanzen.....	56
3.2.1	Die DGDG-Synthasen benötigen Magnesiumchlorid sowie einen neutralen pH-Wert für die optimale Aktivität.....	57
3.2.2	AtCDGD1 glykosyliert spezifisch 18:3/18:3- sowie 18:3/16:0-MGDG.....	58
3.2.3	UDP-Glukose inhibiert die Aktivität der DGDG-Synthasen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
3.2.4	Die Erhöhung der PA-Konzentration führt nicht zu einer erhöhten DGDG-Synthase-Aktivität.....	62
3.2.5	LjCDGD1 von <i>Lotus japonicus</i> zeigt eine geringere Spezifität für 36:6-MGDG als AtCDGD1.....	63
3.3	Lipidbindungsstudien.....	64
3.3.1	Isolierung von AtNDGD1, AtCDGD1 und AtDGD2 für Lipid-Protein-Bindungstests.....	64
3.3.2	AtNDGD1, AtCDGD1 und AtDGD2 binden spezifisch an PA (Lipid-Überlagerungstest).....	66
3.3.3	AtNDGD1 bindet an Liposomen in Abhängigkeit von PA (Liposomenbindungstest).....	67
3.3.4	AtNDGD1 induziert die Fusion von Liposomen in Abhängigkeit von PA (Liposomen-Aggregations-Test).....	68
3.3.5	AtCDGD1 erhöht die Durchlässigkeit von PA-enthaltenden Membranen (Liposomen-Durchlässigkeits-Test).....	70
3.3.6	AtNDGD1 führt zu einer geringen Fluoreszenzänderung innerhalb der „content mixing“-Tests.....	72
3.4	Überexpression von AtNDGD1 in <i>A. thaliana</i>.....	75
3.4.1	Quantifizierung der polaren Lipide sowie des Chlorophylls in AtNDGD1-Überexpressionslinien.....	76
3.4.2	Maximale Quantenausbeute des PSII von AtNDGD1-Überexpressionslinien.....	78
3.4.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Chloroplasten von AtNDGD1-Überexpressionslinien.....	79

3.5	Bioinformatische Charakterisierung von AtNDGD1 mit Hilfe von Struktur-	
	vorhersagen und phylogenetischen Analysen.....	81
3.5.1	I-TASSER	81
3.5.2	Phylogenetische Analysen.....	82
4	DISKUSSION	85
4.1	Die Rolle der DGDG-Synthasen bei der Umstrukturierung der Lipidzusammensetzung	
	unter Phosphatmangel.....	85
4.2	Die Substratspezifitäten der DGDG-Synthasen	87
4.3	PA-abhängige Membranmanipulation durch AtNDGD1.....	92
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	98
6	LITERATURVERZEICHNIS	100
7	ANHANG	112
7.1	Klonierungsprotokolle.....	112
7.2	Vektorkarten	113
7.3	Konzentration der Glyko- und Phospholipide in <i>dgd1-1</i> , <i>dgd2-1</i> und <i>dgd1-1 dgd2-1 +/- P</i>	115
7.4	Expression von DGD1-CTAP in <i>dgd1-1</i>	117
8	DANKSAGUNG	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	<i>sn</i> -Nomenklatur des Glycerolipide.....	1
Abbildung 2:	Lipidstrukturen in wässriger Umgebung	2
Abbildung 3:	A Kopfgruppenstrukturen der in Pflanzen vorherrschenden Galaktolipide MGDG und DGDG. B Für die pflanzlichen Galaktolipide charakteristische Fettsäuren.....	3
Abbildung 4:	Der Hauptbiosyntheseweg der Galaktolipide in 16:3-Pflanzen.....	6
Abbildung 5:	Der zweite Biosyntheseweg der Galaktolipide.....	10
Abbildung 6:	Wachstum der DGDG-Synthasemutanten im Vergleich zum Wildtyp	11
Abbildung 7:	Prinzipieller Verlauf der beiden Varianten des „content mixing“-Tests	47
Abbildung 8:	Internetseite des Servers I-TASSER.....	48
Abbildung 9:	Glyko- und Phospholipidzusammensetzung in Blättern der DGDG-Synthase-Mutanten im Vergleich zum WT-Col2	51
Abbildung 10:	Prozentuale Verteilung der Hauptlipidspezies der Glyko- und Phospholipide von <i>dgd1-1</i> , <i>dgd2-1</i> und <i>dgd1-1 dgd2-1 +/- P</i>	53
Abbildung 11:	Akkumulation der TAGs in den Blättern der DGDG-Synthase-Mutanten unter Phosphatmangel.....	54
Abbildung 12:	Verteilung der TAG-Spezies innerhalb von <i>dgd1-1</i> , <i>dgd2-1</i> und <i>dgd1-1 dgd2-1</i>	55
Abbildung 13:	Positionelle Verteilung der an <i>sn2</i> gebundenen Fettsäuren in den unter Phosphatmangel akkumulierten TAGs	56
Abbildung 14:	Expression von Nus (Kontrolle), NusAtCDGD1 und AtDGD2 in <i>E. coli</i>	57
Abbildung 15:	Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von AtCDGD1 und AtDGD2 von zweiwertigen Erdalkalimetallen	58
Abbildung 16:	Analyse des pH-Optimums von AtCDGD1 und AtDGD2.....	58
Abbildung 17:	Relative Verteilung der beiden Hauptspezies (34:6 und 36:6) des durch AtCDGD1 und AtDGD2 synthetisierten DGDGs (Produkt) im Vergleich mit der Zusammensetzung des Substrates (MGDG aus Spinat)	59
Abbildung 18:	DGDG-Synthase Enzymtests mit AtCDGD1 und AtDGD2 und teilweise gesättigtem prokaryotischem Substrat.	60
Abbildung 19:	Relative Aktivität von AtCDGD1 (links) und AtDGD2 (rechts) für prokaryotisches und eukaryotisches Substrat	61
Abbildung 20:	UDP-Glc ist ein Inhibitor von AtCDGD1 und AtDGD2.....	62
Abbildung 21:	Die Erhöhung der PA-Konzentration beeinflusst nicht die Aktivität von AtCDGD1 und AtDGD2.....	63
Abbildung 22:	Relative Verteilung der beiden Hauptspezies (34:6 und 36:6) des durch LjCDGD1 und LjDGD2 synthetisierten DGDGs.....	64
Abbildung 23:	Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie (Ni-NTA) mit gleichzeitiger Renaturierung der an das Säulenmaterial gebundenen rekombinanten Proteine.....	65

Abbildung 24: Lipidüberlagerungstests mit AtNDGD1, AtCDGD1 und AtDGD2.	66
Abbildung 25: Liposomenbindungstest mit AtNDGD1	68
Abbildung 26: AtNDGD1 induziert die Aggregation/ Fusion von PA-enthaltenden Liposomen	69
Abbildung 27: PA-abhängige Liposomenfusion durch NDGD1	70
Abbildung 28: AtCDGD1 führt zu der Erhöhung der Durchlässigkeit von Membranen in Abhängigkeit von PA.	71
Abbildung 29: Content mixing-Test mit AtNDGD1, Variante 1.....	73
Abbildung 30: Content mixing-Test mit AtNDGD1, Variante 2.....	74
Abbildung 31: Die AtNDGD1-Überexpressionslinien (ND1#45 und ND1#40) im Vergleich zum WT (Col2) und der <i>dgd1-1</i> -Mutante.....	75
Abbildung 32: Quantifizierung der polaren Lipide sowie des Chlorophylls von Blättern in den AtNDGD1-Überexpressionslinien (ND1#45 und ND1#40).....	77
Abbildung 33: Maximale photosynthetische Quantenausbeute des PSII der AtNDGD1- Überexpressionslinien ND1#45 und ND1#40 unter verschiedenen Belichtungsintensitäten.....	78
Abbildung 34: Morphologie der Blattzellen und der Chloroplasten der NDGD1- Überexpressionslinien ND1#45 und ND1#40 im Vergleich zum Wildtyp (Col2) und der <i>dgd1-1</i> -Mutante	80
Abbildung 35: I-TASSER: Die besten 4 der Threading-Vorlagen für AtNDGD1	82
Abbildung 36: Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum (Neighbor-joining Algorithmus) der NDGD1-Sequenzen aus ausgewählten Vertretern der Grün- und Rotalgen sowie der Streptophyta.....	83
Abbildung 37: Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum (Neighbor-joining Algorithmus) der CDGD1-und DGD2-Sequenzen aus ausgewählten Vertretern der Grün- und Rotalgen sowie der Streptophyta.	84
Abbildung 38: Substratspezifität von AtDGD1	89
Abbildung 39: Sequenzlogo von 3 konservierten Teilsequenzen von NDGD1	94
Abbildung 40: AtNDGD1 vermittelt die Assoziation der inneren und äußeren Hüllmembran des Chloroplasten durch die Bindung an PA	96
Abbildung 41: Konstrukte zur Expression von Nus, NusAtDGD1, NusAtNDGD1, NusAtCDGD1 und NusAtDGD2 in <i>E.coli</i>	113
Abbildung 42: Konstrukte zur Expression von NusLjCDGD1 und NusLjDGD2 in <i>E.coli</i>	114
Abbildung 43: Konstrukt zur Überexpression von DGD1-CTAP in <i>A.thaliana dgd1-1</i>	114
Abbildung 44: Expression des DGD1-CTAP-Proteins in der <i>dgd1-1</i> -Mutante	117

Abkürzungen

ACP	Acyl Carrier Protein
ANTS	8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonsäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
CAZy	Carbohydrate-Active enZYmes database
CDGD1	Glykosyltransferasedomäne der DGD1
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CL	Cardiolipin
CoA	Coenzym A
Col	Columbia
DAG	Diacylglycerin
DC	Dünnschichtchromatographie
deion.	deionisiert
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerin
DIK	Differentialinterferenzkontrast
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPX	p-Xylene-bis-pyridiniumbromid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethanmethylsulfonat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	Expressed sequence tag
FID	Flammenionisationsdetektor
G3P	Glycerol-3-phosphat
GC	Gaschromatographie
GGGT	Galaktolipid:Galaktolipid Galaktosyltransferase (jetzt SFR2)
GlcA	Glukuronsäure (engl. glucuronic acid)
GlcADG	Glukuronosyldiacylglycerin
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
kDa	Kilo Dalton
LHC	Lichtsammelkomplex (engl. Light-harvesting complex)
LHCII	Lichtsammelkomplex des Photosystems II
Lj	<i>Lotus japonicus</i>
LUV	große (engl. large) unilamellare Vesikel
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerin
MGlcDG	Monoglycosyldiacylglycerin
MLV	multilamellare Vesikel
mol%	Mol-Prozent
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
NDGD1	N-Terminaler Bereich von DGD1
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	optische Dichte
PA	Phosphatidsäure (engl. phosphatidic acid)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAP	PA Phosphatase
PC	Phosphatidylcholin

PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PIPES	1,4-Piperazinediethansulfonsäure
PL	Phospholipase
PS	Phosphatidylserin
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Q-TOF MS	Quadrupol Time-Of-Flight Massenspektrometer
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
<i>sn</i>	stereospezifische Nummerierung
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerin
TAG	Triacylglycerin
TAP	Tandem Affinitätsreinigung (engl. tandem affinity purification)
T-DNA	Transfer-DNA
TriGDG	Trigalaktosyldiacylglycerin
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Gal	UDP-Galaktose
UDP-Glc	UDP-Glucose
ULV	unilamellare Vesikel
WT	Wildtyp

Fettsäuren werden X:Y abgekürzt, wobei X der Anzahl der Kohlenstoffatome und Y der Anzahl der Doppelbindungen entspricht.

Die Reihenfolge der angegebenen Fettsäuren eines Glycerolipides entsprechen, wenn nicht anders angegeben, der jeweiligen *sn*-Konfiguration (*sn1/sn2*).

1 Einleitung

1.1 Lipide in Pflanzen

Lipide gehören neben den Kohlenhydraten und Proteinen zu den Hauptbausteinen der Zellen aller Organismen. Generell werden Substanzen als Lipide bezeichnet, die aufgrund ihrer Polarität in Wasser unlöslich sind. Diese Eigenschaft wird auch als Hydrophobie bezeichnet. Lipide lösen sich in unpolaren Lösungsmitteln wie z.B. Chloroform. In biologischen Systemen fungieren sie u.a. als Energiespeicher (Öle/Fette), Pigmente (wie Chlorophyll oder die Carotinoide) oder auch Signalmoleküle. Durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Membranen sind die Membranlipide essentiell für die Funktionalität der Zellen. Die Membranen bilden die Barriere zu der Außenwelt und unterteilen die biologischen Prozesse über die Zellorganellen, wie z.B. Chloroplasten oder Mitochondrien, in einzelne Kompartimente. Die Lipidmatrix der Membranen dient auch zu der Einbettung vieler durch Proteine vermittelter biologischer Prozesse. Zum Beispiel ist die gesamte photosynthetische Elektronentransportkette innerhalb des Endomembransystems der Chloroplasten, der Grana- und Stromathylakoide, lokalisiert. Membranlipide sind amphiphil, d.h. sie besitzen einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil. In den Lipiddoppelschichten („Bilayer“) biologischer Membranen weisen die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide zu der wässrigen Umgebung, während der hydrophobe Teil in das Innere der Doppelschicht zeigt. Pflanzliche Membranen sind hauptsächlich aus Phosphoglycerolipiden sowie Glykoglycerolipiden aufgebaut, die den Glycerolipiden zugeordnet werden. Die drei Kohlenstoffatome des für die Glycerolipide charakteristischen Glycerinrückgrates werden über die *sn*-Nomenklatur (*sn* = stereospezifische Nummerierung) unterschieden (Abbildung 1). Für die *sn*-Nomenklatur steht die an das chirale C-Atom gebundene Hydroxygruppe in der Fisher-Projektion immer links. Das chirale C-Atom des Glycerins in Glycerolipiden ist das C2-Atom. Das C-Atom über dem chiralen Zentrum wird als C1, das unterste als C3 bezeichnet.

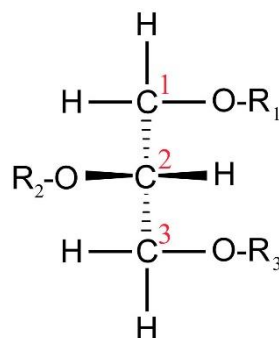


Abbildung 1: *sn*-Nomenklatur des Glycerolipide.

Das C1- und C2-Atom ist in der Regel mit je einer Fettsäure verestert. Fettsäuren sind aliphatische Monocarbonsäuren. Pflanzliche Fettsäuren haben eine Kettenlänge von 12-22 C-Atomen, wobei die C16- und C18-Fettsäuren überwiegen. Ungesättigte Fettsäuren mit einer oder mehreren

Doppelbindungen (in höheren Pflanzen bis zu drei) werden von den gesättigten Fettsäuren ohne Doppelbindungen abgegrenzt. Fettsäuren werden in der Regel in der Kurzform beschrieben. Zum Beispiel ist die Kurzform für die Hexadecatriensäure „16:3“, hierbei beschreibt die erste Ziffer die Anzahl der Kohlenstoffatome und die Ziffer nach dem Doppelpunkt die Anzahl der Doppelbindungen. Die polare Kopfgruppe der Phospho- und Glykoglycerolipide ist in Eukaryoten immer an der *sn*3-Position, d.h. sie ist an das C3-Atom gebunden. Die Phosphatgruppe der Kopfgruppe der Phospholipide ist mit diesem C-Atom verestert, währenddessen die Zuckerkopfgruppe der Glykolipide über eine glykosidische Bindung gebunden wird. Die sogenannten Galaktolipide Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG) und Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG) sind die in Pflanzen vorherrschenden Glykoglycerolipide. Die Kopfgruppe dieser Lipide ist aus einem oder mehreren Galaktosemolekülen aufgebaut. Weitere Glykoglycerolipide in Pflanzen sind Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG) und Glukuronosyldiacylglycerin (GlcADG).

1.1.1 Strukturen der Membranlipide in wässriger Umgebung

In Abhängigkeit von ihrer Molekülstruktur zeigen die Glycerolipide ein unterschiedliches Verhalten in wässriger Umgebung. Membranen die mit Lipiden mit einer kleinen Kopfgruppe und/oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren angereichert sind (wie MGDG oder Phosphatidsäure (PA)), neigen zu der Ausbildung der sogenannten hexagonalen HII-Phase (s. Abbildung 2 A) (Shipley *et al.*, 1973; Bruce, 1998). Diese Lipide werden auch als nicht-bilayerstabilisierende Lipide bezeichnet. Von diesen Lipiden werden die bilayerstabilisierenden Lipide wie Phosphatidylcholin (PC) und DGDG abgegrenzt. Diese haben eine größere Kopfgruppe sowie zumeist einen höheren Sättigungsgrad der Fettsäuren. Membranen die mit bilayerstabilisierenden Lipiden angereichert sind, neigen zu der Ausbildung der lamellaren L-Phase. Durch den Ringschluss dieser Doppelmembran entstehen Lipidkugeln, die mit der wässrigen Lösung gefüllt sind (s. Abbildung 2 B). Diese werden Liposomen oder auch Vesikel genannt.

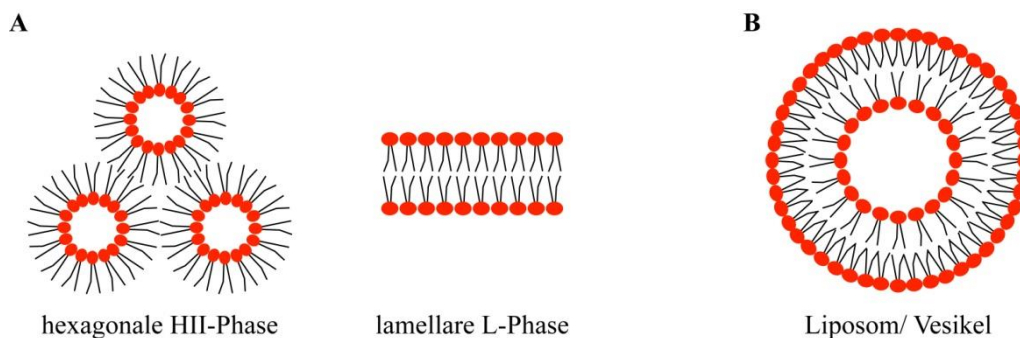


Abbildung 2: Lipidstrukturen in wässriger Umgebung. A Hexagonale HII-Phase und lamellare L-Phase. Die Ausbildung dieser Phasen ist von mehreren Faktoren, wie z.B. der Kopfgruppengröße oder dem Desaturierungsgrad der Fettsäuren, abhängig. **B Liposomen.** Der wässrige Inhalt der Liposomen oder Vesikeln ist von einer oder auch mehreren Lipiddoppelschicht/en umgeben.

1.2 Die Galaktolipide

Die Galaktolipide MGDG und DGDG gehören zu den Hauptbestandteilen der Membranen photosynthetisch aktiver Organismen. Die Membranlipide pflanzlicher Mesophyll-Zellen enthalten bis zu 75 mol% der beiden Galaktolipide, wobei der Anteil des MGDGs überwiegt (~ 50 mol% der Gesamtlipide) (Dörmann and Benning, 2002). Unter optimaler Nährstoffversorgung beschränkt sich das Vorkommen beider Lipide auf plastidäre Membranen, insbesondere die der Chloroplasten. Neben den neutralen Galaktolipiden enthalten diese auch die anionischen Lipide SQDG sowie Phosphatidylglycerin (PG). In den Chloroplasten ist MGDG in den Thylakoiden sowie in der inneren Hüllmembran stark angereichert (~ 50 mol% der Lipide der jeweiligen Fraktion), in der äußeren Hüllmembran ist es jedoch geringer konzentriert (17 mol%) (Block *et al.*, 1983). DGDG ist im Vergleich dazu in den drei Membrankompartimenten des Chloroplasten gleichmäßig verteilt (~ 30 mol%).

Die Zuckerkopfgruppe des MGDGs ist mit dem C3-Atom des Glycerin-Rückgrates β -glycosidisch verknüpft (Carter *et al.*, 1956) (s. Abbildung 3). Bei der Synthese des DGDGs wird das zweite Galaktosemolekül mit der Kopfgruppe des MGDGs α -(1 \rightarrow 6)-glycosidisch verknüpft.

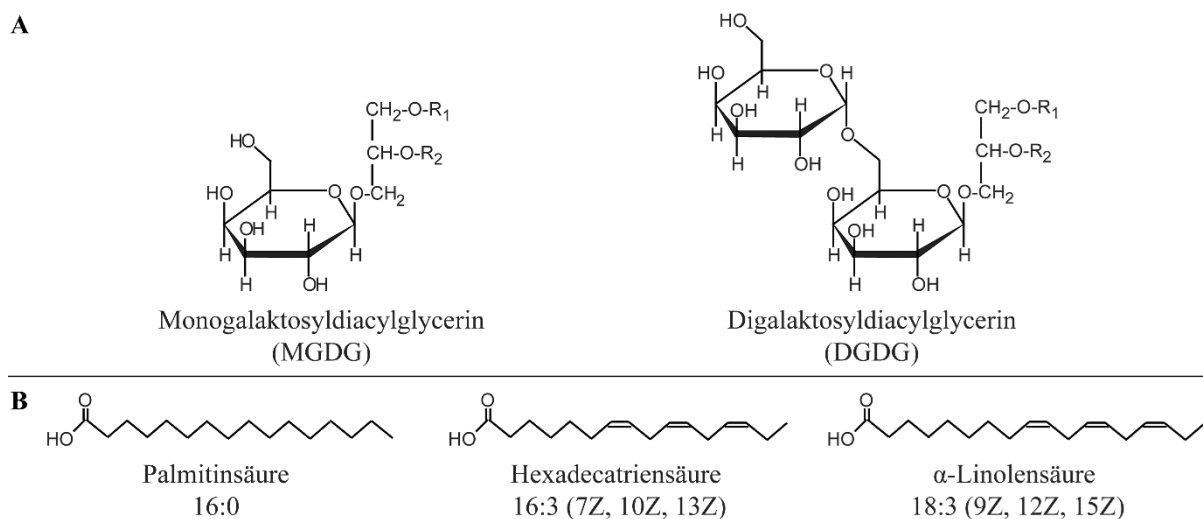


Abbildung 3: A Kopfgruppenstrukturen der in Pflanzen vorherrschenden Galaktolipide MGDG und DGDG. R_1, R_2 = Fettsäurerest **B Für die pflanzlichen Galaktolipide charakteristische Fettsäuren.** Erläuterung zu der Fettsäurenomenklatur am Beispiel der Hexadecatriensäure. 16:3 = Anzahl Kohlenstoffatome:Anzahl der Doppelbindungen. 7Z, 10Z, 13Z = Position der Doppelbindungen, Doppelbindungen sind in cis-Konfiguration.

MGDG aus *Arabidopsis* enthält in erster Linie die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Hexadecatriensäure (16:3) sowie α -Linolensäure (18:3) (s. Abbildung 3 B) (Siebertz and Heinz, 1977). Das DGDG dieser Pflanze enthält hauptsächlich 18:3 und in geringeren Mengen Palmitinsäure (16:0), der Gehalt an 16:3 ist vernachlässigbar.

1.2.1 Die Biosynthese der Galaktolipide in Pflanzen

Der Hauptbiosyntheseweg der Galaktolipide involviert zwei Glykosyltransferasen, MGD1 und DGD1 (s. Abbildung 4). Diacylglycerin (Glycerin verestert mit zwei Fettsäuren, DAG) ist das Substrat dieses Syntheseweges. MGD1 (früher MGDA) katalysiert die Ausbildung der β -glykosidischen Bindung zwischen DAG und der Galaktose in der inneren Hüllmembran des Chloroplasten (Miège *et al.*, 1999; Jarvis *et al.*, 2000). Als Zuckerdonor dient bei dieser Reaktion UDP- α -Galaktose (Covès *et al.*, 1986). Da es hierbei zu einer Änderung der Anomerie des Zuckers kommt, gehört MGD1 zu den invertierenden Glykosyltransferasen. In der CAZy-Datenbank (Carbohydrate Active EnZYmes, www.cazy.org) wird sie zu der Gruppe GT28 zugeordnet. Der Hauptanteil des synthetisierten MGDGs wird direkt zu den Thylakoiden zur Ausbildung der photosynthetisch aktiven Membranen transportiert. Ein kleinerer Anteil wird von der inneren zu der äußeren Hüllmembran transportiert, wo es als Substrat für die DGDG-Synthese durch DGD1 dient (Dörmann *et al.*, 1995a; Froehlich *et al.*, 2001). DGD1 nutzt wie MGD1 UDP- α -Galaktose als Zuckerdonor (Kelly *et al.*, 2003). Bei dieser Glykosylierungsreaktion behält aber der Zucker seine Anomerie, weshalb DGD1 den erhaltenen („retaining“) Glykosyltransferasen zugeordnet wird. In der CAZy-Datenbank wird DGD1 der Gruppe GT4 zugewiesen. Das synthetisierte DGDG wird nun zu der inneren Hüllmembran und von dort aus weiter zu den Thylakoiden transportiert. Der Mechanismus des Transports der Galaktolipide zwischen den beiden Hüllmembranen ist bis jetzt noch nicht geklärt.

Die Biosynthese der Galaktolipide beginnt mit der Fettsäuresynthese in dem Stroma der Chloroplasten. Die Fettsäuresynthese wird initiiert durch die Synthese von Malonyl-CoA durch den Acetyl-CoA-Carboxylase-Komplex (Ohlrogge and Browse, 1995). Bevor die Malonylgruppe in den Zyklus zur Fettsäuresynthese eingeschleust werden kann, muss sie zunächst auf ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) transferiert werden. Innerhalb des Fettsäuresynthesesykluses verlaufen aufeinander folgend Kondensations-, Reduktions- und Dehydrationsreaktionen, die durch den Fettsäuresynthese-Komplex vermittelt werden. Die neu synthetisierten Fettsäuren sind zunächst gesättigt. Die erste Doppelbindung wird über die plastidäre Stearoyl-ACP Δ 9-Desaturase in die 18C-Kette eingefügt. In Arabidopsis sowie einigen weiteren Pflanzen verzweigt sich an diesem Punkt der weitere Biosyntheseweg in den sogenannten prokaryotischen Weg im Chloroplasten und den eukaryotischen Weg im endoplasmatischen Reticulum (ER) (Browse *et al.*, 1986).

In dem prokaryotischen Weg wird Glycerin-3-phosphat (G3P) im Chloroplasten durch zwei Acyltransferasen (ATS1 und ATS2) zu PA umgewandelt. ATS1 acyliert spezifisch 18:1 an die *sn*1-Position des Lipidgrundgerüsts, ATS2 hingegen 16:0 an die Position *sn*2 (Frentzen *et al.*, 1983). Durch die Dephosphorylierung des PAs durch plastidäre PA Phosphatasen (LPP δ , LPP ϵ 1, LPP ϵ 2) wird DAG synthetisiert, welches direkt für die Galaktolipidbiosynthese genutzt werden kann (Nakamura *et al.*, 2007). Lipide, die von diesen Vorläufern abstammen, sind charakterisiert durch eine 16C-Fettsäure an

der *sn2*-Position und werden aufgrund ihres evolutionären Ursprunges auch prokaryotische Lipide genannt.

Der eukaryotische Weg beginnt mit der Hydrolyse des Acyl-ACPs durch plastidäre Thioesterasen (FATA und FATB) zur Produktion von freien Fettsäuren (Dörmann *et al.*, 1995b; Pollard and Ohlrogge, 1999; Salas and Ohlrogge, 2002; Bonaventure *et al.*, 2003; Li-Beisson *et al.*, 2013). Es wird angenommen, dass die Fettsäuren für den Export in der Form von Acyl-CoA aktiviert werden müssen. Diese Reaktion wird wahrscheinlich über die Langketten Acyl-CoA Synthasen (LACS) vermittelt (Roughan and Slack, 1977; Joyard and Stumpf, 1981). Der Mechanismus des Transports des Acyl-CoAs zu dem ER konnte bis jetzt noch nicht genau geklärt werden. Es zeigte sich jedoch, dass dabei mehrere ABC-Transporter sowie die Acyl-CoA Bindeproteine (ACBP) eine Rolle spielen (für weitere Informationen s. Hurlock *et al.* (2014)). In der äußeren Hüllmembran und/oder im ER werden die Fettsäuren u.a. für die Synthese der Phospholipide wie PC eingesetzt. Eine ER-gebundene Acyltransferase überträgt dabei spezifisch eine 18C-Fettsäure an die *sn2*-Position des Glycerin-Grundgerüsts (Browse *et al.*, 1986). Diese 18C-Fettsäure an der *sn2*-Position ist charakteristisch für die sogenannten eukaryotischen Lipide.

Bis jetzt herrscht noch Unklarheit darüber, wie und in welcher Form die eukaryotischen Vorläufer zu den Chloroplastenhüllmembranen zurück transportiert werden. Es zeigte sich, dass ein ABC-Transporterkomplex (TGD1, TGD2, TGD3) in der inneren Hüllmembran sowie ein weiteres Protein in der äußeren Hüllmembran (TGD4) an dem Transport der eukaryotischen Vorläufer beteiligt sind (Xu *et al.*, 2003; Awai *et al.*, 2006b; Lu *et al.*, 2007a; Xu *et al.*, 2008; Roston *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). TGD2 sowie TGD4 binden spezifisch PA, aber ob dieses Lipid auch transportiert wird, ist unklar (Awai *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2012). Des Weiteren wird u.a. ein direkter Import von PC oder lysoPC vermutet (Mongrand *et al.*, 2000; Hurlock *et al.*, 2014). Womöglich spielen dabei Kontaktstellen zwischen dem Chloroplasten und dem ER eine wichtige Rolle.

Zur Bereitstellung der DAGs für die Galaktolipidbiosynthese ist die Abspaltung der Kopfgruppe der importierten Phospholipide notwendig. Welche Phospholipasen daran beteiligt sind, ist bis jetzt noch nicht genau geklärt. Eine Studie konnte Hinweise darauf geben, dass PC in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten mit Hilfe von einer cytosolischen Phospholipase D (PLD) sowie PA Phosphatase zu DAG umgesetzt wird, welches dann als Substrat für die MGDG-Synthese dient (Andersson *et al.*, 2004). Aber auch weitere Wege, wie die Abspaltung der gesamten Kopfgruppe (Phosphocholin) durch eine Phospholipase C, sind wahrscheinlich.

Pflanzen, wie Arabidopsis oder auch Spinat, in denen sowohl der prokaryotische als auch der eukaryotische Weg stattfindet, werden auch 16:3-Pflanzen genannt, da in diesen Pflanzen bei MGDG

diese Fettsäure stark angereichert ist. Pflanzen, wie die Erbse (*Pisum sativum*), *Lotus japonicus* oder auch die Monokotyledonae im Allgemeinen, in denen hingegen nur der eukaryotische Weg verläuft, werden als 18:3-Pflanzen bezeichnet. In einer großen Studie mit mehreren hundert Pflanzenarten konnte gezeigt werden, dass der prokaryotische Weg im Laufe der Evolution der Pflanzen in mehreren Pflanzengruppen reduziert oder auch vollständig aufgegeben wurde (Mongrand *et al.*, 1998).

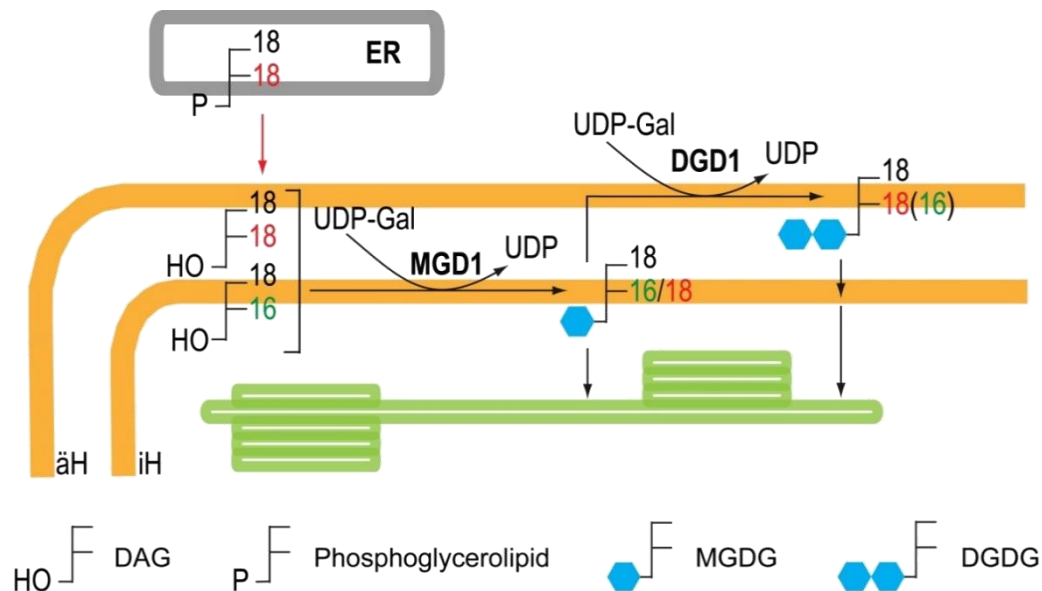


Abbildung 4: Der Hauptbiosyntheseweg der Galaktolipide in 16:3-Pflanzen. Lipide mit grün markierten Fettsäuren stammen von dem prokaryotischen Biosyntheseweg ab, mit rot markierten von dem eukaryotischen. äH = äußere Hüllmembran, iH = innere Hüllmembran.

Die Desaturierung der Fettsäuren im Chloroplasten verläuft auf Galaktolipidniveau durch plastidäre Desaturasen. FAD5 initiiert die Desaturierung der an prokaryotischem MGDG gebundenen 16C-Fettsäure durch die Insertion einer Doppelbindung an der Position $\Delta 7$ (Roughan *et al.*, 1979; Ohlrogge and Browse, 1995; Heilmann *et al.*, 2004). Interessanterweise ist aber prokaryotisches DGDG kein Substrat dieser Desaturase. Der zweite Desaturierungsschritt erfolgt durch FAD6, die sowohl 16:1 als auch 18:1 an Position $\omega 6$ ($\Delta 10$ bzw. $\Delta 12$) desaturiert (Falcone *et al.*, 1994). FAD7 und FAD8 fügen abschließend die dritte Doppelbindung beider Fettsäuren an Position $\omega 3$ ($\Delta 13$ bzw. $\Delta 15$) ein (Iba *et al.*, 1993; McConn *et al.*, 1994). Der eukaryotische Vorläufer di18:1-PC wird über FAD2 und FAD3 im ER aufeinanderfolgend zu di18:3-PC desaturiert (Lemieux *et al.*, 1990; Miquel and Browse, 1992). Radioaktive Pulsmarkierungsexperimente („pulse-chase-analysis“) konnten aber Hinweise darauf geben, dass in erster Linie das Lipidrückgrat von di18:2-PC in die Galaktolipidbiosynthese eingeschleust wird (Roughan, 1970, 1975).

In *Arabidopsis* überwiegt die prokaryotische Form des MGDGs (18:3/16:3 [*sn1/sn2*], ~ 70 mol%), während DGDG hauptsächlich in der eukaryotischen Form (18:3/18:3, ~ 80 mol%) vorliegt (Browse *et*

al., 1986; Kelly *et al.*, 2003). Wie schon zuvor erwähnt, enthält prokaryotisches DGDG im Gegensatz zu MGDG fast ausschließlich Palmitinsäure (16:0) an der *sn2*-Position. Die Ursachen für diese markanten Unterschiede zwischen Substrat und Produkt der DGDG-Synthese sind bis jetzt noch offen. Im Gegensatz zu MGD1, für das sich herausstellte, dass es keine Selektivität für prokaryotisches oder eukaryotisches DAG zeigt (Miège *et al.*, 1999; Awai *et al.*, 2001), ist bis jetzt noch nichts über eine Substratspezifität von DGD1 bekannt.

1.2.2 Die Funktion der Galaktolipide

Den Galaktolipiden werden neben ihrer Funktion als Grundbaustein der photosynthetischen Membranen auch weitere spezielle Funktionen innerhalb der Photosynthese sowie als Substituenten der Phospholipide unter Phosphatmangel zugeschrieben. Grundsätzliche Informationen über die Funktionen der Galaktolipide konnten u.a. über die entsprechenden Galaktolipidsynthese-Mutanten erlangt werden. Die Knockdown-Mutation von MGD1 (*mgd1-1*) führte neben der Reduktion des MGDG-Gehaltes um etwa 42 % auch zu einer Reduktion des Chlorophyllgehaltes auf die Hälfte im Vergleich zu Wildtyp (WT) (Jarvis *et al.*, 2000). Des Weiteren kam es zu einer Veränderung der Ultrastruktur der Chloroplasten, die u.a. kleiner waren und weniger Thylakoide aufwiesen. Die *mgd1-2* Knockout-Mutante zeigte eine fast vollständige Reduktion beider Galaktolipide mit drastischen Auswirkungen auf die Chloroplasten (Kobayashi *et al.*, 2007). Die entsprechenden Pflanzen waren farblos, kleinwüchsig, enthielten kein Chlorophyll und wiesen keine Chlorophyllautofluoreszenz auf. Eine photosynthetische Aktivität der Blätter konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, was sich auch darin zeigte, dass die Pflanzen nur heterotroph auf Saccharose-enthaltendem Medium wachsen konnten. Die Ultrastruktur des Chloroplasten war drastisch gestört, sie waren vollkommen rund und enthielten nur noch Überreste eines Endomembransystems sowie keine Grana-Stapel. Auch die photosynthetisch-assoziierten Proteine wie das D1-Protein konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

Pflanzen mit einer Nullmutation des DGD1-Lokus (*dgd1-1*) und einer damit korrelierenden Reduktion des DGDGs von über 90 mol% blieben klein und buschig und hatten nur schwach grüne Blättern. Im Gegensatz zu der MGD1-Knockout-Mutante konnten sie aber photoautotroph wachsen sowie lebensfähige Samen bilden (Dörmann *et al.*, 1995a; Dörmann *et al.*, 1999). Die Chloroplasten wirkten im Vergleich zum WT kleiner, aber dabei wie aufgeschwollen mit einer klaren Abgrenzung der Thylakoide vom Stroma. Zudem wurde ein erniedrigter Chlorophyllgehalt bezogen auf das Frischgewicht sowie eine verschlechterte Effizienz des Photosystems II (PSII) beobachtet. In weiteren Studien, die sich ausführlich mit der Auswirkung dieser Mutation auf die Photosyntheseleitung der Pflanzen beschäftigten, konnte u.a. gezeigt werden, dass mit dem PSII-Reaktionszenter assoziierte Proteine geringer konzentriert vorlagen als im WT (Härtel *et al.*, 1997). Es wurde weiter gehend vermutet, dass DGDG für die Stabilisation dieser Proteinkomplexe benötigt wird und auf Grund der Mutation etwa 25-35 % der PSII-Reaktionszentren nicht-funktional sind. Zudem kommt es in dieser

Mutante zu einer Destabilisation des wasserspaltenden Komplexes sowie einer Störung des Elektronentransportes zwischen Q_A und Q_B , zwei Plastochinonen innerhalb des PSII (Reifarth *et al.*, 1997). Die verschlechterte Effizienz des PSII kann aber in *dgd1-1* durch eine Vergrößerung des Radius der mit den aktiven Reaktionszentren assoziierten LHCII-Komplexe kompensiert werden, wodurch die letztendliche Photosyntheseleistung gemessen an der O_2 -Produktion sich nicht signifikant verschlechtert. Obwohl die Anzahl der PSI-Reaktionszentren sich zum Wildtyp nicht unterschied, zeigte sich, dass die Reduktion des DGDG-Gehaltes zu einer Destabilisierung des PSI sowie einem gestörten Elektronentransport innerhalb dieses Komplexes führt (Guo *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2006).

In mehreren Studien konnte sowohl bei Cyanobakterien als auch Pflanzen eine spezifische Bindung der plastidären Lipide an die photosynthetischen Komplexe detektiert werden. Für die Kristallisation sowie die Funktionalität des LHCII-Komplexes zeigte sich insbesondere DGDG als kritisch (Nussberger *et al.*, 1993; Moya *et al.*, 2001). In Cyanobakterien sowie Pflanzen stellte sich heraus, dass der PSII-Komplex alle 4 Thylakoidmembranlipide (MGDG, DGDG, SQDG, PG) beinhaltet (Murata *et al.*, 1990; Loll *et al.*, 2005; Sakurai *et al.*, 2006), in PSI konnte aber nur MGDG sowie PG detektiert werden (Makewicz *et al.*, 1996). Für die Rekonstitution der Aktivität des Cytochrom b_6/f Komplexes und der ATPase waren jeweils DGDG oder MGDG notwendig (van Walraven *et al.*, 1984; Chain, 1985).

Substitution der Phospholipide unter Phosphatmangel

Phosphat ist ein essentieller Nährstoff für alle Organismen. Oft liegt aber das Phosphat im Boden nur in limitierten Mengen vor. Deshalb haben Pflanzen diverse Mechanismen entwickelt, um unter diesen Bedingungen Phosphat für lebenswichtige Prozesse wie z.B. die DNA-Synthese einzusparen. Ein Drittel des organischen Phosphates in den Blättern von *Arabidopsis* liegt gebunden an die Phospholipide als ein potentielleres Phosphatreservoir vor (Poirier *et al.*, 1991). Für die Nutzung dieses Reservoirs müssen zwei Voraussetzungen erfüllt werden: Zum einen müssen die Phospholipide durch Nicht-Phospholipide, in Pflanzen in erster Linie DGDG, ersetzt werden, zum anderen muss das Phosphat durch den Abbau der Kopfgruppe frei gesetzt werden. Es stellte sich heraus, dass bei einer Verknappung des Phosphates ein zweiter Galaktolipidbiosyntheseweg in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten aktiviert wird. Dieser involviert zwei MGDG-Synthasen (MGD2, MGD3) und eine DGDG-Synthase (DGD2) (s. Abbildung 5) (Härtel *et al.*, 2000; Awai *et al.*, 2001; Kelly and Dörmann, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004). Phosphatmangelstress führt zu einer Akkumulation des DGDGs, aber nicht des MGDGs, somit wird davon ausgegangen, dass das gesamte durch MGD2 und MGD3 produzierte MGDG in die Produktion des DGDGs übergeht (Kelly *et al.*, 2003). Dieses DGDG ist ausschließlich eukaryotisch und ein Großteil beinhaltet eine 16:0-Fettsäure an der *sn1*-Position (Kelly *et al.*, 2003). Die Ähnlichkeit der Fettsäurezusammensetzung des neu synthetisierten DGDGs zu PC bekräftigt die Annahme, dass dieses Lipid von einem Abbauprodukt des PCs abstammt. Nachfolgend wird das DGDG zu den extraplastidären Membranen wie der Plasmamembran, dem Tonoplasten oder auch den mitochondrialen

Membranen transportiert, um dort die Phospholipide zu ersetzen (Härtel *et al.*, 2000; Jouhet *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005). Dabei beschränkt sich aber bezüglich der Plasmamembran dieser Austausch auf die cytosolische Seite (Tjellström *et al.*, 2010). Unter Phosphatmangel erfolgt auch die Stimulation des Hauptsyntheseweges (MGD1, DGD1), womöglich zur Bereitstellung des DGDGs als Ersatz für plastidäres PC und PG (Kelly *et al.*, 2003). PG wird jedoch hauptsächlich durch die anionischen Glykolipide SQDG und GlcADG substituiert (Essigmann *et al.*, 1998; Siegenthaler, 1998; Okazaki *et al.*, 2013).

Die bekanntesten zwei Wege für den Abbau der Phospholipide zur Bereitstellung des DAGs sind, wie zuvor schon beschrieben, zum einen die Kopplung einer PLD mit einer PAP mit PA als Zwischenprodukt und zum anderen die vollständige Hydrolyse der Kopfgruppe durch eine PLC. In mehreren Studien konnte eine spezifische Hochregulation der Expression einzelner Vertreter dieser Phospholipasen unter Phosphatmangel nachgewiesen werden. Insbesondere in den Wurzeln von Arabidopsis wurde eine eindeutige Hochregulation der PLD ζ 1 und PLD ζ 2 beobachtet (Misson *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Während PLD ζ 1 in Vesikeln in der Nähe des Zellkortex detektiert wurde, wurde PLD ζ 2 ausschließlich in dem Tonoplasten lokalisiert (Ohashi *et al.*, 2003; Yamaryo *et al.*, 2008). In weiteren Studien konnte eine Induktion einer PLD-Aktivität innerhalb der Plasmamembran der Wurzelzellen von Hafer nachgewiesen werden (Andersson *et al.*, 2005; Tjellström *et al.*, 2008). Über eine Spezifität dieser PLDs bezüglich einer Phospholipidklasse ist bis jetzt noch nichts bekannt. Zwei cytosolische PAPs (PAH1 und PAH2) zeigten sich für den Membranumbau als notwendig, womöglich durch ihre Beteiligung an der Bereitstellung der eukaryotischen Vorläufer für die Galaktolipidbiosynthese (Nakamura *et al.*, 2009). Die beiden unspezifischen PLCs NPC4 und NPC5 sind an der Hydrolyse des PCs unter Phosphatmangel beteiligt (Nakamura *et al.*, 2005; Gaude *et al.*, 2008). Interessanterweise trägt aber unter diesen Bedingungen nur die Aktivität der cytosolischen NPC5 zu der Akkumulation des DGDGs bei, wie durch die entsprechenden Mutanten ersichtlich wurde.

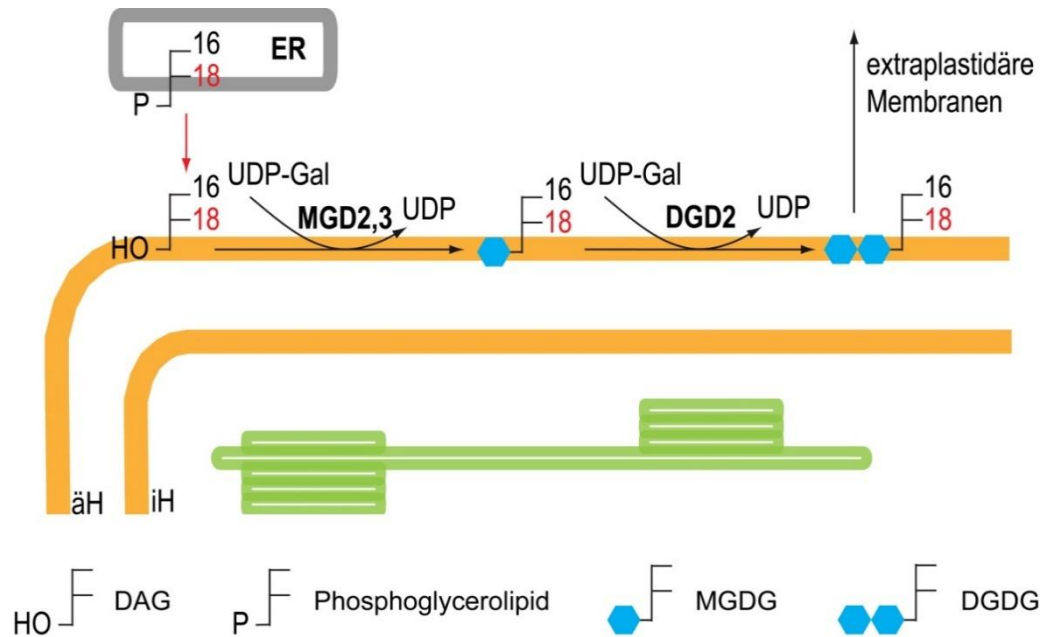


Abbildung 5: Der zweite Biosyntheseweg der Galaktolipide. Das innerhalb dieses Syntheseweges gebildete DGDG stammt ausschließlich von eukaryotischen Vorläufern ab. äH = äußere Hüllmembran, iH = innere Hüllmembran.

Die durch die T-DNA-Insertion generierte *dgd2-1*-Mutante unterschied sich bei dem Wachstum auf Erde oder auf Vollmedium weder in ihrer Größe noch im DGDG-Gehalt vom WT (s. Abbildung 6) (Kelly *et al.*, 2003). Auch die Photosyntheseleistung gemessen an der PSII-Effizienz unterschied sich nicht. Somit spielt DGD2 unter optimalen Wachstumsbedingungen nur eine untergeordnete Rolle. Unter Phosphatmangel hingegen war der prozentuale Anstieg des DGDGs bei der *dgd2-1*-Mutante um die Hälfte im Vergleich zum WT reduziert. Die durch Kreuzung generierte *dgd1-1 dgd2-1*-Doppelmutante zeigte hingegen einen drastischen Phänotypen mit winzigen sterilen Pflanzen (s. Abbildung 6) (Kelly *et al.*, 2003). DGDG konnte nur noch in Spuren nachgewiesen werden und die photochemische Effizienz des PSII-Komplexes verschlechterte sich deutlich im Vergleich zum Wildtyp sowie zu den beiden Einzelmutanten. Unter Phosphatmangel konnte auch keine Akkumulation des DGDGs in der Doppelmutante beobachtet werden.

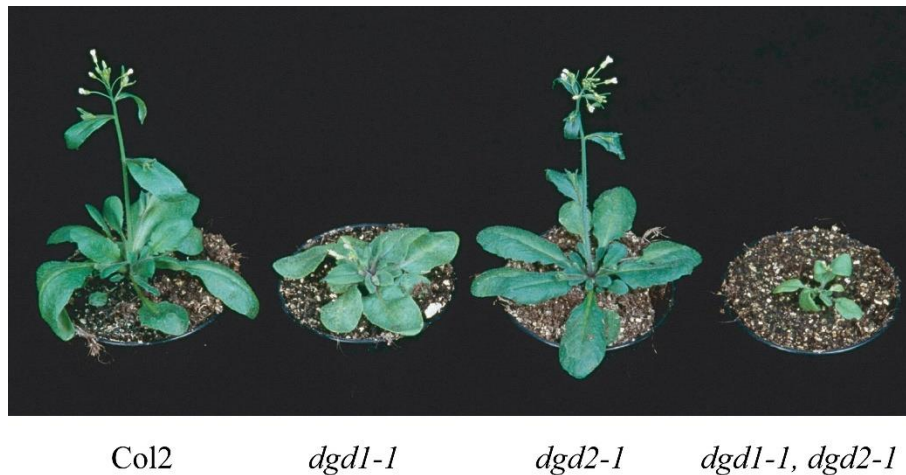


Abbildung 6: Wachstum der DGDG-Synthasemutanten im Vergleich zum Wildtyp (Kelly *et al.*, 2003).

Die Expression einer Glucosyltransferase aus *Chloroflexus aurantiacus* in *dgd1-1* sowie *dgd1-1 dgd2-1* mit der resultierenden Produktion von Glucosylgalaktosyldiacylglycerin (GlcGalDG) führte zu der vollständigen Komplementation des Wachstumsphänotyps der DGDG-Synthase-Mutanten (Hölzl *et al.*, 2006; Hölzl *et al.*, 2009). Interessanterweise konnte aber durch das GlcGalDG nicht die verminderte Effizienz des PSII-Komplexes komplementiert werden. Dieses Ergebnis konnte somit Hinweise auf spezifische Wechselwirkungen zwischen DGDG und den photosynthetischen Komplexen geben, die nicht durch das GlcGalDG ermöglicht werden können.

In Pflanzen existiert ein weiterer Syntheseweg zur Produktion von DGDG sowie weiterer Oligogalaktolipide. Dieser wird in erster Linie durch diverse Stressbedingungen, wie Kältestress oder auch die Begasung mit Ozon, aktiviert und involviert eine in der äußeren Hüllmembran lokalisierte Galaktolipid:Galaktolipid Galaktosyltransferase (GGGT oder auch SFR2, sensitive to freezing 2) (Sakaki *et al.*, 1990a; Fourrier *et al.*, 2008; Moellering *et al.*, 2010). Dieses Enzym transferiert die Galaktose-Einheit von der Kopfgruppe des MGDGs auf ein weiteres Galaktolipid, wobei DGDG oder andere Oligogalaktolipide wie Trigalaktosyldiacylglycerin (TriGDG) synthetisiert werden. Bei dieser Reaktion wird auch DAG gebildet, welches durch die Veresterung mit einer dritten Fettsäure zu Triacylglycerin (TAG) umgewandelt wird. Es wird vermutet, dass unter Kältestress die Akkumulation der Oligogalaktolipide und des TAGs die Aggregation der Membranen beim Gefrieren vermindert. In weiteren Studien konnte ebenfalls eine direkte Korrelation zwischen der Behandlung der Pflanzen mit unterschiedlichen Stressen und der Akkumulation von TAG nachgewiesen werden. Ob diese aber von SFR2 abhängig ist, ist fraglich (z.B. Lippold *et al.* (2012)).

1.2.3 Charakterisierung und Regulation der Galaktolipid-Synthasen

In den letzten Jahren erfolgte eine intensive Charakterisierung der an der Galaktolipidbiosynthese beteiligten Glykosyltransferasen, hier insbesondere der MGDG-Synthasen. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten werden die drei MGDG-Synthasen in zwei Gruppen gegliedert: Typ A (MGD1) und Typ B (MGD2, MGD3) (Awai *et al.*, 2001). MGDG-Synthasen des Typs A sind charakterisiert durch ein N-terminales Transitpeptid (~ 100 Aminosäuren), das die Information für die Insertion in die innere Hüllmembran beinhaltet. Nach dessen Abspaltung hat das gereifte Protein ein Molekulargewicht von etwa 47 kDa. Wie sich aus der Analyse der *mgd1*-Mutanten herausstellte, ist die Aktivität dieses Proteins essentiell für die Pflanzenentwicklung, die Chloroplastenstruktur und damit die Photosynthese (Jarvis *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007). MGDG-Synthasen des Typs B haben ein kürzeres N-terminales Transitpeptid (~ 40 Aminosäuren) ohne bis jetzt bekannte Zielsequenzen. MGD2 und MGD3 haben ein Molekulargewicht von etwa 53 kDa und inserieren in die äußere Hüllmembran. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit beider Enzyme wird davon ausgegangen, dass MGD2 über eine vorangegangene Genduplikation aus MGD3 hervorgegangen ist (Awai *et al.*, 2001). Während MGD1 in allen photosynthetisch aktiven Geweben innerhalb der gesamten pflanzlichen Entwicklung stark expremiert wird, begrenzt sich die Expression von MGD2 und MGD3 unter Optimalbedingungen auf spezifische Gewebe wie der Blüte, hier insbesondere der Pollen, sowie der Wurzel (Awai *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2004). Unter Phosphatmangel wird die Expression beider MGDG-Synthasen des Typs B, hierbei insbesondere MGD3 in den Wurzeln, hochreguliert.

Das ca. 90 kDa große DGD1-Protein beinhaltet neben der C-terminalen Glykosyltransferasedomäne (CDGD1) auch eine etwa 38 kDa (338 Aminosäuren) große N-terminale Peptidsequenz (NDGD1) (Froehlich *et al.*, 2001). Es stellte sich heraus, dass diese für die Insertion des Proteins in die äußere Hüllmembran notwendig ist, aber kein absplaltbares Transitpeptid enthält. Es wird davon ausgegangen, dass NDGD1 noch weitere Funktionen innerhalb der Galaktolipidbiosynthese hat, diese sind aber bis jetzt noch ungeklärt. Wie zuvor beschrieben ist das über DGD1 produzierte DGDG essentiell für die Stabilität und Funktionalität der photosynthetischen Komplexe. DGD1 wird in allen Pflanzenorganen sowie während der gesamten Entwicklung stark expremiert (Arabidopsis eFP Browser) (Winter *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu dem DGD1-Protein fehlt dem Paralog DGD2 die lange N-terminale Peptidsequenz, stattdessen ist nur ein kurzes Transitpeptid vorhanden (Kelly *et al.*, 2003). Unter optimaler Nährstoffversorgung wird DGD2 in Blättern sowie in der Blüte nur schwach expremiert (Kelly and Dörmann, 2002). Unter Phosphatmangel kommt es jedoch zu einer starken Hochregulation der Expression beider DGDG-Synthasen (s. Seite 8).

Die MGD1- sowie DGD1-Expression in Keimlingen wird deutlich durch Licht und/ oder die Zugabe von Cytokinin gesteigert (Ohta *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2014). Licht reguliert die MGDG-Biosynthese post-transkriptional, Cytokinin wahrscheinlich auf dem mRNA-Level (Yamaryo *et al.*,

2003). Im Gegensatz dazu konnte keine Hochregulation des alternativen Biosyntheseweges (MGD2/MGD3, DGD2) durch Licht beobachtet werden (Kobayashi *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2014). Der Hauptbiosyntheseweg der Galaktolipide ist eng mit der Biosynthese des Chlorophylls verknüpft, aber eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes hat nicht zwangsläufig eine Reduktion des Transkriptes von MGD1 und DGD1 zu Folge.

1.2.4 Der Ursprung der Galaktolipide

Die Galaktolipide sind ein Kennzeichen aller photosynthetisch aktiver Organismen. Sie wurden sowohl in Cyanobakterien, diversen Grün- und Rotalgen als auch in allen höheren Pflanzen detektiert. In Cyanobakterien sind jedoch in der Regel bei der Synthese der Galaktolipide Glycosyltransferasen involviert, die in keinerlei Verwandtschaft zu den entsprechenden Enzymen der photosynthetisch-aktiven Eukaryoten stehen. In den meisten Cyanobakterien verknüpft eine MGlcDG-Synthase Glucose anstelle der Galaktose über eine β -glykosidische Bindung mit der *sn3*-Position des DAGs (Awai *et al.*, 2006a). Das synthetisierte Monoglucosyldiacylglycerin (MGlcDG) wird anschließend mittels einer Epimerase zu MGDG umgewandelt (Awai *et al.*, 2014). Da in der Regel nur geringe Mengen des MGlcDGs in den Zellen detektiert werden können, wird angenommen, dass dieses Lipid bei diesem Syntheseweg nur ein Zwischenprodukt ist (Awai *et al.*, 2006a). Die DGDG-Synthese wird in Cyanobakterien durch DgdA katalysiert, die, wie die DGDG-Synthasen der Algen und Pflanzen, Galaktose über eine α -glykosidische Bindung mit dem MGDG verknüpft (Awai *et al.*, 2007; Sakurai *et al.*, 2007). In *Synechocystis sp.* hat unter optimalen Wachstumsbedingungen die Blockade der DGDG-Produktion durch die Mutation von *dgdA* keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen, unter Phosphatmangel jedoch reduziert sich das Wachstum der Zellen dramatisch (Awai *et al.*, 2007). Somit ist DGDG in Cyanobakterien wie auch in Pflanzen essentiell für den Membranumbau unter Phosphatmangel.

Das MGD1-Protein der Algen und Pflanzen weist eine nähere Verwandtschaft zu MGDG-Synthasen von grünen Nichtschwefelbakterien (Chloroflexi) auf (Yuzawa *et al.*, 2012). Interessanterweise wurden zu eukaryotischen MGDG-Synthasen ähnliche Enzyme in Gloeobacter, einer eher ursprünglichen Gruppe der Cyanobakterien, gefunden (Yuzawa *et al.*, 2012). Diese Enzyme befinden sich in einer Klade mit den MGDG-Synthasen der Chloroflexi, und phylogenetische Analysen gaben Hinweise darauf, dass ein horizontaler Gentransfer zwischen diesen Gruppen stattgefunden hat, jedoch erst nach dem primären endosymbiotischen Ereignis. Ob dieser Transfer auch bei dem Cyanobakterium stattgefunden hatte, das als Vorfahre der heutigen Chloroplasten gilt, ist nicht auszuschließen. Über die Evolution der DGDG-Synthasen ist nicht viel bekannt. DgdA steht in keinerlei Verwandtschaftsverhältnis zu den DGDG-Synthasen der meisten Algen und Pflanzen. Bis jetzt konnten zu DgdA-homologe Sequenzen nur in einer Gruppe der Rotalgen, den Cyanidiales, gefunden werden (Awai *et al.*, 2007; Petroutsos *et al.*, 2014).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Bereitstellung weiterer Daten zu der Charakterisierung der DGDG-Synthase DGD1 sowie ihrem Paralog DGD2 aus Arabidopsis und anderen Pflanzen. Das gesamte Projekt wird in fünf Teilbereiche aufgliedert:

In dem ersten Teilbereich sollen die Veränderungen des Lipidfluxes in den DGDG-Synthase-Mutanten *dgd1*, *dgd2* und *dgd1dgd2* unter optimaler Nährstoffversorgung und Phosphatmangel untersucht werden. Zusätzlich zu den schon bekannten Unterschieden innerhalb der Galaktolipide (Kelly *et al.*, 2003) sollen hier mögliche Veränderungen der Vorläufer der Galaktolipide PC und PA analysiert werden. Ein weiterer Fokus wird auf den Veränderungen in der stressinduzierten Akkumulation des TAGs liegen.

Der zweite Bereich beschäftigt sich mit der Erforschung einer möglichen Substratspezifität der beiden DGDG-Synthasen der Pflanzen. Bis jetzt konnte noch nicht genau geklärt werden, ob die Akkumulation des eukaryotischen DGDGs in 16:3 Pflanzen durch eine Präferenz der DGDG-Synthasen hervorgerufen wird. Für die Beantwortung dieser Fragestellung soll ein nicht-radioaktiver DGDG-Synthase-Enzymtest mit in *E.coli* heterolog expremiertem Protein etabliert werden. In vorherigen Studien mit den rekombinanten DGDG-Synthasen zeigte insbesondere das DGD1-Protein eine nur geringe Aktivität. Deshalb soll in dieser Arbeit das durch die DGDG-Synthase produzierte DGDG mit Hilfe des hochsensitiven Quadrupol-Flugzeit- (engl. Time-Of-Flight) Massenspektrometers (Q-TOF MS) erfasst und die Zusammensetzung bezüglich der molekularen Spezies analysiert werden. Um Aufschlüsse zu der Substratspezifität zu gewinnen sollen mehrere Substrate (MGDG) mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung eingesetzt werden. In weiteren Enzymtests soll die Substratspezifität des DGD1-Enzyms der 18:3-Pflanze *Lotus japonicus* untersucht werden.

Es ist bis jetzt noch nicht geklärt, ob NDGD1 noch weitere Funktionen neben dem Import (Targeting) des Proteins in die äußere Hüllmembran hat. Die Ergebnisse vorangegangener Komplementationsexperimente zeigen, dass die Insertion der Glykosyltransferasedomäne von DGD1 (CDGD1) in die äußere Hüllmembran (nach Fusion von CDGD1 mit dem Transitpeptid von DGD2) alleine nicht für die Komplementation der *dgd1*-Mutation ausreicht (Kelly *et al.*, 2016). Nur Pflanzen, die Fusionskonstrukte mit NDGD1 und CDGD1 oder DGD2 überexpremierten, zeigten einen komplementierten Wachstums- sowie Lipidphänotyp. Das Fehlen von NDGD1 hat aber keine Auswirkungen auf die Glykosyltransferaseaktivität selbst. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass NDGD1 in dem Transfer der Galaktolipide zwischen den Hüllmembranen involviert ist. Um weitere Einblicke in die Mechanismen des durch NDGD1 vermittelten Galaktolipidtransfers zu erlangen sollen in dieser Arbeit mehrere Lipidbindungsexperimente mit Phospho- und Glykolipiden durchgeführt werden.

In vorangegangenen Arbeiten (Witt, 2009) wurden mehrere transgene Linien generiert, die NDGD1 im Wildtyp-Hintergrund überexpremieren. Die Überexpression von NDGD1 resultiert in kleineren Pflanzen, die gekräuselte Blätter haben. Um herauszufinden, welche Auswirkungen die Überexpression

von NDGD1 auf die Membranlipidbiosynthese hat, sollen in dieser Doktorarbeit die Glyko- und Phosphoglycerolipide dieser Linien über das Q-TOF MS quantifiziert werden. Zusätzlich soll die Funktionalität der Photosynthese dieser Linien durch die Messung des Chlorophyllgehaltes sowie der Quantenausbeute des PSII überprüft werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen sollen Auskunft über mögliche Veränderungen des Habitus des Chloroplasten geben, die durch die Akkumulation von NDGD1 in der äußeren Hüllmembran hervorgerufen werden.

Innerhalb des fünften Teilbereiches soll die mögliche Funktion von NDGD1 über bioinformatische Ansätze weiter charakterisiert werden. Hierbei sollen Auskünfte zu der möglichen Struktur sowie Funktion von NDGD1 über den Vergleich mit Proteinen, deren Struktur und Funktion schon aufgeklärt werden konnte erhalten werden. Über eine detaillierte phylogenetische Analyse sollen Informationen zu dem evolutionären Ursprung von NDGD1 gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Laborausstattung

Analysenwaage 770	Kern, Balingen-Frommern (D)
Autoklav	Tuttnauer Systec, Kirchseeon-Buch (D)
Heizblock	Bioer, Hangzhou (CHN)
Homogenisator Precellys® 24	PEQLAB/VWR, Erlangen (D)
Inkubator, Kelvitron® t	Thermo Scientific Heraeus® , Waltham (USA)
Inkubationsschüttler, Multitron 28570	INFORS, Einsbach (D)
Junior-PAM	WALZ, Effeltrich (D)
Kamera DP7Z (Mikroskopie)	Olympus, Hamburg (D)
Laufkammer für die Gelelektrophorese	Cti, Idstein (D)
Lichtmikroskop BH-2	Olympus, Hamburg (D)
Mini-Extruder	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Photometer, Specord 205	Analytik Jena, Jena (D)
Probenkonzentrator	Techne (Bibby Scientific), Stone (UK)
Protan Nitrocellulose Transfermembran	Whatman/GE Healthcare, Maidstone (UK)
Schwingmühle MM400	Retsch, Haan (D)
Spektralfluorimeter FluoroMax-4	HORIBA Jobin Yvon, Edison (USA)
Spektrophotometer Nanodrop 1000	PEQLAB/VWR, Erlangen (D)
Sterilbank (Model 1.8)	Holten Lamin Air, Allerød (DK)
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen (D)
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, Hercules (USA)
Vertikale Laufkammer SE250, SDS-PAGE	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Vortex Cetromat® MV	Braun Biotech, Melsungen (D)
Waage PG503-S Delta Range	Mettler Toledo, Gießen (D)
Wachstumschammer, Rumed	Rubarth Apparate GmbH, Laatzen (D)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg (D)

Gaschromatograph (GC) mit Flammenionisationsdetektor (FID), Model 7890 Agilent, Böblingen (D)
 Quadrupol Time-Of-Flight (Q-TOF) LC/MS, Model 6530 Agilent, Böblingen (D)

2.1.2 Chemikalien

Aceton	Prolabo VWR, Darmstadt (D)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40% (29:1)	Roth, Karlsruhe (D)
Agarose	PEQLAB/VWR, Erlangen (D)
Albumin – Fraktion V	AppliChem, Darmstadt (D)
8-Aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS)	Setareh Biotech, Eugene (USA)
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt (D)
Ammonium(VI)-molybdat-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Ammoniumnitrat	AppliChem, Darmstadt (D)

Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Hercules (USA)
Bicinchoninsäure (BCA) – Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Borsäure	Grüssing, Filsum (D)
Bradford-Reagenz	BioRad, Hercules (USA)
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Cardiolipin (CL), Rinderherz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Chloroform	Merck, Darmstadt (D)
Coomassie Brilliant Blau R 250	AppliChem, Darmstadt (D)
3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
di16:0-Diacylglycerol (DAG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
di18:3-DAG	Larodan, Malmö (S)
Diethylether	Prolabo VWR, Darmstadt (D)
Digalactosyldiacylglycerin (DGDG), Spinat	Larodan, Malmö (S)
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt (D)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (D)
ECL Plus Western Blotting Substrate	Pierce/Thermo Scientific, Waltham (USA)
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt (D)
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt (D)
Ethanol 99 %, technisch	Hofmann
Ethanol, p.A.	Merck, Darmstadt (D)
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg (D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Fe-EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Glycerin	AppliChem, Darmstadt (D)
Guanidinhydrochlorid	AppliChem, Darmstadt (D)
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt (D)
Hexan	Merck, Darmstadt (D)
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Iod	AppliChem, Darmstadt (D)
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt (D)
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumnitrat	Grüssing, Filsum (D)
Kieselgel 60 mit Konzentrierungszone für die Dünnschichtchromatographie	Merck, Darmstadt (D)
Kobalt(II)-chlorid	Merck, Darmstadt (D)
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt (D)
Magermilchpulver	Heirler, Radolfzell (D)
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Monogalactosyldiacylglycerin (MGDG), Spinat	Larodan, Malmö (S)
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)
α -Naphthol	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt (D)
Natriumhypochlorit	Roth, Karlsruhe (D)
Natriummolybdat	Merck, Darmstadt (D)
Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Agarose	Qiagen, Hilden (D)
Phosphatidsäure (PA), Eigelb	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Phosphatidylcholin (PC), Eigelb	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
PC, Soja	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
1,4-Piperazinediethansulfonsäure (PIPES)	AppliChem, Darmstadt (D)
Ponceau S	Merck, Darmstadt (D)
p-Xylene-bis-pyridiniumbromid (DPX)	Setareh Biotech, Eugene (USA)
Saccharose	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)
Salzsäure 37%, zur Analyse	AppliChem, Darmstadt (D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, Hercules (USA)
Toluol	Prolabo VWR, Darmstadt (D)
Tricin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
UDP-Galaktose	Calbiochem/Merck, Darmstadt (D)
UDP-Glukose	Calbiochem/Merck, Darmstadt (D)
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt (D)

2.1.3 Medien und Antibiotika

Bacto Agar	Becton, Dickinson & Company, Sparks (USA)
Bacto Peptone	Becton, Dickinson & Company, Sparks (USA)
LB Broth	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)
Murashige & Skoog Medium (mit Vitaminen)	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)
Plant Agar	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)
Hefeextrakt (Yeast Extract)	Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)

Antibiotika wurden über Duchefa Biochemie (Haarlem (NL)) und AppliChem (Darmstadt (D)) erworben.

2.1.4 Antikörper

His Detector Nickel HRP	KPL, Gaithersburg (USA)
Peroxidase anti-Peroxidase (PAP) (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)

2.1.5 Kits und Enzyme

CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas/ Thermo Scientific, Waltham (USA)
High Speed Plasmid Mini Kit	DNA Cloning Service, Hamburg (D)
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	DNA Cloning Service, Hamburg (D)

Die Restriktionsenzyme, DNA-Polymerasen sowie Ligasen wurden von Fermentas/Thermo Scientific (Waltham (USA)) oder NEB (Ipswich (USA)) erworben.

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Integrated DNA Technologies (Leuven (B)) synthetisiert. Die Erkennungssequenzen der jeweiligen Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz	Kommentar, Restriktionsschnittstelle, mittlere Schmelztemperatur
bn1310	AGGATCCGACACCGGAAAACAAAAGGC	C-terminus von <i>DGD1</i> forward, <i>Bam</i> HI, 71 °C
bn1311	TTCTGCAGCCAGCCGAAGATTGGC	C-terminus von <i>DGD1</i> reverse, <i>Pst</i> I, 71 °C
bn1491	GCGGATCCGTTGTCTGACAATGAAAG	Lj <i>CDGD1</i> forward, <i>Bam</i> HI, 68 °C
bn1492	TAGCGGATCCGGGTAAGAAACAACATATTGC	Lj <i>DGD2</i> forward, <i>Bam</i> HI, 70 °C
bn1493	TCATGTCGACCCAGCCATAAATAGG	Lj <i>DGD1</i> reverse, <i>Sal</i> I, 66 °C
bn1494	TCTCGTCTGACTTTCCTGCCAGAATCAG	Lj <i>DGD2</i> reverse, <i>Sal</i> I, 69 °C
bn2200	AGGATCCGACGAATCAGCAGGAGCAACAC	DGD2 forward, <i>Bam</i> HI, 72 °C
bn2279	CTGTCGACATCTTGCTTGCAGATATTTGGG	DGD2 reverse, <i>Sal</i> I, 58 °C

2.1.7 Vektoren

Vektor	Selektionsmarker	Anbieter
pET43.1b	Amp ^R	Novagen/Merck, Darmstadt (D)
pJET1.2	Amp ^R	Fermentas/Thermo Scientific, Waltham (USA)
pQE31	Amp ^R	Qiagen, Hilden (D)
pBluescript II SK+	Amp ^R	Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
pLH6000	Sm ^R /Sp ^R in Bakterien; Hyg ^R in Pflanzen	DNA Cloning Service, Hamburg (D)
p6N-35S	Sm ^R /Sp ^R in Bakterien; Hyg ^R in Pflanzen	DNA Cloning Service, Hamburg (D)

2.1.8 Zellstämme

Escherichia coli:

Stamm	Genotyp	Anbieter
ElectroSHOX	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i> λ ⁻	Bioline, Taunten (USA)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^s ZAM15 Tn10 (Tet ^r)] F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS	Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
BI21 [DE3] pLysS	(Cam ^R)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad (USA)
BL21 STAR	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad (USA)
M15[pREP4]	NaI ^s , Str ^s , Rif ^s , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁻ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Qiagen, Hilden (D)

Agrobacterium fabrum (ehemals tumefaciens C58) (Lassalle et al., 2011):

C58C1(pGV2260) Deblaere et al. (1985)

Chlamydomonas reinhardtii:

dw15 Moellering und Benning (2010)

2.2 Arbeitsmethoden mit *E. coli*

2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Flüssigkulturen wurden in LB Medium bei 37 °C unter Schütteln (ca. 180 rpm) kultiviert. Die Selektion von plasmidhaltigen Zellen erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL) oder Carbenicillin (Endkonzentration 25 µg/mL).

LB Medium:

25 g/L LB-Broth (Duchefa), pH 7.2

Für Festmedien wurde 1,5 % Bacto Agar (BD) zugesetzt.

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mittels optischer Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt.

Für Dauerkulturen wurden Über-Nacht-Kulturen 1:1 mit sterilem 70%igen Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Plasmidisolation

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Riggs *et al.* (1986) isoliert. Das Zellpellet einer 2 mL-Übernachtskultur wurde in 200 µL BF-Puffer und 10 µL Lysozym (1 mg/mL) lysiert. Das Lysozym wurde durch einminütiges Erhitzen bei 100°C inaktiviert und dann das Lysat auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurde die Suspension bei 14000 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand zur Fällung der DNA mit 400 µL Isopropanol und 80 µL 5 M Ammoniumacetat vermischt. Es folgte nun eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 12 min. Die gefällte DNA wurde mit 500 µL 70%igem Ethanol gewaschen und dann erneut bei 14000 rpm für 6 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die DNA bei 45°C getrocknet und in 80-100 µL RNase-haltigem Wasser aufgenommen. Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

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

Plasmide für die Sequenzanalyse wurden mittels des „High-Speed Plasmid Mini Kits“ (DNA Cloning Service, Hamburg) isoliert.

2.2.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

Die Transformation der Zellen erfolgte entweder durch chemische Transformation, oder durch Elektroporation. Dementsprechend wurden nach unterschiedlichen Methoden chemisch kompetente oder elektrokompente Zellen hergestellt.

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) wurden 200 mL SOB Medium mit 2 mL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen bei 2.500 g und 4°C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde dann in 80 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut bei 2.500 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 15 mL eiskaltem TB-Puffer aufgenommen, mit 1,2 mL DMSO (finale Konzentration 7%) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die nun kompetenten Zellen in Aliquots von 220 µL in flüssigem Stickstoff direkt schockgefroren und bei -80°C gelagert.

SOB-Medium

20 g/L	Bacto-Peptide
5 g/L	Hefeextrakt
0,6 g/L	NaCl
0,18 g/L	KCl
2 mL	1 M MgSO ₄
2 mL	1 M MgCl ₂

MgSO₄ und MgCl₂ wurden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

TB-Puffer

10 mM	PIPES pH 6,7 (KOH), steril filtriert
55 mM	MnCl ₂
15 mM	CaCl ₂
250 mM	KCl

Für die Transformation wurde die Plasmid-DNA bzw. der Ligationsansatz zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben (maximal 20 µL) und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte nun durch einen Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen mit 800 µL LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C zur Etablierung der Transformation inkubiert. Ein Aliquot des Transformationsansatzes wurde abschließend auf festes LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde zunächst 400 mL SOB Medium mit 20 mL einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und vor der Ernte für 30 min auf Eis abgekühlt. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die durch Zentrifugation (5000 rpm, 15 min) geernteten Zellen wurden zunächst in 400 mL 1 mM HEPES aufgenommen und mehrfach mit eiskaltem deionisiertem Wasser mit absteigenden Volumina (200 mL, 100 mL, 50 mL) gewaschen. Der letzte Waschschriff erfolgte mit 20 mL einer 20 %igen Glycerinlösung. Abschließend wurden die Zellen in 2 mL einer 10 %igen Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots von 50 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation per Elektroporation wurden die Aliquots der elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA oder dem entsalzten Ligationsansatz (s. 2.6.3) für 2-5 min inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte 1mm-Elektroporationsküvette überführt und einem Spannungspuls von 1250 V ausgesetzt. Direkt nach der Transformation wurde 800 µL LB Medium auf die Zellen gegeben. Hiernach wurde wie nach der chemischen Transformation weiter vorgegangen.

2.2.4 Klonierung der Expressionskonstrukte

Das Konstrukt zur Expression der vollständigen DGD1-Sequenz sowie ihrer N-terminalen Sequenz (NDGD1) in pET43.1b wurde von Amélie Kelly hergestellt (Kelly *et al.*, 2016). Dieser Vektor beinhaltet neben einer C-terminalen Polyhistidinsequenz (His-Tag) die Gensequenz für den NusA-Tag. Das NusA-Protein ist ein natives *E.coli*-Protein, das *in vivo* durch die Bindung an die Terminationssequenz eines Gens das Abstoppen der Transkription an dieser Position hemmt (Antiterminator) (Burns *et al.*, 1998). Aufgrund der ausgeprägten Hydrophilie dieses Proteins wird es in diesem Expressionssystem dazu verwendet, über die N-terminale Fusion hydrophobe Proteine in Lösung zu bringen (Davis *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde ein weiteres Konstrukt zur Expression der Glykosyltransferasedomäne der DGD1 (CDGD1) in pET43.1b hergestellt. Dazu wurde die CDGD1 Sequenz mittels der Primer bn1310 sowie bn1311 aus dem Vektor pQE31-At*CDGD1* per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (s. auch 2.6.2) amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI, *Pst*I in pET43.1b ligiert. Die DGD2-Sequenz wurde mit Hilfe der Primer bn2200, bn2279 aus dem Vektor pQE31-DGD2 amplifiziert und über die eingefügten Schnittstellen *Bam*HI, *Sal*I in pET43.1b eingefügt. Die Amplifikation von CDGD1 sowie von DGD2 entsprechend der Sequenz aus *Lotus japonicus* erfolgte über die Primer bn1491, bn1493 bzw. bn1492, bn1494 aus den Vektoren pSPORT1-Lj*DGD1* sowie pBluescriptSK-Lj*DGD2*. Die PCR-Produkte wurden über die eingefügten Schnittstellen *Bam*HI, *Sal*I in pET43.1b ligiert.

Tabelle 1: Innerhalb dieser Arbeit verwendete *E.coli*-Expressionskonstrukte. Entsprechende Sequenzen wurden aus der cDNA von *Arabidopsis* oder *Lotus japonicus* (Lj) abgeleitet. Konstrukt: In dieser Arbeit zur Expression verwendete Konstrukte. Ursprungssequenzen: Vorlagen für die Amplifikation der entsprechenden cDNA Sequenzen über die PCR.

Konstrukt	Ursprungssequenzen	Anmerkung	Referenz
pET43.1b	-	Leervektor	Amélie Kelly (bn 163)
pET43.1b- <i>DGD1</i>	pET22b- <i>DGD1</i> (Peter Dörmann)	Fusion von NusA mit der vollständigen DGD1-Sequenz	Amélie Kelly (bn 166)
pET43.1b- <i>NDGD1</i>	pET22b- <i>DGD1</i> (Peter Dörmann)	Fusion von NusA mit NDGD1	Amélie Kelly (bn 170)
pET43.1b- <i>CDGD1</i>	pQE31- <i>CDGD1</i>	Fusion von NusA mit CDGD1	diese Arbeit (bn 335)
pQE31- <i>DGD2</i>	<i>DGD2</i> cDNA	DGD2	Kelly and Dörmann (2002) (PD 185)
pET43.1b- <i>DGD2</i>	pQE31- <i>DGD2</i>	Fusion von NusA mit DGD2	diese Arbeit (bn 868)
pET43.1b-Lj <i>CDGD1</i>	pSPORT1-Lj <i>DGD1</i> (Gaude <i>et al.</i> , 2004)	Fusion von NusA mit CDGD1 von <i>Lotus japonicus</i>	diese Arbeit (bn 476)
pET43.1b-Lj <i>DGD2</i>	pBluescriptSK-Lj <i>DGD2</i> (Gaude <i>et al.</i> , 2004)	Fusion von NusA mit DGD2 von <i>Lotus japonicus</i>	diese Arbeit (bn 477)

2.2.5 Expression in *E. coli*

Je nach weiterer Vorgehensweise wurde mit einem von zwei Expressionsprotokollen gearbeitet:

- 1) Um für die Enzymassays (s. 2.9) eine möglichst große Menge aktiven Proteins zu erhalten, wurde die Expression bei 16 °C durchgeführt. Dazu wurden zunächst 50 mL-Hauptkulturen mit den entsprechenden Übernachtskulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 wurde die Expression nach dem 20 minütigen Abkühlen der Kulturen bei 4 °C mit 0,1 mM IPTG induziert. Wie zuvor beschrieben erfolgte die Expression bei 16 °C für mindestens 12 h.
- 2) Um höhere Proteinernnten zu erzielen sowie zur Zeitersparnis wurde vorbereitend zur denaturierenden Proteinaufreinigung (s. 2.8.4) ein anderes Expressionsprotokoll ausgewählt. Hier erfolgte nach der Induzierung mit IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 die Expression für 3 h bei 37 °C.

2.3 Arbeitsmethoden mit *Agrobacterium fabrum*

Aufgrund seiner Fähigkeit, Fremd-DNA in Pflanzenzellen einzubringen und diese stabil in das Pflanzengenom zu integrieren, ist die Transformation über das Bodenbakterium *A. fabrum* mittlerweile eine Standardmethode für die Erzeugung von transgenen Pflanzenlinien. Die dafür verwendeten nicht-pathogenen Zellstämme enthalten einen sogenannten Helferplasmid, der die Virulenzgene enthält. Diese sind für die Infektion der Pflanzenzellen sowie die anschließende Integration der Fremd-DNA in das pflanzliche Genom nötig. In die Bakterienzellen wird nun ein zweiter Vektor eingebracht, der sogenannte binäre Vektor. Dieser enthält neben dem gewünschten Zielgen jeweils einen Replikationsursprung sowie einen Selektionsmarker für Bakterien und Pflanzen.

2.3.1 Kultivierung von *A. fabrum*

A. fabrum wurde bei 28°C in YEP Medium mit Rifampicin (Endkonzentration 80 µg/mL) sowie gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika als Selektionsmarker kultiviert. Die Belüftung der Flüssigkulturen erfolgte durch Schütteln bei 180 rpm.

YEP Medium

10 g/L	Bacto Peptone
10 g/L	Hefeextrakt
5 g/L	Natriumchlorid

pH 7,4

Für Festmedium wurde des Weiteren 1,5 % Bacto Agar zugefügt.

Zur Überprüfung der Zelldichte wurde die OD₆₀₀ bestimmt.

Dauerkulturen wurden aus 1 mL einer Über-Nacht-Kultur und Zugabe von 1 mL sterilem 70%igen Glycerin angelegt und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Herstellung kompetenter *A. fabrum* Zellen und Transformation

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde 400 mL YEP Medium mit 5 mL einer üN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD600 von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die im Eisbad abgekühlten Kulturen wurden für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C für die Zellernte zentrifugiert und das Zellpellet in 400 mL eiskaltem sterilem deion. Wasser gewaschen. Dieser Schritt wurde 4fach wiederholt und anschließend das Zellpellet in 1 mL eiskaltem sterilem 10 %igem Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in Aliquots von 40 µL nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Die Transformation von *A. fabrum* erfolgte über Elektroporation. Dazu wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen mit Plasmid DNA (~ 1 µL) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte 1mm-Elektroporationsküvette überführt und dann einem Spannungspuls von 1250 V ausgesetzt. Nach diesem Puls wurden die Zellen direkt in 800 µL YEP Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für 4 h bei 28°C regeneriert und dann auf festes YEP Medium mit Rifampicin sowie den entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert.

2.4 Arbeitsmethoden mit *Chlamydomonas reinhardtii*

2.4.1 Kultivierung von *C. reinhardtii*

Die Kultivierung von *C. reinhardtii* erfolgte bei einer Lichtintensität von 50-70 µmol Quanten m⁻² s⁻¹ (Dauerlicht) und einer Temperatur von 22°C in TAP Medium. Die Flüssigkulturen wurden hierbei bei 100 rpm zur Belüftung geschüttelt.

Das TAP-Medium wurde nach Gorman und Levine (1965) angesetzt.

STAMMLÖSUNGEN FÜR DAS TAP-MEDIUM:

10 x TAP Base (pH 7,0-7,5)

1 g/L	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
0.5 g/L	CaCl ₂ * 2 H ₂ O
24.2 g/L	Tris Base
10 mL/L	Eisessig

100 x N-Stammlösung

180 g/L	NH ₄ Cl
---------	--------------------

1000 x P-Stammlösung

180 g/L	K ₂ HPO ₄
90 g/L	KH ₂ PO ₄

1000 x Hutner's Spurenelement-Lösung

50 g/L	EDTA Dinatriumsalz
22 g/L	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O
11.4 g/L	H ₃ BO ₃
5.06 g/L	MnCl ₂ * 4 H ₂ O
1.61 g/L	CoCl ₂ * 6 H ₂ O
1.57 g/L	CuSO ₄ * 5 H ₂ O
1.10 g/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O
4.99 g/L	FeSO ₄ * 7 H ₂ O

TAP-MEDIUM 1L:

100 mL	TAP Base
10 mL	N-Stammlösung
1 mL	P-Stammlösung
1 mL	Hutner's Spurenelement-Lösung

Für die Herstellung von Festmedium wurde des Weiteren 1,5 % Plant Agar hinzugefügt.

2.5 Arbeitsmethoden mit *Arabidopsis thaliana***2.5.1 Kultivierung von *A. thaliana***

Je nach Zielsetzung wurden die Samen von *Arabidopsis* direkt auf Erde oder auf ein Nährmedium (MS-Medium) ausgebracht. Für das Wachstum der Pflanzen auf dem Nährmedium war es zunächst notwendig, die Samenoberfläche zu sterilisieren. Dazu wurden diese in Samensterilisationsmedium für 15-20 min unter Schütteln inkubiert und daraufhin mit 96 %igen Ethanol (vergällt) dreifach gewaschen. Die Samen wurden unter sterilen Bedingungen getrocknet und dann auf Platten mit 2xMS-Medium ausgebracht. Zur Vernalisation wurden die Platten mit den Samen für mindestens 12 h bei 4 °C gelagert.

Samensterilisationsmedium (10 mL):

4,2 mL	deion. H ₂ O
0,8 mL	12 % Natriumhypochlorit-Lösung
5 mL	96 % Ethanol

2xMS – Medium (Murashige and Skoog, 1962):

4,8 g/L	MS salts including vitamins
10 g/L	Saccharose
9 g/L	Plant Agar

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte bei $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 %, entweder bei Langtag- (16 h Licht) oder Kurztag- (8 h Licht) Bedingungen. Für Phosphatmangelexperimente wurden die entsprechenden Pflanzen zunächst für 2 Wochen auf 2xMS-Medium angezogen. Die Pflanzen wurden auf ein synthetisches Nährmedium mit (+ Phosphat) und ohne (- Phosphat) KH_2PO_4 umgesetzt und für weitere 10 bis 12 Tage (bis sich die Blätter der Pflanzen auf Phosphatmangelmedium rötlich verfärbten) kultiviert.

Synthetisches Nährmedium

0,8 %	Agarose
1 %	Saccharose
2,5 mM	KNO_3
1 mM	MgSO_4
1 mM	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
1 mM	KH_2PO_4
1 mM	NH_4NO_3
25 μM	Fe-EDTA
35 μM	H_3BO_3
7 μM	MnCl_2
0,25 μM	CuSO_4
0,5 μM	ZnSO_4
0,1 μM	Na_2MoO_4
5 μM	NaCl
5 nM	CoCl_2

2.5.2 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation der *dgdl-1*-Mutante (Dörmann *et al.*, 1995a) erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Clough *et al.* (1998). Aufgrund des kleinen Wachses der Mutante wurde hier anstatt des “Floral dippings”, das in dieser Publikation vorgestellt wurde, die Suspension der transgenen *A. fabrum* Zellen in der Saccharose-Silwett L77-Lösung per Pinsel auf die Infloreszenzen der etwa 4 Wochen alten Pflanzen aufgetragen. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen, wurden nach dieser Behandlung die Pflanzen mit einer mit Wasser besprühten Plastikhaube über Nacht abgedeckt. Diese Prozedur wurde mehrfach alle 5 Tage zur Steigerung der Effizienz wiederholt. Sobald die Samenschoten gelb bzw. braun wurden, wurden diese abgeschnitten, getrocknet und die Samen geerntet. Die Selektion der transformierten Pflanzen erfolgte auf 2xMS – Platten, die mit entsprechenden Selektionsmarkern versehen waren.

2.5.3 Klonierung von DGD1-CTAP in p35-6N

Mit dem Ziel, das DGD1-Protein mit potentiellen Interaktionspartnern aus den Pflanzen zu extrahieren und zu reinigen, wurde in der Doktorarbeit von Sandra Witt (2009) ein TAP-Tag C-terminal mit der DGD1-Sequenz fusioniert (DGD1-CTAP) und über den Vektor pLH6000 in *dgdl-1* eingebracht. Die

Tandem Affinity Purification (TAP) Methode wird im Allgemeinen dazu verwendet, Proteine über zwei Schritte aufzureinigen. Aufgrund der Problematik, dass diese Pflanzen nach einiger Zeit keine detektierbare Proteinexpression zeigten, wurde vermutet, dass „Gene silencing“ in den Pflanzen erfolgte. Der Grund hierfür könnte sein, dass sowohl die Expressionskassette als auch das Resistenzgen in pLH6000 unter der Kontrolle des 35S-Promotors stehen (Meyer and Saedler, 1996; Komari *et al.*, 2006). Um dies zu umgehen, wurde innerhalb dieser Arbeit das DGD1-CTAP-Konstrukt in den binären Vektor p6N-35S über die *Sfi*I-Schnittstellen eingebracht. Die Resistenzkassette dieses Vektors beinhaltet anstelle des 35S-Promotors einen NOS-Promotor (NOS = NOpaline Synthase).

Die Selektion in Bakterien erfolgte über Streptomycin und Spectinomycin. Transformierte *dgd1-1*-Mutanten wurden über 2xMS-Platten mit Hygromycin B selektiert.

2.5.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

In der vorangegangenen Arbeit von Sandra Witt (2009) wurde der binäre Vektor pBINAR-*NDGD1*, zur Überexpression der N-terminalen Sequenz von DGD1, in Col2 eingebracht. Die resultierenden Pflanzen waren verkleinert und hatten gekräuselte Blätter. Zur Klärung der Frage, ob die Überexpression von NDGD1 sowie die Akkumulation von NDGD1 in der äußeren Chloroplastenhüllmembran zu einer gestörten Chloroplastenmorphologie führt, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Probenaufbereitung sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten durch Dr. Michael Melzer (Strukturelle Zellbiologie, IPK Gatersleben).

2.5.5 Chlorophyllextraktion und -bestimmung

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach dem Protokoll von Porra *et al.* (1989). Zur absoluten Quantifizierung wurden mittels eines Korkbohrers Scheiben mit einer definierten Grundfläche (12,57 mm²) aus den Blättern ausgestanzt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mittels einer Schwingmühle (Retsch) wurde das Blattmaterial durch Metallkugeln im gefrorenen Zustand gemörsert und zunächst wieder im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Das pulverisierte Blattmaterial wurde nun in 1 mL 80 %igem (v/v) Aceton aufgenommen und extrahiert. Es ist wichtig, dabei schnell vorzugehen und die Proben auf Eis zu lagern, da das Chlorophyll leicht degradiert. Nach der Extraktion wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (4 °C, 13000 rpm, 5 min), der Überstand abgenommen, das Pellet erneut in 1 mL 80 %igem Aceton zur Extraktion des restlichen Chlorophylls aufgenommen und nach erneuter Zentrifugation der Überstand zu dem ersten Extrakt hinzugefügt. Die Absorptionsmessung erfolgte in Quarzküvetten bei 663.6, 646.6 sowie 750 nm. Der Absorptionswert bei 750 nm diente hierbei als Korrekturfaktor und wurde zunächst von den Absorptionswerten von 663.6 und 646.6 nm abgezogen. Die Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Konzentrationen wurden anhand der folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Chlorophyll a} = 12.25 * (A_{663.6} - A_{750}) - 2.55 * (A_{646.6} - A_{750})$$

$$\text{Chlorophyll b} = 20.31 * (A_{646.6} - A_{750}) - 4.91 * (A_{663.6} - A_{750})$$

2.5.6 PAM-Fluorometrie

Die Erfassung der photosynthetischen Aktivität des Photosystems II (PSII) erfolgte über die PAM-Fluorometrie (Pulse-Amplitude-Modulated Fluorescence).

Photosynthetisch aktive Strahlung wird direkt photobiochemisch genutzt oder als Fluoreszenz- und Wärmestrahlung wieder abgegeben. Je nach Zustand der Photosysteme variiert hierbei das Verhältnis, d.h. dass sich eine Beeinträchtigung der Photosysteme durch eine Erhöhung der Fluoreszenz- sowie Wärmeemission zeigen kann. Mittels des PAM-Fluorometers (Junior-PAM, WALZ) werden sättigende Lichtimpulse direkt auf die Blattoberfläche abgegeben und darauf folgend die Fluoreszenzemission erfasst. Dieser Wert wird als die maximale Fluoreszenz (F_M) bezeichnet. Durch die Einbeziehung der Grundfluoreszenz (F_0 , Fluoreszenzwert vor den Lichtimpulsen) kann nun die maximale Quantenausbeute (F_V/F_M) von dem PSII bestimmt werden. Lichtstress ($500, 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) induziert die Aktivierung diverser Mechanismen zur Ableitung der überschüssigen Lichtenergie (z.B. der Xantophyllzyklus). Eine veränderte Reaktion der Pflanzen auf den Lichtstress wird als Hinweis auf eine mögliche Fehlfunktion der Photosysteme angenommen. Es wird hierbei zwischen der absoluten Quantenausbeute F_V/F_M bei dunkel-adaptierten Pflanzen sowie der relativen Quantenausbeute F_V'/F_M' bei Licht-adaptierten Pflanzen unterschieden.

In dieser Arbeit wurden zunächst Col2- und *dgd1-1*-Pflanzen, sowie Pflanzen der beiden Überexpressionslinien ND1#40 und ND1#45 für 20 min unterschiedlichen Lichtintensitäten ($0, 500, 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ausgesetzt. Nach der Adaptionszeit erfolgte unter den genannten Bedingungen die PAM-Messung, wobei der Lichtleiter des Junior-PAM Geräts direkt auf die Blattoberfläche aufgesetzt wurde. Die Messwerte wurden nun graphisch im Vergleich zueinander aufgetragen und ausgewertet.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Gelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese erfolgte eine Auftrennung einzelner DNA-Fragmente z.B. nach einem Restriktionsverdau. In der Regel wurden hier 1 %ige Agarosegele in TBE-Puffer mit $0,1 \mu\text{g/mL}$ Ethidiumbromid verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6x-Probenpuffer versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde für die Abschätzung der Größen der Banden ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Je nach Größe des Gels wurde die Elektrophorese bei 90 bis 120 V durchgeführt.

1x TBE-Puffer

89 mM	Tris-Base
89 mM	Borsäure
2 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8)

6x-Probenpuffer

10 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
60 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8)
0,03 %	Bromphenolblau
0,03 %	Xylol cyanol FF
6,5 %	Glycerin

2.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten bzw. Genen aus dem Genom eines Organismus oder aus Plasmiden erfolgt über die PCR. In den meisten Fällen werden hier über Überhänge der Primer Restriktionsschnittstellen für die weitere Klonierung angefügt.

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in der Regel über die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB). Für die Amplifikation eines Fragmentes aus einem Plasmid wurden etwa 1-10 ng der Vorlage- (Template) DNA benötigt. Die Primer wurden von der Firma IDT bezogen und mit A. deion. bis zu einer Konzentration von 10 pmol/μL verdünnt. Um die Spezifität der Bindung der Primer an das Template zu erhöhen, kann zu dem PCR-Ansatz 2% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben werden. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50 μL.

PCR-Reaktionsansatz

1 μL (≅ 1-10 ng)	Template-DNA
10 μL	Q5 Reaction buffer
1 μL	10 mM dNTPs
2,5 μL	10 pmol/μL forward Primer
2,5 μL	10 pmol/μL reverse Primer
32,5 μL	A. deion.
0,5 μL	Q5 Polymerase

Das PCR-Programm wurde an die Herstellerangaben von NEB angepasst:

PCR-Programm

		Temperatur	Zeit		
30-35 x	[1	98 °C	30 s	Denaturierung
		2	98 °C	10 s	Denaturierung
		3	$T_m - 5$ °C	30 s	Annealing
		4	72 °C	30 s/ kb	Elongation
		5	72 °C	2 min	Elongation

Bei unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Primer (T_m , s. 2.1.6) wurde für das Annealing immer die niedrigere berechnete Temperatur verwendet. Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese sowie anschließender Gelextraktion (Kit) gereinigt.

2.6.3 Weitere Klonierungsschritte

Das gereinigte PCR-Fragment wurde nachfolgend in den Klonierungsvektor pJET1.2 ligiert (nach Protokoll des Herstellers) und in *E.coli* vermehrt. Das PCR-Fragment wurde über die eingefügten Schnittstellen per Restriktionsverdau herausgelöst und der Zielvektor (z.B. pET43.1b) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert (2h). Beide Fragmente wurden per Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend wurde der linearisierte Zielvektor mit dem geschnittenen PCR-Produkt (Insert) ligiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Zielvektor zu dem PCR-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1 zu 3 vorliegt. Die Berechnung der Menge der jeweiligen Fragmente für die Ligation kann mittels folgender Formel erfolgen:

$$\frac{I_{\text{vektor}} \times G_{\text{insert}}}{G_{\text{vektor}}} \times 3 = V_{\text{insert}}$$

Die Bestimmung der Bandenintensität (I) von 1 μL der DNA erfolgte mittels Gelelektrophorese. I_{vektor} ist die Intensität des Vektors im Vergleich zu der des Inserts. G ist die Größe der entsprechenden Fragmente in kbp. V_{insert} ist das für die Ligation benötigte Volumen des Inserts in μL , wenn 1 μL des Vektors verwendet wird. Die Ligation der Fragmente erfolgte mit Hilfe der T4 Ligase (Fermentas) nach den Angaben des Herstellers. Für die Transformation mittels Elektroporation war es notwendig die Ligationsansätze zu entsalzen. Die Entsalzung des Ligationsansatzes erfolgte in der Regel über die Dialyse durch einen Membranfilter (Celluloseester, Porengröße 0,025 μm) (EMD Millipore, FisherScientific, Waltham (USA)). Anschließend wurden die entsalzten Ligationsansätze in elektrokompetente *E. coli* Zellen (s. 2.2.3) transferiert. Nach der Ausplattierung und Kultivierung der transformierten Zellen wurden mehrere resistente Kolonien gepickt und damit *E. coli*-Flüssigkulturen angesetzt. Aus den Flüssigkulturen wurden anschließend die Plasmide isoliert (s. 2.2.2). Die erzeugten Plasmide wurden mittels Kontrollverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen überprüft (genaue Klonierungsprotokolle bitte dem Anhang entnehmen).

2.7 Lipidanalytik

2.7.1 Lipidisolation

Die Extraktion der Lipide aus frischem Pflanzenmaterial erfolgte nach Siebertz *et al.* (1979). Zur Inaktivierung der Lipasen wurde das Pflanzenmaterial direkt nach dem Ernten zunächst 10 min in Wasser abgekocht. Das Wasser wurde dann verworfen. Der erste Extraktionsschritt erfolgte mit Chloroform:Methanol in einem Verhältnis von 1:2 unter Schütteln für mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C. Der zweite Extraktionsschritt wurde mit Chloroform:Methanol 2:1 unter den gleichen Bedingungen wie bei dem ersten Schritt durchgeführt. Die Extrakte wurden nun vereinigt und ein Mischungsverhältnis Chloroform:Methanol:Wasser von 2:1:0,75 eingestellt. Über das anschließende Ausschütteln wurden polare Kontaminationen des Lipidextraktes in die wässrige Phase überführt. Die anschließende Phasentrennung erfolgte über die Zentrifugation bei 1000 rpm für 2 min. Die Chloroformphase (unten) mit den darin enthaltenden Lipiden wurde anschließend mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein neues Glasröhrchen überführt. Die Lagerung der Lipidextrakte erfolgte bei -20 °C.

2.7.2 Fraktionierung der Lipide mittels Festphasenextraktion

Zur Fraktionierung eines Gesamtlipidextraktes in Neutrallipide (wie TAG), Glykolipide (wie MGDG und DGDG) und Phospholipide (wie PC) wurde eine Festphasenextraktion mit Silikasäulchen durchgeführt. Je nach Volumen und Konzentration des Extraktes wurden 500 mg-Säulchen (5 mL Gesamtvolumen) oder 100 mg-Säulchen (1 mL Gesamtvolumen) gewählt. Die in Chloroform aufgenommenen Lipide wurden auf die mit Chloroform äquilibrierte Säule gegeben und folgendermaßen fraktioniert:

- | | |
|--|---------------|
| 1. 3faches Gesamtvolumen Chloroform: | Neutrallipide |
| 2. 3faches Gesamtvolumen Aceton/Isopropanol (9:1): | Glykolipide |
| 3. 3faches Gesamtvolumen Methanol: | Phospholipide |

Für die Anreicherung von DAG und TAG in den Lipidextrakten wurden die Extrakte in Hexan aufgenommen und auf die zuvor mit Hexan äquilibrierte Säule gegeben. Die Elution der Lipide erfolgte nach folgendem Schema (nach <http://www.cyberlipid.org>):

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1. 3faches Gesamtvolumen Hexan: | Kohlenwasserstoffe sowie Squalene |
| 2. 5faches Gesamtvolumen Hexan/Diethylether (95:5): | u.a. TAG |
| 3. 5faches Gesamtvolumen Diethylether: | u.a. DAG und MAG |

2.7.3 Dünnschichtchromatographie

Mittels der Dünnschichtchromatographie (DC) über Silicaplatten wurde die Reinheit sowie Zusammensetzung eines Lipidextraktes überprüft. Die Lipidproben wurden etwa 0,5 bis 1 cm breit auf die Platte neben einem Referenzlipidextrakt aufgetragen. Bei der präparativen DC zur Gewinnung reiner Lipide wurde der Lipidextrakt in einem schmalen Band auf die gesamte Breite der Platte aufgetragen, hierbei wurde zu den Rändern etwa 1 cm Platz gelassen. Als Laufmittel wurde Aceton:Toluol:Wasser

91:30:8 verwendet. Für die Visualisierung der Lipide wurden mehrere Färbemethoden verwendet. Glykolipide werden mit Hilfe des α -Naphthol-Schwefelsäure-Reagenz und dem anschließenden Erhitzen der Platte auf etwa 137 °C selektiv angefärbt. Durch das anschließende Erhitzen auf über 200 °C erfolgt die durch die Schwefelsäure verursachte Verkohlung aller organischen Substanzen wie z.B. der Phospholipide, wodurch diese auf der Platte als braune bis schwarze Flecken erscheinen. Für die präparative Dünnschichtchromatographie kann dieses Reagenz aber nicht verwendet werden. Über das ANS-Reagenz können Lipide ohne die Zerstörung der Molekülstruktur unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden. Die Bande des zu reinigenden Lipides wurde markiert und von der Platte geschabt. Die Lipide wurden aus dem Silicamaterial analog zu der generellen Lipidisolierung extrahiert (s. Lipidisolierung). Eine weitere Möglichkeit, organische Moleküle auf den Platten anzufärben, ist das Bedampfen mit molekularem Iod.

ANS-Reagenz

0,2 % (w/v) Anilinnaphthalinsulfonsäure in Methanol

α -Naphthol / Schwefelsäure

8 g α -Naphthol in 250 mL Methanol

30 mL konz. H₂SO₄ unter Rühren im Eisbad zugeben

2.7.4 Lipidquantifizierung durch Messung der Fettsäuremethylester per GC-FID

Die Lipide wurden anhand ihrer Fettsäuremethylester (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) mittels eines Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) analysiert und quantifiziert. Per saurer Transmethylierung wurden die Fettsäuren von dem Glycerin-Grundgerüst der komplexen Lipide gelöst. Anhand der Konzentration der Fettsäuren konnten nun auch die Lipide quantifiziert werden ($C_{\text{Lipid}} = C_{\text{Fettsäure}}/2$).

Zunächst wurden 1 mL 1 M methanolische Salzsäure auf das getrocknete Lipid gegeben und 100 μ L des internen Standards Pentadecansäure (15:0; 50 μ g/ mL in Methanol) hinzugefügt. Die Transmethylierungsreaktion erfolgte bei 80 °C für 20 min. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden 1 mL Hexan sowie 1 mL 0,9 %ige NaCl-Lösung zugegeben. Nach dem Ausschütteln und der darauf folgenden Zentrifugation (2000 rpm, 2 min) wurde die obere Hexanphase abgenommen und direkt oder aufkonzentriert per GC-FID analysiert.

2.7.5 Lipidanalytik mit Hilfe des Q-TOF-Massenspektrometers

Des Weiteren wurden die Lipide mittels des 6530 Accurate Mass Quadropole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS Massenspektrometers (Agilent) analysiert. Hierzu wurden zunächst die Lipidextrakte (s. Seite 32) in dem Laufmittelgemisch Chloroform:Methanol:300mM Ammoniumacetat (300:665:35)

aufgenommen. Für die Messung wurden 5-15 μL der Probe mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ unter Verwendung des „Nanoflow direct infusion Chip Cubes“ in das Massenspektrometer injiziert ($V_{\text{cap}} = 1500 \text{ V}$). Nach der Selektion der positiv ionisierten Lipide im Quadrupol erfolgte unter Spannung deren Fragmentierung mittels Stickstoff in der Kollisionszelle (Fragmentorspannung = 200 V). Hierzu wurde zuvor die Kollisionsenergie für jede Lipidklasse ermittelt. Die Lipidklassen wurden nach Abspaltung der Kopfgruppe (Glyko- und Phospholipide) oder einer Fettsäure (Neutrallipide) über den charakteristischen Masseverlust („neutral loss“) oder das Auftreten einer bestimmten Fragmentmasse („precursor ion“) identifiziert. Anhand der Signalstärke des resultierenden positiv geladenen Fragmentes wie z.B. des Phosphocholins oder des DAGs der Phospho- und Galaktolipide wurden die Lipide relativ zu Standards (s.

Tabelle 2) quantifiziert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Mass Hunter Workstation Software (Version B.02.00; Agilent Technologies) (Welti *et al.*, 2002; Gasulla *et al.*, 2013).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Phospho- und Galaktolipidstandards (links), des internen Galaktolipidstandards (Mitte) sowie des DAG- und TAG-Standards (rechts).

Lipid	Konzentration (nmol/ 10 μL)	Lipid	Konzentration (nmol/ 50 μL)	Lipid	Konzentration (nmol/ 10 μL)		
MGDG	34:0	0,07	MGDG	34:0	0,7		
	36:0	0,05		DGDG	34:0	0,75	
DGDG	34:0	0,1	36:0		2,72	DAG	
	36:0	0,2	SQDG	34:0	0,2		
PA	28:0	0,07		PA	28:0		0,07
	40:0	0,07			PS		28:0
PS	28:0	0,01		PI		34:0	0,15
	40:0	0,01	PE		28:0	0,1	
PI	34:0	0,15		40:0	0,1	PG	
	PE	28:0	0,1	28:0	0,1		
PG		40:0	0,1	40:0	0,1	PC	
	PC	28:0	0,1	28:0	0,1		
						40:0	0,1

2.7.6 Analyse der Verteilung der an *sn2* gebundenen Fettsäuren in TAG

Zur Analytik der an der *sn2*-Position des TAGs gebundenen Fettsäuren wurde nach dem Protokoll von Byrdwell (2005) vorgegangen. Die TAGs der Blattproben wurden zunächst aufgereinigt (s. 2.7.2). Zum Zweck der Vereinheitlichung und damit Vereinfachung der Messung wurden die an diesen TAGs gebundenen Fettsäuren in Anwesenheit von Platin(IV)-oxid mit Wasserstoff hydriert und damit abgesättigt. Die TAG-Proben sowie 16:0/16:0/18:0- (PPS, 50:0), 16:0/18:0/16:0- (PSP, 50:0), 18:0/18:0/16:0- (SSP, 52:0) und 18:0/16:0/18:0- (SPS, 52:0) TAG wurden mit dem QTOF-MS fragmentiert. Die nach der Messung erhaltenen Chromatogramme wurden nach dem Masseverlust einer 16:0- (Palmitinsäure, P) oder 18:0- (Stearinsäure, S) Fettsäure extrahiert. Die Berechnung der

Verhältnisse der Regioisomere der TAGs zueinander (z.B. PPS zu PSP) innerhalb der Proben beruht auf dem Tatsache, dass Fettsäuren, die an *sn1* oder *sn3* gebunden sind, leichter bei der Fragmentierung abgespalten werden, als die Fettsäure, die sich an *sn2* befindet. Somit ist z.B. das Verhältnis $[PP]^+/[PS]^+$ (bezogen auf die jeweilige Häufigkeit der nach der Fettsäureabspaltung erhaltenen DAG-Fragmente) bei PSP größer als bei PPS. In den folgenden Erläuterungen wird beispielhaft auf die Berechnung des Verhältnisses PSP zu PPS in den Proben eingegangen. Nach der Messung wird anhand der erhaltenen Häufigkeitswerte der DAG-Fragmente das Verhältnis $[PP]^+/[PS]^+$ bei den reinen TAGs (in dem Fall PSP und PPS) sowie den 50:0-TAGs der Proben berechnet. Diese Verhältnisse werden in die folgenden Formeln eingesetzt.

$$(\% \text{ PSP}) = \left(\frac{\left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{PPS}} - \left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{PPS}} - \left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{PSP}}} \right) \times 100 \%$$

$$(\% \text{ PPS}) = \left(\frac{\left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{Probe}} - \left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{PSP}}}{\left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{PPS}} - \left(\frac{[PP]^+}{[PS]^+} \right)_{\text{PSP}}} \right) \times 100\%$$

Mittels dieser Formeln wird das prozentuale Verhältnis von PSP zu PPS innerhalb der 50:0-TAGs der Proben berechnet. Das heißt, dass mit den erhaltenen Werten die prozentuale Verteilung der an *sn2* gebundenen Fettsäuren (bezogen auf die Kettenlänge) abgeschätzt werden kann.

Für die Berechnung des prozentualen Verhältnisses SPS zu SSP innerhalb der 52er-TAGs wird ähnlich vorgegangen. Für diese Berechnung wird aber das Verhältnis $[SS]^+/[SP]^+$ verwendet. Dieses Verhältnis wird für das reine SPS und SSP sowie den 52:0-TAGs der Proben berechnet und in die folgenden Formeln eingesetzt.

$$(\% \text{ SPS}) = \left(\frac{\left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{SSP}} - \left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{SSP}} - \left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{SPS}}} \right) \times 100 \%$$

$$(\% \text{ SSP}) = \left(\frac{\left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{Probe}} - \left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{SPS}}}{\left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{SSP}} - \left(\frac{[SS]^+}{[SP]^+} \right)_{\text{SPS}}} \right) \times 100 \%$$

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Proteinkonzentrationsmessungen

Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte photometrisch mittels des BCA- oder Bradford-Reagenz. Für die Herstellung der BCA-Arbeitslösung (Smith *et al.*, 1985) wurde zu 50 Teilen des Reagenz 1 Teil einer 7 %igen Kupfersulfatlösung hinzugefügt. Auf 20 μL Probenansatz wurden 200 μL der BCA-Arbeitslösung pipettiert und für 15 min bei 60 °C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 560 nm.

Für den Bradford-Test (Bradford, 1976) wurde auf 20 μL Probe 200 μL mit Wasser verdünntes Reagenz (1:5) gegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und photometrisch bei 595 nm der Proteingehalt bestimmt. Zu jeder Messung wurden 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1.0 mg/mL BSA-Standardreihen im entsprechenden Puffersystem angefertigt.

2.8.2 SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion

Der Proteinnachweis erfolgte über Natrium- (engl. Sodium-) dodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) und gegebenenfalls nachfolgendem Western Blot und Immunodetektion. Die SDS-PAGE erfolgte nach dem Protokoll nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist Tabelle 3 zu entnehmen. TEMED sowie die Ammoniumpersulfatlösung wurden direkt vor dem Einfüllen der jeweiligen Lösung in die Gießkammer hinzugefügt. Das Trenngel wurde bis etwa 3 cm unter dem Rand der Gießkammer gegossen und mit 70 %igen Isopropanol überlagert. Nach 20 min Polymerisationszeit wurde das Isopropanol wieder vollständig entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Schließlich wurden die Kämme für die Probenaschen eingesetzt und das Gel für 20 min auspolymerisiert.

Tabelle 3: Pippettierschema für 2 Minigele (5 x 8 cm) für die SDS-PAGE (das 10 %ige Trenngel wurde für die Auftrennung der Proteine insbesondere im Bereich von 60-100 kDa, das 7 %ige im Bereich über 100 kDa eingesetzt):

	Trenngel		Sammelgel
	10%	7%	4%
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40%	6,25 mL	4,5 mL	1 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	6,25 mL	6,25 mL	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	-	2,5 mL
10 % SDS	250 μL	250 μL	100 μL
H ₂ O	12,1 mL	13,85 mL	6,3 mL
TEMED	10 μL	10 μL	5 μL
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung	150 μL	150 μL	100 μL
Total	25 mL		10 mL

Pro Tasche wurden 30 - 50 µg Protein bei Rohextrakten und 5 µg bei reinen Proteinen aufgetragen. Zuvor wurde dazu das entsprechende Probenvolumen mit 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht und dann 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert.

Probenpuffer 4x

400 mM	Tris Base
8 %	SDS
40 %	Glycerin
0.02 %	Bromphenolblau
4 mM	EDTA
10 %	β-Mercaptoethanol

Die Elektrophorese erfolgte in einem Tank mit 1 x Lauffpuffer. Der Lauf wurde mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Minigel (5 x 8 cm) gestartet. Sobald die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Stromstärke auf 35 mA pro Minigel erhöht.

1 x Lauffpuffer

25 mM	Tris Base
192 mM	Glycin
0.1 % (w/v)	SDS

Nachdem die Lauffront das untere Ende des Geles erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel entnommen. Zur Übersicht konnte das Gel nun direkt mittels „Coomassie-Mikrowellen-Färbung“ angefärbt werden.

Für die Coomassie-Mikrowellen-Färbung wurden die Gele in die Färbelösung gelegt, in der Mikrowelle aufgeköcht und 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, mit Wasser nachgespült und die Entfärbelösung auf das Gel gegeben. Das Gel in der Entfärbelösung wurde wieder aufgeköcht und 5 min geschüttelt. Dieser Entfärbungsschritt wurde so lange mit frischem Entfärber wiederholt, bis sich die Proteinbanden klar von dem Hintergrund absetzten.

Coomassie-Färbelösung

500 mL/L	Ethanol (95%)
70 mL/L	Essigsäure
428 mL/L	Wasser
2,52 g/L	Coomassie R250

Entfärbelösung

50 mL/L	Glycerin
75 mL/L	Essigsäure
875 mL/L	Wasser

Um das zu untersuchende Protein in einer komplexen Proteinlösung zu identifizieren, wird die Immunodetektion verwendet. Dazu ist es zunächst notwendig, die Proteine von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran mittels Western Blot zu übertragen.

Der Übertrag der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte per Semi-dry-Blotting bei 10 V und 70 mA pro Minigel für 1-2 h. Zuvor wurden alle Komponenten mit Towbin-Transfer-Puffer angefeuchtet.

Towbin-Transfer-Puffer (Towbin *et al.*, 1979)

25 mM	Tris base
192 mM	Glycin
20 %	Methanol
0,1 %	SDS

In der Regel erfolgt die Immunodetektion mit Hilfe eines 2-Antikörper-Systems. Eine vorherige Absättigung der Membran mit einer Proteinlösung (in der Regel eine BSA- oder Milchpulverlösung) ist hierbei wichtig, da diese ansonsten unspezifisch die Antikörper binden würde. Während der Inkubation mit dem ersten Antikörper bindet dieser mittels seiner spezifischen Binderegion an sein Antigen in der Aminosäuresequenz des zu analysierenden Proteins. Diese Antikörper werden u.a. aus dem Blutserum von Tieren (meist Mäuse, Kaninchen oder Ziegen) gewonnen. Der zweite Antikörper besteht generell aus zwei Bereichen: Der eine bindet spezifisch an die schwere Kette des ersten Antikörpers, der andere ist mit einem Nachweiszym, wie der Alkalischen Phosphatase (AP) oder der Meerrettich- („Horseradish“) Peroxidase (HRP) gekoppelt. Durch dieses 2-Antikörper-System kommt es zu einer Verstärkung des Signales. Die nachfolgende Nachweisreaktion erfolgt nun, abhängig von dem gekoppelten Enzym, mittels zweier Wege. Bei einer Kopplung des zweiten Antikörpers mit der alkalischen Phosphatase vollzieht sich der Nachweis mittels einer Farbreaktion auf der Membran an den Stellen, an denen die Antikörper gebunden haben. 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) sowie Nitroblau-Tetrazolium (NBT) werden dabei zu blauem Indigo und purpurfarbigem Diformazan enzymatisch umgesetzt. Bei dem zweiten System ist der zweite Antikörper an die HRP gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Luminol in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid, wobei Chemilumineszenzstrahlung emittiert. Durch die Präsenz weiterer Chemikalien wird dieses Signal noch

weiter verstärkt (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Die Aufnahme des Signals erfolgte per Röntgenfilm.

In anderen Systemen ist der erste Antikörper direkt mit einem Nachweiszym gekoppelt, was die Inkubationszeiten halbiert. In dieser Arbeit wurde zusätzlich mit einem Antikörper-unabhängigem System gearbeitet. Hierbei bildet die HRP mit einem Nickel-NTA-Komplex ein Konjugat, welches spezifisch an eine Polyhistidinsequenz (His-Tag) bindet (His Detector Nickel HRP, KPL) (Zhang *et al.*, 2007; Ioannou *et al.*, 2007).

Die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran erfolgte durch eine Inkubation für 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4 °C) in 2 % Milchpulver bzw. 1% BSA in TBST-Puffer (Blockierungspuffer).

TBST-Puffer

20 mM	Tris-HCl, pH 8
0,05 % (v/v)	Tween 20
150 mM	NaCl

Die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper erfolgte unter Schütteln für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C. Der Antikörper wurde zuvor 1:1000 mit Blockierungspuffer verdünnt. Nach Abgießen der Antikörperlösung wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer entfernt. Es erfolgte eine erneute Inkubation in Blockierungspuffer zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen. Der zweite Antikörper wurde 1:2000 bis 1:10000 (je nach Angaben des Herstellers) in TBST-Puffer verdünnt und unter Schütteln für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Wie zuvor wurde nun der nicht gebundene Antikörper mit TBST-Puffer entfernt. Anschließend folgte der enzymatische Nachweis, entweder über die Farbreaktion (AP-System) oder Chemilumineszenz (HRP-System) (s.o.).

2.8.3 Proteinextraktion aus Blattmaterial mit Phenol

Die Extraktion der Proteine aus pflanzlichen Geweben erfolgte mit Phenol nach dem Protokoll von Cahoon *et al.* (1992). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie schnell ist und der Proteinextrakt weitestgehend frei von Kontaminationen (wie z.B. DNA und Salze) ist. Zu beachten ist hier aber, dass die Proteine bzw. Proteinkomplexe während der Extraktion denaturiert werden. Zunächst wurden etwa 100 mg gefrorenes Blattmaterial mit flüssigem Stickstoff im Precyllys-Homogenisator (mit Keramik-Kugeln) oder im Porzellanmörser fein zerrieben. Das entstandene Blattpulver wurde in 500 µL eiskaltem Extraktionspuffer extrahiert. Auf den Extrakt wurden nun 500 µL Phenol gegeben und beides vermischt. Nun wurde der Extrakt für 10 min bei 3000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Von der oberen Phase wurden 400 µL abgenommen und anschließend die verbleibende untere Phase nochmals mit 300 µL

Phenol extrahiert, erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. 200 µL des phenolischen Extraktes wurden jeweils mit 1 mL einer methanolischen 0,1 M Ammoniumacetatlösung vermischt, um die Proteine über Nacht bei -20 °C zu präzipitieren. Das Präzipitat wurde bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert und mit eiskaltem 80%igen Aceton gewaschen. Nach der Evaporation des Lösungsmittels wurden die Pellets in 100 µL einer 1 %igen SDS-Lösung gelöst.

Extraktionspuffer

0,7 M	Saccharose
0,5 M	Tris-HCl
50 mM	Na ₂ -EDTA
0,1 M	KCl
pH 9,4	

Kurz vor Gebrauch wurden 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol sowie 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugefügt.

2.8.4 Denaturierende Zellysis und renaturierende Reinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie

Da bei der nativen Reinigung des in *E.coli* heterolog expremierten DGD1-Proteins sowie von NDGD1 und CDGD1 die Proteinausbeute nur unzureichend war, erfolgte die Proteinaufreinigung nach einem Online-Protokoll (http://openwetware.org/wiki/Sauer:Purification_of_His-tagged_proteins/Deanturing_prep) unter anfangs denaturierenden Bedingungen. Dazu wurde das *E.coli*-Zellpellet einer 500 mL-Kultur zunächst denaturierend lysiert, indem es in 5 mL des Lysispuffers, der 6 M Guanidin-Hydrochlorid enthält, aufgenommen und anschließend für mindestens 30 min bei -80 °C eingefroren wurde. Das wieder aufgetaute Lysat wurde mit weiteren 15 mL des Lysepuffers verdünnt und für mindestens 30 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 14000 rpm für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde für 1 h bei RT mit 0,5 mL Ni-NTA Agarose unter leichtem Schütteln zur Bindung der Proteine an das Säulenmaterial inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA Agarose bei 1000 rpm für 1 min sedimentiert und der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen bis auf ein Aliquot für die spätere Überprüfung per SDS-PAGE verworfen. Die Ni-NTA Agarose mit den gebundenen Proteinen wurde in 3 mL Lysispuffer aufgenommen und in eine 10 mL-Kunststoffsäule überführt. Nach der Sedimentation der Ni-NTA Agarose in der Säule wurde der Puffer wieder abgelassen und darauffolgend mit 7 mL des W1-Puffers das Säulenmaterial gewaschen, um unspezifische Proteinbindungen zu lösen. Durch das nachfolgende Waschen der Säule mit 25 mL des eiskalten W2-Puffers erfolgte eine Renaturierung der an das Säulenmaterial gebundenen Proteine. Abschließend wurden die Proteine in 0,5 mL-Schritten mit eiskaltem Elutionspuffer eluiert. Vorbereitend zu der Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie

wurden die Elutionen in Dialysepuffer dialysiert. Für die weiteren Lipidbindungsexperimente war keine Dialyse notwendig.

Die Überprüfung der Reinigung erfolgte mittels SDS-Page und/oder Western Blot.

Lysispuffer

100 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	Tris-Base
6 M	Guanidinhydrochlorid
10 mM	Imidazol
pH 8	

W1-Puffer

100 mM	NaH ₂ PO ₄
150 mM	NaCl
8 M	Harnstoff
20 mM	Imidazol
pH 8	

W2-Puffer

50 mM	NaH ₂ PO ₄
500 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
pH 8	

Elutionspuffer

50 mM	NaH ₂ PO ₄
500 mM	NaCl
250 mM	Imidazol
pH 8	

Dialyse-Puffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7
100 mM	NaCl
10 %	Glyzerin

2.9 DGDG Synthase Enzymtests

Zur Überprüfung der Substratspezifität der zwei DGDG-Synthasen der Pflanzen (DGD1, DGD2) wurde der DGDG Synthase Enzymtest nach dem Vorbild von Amélie Kelly (Kelly and Dörmann, 2002) mit in *E. coli* heterolog exprimierten Proteinen durchgeführt. Zunächst wurde 50 μL eines Proteinextraktes einer *E. coli*-Expressionskultur (mit definierter Proteinkonzentration) zu 100 μL des 2x Enzymtestpuffers hinzugefügt. 5 μL einer 5 mM ethanolischen MGDG-Lösung (\cong 25 nmol) wurden mit einer Hamilton-Spritze direkt in den Ansatz gegeben. Durch die Zugabe von 50 μL einer 2 mM UDP-Galaktoselösung (\cong 0,1 μmol) wurde der Assay gestartet und 30 bis 60 min bei 28 °C inkubiert.

2 x Enzymtestpuffer:

15 mM Tricin-KOH, pH 8.0

30 mM MgCl_2

3mM DTT

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 mL Chloroform:Methanol 2:1 und 500 μL einer 10%igen Ammoniumacetat-Lösung abgestoppt. Anschließend wurden 50 μL des internen Galaktolipid-Standards (Tabelle 2) hinzugefügt. Die Lipide wurden extrahiert (Kapitel 2.7.1) und der Extrakt bis zur Trockene eingengt. Der Lipidextrakt wurde anschließend in Q-TOF-Laufmittel aufgenommen und mittels Q-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

2.10 Lipidbindungsstudien

2.10.1 Lipidüberlagerungstest (Lipid-Overlay-Assay) (Wang *et al.*, 2012)

Um die generelle Bindungskapazität von Proteinen an Membranlipide zu untersuchen, wird der Lipidüberlagerungstest durchgeführt. Dafür wurden zunächst 200 nmol des entsprechenden Lipids in 20 μL „Spot-Puffer“ gelöst. Direkt darauf folgend wurde nun 1 μL (\cong 10 nmol) des Lipids auf je eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Ebenso wurde dann mit den anderen Lipiden vorgegangen.

Spot-Puffer

250 μL Chloroform

500 μL Methanol

200 μL 50 mM HCl

2 μL 1 %ige Ponceau S – Lösung

Nach dem Eintrocknen der Lipidtropfen auf der Nitrocellulose wurden die so hergestellten „Lipidstrips“ für zwei Stunden auf einem Schüttler in einer Blockierungslösung mit 3 % BSA (w/v)

(s. Seite 39) inkubiert, anschließend das gereinigte Protein (Endkonzentration 1 µg/ mL) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer wurde das gebundene Protein über Immunodetektion (Kapitel 2.8.2) nachgewiesen.

2.10.2 Liposomenbindungstest

Die Durchführung des Liposomenbindungstests erfolgte mit geringen Modifikationen nach dem Protokoll von Awai *et al.* (2006b). Dazu wurde pro Assay 250 µg der Lipide (Gesamtmenge) in ein Glasröhrchen überführt und das Lösungsmittel evaporiert. Durch die Zugabe eines entsprechenden Volumens an TBS auf den Lipidfilm wurde eine Konzentration von 0,5 µg Lipid/ µL TBS eingestellt. Die Lipide wurden für 1 h bei 37 °C in einem Wasserbad zur Hydratisierung und Emulgierung inkubiert und anschließend für 5 min stark gevortext. Mittels dieser Methode entstehen große multilamellare Liposomen. Diese wurden bei 4 °C für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Liposomenpellet wurde in eiskaltem TBS-Puffer (Endkonzentration 0,5 µg Lipid/ µL TBS) aufgenommen, die multilamellaren Liposomen per Zentrifugation wieder pelletiert und in eiskaltem TBS aufgenommen (Konzentration s.o.). Dieser Waschschrift dient der möglichst vollständigen Entfernung von bei 14000 rpm nicht-pelletierbaren Lipidstrukturen. 400 µL (= 200 µg) der Liposomensuspension wurden in neue Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und abzentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden Lösungen der gereinigten Proteine auf eine Konzentration von 1 µg Protein pro 10 µL eiskaltem TBS-Puffer eingestellt. Das Liposomenpellet wurde in 50 µL der Proteinlösung (\cong 5 µg Protein) aufgenommen und die gesamte Lösung für 30 min bei 28 °C inkubiert. Hiernach wurden die Liposomen abzentrifugiert und zweimal mit 400 µL eiskaltem TBS-Puffer gewaschen. Abschließend wurde das Liposomenpellet in 1x Laemmli-puffer aufgenommen und per SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung des Gels die gegebenenfalls gebundenen Proteine detektiert.

TBS-Puffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7
100 mM	NaCl

2.10.3 Liposomen-Aggregations-Test (Liposome Aggregation Assay)

Mit Hilfe des Liposomen-Aggregations-Test wird ermittelt, ob ein Protein die Fähigkeit besitzt Membranen miteinander zu fusionieren oder miteinander in Kontakt zu bringen. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass große Liposomen bzw. Liposomenaggregate stärker das Licht streuen als kleinere unilamellare Liposomen. Die durch ein Protein induzierte Bildung von Liposomenfusionen bzw. -aggregaten führt somit zu der Verstärkung der Trübung der Liposomensuspension. Dieser Vorgang kann photometrisch bei 350 nm aufgezeichnet werden.

Die Durchführung des Liposomen-Aggregations-Test erfolgte nach dem Protokoll von Roston *et al.* (2011). Zu Beginn wurde ähnlich wie bei dem Liposomenbindungstest vorgegangen, die Konzentration der Lipide wurde jedoch vor der Inkubation bei 37 °C auf 650 nmol/mL TBS eingestellt. Nach dieser Inkubation wurde die Suspension kurz gevortext und darauf folgend große („large“) unilamellare Vesikel (LUV) mittels Extrusion durch einen 0,1 µm Filter hergestellt. 1 mL dieser LUVs wurden in eine Quartzküvette überführt und der Absorptionsnullwert bei 350 nm bestimmt. Nach der Zugabe des Proteins (molares Verhältnis Protein:Lipid = 1:1000 bzw. 1:500) wurde die Absorptionsänderung für 5 min bei 350 nm aufgezeichnet.

2.10.4 Differentialinterferenzkontrast-Lichtmikroskopie

Mikroskopische Aufnahmen der Liposomen erfolgten mit Hilfe der Differentialinterferenzkontrast (DIK)-Lichtmikroskopie. Über DIK werden Unterschiede in der optischen Weglänge im betrachteten Objekt in Helligkeitsunterschiede des Bildes umwandelt. Dadurch werden an sich durchsichtige Objekte wie z.B. Liposomen in der Lichtmikroskopie sichtbar gemacht.

Vorbereitend vor den mikroskopischen Aufnahmen wurden zunächst die Liposomen wie für den Liposomen-Aggregations-Test hergestellt (Kapitel 2.10.3). Das zu testende Protein wurde zu 200 nmol der Liposomen in einem molaren Verhältnis von 1:500 (Protein:Lipid) hinzugefügt und für eine Minute auf Eis inkubiert. Die Liposomenaggregation bzw. -fusion wurde mit Hilfe eines DIK-Lichtmikroskopes (Leica DMI4000 B) mit einem 20 x, 0.50 NA Objektiv (Leica HCX PL FLUOTAR) aufgezeichnet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der LAS V4.3 software (Leica) bearbeitet.

2.10.5 Liposomen-Durchlässigkeitstest („liposome leakage“)

Der Liposomen-Durchlässigkeitstest erfolgt zur Überprüfung in wie weit das getestete Protein in eine Membran inseriert. Die hier verwendeten Liposomen enthalten ein Gemisch aus dem Fluoreszenzfarbstoff 8-Aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS) und dem Quencher p-Xylen-bispyridiniumbromid (DPX). Durch das Zusammenstoßen des ANTS mit dem DPX in diesen Liposomen wird die Energie des angeregten Fluorophors auf das DPX übertragen und als Wärmestrahlung abgegeben, die Fluoreszenzemission wird gelöscht („gequencht“). Inseriert ein Protein in die Membran der Liposomen, werden diese an dieser Stelle möglicherweise durchlässig und das ANTS sowie DPX kann austreten. Durch diese Verdünnung kann das ANTS durch DPX nicht mehr so effizient gequencht werden und die Fluoreszenzemission steigt.

Die Durchführung des Tests zur Protein-induzierten Durchlässigkeit der Liposomen erfolgte nach dem Protokoll von Roston *et al.* (2011) mit einzelnen Modifikationen. Die Lipidkonzentration sowie -zusammensetzung entsprach dem Liposomen-Aggregations-Test (Kapitel 2.10.3). Nach der Evaporation des Lösungsmittels wurden die Lipide in TBS-Puffer, der 12,5 mM ANTS sowie 90 mM DPX enthielt, aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Emulsion

kurz gevortext und zur Steigerung der Aufnahme des ANTS und DPX in die Liposomen 5 mal bei -80 °C eingefroren und in lauwarmen Wasser wieder aufgetaut. LUVs wurden analog zu dem Liposomen-Aggregations-Test durch Extrusion durch einen 0,1 µm Filter hergestellt. Nicht-aufgenommenes ANTS und DPX wurden über die Größenausschluss-Chromatographie (Sephadex G-25, GE Healthcare) von den Liposomen abgetrennt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels des Spektralfluorimeters FluoroMax-4 bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und der Aufzeichnung der Emission bei 520 nm für 600 s. Nach der Bestimmung der Grundfluoreszenz der Liposomensuspension für 20 s wurde das Protein in dem molaren Verhältnis Protein:Lipid \approx 1:1000 hinzugefügt und die Änderung der Fluoreszenzemission aufgezeichnet. Die Maximalfluoreszenz wurde nach der Zugabe von 1 % SDS bestimmt. Die Aufzeichnung und Analyse der Messung erfolgte über die Software FluorEssence (HORIBA Jobin Yvon, Edison (USA)). Die relative Fluoreszenzzunahme wurde nach folgender Formel berechnet (nach Xia *et al.* (2003)):

$$\text{rel. Fluoreszenzzunahme [\%]} = \frac{(I_t - I_0)}{(I_f - I_0)} \times 100 \%$$

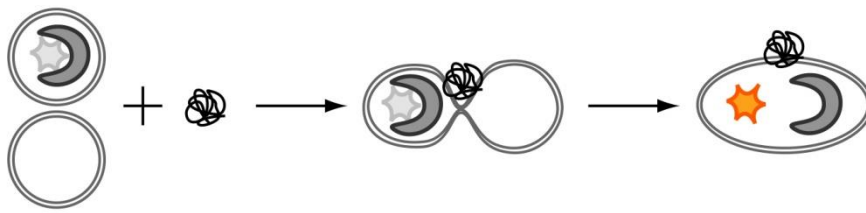
I_t ist hierbei der gemessene Fluoreszenzwert zu dem Zeitpunkt x , I_0 die Grundfluoreszenz vor der Zugabe des Proteins und I_f die Maximalfluoreszenz gemessen nach der Zugabe des SDS.

2.10.6 Nachweis von proteininduzierter Membranfusion mit Hilfe von Liposomen mit verschiedenen Inhalten („content mixing“)

Die Fähigkeit eines Proteins zwei Membranen miteinander zu fusionieren, kann mit Hilfe des sogenannten „content mixing“-Tests erfolgen. Hierfür wurden zwei Varianten dieses Experimentes etabliert. Für die erste Variante wurden wie auch bei dem Liposomen-Durchlässigkeits-Test (Kapitel 2.10.5) Liposomen mit dem Fluorophor-Quencher-Paar ANTS und DPX hergestellt. Diese werden mit „leeren“ Liposomen vermischt, die weder ANTS noch DPX beinhalten (Abbildung 7 Variante 1). Da das ANTS zu diesem Zeitpunkt nahezu vollständig gequencht vorliegt, ist die Fluoreszenzemission niedrig. Zu dieser Mischung wird das zu testende Protein hinzugefügt. Wenn dieses Protein die Fähigkeit besitzt Membranen miteinander zu fusionieren, führt das zu der Fusion der beiden Liposomentypen in dieser Mischung. Dadurch wird die Konzentration des ANTS und DPX innerhalb dieser fusionierten Liposomen gesenkt. Das ANTS trifft seltener auf das DPX, wodurch die Fluoreszenzemission steigt. Im Gegensatz zu der ersten Variante wird in der zweiten das ANTS und DPX getrennt voneinander in den Liposomen eingeschlossen (Abbildung 7 Variante 2). Diese Liposomen werden anschließend miteinander vermischt. Da das ANTS frei in den Liposomen vorliegt, ist die Fluoreszenzemission zu diesem Zeitpunkt hoch. Erfolgt nach der Zugabe des Proteins die Fusion der Liposomen in dieser Mischung, wird die Fluoreszenzemission des ANTS durch das DPX gequencht. Proteine, die Liposomen durchlässig werden lassen (Kapitel 2.10.5), können nicht für diese Experimente eingesetzt werden.

Die Herstellung der Liposomen erfolgte nach dem Protokoll des Liposomen-Durchlässigkeits-Test mit folgenden Abweichungen. Für die erste Variante wurden neben den Liposomen, die das Fluorophor-Quencher-Paar beinhalteten, auch Liposomen hergestellt die weder ANTS noch DPX enthielten. Die zuletzt genannten Liposomen wurden nicht aufgereinigt. Für die zweite Variante wurden LUVs generiert und aufgereinigt, die entweder 12,5 mM ANTS oder 90 mM DPX enthielten. Die Liposomen wurden in beiden Varianten miteinander vermischt (1:1) und die Mischungen für die Messungen eingesetzt. Die Messung der Fluoreszenzänderung erfolgte wie in Kapitel 2.10.5 angegeben. Die Auswertung der ersten Variante erfolgte wie bei dem Liposomen-Durchlässigkeits-Test. Für die Auswertung der zweiten Variante wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte auf die Anfangsfluoreszenz (vor Zugabe des Proteins) bezogen.

Variante 1:



Variante 2:

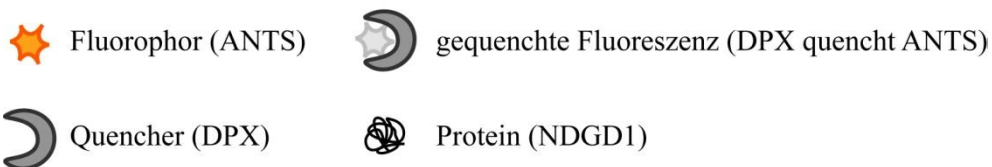
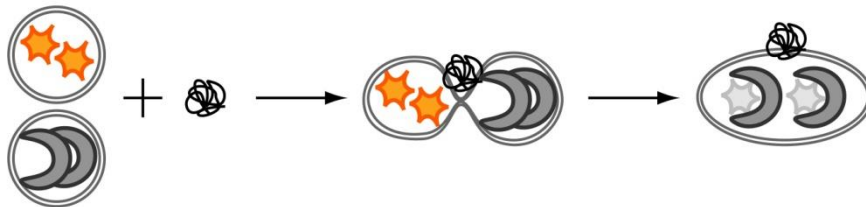


Abbildung 7: Prinzipieller Verlauf der beiden Varianten des „content mixing“-Tests. Variante 1: Nach der Herstellung von Liposomen, die sowohl das Fluorophor (ANTS) als auch den Quencher (DPX) enthalten, und „leerer“ Liposomen ohne Fluorophor und Quencher werden diese beiden Liposomentypen miteinander vermischt. Das Fluorophor wird zu diesem Zeitpunkt gequench, die Fluoreszenz ist niedrig. Zu dieser Mischung wird das zu testende Protein (z.B. NDGD1) in dem molaren Verhältnis Protein zu Lipid 1:1000 hinzugegeben. Falls das Protein die Fähigkeit besitzt, Membranen vollständig miteinander zu fusionieren, erfolgt die Mischung der Inhalte dieser Liposomen. Dadurch wird die Konzentration des Fluorophors und des Quenchers innerhalb der Liposomen verdünnt. Der Quencher kann nicht mehr so effizient das Fluorophor quenchen und die Fluoreszenzemission steigt. **Variante 2:** Nach der Herstellung von Liposomen, die alleinig ANTS oder DPX enthalten, werden diese beiden Liposomentypen miteinander vermischt. Da das Fluorophor zu diesem Zeitpunkt nicht gequench wird, ist die Fluoreszenz hoch. Zu dieser Mischung wird das zu testende Protein (z.B. NDGD1) in dem molaren Verhältnis Protein zu Lipid 1:1000 hinzugegeben. Falls das Protein die Fähigkeit besitzt, Membranen vollständig miteinander zu fusionieren, erfolgt die Mischung der Inhalte dieser Liposomen und das daraus resultierende Quenching des Fluorophors. Die Fluoreszenzemission sinkt.

2.11 Computergestützte Analytik mittels I-Tasser (Iterative Threading ASSEMBLY Refinement) und Protein-Blast

Für die Untersuchung der möglichen Struktur und Funktion sowie des evolutionären Ursprunges insbesondere der N-terminalen Sequenz von DGD1 wurden diverse Internetdatenbanken, wie I-Tasser online und NCBI-Blast, verwendet.

I-Tasser online ist ein kostenloser Server des Labors der Arbeitsgruppe von Prof. Zhang (University of Michigan) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2012).

Dieser Server verfügt über eine Software, die anhand der Aminosäuresequenzen mögliche Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der Proteine berechnet und diese mit in den Datenbanken gespeicherten Proteinen mit bekannter Struktur und Funktion vergleicht. Nach der Fertigstellung erhält man so durch diesen Server mehrere Vorschläge der Proteinstruktur und der dazu gehörigen Funktion des Proteins mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeitswerten.

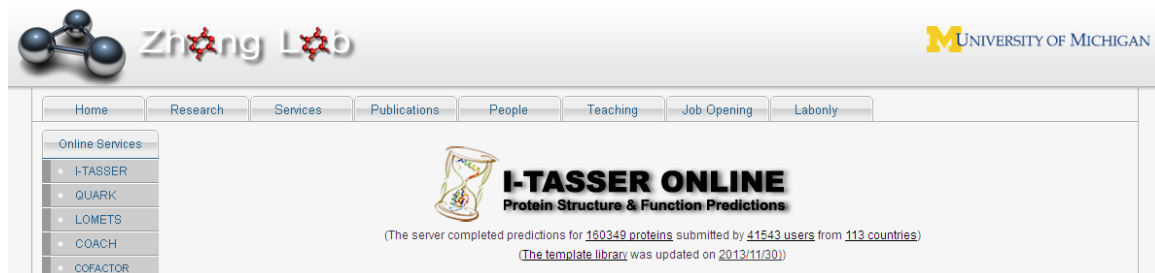


Abbildung 8: Internetseite des Servers I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)

Über die Protein-BLAST-Algorithmen der Internetdatenbanken NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Cyanophora (<http://cyanophora.rutgers.edu/porphyridium>) (Deng *et al.*, 2007) sowie Kazusa (<http://genome.microbedb.jp/klebsormidium>) (Hori *et al.*, 2014) wurde innerhalb des Pflanzenreiches nach zu AtDGD1 oder AtDGD2 homologen Sequenzen gesucht, um Informationen zu dem Ursprung der DGDG-Synthasen mit Fokus auf NDGD1 zu erhalten. In Tabelle 4 sind die Organismen gezeigt, die in die phylogenetische Analyse mit einbezogen wurden. Für die Erstellung des Phylogrammes wurde die Software MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2011) verwendet. Die Sequenzen wurden über den ClustalW-Algorithmus miteinander abgeglichen. Ein ungewurzelter Stammbaum wurde über den Neighbor-joining Algorithmus erstellt, wobei die Bootstrap-Werte von 1000 Replikaten erhalten wurden.

Tabelle 4: In die phylogenetische Analyse einbezogene Aminosäuresequenzen von ausgesuchten Rot- und Grünalgen sowie Streptophyta. Gezeigt sind die entsprechenden Genbezeichnungen. Sequenzen mit einer N-terminalen Extension (DGD1-ähnlich) sind rot, Sequenzen ohne diese Extension (DGD2-ähnlich) blau markiert.

Abteilung, Familie	Art	Genbezeichnung
Rhodophyta	<i>Chondrus crispus</i>	CHC_T00008344001, XP_005719327
	<i>Porphyridium purpureum</i>	evm.model.contig_3569.7 evm.model.contig_496.8
Chlorophyta, Prasinophytæ	<i>Bathycoccus prasinus</i>	Bathy13g01940, XP_007509487 Bathy04g03150, XP_007513661
	<i>Micromonas sp.</i>	MICPUN_86997, XP_002509215 MICPUN_83849, XP_002503614
	<i>Ostreococcus tauri</i>	Ot11g01480, XP_003081950 Ot07g02970, XP_003080403
Chlorophyta, Trebouxiophyceae	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	F751_0628, KFM26760
	<i>Chlorella variabilis</i>	CHLNCRAFT_31413, XP_005846865
	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	COCSUDRAFT_49349, XP_005642814 COCSUDRAFT_27439, XP_005650356
Chlorophyta, Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre13.g583600
	<i>Volvox carteri f nagariensis</i>	VOLCADRAFT_116955, XP_002948730
Streptophyta, Charophyta	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	kfl00531_0060
Streptophyta, Bryophyta	<i>Physcomitrella patens</i>	Phypa_218058, XP_001771288 Phypa_216055, XP_001770278 Phypa_162919, XP_001761588 Phypa_137342, XP_001772591
Streptophyta, Lycopodiophyta	<i>Selaginella moellendorffii</i>	SELMODRAFT_130585, XP_002989787
Streptophyta, Spermatophyta	<i>Oryza sativa</i>	Os02g0539100 (DGD1) Os04g0416900 (DGD1) Os04g0416900 (DGD1) Os03g0214400 (DGD2) Os03g0268300 (DGD2)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g11670 (DGD1) At4g00550 (DGD2)

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Phosphatmangel auf die Lipidzusammensetzung der *dgd1-1*- und *dgd2-1*-Mutante sowie der *dgd1-1 dgd2-1*-Doppelmutante

In vorherigen Studien konnte bewiesen werden, dass ein Mangel an Phosphat u.a. zu einer Umstrukturierung der Lipidzusammensetzung in Pflanzen wie *A. thaliana* führt. Dies zeigt sich durch eine Reduktion des Gehalts der Phospholipide, während die Konzentration der Glykolipide (DGDG und SQDG) ansteigt. Für diese Messungen wurden die Lipide über DC und anschließender Quantifizierung der FAMES der Fettsäuren mittels Gaschromatographie analysiert (Essigmann *et al.*, 1998; Härtel *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2003). Amélie Kelly konnte zeigen, dass in Arabidopsis unter Phosphatmangel die Expression der DGDG-Synthase DGD2 stark ansteigt und somit DGD2 für einen großen Anteil des neu synthetisierten DGDGs verantwortlich ist (Kelly and Dörmann, 2002). Die zusätzliche DGDG-Synthese konnte sowohl in der *dgd1-1*- als auch in *dgd2-1*-Mutante beobachtet werden, was zeigt, dass die Syntheserate von DGD1 und DGD2 unter Phosphatmangel ansteigt (Kelly *et al.*, 2003). In der Doppelmutante *dgd1-1 dgd2-1* ist die DGDG-Synthese soweit inhibiert, dass sowohl unter Normal- als auch unter Phosphatmangelbedingungen die DGDG-Konzentration unter der Nachweisgrenze liegt (Kelly *et al.*, 2003).

Innerhalb dieser Arbeit wurden erstmals die Glyko- sowie Phospholipide der DGDG-Synthase-Mutanten mittels der Q-TOF Massenspektrometrie analysiert und quantifiziert. Ein Vorteil der Lipidquantifizierung mittels Q-TOF MS gegenüber der zuvor verwendeten Messmethode ist, dass die einzelnen Lipidklassen nicht mehr aufgereinigt werden müssen, sondern der Lipidrohextrakt direkt gemessen werden kann. Dadurch wird die Messgenauigkeit entscheidend erhöht. Deshalb können auch Lipide, die in den Pflanzen in geringer Konzentration vorliegen (z.B. PA), erfasst werden. Des Weiteren kann die Zusammensetzung einer Lipidklasse bezüglich ihrer einzelnen Spezies (wie z.B. 34:6 und 36:6) analysiert werden. Hierbei ist aber zu beachten, dass im positiven Modus des Q-TOF Massenspektrometers nicht zwischen zwei Spezies einer Lipidklasse mit der gleichen Masse unterschieden werden kann. Zum Beispiel haben 18:1/16:1- sowie 18:2/16:0-MGDG die selbe Masse und werden als 34:2-MGDG zusammengefasst.

Die Änderung der relativen Mengen der Membranlipide unter Phosphatmangel im Wildtyp sowie den DGDG-Synthase-Mutanten ist auch in dieser Arbeit eindeutig zu sehen (Abbildung 9). Gut erkennbar ist der zum Wildtyp vergleichbare Lipidphänotyp der *dgd2-1*-Mutante, während die Mutation der Haupt-DGDG-Synthase DGD1 zu einer drastischen DGDG-Reduktion, insbesondere unter optimaler Phosphatversorgung, führt. Die DGDG-Reduktion in *dgd1-1* sowie *dgd1-1 dgd2-1* führt zu einem prozentualen Anstieg der anderen Phospholipide, hierbei insbesondere von PC.

Im Laufe dieser Arbeit konnten zum ersten Mal die Konzentrationen der Phospholipide PA, PS sowie PI in *dgd1-1*, *dgd2-1*, *dgd1-1 dgd2-1* unter Phosphatmangel bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die relative Konzentration an PA in allen Linien auch unter Phosphatmangel konstant niedrig bleibt (< 0,5 mol%). Der relative Gehalt von PS verhielt sich ähnlich (< 1 mol%, absolute Werte s. Tabelle 5 im Anhang).

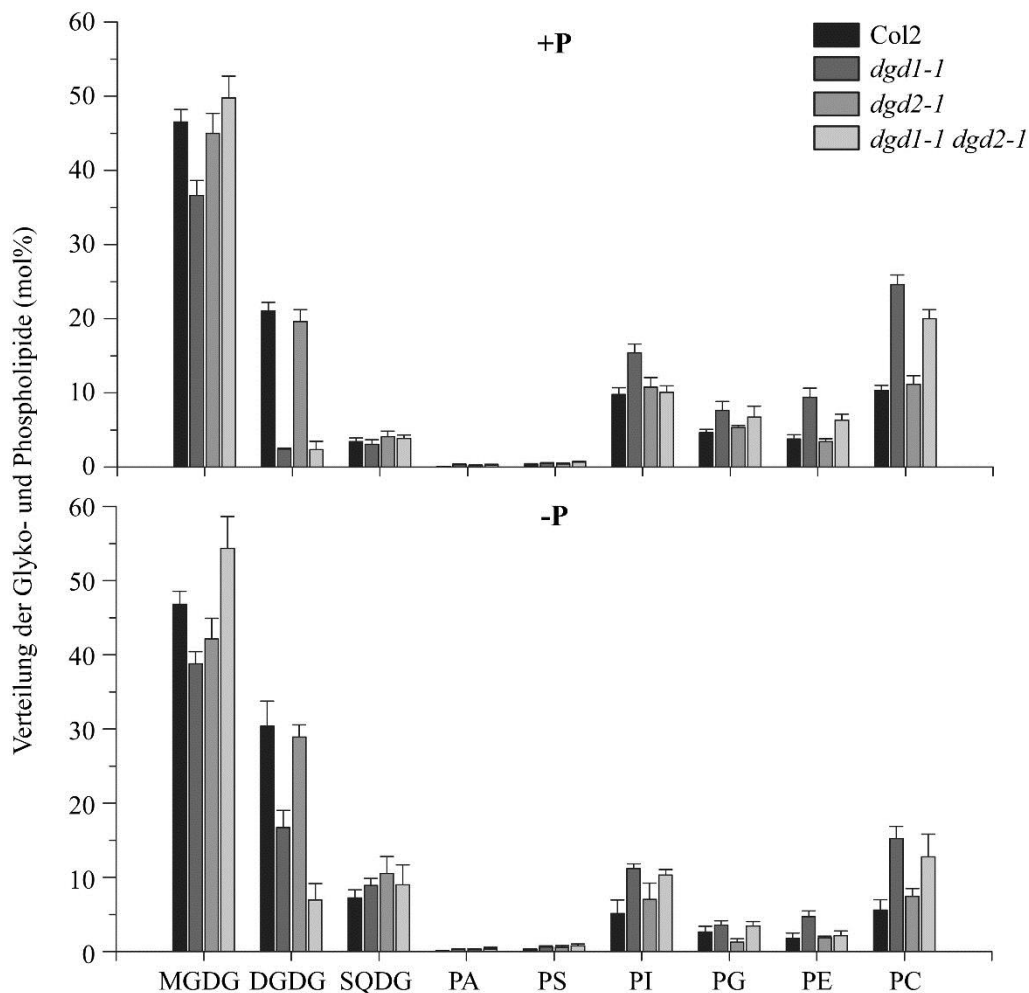


Abbildung 9: Glyko- und Phospholipidzusammensetzung in Blättern der DGDG-Synthase-Mutanten im Vergleich zum WT-Col2. +P = Vollmedium, -P = Phosphatmangelmedium. Anzahl der Replika: Col2 +/- P = 10; *dgd1-1* +/- P = 5; *dgd2-1* +/- P = 8; *dgd1-1 dgd2-1* + P = 6, -P = 3, gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Mittels der Quantifizierung anhand des Q-TOF-Massenspektrometers konnten die Ergebnisse von Amélie Kelly (2003) bezüglich der Verteilung der einzelnen Lipidspezies der Galaktolipide in den DGDG-Synthase-Mutanten bestätigt werden (Abbildung 10). Die Mutation des *DGD1*-Gens in *dgd1-1* führt zu einer Umverteilung der MGDG-Spezies; während der Anteil von 34:6 im Vergleich zum Wildtyp drastisch abnimmt, kommt es zu einer Akkumulation von 34:3 und 36:6. Dies ist auch in *dgd1-1 dgd2-1* zu beobachten. Im Gegensatz hierzu verteilen sich die MGDG-Spezies in der *dgd2-1*-Mutante vergleichbar zum Wildtyp, mit dem Unterschied, dass hier unter Phosphatmangel der Anteil von 34:3

MGDG stärker zunimmt. Vergleicht man die Verteilung dieser Spezies innerhalb von DGDG, ist zu beobachten, dass im Wildtyp sowie in der *dgd1-1*-Mutante unter Phosphatmangel der Anteil von 34:3 zunimmt, während der von 36:6 um 10-20 mol% abnimmt. Die relative Abnahme von 36:6-DGDG ist auch in der *dgd2-1*-Mutante zu sehen. Durch die Mutationen beider DGDG-Synthasen sind nur noch Spuren dieses Galaktolipids zu detektieren, wodurch eine Charakterisierung hier erschwert wird. Für das dritte Glykolipid SQDG konnten keine Unterschiede der Spezies zwischen den Linien und/oder Bedingungen beobachtet werden (Abbildung 10). Auch innerhalb der Phospholipide ist eine Umverteilung der jeweiligen Lipidspezies zu beobachten. Insbesondere fällt der Abfall des plastidären 18:3/16:1 Δ 3trans (34:4)-PGs unter Phosphatmangel auf. Phosphatmangel führt bei den anderen Phospholipiden wie PC oder PE zu der Reduktion der 34:x Lipidspezies. In den DGDG-Synthesemutanten tritt dieser Effekt bei den meisten Phospholipiden verstärkt auf. Aufgrund der geringen Konzentration von PA und PS konnten keine verlässlichen Aussagen zu einer Umverteilung deren Spezies getätigt werden.

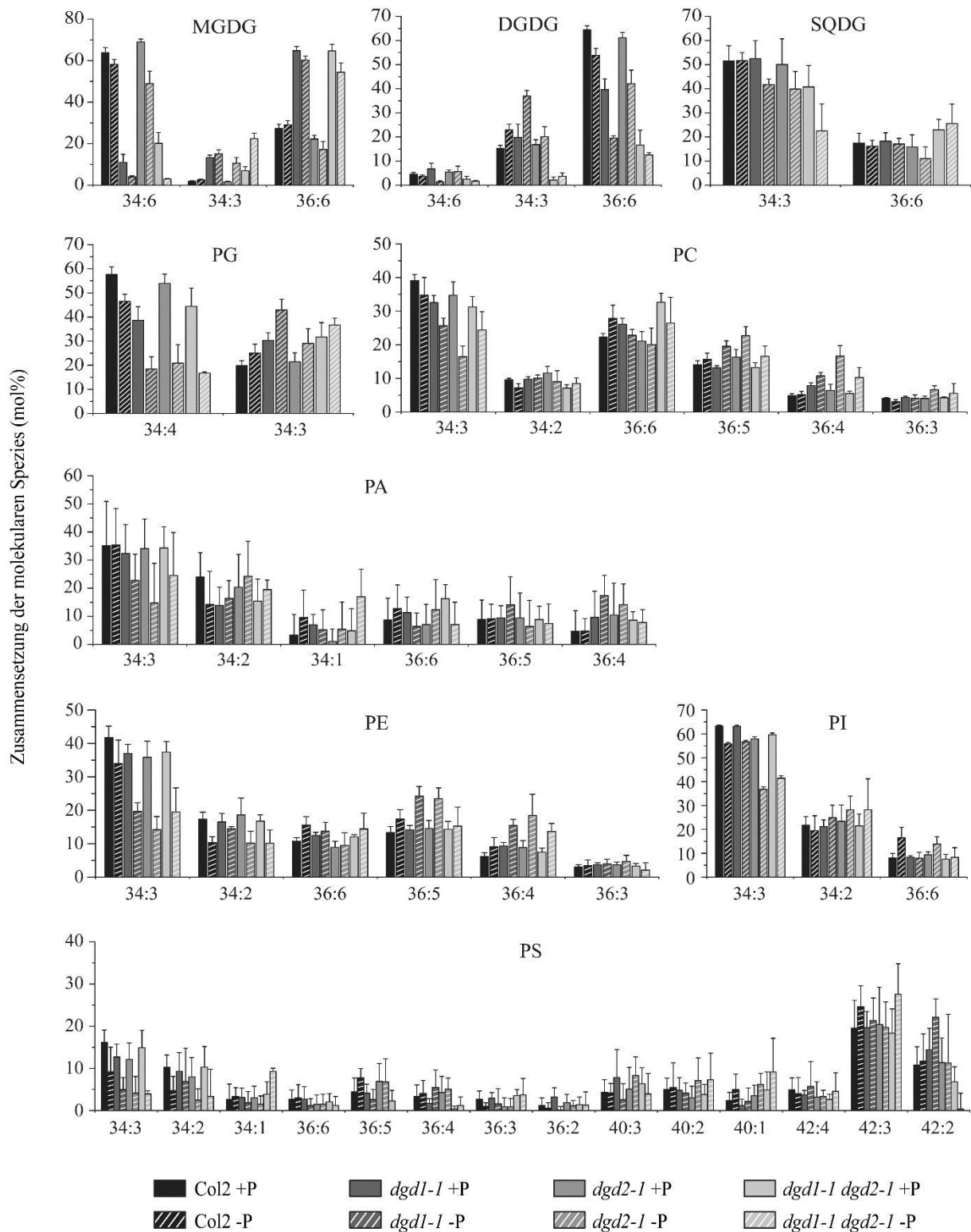


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der Hauptlipidspezies der Glyko- und Phospholipide von *dgd1-1*, *dgd2-1* und *dgd1-1 dgd2-1* +/- P; oberste Reihe: plastidäre Glykolipide, Reihe 2 und 3: Phospholipide des Chloroplasten und der extraplastidären Membranen, Reihe 4 und 5: extraplastidäre Phospholipide. +P = Vollmedium, -P = Phosphatmangelmedium. Anzahl der Replika: Col2 +/- P = 10; *dgd1-1* +/- P = 5; *dgd2-1* +/- P = 8; *dgd1-1 dgd2-1* + P = 6, -P = 3, gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Mit Hilfe des hoch-sensitiven Q-TOF Massenspektrometers konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal auch eine Charakterisierung des TAG-Pools in den Blättern von *dgd1-1*, *dgd2-1* und *dgd1-1 dgd2-1* erfolgen. Diverse Stressbedingungen wie auch Phosphatmangel können zu einer Akkumulation von TAG in den Blättern führen (Sakaki *et al.*, 1990b; Kaup *et al.*, 2002; Awai *et al.*, 2006b; Lippold *et al.*, 2012; Pant *et al.*, 2015). Auch in dieser Arbeit konnte unter Phosphatmangel insbesondere in den DGDG-Synthasemutanten eine Akkumulation von TAGs in den Blättern gezeigt werden (Abbildung 11). Der stärkste Anstieg konnte in *dgd1-1* beobachtet werden, diese Pflanzen akkumulierten bis zu der 10fachen Menge an TAGs, verglichen mit der entsprechenden TAG-Konzentration bei Wachstum im Vollmedium. Vergleicht man die DGDG-Synthasemutanten untereinander, ist, auch unter Phosphatmangel, kein signifikanter Unterschied bezüglich der TAG-Konzentration zu erkennen.

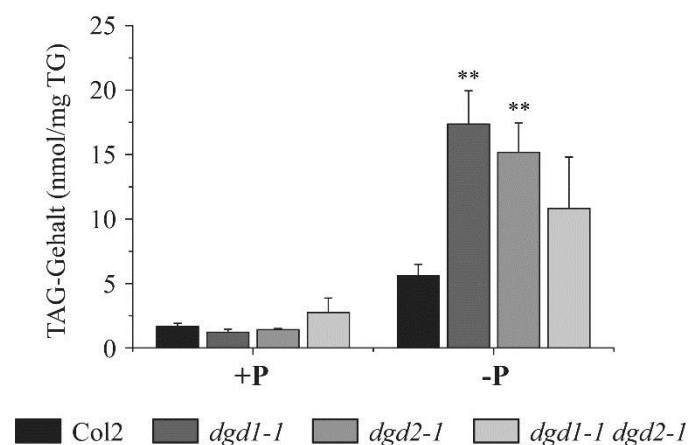


Abbildung 11: Akkumulation der TAGs in den Blättern der DGDG-Synthase-Mutanten unter Phosphatmangel; +P = Vollmedium, -P = Phosphatmangelmedium, TG = Trockengewicht. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 unabhängigen Replika, Ausnahme *dgd1-1 dgd2-1* -P: aufgrund der geringen Überlebensrate unter Phosphatmangel wurden hier nur drei Replika gemessen. Sternchen kennzeichnen Messwerte, die sich signifikant vom Wildtyp unterscheiden (Welch's t-Test, $P < 0,05$ (*), $P < 0,02$ (**)).

Betrachtet man die Verteilung der molekularen TAG-Spezies bei +P, fällt auf, dass in den DGDG-Synthase-Mutanten, insbesondere in *dgd1-1*, in erster Linie TAGs mit mindestens zwei 18C-Fettsäuren akkumulieren (Abbildung 12). Diese Akkumulation der 18C/18C-TAG-Spezies in *dgd1-1* korreliert mit einer Reduktion der TAGs mit drei 16C-Fettsäuren. Unter Phosphatmangel kommt es in der *dgd2-1*-Mutante zu einer verstärkten Akkumulation von TAGs mit drei 18C-Fettsäuren (um bis zum Dreifachen im Vergleich zum Wildtyp, 18:2/18:3/18:3). Die Konzentration der anderen TAGs wird unterdessen, zum Teil drastisch (16:0/16:0/18:3), reduziert. Im Gegensatz hierzu steigt in der *dgd1-1*-Mutante der Anteil der Spezies mit einer oder zwei 16C-Fettsäuren um bis zu 5 mol% (z.B. 16:0/16:0/18:3 oder 16:0/18:3/18:3). Die Zusammensetzung des TAGs der Doppelmutante ist unter diesen Bedingungen zumeist vergleichbar zum Wildtyp. Die Ausnahme sind die TAG-Spezies mit drei 16C-Fettsäuren, die, im Vergleich zu *dgd1-1*, *dgd2-1* oder dem WT, vermehrt in *dgd1-1 dgd2-1* vorkommen. Die hier angegebene Reihenfolge der Fettsäuren entspricht nicht der *sn*-Konfiguration.

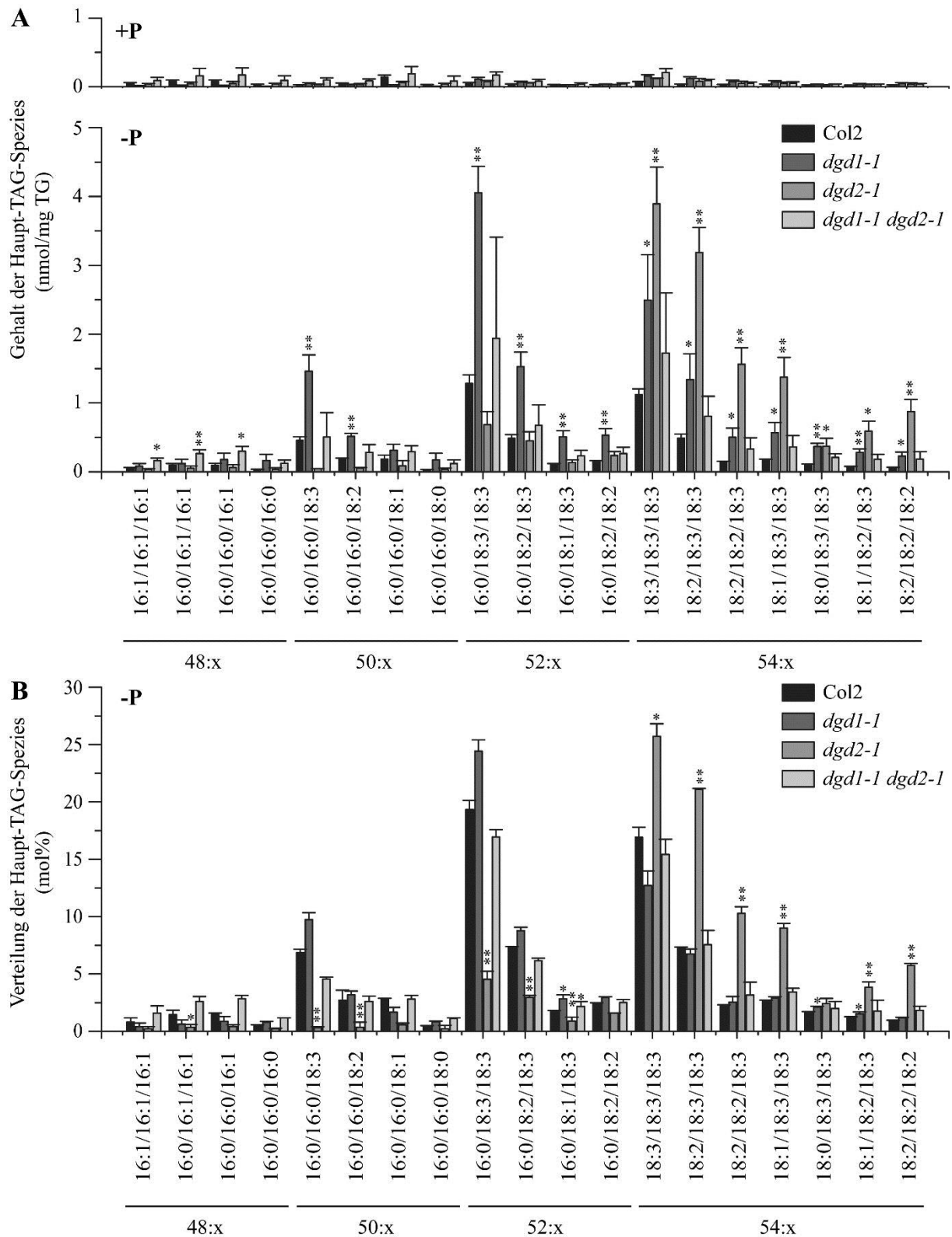


Abbildung 12: Verteilung der TAG-Spezies innerhalb von *dgd1-1*, *dgd2-1* und *dgd1-1 dgd2-1*; A Absoluter Gehalt der Haupt-TAG-Spezies, **B** Relative Verteilung der Haupt-TAG-Spezies. +P = Vollmedium, -P = Phosphatmangelmedium; Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 unabhängigen Replika, Ausnahme *dgd1-1 dgd2-1* -P: aufgrund der geringen Überlebensrate unter Phosphatmangel wurden hier drei Replika gemessen. Sternchen kennzeichnen Messwerte, die sich signifikant vom Wildtyp unterscheiden (Welch's t-Test, $P < 0,05$ (*), $P < 0,02$ (**)). *sn*-Konfiguration nicht angegeben.

Zusätzlich wurde die positionelle Verteilung der an der *sn2*-Position gebundenen Fettsäuren innerhalb der in WT, *dgd1-1* und *dgd2-1* unter Phosphatmangel akkumulierten 50:x (mit zwei 16C- und einer 18C-Fettsäure) und 52:x (mit zwei 18C und einer 16C-Fettsäure) TAG-Spezies analysiert. Um die Messung zu vereinfachen, wurden die TAGs zunächst hydriert. Nach diesem Schritt lagen somit die 50:x und 52:x TAGs vollständig abgesättigt als 50:0 oder 52:0 vor. Nach der Hydrierung wurden die TAGs mit Hilfe des Q-TOF MS fragmentiert. Anhand der Fragmentierungsmuster wurde nun, im Vergleich zu dem Fragmentierungsmuster von reinem 16:0/16:0/18:0- bzw. 16:0/18:0/16:0- und 18:0/18:0/16:0- bzw. 18:0/16:0/18:0-TAG, die Zusammensetzung der TAG-Isomere in den Blattextrakten berechnet. Bezüglich der 50:x TAGs stellte sich heraus, dass im Wildtyp sowie in der *dgd2-1*-Mutante die Spezies mit einer 16C-Fettsäure an *sn2* überwogen (Abbildung 13). In der *dgd1-1*-Mutante zeigte sich hier ein umgekehrtes Verhältnis, wobei die Spezies mit einer 18C-Fettsäure an *sn2* dominierten. In Hinsicht auf die 52:x TAGs herrschten in *dgd1-1*, *dgd2-1* sowie im Wildtyp die Spezies vor, bei denen eine 18C-Fettsäure an *sn2* gebunden war. Zwischen dem Wildtyp, *dgd1-1* und *dgd2-1* konnte jedoch kein signifikanter Unterschied innerhalb der Zusammensetzung des 52:x-TAGs detektiert werden.

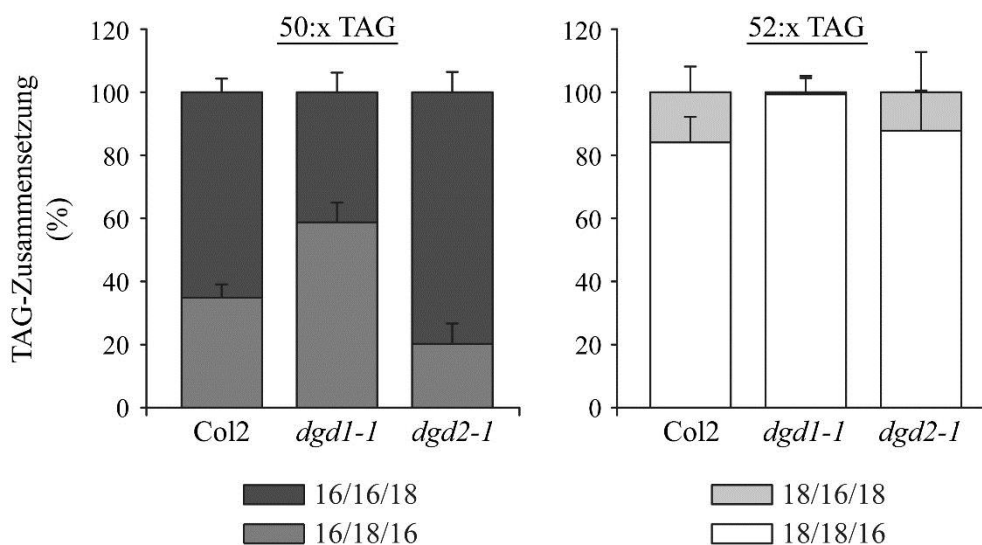


Abbildung 13: Positionelle Verteilung der an *sn2* gebundenen Fettsäuren in den unter Phosphatmangel akkumulierten TAGs; *dgd1-1* und *dgd2-1* im Vergleich zum Wildtyp. Links: Relative Verteilung innerhalb der 50:x TAG-Spezies. Rechts: Relative Verteilung innerhalb der 52:x TAG-Spezies. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen biologischen Replika.

3.2 Charakterisierung der Substratspezifität der DGDG-Synthasen aus „16:3“- und „18:3“-Pflanzen

Die Galaktolipide von *Arabidopsis thaliana* enthalten molekulare Spezies plastidären (prokaryotisch) und extraplastidären (ER; eukaryotisch) Ursprungs. Charakteristisch für die prokaryotischen Galaktolipide ist die an der *sn2*-Position des Glycerin-Grundgerüsts gebundene 16C-Fettsäure

(hauptsächlich 16:3 in MGDG und 16:0 in DGDG). Eukaryotische Lipide hingegen tragen an dieser Position eine 18:3-Fettsäure. Die unterschiedliche Verteilung der molekularen Spezies innerhalb beider Galaktolipide in 16:3-Pflanzen ist entweder auf eine selektive Galaktosylierung des eukaryotischen MGDGs durch DGD1 sowie DGD2 (d.h. aufgrund ihrer Substratspezifität), oder das Vorhandensein mehrerer MGDG-Reservoirs im Chloroplasten zurückzuführen. Als Test, ob die genannten Unterschiede zwischen MGDG und DGDG durch eine Substratspezifität von DGD1 oder DGD2 hervorgerufen werden, wurde der DGDG-Synthase-Enzymtest mit rekombinantem Protein etabliert. Da die Expression der kompletten DGD1-Sequenz (aus Arabidopsis, AtDGD1) für *E. coli* toxisch ist, wurde für diese Versuche nur die Glykosyltransferase-Sequenz (AtCDGD1) verwendet. Über die heterologe Co-Expression von MGD1 mit AtDGD1 und AtCDGD1 in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Sequenz keine Auswirkungen auf die Glykosyltransferaseaktivität der DGD1 hat (Kelly *et al.*, 2016). In Abbildung 14 ist zu sehen, dass die rekombinanten Proteine AtCDGD1 (in Fusion mit Nus, NusAtCDGD1) sowie AtDGD2 in *E. coli* in etwa gleichen Mengen produziert werden.

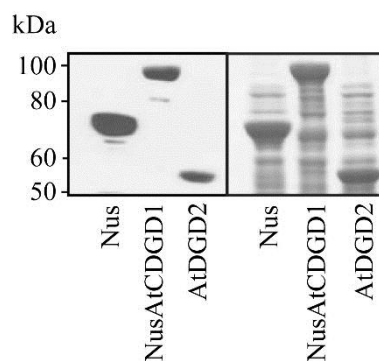


Abbildung 14: Expression von Nus (Kontrolle), NusAtCDGD1 und AtDGD2 in *E. coli*. Links: Immunoblot (HisDetector Nickel-HRP, 1:10000). Rechts: Coomassiefärbung des SDS Gels.

3.2.1 Die DGDG-Synthasen benötigen Magnesiumchlorid sowie einen neutralen pH-Wert für die optimale Aktivität

Die Optimierung der Enzymtestbedingungen erfolgte mit Hilfe von in *E. coli* heterolog exprimierten AtCDGD1- sowie AtDGD2-Protein.

Sowohl Calcium- als auch Magnesiumchlorid zeigen eine aktivierende Wirkung auf die beiden untersuchten Enzyme (Abbildung 15). Dieser Effekt trifft insbesondere bei AtDGD2 auf $MgCl_2$ zu. Durch die Zugabe von $MgCl_2$ wird die Aktivität von AtDGD2 um etwa das achtfache im Vergleich zu der Kontrolle ohne $MgCl_2$ gesteigert. In Kelly *et al.* (2002) konnte ebenfalls der Steigerung der Aktivität von AtDGD2 durch die Zugabe von $MgCl_2$ beobachtet werden. Als Folge dieser Resultate wurde für die nachfolgenden Enzymtests $MgCl_2$ zu dem Enzymtestpuffer hinzugefügt.

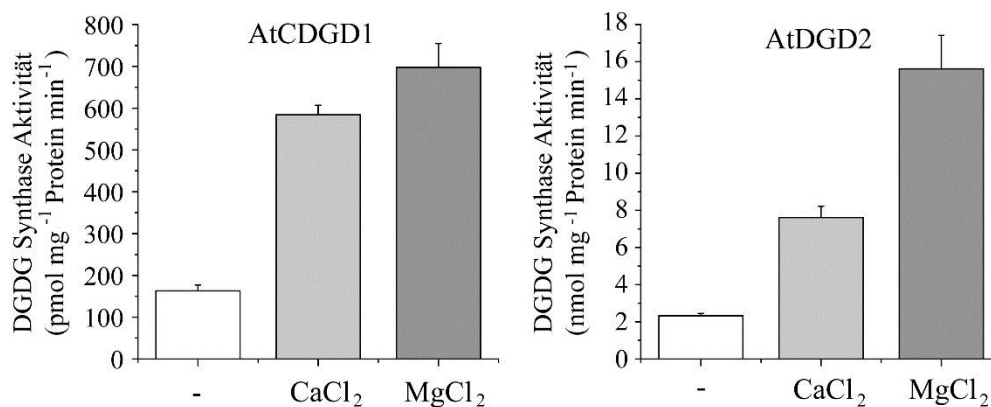


Abbildung 15: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von AtCDGD1 und AtDGD2 von zweiwertigen Erdalkalimetallen. Eingesetzte Konzentration an CaCl_2 oder MgCl_2 : jeweils 30 mM. Verwendete Menge an Protein aus dem *E.coli* Lysat pro Enzymtest: AtCDGD1 750 μg , AtDGD2 10 μg . Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Enzymtests.

Das pH-Optimum von AtCDGD1 ist recht eng (zwischen pH 7,5 und 8,0; Abbildung 16). Bereits eine leichte Veränderung des pH-Wertes führte zu einem starken Aktivitätsverlust. AtDGD2 hingegen ist innerhalb eines breiten pH-Bereiches (zwischen pH 7 und 9,5) hoch aktiv. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Experimente ein Tricine-KOH-Puffer mit einem pH-Wert von 8 verwendet.

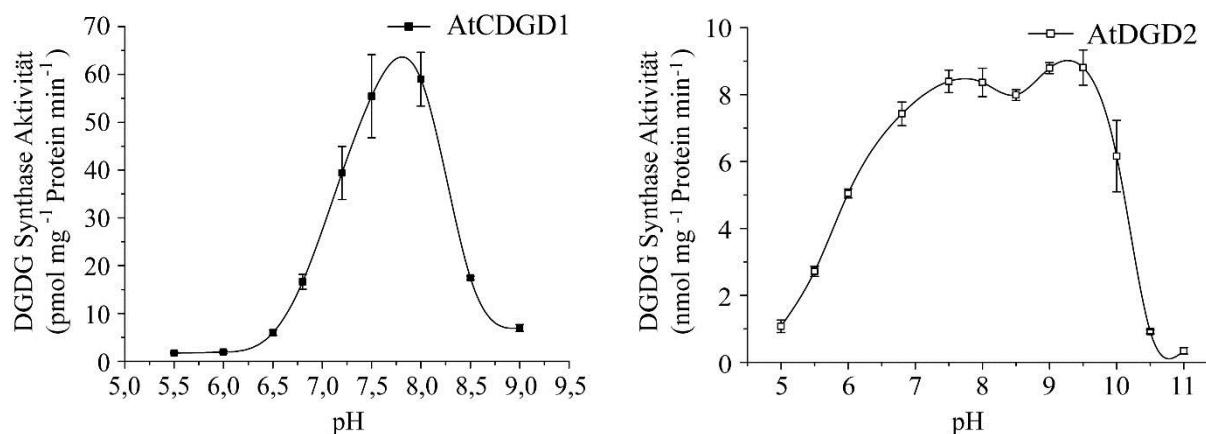


Abbildung 16: Analyse des pH-Optimums von AtCDGD1 und AtDGD2. Verwendete Menge an Protein aus dem *E. coli* Lysat pro Enzymtest: AtCDGD1 750 μg , AtDGD2 10 μg . Verwendete Puffer: 7,5 mM MES-KOH (pH 5,0, 5,5, 6,5, 6,8), 7,5 mM Tricine-KOH (pH 7,2, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0), 7,5 mM CAPS-KOH (9,5, 10,0, 10,5, 11,0). Zu beachten ist die unterschiedlichen Umsatzmengen (in pmol, nmol) der beiden DGDG-Synthasen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Enzymtests.

3.2.2 AtCDGD1 glykosyliert spezifisch 18:3/18:3- sowie 18:3/16:0-MGDG

Für die Untersuchung der Substratspezifität der DGDG-Synthasen von *Arabidopsis thaliana* wurde MGDG aus Spinat (*Spinacia oleracea*) gewählt. Spinat gehört wie *Arabidopsis* zu den 16:3 Pflanzen,

die sowohl prokaryotische (34:6) wie auch eukaryotische (36:6) Galaktolipide aufweisen (Abbildung 17) (Sakaki *et al.*, 1990b). Bei dem Vergleich der Zusammensetzung des durch die jeweiligen Glykosyltransferasen synthetisierten Produktes (DGDG) mit der des Substrates (MGDG) fällt auf, dass das DGDG, welches durch AtCDGD1 synthetisiert wurde, einen höheren Anteil (85 mol%) der eukaryotischen Form (36:6, 18:3/18:3) aufweist (Abbildung 17). AtDGD2 hingegen synthetisiert eukaryotisches DGDG zu einem weit niedrigeren Anteil (63 mol%). Daher zeigt AtCDGD1 eine hohe Spezifität für 36:6-MGDG, während AtDGD2 nur eine geringe Präferenz für 36:6-MGDG hat.

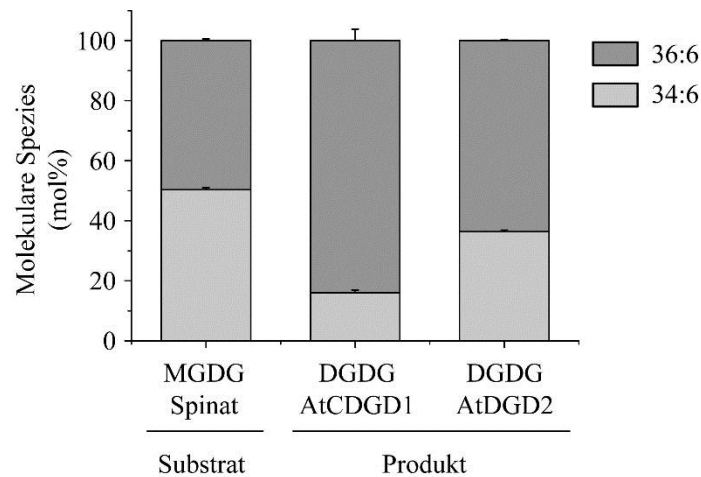


Abbildung 17: Relative Verteilung der beiden Hauptspezies (34:6 und 36:6) des durch AtCDGD1 und AtDGD2 synthetisierten DGDGs (Produkt) im Vergleich mit der Zusammensetzung des Substrates (MGDG aus Spinat). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Enzymtests.

DGDG der *dgd2-1* Mutante enthält etwa 17 mol% prokaryotische Spezies (Kelly *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu prokaryotischem MGDG ist die an *sn2* gebundene 16C-Fettsäure bei diesem Lipid jedoch vollständig gesättigt. Es ist davon auszugehen, dass DGDG aus *dgd2-1* allein durch DGD1 produziert wird. Somit hat DGD1 auch Zugang zu prokaryotischem Substrat, setzt aber nur 18:x/16:0-MGDG um. Der nächste Enzymtest sollte deshalb Aufschlüsse über die Aktivität von DGD1 mit prokaryotischem MGDG mit gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren geben. Zunächst wurde aus der *fad5*-Mutante von *A. thaliana* (Roughan *et al.*, 1979; Kunst *et al.*, 1989) MGDG isoliert, das sich aus etwa 80 mol% 36:6 (18:3/18:3) und 20 mol% 34:3 (18:3/16:0) zusammensetzt (Abbildung 18 A). Wurde *fad5*-MGDG als Substrat verwendet, stellte sich heraus, dass AtCDGD1 18:3/16:0-MGDG bevorzugt umsetzte, während AtDGD2 keine Präferenz für eine der beiden Spezies zeigte. Hieraus folgt, dass die Akkumulation von 18:3/16:0-DGDG *in planta* durch die Spezifität von DGD1 für 18.x/16:0-MGDG ausgelöst wird. Als weiteres Substrat wurde MGDG aus einer *E. coli*-Linie verwendet, die die MGD1 cDNA aus *Cucumis sativus* (Gurke) heterolog exprimiert (pGEX-3X-CsMGD1) (Shimojima *et al.*, 1997). Die molekularen Spezies dieses MGDGs beinhalten die Hauptfettsäuren von *E. coli* (16:0, 16:1Δ9, 18:1Δ11 sowie 17:0cyclo), wobei der Großteil als 32:1-MGDG (ca. 50 mol%, wahrscheinlich 16:0/16:1 (Ekroos *et al.*, 2002)) vorliegt (Abbildung 18 B). In den Enzymtests mit dem in *E. coli*

synthetisierten MGDG konnte jedoch keine Präferenz von AtCDGD1 oder AtDGD2 für eine oder mehrere molekulare Spezies des MGDGs beobachtet werden.

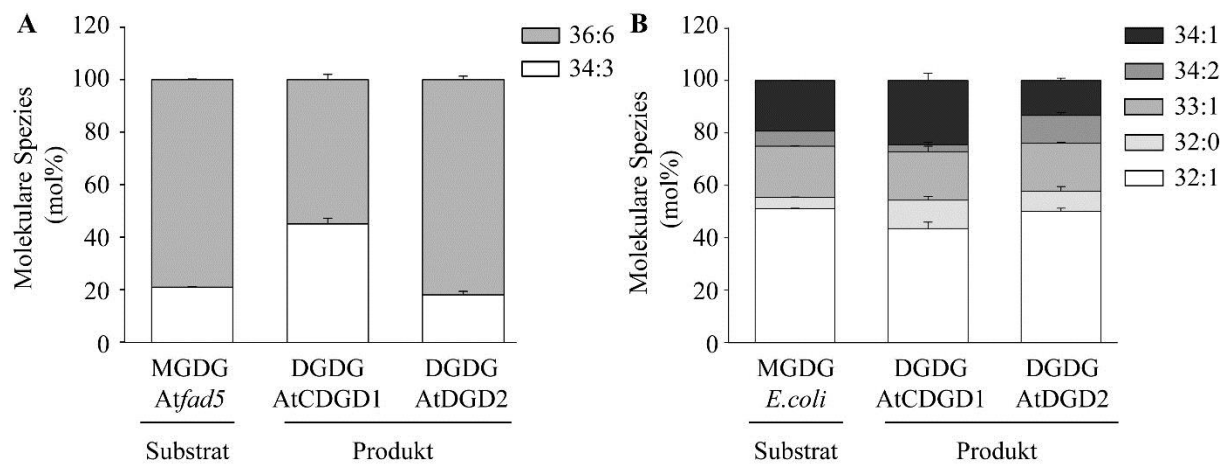


Abbildung 18: DGDG-Synthese Enzymtests mit AtCDGD1 und AtDGD2 und teilweise gesättigtem prokaryotischem Substrat.

A Enzymatischer Umsatz des MGDGs isoliert aus der *fad5*-Mutante von *A.thaliana* (*Atfad5*). 36:6 (18:3/18:3), 34:3 (größtenteils 18:3/16:0).

B Enzymatischer Umsatz des aus *E.coli* (pGEX-3X-*CsMGD1*) gewonnenen MGDGs, zusammengesetzt aus 34:1 (16:0,18:1), 34:2 (16:1,18:1), 33:1 (16:0,17:0cyclo), 32:0 (16:0,16:0), 32:1 (16:0,16:1). Die Position der jeweiligen Fettsäuren bezüglich *sn1* und *sn2* wurde nicht bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Enzymtests.

In weiteren Tests wurde die enzymatische Aktivität beider DGDG-Synthasen für jeweils ausschließlich prokaryotisches oder eukaryotisches Substrat bestimmt und mit der für MGDG aus Spinat verglichen. Dafür wurde zunächst MGDG aus *Chlamydomonas reinhardtii*, welches zu 100% prokaryotisch (hauptsächlich 18:3/16:4 bzw. 34:7) ist (Vieler *et al.*, 2007), sowie aus der Erbse (*Pisum sativum*), ein Beispiel der 18:3 Pflanzen mit 100% eukaryotischen Glykolipiden (in erster Linie 18:3/18:3 bzw. 36:6) (Chapman *et al.*, 1983), isoliert.

In Übereinstimmung mit dem Umsatz von MGDG aus Spinat, sinkt die Aktivität beider DGDG-Synthasen drastisch (auf etwa 8 - 9 %), wenn als alleiniges Substrat das prokaryotische MGDG aus *Chlamydomonas* (18:3/16:4) vorliegt (Abbildung 19). Die enzymatische Aktivität für eukaryotisches MGDG (18:3/18:3) ähnelt derjenigen für MGDG aus Spinat. Da AtDGD2 in dem zuvor gezeigten Enzymtest mit Spinat-MGDG in etwa den gleichen Umsatz für prokaryotisches und eukaryotisches Substrat zeigte (Abbildung 17), wird angenommen, dass die vierte Doppelbindung in der 16C-Fettsäure des MGDGs aus *Chlamydomonas* sich negativ auf die Substratbindung bzw. den Umsatz auswirkt.

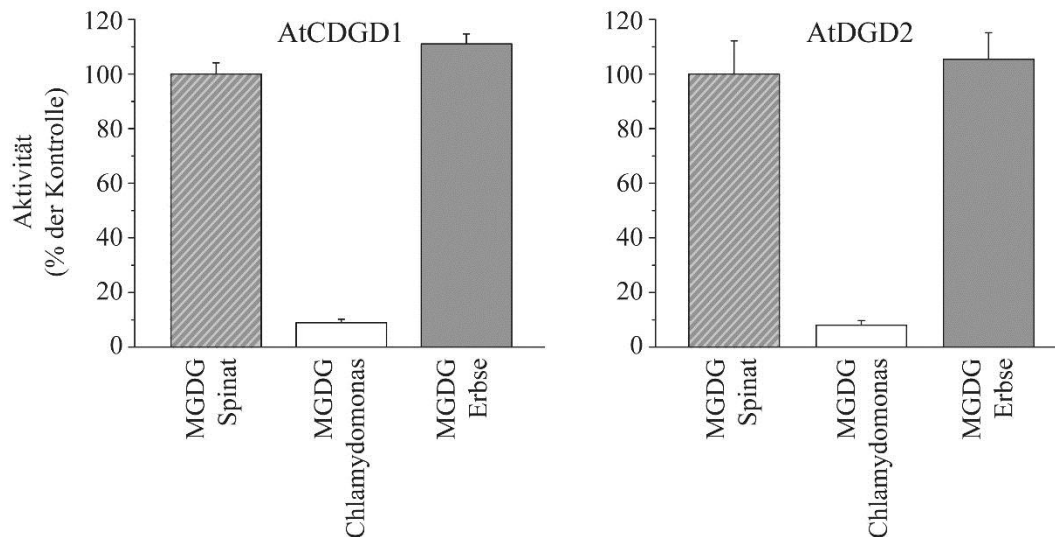


Abbildung 19: Relative Aktivität von AtCDGD1 (links) und AtDGD2 (rechts) für prokaryotisches und eukaryotisches Substrat. Es wurde hierfür MGDG aus Spinat (Zusammensetzung s. Abbildung 17) als Kontrolle (schraffiert), sowie MGDG aus Chlamydomonas (100 % prokaryotisch (16:4/18:3), weiß) und der Erbse (100 % eukaryotisch (18:3/18:3), grau) verwendet. Die Aktivität für die einzelnen Substrate wurde prozentual auf die Kontrolle bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Enzymtests.

3.2.3 UDP-Glukose inhibiert die Aktivität der DGDG-Synthasen von *Arabidopsis thaliana*

In weiteren Enzymtests wurde überprüft, ob beide DGDG-Synthasen neben UDP-Galaktose (UDP-Gal) auch UDP-Glukose (UDP-Glc) als Zucker-Donor akzeptieren. Des Weiteren wurde mittels einer 1:1- sowie einer 1:3- (UDP-Gal:UDP-Glc) Mischung überprüft, inwieweit UDP-Glc mit UDP-Gal im Bezug auf die enzymatische Bindung konkurriert und infolgedessen die Syntheserate beeinflusst. Das Verhältnis 1:3 wurde gewählt in Anlehnung des *in planta* Verhältnisses beider UDP-Zucker in *Arabidopsis*-Blättern (Dörmann and Benning, 1998).

Wurde ausschließlich UDP-Glc in dem Enzymtest eingesetzt, sank die Aktivität von AtCDGD1 sowie AtDGD2 auf unter 20 %, bezogen auf die Aktivität beider Enzyme im Enzymtest mit 100 nmol UDP-Gal (Kontrolle) (Abbildung 20). Ähnliche Ergebnisse konnten zuvor mittels eines radioaktiven Enzymtests mit UDP-[U¹⁴C]Gal mit AtDGD2 erzielt werden (Kelly and Dörmann, 2002). Da mittels eines Massenspektrometers aufgrund der gleichen Masse nicht zwischen Glukose und Galaktose unterschieden werden kann, ist nicht auszuschließen, dass sowohl Glukosylgalaktosyldiacylglycerol als auch DGDG synthetisiert wurde. Wurde zu dem Standardenzymtest mit 100 nmol UDP-Gal 100 nmol bzw. 300 nmol UDP-Glc hinzugefügt, führte dies bei AtCDGD1 sowie AtDGD2 zu einer Reduktion der Aktivität um etwa 20 - 40 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass UDP-Glc beide DGDG-Synthasen vermutlich durch kompetitive Wechselwirkungen inhibiert.

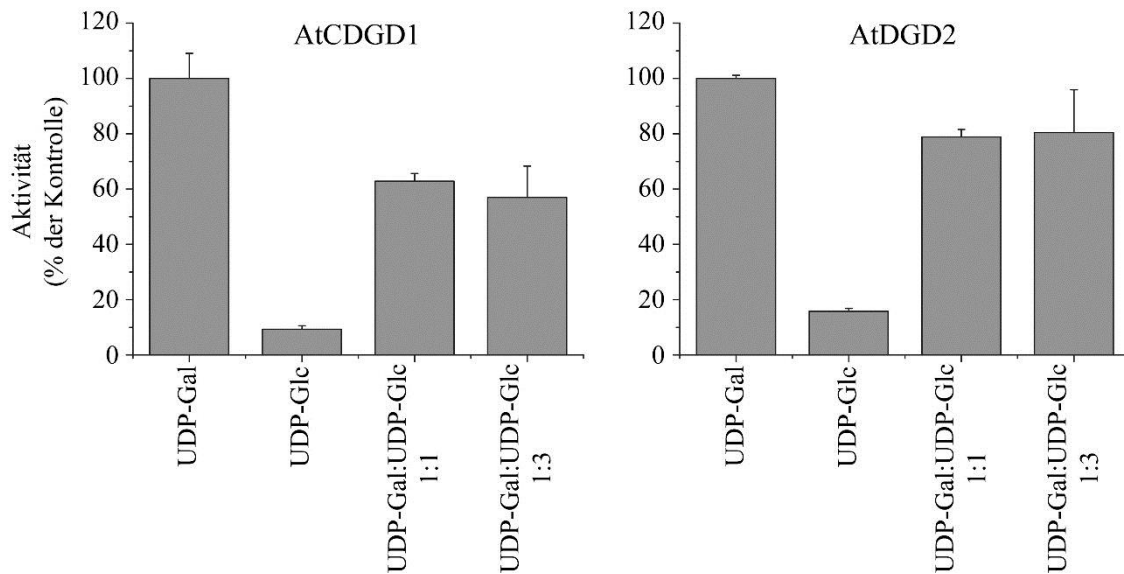


Abbildung 20: UDP-Glc ist ein Inhibitor von AtCDGD1 und AtDGD2. Es wurden 100 nmol des jeweiligen UDP-Zuckers (bzw. 300 nmol UDP-Glc bei dem Verhältnis 1:3) pro Enzymtest verwendet. Als weiteres Substrat wurde MGDG aus Spinat verwendet (Abbildung 17). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Replika.

3.2.4 Die Erhöhung der PA-Konzentration führt nicht zu einer erhöhten DGDG-Synthase-Aktivität

Dubots *et al.* (2010) konnten eine Steigerung der Aktivität der MGDG-Synthase MGD1 nach der Zugabe von 1,5 mol% PA beobachten. In dieser Veröffentlichung wurde ebenfalls der Einfluss von PA auf die MGDG- und DGDG-Synthase-Aktivität innerhalb von Blatthomogenaten von *Arabidopsis* getestet. Während die MGDG-Synthase-Aktivität durch die PA-Zugabe gesteigert wurde, hatte PA keinen Effekt auf die DGDG-Synthase-Aktivität. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von PA auf rekombinantes AtCDGD1- und AtDGD2-Protein überprüft. Da Versuche aktives AtCDGD1-Protein aufzureinigen nicht erfolgreich waren, wurde in den Enzymtests der *E. coli*-Proteinrohextrakt verwendet. Dadurch hatte man auch in den Negativkontrollen dieses Enzymtests einen PA-Hintergrund von 0,5-1,0 mol%. Um den Effekt von einer Erhöhung der PA-Konzentration auf die DGDG-Synthase-Aktivität zu überprüfen, wurde zu dem Enzymtestansatz 1,5 mol% PA hinzugefügt.

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass die Aktivität von AtCDGD1 sowie AtDGD2 nach der Zugabe von 1,5 mol% PA zu dem Enzymtestansatz zu der ohne artifizieller PA-Zugabe vergleichbar blieb. Somit hat die Erhöhung der PA-Konzentration keinen Effekt auf die Aktivität der DGDG-Synthasen.

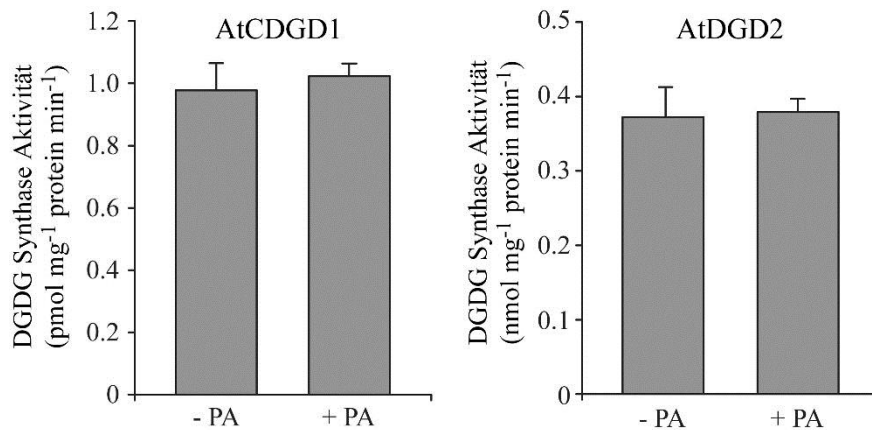


Abbildung 21: Die Erhöhung der PA-Konzentration beeinflusst nicht die Aktivität von AtCDGD1 und AtDGD2. - PA: DGDG-Synthaseaktivität im *E. coli*-Proteinrohextrakt ohne PA-Zugabe (~ 0.5-1 mol% PA). + PA: DGDG-Synthaseaktivität im *E. coli*-Proteinrohextrakt nach Zugabe von 1.5 mol% PA (Gesamtmenge ~ 2 - 2.5 mol% PA). Pro Enzymtest wurden standardmäßig 25 nmol von MGDG aus Spinat eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Replika.

3.2.5 LjCDGD1 von *Lotus japonicus* zeigt eine geringere Spezifität für 36:6-MGDG als AtCDGD1

In weiteren Enzymtests wurde die Substratspezifität von rekombinantem DGD1- sowie DGD2-Protein aus der 18:3-Pflanze *Lotus japonicus* überprüft. Da in 18:3-Pflanzen für die DGDG-Synthasen nur eukaryotisches Substrat (36:x-MGDG) zu Verfügung steht, war es von Interesse zu erfahren, ob die DGDG-Synthasen der 18:3-Pflanzen auch eukaryotisches Substrat bevorzugen. Beide DGDG-Synthasen aus *Lotus* zeigten in Enzymtests mit Spinat MGDG eine leichte Präferenz für eukaryotisches MGDG (Abbildung 22), etwa 60-65 mol% des synthetisierten DGDGs war eukaryotisch (36:6, 18:3/18:3). Im Vergleich zu AtCDGD1 (Abbildung 17) zeigte LjCDGD1 von *Lotus* hingegen eine schwächere Substratspezifität. Die Substratspezifitäten der DGD2-Enzyme aus *Arabidopsis* und *Lotus* waren ähnlich.

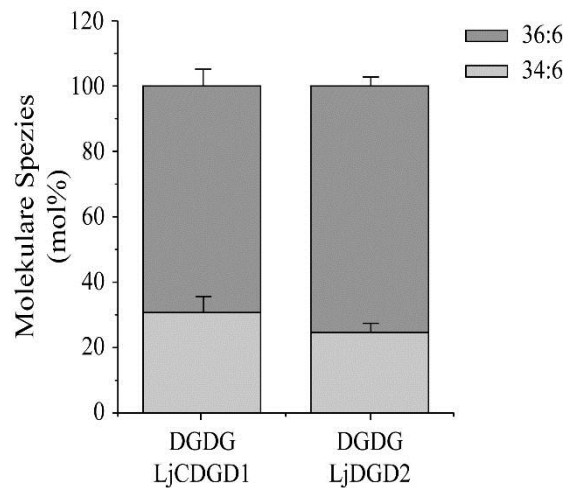


Abbildung 22: Relative Verteilung der beiden Hauptspezies (34:6 und 36:6) des durch LjCDGD1 und LjDGD2 synthetisierten DGDGs; Substrat MGDG von Spinat (Abbildung 17). Mittelwerte aus drei unabhängigen Enzymtests.

3.3 Lipidbindungsstudien

Um die Lipidbindungseigenschaften der DGDG-Synthasen von Arabidopsis zu untersuchen, wurden mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen verschiedene Lipidbindungsexperimente etabliert. Neben der Bindung beider DGDG-Synthasen an PA und PG wurde auch die Bindung an die Galaktolipide überprüft. Der Fokus wurde hierbei auf AtNDGD1 gesetzt, um eine mögliche Beteiligung dieses Peptids an der Lipidbindung zu überprüfen.

3.3.1 Isolierung von AtNDGD1, AtCDGD1 und AtDGD2 für Lipid-Protein-Bindungstests

Für die Durchführung der Lipidbindungsstudien werden gereinigte Proteine benötigt. In vorangegangenen Versuchen dieser Arbeit zur Solubilisierung der rekombinanten membrangebundenen DGDG-Synthasen in dem *E.coli*-Zelllysate wurde festgestellt, dass obwohl die Proteine in Fusion mit dem hochlöslichen Nus-Protein exprimiert wurden AtNDGD1 und AtCDGD1 größtenteils aggregiert vorlagen. Das in dem Überstand verbliebende Protein band zudem nur unzureichend an die Ni-NTA-Agarose-Matrix (Protokoll zur nativen Proteinreinigung, QIAexpressionist), was auch nicht durch die Zugabe von Detergentien wie Triton X-100, CHAPS oder Dodecylmaltosid verbessert werden konnte. Die aus der nativen Proteinreinigung resultierende Proteinausbeute war aufgrund dieser beiden Gründe nur ungenügend. Um die Proteinausbeute zu erhöhen, wurde ein Protokoll verwendet in dem die Zellen in einem Puffer lysiert wurden, der das denaturierende Agens Guanidinhydrochlorid enthält. Dieses Agens führt zu der Solubilisierung der Proteinaggregate, aber auch zu der Denaturierung der Proteine. Nach der Zellysis und der anschließenden Bindung der denaturierten Proteine an die Ni-NTA-Agarose-Matrix in einer Säule, wurde die Säule zunächst mit einem Puffer gewaschen, der Harnstoff als denaturierendes Agens enthielt (W1). Der Harnstoff sowie die Reste des Guanidinhydrochlorids wurden mit dem 50fachen Säulenvolumen (bezogen auf das Volumen des Ni-NTA-Agarose-Materials) eines

zweiten Waschpuffers ohne denaturierende Agentien entfernt (W2), wodurch die Proteine renaturiert wurden. Anschließend wurden die Proteine mit dem Elutionspuffer, ebenfalls ohne denaturierende Agentien, eluiert.

In Abbildung 23 ist der Reinigungsverlauf für alle Proteine, die für Lipidbindungsstudien verwendet wurden, gezeigt. In der Durchfluss-Fraktion (FT) sind die Proteine enthalten, die nicht an das Säulenmaterial gebunden haben. FT1 ist der direkte Durchfluss nach der Überführung des Ni-NTA-Proteinextraktes in die Säule, FT2 ein Waschschriff mit dem Lysispuffer. Beide FT-Fraktionen enthielten auch einen Teil des zu reinigenden Proteins. Die teilweise unscharfen Proteinbanden werden durch die hohe Konzentration des Guanidinhydrochlorids hervorgerufen, das den Verlauf der SDS-PAGE stört. Das Waschen der Säule mit den beiden Waschpuffern (Fraktionen W1 und W2) führt zu einer Ablösung von geringen Mengen der rekombinanten Proteine. Wie in der unteren Abbildung zu sehen ist, konnten durch diese Methode ausreichende Mengen gereinigter Proteine in löslicher Form gewonnen werden (Fraktionen E). Es ist aber unklar, ob diese in der nativen (d.h. enzymatisch aktiven) Form vorliegen.

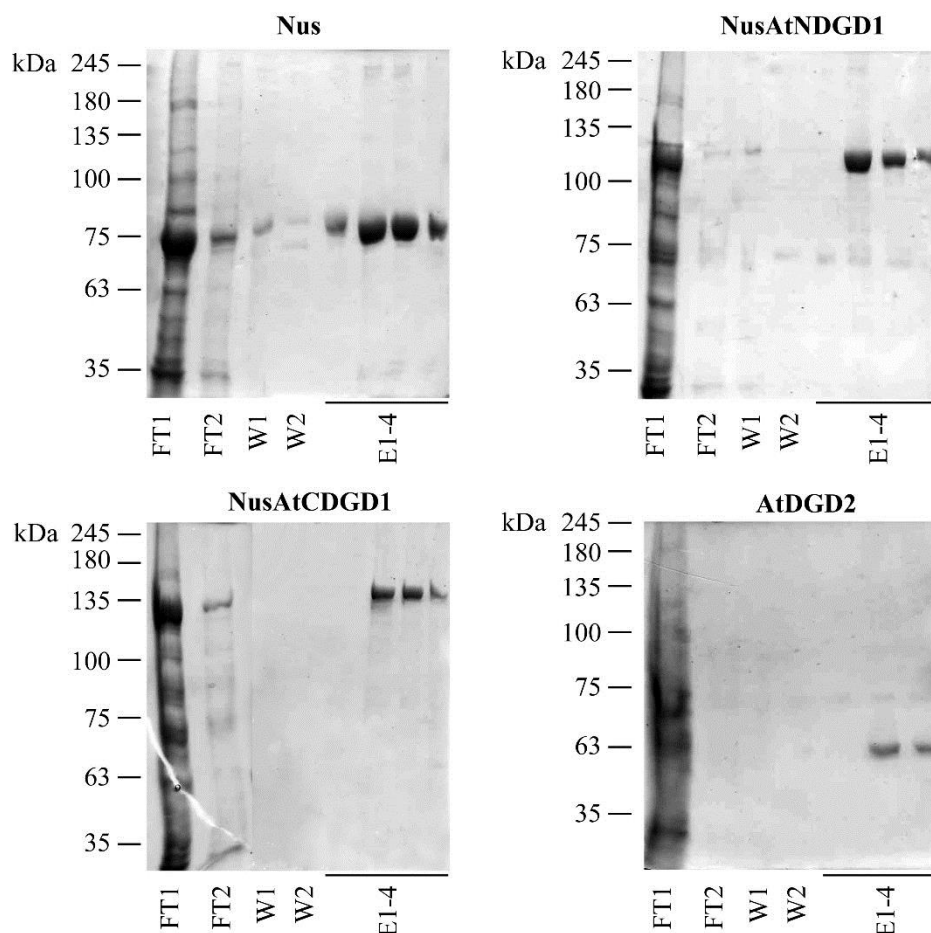


Abbildung 23: Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie (Ni-NTA) mit gleichzeitiger Renaturierung der an das Säulenmaterial gebundenen rekombinanten Proteine. Repräsentative Dokumentation des Reinigungsverlaufes mit SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung des SDS-PAGE Gels. Berechnetes Molekulargewicht der jeweiligen Proteine: Nus 66 kDa, NusAtNDGD1 101 kDa, NusAtCDGD1 116 kDa, AtDGD2 54 kDa.

3.3.2 AtNDGD1, AtCDGD1 und AtDGD2 binden spezifisch an PA (Lipid-Überlagerungs-Test)

Mit Hilfe des Lipid-Überlagerungs-Tests ist es möglich einen Überblick über die Lipidbindungseigenschaften eines Proteins zu erhalten. Hierzu werden zunächst die zu testenden Lipide auf eine Nitrocellulosemembran in Punkten aufgetragen. Innerhalb dieser Arbeit wurden in erster Linie plastidäre Lipide verwendet, da beide DGDG-Synthasen im Chloroplasten lokalisiert sind (Abbildung 24). Anschließend wird die mit den Lipiden beladene Membran mit einer Lösung, die das zu untersuchende Protein enthält, inkubiert. Der Nachweis des gebundenen Proteins an ein oder mehrere Lipide erfolgt über die Immunodetektion.

Mit diesem Test konnte eine starke Bindung von AtNDGD1, AtCDGD1 sowie AtDGD2 an PA festgestellt werden (Abbildung 24A). Werden nun die Bindungseigenschaften von AtNDGD1 und AtCDGD1 betrachtet, fällt auf, dass insbesondere AtNDGD1 stark an PA bindet, im Gegensatz zu AtCDGD1, welches nur schwach mit diesem Lipid interagiert. Verglichen mit AtCDGD1, zeigte AtDGD2 hingegen eine viel stärkere Bindung an PA. Eine Bindung von AtNDGD1 konnte selbst bei einer Stoffmenge von 1 nmol PA nachgewiesen werden (Abbildung 24B). Interessanterweise konnte keine Interaktion der DGDG-Synthasen mit MGDG sowie DGDG beobachtet werden. Womöglich ist die Bindung an das Substrat bzw. Produkt der DGDG Synthasen nur schwach, und daher kann AtNDGD1, AtCDGD1 wie auch AtDGD2 leicht durch die Detergentien in dem Waschpuffer abgelöst werden.

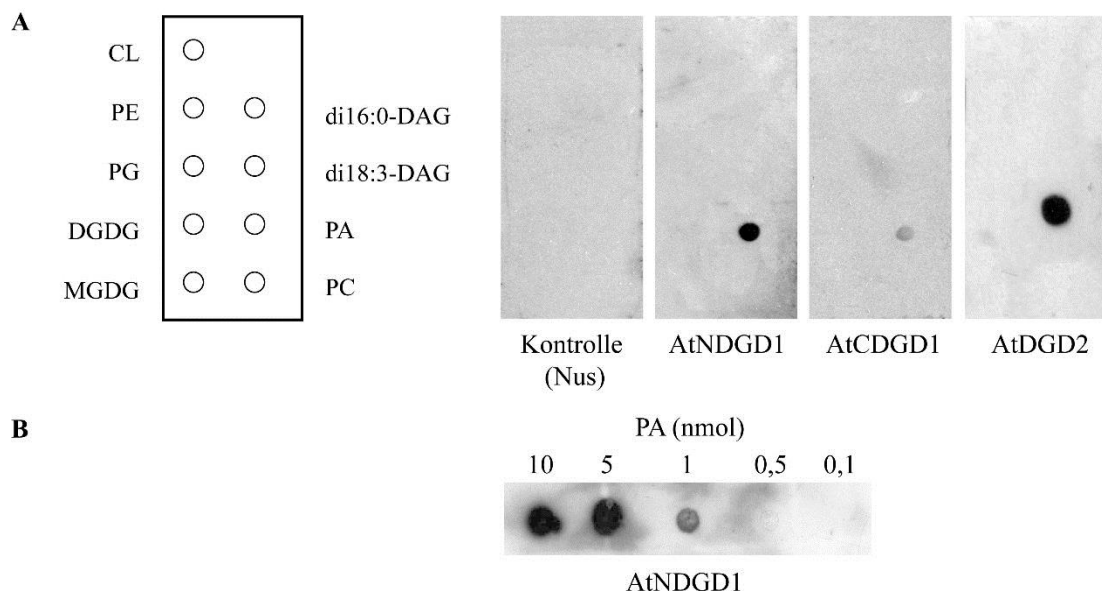


Abbildung 24: Lipidüberlagerungstests mit AtNDGD1, AtCDGD1 und AtDGD2.

A Lipidüberlagerungstest mit unterschiedlichen Glycerolipiden. 5 nmol des jeweiligen Lipids wurden auf die Membranen gespottet. **B Erfassung der Bindungseffizienz von NDGD1 an PA.**

Pro Test wurden jeweils 5 µg (1 µg/mL) des gereinigten Proteins verwendet. Nachweis des gebundenen Proteins über Immunodetektion (HisDetector Nickel-HRP, 1:10000).

3.3.3 AtNDGD1 bindet an Liposomen in Abhängigkeit von PA (Liposomenbindungstest)

Eine zweite Möglichkeit die Bindung eines Proteins an ein bestimmtes Lipid zu untersuchen ist der Liposomenbindungstest. Zur Herstellung der Liposomen wurden die Lipide zunächst für eine Stunde bei 37 °C in einer wässrigen Pufferlösung hydratisiert und dann zur Herstellung von multilamellaren Liposomen 5 Minuten gevortext. Die hier verwendeten Liposomen setzen sich aus einem bilayerstabilisierenden Lipid (z.B. PC) als Trägermatrix sowie dem zu testenden Lipid zusammen. Für die Trägermatrix wurde PC ausgewählt, da AtNDGD1 in dem Lipidüberlagerungstest nicht an dieses Lipid gebunden hat (Abbildung 24). Aufgrund ihrer Größe ist es möglich die multilamellaren Liposomen durch Zentrifugation bei 14000 rpm zu pelletieren. Somit ist es recht einfach sie aus einer Lösung zu isolieren. Zur Entfernung von nicht-pelletierbaren Lipidstrukturen werden die Liposomen nach dem Vortexen wiederholt durch Zentrifugation und anschließender Aufnahme des Pellets in frischem eiskaltem Puffer gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit mit dem zu untersuchenden Protein werden die Liposomen sowie die Lipid-gebundenen Proteine über die Zentrifugation von den ungebundenen bzw. sich in Lösung befindenen Proteinen abgetrennt. Der Nachweis der Proteinbindung erfolgt mittels der SDS-PAGE mit der Pellet- (Liposomen-) sowie der Überstandsfraktion und anschließender Coomassie-Färbung des Gels.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, konnte durch den Liposomenbindungstest die Bindung des AtNDGD1-Proteins an PA bestätigt werden. Eine Bindung dieses Proteins an PA-enthaltende Liposomen konnte in einem Proteinnengenbereich zwischen 2 und 10 µg Protein nachgewiesen werden (Abbildung 25A). Währenddessen konnte in dem Kontrollexperiment mit Liposomen, die nur PC enthielten, kein AtNDGD1-Protein in der Pelletfraktion nachgewiesen werden. Die stärkste Bindung dieses Proteins wurde bei Liposomen beobachtet, die etwa 40-60 mol% PA enthielten (Abbildung 25B). Wurde die PA-Konzentration weiter erhöht, sank die Menge an gebundenem Protein. Vermutlich ist dies begründet durch eine Destabilisierung der Liposomen, die durch die hohe Konzentrationen des bilayer-destabilisierenden PAs verursacht wurde. Im Gegensatz zu AtNDGD1 band die Kontrolle (Nus) nicht an die PA-enthaltenden Liposomen, womit eine Beteiligung des Nus-Tags sowie des C-terminalen His-Tags an der PA-Bindung auszuschließen ist (Abbildung 25C).

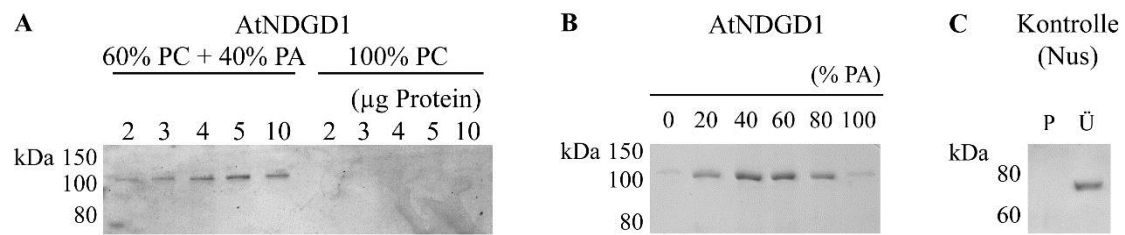


Abbildung 25: Liposomenbindungstest mit AtNDGD1. A Versuch mit verschiedenen Proteinmengen (2-10 µg AtNDGD1-Protein pro Test). Als Kontrolle dienten Liposomen, die nur PC enthielten. **B Bindung von AtNDGD1 an Liposomen mit ansteigender PA-Konzentration.** Pro Versuch wurden je 5 µg des gereinigten AtNDGD1-Proteins verwendet.

C, Kontrollversuch mit dem Nus-Protein. Pro Versuch wurden je 5 µg des gereinigten Proteins verwendet. P Pellet, Ü Überstand. Die gebundenen Proteine wurden per SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung detektiert.

3.3.4 AtNDGD1 induziert die Fusion von Liposomen in Abhängigkeit von PA (Liposomen-Aggregations-Test)

Mit dem Liposomen-Aggregations-Test kann die durch Proteine induzierte Veränderung von Membranstrukturen untersucht werden. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass große Liposomenaggregate stärker das Licht streuen als kleine einzelne Liposomen. Einzelne Proteine besitzen die Eigenschaften Membranen zu fusionieren oder aneinander anzulagern. Die Zugabe dieser Proteine zu einer Lösung mit unilamellaren Vesikeln mit etwa gleichem Durchmesser führt zu einer Fusion oder Aggregation dieser Vesikel, wodurch wie zuvor beschrieben die Lichtstreuung bzw. Trübung der Lösung erhöht wird. Diese Veränderung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 350 nm erfasst werden.

Nach der Zugabe von AtNDGD1 zu den PA-enthaltenden Liposomen konnte ein eindeutiger Anstieg der Absorption beobachtet werden (Abbildung 26A und B). Demnach führt AtNDGD1 *in vitro* zu einer Fusion oder Aggregation von Membranen. Diese Eigenschaft von AtNDGD1 ist eindeutig PA-abhängig, da keine Absorptionsänderung bei Liposomen ohne PA zu beobachten war (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von AtCDGD1 sowie der Negativkontrolle (Nus) bei beiden Versuchen zu keinem Absorptionsanstieg. Somit kann ausgeschlossen werden, dass erstens bei diesem Ergebnis das Nus-Protein oder der His-Tag eine Rolle spielen, und zweitens AtCDGD1 für die Fusion/Aggregation der Membranen erforderlich ist.

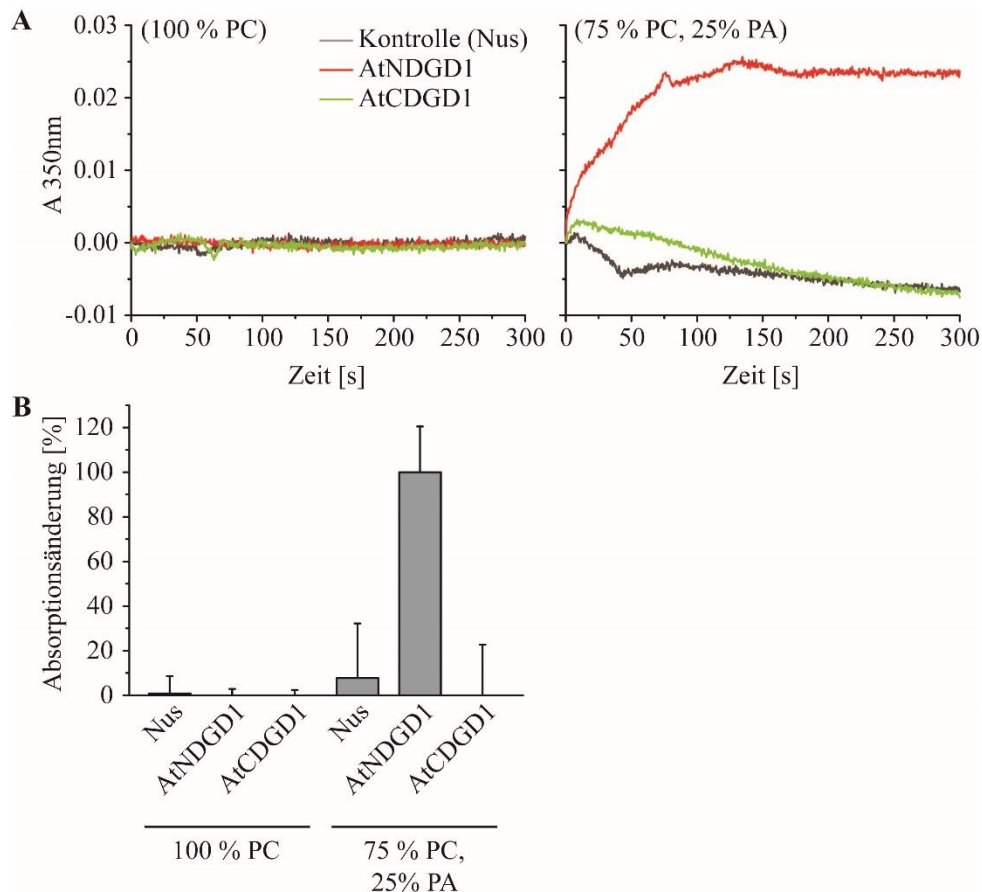


Abbildung 26: AtNDGD1 induziert die Aggregation/ Fusion von PA-enthaltenden Liposomen. A Repräsentative Veränderung der Lichtstreuung der Liposomensuspension über die Zeit in Abhängigkeit von der Zugabe von AtNDGD1, AtCDGD1 sowie der Kontrolle (Nus). Zusammensetzung der Liposomen: Links 100 % PC, rechts 75 % PC 25 % PA. **B Veränderung der Lichtstreuung nach 300 s.** Die gezeigten Werte beziehen sich jeweils auf die Differenz zwischen dem kleinsten (AtCDGD1, 75 % PC und 25 % PA) und dem größten Mittelwert (AtNDGD1, 75 % PC und 25 % PA). Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. Pro Versuch wurden $650 \text{ nmol Lipid mL}^{-1}$ mit einem Verhältnis von Protein zu Lipid von 1:1000 verwendet.

Über den photometrischen Liposomenaggregationstest kann nicht zwischen Liposomenaggregation oder -fusion unterschieden werden. Um weitere Hinweise dazu zu erhalten, inwieweit AtNDGD1 Membranen bzw. Liposomen in Abhängigkeit von PA modifiziert, wurde die Liposomenaggregation/ -fusion mittels eines DIK-Lichtmikroskopes dokumentiert. Die DIK-Lichtmikroskopie wird insbesondere bei transparenten Untersuchungsobjekten wie z.B. Liposomen verwendet, die bei der Lichtmikroskopie im Durchlicht nicht oder nur schwer sichtbar wären. Die für dieses Experiment durch Extrusion hergestellten Liposomen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 100 nm und können aufgrund der zu geringen Auflösung durch die Lichtmikroskopie nicht sichtbar gemacht werden. Überschreiten diese Liposomen jedoch z.B. durch die Fusion miteinander eine Mindestgröße (ca. 200 - 300 nm), werden sie im Lichtmikroskop sichtbar. Nach der einminütigen Inkubation der Liposomen mit dem Nus-Protein (Leervektorkontrolle, Liposomen mit und ohne PA) waren nur vereinzelt große Liposomen (\varnothing 1 - 5 μm) sichtbar (Abbildung 27). Ähnlich verhielt es sich auch mit AtNDGD1, wenn

die Liposomen kein PA enthielten. Nur nach der Inkubation von AtNDGD1 mit PA-enhaltenden Liposomen konnte eine Anhäufung von im Lichtmikroskop sichtbaren Liposomen mit einem Durchmesser von etwa 1 - 5 μm beobachtet werden. Einzelne Liposomen hatten einen Durchmesser von bis zu 10 - 20 μm . Somit konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass AtNDGD1 die Fusion der PA-enhaltenden Liposomen induziert.

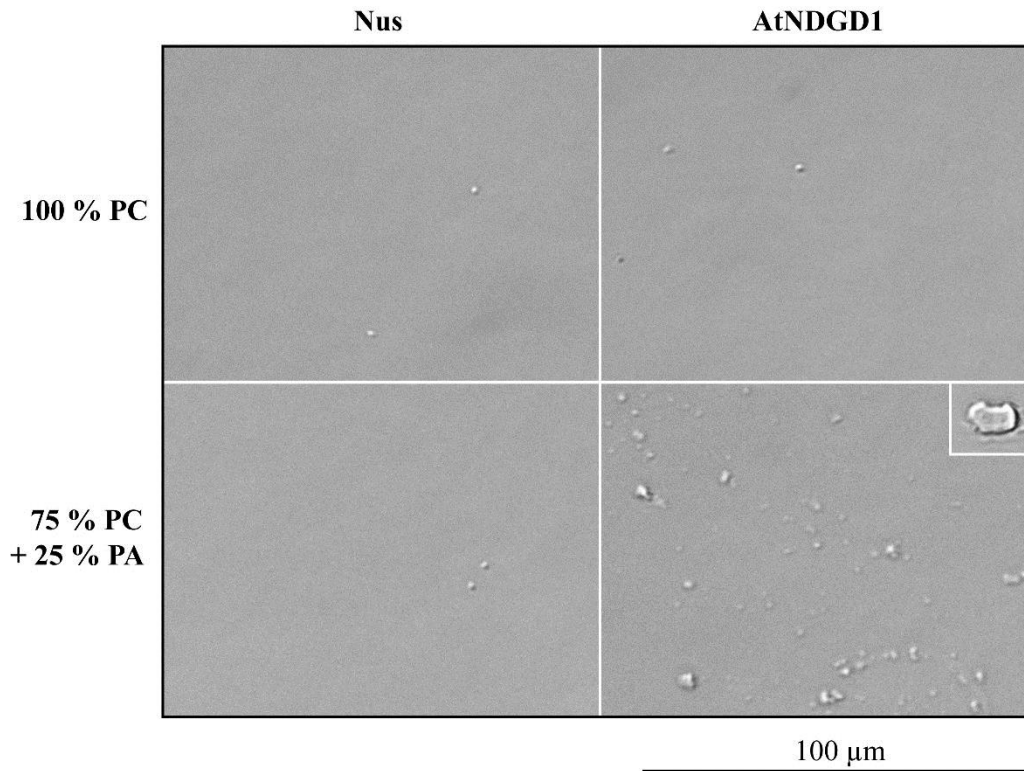


Abbildung 27: PA-abhängige Liposomenfusion durch NDGD1. DIK-lichtmikroskopische Aufnahmen der Liposomen nach 1-minütiger Inkubation mit Nus oder NusNDGD1. Repräsentative Aufnahmen. Der Balken entspricht 100 μm .

3.3.5 AtCDGD1 erhöht die Durchlässigkeit von PA-enhaltenden Membranen (Liposomen-Durchlässigkeits-Test)

Mit Hilfe des Liposomen-Durchlässigkeits-Tests wird eine mögliche Insertion des zu testenden Proteins in eine Membran untersucht. Das Prinzip dieses Experimentes beruht darauf, dass durch die Insertion eines Proteins die Membran an dieser Stelle durchlässig wird, das heißt, dass Substanzen an dieser Stelle hindurch diffundieren können. Für dieses Experiment erfolgt zunächst der Einschluss des Fluoreszenzfarbstoffes ANTS sowie des entsprechenden Fluoreszenzquenchers DPX in Liposomen (LUVs). Durch die enge Nachbarschaft von ANTS und DPX in den Liposomen wird die Fluoreszenz des ANTS gequench und somit minimiert. Resultierend aus der Insertion der Proteine und der daraus folgenden Erhöhung der Durchlässigkeit der Membranen, erfolgt der Austritt von ANTS und DPX aus den Liposomen. Durch diese Verdünnung kann das Quenching nicht mehr so effektiv erfolgen und die Fluoreszenzemission steigt. Die gemessenen Fluoreszenzemissionswerte werden relativ auf die

Maximalfluoreszenz (gemessen nach der Zugabe von 1 % SDS) bezogen. Die Zugabe der Glykosyltransferasedomäne von AtDGD1 (AtCDGD1) zu Liposomen, die 25 mol% PA enthielten, führte zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz (um durchschnittlich 69 % bezogen auf die Maximalfluoreszenz, Abbildung 28 A und B). Demzufolge inserierte AtCDGD1 in diese Membranen, was den Austritt des ANTS und DPX aus den Liposomen auslöste. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von AtNDGD1 zu Liposomen mit der gleichen Zusammensetzung nur zu einem geringeren Anstieg der Fluoreszenz (um etwa 8 %). Somit wird durch die Interaktion von AtNDGD1 mit PA-enhaltenden Membranen deren Durchlässigkeit geringfügig erhöht. Das Nus-Protein selbst zeigte keinen reproduzierbaren Effekt auf die Durchlässigkeit dieser Liposomen. Keines der untersuchten Peptide zeigte, ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen Experimenten, eine Interaktion mit Membranen die nur aus PC aufgebaut waren.

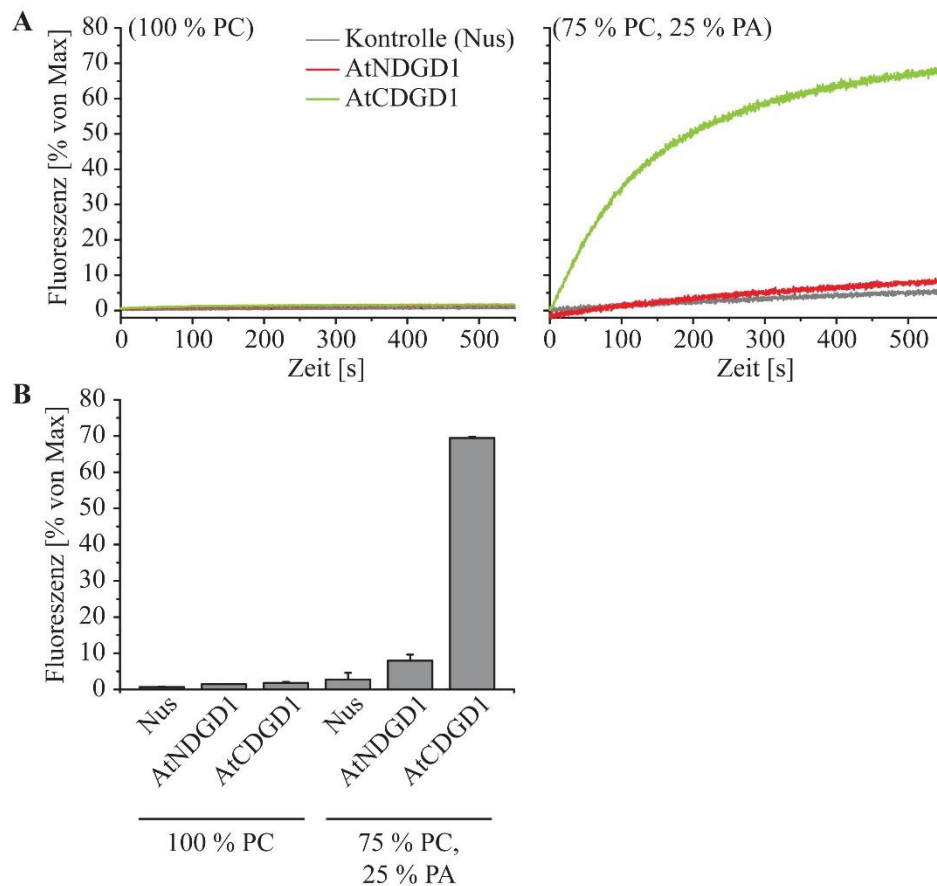


Abbildung 28: AtCDGD1 führt zu der Erhöhung der Durchlässigkeit von Membranen in Abhängigkeit von PA.

A Repräsentative relative Veränderung der Fluoreszenzemission über die Zeit in Abhängigkeit von der Zugabe von AtNDGD1, AtCDGD1 und der Kontrolle (Nus). Zusammensetzung der Liposomen: Links 100 % PC, rechts 75 % PC 25 % PA.

B Veränderung der Fluoreszenzemission nach 550 s. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Pro Versuch wurden 650 nmol Lipid mL⁻¹ mit einem Verhältnis von Protein zu Lipid von 1:1000 verwendet. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden relativ auf die Maximalfluoreszenz (Max) bezogen.

3.3.6 AtNDGD1 führt zu einer geringen Fluoreszenzänderung innerhalb der „content mixing“-Tests

Mit Hilfe des Liposomen-Aggregations-Tests und der DIK-Mikroskopie (Kapitel 3.3.4) konnte gezeigt werden, dass AtNDGD1 die Fusion von PA-enthaltenden Membranen induziert. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden zwei Varianten des sogenannten „content mixing“-Tests mit AtNDGD1 durchgeführt. In der ersten Variante werden wie bei dem Liposomen-Durchlässigkeitstest (Kapitel 3.3.5) Liposomen hergestellt, die ANTS sowie DPX einschließen. Zu diesem Zeitpunkt ist durch das Quenching des DPX die Fluoreszenzemission niedrig. Diese Liposomen werden mit Liposomen vermischt, die „leer“ sind, d.h. weder ANTS noch DPX enthalten (Abbildung 29 A). Erfolgt nun die durch das Protein ausgelöste Fusion dieser Liposomen, wird das ANTS und DPX in den nun größeren Liposomen verdünnt. Das ANTS wird dadurch weniger effektiv durch das DPX gequench und die Fluoreszenz steigt. In der zweiten Variante dieses Tests wird das ANTS und DPX getrennt voneinander in die Liposomen eingeschlossen (Abbildung 30 A). Diese Liposomen werden anschließend miteinander vermischt. Zu Beginn ist in dieser Testvariante die Fluoreszenzemission hoch, da das ANTS in den Liposomen nicht gequench wird. Erfolgt nun im Laufe der Messung eine durch das Protein hervorgerufene Fusion der unterschiedlichen Liposomen, vermischt sich das ANTS mit dem DPX. Dadurch wird die Fluoreszenz gelöscht und das gemessene Signal nimmt ab. Wie in Kapitel 3.3.5 gezeigt, führte AtCDGD1 in dem Liposomen-Durchlässigkeitstest durch die Insertion in die Membran zu dem Austritt des ANTS und DPX aus den Liposomen (Abbildung 28), was zu dem Anstieg der Fluoreszenz führte. In den beiden Varianten des „content mixing“-Tests kann nicht zwischen der Fluoreszenzänderung durch die Insertion des Proteins in die Membran und der Änderung durch die Fusion der Liposomen unterschieden werden. Auf Grund dessen konnte AtCDGD1 nicht im „content mixing“-Test mit einbezogen werden.

Im Vergleich zu der Leervektorkontrolle konnte in der ersten Variante des „content mixing“-Tests nach der Zugabe von AtNDGD1 zu Liposomen mit PA ein minimaler Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden (um etwa 1,5 % bezogen auf die Maximalfluoreszenz) (Abbildung 29 B und C). Wenn für diesen Test Liposomen aus 100 % PC verwendet wurden, konnte kein Unterschied bezüglich der Fluoreszenzänderung zwischen AtNDGD1 und der Leervektorkontrolle festgestellt werden.

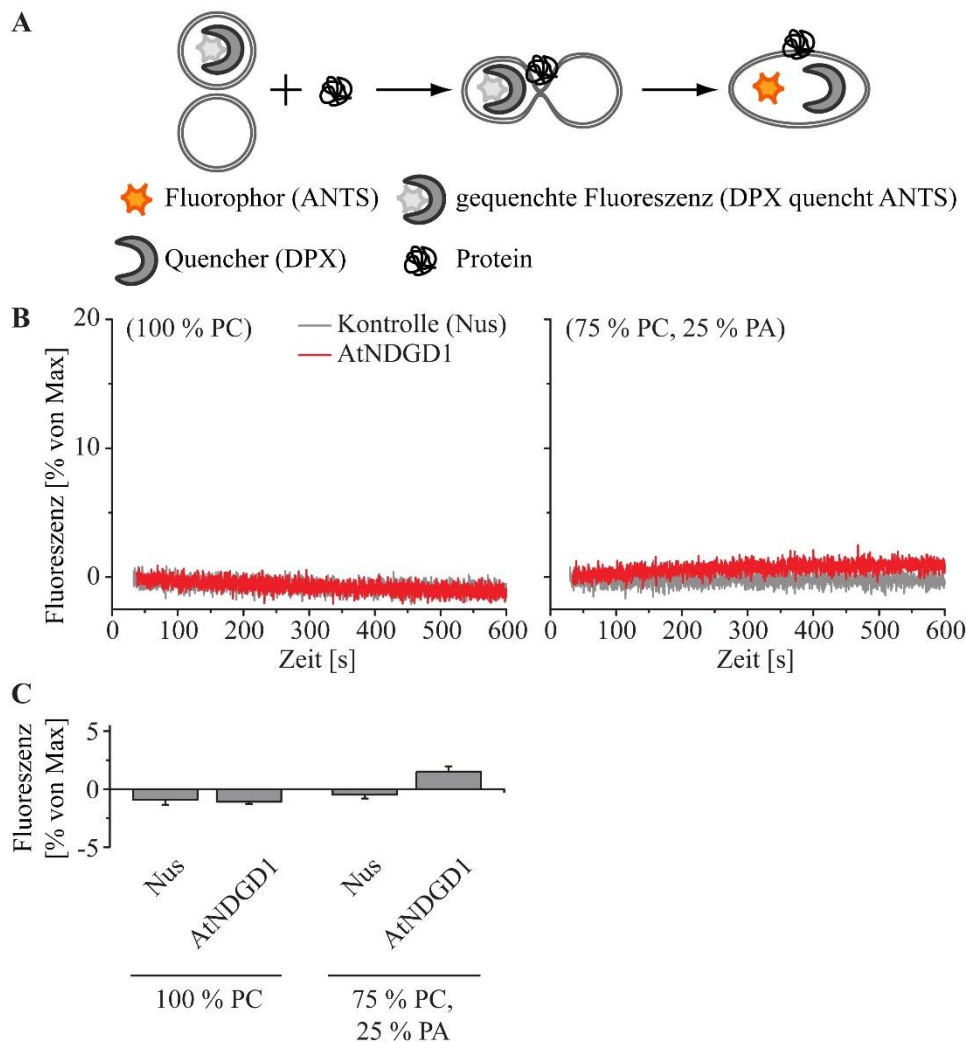


Abbildung 29: Content mixing-Test mit AtNDGD1, Variante 1. A Testprinzip. Liposomen mit ANTS und DPX (gequenchte Fluoreszenz) werden mit leeren Liposomen und dem getesteten Protein vermischt. Induziert dieses Protein die Liposomenfusion, kommt es zu der Verdünnung des ANTS und DPX. Dadurch treffen diese Substanzen seltener aufeinander und die Fluoreszenz steigt. **B Repräsentative relative Veränderung der Fluoreszenzemission über die Zeit in Abhängigkeit von der Zugabe von AtNDGD1 und der Kontrolle (Nus).** Zusammensetzung der Liposomen: Links 100 % PC, rechts 75 % PC 25 % PA. **B Veränderung der Fluoreszenzemission nach 600 s.** Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Pro Versuch wurden $650 \text{ nmol Lipid mL}^{-1}$ mit einem Verhältnis von Protein zu Lipid von 1:1000 verwendet. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden relativ auf die Maximalfluoreszenz (Max) bezogen.

In der zweiten Variante dieses Testes konnte im Vergleich zu der Leervektorkontrolle eine leicht verstärkte Fluoreszenzabnahme nach der Zugabe von AtNDGD1 zu den Liposomen mit 25 % PA beobachtet werden (Abbildung 30 B und C). Dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Zudem konnte im Mittel diese Tendenz auch bei Liposomen ohne PA beobachtet werden (Abbildung 30 C). Es wurde in allen Messungen ein Abfall der Fluoreszenz um 15-20 % bezogen auf den Startwert beobachtet. Der Grund für diese Abnahme wurde aber nicht weiter untersucht.

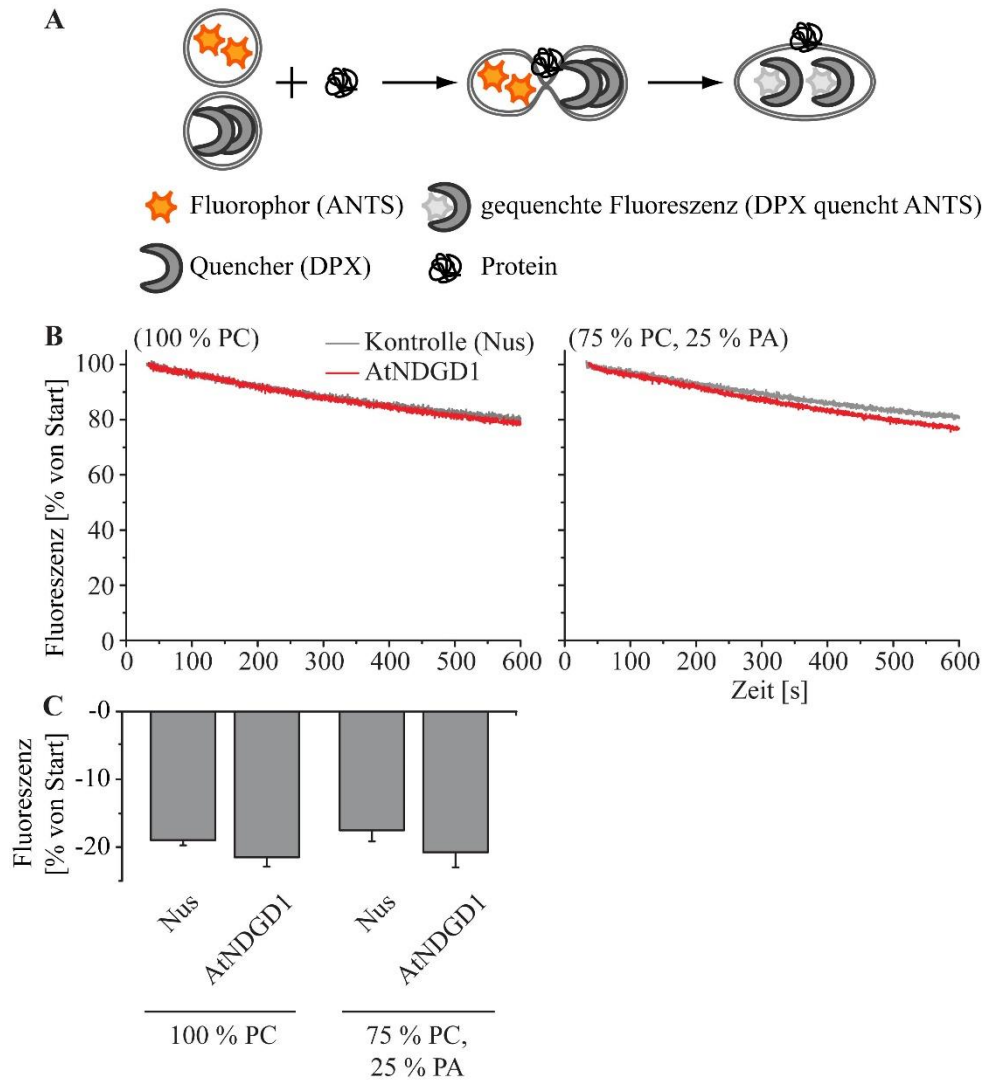


Abbildung 30: Content mixing-Test mit AtNDGD1, Variante 2. A Testprinzip. Liposomen mit ANTS werden mit Liposomen mit DPX und dem getesteten Protein vermischt. Da das ANTS nicht gequenchet wird, ist die Fluoreszenz hoch. Induziert das Protein die Liposomenfusion, kommt es zu dem Aufeinandertreffen des ANTS und DPX, wodurch die Fluoreszenz gequenchet wird. Die Fluoreszenzemission sinkt. **B Repräsentative relative Veränderung der Fluoreszenzemission über die Zeit in Abhängigkeit von der Zugabe von AtNDGD1 und Nus.** Zusammensetzung der Liposomen: Links 100 % PC, rechts 75 % PC 25 % PA. **B Veränderung der Fluoreszenzemission nach 600 s.** Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Pro Versuch wurden $650 \text{ nmol Lipid mL}^{-1}$ mit einem Verhältnis von Protein zu Lipid von 1:1000 verwendet. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden relativ auf die Fluoreszenz direkt nach der Zugabe des Proteins (Start) bezogen.

3.4 Überexpression von AtNDGD1 in *A. thaliana*

In der Studie von *Froehlich et al.* (2001) konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich (M¹-E³³⁸, NDGD1, 38 kDa) des DGD1-Proteins aus Arabidopsis für die Insertion des gesamten Proteins in die äußere Hüllmembran des Chloroplasten notwendig ist. Die Enzymaktivität des rekombinanten AtCDGD1-Proteins war unabhängig von AtNDGD1 (*Kelly et al.*, 2016) (s. auch Kapitel 3.2). Um Hinweise auf die Funktion von AtNDGD1 zu erhalten, wurden in der Doktorarbeit von Sandra Witt (2009) mehrere Arabidopsis-Linien generiert, die in dem WT-Col2 Hintergrund das AtNDGD1-Protein überexpressieren. Dazu wurde die AtNDGD1-cDNA in den binären Vektor pBINAR kloniert und Col2-Pflanzen mit diesem Konstrukt transformiert. Der Nachweis der erfolgreichen Überexpression in den selektierten transgenen Linien erfolgte über Northern sowie Western Blot. Diese transgenen Pflanzen zeigen ein verändertes Wachstum mit kleinen buschigen Pflanzen (Abbildung 31). Im Vergleich zu der *dgd1-1*-Mutante sind die AtNDGD1-Überexpressionslinien aber größer und die Blätter grüner. Zur Aufklärung des Ursprungs des Phänotyps wurde der Lipid- und Chlorophyllgehalt sowie die Quantenausbeute des PSII bestimmt. Zur Überprüfung, inwieweit die Akkumulation von AtNDGD1 in der äußeren Chloroplastenhüllmembran sich auf den Chloroplastenhabitus auswirkt, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt.

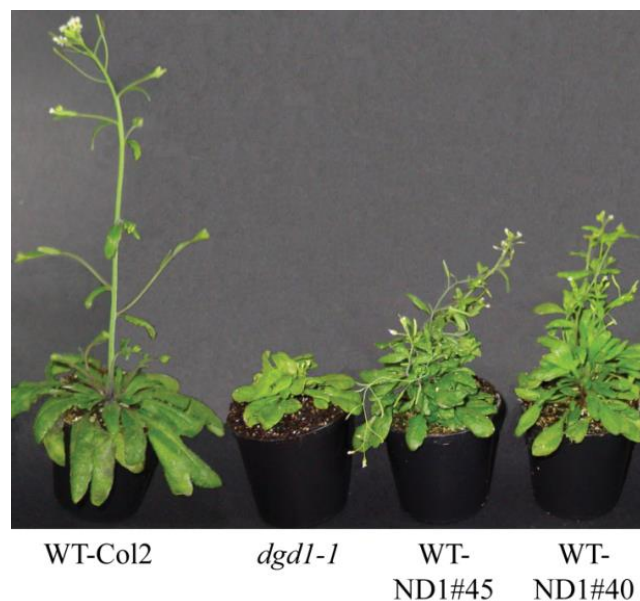


Abbildung 31: Die AtNDGD1-Überexpressionslinien (ND1#45 und ND1#40) im Vergleich zum WT (Col2) und der *dgd1-1*-Mutante. (Witt, 2009)

3.4.1 Quantifizierung der polaren Lipide sowie des Chlorophylls in AtNDGD1-Überexpressionslinien

Zur Überprüfung, ob die übermäßige Akkumulation von AtNDGD1 in der äußeren Hüllmembran sich negativ auf den pflanzlichen Lipidstoffwechsel auswirkt, wurden die Membranlipide der Überexpressionslinien mittels Q-TOF-MS quantifiziert. Des Weiteren wurde der Chlorophyllgehalt in den Blättern photometrisch bestimmt.

Die Quantifizierung der Lipide beider Überexpressionslinien erfolgte mittels Q-TOF-MS im Vergleich zum Wildtyp und der *dgd1-1*-Mutante. Es zeigte sich, dass bei beiden AtNDGD1-Überexpressionslinien (ND1#45 und ND1#40) der Anteil der plastidären Lipide MGDG, DGDG, SQDG und PG im Vergleich zum WT niedriger war (Abbildung 32A), und der Galaktolipidanteil im Vergleich zu der *dgd1-1*-Mutante erhöht war. Bezüglich der nicht-plastidären Phospholipide PS, PI, PE und PC konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Zusammensetzung der einzelnen molekularen Spezies von MGDG und DGDG unterschied sich nicht vom Wildtyp (Abbildung 32B), was bedeutet, dass die Konzentration der Galaktolipide abgesenkt wurde. Eine Akkumulation einzelner MGDG-Spezies vergleichbar zu der *dgd1-1*-Mutante (Dörmann *et al.*, 1995a; Härtel *et al.*, 2000) wurde nicht detektiert. Beide Überexpressionslinien wiesen zudem einen leicht geringeren Chlorophyllgehalt der Blätter im Vergleich zum WT auf (Abbildung 32C), wobei diese Reduktion, ähnlich wie bei den plastidären Membranlipiden, nicht so stark ausgeprägt war wie bei der *dgd1-1*-Mutante. Diese Ergebnisse deuten auf eine Reduktion der photosynthetischen Membranen hin. Ob sich diese Reduktion auf die photosynthetische Leistung der Pflanzen auswirkt, wurde mittels der PAM-Fluoreszenz Messung überprüft.

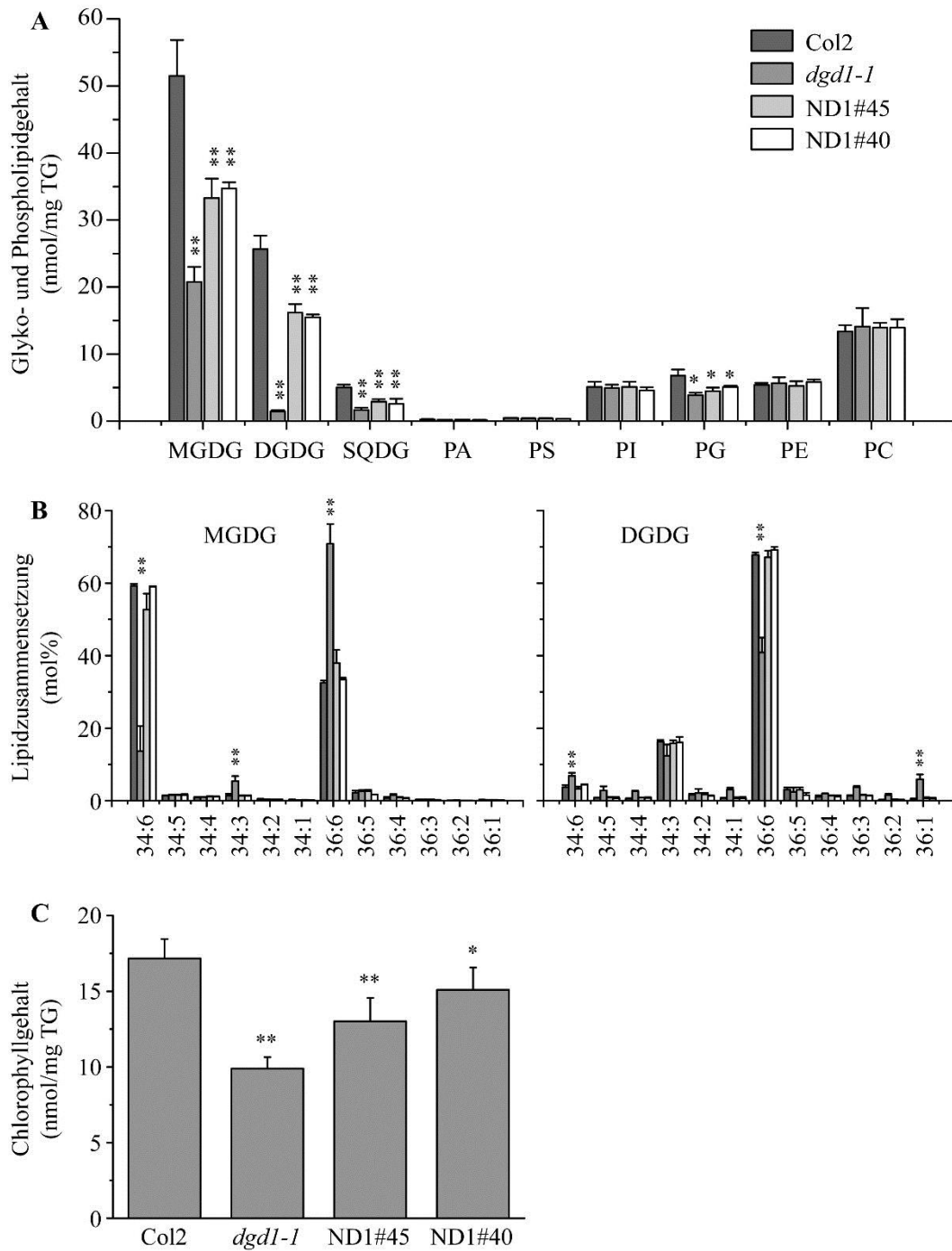


Abbildung 32: Quantifizierung der polaren Lipide sowie des Chlorophylls von Blättern in den AtNDGD1-Überexpressionslinien (ND1#45 und ND1#40). A Absoluter Lipidgehalt bezogen auf das TG B Zusammensetzung der Galaktolipide MGDG und DGDG in mol%. C Absoluter Chlorophyllgehalt (Chlorophyll a + b) bezogen auf das TG.

A, B Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Messungen. C Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 17 unabhängigen Messwerten.

Sternchen kennzeichnen Messwerte, die sich signifikant vom Wildtyp unterscheiden (Welch's t-Test, $P < 0,05$ (*), $P < 0,02$ (**))

3.4.2 Maximale Quantenausbeute des PSII von AtNDGD1-Überexpressionslinien

Die Erfassung der photosynthetischen Quantenausbeute des PSII, als Maß für die Funktionalität der Photosynthese, erfolgte mittels des sogenannten PAM-Fluorometers über die Sättigungspuls-Analyse. Direkt vor der Messung wurden die Pflanzen zunächst für 20 min einer Lichtintensität von 0 (d.h. völlige Dunkelheit), 500 sowie 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ausgesetzt. Wie in Abbildung 33 zu sehen, zeigten alle vier Pflanzenlinien (WT, *dgd1-1*, ND1#45 und ND1#40) nach Dunkeladaptation vergleichbare F_v/F_m -Werte. Dagegen war unter Lichtstress (500 und 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) die verminderte photochemische Quantenausbeute der *dgd1-1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eindeutig zu erkennen (s.a. Dörmann *et al.* (1995a)). Im Gegensatz dazu war F_v'/F_m' bei beiden Überexpressionslinien unter diesen Bedingungen vergleichbar zum Wildtyp. Die verminderte Konzentration der plastidären Lipide sowie des Chlorophylls hat somit keine Auswirkung auf die Quantenausbeute von PSII der AtNDGD1-Überexpressionslinien. Folglich wird die optimale photosynthetische Quantenausbeute von PSII nicht durch eine verminderte Anzahl der photosynthetischen Membranen beeinträchtigt.

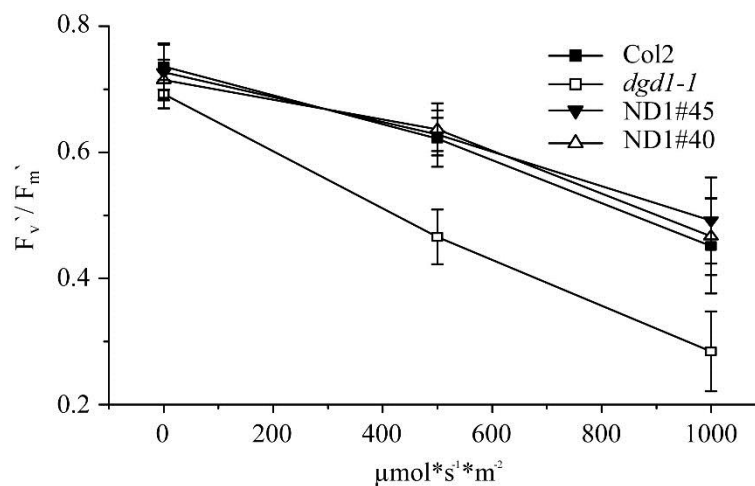


Abbildung 33: Maximale photosynthetische Quantenausbeute des PSII der AtNDGD1-Überexpressionslinien ND1#45 und ND1#40 unter verschiedenen Belichtungsintensitäten (angegeben in $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). F_v'/F_m' = Maximale photochemische Quantenausbeute unter der jeweiligen Belichtung. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 24 bis 31 Replika.

3.4.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Chloroplasten von AtNDGD1-Überexpressionslinien

Die in den vorangegangenen Messungen beobachtete Verringerung der plastidären Lipide sowie des Chlorophylls in den Überexpressionslinien (Abbildung 32), lässt vermuten, dass die plastidären Membranen im Vergleich zum Wildtyp reduziert sind. Mögliche Ursachen für diese Reduktion sind erstens eine Verringerung der Anzahl der Chloroplasten und zweitens die Verringerung des Membrangehaltes pro Chloroplast. Die Akkumulation von AtNDGD1 in der äußeren Hüllmembran könnte zudem die Morphologie dieser Membran verändern. Zur Überprüfung der Chloroplastenzahl pro Zelle wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Pflanzenzellen angefertigt. Zur Abschätzung des Gehaltes an plastidären Membranen pro Chloroplast sowie zur Dokumentation einer möglichen Veränderung dieser Membranen, insbesondere der äußeren Hüllmembran, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Im Vergleich zum Wildtyp konnten mittels dieser Aufnahmen keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden, weder bei der Anzahl sowie Größe der Chloroplasten, noch dem Aufbau der Hüllmembranen sowie der Thylakoide (Abbildung 34). Somit sind die Unterschiede gering ausgeprägt und daher möglicherweise nur mittels der detaillierten Auswertung der elektronischen Aufnahmen bezüglich u.a. der Anzahl und Größe der Chloroplasten sichtbar zu machen. Die Chloroplasten der *dgd1-1*-Mutante hingegen zeigten die schon bekannten morphologischen Veränderungen mit einer reduzierten Anzahl von kleineren Plastiden mit gekrümmten sowie von dem plastidären Stroma separierten Thylakoiden (Dörmann *et al.*, 1995a).

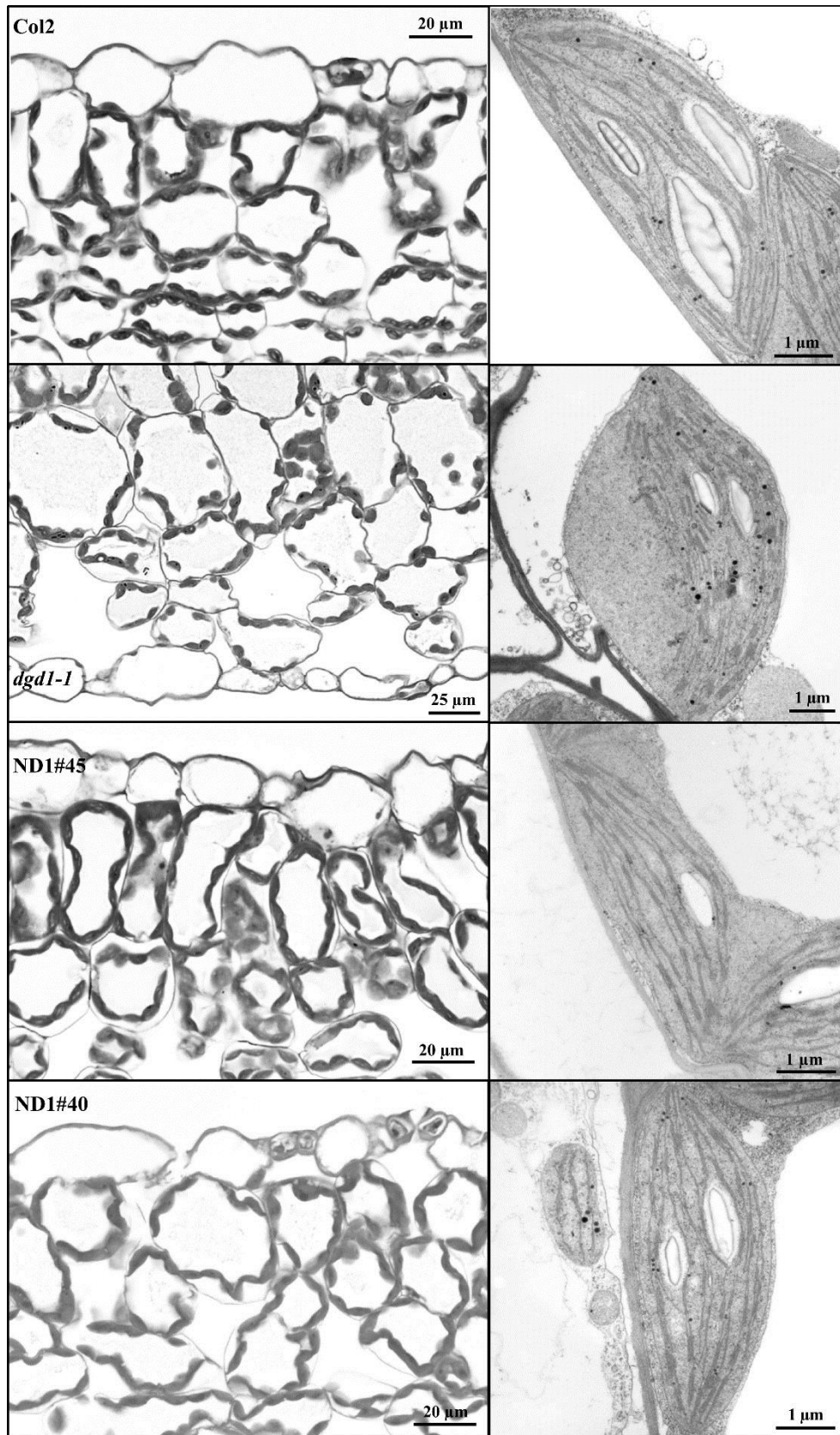


Abbildung 34: Morphologie der Blattzellen (links, Lichtmikroskopie) **und der Chloroplasten** (rechts, Elektronenmikroskopie) **der NDGD1-Überexpressionslinien ND1#45 und ND1#40** im Vergleich zum Wildtyp (Col2) und der *dgd1-1*-Mutante. Repräsentative Abbildungen. Vergrößerung wie angegeben. Die Probenaufbereitung sowie die Aufnahmen erfolgten durch Michael Melzer (IPK Gatersleben). Die Kontrastierung der biologischen Membranen erfolgte durch Osmiumtetroxid.

3.5 Bioinformatische Charakterisierung von AtNDGD1 mit Hilfe von Strukturvorhersagen und phylogenetischen Analysen

3.5.1 I-TASSER

Über den Online-Server I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang *et al.*, 2015) wurde nach Informationen zu der möglichen Struktur sowie Funktion von AtNDGD1 gesucht. Dieser Server vergleicht die Sekundärstruktur der Vorlage (Proteinsequenz) mit Proteinen mit bekannter Sekundär- und Tertiärstruktur aus der PDB-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Über dieses sogenannte „Threading“ erstellt der Server einzelne Strukturfragmente der Vorlage, die dann zu mehreren Modellen zu der Tertiärstruktur des gewünschten Proteins zusammengesetzt werden. Über weitere Algorithmen werden Funktionen, Liganden-Bindungsstellen sowie die Lokalisierung vorhergesagt. Zu jeder Vorhersage werden Wahrscheinlichkeitswerte herausgegeben, die über die Qualität dieser Vorhersage informieren.

In Abbildung 35 sind die besten 4 der durch I-TASSER eingesetzten Vorlagen zum Threading mit AtNDGD1 gezeigt. Alle der vorhergesagten Proteinstrukturen für AtNDGD1 sind zusammengesetzt aus mehreren aufeinander folgenden α -Helices bzw. Coiled-Coil- (deutsch: Doppelwendel-) Strukturen. Alle Proteine der gezeigten besten 4 der Threading-Vorlagen (Abbildung 35) sind assoziiert mit biologischen Membranen. TIC110 (4bm5A) ist eine Untereinheit des TIC- (Translocon der inneren Chloroplastenhüllmembran) Komplexes (Tsai *et al.*, 2013) Dieser Komplex ist an dem Proteinimport vom Cytosol oder ER in den Chloroplasten beteiligt. Die Bro1 V Domäne (4jiaA) ist die mittlere Domäne des Bro1-Proteins von Hefe (Pashkova *et al.*, 2013; Bissig and Gruenberg, 2014). Bro1 selbst ist eine Komponente des ESCRT-Komplexes welcher den Transport der ubiquitinierten Proteine in die späten Endosomen reguliert. LegC3 (4mu6A) aus *Legionella pneumophila* sowie EspB (4wj1A) aus *Mycobacterium tuberculosis* sind beides sogenannte Effektorproteine, die entweder die Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen verhindern oder die Phagosomen direkt beschädigen (Yao *et al.*, 2014; Solomonson *et al.*, 2015).

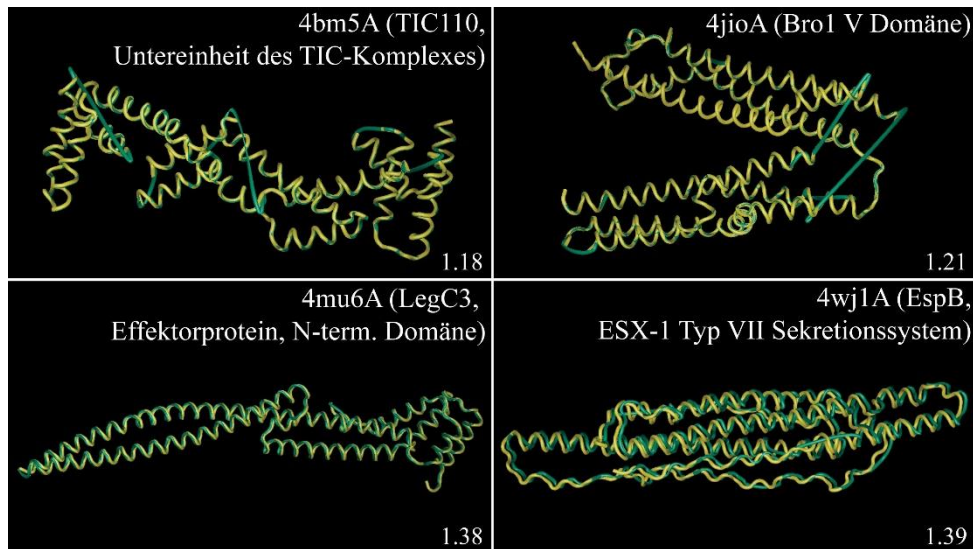


Abbildung 35: I-TASSER: Die besten 4 der Threading-Vorlagen für AtNDGD1. Jeweils gezeigt sind die Strukturvorlagen in gelb und die entsprechende Strukturvorhersage für AtNDGD1 in grün. 4bm5A: TIC110, Untereinheit des Proteintransportkomplexes der inneren Hüllmembran des Chloroplasten (TIC-Komplex). 4jioA: V Domäne des Bro1-Proteins von Hefe. 4mu6A: N-terminale Domäne von LegC3, eines Effektorproteins aus *Legionella pneumophila*. 4wj1A: EspB, ESX-1 Typ VII Sekretionssystem von *Mycobacterium tuberculosis*. Die Ziffern entsprechen dem jeweiligen Z-Wert, wobei Werte >1 auf ein gutes Alignment zwischen der Vorlage und der Vorhersage deuten.

3.5.2 Phylogenetische Analysen

Mit dem Ziel der Erfassung des evolutionären Ursprungs von NDGD1 bzw. der Glykosyltransferase-domänen der beiden DGDG-Synthasen (CDGD1 und DGD2) von *Arabidopsis* wurden phylogenetische Studien durchgeführt. Über die drei Online-Server NCBI-BLAST, Cyanophora und Kazusa (Kasuz DNA Research Institut) wurde dafür nach homologen Aminosäuresequenzen mit (DGD1-homolog) oder ohne (CDGD1- bzw. DGD2-homolog) NDGD1 gesucht. Die Sequenzen der DGDG-Synthasen folgender Organismen wurden in den Sequenzvergleich mit einbezogen: *Chondrus crispus* und *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta), *Bathycoccus prasinus*, *Micromonas sp* und *Ostreococcus tauri* (Prasinophytae, Chlorophyta), *Auxenochlorella protothecoides*, *Chlorella variabilis* und *Coccomyxa subellipsoidea* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri f nagariensis* (Chlorophyceae, Chlorophyta), *Klebsormidium flaccidum* (Charophyta), *Physcomitrella patens* (Bryophyta), *Selaginella moellendorffii* (Lycopodiophyta), *Oryza sativa* (Monokotyledonae) sowie *Arabidopsis thaliana* (Dikotyledonae). Die zu NDGD1 ähnlichen Sequenzen wurden getrennt von den Glykosyltransferasedomänen (CDGD1- und DGD2-homolog) einander gegenüber gestellt. Wie in Abbildung 37 zu sehen, enthalten alle Organismen der höheren Pflanzen zumindest eine DGDG-Synthase mit der für DGD1 charakteristischen NDGD1-Sequenz. Innerhalb der Streptophyta, insbesondere bei den Landpflanzen, ist die NDGD1-Proteinsequenz hoch konserviert. Die N-terminale Extension der DGD1-Proteine der Algen, die in dieser Studie mit einbezogen wurden, zeigten untereinander sowie auch zu NDGD1 der Streptophyta einen geringeren Verwandtschaftsgrad.

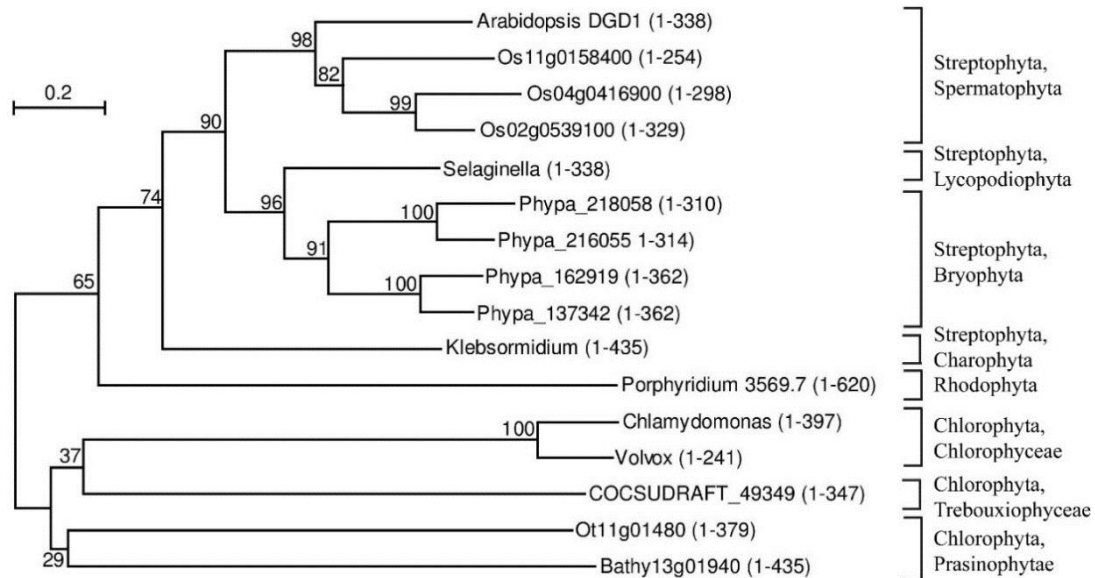


Abbildung 36: Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum (Neighbor-joining Algorithmus) der NDGD1-Sequenzen aus ausgewählten Vertretern der Grün- und Rotalgen sowie der Streptophyta.

Die positionelle Verteilung der jeweiligen Domänen anhand der Aminosäuren ist in den Klammern angegeben.

Bei den Rot- und Grünalgen kann keine evolutionär begründete Verteilung beider DGDG-Synthasen vorhergesagt werden; während einige Arten nur jeweils eine der DGDG-Synthasen aufweisen (DGD1 [z.B. *C. reinhardtii*] oder DGD2 [z.B. *C. crispus*]) enthalten andere Arten beide (z.B. *C. subellipsoidea*) (Abbildung 37). Auffällig ist, dass die Glykosyltransferasedomänen der DGDG-Synthasen der in dem Vergleich einbezogenen Organismen untereinander höher konserviert sind, als die dazugehörigen NDGD1-Sequenzen (Abbildung 36).

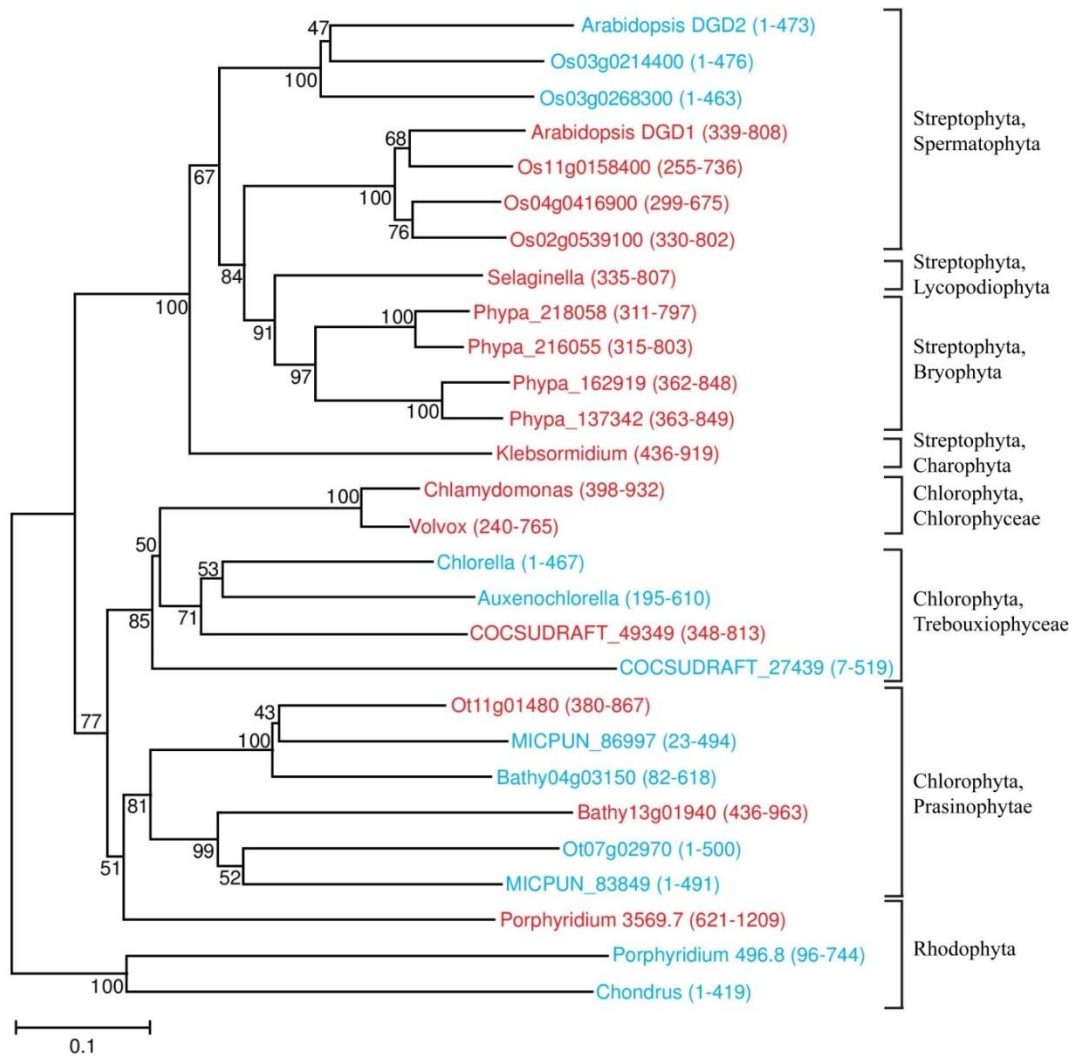


Abbildung 37: Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum (Neighbor-joining Algorithmus) der CDGD1- und DGD2-Sequenzen aus ausgewählten Vertretern der Grün- und Rotalgen sowie der Streptophyta.

Zu AtCDGD1 homologe Sequenzen sind rot und zu AtDGD2 homologe Sequenzen sind blau markiert.

Die positionelle Verteilung der jeweiligen Domänen anhand der Aminosäuren ist in den Klammern angegeben.

Über die verwendeten Server konnten außerhalb des Pflanzenreiches keine zu AtNDGD1 homologen Sequenzen gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle der DGDG-Synthasen bei der Umstrukturierung der Lipidzusammensetzung unter Phosphatmangel

Aufgrund der Limitierung von verwertbarem Phosphat in vielen Böden haben Landpflanzen diverse Anpassungsstrategien an diese Stressbedingung entwickelt. Eine dieser Anpassungsstrategien ist die Reduktion des Gehalts an Phospholipiden und deren Ersatz durch die Glykolipide DGDG, SQDG und GlcADG. Eine charakteristische Stressantwort auf Phosphatmangel ist die Aktivierung des zweiten Galaktolipidbiosyntheseweges, in dem MGD2, MGD3 sowie DGD2 involviert sind. Die beiden Hauptspezies des DGDGs, welche durch diesen Biosyntheseweg produziert werden, sind 18:3/18:3- sowie 16:0/18:3-DGDG. Damit unterscheidet es sich von DGDG, welches von DGD1 synthetisiert wird, das sich in erster Linie aus 18:3/18:3- und zu einem kleineren Anteil aus prokaryotischem 18:3/16:0-DGDG zusammensetzt (Härtel *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2003). Wie bei DGD2 wird auch die Expression von DGD1 unter Phosphatmangel hochreguliert. Unter Phosphatmangel dient das durch DGD1 produzierte DGDG als Ersatz für die plastidären Phospholipide (PC und PG). Ob Störungen innerhalb der DGDG-Synthese sich auch auf den Flux der anderen Lipide unter Phosphatmangel auswirken, sollte in dieser Arbeit mittels der Lipidanalytik der DGDG-Synthasemutanten *dgd1-1*, *dgd2-1* und *dgd1-1 dgd2-1* überprüft werden. Übereinstimmend mit den Daten vom Kelly *et al.* (2003), konnte auch bei den Lipidmessungen in dieser Arbeit unter Phosphatmangel ein Anstieg des DGDGs mit einer gleichzeitigen Senkung der Konzentration an Phospholipiden (Abbildung 9 und Abbildung 10) im Wildtyp und den Mutanten beobachtet werden. Die Aktivierung des zweiten Biosyntheseweges im WT sowie in *dgd1-1* ist deutlich an der Akkumulation von 34:3 (16:0/18:3) - DGDG zu erkennen (Härtel *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2003). Aufgrund der Mutation des DGD2-Lokus bleibt diese Akkumulation in *dgd2-1* sowie der Doppelmutante aus, was zur Folge hat, dass die Konzentration von 34:3 (16:0/18:3) - MGDG ansteigt (Kelly *et al.*, 2003). Die drastische Verringerung des DGDG-Gehaltes ist in *dgd1-1* im Vergleich zu Wildtyp bei +P mit gleichzeitiger Akkumulation des eukaryotischen MGDGs zu erkennen (Dörmann *et al.*, 1995a). Der Phosphatmangel hat zur Folge, dass der Anteil der Spezies mit einer 16C-Fettsäure in den Phospholipiden zum Teil drastisch abnimmt. Die gleiche Tendenz wurde auch in der Studie von Pant *et al.* (2015) beobachtet. Ob die relative Abnahme des Anteils der 34:x-Phospholipide z.B. durch eine Selektivität der involvierten Phospholipasen verursacht wird, sollte in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Unterschiedlich Stressbedingungen führen zu der Akkumulation von TAG in den Blättern der Pflanzen (Sakaki *et al.*, 1990b; Moellering *et al.*, 2010; Lippold *et al.*, 2012; Pant *et al.*, 2015). In dieser Arbeit wurde die Anreicherung des TAGs unter Phosphatmangel sowie dessen Zusammensetzung in den DGDG-Synthasemutanten untersucht. Wie auch von Pant *et al.* (2015) gezeigt werden konnte, führte der Phosphatmangel zu der Anreicherung des TAGs in den Blättern (Abbildung 11). Im Vergleich zum

Wildtyp akkumulieren die DGDG-Synthesemutanten unter Phosphatmangel bis zu der dreifachen Menge an TAG. Die Zusammensetzung des unter Phosphatmangel synthetisierten TAGs in den DGDG-Synthesemutanten unterscheidet sich vom Wildtyp wie auch untereinander, wie durch die Q-TOF MS/MS Messungen ersichtlich wurde (Abbildung 12). Im WT akkumulieren in erster Linie 52:x- und 54:x-TAGs (beide TAG-Gruppen zu jeweils etwa 30 mol%) und in kleineren Mengen 50:x-TAGs (ca. 15 mol%). Eine ähnliche Verteilung des TAGs konnte über die MS/MS-Messung auch in der *dgd1-1*-Mutante beobachtet werden. In der *dgd2-1*-Mutante hingegen reichern sich in hohen Mengen 54:x-TAGs (ca. 80 mol%) und in geringeren Mengen 52:x-TAGs (ca. 10 mol%) an. Für *dgd1-1 dgd2-1* ist eine Tendenz zu erkennen, dass mehr 48:x-TAGs als im Wildtyp akkumulieren. Die Q-TOF MS/MS Messungen konnten über die jeweilige Fettsäurezusammensetzung, jedoch nicht über die *sn*-Konfiguration des TAGs Auskunft geben, da im positiven MS/MS-Messmodus nicht zwischen den einzelnen Isomeren unterschieden werden kann. Um herauszufinden, ob die TAGs von prokaryotischen oder eukaryotischen Vorläufern abstammen, wurde ein neuer Ansatz für die Analytik der *sn*-Konfiguration der TAGs in den Blättern gewählt. Hierfür wurde das Messprinzip von Byrdwell *et al.* (2005) verwendet. Die aus den Blättern der Pflanzen isolierten TAGs wurden hierfür zunächst zur Vereinheitlichung der Fettsäurekomposition hydriert. Im Vergleich zu TAGs mit bekannter Molekülstruktur wurde anhand des Fragmentierungsmusters die Zusammensetzung der prokaryotischen und eukaryotischen TAGs relativ zueinander in den 50:x- und 52:x-TAGs rechnerisch bestimmt. Hierbei liegt das Prinzip zugrunde, dass die Fettsäuren an der *sn1*- und *sn3*-Positionen leichter abgespalten werden als die an der *sn2*-Position. Diese Methode wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal bei dem unter Phosphatmangel akkumulierten TAGs aus Blättern angewendet. Wegen Mangels an Blattmaterial von der *dgd1-1 dgd2-1* Doppelmutante wurde mittels dieser Methode jedoch nur TAG aus dem WT sowie der *dgd1-1*- und *dgd2-1*-Mutante analysiert. Die 52:x-TAGs im WT und *dgd2-1* stammen zu 80% von eukaryotischen und zu 20 % von prokaryotischen Vorstufen ab, während die 52:x-TAGs in *dgd1-1* ausschließlich eukaryotisch sind (Abbildung 13). Bezüglich der 50:x-TAGs konnten interessante Unterschiede gezeigt werden. 50:x-TAG von *dgd1-1* setzt sich zu etwa 60 % aus eukaryotischen Spezies (16:0/18:x/16:0) und 40 % prokaryotischen Spezies (16:0/16:0/18:x) zusammen. 50:x-TAGs im Wildtyp wie auch in der *dgd2-1*-Mutante haben jedoch, verglichen mit *dgd1-1*, einen viel höheren Anteil der prokaryotischen 50:x-TAG Spezies (60-80 %). Der Anteil des prokaryotischen TAGs an dem gesamten TAG ist jedoch insbesondere in *dgd2-1* nur gering, da die 50:x-TAGs nur einen kleinen Anteil an den gesamten TAGs ausmachen.

Obwohl vermutlich der Großteil des über den Abbau der extraplastidären Phospholipide gewonnenen DAGs in die Produktion von eukaryotischen DGDG übergeht, wird somit auch ein gewisser Anteil über die im ER lokalisierten Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferasen (DGAT1 und DGAT2) oder die Phospholipid: Diacylglycerol Acyltransferase (PDAT1) im WT, *dgd1-1* sowie *dgd2-1* zu eukaryotischem TAG umgesetzt (Yen *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2013). Während die extraplastidäre TAG-

Biosynthese weitestgehend aufgeklärt ist, ist unklar, ob prokaryotisches TAG in den Chloroplasten synthetisiert wird oder dessen Vorläufer für die TAG-Biosynthese zum ER transportiert werden. Jedoch konnten in Lippold *et al.* (2012) Hinweise zu einer möglichen Beteiligung von zwei Phytylester-Synthasen (PES1 und PES2) an der plastidären TAG-Biosynthese gegeben werden.

Die Beteiligung von SFR2 an der Synthese der Galaktolipide sowie des TAGs in den DGDG-Synthasemutanten unter Phosphatmangel ist unwahrscheinlich. SFR2 überträgt den Zucker von MGDG auf ein weiteres Galaktolipid, wodurch ein Oligogalaktolipid und DAG entsteht (Moellering *et al.*, 2010). Das DAG entspricht der Fettsäurezusammensetzung des MGDGs. Wenn angenommen werden kann, dass zumindest ein Teil des DAGs in die TAG-Biosynthese übergeht, müsste ein erheblicher Anteil des TAGs im Wildtyp oder den DGDG-Synthasemutanten 16:3 enthalten. Dies ist jedoch nicht der Fall.

4.2 Die Substratspezifitäten der DGDG-Synthasen

Die Fettsäurezusammensetzung des DGDGs in 16:3-Pflanzen wie Arabidopsis ist wie auch im Kapitel 3.1 beschrieben deutlich verschieden von der Fettsäurezusammensetzung von MGDG (Abbildung 10). Wodurch die Akkumulation der eukaryotischen Spezies im DGDG hervorgerufen wird, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Heterolog in *E. coli* synthetisiertes AtDGD1-Protein zeigt nur eine geringe Aktivität. Aufgrund der zu niedrigen Sensitivität der bisher verwendeten Methoden zur Messung des DGDGs konnte die Substratspezifität des DGD1-Proteins nicht bestimmt werden. Innerhalb dieser Arbeit konnte nun zum ersten Mal die enzymatischen Charakteristika beider DGDG-Synthasen mit Hilfe der hochsensitiven Q-TOF MS analysiert werden.

In den Vorversuchen zu der Etablierung der optimalen Konditionen für den Enzymtest mit in *E. coli* heterolog expremiertem Protein zeigte sich, dass die Aktivität beider DGDG-Synthasen (AtCDGD1, AtDGD2) von der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen, insbesondere Mg^{2+} , abhängig ist (Abbildung 15). Für die Aktivität der meisten Glycosyltransferasen, die Nucleosiddiphosphat-Zucker (wie UDP-Gal) als Zuckerdonoren verwenden, ist die Präsenz von zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} oder auch Mn^{2+} entscheidend (Lairson *et al.*, 2008). Die Anlagerung dieser Kationen an die Phosphatgruppen des Nucleosiddiphosphat-Zuckers führt zu einer leichteren Abspaltung des aktivierten Zuckers während des nukleophilen Angriffes des Enzyms sowie des Akzeptormoleküls.

In den Vorversuchen sowie in den nachfolgenden Enzymtests zeigte sich deutlich, dass AtCDGD1 sensitiver auf Veränderungen der Testbedingungen reagierte als AtDGD2. Beispielsweise ist das pH-Optimum von AtCDGD1 nur schmal (zwischen 7,5 und 8,0), AtDGD2 ist hingegen in dem pH-Bereich zwischen 6,5 und 9,5 hoch aktiv (Abbildung 16). Auch die Aktivität von AtDGD2 ist durchschnittlich

um den Faktor 100 höher als bei AtCDGD1. Womöglich ist die Struktur des heterolog exprimierten AtCDGD1-Proteins instabiler als die von AtDGD2, wodurch die Aktivität beeinflusst wird.

Innerhalb dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass AtCDGD1 eine ausgeprägte Präferenz für eukaryotisches 36:6-MGDG zeigt, wenn AtCDGD1 eine Mischung aus 34:6- und 36:6-MGDG angeboten wird (Abbildung 17 und Abbildung 38). Wenn AtCDGD1 hingegen nur eukaryotisches 36:6-MGDG, welches aus der 18:3-Pflanze *Pisum sativum* isoliert wurde, angeboten wurde, war die Aktivität vergleichbar wie für die 34:6-/36:6-MGDG-Mischung aus Spinat (Abbildung 19). 34:6-MGDG wird somit nur in geringen Mengen als Substrat von AtCDGD1 akzeptiert. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass die Glykosyltransferaseaktivität von AtCDGD1 nicht kompetitiv von 34:6-MGDG inhibiert wird. Um den Umsatz von reinem prokaryotischen MGDG zu untersuchen, wurde MGDG von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* isoliert. Dieses enthält hauptsächlich 18:3/16:4-Spezies. MGDG von *Chlamydomonas* wird noch schlechter als Substrat von AtCDGD1 akzeptiert im Vergleich zu prokaryotischem MGDG aus der Mischung von Spinat (18:3/16:3, Abbildung 17). Die Veränderung der Struktur durch die vierte Doppelbindung in der 16C-Fettsäure von 18:3/16:4-MGDG könnte die Bindung an die Glykosyltransferasedomäne der DGDG-Synthase beeinträchtigen und somit zu dem geringen Umsatz führen.

DGDG von Arabidopsis enthält zu einem kleinen Anteil (~ 17 mol%) prokaryotische molekulare Spezies, die 16C-Fettsäure an der *sn2*-Position ist hier aber im Vergleich zu MGDG gesättigt (Kelly *et al.*, 2003). Mittels des *in vitro* Enzymtests wurde nun die enzymatische Aktivität für 18:3/16:0-MGDG überprüft. Das entsprechende MGDG wurde aus der Arabidopsis Mutante *fad5* isoliert. Die Desaturase FAD5 initiiert die Desaturierung der 16C-Fettsäure des prokaryotischen MGDGs durch die Insertion der ersten Doppelbindung in die Kohlenstoffkette an Position $\Delta 7$ (Kunst *et al.*, 1989; Heilmann *et al.*, 2004). Prokaryotisches MGDG von *fad5* ist somit einzig aus 18:3/16:0-Spezies zusammengesetzt. Die beobachtete hohe Aktivität von AtCDGD1 für 18:3/16:0-MGDG zeigt (Abbildung 18), dass für die Substraterkennung der Desaturierungsgrad der 16C-Fettsäure entscheidend ist. Wahrscheinlich wird *in planta* durch die Desaturierung des MGDGs durch FAD5 die Produktion von prokaryotischen DGDG herabgesetzt, da MGDG mit einer desaturierten 16C-Fettsäure kein Substrat mehr für die DGDG-Produktion ist (Abbildung 38).

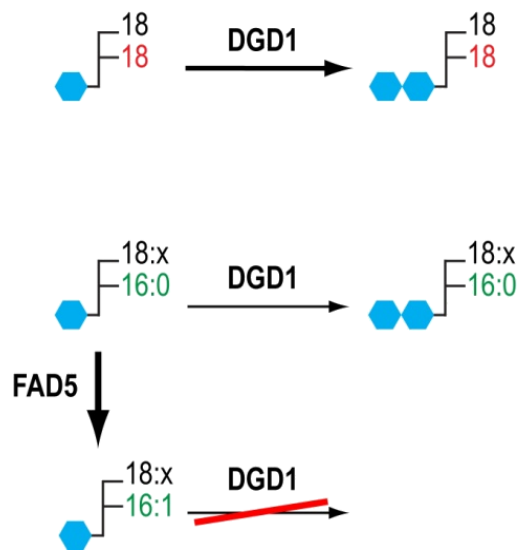


Abbildung 38: Substratspezifität von AtDGD1. AtDGD1 bevorzugt eukaryotisches 18:x/18:x-MGDG. Der Hauptanteil von 16:0 an der *sn2*-Position des prokaryotischen MGDGs wird durch FAD5 desaturiert. Das durch FAD5 desaturierte MGDG ist jedoch kein Substrat mehr für AtDGD1.

Die Fettsäuren von *E. coli* enthalten höchstens eine Doppelbindung und weisen somit einen höheren Sättigungsgrad auf als die Hauptspezies der Lipide der Pflanzen. Unter der Annahme, dass DGD1 für die Galaktosylierung ein Substrat mit niedrigem Desaturierungsgrad bevorzugt, wurde deshalb für den Enzymtest MGDG aus einer *E. coli*-Kultur isoliert, die MGD1 von *Cucumis sativa* heterolog expremiert. Bei der Analyse des synthetisierten DGDGs konnte jedoch keine eindeutige Präferenz für eine oder mehrere Spezies beobachtet werden (Abbildung 18). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nur ein kleiner Anteil der in *E. coli* produzierten MGDG-Spezies auch in Pflanzen vorkommt (34:2 und 34:1). PE ist das häufigste Phospholipid von *E. coli* (sein Anteil an den Membranlipiden kann bis zu 75 mol% ausmachen) (Sohlenkamp and Geiger, 2016). Somit ist es recht wahrscheinlich, dass das in *E. coli* durch MGD1 synthetisierte MGDG der *sn*-Konfiguration des bakteriellen PEs entspricht. 34:2-PE trägt an der *sn1*-Position 18:1 Δ 11 und an der *sn2*-Position 16:1 Δ 9 (Ekroos *et al.*, 2002; Feng and Cronan, 2009). 34:1-PE kann entweder als 18:0/16:1 Δ 9-PE oder auch 16:0/18:1 Δ 11-PE vorliegen. Wenn man davon ausgeht, dass das MGDG die gleiche Fettsäurezusammensetzung in *E. coli* hatte wie PE, lag die an *sn2* gebundene 16C-Fettsäure in erster Linie in ihrer einfach ungesättigten Form vor. Diese zusätzliche Doppelbindung im Vergleich zu 16:0/18:3-MGDG könnte sich auf die Aktivität der DGDG-Synthasen negativ auswirken. Auch befindet sich diese Doppelbindung an einer anderen Position als in Pflanzen. Somit ist fraglich, ob das hier verwendete Substrat für die Aktivität der pflanzlichen DGDG-Synthasen überhaupt relevant ist.

Im Gegensatz zu AtCDGD1 zeigte AtDGD2 eine geringer ausgeprägte Präferenz für das eukaryotische 18:3/18:3-MGDG, wenn MGDG aus Spinat für den Enzymtest verwendet wurde. Ähnlich wie

AtCDGD1 setzte AtDGD2 18:3/16:4-MGDG aus *Chlamydomonas* nur in geringen Mengen um, wahrscheinlich ebenfalls aufgrund der zusätzlichen Doppelbindung. Interessanterweise zeigte AtDGD2 im Gegensatz zu AtCDGD1 keine Präferenz für 18:3/16:0-MGDG aus *fad5*, was bekräftigt, dass prokaryotisches MGDG in *planta* kein Substrat dieser DGDG-Synthase ist (Härtel *et al.*, 2000). Die in den Enzymtests beobachtete geringe Präferenz von AtDGD2 für das eukaryotische (18:3/18:3-MGDG) oder prokaryotische (18:3/16:3- oder 18:3/16:0-MGDG) Substrat stimmt mit den Ergebnissen von Amélie Kelly (2002) überein. Für ihre Studie verwendete sie MGDG vom Arabidopsis WT, welches wie zuvor beschrieben zu einem großen Anteil in der prokaryotischen Form (18:3/16:3-MGDG) vorliegt (Browse *et al.*, 1986). Als weiteres Substrat verwendete sie MGDG aus der Mutante der Acyl-ACP:Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase *act1* (Synonym: *ats1*), in der durch den gestörten prokaryotischen Syntheseweg die Galaktolipide nur in der eukaryotischen Form (18:3/18:3-MGDG) vorliegen (Kunst *et al.*, 1988). In beiden Experimenten konnte sie einen ähnlichen Umsatz beider Substrate durch AtDGD2 feststellen. Ihre sowie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass AtDGD2, im Gegensatz zu AtCDGD1, keine ausgeprägte Präferenz für eukaryotisches MGDG aufweist.

Awai *et al.* (2001) studierten die Substratspezifität von rekombinanten AtMGD1-, AtMGD2- und AtMGD3-Proteinen von Arabidopsis. Ähnlich wie die DGDG-Synthasen sind die drei MGDG Synthasen in der Lage, sowohl prokaryotisches als auch eukaryotisches Substrat umzusetzen. Interessanterweise zeigte die Haupt-MGDG-Synthase AtMGD1 keinerlei Präferenz, während AtMGD2 und AtMGD3 eine höhere Aktivität mit dem eukaryotischen Substrat (in diesem Fall 18:2/18:2-DAG) aufwiesen. Mit Hilfe dieser Ergebnisse sowie der Ergebnisse aus den DGDG-Synthase-Enzymtests dieser Arbeit kann nun ein Modell zu der Synthese der Galaktolipide entwickelt werden. AtMGD1 produziert in dem ersten Schritt des Hauptbiosyntheseweges der Galaktolipide aufgrund ihrer Unspezifität in etwa gleichen Mengen prokaryotisches und eukaryotisches MGDG (abhängig von der Bereitstellung des Substrates). Ein Teil des eukaryotischen MGDGs wird nun in der äußeren Hüllmembran für die Synthese des eukaryotischen DGDGs durch AtDGD1 verwendet. Prokaryotisches MGDG wird von AtDGD1 hauptsächlich dann akzeptiert, solange es noch nicht von FAD5 desaturiert wurde. In dem zweiten Biosyntheseweg erfolgt die Selektion der eukaryotischen Spezies (18:x/18:x) wahrscheinlich hauptsächlich auf der Ebene von AtMGD2 und AtMGD3. Ob die unter Phosphatmangel typische Akkumulation des 16:0/18:3-DGDGs (Härtel *et al.*, 2000) durch die Spezifität von AtMGD2/AtMGD3 und/oder AtDGD2 begründet ist, wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

Ob wie bei den 16C-Fettsäuren auch der Desaturierungsgrad der 18C-Fettsäuren von MGDG die Aktivität der AtDGD1 beeinflusst, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Allgemein wird angenommen, dass sowohl prokaryotisches als auch eukaryotisches Substrat mit in erster Linie ein- oder zweifach desaturierten Fettsäuren für die Galaktolipidbiosynthese eingesetzt wird (Ohlrogge and Browse, 1995). Das Einfügen der zweiten und dritten Doppelbindung erfolgt dann auf dem Niveau des

Galaktolipides. Enzymtests mit 34:4- und 36:4- oder 34:2- und 36:2-MGDG aus den entsprechenden Desaturasemutanten von *Arabidopsis* könnten weitere Aufschlüsse zu der Substratspezifität der DGD1 geben. Beispielsweise könnte hierfür MGDG aus der *fad2-2 fad6* Doppelmutante verwendet werden, die nur Spuren an mehrfach desaturierten Fettsäuren aufweist (McConn and Browse, 1998). FAD6 ist eine plastidäre Desaturase, die die zweite Doppelbindung der an die Galaktolipide veresterten 16C- und 18C-Fettsäuren an Position $\omega 6$ einfügt. Ihr extraplastidäres Analog FAD2 desaturiert die an PC gebundene 18:1-Fettsäure. Ein weiteres interessantes Substrat wäre MGDG aus der *fad3-2 fad7-2 fad8* Tripelmutante. Über diese Mutationen wurde der letzte Desaturierungsschritt im prokaryotischen und eukaryotischen Biosyntheseweg ausgeschaltet, was, u.a. in den Glykolipiden, zu der Akkumulation von 16:2- und 18:2-Fettsäuren führt (McConn and Browse, 1996).

In *Arabidopsis* liegt UDP-Gal zu UDP-Glc in einem molaren Verhältnis von etwa 1 zu 3 vor (Dörmann and Benning, 1998). In einem weiteren Enzymtest sollte in dieser Arbeit überprüft werden, inwieweit UDP-Glc die Aktivität der DGDG-Synthasen von *Arabidopsis* beeinflusst und ob diese Enzyme auch UDP-Glc als Zuckerdonor akzeptieren können. Die Aktivität beider DGDG-Synthasen sank auf etwa 10-20 % (bezogen auf die Kontrolle), wenn allein UDP-Glc zu Verfügung stand (Abbildung 20). Somit wird UDP-Glc allenfalls bedingt als Donorsubstrat akzeptiert. In den Enzymtests wurde nicht mit gereinigtem Protein, sondern einem Rohextrakt der rekombinanten *E. coli*-Linien gearbeitet. Da mittels der Massenspektrometrie nicht zwischen Galaktose und Glukose unterschieden werden kann, ist fraglich, ob die verbleibende Aktivität tatsächlich der Umsatz von UDP-Glc ist, oder der an das Nucleosiddiphosphat gebundene Zucker mittels der UDP-Gal 4-Epimerase zuvor zu UDP-Gal umgewandelt wurde (Wilson and Hogness, 1964). Eine mögliche Kontamination der UDP-Glc mit UDP-Gal sollte auch in Betracht gezogen werden (Thorsoe *et al.*, 2005). Wurden in den Enzymtest Mischungen der beiden UDP-Zucker verwendet, führte dies zu der Reduktion der Aktivität um 20 bis 50 % bezogen auf die Kontrolle, obwohl UDP-Gal in der gleichen Konzentration wie in der Kontrolle eingesetzt wurde. Somit scheint UDP-Glc, womöglich kompetitiv, die Aktivität beider DGDG-Synthasen zu inhibieren.

In den Enzymtests mit rekombinanten Proteinen der DGDG-Synthasen der 18:3-Pflanze *Lotus japonicus* konnte beobachtet werden, dass LjCDGD1 im Vergleich zu AtCDGD1 aus *Arabidopsis* eine geringer ausgeprägte Präferenz für eukaryotisches MGDG zeigte (Abbildung 22). Womöglich hat LjDGD1 aufgrund der Abwesenheit des prokaryotischen MGDGs *in planta* im Laufe der Evolution die Spezifität für das eukaryotische Substrat verloren. Das durch LjDGD2 synthetisierte DGDG zeigte eine ähnliche Verteilung der Hauptspezies wie LjCDGD1. Verglichen mit DGDG welches von AtDGD2 synthetisiert wurde, hatte das durch LjDGD2 produzierte DGDG einen höheren Anteil des eukaryotischen 18:3/18:3-DGDGs. Ob diese höhere Selektivität von LjDGD2 auch innerhalb der Lipidbiosynthese von *Lotus* eine Rolle spielt, ist unklar.

4.3 PA-abhängige Membranmanipulation durch AtNDGD1

Inwieweit NDGD1 eine Funktion innerhalb der DGDG-Produktion der Pflanzen hat, konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden. Bis zu dieser Arbeit war nur bekannt, dass dieser Teil des Proteins für die Insertion von DGD1 in die äußere Hüllmembran des Chloroplasten notwendig ist (Froehlich *et al.*, 2001). In *in vitro* Studien mit in *E.coli* heterolog expremierten AtDGD1-, AtCDGD1- sowie AtNDGD1-Proteinen konnte gezeigt werden, dass AtNDGD1 keinen direkten Einfluss auf die Glykosyltransferaseaktivität von AtDGD1 hat (Kelly *et al.*, 2016). Komplementationstudien mit *dgd1-1* konnten jedoch Hinweise für die Essentialität von AtNDGD1 für die Akkumulation von DGDG in Pflanzen geben (Kelly *et al.*, 2016). Für diese Studien wurden mehrere Fusionskonstrukte hergestellt und in *dgd1-1* eingebracht. Die Expression des vollständigen AtDGD1-Protein (AtNDGD1AtCDGD1) führte wie zu erwarten zur Komplementation des *dgd1-1*-Phänotyps. Die Expression von AtDGD2 (ohne Transitpeptid) in Fusion mit AtNDGD1 führte ebenfalls zu einer Akkumulation von DGDG in den transgenen Linien. Das Transitpeptid von AtDGD2 (AtNDGD2), welches für die Lokalisierung von AtDGD2 in der äußeren Hüllmembran notwendig ist, wurde in einem weiteren Expressionskonstrukt mit AtCDGD1 fusioniert und in *dgd1-1* eingebracht. Die Expression von AtNDGD2-AtCDGD1 resultierte jedoch nicht in der Komplementation des *dgd1-1*-Phänotyps, obwohl die Glykosyltransferaseaktivität von AtCDGD1 hier ebenfalls in der äußeren Hüllmembran lokalisiert sein sollte. Ebenfalls führte die Expression des vollständigen AtDGD2-Proteins (mit Transitpeptid) nicht zu der Akkumulation von DGDG. Die Expression des N-Terminus von AtMGD1 (AtNMGD1) in Fusion mit AtCDGD1 oder AtDGD2 mit der resultierenden Fehllokalisierung der DGDG-Synthese in die innere Hüllmembran resultierte interessanterweise in Pflanzen mit zum Teil komplementiertem *dgd1-1*-Phänotyp. Zusammengefasst konnte nur in den Fällen die Komplementation des *dgd1-1*-Phänotyps beobachtet werden, wenn die DGDG-Synthese artifiziell in die inneren Hüllmembran lokalisiert wurde (mittels der Fusionskonstrukte mit AtNMGD1) oder AtCDGD1 und AtDGD2 in Fusion mit AtNDGD1 in *dgd1-1* expremiert wurden. AtNDGD1 spielt somit eine wichtige Rolle für die DGDG-Synthese in der äußeren Hüllmembran, womöglich durch seine Beteiligung an dem Transfer der Galaktolipide zwischen den Hüllmembranen.

DGD1-Proteine mit zu AtNDGD1 homologen Sequenzen kommen ubiquitär in allen Vertretern der Streptophyta vor (Abbildung 36). Auch in der Alge *Klebsormidium flaccidum*, einem Vertreter der Charophytae, eher primitiver Streptophyta, konnten zu AtNDGD1 homologe Sequenzen gefunden werden. Auch einige Vertreter der DGDG-Synthasen der hier untersuchten Grün- und Rotalgen weisen eine N-terminale Extension, ähnlich wie bei AtDGD1, auf. Die niedrigen Bootstrap-Werte an der Abzweigung zu den Streptophyta sowie auch an den Abzweigungen innerhalb der Algen indizieren aber einen minderen Verwandtschaftsgrad zu den entsprechenden Proteinen der Streptophyta. Außerhalb des Pflanzenreiches wie z.B. der Domäne der Prokaryota konnten keine zu AtNDGD1 homologen Sequenzen gefunden werden. Der Ursprung dieses Proteins ist somit unklar. Beide Hüllmembranen des

Chloroplasten stammen ursprünglich von dem Cyanobakterium ab, dass im Rahmen der Endosymbiontentheorie als Vorfahre der Chloroplasten gilt (Cavalier-Smith, 2000; Petroutsos *et al.*, 2014). Jedoch konnten hier ebenfalls keine verwandten Sequenzen gefunden werden. Auch DgdA, die DGDG-Synthase der Cyanobakterien, steht in keinerlei Verwandtschaftsverhältnis zu DGD1 (Awai *et al.*, 2007; Sakurai *et al.*, 2007). Zu DgdA verwandte Sequenzen konnten bis jetzt innerhalb des Pflanzenreiches nur in den Cyanidiales, einer Ordnung der Rhodophyta, sowie in dem Glaucophyt *Cyanophora paradoxa* nachgewiesen werden (Hori *et al.*, 2016). DgdA wurde in der inneren Membran des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 nachgewiesen (Selão *et al.*, 2014). In Arabidopsis ist die DGDG Synthese (DGD1) jedoch im äußeren Envelope lokalisiert. Daher erforderte die Einbettung des Endosymbionten in die Lipidbiosynthese der Wirtszelle, einhergehend mit dem Austausch von DgdA durch DGD1, die Entwicklung neuer Transfer-Mechanismen durch NDGD1 für die Verteilung von MGDG und DGDG zwischen den Hüllmembranen des Chloroplasten. Die Haupt-DGDG-Synthase der Streptophyta scheint im Laufe der Evolution durch N-terminale Fusionen mit Peptiden eine Art Neofunktion erhalten zu haben, die einzigartig ist. Die geringe Ähnlichkeit zwischen den N-terminalen Extensionen der DGDG-Synthasen der Streptophyta und der der in diese Studie einbezogenen Algen lässt vermuten, dass im Rahmen der Evolution diese Peptidfusionen in den Gruppen mehrfach unabhängig voneinander stattgefunden haben muss. Ob die N-terminale Extensionen der Algen auch die gleiche Funktion haben wie AtNDGD1 sollte in folgenden Studien erforscht werden.

Die Strukturvorhersagen mittels I-TASSER lassen darauf schließen, dass AtNDGD1 aus mehreren aufeinander folgenden α -Helices und Coiled-Coil-Domänen aufgebaut ist (Abbildung 35). Aussagen zu einer möglichen Tertiärstruktur dieses Peptides sind mit diesen Ergebnissen jedoch nicht möglich, da die Vorhersagen sich diesbezüglich stark unterscheiden. Alle Peptide der Top 4 der hier verwendeten Threading-Vorlagen sind wie wahrscheinlich auch AtNDGD1 mit biologischen Membranen assoziiert.

Über den Sequenzvergleich konnten innerhalb der NDGD1-Sequenz von Vertretern der Bryophyta und Kormophyta 3 höher konservierte Teilbereiche ermittelt werden (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>, Abbildung 39). Diese Teilsequenzen enthalten eine hohe Anzahl an hoch konservierten Serinen (S). Serin und Threonin (T) sind aufgrund ihrer Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden Komponenten vieler struktureller Motive der α -Helices. Es wird vermutet, dass diese Aminosäuren insbesondere bei Membranproteinen bei der Ausbildung der α -Helices eine wichtige Rolle spielen (Gray and Matthews, 1984). Ebenso ist in den NDGD1-Sequenzen häufig Leucin (L), Glutamat (E), Arginin (R) und Lysin (K) zu finden. Diese Aminosäuren neigen ebenfalls zu der Ausbildung von α -Helices (Pace and Scholtz, 1998). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Sekundärstruktur von NDGD1 mehrere Bereiche mit konservierten α -Helices beinhaltet.

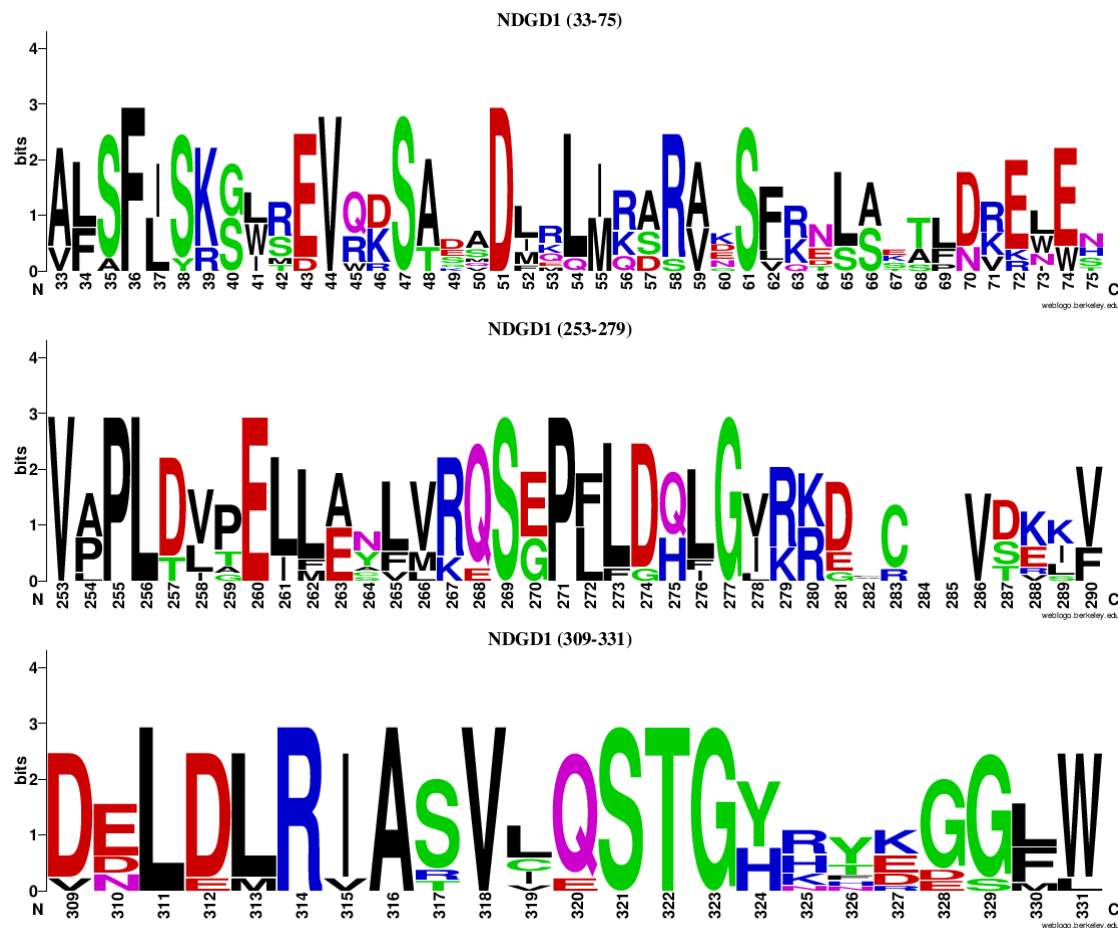


Abbildung 39: Sequenzlogo von 3 konservierten Teilsequenzen von NDGD1 (Aminosäure 33-75, 253-279 und 309-331, Nummerierung gemäß der Sequenz von AtNDGD1). In das Alignment mit einbezogen wurden NDGD1-Proteinsequenzen von *Physcomitrella patens* (Phypa_218058, Phypa_162919, Phypa_216055, Phypa_137342), *Selaginella moellendorffii* (SELMODRAFT_130585), *Arabidopsis thaliana* (At3g11670), *Lotus japonicus* (AAT67422.1) und *Oryza sativa* (Os02g0539100, Os11g0158400, Os04g0416900). Farbschema der Aminosäuren: grün = polar, magenta = neutral, blau = basisch, rot = sauer, schwarz = hydrophob. Die Größe der Buchstaben entspricht der Konservierung der entsprechenden Aminosäure innerhalb der Proteinsequenzen (angegeben in bits, <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Um weitere Informationen zu den Eigenschaften von NDGD1 zu erhalten, wurden innerhalb der Doktorarbeit von Sandra Witt (2009) Pflanzenlinien generiert, die im Wildtypintergrund das AtNDGD1-Protein überexprimieren. Die Pflanzen dieser Linien zeigten einen außergewöhnlichen Phänotyp mit kleinen buschigen Pflanzen mit zum Teil stark gekrümmten Blättern (Abbildung 31). Innerhalb dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die plastidären Lipide sowie die photosynthetischen Pigmente im Vergleich zum Wildtyp in verminderter Menge vorlagen (Abbildung 32). Diese Ergebnisse deuten auf eine Reduktion der photosynthetischen Membranen hin, entweder durch eine Reduktion der Anzahl der Chloroplasten oder die Reduktion der Thylakoide pro Chloroplast. Um genauere Informationen dazu zu erhalten, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Blattzellen sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen der Chloroplasten angefertigt. Diese zeigten aber keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Überexpressionslinien und dem Wildtyp (Abbildung 34). Vermutlich könnte eine statistische Auszählung der Chloroplasten pro Zelle sowie der Thylakoide

pro Chloroplast innerhalb mehrerer Aufnahmen die Unterschiede verdeutlichen. Unterschiede innerhalb der Struktur der beiden Hüllmembranen könnten durch andere Aufnahmemethoden, wie z.B. der Gefrierbruchtechnik zur Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate, sichtbar gemacht werden. Interessant wäre auch die Markierung von AtNDGD1 mit Immunogold in Vorbereitung auf die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, um die Assoziation dieses Peptids mit den Membranen genauer zu studieren. Die Reduktion des Gehaltes an plastidären Lipiden sowie Chlorophyll in den AtNDGD1-Überexpressionslinien hat interessanterweise keine Auswirkung auf die Photosyntheseleistung des PSII, wie die PAM-Messungen zeigen konnten (Abbildung 33). Diese Messmethode erfasst jedoch wie beschrieben nur die Aktivität von PSII, eine Störung der Elektronentransportkette an einer anderen Stelle kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, zeigte sich AtNDGD1 *in planta* als essentiell für die Akkumulation des DGDGs in den Chloroplasten, beeinflusste aber nicht direkt die Glykosyltransferaseaktivität. Eine mögliche Funktion dieses Peptids könnte eine Beteiligung am Transfer der Galaktolipide zwischen den Hüllmembranen sein. Um Hinweise zu dieser Hypothese zu erhalten, wurden innerhalb dieser Arbeit Lipidbindungsstudien mit AtNDGD1 durchgeführt. Mit Hilfe des Lipidüberlagerungstests sowie des Liposomenbindungstests konnte eine eindeutige Bindung von AtNDGD1 an PA nachgewiesen werden (Abbildung 24 und Abbildung 25). Um tiefer gehende Erkenntnisse zu der Bindung von AtNDGD1 an PA zu erhalten, wurde der Liposomen-Aggregations-Test mit darauf anschließenden lichtmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass AtNDGD1 *in vitro* in Abhängigkeit von PA die Membranfusion der Liposomen induziert. Mittels der „Content mixing“-Tests konnten diese Ergebnisse jedoch nur bedingt bestätigt werden (Abbildung 29 und Abbildung 30). Die Ergebnisse der ersten Variante zeigen in Abhängigkeit von PA einen geringfügigen Anstieg der Fluoreszenz nach der Zugabe von AtNDGD1. Es könnte somit sein, dass in diesem Experiment Liposomen vereinzelt über AtNDGD1 miteinander fusionierten. Da jedoch AtNDGD1 in dem Liposomen-Durchlässigkeitstest ebenfalls eine leichte Aktivität zeigte (Abbildung 28), könnte der leichte Anstieg der Fluoreszenz in Variante 1 des „content mixing“-Tests ebenfalls durch die Insertion von AtNDGD1 in die Membranen hervorgerufen werden. Die Ergebnisse der zweiten Variante zeigten keinen signifikanten Unterschied. Bei diesem Experiment fiel die Fluoreszenz bei den Negativkontrollen wie auch bei PA-enthaltenden Liposomen nach der Zugabe von AtNDGD1 im gleichen Maß, was auf eine Autofusion der Liposomen in allen Experimenten schließen lässt. Wodurch diese Autofusion verursacht wurde ist unklar, womöglich führt die höhere Temperatur innerhalb des Fluorometers zu der Instabilität der Liposomen. Bei einer Wiederholung dieses Experimentes könnte die Kühlung der Küvetten während der Messung die Liposomen stabilisieren. Die Stabilität von Membranen hängt neben der Temperatur sowie dem Verhältnis von bilayer- zu nicht-bilayerstabilisierenden Lipide auch von vielen weiteren Faktoren wie z.B. dem Desaturierungsgrad der Fettsäuren oder der Ionenstärke der Lösung ab (Webb, M.S., Green, B.R., 1991). Bei einer

Wiederholung dieses Experimentes könnte auf PC und PA mit einem höheren Sättigungsgrad (z.B. di18:1-PC bzw. -PA) zurückgegriffen werden, wodurch die Membranen stabilisiert werden. Zusätzlich könnte die Optimierung des Testpuffers (Kapitel 2.10.6) z.B. mittels der Veränderung des pH-Wertes als auch der Ionenstärke zu einer größeren Stabilität der Liposomen führen.

Die Ergebnisse der am Anfang dieses Kapitels erwähnten *dgd1-1*-Komplementationsstudien (Kelly *et al.*, 2016) sowie der Lipidbindungsexperimente lassen darauf schließen, dass AtNDGD1 *in planta* den Transfer der Galaktolipide zwischen den Hüllmembranen über die Ausbildung von Kontaktstellen vermittelt (Abbildung 40). Die Formation dieser Kontaktstellen erfolgt über die Affinität dieses Peptids zu PA. Die grundsätzliche Präsenz von Kontaktstellen zwischen den beiden Hüllmembranen konnten über elektronenmikroskopische Aufnahmen bewiesen werden (Cremers *et al.*, 1988). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der AtNDGD1-Überexpressionslinien (Abbildung 34) konnte jedoch nicht eindeutig ein erhöhtes Vorkommen der Kontaktstellen zwischen der äußeren und inneren Hüllmembran beobachtet werden. Wie auf Seite 95 erwähnt wurde, könnte hier das Gefrierbruchverfahren mit oder ohne Immunogoldmarkierung die Unterschiede verdeutlichen. Ebenfalls könnte für die Ausbildung der Kontaktstellen in den Überexpressionslinien die PA-Konzentration in den Hüllmembranen selbst der limitierende Faktor sein, d.h. dass die PA-Konzentration artifiziell erhöht werden müsste, um erst eine erhöhte Anzahl an Kontaktstellen erkennen zu können. Es ist unklar, ob die mit AtNDGD1 assoziierten Membranen an den Kontaktstellen miteinander vollständig fusionieren oder ob es zu der Ausbildung von sogenannten Hemifusionen kommt. Bei einer Hemifusion erfolgt einzig die Fusion zweier Lipidschichten von zwei Biomembranen. Hemifusionen zwischen dem ER und der äußeren Hüllmembran konnten mittels Gefrierbruch-Rasterelektronenmikroskopie beobachtet werden und sind womöglich an dem Transfer der Lipide zwischen ER und Chloroplast beteiligt (McLean *et al.*, 1988; Whatley *et al.*, 1991; Mehrshahi *et al.*, 2013).

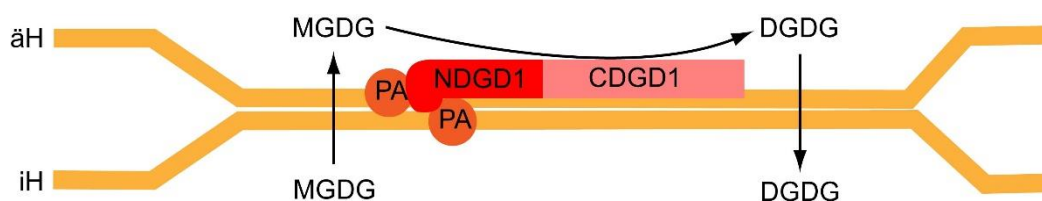


Abbildung 40: AtNDGD1 vermittelt die Assoziation der inneren (iH) und äußeren (äH) Hüllmembran des Chloroplasten durch die Bindung an PA. Über diese Kontaktstellen erfolgt der Transfer der durch AtMGD1 und AtDGD1 (NDGD1CDGD1) synthetisierten Galaktolipide.

Ebenso wie bei DGD1 beeinflusst PA auch weitere an der Biosynthese der Galaktolipide beteiligte Proteine. Zum Beispiel wurde in *in vitro* Enzymtests eine aktivierende Wirkung des PAs auf die

enzymatische Aktivität von MGD1 nachgewiesen (Dubots *et al.*, 2010). TGD2 und TGD4 zwei Komponenten des die beiden Hüllmembranen des Chloroplasten durchspannenden TGD-Transporter-komplexes binden spezifisch an PA (Awai *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2012). Mutationen innerhalb der Loci der fünf Komponenten dieses Komplexes führten zu der Reduktion der eukaryotischen Spezies der Galaktolipide, weshalb vermutet wird, dass dieser Komplex an dem Transport von PA vom ER zu den Hüllmembranen des Chloroplasten beteiligt ist (Xu *et al.*, 2003; Awai *et al.*, 2006b; Lu *et al.*, 2007b; Wang *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2015). Ähnlich zu AtNDGD1 induziert TGD2, das Substratbindepotein, in Abhängigkeit von PA die Fusion von Liposomen (Roston *et al.*, 2011). Zusätzlich konnte experimentell belegt werden, dass TGD2 in PA-enthaltende Membranen inseriert, vergleichbar mit AtCDGD1.

Interessanterweise führte in der Studie von Dubots *et al.* (2010) die Zugabe von PA nicht zu einer erhöhten DGDG-Produktion. Die Enzymtests zur Messung der DGDG-Synthaseaktivität erfolgten hier mit Arabidopsis-Blatthomogenaten. Es könnte somit sein, dass das natürlich in den äußeren Hüllmembranen der Chloroplasten enthaltene PA (bei Reispflanzen liegt der Gehalt bei etwa 1-2 mol%, Uemura & Steponkus (1997) für die optimale Aktivität der DGD1 (Transfer der Galaktolipide sowie Glykosyltransferaseaktivität) ausreicht. Ähnlich wie bei Dubots *et al.* (2010) konnte auch innerhalb dieser Arbeit durch die Addition von PA zu dem DGDG-Synthaseenzymtest mit AtCDGD1 oder AtDGD2 kein Anstieg der Glykosyltransferaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 21). Da hierbei jedoch ebenfalls nur mit einem Proteinrohextrakt gearbeitet wurde (in diesem Fall von den rekombinanten *E. coli*-Zellen), gab es hier auch bei den Negativkontrollen einen Hintergrund an PA von etwa 0,5-1 mol% (Daten nicht gezeigt). Da die Addition von PA weder bei Dubots *et al.* noch in dieser Arbeit sich auf die DGDG-Syntheserate positiv auswirkte, hat PA wahrscheinlich eher einen geringfügigen Effekt auf die Glykosyltransferaseaktivität selbst. AtCDGD1 bindet jedoch ebenfalls an PA (Abbildung 24). Im Gegensatz zu AtNDGD1 erhöht AtCDGD1 in Abhängigkeit von PA im hohen Maße die Durchlässigkeit der Liposomen (Abbildung 28), was auf die Insertion dieses Peptids in bzw. Anlagerung an die entsprechenden Membranen schließen lässt. Somit enthält AtCDGD1 eine Teilsequenz, die über die Interaktion mit PA AtDGD1 in Membranen verankert.

In den Lipidüberlagerungstests konnte weder bei AtNDGD1, AtCDGD1, noch dem AtDGD2-Protein eine Bindung an die Galaktolipide selbst beobachtet werden. Die Substrat- und/oder Produktbindung dieser Proteine erfolgt demnach entweder nur schwach und/oder temporär, oder erfordert weitere Cofaktoren.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Galaktolipide Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG) und Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG) sind die häufigsten Membranlipide der Chloroplasten und essentiell für die optimale Photosyntheseleistung der Pflanzen. Die Biosynthese von DGDG erfolgt hauptsächlich durch die Glykosyltransferase DGD1. Neben seiner Funktion als Baustein plastidärer Membranen sowie Bestandteil einiger photosynthetischer Komplexe dient DGDG unter Phosphatmangel auch als Ersatz für plastidäre sowie extraplastidäre Phospholipide. Unter Phosphatmangel erfolgt die Aktivierung eines zweiten Biosyntheseweges, in dem DGD2, eine weitere DGDG-Synthase, involviert ist. In Arabidopsis gibt es zwei Biosynthesewege für die Produktion von Diacylglycerol (DAG), dem Vorläufer der Galaktolipide. In dem ersten Biosyntheseweg erfolgt die *de novo*-Synthese des DAGs in den Chloroplasten. So genannte prokaryotischen Lipide, die von diesem DAG abgeleitet sind, sind charakterisiert durch eine 16C-Fettsäure an der *sn2*-Position. Der zweite Weg involviert die Degradation extraplastidärer Phospholipide durch Phospholipasen und den Reimport der Vorläufer in den Chloroplasten. Lipide, die von diesen Vorläufern abgeleitet sind, werden auch eukaryotische Lipide genannt und sind durch eine 18C-Fettsäure an der *sn2*-Position charakterisiert.

Der DGDG-Gehalt in Pflanzen mit einer Knockout-Mutation des DGD1-Gens ist nur noch gering (≤ 1 mol%). Unter Phosphatmangel akkumuliert DGDG in *dgd1-1*, katalysiert durch die Aktivität von DGD2. Die Mutation des DGD2-Lokus in der *dgd2-1*-Mutante führt unter optimaler Nährstoffversorgung zu keiner Veränderung des Galaktolipidgehalts. Unter Phosphatmangel akkumulieren diese Pflanzen jedoch weniger DGDG. Innerhalb dieser Arbeit wurde nun zum ersten Mal die Auswirkung dieser beiden Mutationen auf weitere Glycerolipide von Pflanzen, die mit oder ohne Phosphat im Nährmedium wuchsen, untersucht. Während sich die Zusammensetzung der Phospholipide unter beiden Konditionen im Vergleich zum Wildtyp nur wenig unterschied, wirkten sich die Mutationen unter Phosphatmangel jedoch auf die Zusammensetzung des Triacylglycerols (TAG) aus. Die DGDG-Synthase-Mutanten akkumulierten im Vergleich zum Wildtyp verstärkt TAG. Im Wildtyp und in *dgd2-1* akkumulierte mehr prokaryotisches 16:0/16:0/18:x-TAG (50:x) als eukaryotisches 16:0/18:x/16:0-TAG. Jedoch war der Anteil des prokaryotischen 50:x TAGs am gesamten TAG im WT und *dgd2-1* nur gering. In *dgd2-1* akkumulierten in erster Linie TAGs mit drei 18C-Fettsäuren (54:x), was diese Pflanzen von *dgd1-1* und dem WT unterschied. In *dgd1-1* akkumulierten relativ weniger prokaryotische als eukaryotische 50:x-TAGs. Im Anschluss an diese Arbeit sollte ebenfalls das DAG in diesen Pflanzen analysiert werden, da dieses Molekül die direkte Vorstufe der Galaktolipide ist.

MGDG von Arabidopsis setzt sich aus etwa 70 mol% prokaryotischen (18:3/16:3-MGDG) und 30 mol% eukaryotischen Spezies (18:3/18:3-MGDG) zusammen. Das DGDG dieser Pflanze hingegen leitet sich in erster Linie von eukaryotischen Vorstufen ab. Durch die Analyse des DGDGs der *dgd2-1*-Mutante konnten in einer früheren Studie Hinweise dazu gefunden werden, dass AtDGD1 zu einem kleinen Anteil prokaryotisches 18:3/16:0-DGDG synthetisiert. Die vollständige Sättigung der 16C-Fettsäure an *sn2* unterscheidet das prokaryotische DGDG von prokaryotischem MGDG. Eine weitere Studie befasste

sich mit der positionellen Analytik des DGDGs der *dgd1-1*-Mutante, welches sich aus 18:3/18:3-DGDG sowie einem kleineren Anteil 16:0/18:3-DGDG zusammensetzt. Es wird davon ausgegangen, dass DGDG von *dgd1-1* aus der Aktivität von AtDGD2 entstammt. Wodurch die Unterschiede bezüglich der Fettsäurezusammensetzung zwischen MGDG und DGDG in Arabidopsis hervorgerufen werden, war bis jetzt unklar. Innerhalb dieser Arbeit konnte zum ersten Mal mittels der DGDG-Synthase-Enzymtests mit in *E. coli* heterolog exprimiertem Proteinen gezeigt werden, dass AtDGD1 eukaryotisches 18:3/18:3-MGDG als Substrat dem prokaryotischen 18:3/16:3-MGDG vorzieht. Wurde jedoch AtDGD1 prokaryotisches 18:3/16:0-MGDG angeboten, das anstelle von 16:3 gesättigtes 16:0 an sn2 trug, erhöhte dies den Umsatz um ein Vielfaches. AtDGD1 bevorzugt somit eukaryotisches 18:x/18:x-MGDG und akzeptiert prokaryotisches MGDG nur dann, wenn die 16C-Fettsäure an sn2 noch nicht desaturiert wurde. AtDGD2 zeigte keine ausgeprägte Präferenz für die angebotenen MGDG-Spezies. Einige Pflanzenfamilien wie die Fabaceae verloren im Laufe der Evolution den prokaryotischen Biosyntheseweg. Ob der Verlust des prokaryotischen Biosyntheseweges sich auf die Substratspezifität der DGDG-Synthasen auswirkt, wurde mit LjCDGD1 und LjDGD2 von *Lotus japonicus* überprüft. LjCDGD1 zeigte im Vergleich zu AtCDGD1 eine verminderte Präferenz für das eukaryotische Substrat. Da in *Lotus* nur eukaryotisches Substrat für LjDGD1 vorliegt, spielt vermutlich die Substratspezifität keine große Rolle mehr. In folgenden Enzymtests mit AtCDGD1 und AtDGD2 sollte untersucht werden, ob der Desaturierungsgrad des eukaryotischen 18:x/18:x-MGDGs die Enzymaktivität beeinflusst. Das AtDGD1-Protein verfügt neben der C-terminalen Glykosyltransferase-Domäne auch über eine etwa 30 kDa große N-terminale Extension (AtNDGD1) die für die Insertion von AtDGD1 in die äußere Hüllmembran des Chloroplasten notwendig ist. DGDG-Synthasen mit einer N-terminalen Extension wie bei AtDGD1 konnten in einzelnen Vertretern der Rhodophyta und Chlorophyta, sowie in allen der in der phylogenetischen Analyse einbezogenen Streptophyta gefunden werden. Die Online-Software I-TASSER konnte Hinweise dazu geben, dass die Sekundärstruktur von AtNDGD1 wahrscheinlich aus mehreren aufeinander folgenden α -Helices und Coiled-Coil-Domänen aufgebaut ist. Durch die Lipidbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass AtNDGD1 in Abhängigkeit von PA Membranen miteinander fusioniert. Dies lässt vermuten, dass AtNDGD1 über die Ausbildung einer Fusion oder Hemifusion der beiden Chloroplastenhüllmembranen den Austausch der Galaktolipide zwischen diesen Membranen ermöglicht. Die Akkumulation von AtNDGD1 scheint toxisch zu sein, wie durch die AtNDGD1-Überexpressionslinien gezeigt werden konnte. Diese Toxizität könnte begründet sein durch die hier gezeigte Fähigkeit von AtNDGD1 zur Membranmanipulation. Ebenso könnte allein die Fähigkeit von AtNDGD1, PA an sich zu binden, andere PA-abhängige Prozesse inhibieren. In folgenden Arbeiten sollte die Auswirkung von gezielten Mutationen innerhalb der PA-Bindungsstelle von AtNDGD1 auf die Funktionalität des gesamten AtDGD1-Proteins *in planta* untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Andersson MX, Kjellberg JM, Sandelius AS.** 2004. The involvement of cytosolic lipases in converting phosphatidyl choline to substrate for galactolipid synthesis in the chloroplast envelope. *Biochim Biophys Acta* **1684**, 46–53.
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellström H, Liljenberg C, Sandelius AS.** 2005. Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* **280**, 27578–27586.
- Awai K, Kakimoto T, Awai C et al.** 2006a. Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria. *Plant Physiol* **141**, 1120–1127.
- Awai K, Maréchal E, Block MA et al.** 2001. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16: 3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10960–10965.
- Awai K, Ohta H, Sato N.** 2014. Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 13571–13575.
- Awai K, Watanabe H, Benning C, Nishida I.** 2007. Digalactosyldiacylglycerol is Required for Better Photosynthetic Growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 Under Phosphate Limitation. *Plant Cell Physiol* **48**, 1517–1523.
- Awai K, Xu C, Tamot B, Benning C.** 2006b. A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10817–10822.
- Bissig C, Gruenberg J.** 2014. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends in cell biology* **24**, 19–25.
- Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R.** 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem* **258**, 13281–13286.
- Bonaventure G, Salas JJ, Pollard MR, Ohlrogge JB.** 2003. Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell* **15**, 1020–1033.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Browse J, Warwick N, Somerville CR, Slack CR.** 1986. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16: 3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **235**, 25–31.

- Bruce BD.** 1998. The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Mol Biol* **38**, 223–246.
- Burns CM, Richardson LV, Richardson JP.** 1998. Combinatorial effects of NusA and NusG on transcription elongation and Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **278**, 307–316.
- Byrdwell WC.** 2005. The bottom-up solution to the triacylglycerol lipidome using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* **40**, 383–417.
- Cahoon EB, Shanklin J, Ohlrogge JB.** 1992. Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 11184–11188.
- Carter HE, McCluer RH, Slifer ED.** 1956. Lipids of Wheat Flour .1. Characterization of Galactosylglycerol Components. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 3735–3738.
- Cavalier-Smith T.** 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science* **5**, 174–182.
- Chain RK.** 1985. Involvement of plastoquinone and lipids in electron transport reactions mediated by the cytochrome *b₆-f* complex isolated from spinach. *FEBS Lett* **180**, 321–325.
- Chapman DJ, De-Felice J, Barber J.** 1983. Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of pea chloroplasts. *Plant Physiol* **72**, 225–228.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735–743.
- Covès J, Block MA, Joyard J, Douce R.** 1986. Solubilization and partial purification of UDP-galactose diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast envelopes. *FEBS Letters* **208**, 401–406.
- Cremers FF, Voorhout WF, van der Krift TP, Leunissen-Bijvelt JJ, Verkleij AJ.** 1988. Visualization of contact sites between outer and inner envelope membranes in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **933**, 334–340.
- Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG.** 1999. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **65**, 382–388.
- Deblaere R, Bytebier B, Greve H de et al.** 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**, 4777–4788.
- Deng W, Nickle DC, Learn GH, Maust B, Mullins JL.** 2007. ViroBLAST: a stand-alone BLAST web server for flexible queries of multiple databases and user's datasets. *Bioinformatics* **23**, 2334–2336.
- Dörmann P, Balbo I, Benning C.** 1999. *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* **284**, 2181–2184.
- Dörmann P, Benning C.** 1998. The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*. *Plant J* **13**, 641–652.
- Dörmann P, Benning C.** 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* **7**, 112–118.

- Dörmann P, Hoffmann-Benning S, Balbo I, Benning C.** 1995a. Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* **7**, 1801–1810.
- Dörmann P, Voelker TA, Ohlrogge JB.** 1995b. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a novel thioesterase from *Arabidopsis thaliana* specific for long-chain acyl-acyl carrier proteins. *Arch Biochem Biophys* **316**, 612–618.
- Dubots E, Audry M, Yamaro Y et al.** 2010. Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **285**, 6003–6011.
- Ekroos K, Chernushevich IV, Simons K, Shevchenko A.** 2002. Quantitative profiling of phospholipids by multiple precursor ion scanning on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **74**, 941–949.
- Essigmann B, Güler S, Narang RA, Linke D, Benning C.** 1998. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1950–1955.
- Falcone DL, Gibson S, Lemieux B, Somerville C.** 1994. Identification of a Gene That Complements an Arabidopsis Mutant Deficient in Chloroplast Omega-6 Desaturase Activity. *Plant Physiology* **106**, 1453–1459.
- Fan J, Yan C, Zhang X, Xu C.** 2013. Dual role for phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: enhancing fatty acid synthesis and diverting fatty acids from membrane lipids to triacylglycerol in *Arabidopsis* leaves. *The Plant cell* **25**, 3506–3518.
- Fan J, Zhai Z, Yan C, Xu C.** 2015. Arabidopsis TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 Interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to Facilitate Lipid Transfer from the Endoplasmic Reticulum to Plastids. *The Plant cell* **27**, 2941–2955.
- Feng Y, Cronan JE.** 2009. Escherichia coli unsaturated fatty acid synthesis: complex transcription of the fabA gene and in vivo identification of the essential reaction catalyzed by FabB. *The Journal of biological chemistry* **284**, 29526–29535.
- Fourrier N, Bedard J, Lopez-Juez E et al.** 2008. A role for SENSITIVE TO FREEZING2 in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **55**, 734–745.
- Frentzen M, Heinz E, McKeon TA, Stumpf PK.** 1983. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* **129**, 629–636.
- Froehlich JE, Benning C, Dörmann P.** 2001. The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J Biol Chem* **276**, 31806–31812.

- Gasulla F, Vom Dorp K, Dombrink I et al.** 2013. The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: a comparative approach. *Plant Journal* **75**, 726–741.
- Gaude N, Nakamura Y, Scheible W-R, Ohta H, Dörmann P.** 2008. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *Plant J* **56**, 28–39.
- Gaude N, Tippmann H, Fletmetakis E, Katinakis P, Udvardi M, Dormann P.** 2004. The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and Lotus. *J Biol Chem* **279**, 34624–34630.
- Gorman DS, Levine RP.** 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**, 1665–1669.
- Gray TM, Matthews BW.** 1984. Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within alpha-helices and its relevance to membrane-bound proteins. *Journal of molecular biology* **175**, 75–81.
- Guo J, Zhang Z, Bi Y, Yang W, Xu Y, Zhang L.** 2005. Decreased stability of photosystem I in *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **579**, 3619–3624.
- Härtel H, Dörmann P, Benning C.** 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10649–10654.
- Härtel H, Lokstein H, Dörmann P, Grimm B, Benning C.** 1997. Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **115**, 1175–1184.
- Heilmann I, Mekhedov S, King B, Browse J, Shanklin J.** 2004. Identification of the *Arabidopsis* palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol delta7-desaturase gene FAD5, and effects of plastidial retargeting of *Arabidopsis* desaturases on the *fad5* mutant phenotype. *Plant Physiol* **136**, 4237–4245.
- Hölzl G, Witt S, Gaude N, Melzer M, Schöttler MA, Dörmann P.** 2009. The Role of Diglycosyl Lipids in Photosynthesis and Membrane Lipid Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**, 1147–1159.
- Hölzl G, Witt S, Kelly AA et al.** 2006. Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7512–7517.
- Hori K, Maruyama F, Fujisawa T et al.** 2014. Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat Commun* **5**, 3978.
- Hori K, Nobusawa T, Watanabe T et al.** 2016. Tangled evolutionary processes with commonality and diversity in plastidial glycolipid synthesis in photosynthetic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*.

- Hurlock AK, Roston RL, Wang K, Benning C.** 2014. Lipid trafficking in plant cells. *Traffic* **15**, 915–932.
- Iba K, Gibson S, Nishiuchi T et al.** 1993. A Gene Encoding a Chloroplast Omega-3-Fatty-Acid Desaturase Complements Alterations in Fatty-Acid Desaturation and Chloroplast Copy Number of the Fad7 Mutant of Arabidopsis-Thaliana. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 24099–24105.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28.
- Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A.** 2007. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum* **56**, 280–290.
- Ivanov AG, Hendrickson L, Krol M et al.** 2006. Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations. *Plant Cell Physiol* **47**, 1146–1157.
- Jarvis P, Dörmann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J.** 2000. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8175–8179.
- Jouhet J, Maréchal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA.** 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* **167**, 863–874.
- Joyard J, Stumpf PK.** 1981. Synthesis of long-chain acyl-CoA in chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol* **67**, 250–256.
- Kaup MT, Froese CD, Thompson JE.** 2002. A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol.* **129**, 1616–1626.
- Kelly AA, Dörmann P.** 2002. DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J Biol Chem* **277**, 1166–1173.
- Kelly AA, Froehlich JE, Dörmann P.** 2003. Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* **15**, 2694–2706.
- Kelly AA, Kalisch B, Hölzl G et al.** 2016. Synthesis and transfer of the galactolipids in the chloroplast envelope membranes of *Arabidopsis thaliana*. *wurde eingereicht bei PNAS*.
- Kobayashi K, Awai K, Takamiya K, Ohta H.** 2004. *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* **134**, 640–648.
- Kobayashi K, Fujii S, Sasaki D et al.** 2014. Transcriptional regulation of thylakoid galactolipid biosynthesis coordinated with chlorophyll biosynthesis during the development of chloroplasts in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **5**.

- Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H.** 2007. Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17216–17221.
- Komari T, Takakura Y, Ueki J, Kato N, Ishida Y, Hiei Y.** 2006. Binary vectors and super-binary vectors. *Methods Mol Biol* **343**, 15–41.
- Kunst L, Browse J, Somerville C.** 1988. Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4143–4147.
- Kunst L, Browse J, Somerville C.** 1989. A mutant of *Arabidopsis* deficient in desaturation of palmitic Acid in leaf lipids. *Plant Physiol* **90**, 943–947.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG.** 2008. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* **77**, 521–555.
- Lassalle F, Campillo T, Vial L et al.** 2011. Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol Evol* **3**, 762–781.
- Lemieux B, Miquel M, Somerville C, Browse J.** 1990. Mutants of *Arabidopsis* with Alterations in Seed Lipid Fatty-Acid Composition. *Theoretical and Applied Genetics* **80**, 234–240.
- Li M, Welti R, Wang X.** 2006. Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D zeta1 and D zeta2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol* **142**, 750–761.
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F et al.** 2013. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* **11**, e0161.
- Lippold F, Vom Dorp K, Abraham M et al.** 2012. Fatty acid phytol ester synthesis in chloroplasts of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 2001–2014.
- Loll B, Kern J, Zouni A, Saenger W, Biesiadka J, Irrgang KD.** 2005. The antenna system of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* at 3.2 Å resolution. *Photosynth Res* **86**, 175–184.
- Lu B, Xu C, Awai K, Benning C, [Nachname nicht vorhanden].** 2007a. TGD3, an ATPase protein of *Arabidopsis*, functions in ER-to-plastid lipid trafficking. *FASEB Journal* **21**, A236.
- Lu B, Xu C, Awai K, Jones AD, Benning C.** 2007b. A small ATPase protein of *Arabidopsis*, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J Biol Chem* **282**, 35945–35953.
- Makewicz A, Radunz A, Schmid GH.** 1996. Comparative immunological detection of lipids and carotenoids on peptides of photosystem I from higher plants and cyanobacteria. *Z Naturforsch [C]* **51**, 319–328.

- McConn M, Browse J.** 1996. The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *The Plant cell* **8**, 403–416.
- McConn M, Browse J.** 1998. Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of Arabidopsis. *Plant J* **15**, 521–530.
- McConn M, Hugly S, Browse J, Somerville C.** 1994. A Mutation at the Fad8 Locus of Arabidopsis Identifies a 2nd Chloroplast Omega-3 Desaturase. *Plant Physiology* **106**, 1609–1614.
- McLean B, Whatley JM, Juniper BE.** 1988. Continuity of Chloroplast and Endoplasmic Reticulum Membranes in Chara and Equisetum. *The New Phytologist* **109**, 59–65.
- Mehrshahi P, Stefano G, Andaloro JM, Brandizzi F, Froehlich JE, DellaPenna D.** 2013. Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 12126–12131.
- Meyer P, Saedler H.** 1996. Homology-Dependent Gene Silencing in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 23–48.
- Miège C, Maréchal E, Shimojima M et al.** 1999. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur J Biochem* **265**, 990–1001.
- Miquel M, Browse J.** 1992. Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty-Acid Synthesis - Biochemical and Genetic-Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 1502–1509.
- Misson J, Raghothama KG, Jain A et al.** 2005. A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11934–11939.
- Moellering ER, Benning C.** 2010. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in Chlamydomonas reinhardtii. *Eukaryot Cell* **9**, 97–106.
- Moellering ER, Muthan B, Benning C.** 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* **330**, 226–228.
- Mongrand S, Bessoule J-J, Cabantous F, Cassagne C.** 1998. The C16: 3/C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* **49**, 1049–1064.
- Mongrand S, Cassagne C, Bessoule JJ.** 2000. Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Physiol* **122**, 845–852.
- Moya I, Silvestri M, Vallon O, Cinque G, Bassi R.** 2001. Time-resolved fluorescence analysis of the photosystem II antenna proteins in detergent micelles and liposomes. *Biochemistry* **40**, 12552–12561.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473.

- Murata N, Higashi S, Fujimura Y.** 1990. Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1019**, 104–112.
- Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K, Ohta H.** 2005. A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **280**, 7469–7476.
- Nakamura Y, Koizumi R, Shui G et al.** 2009. Arabidopsis lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20978–20983.
- Nakamura Y, Tsuchiya M, Ohta H.** 2007. Plastidic phosphatidic acid phosphatases identified in a distinct subfamily of lipid phosphate phosphatases with prokaryotic origin. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 29013–29021.
- Nussberger S, Dörr K, Wang DN, Kühlbrandt W.** 1993. Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol* **234**, 347–356.
- Ohashi Y, Oka A, Rodrigues-Pousada R et al.** 2003. Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science* **300**, 1427–1430.
- Ohlrogge J, Browse J.** 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957–970.
- Ohta H, Shimojima M, Ookata K, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K.** 1995. A Close Relationship between Increases in Galactosyltransferase Activity and the Accumulation of Galactolipids during Plastid Development in Cucumber Seedlings. *Plant and Cell Physiology* **36**, 1115–1120.
- Okazaki Y, Otsuki H, Narisawa T et al.** 2013. A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion. *Nature Communications* **4**.
- Pace CN, Scholtz JM.** 1998. A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophysical journal* **75**, 422–427.
- Pant BD, Burgos A, Pant P, Cuadros-Inostroza A, Willmitzer L, Scheible W-R.** 2015. The transcription factor PHR1 regulates lipid remodeling and triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* during phosphorus starvation. *Journal of experimental botany* **66**, 1907–1918.
- Pashkova N, Gakhar L, Winistorfer SC et al.** 2013. The yeast Alix homolog Bro1 functions as a ubiquitin receptor for protein sorting into multivesicular endosomes. *Developmental cell* **25**, 520–533.
- Petroutsos D, Amiar S, Abida H et al.** 2014. Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways - From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research* **54**, 68–85.
- Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J.** 1991. Mutant of *Arabidopsis* Deficient in Xylem Loading of Phosphate. *Plant Physiol* **97**, 1087–1093.
- Pollard M, Ohlrogge J.** 1999. Testing models of fatty acid transfer and lipid synthesis in spinach leaf using in vivo oxygen-18 labeling. *Plant Physiol* **121**, 1217–1226.

- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE.** 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**, 384–394.
- Reifarth F, Christen G, Seeliger AG, Dörmann P, Benning C, Renger G.** 1997. Modification of the water oxidizing complex in leaves of the *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochemistry* **36**, 11769–11776.
- Riggs KG, McLachlan A.** 1986. A simplified screening procedure for large number of minipreparation. *Biotechnology* **4**, 310–313.
- Roston R, Gao J, Xu C, Benning C.** 2011. Arabidopsis chloroplast lipid transport protein TGD2 disrupts membranes and is part of a large complex. *Plant Journal* **66**, 759–769.
- Roughan PG.** 1970. Turnover of Glycerolipids of Pumpkin Leaves - Importance of Phosphatidylcholine. *Biochemical Journal* **117**, 1.
- Roughan PG.** 1975. Phosphatidyl Choline - Donor of 18-Carbon Unsaturated Fatty-Acids for Glycerolipid Biosynthesis. *Lipids* **10**, 609–622.
- Roughan PG, Mudd JB, McManus TT, Slack CR.** 1979. Linoleate and alpha-linolenate synthesis by isolated spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem J* **184**, 571–574.
- Roughan PG, Slack CR.** 1977. Long-chain acyl-coenzyme A synthetase activity of spinach chloroplasts is concentrated in the envelope. *Biochem J* **162**, 457–459.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y.** 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725–738.
- Roy A, Yang J, Zhang Y.** 2012. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res* **40**, 7.
- Sakaki T, Kondo N, Yamada M.** 1990a. Pathway for the synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. *Plant Physiol* **94**, 773–780.
- Sakaki T, Saito K, Kawaguchi A, Kondo N, Yamada M.** 1990b. Conversion of monogalactosyldiacylglycerols to triacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. *Plant Physiol* **94**, 766–772.
- Sakurai I, Mizusawa N, Wada H, Sato N.** 2007. Digalactosyldiacylglycerol Is Required for Stabilization of the Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II. *Plant Physiol* **145**, 1361–1370.
- Sakurai I, Shen JR, Leng J, Ohashi S, Kobayashi M, Wada H.** 2006. Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. *J Biochem (Tokyo)* **140**, 201–209.
- Salas JJ, Ohlrogge JB.** 2002. Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch Biochem Biophys* **403**, 25–34.
- Selão TT, Zhang L, Ariöz C, Wieslander Å, Norling B, Subramanyam R.** 2014. Subcellular Localization of Monoglucosyldiacylglycerol Synthase in *Synechocystis* sp. PCC6803 and Its Unique Regulation by Lipid Environment. *PLoS ONE* **9**, e88153.

- Shimajima M, Ohta H, Iwamatsu A, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K.** 1997. Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 333–337.
- Shipley GG, Green JP, Nichols BW.** 1973. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochim Biophys Acta* **311**, 531–544.
- Siebertz.** 1979. Characterization of lipids from chloroplast envelopes. *European Journal of Biochemistry* **101**.
- Siebertz HP, Heinz E.** 1977. Labeling Experiments on Origin of Hexadecatrienoic and Octadecatrienoic Acids in Galactolipids from Leaves. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **32**, 193–205.
- Siegenthaler P.** 1998. Molecular Organization of Acyl Lipids in Photosynthetic Membranes of Higher Plants. In: Siegenthaler P, Murata N, eds. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 119–144.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76–85.
- Sohlenkamp C, Geiger O.** 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS microbiology reviews* **40**, 133–159.
- Solomonson M, Setiাপutra D, Makepeace KAT et al.** 2015. Structure of EspB from the ESX-1 type VII secretion system and insights into its export mechanism. *Structure (London, England 1993)* **23**, 571–583.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Thorsoe KS, Bak S, Olsen CE, Imberty A, Breton C, Moller BL.** 2005. Determination of catalytic key amino acids and UDP sugar donor specificity of the cyanohydrin glycosyltransferase UGT85B1 from *Sorghum bicolor*. Molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses. *Plant Physiology* **139**, 664–673.
- Tjellström H, Andersson MX, Larsson KE, Sandelius AS.** 2008. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell and Environment* **31**, 1388–1398.
- Tjellström H, Hellgren LI, Wieslander A, Sandelius AS.** 2010. Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *Faseb J* **24**, 1128–1138.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350–4354.

- Tsai J-Y, Chu C-C, Yeh Y-H, Chen L-J, Li H-M, Hsiao C-D.** 2013. Structural characterizations of the chloroplast translocon protein Tic110. *The Plant journal for cell and molecular biology* **75**, 847–857.
- Uemura M, Steponkus PL.** 1997. Effect of Cold Acclimation on the Lipid Composition of the Inner and Outer Membrane of the Chloroplast Envelope Isolated from Rye Leaves. *Plant Physiology* **114**, 1493–1500.
- van Walraven HS, Koppenaal E, Marvin HJ, Hagendoorn MJ, Kraayenhof R.** 1984. Lipid specificity for the reconstitution of well-coupled ATPase proteoliposomes and a new method for lipid isolation from photosynthetic membranes. *Eur J Biochem* **144**, 563–569.
- Vieler A, Wilhelm C, Goss R, Süß R, Schiller J.** 2007. The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chem Phys Lipids* **150**, 143–155.
- Wang Z, Xu C, Benning C.** 2012. TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant Journal* **70**, 614–623.
- Webb, M.S., Green, B.R.** 1991. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1060**, 133–158.
- Welti R, Li W, Li M et al.** 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase Da in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 31994–32002.
- Whatley JM, McLean B, Juniper BE.** 1991. Continuity of chloroplast and endoplasmic reticulum membranes in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist*, 209–217.
- Wilson DB, Hogness DS.** 1964. The Enzymes of the Galactose Operon in Escherichia Coli. I. Purification and Characterization of Uridine Diphosphogalactose 4-Epimerase. *J Biol Chem* **239**, 2469–2481.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ.** 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *Plos One* **2**.
- Witt S.** 2009. Die Rolle der DGDG synthase DGD1 bei der Galaktolipid Synthese in den Hüllmembranen von Chloroplasten. Dissertation, Universität Potsdam, Potsdam.
- Xia XF, Zhang F, Shaw PC, Sui SF.** 2003. Trichosanthin induces leakage and membrane fusion of liposome. *Iubmb Life* **55**, 681–687.
- Xu C, Fan J, Cornish AJ, Benning C.** 2008. Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis* requires the extraplastidic TGD4 protein. *Plant Cell* **20**, 2190–2204.
- Xu C, Fan J, Riekhof W, Froehlich JE, Benning C.** 2003. A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*. *EMBO J* **22**, 2370–2379.

- Yamaryo Y, Dubots E, Albrieux C, Baldan B, Block MA.** 2008. Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLD zeta 2, an *Arabidopsis thaliana* phospholipase D. *FEBS Letters* **582**, 685–690.
- Yamaryo Y, Kanai D, Awai K et al.** 2003. Light and cytokinin play a co-operative role in MGDG synthesis in greening cucumber cotyledons. *Plant Cell Physiol* **44**, 844–855.
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y.** 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* **12**, 7–8.
- Yao D, Cherney M, Cygler M.** 2014. Structure of the N-terminal domain of the effector protein LegC3 from *Legionella pneumophila*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **70**, 436–441.
- Yen C-LE, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese, Robert V., Jr.** 2008. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research* **49**, 2283–2301.
- Yuzawa Y, Nishihara H, Haraguchi T et al.** 2012. Phylogeny of galactolipid synthase homologs together with their enzymatic analyses revealed a possible origin and divergence time for photosynthetic membrane biogenesis. *DNA Res* **19**, 91–102.
- Zhang Y.** 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.
- Zhang Y, Yang C, Li Y et al.** 2007. SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1912–1929.

7 Anhang

7.1 Klonierungsprotokolle

Klonierung von pET43b-DGD1 und pET43b-NDGD1

s. Kelly *et al.* (2016)

Klonierung von pET43b-CDGD1

Die cDNA der *CDGD1*-Sequenz von Arabidopsis wurde mit angehängten Schnittstellen für *Bam*HI und *Pst*I (Primer bn1310 und bn1310) mittels PCR amplifiziert. Hierfür diente der Vektor pQE31-*CDGD1* (PD41) als Vorlage. Das Plasmid pET43b-*DGD1* (bn166) wurde mit *Bam*HI und *Pst*I aufgeschnitten. Das daraus resultierende Rückgrat des Plasmides wurde mit *CDGD1* über besagte Schnittstellen ligiert.

Klonierung von pET43b-DGD2

Die cDNA der *DGD2*-Sequenz von Arabidopsis wurde mit angehängten Schnittstellen für *Bam*HI und *Sal*I (Primer bn2200 und bn2279) mittels PCR amplifiziert. Hierfür diente der Vektor pQE31-*DGD2* (PD185) als Vorlage. Das Plasmid pET43b-*DGD1* (bn166) wurde mit *Bam*HI und *Sal*I aufgeschnitten. Das daraus resultierende Rückgrat des Plasmides wurde mit *DGD2* über besagte Schnittstellen ligiert.

Klonierung von pET43b-LjCDGD1

Die cDNA der *CDGD1*-Sequenz von Lotus wurde mit angehängten Schnittstellen für *Bam*HI und *Sal*I (Primer bn1491 und bn1493) mittels PCR amplifiziert. Hierfür diente der Vektor pSPORT1-*LjDGD1* (PD221) als Vorlage. Das Plasmid pET43b-*DGD1* (bn166) wurde mit *Bam*HI und *Sal*I aufgeschnitten. Das daraus resultierende Rückgrat des Plasmides wurde mit *LjCDGD1* über besagte Schnittstellen ligiert.

Klonierung von pET43b-LjDGD2

Die cDNA der *DGD2*-Sequenz von Lotus wurde mit angehängten Schnittstellen für *Bam*HI und *Sal*I (Primer bn1492 und bn1494) mittels PCR amplifiziert. Hierfür diente der Vektor pBluescriptSK-*LjDGD2* (PD220) als Vorlage. Das Plasmid pET43b-*DGD1* (bn166) wurde mit *Bam*HI und *Sal*I aufgeschnitten. Das daraus resultierende Rückgrat des Plasmides wurde mit *LjDGD2* über besagte Schnittstellen ligiert.

7.2 Vektorkarten

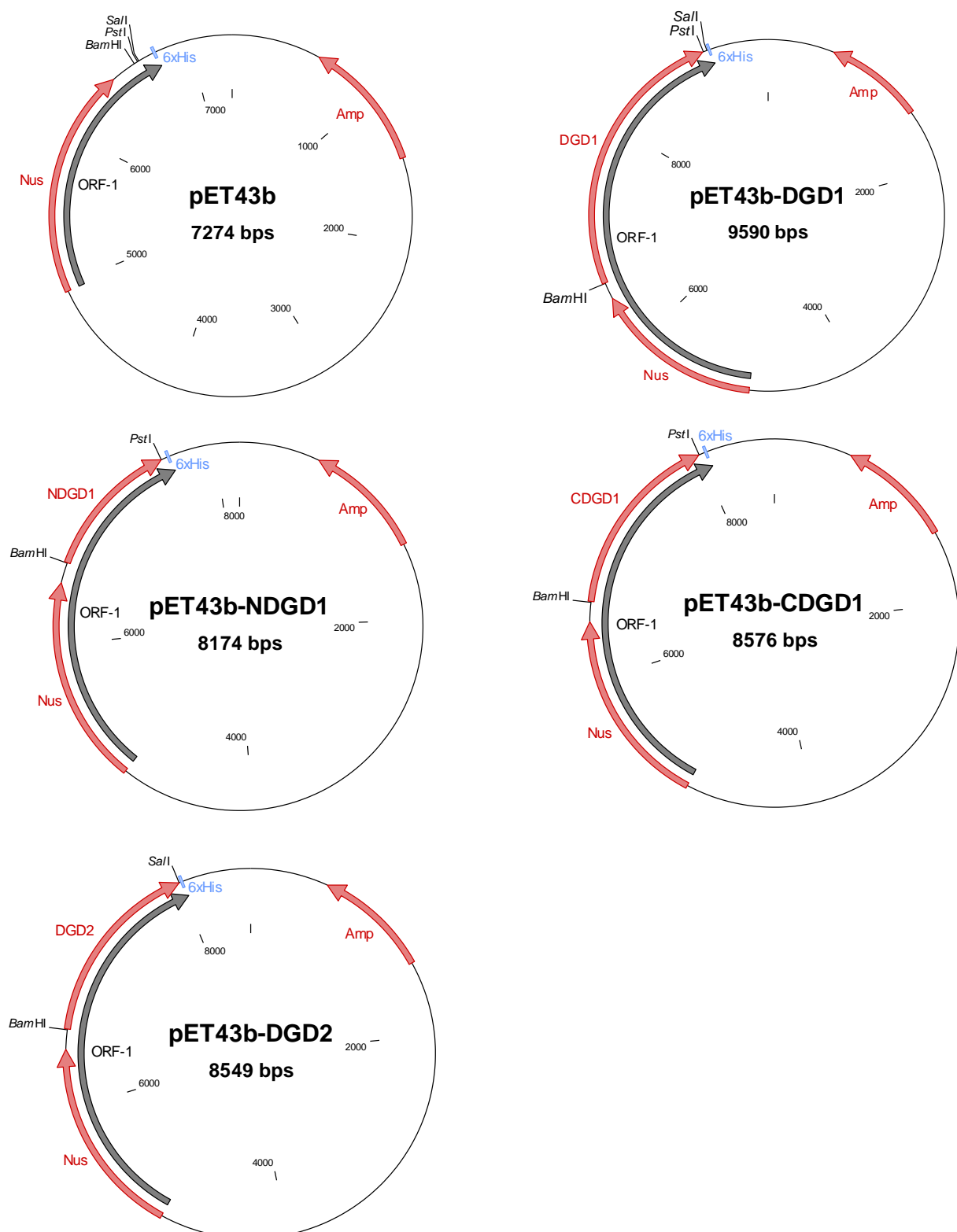


Abbildung 41: Konstrukte zur Expression von Nus, NusAtDGD1, NusAtNDGD1, NusAtCDGD1 und NusAtDGD2 in *E.coli*. cDNA Sequenzen der DGDG-Synthasen aus Arabidopsis. Die entsprechenden cDNA-Sequenzen wurden mit angehängten Restriktionsschnittstellen mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pET43b ligiert.

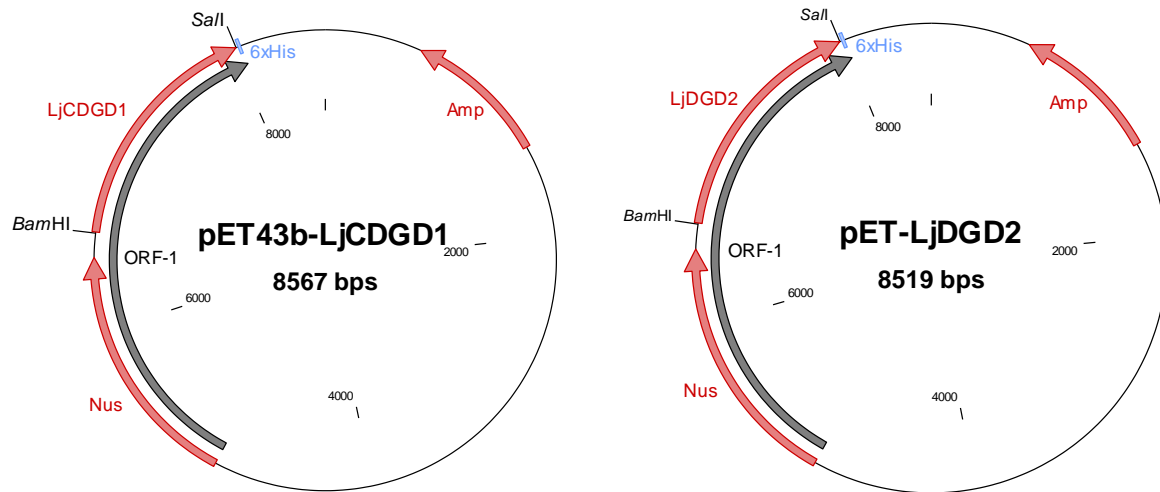


Abbildung 42: Konstrukte zur Expression von NusLjCDGD1 und NusLjDGD2 in *E.coli*. cDNA Sequenzen der DGDG-Synthetasen aus Lotus. Die entsprechenden Sequenzen wurden mit angehängten Restriktionschnittstellen mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pET43b ligiert.

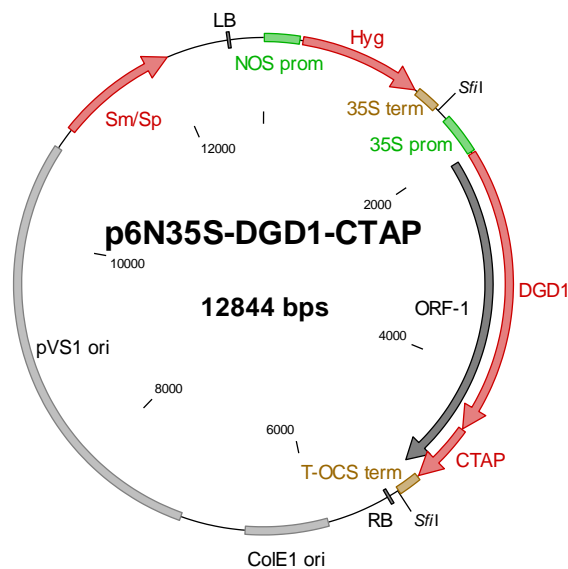


Abbildung 43: Konstrukt zur Überexpression von DGD1-CTAP in *A.thaliana dgd1*. DGD1-CTAP wurde mit *SfiI* aus dem Vektor pLH6000-DGD1-CTAP ausgeschnitten und in den Vektor p6N-35S ligiert.

7.3 Konzentration der Glyko- und Phospholipide in *dgd1-1*, *dgd2-1* und *dgd1-1 dgd2-1 +/- P*

Tabelle 5: Konzentration der Hauptlipidspezies der Glyko- und Phospholipide in *dgd1-1*, *dgd2-1* und *dgd1-1 dgd2-1* in nmol/mg TG. +P = Vollmedium, -P = Phosphatmangelmedium. Anzahl der Replika: Col2 +/- P = 10; *dgd1-1* +/- P = 5; *dgd2-1* +/- P = 8; *dgd1-dgd2* + P = 6, -P = 3, gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. C34/C36: Verhältnis 34:x zu 36:x.

	<u>Col2</u>		<u><i>dgd1-1</i></u>		<u><i>dgd2-1</i></u>		<u><i>dgd1-1 dgd2-1</i></u>	
	+P	-P	+P	-P	+P	-P	+P	-P
MGDG								
34:6	64.3 ± 7.2	54.3 ± 6.3	4.1 ± 1.7	1.1 ± 0.2	76.7 ± 10.5	20.7 ± 10.9	18.3 ± 5.5	1.7 ± 0.4
34:3	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.5	4.8 ± 0.4	4.3 ± 0.7	1.8 ± 0.4	4.5 ± 2.7	6.2 ± 1.5	13.0 ± 4.5
36:6	27.4 ± 2.9	27.2 ± 4.5	23.4 ± 2.3	17.1 ± 2.1	24.6 ± 3.1	7.1 ± 3.4	58.3 ± 5.4	31.0 ± 7.6
DGDG								
34:6	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	2.6 ± 0.3	1.7 ± 1.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
34:3	7.0 ± 1.1	14.0 ± 3.4	0.5 ± 0.1	4.5 ± 0.9	8.1 ± 1.3	5.9 ± 3.3	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2
36:6	29.4 ± 3.4	32.5 ± 4.1	0.9 ± 0.2	2.4 ± 0.6	29.5 ± 5.9	12.1 ± 5.9	1.2 ± 0.8	1.5 ± 0.4
SQDG								
34:3	3.9 ± 0.9	7.5 ± 1.8	1.6 ± 0.3	2.8 ± 0.6	5.0 ± 1.1	4.4 ± 2.9	2.8 ± 0.5	2.0 ± 0.8
36:6	1.3 ± 0.4	2.3 ± 0.5	0.6 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.6 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.6 ± 0.4	2.5 ± 1.4
PG								
34:4	5.8 ± 1.0	2.5 ± 0.9	3.0 ± 0.9	0.5 ± 0.2	7.1 ± 1.0	0.3 ± 0.2	5.3 ± 0.9	0.6 ± 0.2
34:3	2.0 ± 0.4	1.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	1.1 ± 0.3	2.8 ± 0.4	0.4 ± 0.2	3.9 ± 1.2	1.3 ± 0.5
PC								
34:3	8.8 ± 1.3	4.0 ± 1.6	7.8 ± 0.3	2.9 ± 0.6	9.4 ± 0.9	1.2 ± 0.7	11.3 ± 1.4	3.3 ± 1.2
34:2	2.1 ± 0.3	0.8 ± 0.4	2.4 ± 0.3	1.1 ± 0.2	3.2 ± 0.7	0.6 ± 0.2	2.6 ± 0.6	1.1 ± 0.0
36:6	5.0 ± 0.5	3.0 ± 0.5	6.3 ± 0.5	2.5 ± 0.4	5.7 ± 0.6	1.5 ± 0.8	11.8 ± 1.5	3.6 ± 1.5
36:5	3.1 ± 0.4	1.7 ± 0.3	3.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	4.5 ± 0.8	1.6 ± 0.5	4.8 ± 0.9	2.1 ± 0.1
36:4	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.6	1.1 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1
36:3	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2
C34/C36	1.09	0.87	0.84	0.65	0.98	0.41	0.72	0.60
PA								
34:3	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.05	0.10 ± 0.05	0.06 ± 0.04	0.17 ± 0.07	0.03 ± 0.03	0.18 ± 0.06	0.08 ± 0.05
34:2	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.10 ± 0.05	0.06 ± 0.04	0.09 ± 0.06	0.07 ± 0.03
34:1	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.04	0.06 ± 0.04
36:6	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.04 ± 0.05
36:5	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.05	0.01 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.03
36:4	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.04
C34/C36	2.02	1.85	1.29	1.05	1.61	1.16	1.40	1.91
PE								
34:3	3.4 ± 0.6	1.3 ± 0.7	3.4 ± 0.4	0.7 ± 0.2	3.0 ± 0.4	0.3 ± 0.2	4.3 ± 0.8	0.4 ± 0.2
34:2	1.4 ± 0.3	0.4 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.5	0.2 ± 0.1	1.9 ± 0.4	0.2 ± 0.1
36:6	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
36:5	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1
36:4	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1
36:3	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0
C34/C36	1.75	1.08	1.34	0.61	1.49	0.47	1.45	0.70
PI								
34:3	13.4 ± 1.6	5.9 ± 2.7	9.5 ± 0.7	4.7 ± 1.0	15.4 ± 3.4	2.3 ± 0.5	10.9 ± 1.4	4.4 ± 1.3
34:2	4.6 ± 0.7	2.0 ± 0.8	3.2 ± 0.3	2.0 ± 0.4	6.1 ± 1.1	1.7 ± 0.4	3.9 ± 0.7	3.0 ± 0.6
36:6	1.7 ± 0.4	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.3	2.5 ± 0.5	0.9 ± 0.3	1.4 ± 0.4	0.9 ± 0.5
C34/C36	6.72	3.80	6.33	5.52	5.22	2.48	5.40	3.32

PS								
34:3	0.13 ± 0.03	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.13 ± 0.07	0.02 ± 0.03	0.18 ± 0.07	0.03 ± 0.01
34:2	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.12 ± 0.05	0.04 ± 0.07
34:1	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.07 ± 0.02
36:6	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.02
36:5	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.06	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.03	0.00 ± 0.00
36:4	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.03	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01
36:3	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.02
36:2	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.02
40:3	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.03 ± 0.03
40:2	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.06
40:1	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.07	0.06 ± 0.04
42:4	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.03
42:3	0.17 ± 0.08	0.16 ± 0.05	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.20 ± 0.07	0.10 ± 0.04	0.22 ± 0.10	0.21 ± 0.05
42:2	0.09 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.08	0.06 ± 0.06	0.08 ± 0.05	0.00 ± 0.03
C34/C36	1.97	1.02	1.73	1.29	1.50	0.53	3.09	2.10

7.4 Expression von DGD1-CTAP in *dgd1-1*

Mit dem Ziel mögliche Interaktionspartner auf Proteinebene zu finden, wurde in der Doktorarbeit von Sandra Witt (2009) die *dgd1*-Mutante mit einem DGD1-CTAP Fusionskonstrukt komplementiert. Dazu wurde der Vektor pLH6000-DGD1-CTAP in die Mutante eingebracht und das Fusionsprotein unter Kontrolle des 35S Promoters stabil exprimiert. Innerhalb dieser Arbeit sollten nun über die Blue-Native-PAGE mögliche Interaktionspartner gefunden werden. Da aber nach einiger Zeit weder in den nachfolgenden Generationen, noch in den Elternlinien DGD1-CTAP durch die Immunodetektion nachweisbar war, wurde vermutet, dass es in diesen Pflanzen zu dem sogenannten „Gene-silencing“ kam. Dieser Umstand könnte dadurch ausgelöst worden sein, dass in dem pLH6000-Vektor das Resistenzgen sowie das Gen in der Expressionskassette unter der Kontrolle des 35S-Promotors stehen. Um erneutes „Gene-Silencing“ zu umgehen, wurde das DGD1-CTAP-Konstrukt in den Vektor p6N-35S umkloniert und erneut in die *dgd1*-Mutante eingebracht. Bei diesem Vektor wird das Resistenzgen durch den Nos-Promotor und die Expressionskassette durch den 35S-Promotor reguliert. Die resultierenden Pflanzen zeigten innerhalb der Immunodetektion eine schwache Expression des DGD1-CTAP-Proteins (Molekulargewicht ~112 kDa, s. Abbildung 44), zudem konnte auch eine Komplementation des Wachstums beobachtet werden. In den nachfolgenden Generationen konnte das Protein in kaum nachweisbaren Mengen durch Western Blot detektiert werden, obwohl das Wachstum dieser Pflanzen vergleichbar zum Wildtyp blieb. Da diese Proteinmengen nicht ausreichen dürften, um damit Interaktionen zu untersuchen, wurde dieses Teilprojekt eingestellt.

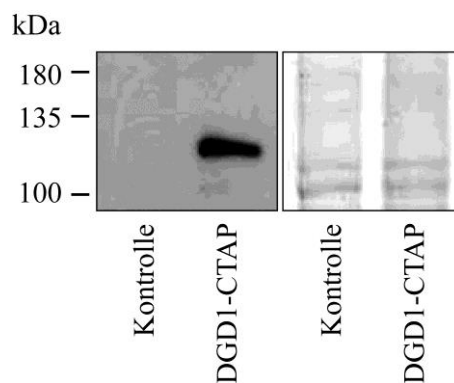


Abbildung 44: Expression des DGD1-CTAP-Proteins in der *dgd1*-Mutante. Links: Immunoblot (PAP-Antikörper, 1:10000). Rechts: Coomassie-Färbung. Proteinrohextrakte aus Blattmaterial von *dgd1* (Kontrolle) sowie *dgd1*-DGD1-CTAP (DGD1-CTAP).

8 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich natürlich bei Prof. Peter Dörmann für die Bereitstellung und Betreuung dieses Projektes bedanken. Ich möchte mich insbesondere bei ihm bedanken, dass er fast immer Zeit für mich und meine Anliegen hatte und immer offen war für konstruktive Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dorothea Bartels für die Anfertigung des Zweitgutachtens bedanken. Ein großer Dank geht auch an das gesamte Prüfungskomitee für seinen Einsatz.

Wichtig ist es mir auch dem gesamten IMBIO-Team zu danken. Jeder Einzelne hat zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen, und es ist schön zu wissen, dass aus vielen Kollegen Freunde wurden. Ein ganz besonderer Dank geht hierbei an Dr. Georg Hölzl. Danke Schorsch, dass du immer für mich und meine Fragen da warst und äußerst gerne mit mir deinen Perfektionismus geteilt hast (auch wenn es manchmal für uns beide echt anstrengend wurde ☺). Auch möchte ich Dr. Ania Zbierzak danken, die eine große Hilfe bei Fragen im Bereich Proteinbiochemie und gute Freundin war. Den Q-TOFifeen der ersten Generation Dr. Katharina Gutbrod, Dr. Vera Wewer und Helga Peisker gehört auch ein großer Dank. Vielen Dank Katha, dass du dich mit mir zusammen durch die TAG-Analyse gekämpft hast. Helga, dir gehört auch ein großer Dank! Vielen Dank, dass du mir bei so vielen Problemen und Problemchen weiter geholfen hast! Danke Regina Wehler, dass du dich so dafür einsetzt, dass hier nicht alles im Chaos versinkt. Ein ganz besonderer Dank geht auch an Andreas Ahrens. Danke, dass du mir immer den Spiegel vorgehalten hast, wenn ich es brauchte und mich über Gott und die Welt aufgeklärt hast! Vielen Dank euch allen für die Wohlfühlatmosphäre!

Auch möchte ich mich bei all meinen Studenten, insbesondere bei Sina-Valerie Mahlitz, für ihren Einsatz für dieses Projekt bedanken.

Sehr wichtig ist es mir auch mich bei Prof. Christoph Benning und Dr. Rebecca Roston zu bedanken. Danke Christoph, dass ich für 4 Wochen die Möglichkeit hatte bei euch in East Lansing zu arbeiten und viele neue Methoden lernen durfte. Rebecca, I really cannot thank you enough for your support during and after my work in East Lansing!!!

Ein großer Dank geht auch an Dr. Michael Melzer vom IPK Gatersleben. Zum einen vielen Dank dafür, dass du die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen der AtNDGD1-Überexpressionslinien angefertigt hast. Zum anderen, dass du so viel Zeit und Mühe dafür investiert hast, um mit mir die beste Methodik für die Ablichtung der Liposomen zu erarbeiten.

„Last but not least“ möchte ich mich ganz besonders bei meinen Freunden und bei meiner Familie bedanken! Vielen Dank an Dr. Benjamin Roenneke, der in den ersten Jahren mein Rückhalt war. Und vielen, vielen Dank an meine Eltern Ursula und Georg Kalisch, die mich auf meinem gesamten Weg immer so weit es ging unterstützt haben.

Am Ende danke ich allen Prokaryoten und Eukaryoten, die ich jetzt vergessen habe zu erwähnen, die aber trotzdem ihren Beitrag geleistet haben: DANKE!