

Phosphatidylglycerophosphat-Synthasen aus *Arabidopsis thaliana*

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

von
Diplom-Biologe
Frank Müller
aus
Bad Oldesloe

Berichter: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. M. Frentzen
Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. U. Priefer

Tag der mündlichen Prüfung: 07.März 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Veröffentlichungen

Aufgrund der Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse wurde einige Teile dieser Arbeit vorab veröffentlicht.

F. Müller und M. Frentzen; Phosphatidylglycerophosphate Synthases from *Arabidopsis thaliana*; FEBS lett. 2001; 509: 298-302.

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Amp	Ampicillin
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
° C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CL	Cardiolipin
CoA	Coenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
GFP	"green fluorescent protein"
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galaktopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
MBq	Mega Bequerel
min	Minuten
mol	Mole
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PGP	Phosphatidylglycerolphosphat
PI	Phosphatidylinositol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]
PLD	Phospholipase D
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sn	stereospezifische Numerierung

Tris	N- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen per Volumen
w/v	Gewicht per Volumen

Aminosäuren:

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
D	Asparaginsäure	F	Phenylalanin
C	Cystein	P	Prolin
Q	Glutamin	S	Serin
E	Glutaminsäure	T	Threonin
G	Glycin	W	Tryptophan
H	Histidin	Y	Tyrosin
I	Isoleucin	V	Valin

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Biosynthese der Phosphodiacylglycerole	1
1.2 Phosphatidyltransferasen werden von zwei Genfamilien kodiert	5
1.3 Physiologische Funktionen von PG	11
1.3.1 Die funktionelle Rolle von PG und CL in der DNA-Replikation in <i>E. coli</i>	11
1.3.2 Funktion von PG in fotosynthetischen Membranen	13
1.3.3 Funktion der Membranlipide PG und CL in Mitochondrien	15
1.4 Problemstellung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Chemikalien	19
2.2 Biologisches Material	20
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämme	20
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	20
2.2.3 Vektoren	21
2.3 Kultivierung von <i>E. coli</i>	21
2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen	22
2.3.2 Transformation	23
2.3.3 Plasmidpräparationen	23
2.3.3.1 Minipräparation von Plasmiden	24
2.3.3.2 Maxipräparation von Plasmiden	25
2.4 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen	26
2.4.2 Transformation	27
2.5 Dauerkulturen	28
2.6 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.6.1 Präparation von mRNA aus <i>A. thaliana</i>	29
2.6.2 Membranpräparation aus <i>A. thaliana</i>	30
2.6.2.1 Präparation von Gesamtmembranen aus <i>A. thaliana</i>	30
2.6.2.2 Isolierung von Differentialsedimenten aus <i>A. thaliana</i>	31
2.6.3 ³² P-Phosphat <i>in vivo</i> -Markierung von Phospholipiden in <i>A. thaliana</i>	31
2.7 Reinigung, Fällung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.8 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen	33
2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.10 PCR, Primer und Klonierung von PCR-Fragmenten	35
2.10.1 PCR mit Taq-Polymerase	35
2.10.2 PCR mit Pfu-Polymerase	35
2.10.3 PCR-Programme	36
2.10.4 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)	37
2.10.5 Primer	37
2.11 Arbeiten mit DNA-modifizierenden Enzymen	39
2.11.1 Restriktionsenzyme	39

2.11.2	Alkalische Phosphatase	39
2.11.3	Polynukleotidkinase	39
2.11.4	Ligase	40
2.12	Funktionale Expression	40
2.12.1	Expression in <i>E. coli</i>	40
2.12.1.1	Expression in pBAD (Invitrogen)	41
2.12.1.2	Expression in pQE70 (Qiagen)	41
2.12.1.3	Membranpräparation aus <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.12.2	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	42
2.12.2.1	Präparation von Gesamtmembranen aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.12.2.2	Präparation von Mitochondrien und Mikrosomen aus <i>S. cerevisiae</i>	43
2.13	Reinigung von PGPS1 und PGPS2	45
2.14	Proteinbestimmung	46
2.15	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
2.15.1	Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen und Detektion	48
2.16	Enzymtests	49
2.16.1	Phosphatidylglycerophosphat-Synthase	49
2.16.2	Phosphatidylinositol-Synthase	50
2.16.3	Phosphatidylserin-Synthase	51
2.16.4	Phosphatidylcholin-Synthase	51
2.16.5	Cardiolipin-Synthase	52
2.16.6	Monogalaktosyldiacylglycerol-Synthase	53
3.	Ergebnisse und Diskussion	54
3.1	Phosphatidyltransferasegene im Genom von <i>A. thaliana</i>	54
3.2	Phosphatidylinositol-Synthasen aus <i>A. thaliana</i>	57
3.3	Die mögliche Cardiolipin-Synthase aus <i>A. thaliana</i>	59
3.4	Phosphatidylglycerophosphat-Synthasen aus <i>A. thaliana</i>	63
3.4.1	Expression von PGPS1 und PGPS2	65
3.4.1.1	Reinigung von PGPS1 und PGPS2	70
3.4.2	Charakterisierung der PGPS-Isoenzyme aus <i>A. thaliana</i>	72
3.5	Die <i>A. thaliana</i> Columbia C24 JOV-Mutante mit einem Defekt in PGPS1	79
3.5.1	PGPS-Aktivitäten in der <i>A. thaliana</i> -Mutante C24 JOV	80
3.5.2	³² P-Markierungsversuche mit <i>A. thaliana</i> Columbia C24 JOV	83
4.	Fazit und Aussicht	86
5.	Literatur	89
6.	Anhang	100

1. Einleitung

Die CDP-Diacylglycerol : Glycerol-3-phosphat-Phosphatidyltransferase (E.C. 2.7.8.5; Phosphatidylglycerophosphat-Synthase; PGPS) katalysiert den entscheidenden Schritt zur Einführung der Kopfgruppe in das anionischen Membranlipid Phosphatidylglycerol (PG). Dieses Enzym überträgt einen Phosphatidylrest (*sn*-1,2-Diacylglycerol-3-phosphat) aus CDP-Diacylglycerol (CDP-DAG) auf die Hydroxygruppe in der *sn*-1 Position des *sn*-Glycerol-3-phosphats. Das Produkt dieser Reaktion ist Phosphatidylglycerophosphat (PGP), der unmittelbare Vorläufer von PG. Durch Dephosphorylierung mittels einer PGP-Phosphatase wird schließlich das fertige Membranlipid PG erhalten (zur Übersicht, Moore, 1982).

Im folgenden soll die Biosynthese der Phosphodiacylglycerole, ihre subzelluläre Lokalisation in Pflanzen sowie die Funktion der anionischen Phosphodiacylglycerole in verschiedenen Biomembranen erläutert werden.

1.1 Biosynthese der Phosphodiacylglycerole

Glycerolipide bilden den dominierenden Teil der Membranlipide in Pflanzen. Hierzu gehören die Glycodiacylglycerole, die charakteristischen Membranlipide der Plastiden sowie die Phosphodiacylglycerole, die Hauptkomponente der extraplastidären Membransysteme, die auch in Tieren, Pilzen und Eubakterien überwiegen.

Phosphodiacylglycerole können durch zwei prinzipiell verschiedene Reaktionswege gebildet werden (Abb. 1.1; zur Übersicht, Moore, 1982). Nachdem durch die Wirkung von Acyltransferasen in zwei Schritten *sn*-Glycerol-3-phosphat über *sn*-1-Acylglycerol-3-phosphat in *sn*-1,2-Diacylglycerol-3-phosphat überführt wurde, erfolgt dann im Weiteren die Einführung der unterschiedlichen polaren Kopfgruppen in die *sn*-3 Position. *Sn*-1,2-Diacylglycerol-3-phosphat (Phosphatidsäure, PA) stellt das zentrale Intermediat in der Glycerolipidbiosynthese dar. Durch eine PA-Phosphatase kann dieses zu Diacylglycerol (DAG) umgesetzt werden, welches wiederum der direkte Vorläufer der Phosphodiacylglycerole Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) ist. Die Synthese dieser Membranlipide katalysieren Enzyme aus der Gruppe der "CDP-Alkohol-Phosphotransferasen". Charakteristisch für die Reaktion dieser Enzyme ist die Übertragung

der Kopfgruppen aus den aktivierten Vorläufern CDP-Cholin bzw. CDP-Ethanolamin auf DAG (Abb. 1.1; Reaktionen 6 A und B).

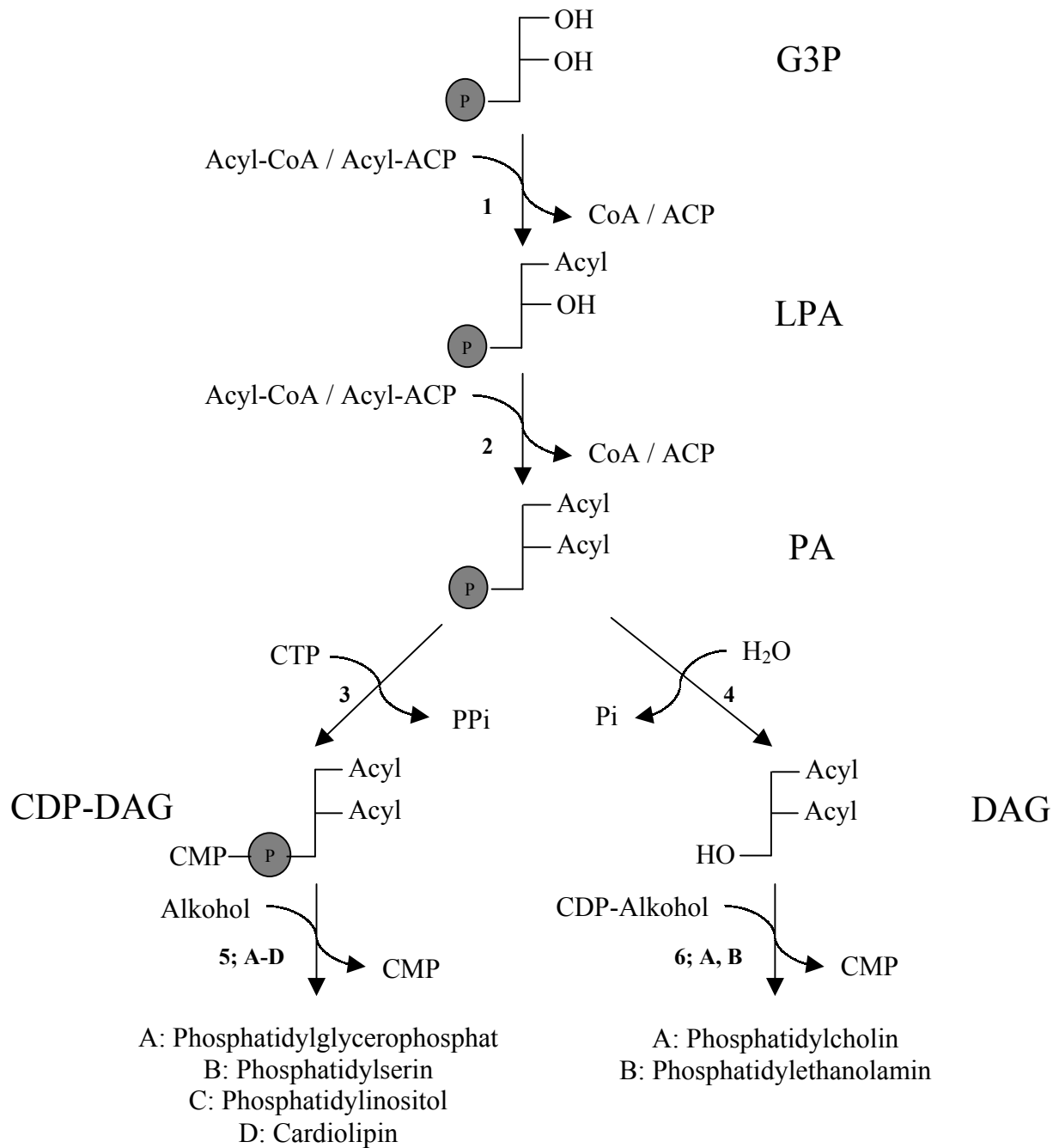


Abb. 1.1: Biosynthesewege der Phosphodiacylglycerole (G3P, Glycerol-3-phosphat; Acyl-ACP, Acyl-Acyl-Carrier-Protein; LPA, Lysophosphatidsäure, sn-1-Acylglycerol-3-phosphat; Alkohol, stellvertretend für G3P, Serin, *myo*-Inositol oder PG; CDP-Alkohol, stellvertretend für CDP-Cholin oder CDP-Ethanolamin; Enzyme: **1:** Acyl-CoA / ACP : G3P-Acyltransferase; **2:** Acyl-CoA / ACP : LPA-Acyltransferase; **3:** CTP : PA-Cytidyltransferase, CDP-DAG-Synthase; **4:** PA-Phosphatase; **5:** **A**, PGPS; **B**, CDP-DAG : Serin-Phosphatidyltransferase, Phosphatidylserin-Synthase, PSS; **C**, CDP-DAG : *myo*-Inositol-Phosphatidyltransferase, Phosphatidylinositol-Synthase, PIS; **D:** CDP-DAG : PG-Phosphatidyltransferase, Cardiolipin-Synthase, CLS; **6:** **A**, CDP-Cholin : DAG-Cholinphosphotransferase; **B:** CDP-Ethanolamin : DAG-Ethanolaminphosphotransferase).

Die Biosynthese der weiteren Phosphodiacylglycerole erfolgt über einen anderen Weg. Hier wird zunächst das Diacylglycerolgerüst der PA durch die Wirkung einer CDP-DAG-Synthase in CDP-DAG überführt und damit das Diacylglycerolgerüst der PA aktiviert. Diesen Vorläufer nutzen eine ganze Reihe sogenannter Phosphatidyltransferasen als Kopfgruppenakzeptor. Diese Phosphatidyltransferasen übertragen entweder Serin, *myo*-Inositol, Glycerol-3-phosphat oder PG und bilden dabei Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), PGP oder Cardiolipin (Abb. 1.1; Reaktionen 5 A bis D).

Diese *de novo* synthetisierten Phosphodiacylglycerole können weiteren Modifikationen unterliegen. Durch Decarboxylierung entsteht beispielsweise PE aus PS, während PE durch eine 3-stufige Methylierung in PC überführt werden kann. Zudem katalysieren spezielle Phosphatidyltransferasen den Austausch der Kopfgruppen an PC oder PE gegen Serin unter Bildung von PS. Nicht alle diese Mechanismen sind in allen Organismen etabliert. Manche Lipide fehlen in einigen Organismen ganz, in anderen sind lediglich die dominierenden Biosynthesewege verschieden. So bildet zum Beispiel *Escherichia coli* kein PC, wohingegen vor kurzem Geiger und Mitarbeiter zeigen konnten, dass *Sinorhizobium meliloti* PC in einer bislang unbekannten CDP-DAG-abhängigen Reaktion synthetisiert (de Rudder et al., 1999; Sohlenkamp et al., 2000). Tiere synthetisieren PS ausschließlich über den Kopfgruppenaustausch aus PC oder PE, während Pflanzen PS zusätzlich auch aus CDP-DAG bilden können (Stone et al., 1998; Stone & Vance, 1999; Delhaize et al., 1999; Vincent et al., 2001).

Während in Bakterien die Biosynthese der Phosphodiacylglycerole fast ausnahmslos durch Membranproteine in der Plasmamembran katalysiert wird, findet in Pflanzen und anderen Eukaryoten die Synthese dieser Lipide in unterschiedlichen Membransystemen statt. Dabei werden die dominierenden Phosphodiacylglycerole PC und PE über unterschiedliche Wege in der Hauptsache an den mikrosomalen Membranen gebildet (Dennis & Kennedy, 1972; Moore, 1982; Vance & Vance, 1988; Daum et al., 1998). In Pflanzen konnte die mitochondriale PC-Biosynthese in Einzelfällen nachgewiesen werden, während bis heute fraglich ist, ob die Decarboxylierung von PS unter Bildung von PE auch in diesen pflanzlichen Organellen stattfindet (Moore, 1982). Eine solche PE-Synthese erfolgt in den Mitochondrien aus Tieren und Hefen, die PS aus bestimmten ER-Domänen importieren und durch die in der Innenmembran lokalisierten Decarboxylasen in PE überführen (Shiao et al., 1995; Daum et al., 1998). Die Biosynthese von PI und PS ist in allen eukaryoten Zellen vollständig außerhalb der Organellen lokalisiert (Moore, 1982; Vance & Vance, 1988; Tanaka

et al., 1996; Daum et al., 1998; Stone et al., 1998; Vincent et al., 2001). Für tierische Zellen sowie für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte allerdings in beiden Fällen ein Import in die Mitochondrien nachgewiesen werden (zu Übersicht, Daum & Vance, 1997).

Die *de novo*-Biosynthese des anionischen Membranlipids PG verläuft in allen Eukaryoten und Prokaryoten über das Zwischenprodukt PGP, welches grundsätzlich aus der Übertragung des Phosphatidylrestes aus CDP-DAG auf Glycerol-3-phosphat durch integrale Membranproteine hervorgeht (Moore, 1974; Hostetler et al., 1975; Hirabayashi et al., 1976; Griebau & Frentzen, 1994). Die entsprechenden PGPS-Aktivitäten wurden in unterschiedlichen Membransystemen lokalisiert. Während *S. cerevisiae* PGP und damit PG ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran synthetisieren kann, sind Tiere zusätzlich in der Lage dieses Lipid am ER zu bilden (Schlame et al., 1986; Ohtsuka et al., 1993; Daum et al., 1998). In pflanzlichen Zellen sind neben den Mitochondrien und dem Endomembransystem auch die Plastiden zur PG-Synthese befähigt, wobei alle für die Synthese dieses Membranlipids erforderlichen Enzyme in der inneren Hüllmembran lokalisiert sind (Moore, 1974; Andrews & Mudd, 1985; Griebau & Frentzen, 1994). PG ist das einzige Phosphodiacylglycerol, welches vollständig in Plastiden synthetisiert werden kann und das spezifisch von der FAD4-Desaturase als Substrat genutzt wird. Diese Desaturase führt eine Δ^3 -trans-Doppelbindung in den Palmitoylrest ein, der an der *sn*-2 Position des PG verestert ist (Dorne & Heinz, 1989; Tremolieres et al., 1991).

PG dient in Eukaryoten und vielen Prokaryoten als Vorstufe für die Biosynthese des Diphosphatidylglycerols, das sogenannte Cardiolipin (CL; Stuhne-Sekalec & Stanacev, 1989; Tropp, 1997). Cardiolipin hat eine einzigartige Struktur, in der zwei Phosphatidylreste über ein Glycerolmolekül miteinander verbunden sind. Daher besitzt CL im Gegensatz zu allen anderen Glycerolipiden 4 Fettsäurereste (Abb. 1.5). CL ist das Markerlipid der Mitochondrien, da seine Synthese durch die Wirkung der Cardiolipin-Synthase (CLS) in Eukaryoten ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran abläuft (Stuhne-Sekalec & Stanacev, 1989; Frentzen & Griebau, 1994; Tropp, 1997; Schlame et al., 2000).

Im Folgenden soll auf die Enzyme, die bei der Phosphodiacylglycerol-Synthese den Transfer eines Phosphatidylrestes katalysieren, näher eingegangen werden. Phosphatidyltransferasen lassen sich nach ihren Substrat-Spezifitäten in zwei große Gruppen einteilen. Die eine Gruppe nutzt, wie oben beschrieben, CDP-DAG als Substrat und überträgt den Phosphatidylrest aus CDP-DAG auf eine polare Kopfgruppe. Die zweite Gruppe nutzt dagegen

Phosphodiacylglycerole als Substrat und überträgt den Phosphatidylrest aus dem Lipid auf eine andere Kopfgruppe und katalysiert somit einen Kopfgruppenaustausch.

1.2 Phosphatidyltransferasen werden von zwei Genfamilien kodiert

Seit 1981, als Otha et al. das erste Gen für eine Phosphatidyltransferase aus dem Bakterium *E. coli* isolierten, erfolgte die Charakterisierung einer großen Zahl weiterer Sequenzen, die ebenfalls für Phosphatidyltransferasen kodieren. Mit der zunehmenden Zahl der Proteinsequenzen wurde deutlich, dass die Phosphatidyltransferasen zwei Proteinfamilien repräsentieren, die untereinander keine Ähnlichkeiten aufweisen. Die erste Familie, die nach dem stark konservierten CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv $\text{Dx}_2\text{DGx}_2\text{ARx}_8\text{Gx}_3\text{Dx}_3\text{D}$ als DGAR-Familie bezeichnet wird, umfasst Phosphatidyltransferasen, die im allgemeinen eine molekulare Masse von 20 bis 25 kDa haben (Otha et al., 1981; Nikawa & Yamashita, 1984; Delhaize et al., 1997; Williams & McMaster, 1998). In diese Gruppe gehören zudem die Aminoalkohol-Phosphotransferasen, die die Kopfgruppen der Phosphodiacylglycerole, wie oben beschreiben, aus den aktivierten Vorstufen CDP-Cholin oder CDP-Ethanolamin auf DAG übertragen (Abb. 1.1). Die entsprechenden Gene, die für Proteine um 45 kDa kodieren, sind aus Pflanzen, Hefen und Mensch isoliert (Hjelmstad & Bell, 1991; Dewey et al., 1994; Henneberry & McMaster, 1999). Die HKD-Familie hingegen weist das Sequenzmotiv $\text{Hx}_2\text{Kx}_{4-6}\text{D}$ auf und enthält Enzyme mit molekularen Masse um 60 kDa. Neben Phosphatidyltransferasen gehören auch Phospholipasen des D-Typs (Exton, 2000), Virushüllproteine (Roper & Moss, 1999) sowie bakterielle Nukleasen (Ponting & Kerr, 1996) in diese Familie.

Die Verteilung prokaryoter und eukaryoter Phosphatidyltransferasesequenzen auf die beiden Protein-Familien sowie deren katalytische Wirkung soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

Phosphatidylinositol-Synthase (PIS)

PISs katalysieren den Transfer des Phosphatidylrestes aus CDP-DAG auf die Hydroxygruppe am C-Atom 1 des *myo*-Inositol unter Abspaltung von CMP (Abb.1.2; Loewus & Murthy, 2000). Nikawa & Yamashita (1984) konnten erstmals eine PIS aus *S. cerevisiae* durch Komplementation einer Hefe-PIS-Mutante mit einer genomischen Bank des Wildtyp-

Stammes isolieren. Diese Mutante wurde ebenfalls genutzt, um eine cDNA für die PIS aus Ratte zu klonieren (Tanaka et al., 1996). Über die PIS in Bakterien war lange Zeit wenig bekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass Mycobakterien PI besitzen und dass dieses sogar essentiell ist (Salman et al., 1999; Jackson et al., 2000). Erst kürzlich gelang die Isolierung des Gens für die PIS aus *Mycobacterium smegmatis* (Jackson et al., 2000). Aus *Arabidopsis thaliana* konnten zwei Labore unabhängig voneinander eine cDNA, die für eine PIS kodiert, klonieren (Collin et al., 1999; Xue et al., 2000). Alle bislang isolierten PISs gehören zur Gruppe der DGAR-Enzyme, wobei sich die Sequenzähnlichkeiten der PISs neben dem konservierten Motiv auf wenige Aminosäurereste beschränken. Andererseits zeigen die Sequenzen dennoch Unterschiede zu denen anderer Phosphatidyltransferasen aus dieser Familie (Jackson et al., 2000).

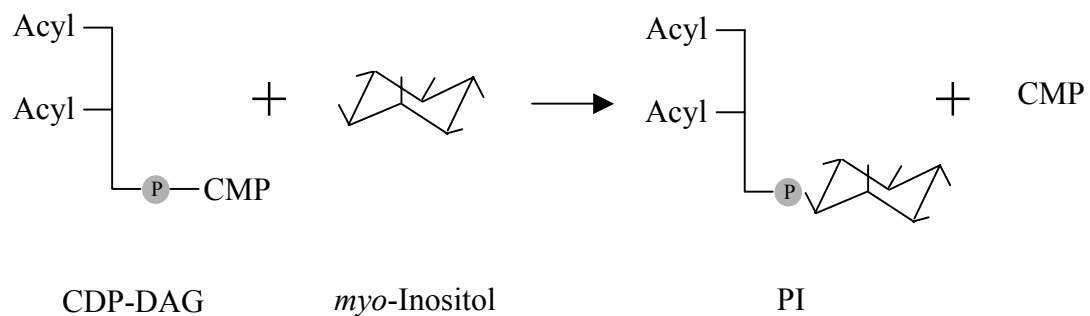


Abb. 1.2: Reaktion der Phosphatidylinositol-Synthase (die sechs Hydroxygruppen des *myo*-Inositol sind durch Striche dargestellt).

Phosphatidylserin-Synthase (PSS)

Für Phosphatidylserin-Synthasen sind zwei unterschiedliche Reaktionen beschrieben worden (Vincent et al., 2001). Wie in Abb. 1.3 dargestellt, kann der auf die Hydroxygruppe des Serins übertragene Phosphatidylrest unterschiedlichen Ursprungs sein und stammt entweder aus CDP-DAG (Abb. 1.3, oben) oder einem Phosphodiacylglycerol (Abb. 1.3, unten). PSSs, die den Phosphatidylrest aus einem Phosphodiacylglycerol übertragen, haben zum Teil unterschiedliche Substrat-Spezifitäten. PSS1 aus Maus kann sowohl PE als auch PC umsetzen, während PSS2 mit PC inaktiv ist und ausschließlich PE als Substrat nutzt (Stone et al., 1998; Stone & Vance, 1999). Die Gene für PSS1 und PSS2, die beide Enzyme des HKD-Typs kodieren, sind bekannt, zeigen allerdings nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu anderen Enzymen aus dieser Gruppe (Stone et al., 1998; Stone & Vance, 1999). Gene für CDP-DAG-abhängige PSSs des DGAR-Typs wurden aus Hefe (Yamashita & Nikawa, 1997) und Weizen (Delhaize et al., 1999) isoliert. Biochemische Daten deuten allerdings darauf hin, dass

Pflanzen auch über den Mechanismus des Kopfgruppenaustausches PS bilden können (Vincent et al., 1999; Manoharan et al., 2000). In Bakterien erfolgt die PS-Synthese ausschließlich in einer CDP-DAG-abhängigen Reaktion. Das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* besitzt ein integrales Membranprotein aus der DGAR-Gruppe mit Ähnlichkeiten zu den PSSs aus Eukaryoten, wohingegen die lediglich membranassoziierte PSS aus *E. coli* aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in die Gruppe der HKD-Proteine einzuordnen ist (Raetz et al., 1977; Okada et al., 1994).

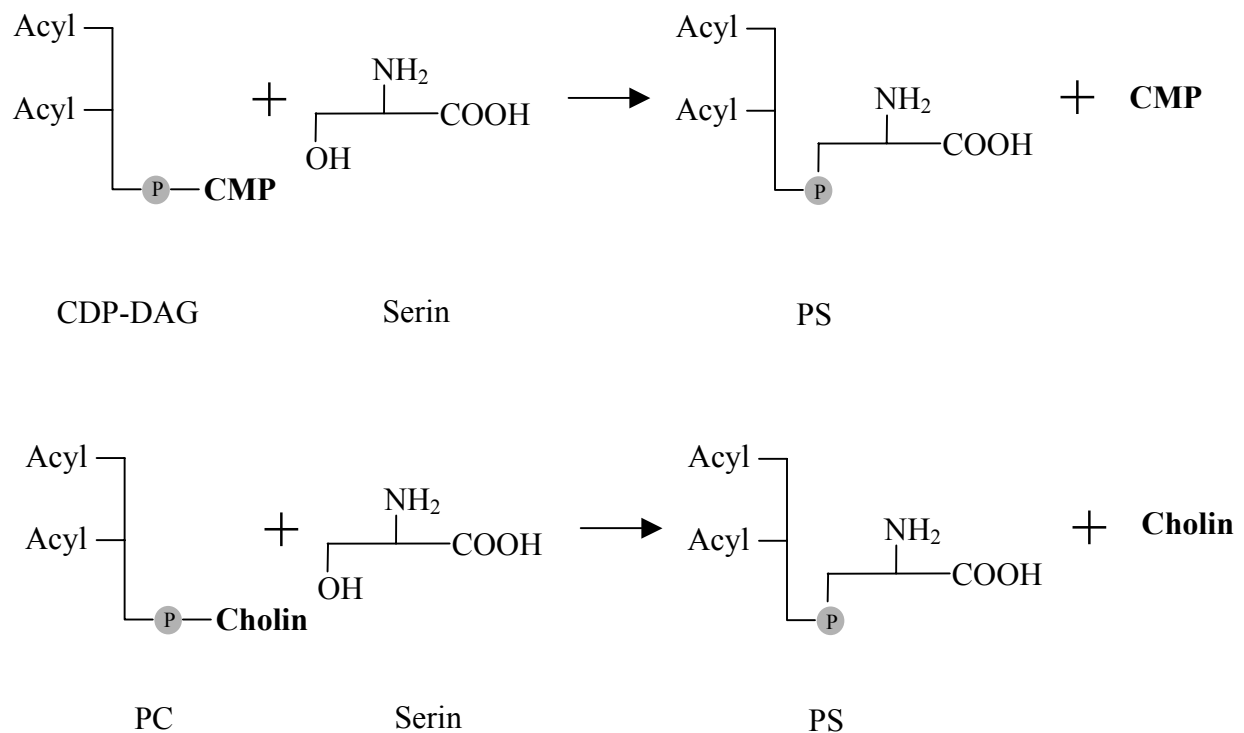


Abb. 1.3: Reaktionen der Phosphatidylserin-Synthasen (die unterschiedlichen Abgangs-gruppen der Phosphatidylendonatoren sind hervorgehoben).

Phosphatidylglycerophosphat-Synthase (PGPS)

In Abb. 1.4 ist dargestellt, dass die PGPS den Phosphatidylrest aus CDP-DAG auf die Hydroxygruppe am C-Atom 1 des Glycerol-3-phosphats überträgt. Unter Abspaltung von CMP entsteht dabei PGP, dass durch ein weiteres Enzym, die PGP-Phosphatase, an der Kopfgruppe dephosphoryliert wird, so dass PG entsteht.

Das Gen für PGPS wurde zunächst aus *E. coli* (Otha et al., 1981) und später aus *Rhodobacter sphaeroides* isoliert (Dryden & Dowhan, 1996). Diese und weitere, anhand hoher Sequenzähnlichkeiten identifizierte, prokaryote PGPSs gehören zur DGAR-Familie. 1993 wurde die PGPS aus *S. cerevisiae* kloniert, allerdings zunächst nicht als solche erkannt

(Janitor & Subik, 1993). Nachdem man zeitweilig dachte es handle sich dabei um eine PSS (Janitor et al., 1995; Janitor et al., 1996), stellte sich heraus, dass das in diesen Veröffentlichungen beschriebene PEL1-Gen eine PGPS aus der HKD-Familie kodiert (Chang et al., 1998 A; Dzugasova et al., 1998). Das PGPS-Gen aus Hamsterzellen wurde über Homologien zwischen dem PGPS-Gen aus Hefe und der möglichen PGPS aus Mensch identifiziert und letztlich über geeignete PCR-Techniken isoliert (Kawasaki et al., 1999). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nicht bekannt, welchen Typ die pflanzlichen PGPSs repräsentieren.

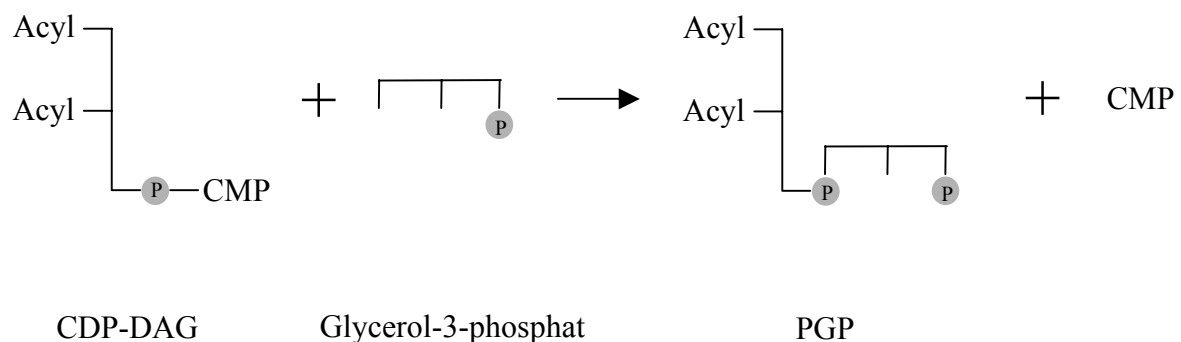


Abb. 1.4: Reaktion der Phosphatidylglycerophosphat-Synthase (die Hydroxygruppen des Glycerol-3-phosphat sind durch Striche dargestellt).

Cardiolipin-Synthasen (CLS)

Um eine spezielle Phosphatidyltransferase handelt es sich bei der Cardiolipin-Synthase, da hier die Kopplung zweier lipophiler Substrate erfolgt. Abb. 1.5 verdeutlicht, dass die CLS als Donator für den Phosphatidylrest, der auf PG übertragen wird, zwei unterschiedliche Lipide nutzen kann. Die CLS aus Prokaryoten kondensiert zwei PG-Moleküle unter Abspaltung von Glycerol, während das eukaryote Enzym aus den Mitochondrien PG mit CDP-DAG zu CL umsetzt (Hostetler et al., 1971; Otha et al., 1985; Frentzen & Griebau, 1994).

Alle bislang isolierten prokaryoten CLSs gehören zur HKD-Familie. Das erste Gen, das für ein solches Enzym kodiert, wurde aus *E. coli* isoliert (Otha et al., 1985). Einige Jahre später konnte aus dem gleichen Organismus ein zweites CLS-Gen charakterisiert werden (Guo & Tropp, 2000). Zwischenzeitlich gelang die Klonierung von CLS-Genen aus anderen Bakterien, unter anderem aus dem grampositiven Bakterium *Bacillus firmus* (Guo & Tropp, 1998). Das einzige Gen einer eukaryoten, und damit CDP-DAG-abhängigen, CLS wurde zeitgleich in drei verschiedenen Arbeitsgruppen aus *S. cerevisiae* isoliert (Jiang et al., 1997;

Chang et al., 1998 B; Tuller et al., 1998). Dieses Enzym zählt wiederum zur Gruppe der DGAR-Proteine und zeigt geringe Sequenzähnlichkeiten zu den prokaryoten PGPSs.

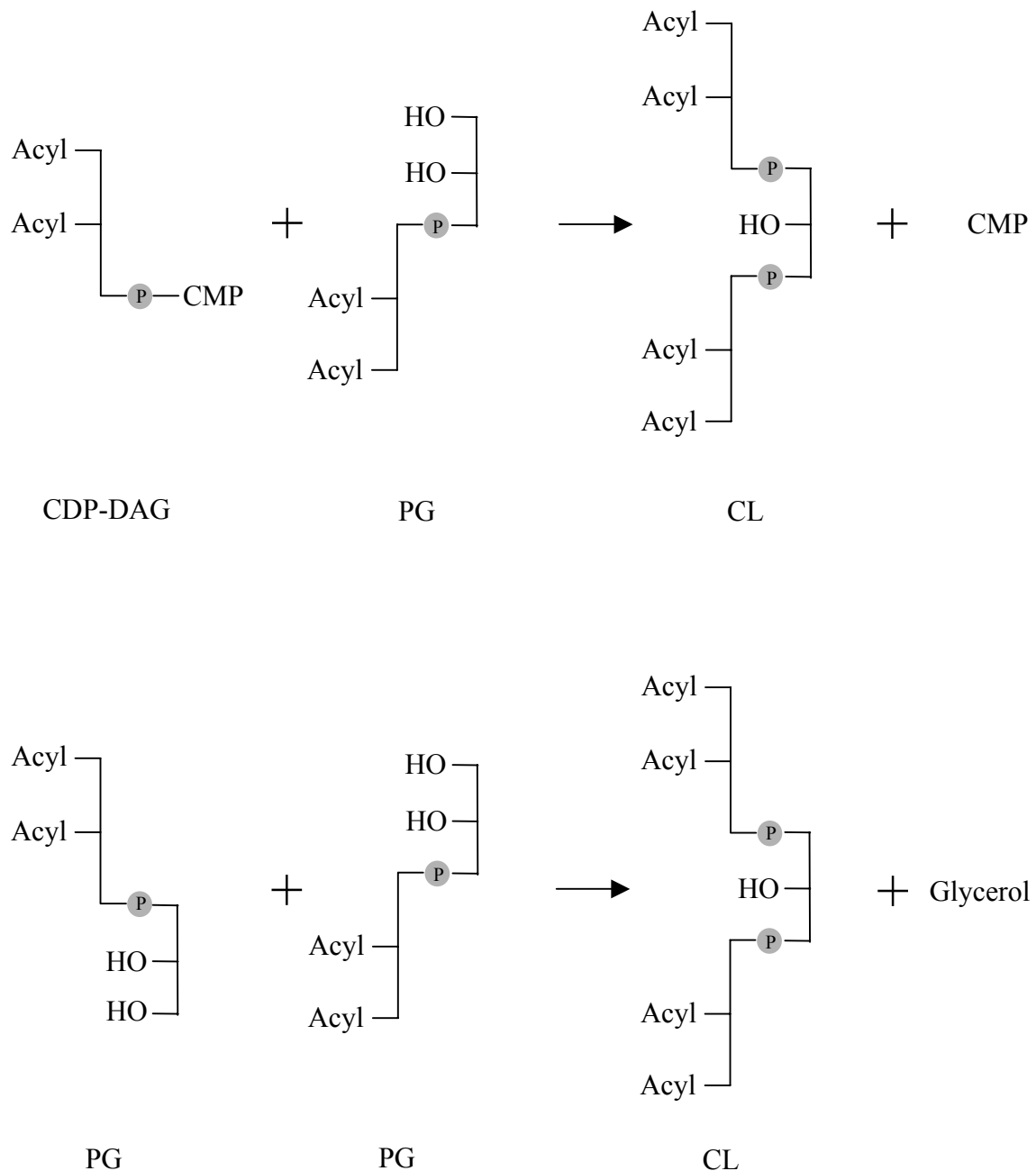


Abb. 1.5: Reaktionen der Cardiolipin-Synthasen.

Phosphatidylcholin-Synthase (PCS)

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Biosynthese von PC in Bakterien ausschließlich über die schrittweise Methylierung von PE abläuft. Interessanterweise gelangen dann allerdings Sohlenkamp et al. (2000) die Isolierung einer PCS aus *S. meliloti*, die den

Phosphatidylrest aus CDP-DAG auf die freie Hydroxygruppe des Cholins überträgt (Abb.1.6). Dieses bislang einzige Enzym seiner Art gehört zur DGAR-Familie und weist schwache Ähnlichkeiten zu den PSSs dieser Familie auf.

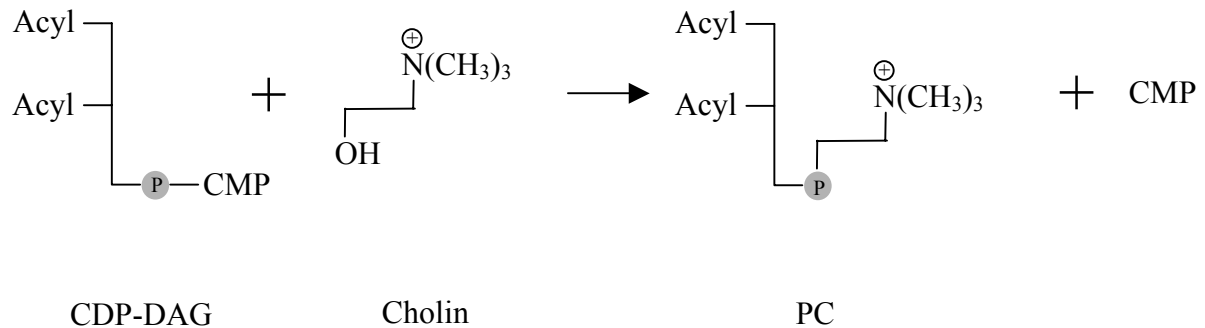


Abb. 1.6: Reaktion der Phosphatidylcholin-Synthase.

Tabelle 1.1: Einordnung der verschiedenen Phosphatidyltransferasen aus Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen in die DGAR- bzw. HKD-Familie.

	Phosphatidyltransferasen				
	PGPS	PIS	PSS	CLS	PCS
Bakterien	DG _{x2} AR	DG _{x2} AR	DG _{x2} AR HxK _{x4-6} D	HxK _{x4-6} D*	DG _{x2} AR
Hefe	HxK _{x4-6} D	DG _{x2} AR	DG _{x2} AR	DG _{x2} AR	
Tiere	HxK _{x4-6} D	DG _{x2} AR	HxK _{x4-6} D*		
Pflanzen		DG _{x2} AR	DG _{x2} AR		

*CDP-DAG-unabhängige Enzyme

Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die Verteilung bekannter Phosphatidyltransferasen auf die zwei unterschiedlichen Gen-Familien. Darin wird deutlich, dass lediglich die PISs - soweit bekannt - grundsätzlich zur DGAR-Familie zählen. Die mitochondrialen PGPSs aus Hefen und Tieren gehören zur HKD-Familie, die bakteriellen Proteine hingegen zur DGAR-Familie. Grampositive Bakterien besitzen PSSs aus der DGAR-Familie, während gramnegative Bakterien membranassoziierte, aber lösliche PSSs aus der Gruppe der HKD-Enzyme aufweisen (Okada et al., 1994; Matsumoto, 1997). Bakterielle CLSs gehören zur HKD-Familie. Ob hingegen die mitochondrialen CLSs der Eukaryoten alle Mitglieder der DGAR-Familie sind, lässt sich schwerlich sagen, da, wie oben beschrieben, bislang nur das

entsprechende Gen aus *S. cerevisiae* bekannt ist. Gleiches gilt für die PCS, die bisher nur aus *S. meliloti* isoliert wurde.

1.3 Physiologische Funktionen von PG

PG ist ein typisches Membranlipid in Bakterien und eukaryoten Zellen. In diesen Membranen ist PG, wie auch alle anderen Lipide, in erster Linie an der Bildung der Membranstruktur beteiligt. Anhand einiger Beispiele soll aber gezeigt werden, dass anionische Phosphodiacylglycerole wie PG und CL mit löslichen und membranständigen Proteinen interagieren und damit Einfluss auf unterschiedliche zellbiologische Vorgänge haben.

1.3.1 Die funktionelle Rolle von PG und CL in der DNA-Replikation in *E. coli*

Unter normalen Bedingungen beginnt die Replikation des *E. coli*-Genoms am oriC. Zwei Replikationsgabeln bewegen sich von dort in entgegengesetzter Richtung auf den terC-Locus zu, an dem die Replikation endet. Die bidirektionale Orientierung der Replikation führt während der Neusynthese des Genoms zur Ausbildung der charakteristischen Theta-Struktur. Der etwa 250 bp lange oriC enthält 4 Erkennungsstellen für das DnaA-Protein, die jeweils 9 bp lang sind (DnaA-Box), sowie 3 hintereinandergeschaltete AT-reiche Sequenzwiederholungen, bestehend aus 13 bp (13-mer-Sequenz). Hinzu kommen noch eine ganze Reihe von GATC-Wiederholungen, an denen durch Methylierungen die Replikation blockiert werden kann. Durch Bindung der DnaA-Proteine an die dafür vorgesehenen Sequenzabschnitte wird die Replikation eingeleitet. 20 bis 40 DnaA-Proteine sind nötig, um in einer ATP-abhängigen Reaktion an den 13-mer-Sequenzen das Genom partiell zu entspiralisieren. An die entstandene einzelsträngige DNA binden dann SSB-Proteine (single strand binding). In der Folge kommen DnaB (Helikase), DnaC (Hilfsprotein für DnaB), DnaG (Primase) und letzten Endes die DNA-Polymerase III hinzu (zur Übersicht: Messer et al., 2001).

DnaA ist für die Replikation von entscheidender Bedeutung. Ohne dieses Protein kann die oriC-abhängige Neusynthese des Genoms nicht eingeleitet werden. DnaA hat eine hohe Affinität für ADP und ATP, jedoch erfolgt ein Austausch der Nukleotide gegeneinander nur

sehr langsam (Crooke, 2001). Lediglich die DnaA-ATP-Form ist geeignet, die Replikation einzuleiten, wobei ATP zu ADP hydrolysiert wird (Sekimizu et al., 1987, Yung et al., 1990). Die Hydrolyse des ATP zu ADP ist interessanterweise zwar DNA- aber nicht zwangsläufig oriC-abhängig (Sekimizu et al., 1987) und wird durch lösliche Faktoren, darunter eine Untereinheit der DNA-Polymerase III, stimuliert (Katayama & Crooke, 1995; Katayama et al., 1998). Bei der Umwandlung des inaktiven DnaA-ADP-Komplexes in den entsprechenden aktiven spielen dagegen Phospholipide eine wichtige Rolle. Wie Sekimizu & Kornberg (1988) zeigten, stimulieren *E. coli*-Phospholipide die Abgabe von ADP aus dem Komplex. Diese Stimulierung der ADP-Abgabe war mit CL etwa zehnmal so hoch wie mit PG, wohingegen PE keinen Effekt zeigte. Die Aufnahme von ATP erfordert hingegen nicht nur die Gegenwart von Phospholipiden, sondern auch oriC-DNA (Crooke et al., 1992). Aber wie die ADP-Abgabe wird auch die ATP-Aufnahme nur durch anionische Phospholipide wie CL oder PG stimuliert (Sekimizu & Kornberg, 1988; Yung & Kornberg, 1988; Castuma et al., 1993). Offensichtlich sind elektrostatische Interaktionen zwischen den Phospholipidkopfguppen und dem Protein für eine Assoziation zwischen DnaA und der Membran erforderlich (Kitchen et al., 1999). Xia & Dowhan (1995) konnten an einer PGPS-Nullmutante, die weder PG noch CL besitzt, zeigen, dass diese Lipide essentiell für eine DnaA-basierte Replikation sind. Die beschriebene Nullmutante besitzt eine induzierbare Kopie des *pgsA*-Gens (kodiert PGPS). Im nicht-induzierten Zustand stellen die Zellen nach acht bis zehn Zellzyklen ihr Wachstum ein. Interessanterweise gibt es eine Suppressor-Mutante, in der das *rnhA*-Gen defekt ist. Dieses Gen kodiert für RNaseH, welche in DNA-RNA-Hybriden die RNA abbaut. In diesen Stämmen erfolgt die Replikation DnaA- und oriC-unabhängig nach dem cSDR Mechanismus (constitutive stable DNA replication; Torrey et al., 1984; von Meyenburg et al., 1987). Dabei werden an mehreren Stellen im Genom vorhandene RNA-Moleküle als Primer für die Neusynthese des Genoms genutzt. Weiter konnte belegt werden, dass eine *E. coli*-*pgsA*-Nullmutante nahezu uneingeschränkt wachsen kann (Kikuchi et al., 2000, Matsumoto 2001). Diese Mutante ist nicht defekt in *rnhA*, teilt sich aber fast mit Wildtyp-Geschwindigkeit. Offensichtlich können diese *E. coli*-Zellen die in erstaunlich hohen Konzentrationen vorhandene PA (4 % der Membranlipide) für die Membranassoziation und ATP-Beladung des DnaA-Proteins nutzen.

Molekulare Analysen haben gezeigt, dass ionische Wechselwirkungen zwischen zwei amphipatischen α -Helices in der C-terminalen Hälfte des DnaA-Proteins einerseits und anionischen Phospholipiden andererseits für die ADP-Abgabe notwendig sind (Hase et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999; Makise et al., 2001; Zheng et al., 2001). Basische

Aminosäurereste sind für diese α -Helices charakteristisch und in DnaA-homologen Proteinen anderer Bakterien hoch konserviert (Yamaguchi et al., 1999). Die Autoren postulieren, dass das an DnaA gebundene ADP in einer Tasche gefangen ist. Durch Wechselwirkungen der genannten α -Helices mit anionischen Phospholipiden, vornehmlich PG und CL, kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, wodurch sich die Tasche öffnet und das ADP entlassen wird. Garner et al. (1998) zeigten weiterhin, dass der membranabhängige ADP-ATP-Austausch mit dem Eintauchen eines C-terminalen Abschnittes des DnaA-Proteins in den Phospholipidbilayer einhergeht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Phospholipid-Bilayer, die für die DnaA-abhängige Initiation der Replikation notwendig sind, sich in der fluiden Phase befinden müssen (Castuma et al., 1993; Suzuki 1998). Wahrscheinlich können Teile des DnaA-Proteins nur dann in die Membran eintauchen, wenn diese einen ausreichend hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäureresten in den Membranlipiden aufweisen.

1.3.2 Funktion von PG in fotosynthetischen Membranen

In den Thylakoidmembranen der Plastiden dominieren die Glykodiacylglycerole Monogalaktosyldiacylglycerol (MGD), Digalaktosyldiacylglycerol (DGD) und Sulfochinovosyldiacylglycerol (SQD), während ihr Phosphodiacylglycerolgehalt nur etwa 10 % der Glycerolipide beträgt und zum überwiegenden Teil aus PG besteht (Block et al., 1983; Dorne et al., 1990).

Wie die Analyse von *Arabidopsis*-Mutanten zeigte, haben nicht nur die dominierenden plastidären Glykolipide MGD und DGD, sondern auch PG einen wichtigen Einfluss auf die Plastidenentwicklung und Funktion (Härtel et al., 1998; Härtel et al., 2000; Jarvis et al., 2000). Beispielsweise besitzt die *Arabidopsis* *pho1*-Mutante aufgrund eines Defekts im Phosphattransport im Vergleich zum Wildtyp einen um 50 bis 70 % verringerten PG-Gehalt in den Blättern, wohingegen die SQD- und DGD-Gehalte ansteigen (Härtel et al., 1998). Phänotypisch äußert sich dieser Defekt in einem deutlich verzögertem Wachstum. PG ist in den Thylakoidmembranen sowohl mit dem Kernkomplex des Fotosystems (PS) II als auch mit den Lichtsammelkomplexen LHCI (light harvesting complex) und LHCII assoziiert (Nussberger et al., 1993; Makewiecz, 1996; Kruse et al., 2000).

Der in den Thylakoidmembranen dominierende Lichtsammelkomplex LHCII (auch LHCP II) stellt ein Trimer aus drei Protein-Pigment-Komplexen dar. Die sehr ähnlichen Polypeptide von durchschnittlich 26 kDa werden durch eine Genfamilie im Kern der Pflanzen kodiert (Häder, 1999). Selbst in gereinigter Form enthält dieses Trimer sowohl DGD als auch PG (Tremolieres et al., 1994). Das DGD kann aber relativ leicht durch eine Behandlung des Komplexes mit geringen Konzentrationen eines milden Detergenz entfernt werden, wobei die trimere Struktur erhalten bleibt. Eine Abtrennung des PGs ist erst durch eine Phospholipase A2-Behandlung möglich. Dadurch wird der Fettsäurerest aus der *sn*-2 Position des PG entfernt und der Komplex zerfällt (Nussberger et al., 1993). Die proteolytische Abspaltung der 49 N-terminalen Aminosäurereste aus den 26 kDa-Proteinen führt ebenfalls zur Freisetzung des PGs und damit zum Verlust der trimeren Struktur. Wie gerichtete Mutagenese- und Deletions-Versuche zeigten, ist ein konservierter Argininrest am N-terminalen Ende der Proteine für die Interaktion mit PG verantwortlich (Hobe et al., 1995; Flachmann & Kühlbrandt 1996).

Das funktionelle Fotosystem II der Thylakoidmembranen in höheren Pflanzen und Cyanobakterien ist ein Dimer, bestehend aus zwei Multiproteinkomplexen (Hankamer et al., 1997 A). Zu den Hauptproteinen der monomeren Proteinkomplexe zählen D1 und D2 aus dem Reaktionszentrum, die Antennenproteine CP47 und CP43 sowie die 17 kDa-, 23 kDa- und 33 kDa-Proteine des wasserspaltenden Komplexes (Hankamer et al., 1997 B). Anhand gereinigter PSII-Komplexe konnten Kruse et al. (2000) zeigen, dass PG das Dimer stabilisiert. So führte die Behandlung der PSII-Komplexe mit Phospholipase A2 zur Dissoziation der Komplexe, wohingegen die Zugabe von PG zu PSII-Monomeren deren Dimerisierung stimulierte. Andere Lipide zeigten bei diesen Versuchen keinen Effekt. In den Thylakoidmembranen ist PG asymmetrisch verteilt und findet sich überwiegend im äußeren Monolayer der Membranen (Rawyler & Siegenthaler 1981). Anhand von Phospholipase A2-Versuchen mit "rightside-out"- und "inside-out"-Vesikeln konnten aber Duchene et al. (2000) beweisen, dass der geringe PG-Gehalt im inneren Monolayer für die Aktivität von PSII entscheidend ist. Darüber hinaus wiesen Kruse et al. (2000) nach, dass der PSII-Komplex vor allem durch PG-Spezies stabilisiert wird, die einen Δ -3-trans-Hexadezenfettsäurerest (16:1 ^{Δ 3t}) in ihrer *sn*-2 Position enthalten. Dies wird auch durch die Untersuchungen von Dubertret et al. (1994) an einer *Chlamydomonas reinhardtii*-Mutante gestützt, die nicht mehr in der Lage ist, diese Fettsäure zu bilden. Diese Mutante ist sowohl in der PSII-Aktivität als auch in der Oligomerisierung von LHCII beeinträchtigt.

Synechocystis-Mutanten, die aufgrund eines Defekts in ihrer CDP-DAG-Synthase bzw. PGPS nicht mehr in der Lage sind PG zu synthetisieren, können unter fotoautotrophen Bedingungen nur dann wachsen, wenn dem Medium PG zugesetzt wird (Sato et al., 2000; Hagio et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen klar, dass PG für Cyanobakterien essentiell ist. Die Fotosyntheseraten dieser Mutanten sind unter PG-Mangelbedingungen um 40 % reduziert. Dabei ist auffällig, dass wiederum die PSII- nicht aber die PSI-Aktivität betroffen ist. Aus der Beobachtung, dass die Zellen trotz der verbleibenden 60 %igen Fotosyntheserate ihr Wachstum einstellen, wird deutlich, dass PG nicht nur für den fotosynthetischen Elektronentransport wesentlich ist. Es erscheint denkbar, dass PG, wie oben beschrieben, auch in *Synechocystis* für andere zelluläre Funktionen wie z. B. die DNA-Replikation erforderlich ist.

1.3.3 Funktion der Membranlipide PG und CL in Mitochondrien

S. cerevisiae ist bislang der einzige eukaryote Organismus, aus dem die Gene sowohl für die PGPS als auch die CLS bekannt sind, so dass gezielt Mutanten erzeugt und analysiert werden konnten (Jiang et al., 1997; Chang et al., 1998 A; Chang et al., 1998 B; Dzugasova et al., 1998; Tuller et al., 1998). Im Gegensatz zu Pflanzen und Tieren findet in der Hefe die PG-Biosynthese ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran statt (Dzugasova et al., 1998). Wie Lipidanalysen zeigten, ist PG in *S. cerevisiae* nur in Spuren nachweisbar. Das beruht darauf, dass die PG-Biosyntheserate unter fermentativen Bedingungen gering ist, während unter nicht-fermentativen Bedingungen die Biosyntheserate zwar ansteigt, dass gebildete PG aber vollständig in CL überführt wird (Tuller et al., 1998). Dagegen setzt die pflanzliche CLS lediglich ein Teil des PG zu CL um, so dass in pflanzlichen Mitochondrien neben CL signifikante Mengen an PG (1-5 %) nachweisbar sind (Bligny & Douce 1980; Dorne & Heinz 1989).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass CL eine besondere Rolle in der Atmung spielen muss. Für eine ganze Reihe mitochondrialer Proteine wurden Beweise erbracht, dass diese mit CL *in vitro* assoziiert sind und dieses Lipid benötigen, um ihre katalytisch aktive Konformation auszubilden (zur Übersicht: Schlame et al., 2000). Die entsprechenden CLS-Nullmutanten konnten jedoch selbst unter nicht-fermentativen Bedingungen relativ normal wachsen, wobei sie allerdings, bedingt durch den Defekt in der CLS, PG akkumulieren (Jiang et al., 1997; Tuller et al., 1998; Chang et al., 1998 B). Bei Temperaturen oberhalb von 37° C wurde dann

ein Unterschied deutlich, da die Mutante in Gegensatz zum Wildtyp bei diesen Temperaturen ihre Atmung einstellt (Jiang et al., 1999). Das beruht darauf, dass die Mutante nicht mehr in der Lage ist das Membranpotential an der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen, während die Entkopplung bei normalen Temperaturen nicht auftritt (Koshkin & Greenberg, 2000). Neben dem Mangel an oxidativer Phosphorylierung zeigen die Mitochondrien unter diesem Umständen einen Defekt im Proteinimport (Schlame et al., 2000) und verlieren ihr Genom (Jiang et al., 2000). Die Tatsache, dass die CLS-Mutante bei hohen Temperaturen mitochondriale Defekte aufweist, lässt die Autoren postulieren, dass CL für die genannten Funktionen unter diesen Bedingungen nötig ist, wohingegen unter normalen Bedingungen die Funktion des CL durch PG erfüllt werden kann (Jiang et al., 2000; Koshkin & Greenberg, 2000; Schlame et al., 2000).

Die *S. cerevisiae* PGPS-Mutante zeigt im Vergleich zur CLS-Mutante hingegen wesentlich stärkere Defekte. Bei den PG-defizienten Stämmen handelt es sich um sogenannte "petite negative"-Mutanten. Während man bei Wildtyphefen oder auch der CLS-Mutante durch Ethidiumbromid-Behandlung einen partiellen oder vollständigen Verlust des mitochondrialen Genoms herbeiführen kann, ist dies bei der PGPS-Mutante unmöglich und damit höchstwahrscheinlich letal (Janitor & Subik, 1993; Chang et al., 1998 A). Der Mutante ist es zudem nicht möglich, auf nicht-fermentierbarem Medium oder auf Glukose-Medium oberhalb von 37° C zu wachsen (Janitor & Subik, 1993; Janitor et al., 1995). Weitere Untersuchungen belegen, dass die Mutante eine defekte Elektronentransportkette in den Mitochondrien besitzt, daher weniger ATP produziert und Sauerstoff verbraucht sowie eine stark veränderte Morphologie der Mitochondrien aufweist (Ostrander et al., 2001). Diese Daten stehen im Einklang mit Ergebnissen aus PGPS-defekten Hamsterzellen, die einen vergleichbaren Phänotyp offenbaren (Ohtsuka et al., 1993 A; Ohtsuka et al., 1993 B). Zudem konnten Ostrander et al. (2001) darlegen, dass in den Hefezellen das kernkodierte Protein *cox4* sowie die mitochondrial kodierten Proteine *cox1*, *cox2*, *cox3* und *cob* fehlen, obwohl deren Transkripte nachweisbar waren. Für eine Reihe anderer mitochondrialer Proteine konnte hingegen gezeigt werden, dass die Transkription der entsprechenden Gene sowie die Translation und der Import der Proteine in die Mitochondrien in der Mutante nicht gestört sind. Die Autoren postulieren, dass der Phänotyp der PGPS-Mutante darauf beruht, dass bestimmte Gene für mitochondriale Proteine nicht translatiert werden. Hierbei sind nicht nur die mitochondrial kodierten Proteine, sondern auch die kernkodierte Proteine betroffen. Daher muss sich der Defekt in den Mitochondrien, der auf einer veränderten Membranlipidzusammensetzung, insbesondere der Innenmembran, beruht, in der Weise auf den

Translationsapparat auswirken, dass in der Folge selektiv die Translation bestimmter mRNAs verhindert wird. Dass die betroffenen Proteine nicht akkumulieren, könnte allerdings auch darauf beruhen, dass nicht die Translation, sondern der Import in die Mitochondrien gestört ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass nicht das Markerlipid der Mitochondrien allein, wie zunächst vermutet, für die Funktion der Mitochondrien wesentlich ist, sondern dass die Funktion des CL partiell durch seine Vorstufe PG erfüllt werden kann. Somit führt nicht das Fehlen des CL zu starken Einschränkungen, sondern erst die Abwesenheit von CL und PG bewirkt den Verlust der Atmungsaktivität in den Hefezellen.

1.4 Problemstellung der Arbeit

Die Membranlipide PG und CL sind in vielerlei Hinsicht mit interessanten zellulären Funktionen verbunden. Genetische Untersuchungen in *E. coli* und *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass beide Lipide für einige dieser Funktionen von herausragender Bedeutung sind. Biochemische Versuche mit Proteinen aus fotosynthetisch aktiven Membranen lassen ebenfalls auf eine bedeutende Funktion des PG schließen. Für *Synechocystis* konnte darüber hinaus sogar gezeigt werden, dass dieses Lipid für fototrophes Wachstum essentiell ist.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass PG und CL auch für die vitalen Funktionen pflanzlicher Zellen wesentlich sind. Dies wurde aber durch experimentelle Daten bisher nicht belegt, da pflanzliche Gene, die für PGPS oder CLS kodieren, noch nicht kloniert wurden. Ebenso ist es bisher nicht gelungen, Mutanten mit Defekten in diesen Genen zu identifizieren.

Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Klonierung und Charakterisierung pflanzlicher PGPS-Gene. Hierzu sollten die Datenbanken von *A. thaliana*, deren Genom Ende 2000 vollständig sequenziert war, mit den bekannten Sequenzen für Phosphatidyltransferasen aus pro- und eukaryoten Organismen abgesucht werden. Die offenen Leserahmen der bei diesen Recherchen identifizierten Gene sollten dann mittels PCR aus *A. thaliana*-cDNA amplifiziert und in Mikroorganismen funktional exprimiert werden, um durch enzymatische Untersuchungen die Identität der klonierten Sequenzen experimentell zu verifizieren. Neben der Funktionsanalyse ist auch die Aufklärung der subzellulären Lokalisation der Translationsprodukte ein wichtiger Aspekt, da in pflanzlichen Zellen die PGPS in drei verschiedenen Zellkompartimenten, nämlich Plastiden, Mitochondrien und ER lokalisiert ist.

Durch Klonierung und Überexpression der Gene soll erstmals Zugang zu den pflanzlichen PGPS-Proteinen erhalten werden, über die, abgesehen von ihrer subzellulären Lokalisation, nur sehr wenig bekannt ist und deren Charakterisierung noch aussteht. Darüber hinaus sollte durch die Klonierung der Gene die Voraussetzung geschaffen werden, die PG-Synthese Kompartiment-spezifisch zu hemmen, um somit die Funktion des PG und seines Folgeproduktes CL in pflanzlichem Gewebe zu analysieren

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Chemikalien

Geräte und Verbrauchsmaterial

In der folgenden Liste sind wichtige Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt, die bei dieser Arbeit verwendet wurden.

Elektrophoresekammer 19 cm x 13 cm	Eigenbau
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 5000 TD	Beckmann
Kieselgel-Platten Kieselgel 60, 0,25 mm	Merck
Netzgerät: Power Pack 300	BioRad
Dialyse Rahmen (Durchlass 3500 Da)	Pierce
Waring Blendor	Waring
pH-Meter HI 9321	Hanna Instruments
Nitrocellulosemembran Protran BA 85, 0,45 µm	Schleicher & Schüll
Rotoren SS34, HB6, GS3, SLA3000	Sorvall
Fotometer SmartSpec 3000	BioRad
Sterilfilter Minisarf, 0,2 µm	Sartorius
Thermocycler Primus 96	MWG Biotech
Western Blot "semi dry" Blotting Aparatur	Eigenbau
Ultraschallstab Sonoplus GM70	Bandelin
Dounce Homogenisator	B. Braun
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf
Ultrazentrifuge L-50	Beckmann

Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, stammten alle verwendeten Chemikalien in Analyse-Qualität von den Firmen Biomol (Hamburg), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), sowie Sigma (Deisenhofen). Zum Ansetzen von Lösungen wurde Wasser einer Millipore-Wasseraufbereitungsanlage verwendet (Milli-Q-Watersystem). Radiochemikalien wurden von Amersham (Braunschweig), NEN (Boston) und Hartmann Analytic (Braunschweig) bezogen. Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Gibco BRL (Neu Isenburg), MBI Fermentas (Vilnius), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia Biotech (Freiburg) und Stratagene (Heidelberg).

2.2 Biologisches Material

2.2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

XL1-Blue MRF' (Bullock et al., 1987)

$\Delta(\text{mcrA})$ 183, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, [F'proAB,lac^qZ Δ M15,Tn10(tet^r)]

TOP10 (Invitrogen)

F', mcrA, $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$, $\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, ΔlacX74 , recA1, deoR, araD139, $\Delta(\text{ara-leu})7697$, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

UTL7A (Warnecke et al., 1999)

MAT a, *ura3-52*, *leu2-3,112*, *trp1*

D2000 (Tuller et al., 1998)

MAT a, *ura3-52*, *trp1* Δ 63, *leu2* Δ 1, *his3* Δ 200, *cls1::KanMX4*

2.2.3 Vektoren

Tabelle 3.1: Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Referenz
pUC19	Amp ^R	Messing, (1983); Yannish-Perron et al., (1985)
pBluescript SK(-)	Amp ^R	Stratagene
pGemT	Amp ^R	Promega
pBAD	Amp ^R	Invitrogen
pESC-Leu	Amp ^R , <i>LEU2</i>	Stratagene
pYES2	Amp ^R , <i>URA3</i>	Invitrogen
pQE70	Amp ^R	Qiagen

Restriktionskarten aller verwendeten Vektoren, soweit für das Verständnis erforderlich, finden sich im Anhang.

2.3 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte nach Standardmethoden. Die Bakterien wurden in Flüssigkulturen und auf Agarplatten aus LB-Medium (Sambrook et al., 1989) angezogen.

LB-Medium

1 % Bacto-Pepton (w/v) (Duchefa)

0,5 % Hefeextrakt (w/v) (Duchefa)

1 % NaCl (w/v)

pH 7,2 mit NaOH

für Festmedien 1,5 % Agar (w/v)

Das Medium wurde autoklaviert

Nach dem Autoklavieren wurden in Abhängigkeit der verwendeten Vektoren Antibiotika (Tabelle 2.2) zugegeben, von denen Stammlösungen in Aqua dest. hergestellt, sterilfiltriert und bei -20° C gelagert wurden.

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration im Medium</u>
Carbenicillin	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	25 µg/ml

Zur blau-weiß-Selektion wurden den Festmedien neben dem Antibiotikum folgende Agenzien zugesetzt:

IPTG

200 µM Isopropyl-β-thiogalaktosid
aus Stammlösung 100 mM in Aqua dest.; bei -20° C gelagert.

X-Gal

80 µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal) aus 2 % (w/v) Stammlösung in Dimethylformamid; bei -20° C gelagert.

Die Dichtebestimmung einer Bakterienkultur erfolgte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀).

2.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Präparation der zur Transformation geeigneten kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach einer Methode von Inoue et al. (1990). Zu diesem Zweck wurde von einer Einzelkolonie eine Übernachtskultur in 2 ml SOB-Medium angezogen. Am Morgen wurden 100 ml desselben Mediums mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 kultiviert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 5000 x g und 4° C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment in 40 ml TB-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 10 min auf Eis und einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurden die Zellen in 8 ml TB-Puffer resuspendiert und mit 0,56 ml Dimethylsulfoxid zu einer Endkonzentration von 7 % versetzt. Nach einer letzten

Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Zellen in Portionen zu 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70° C gelagert.

SOB-Medium

2 % Bacto-Pepton (w/v) (Duchefa)

0,5 % Hefeextrakt (w/v) (Duchefa)

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von sterilfiltrierten Magnesiumsalzen aus Stammlösungen zu den angegebenen Endkonzentrationen:

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

TB-Puffer

10 mM Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure] (PIPES), pH 6,7 mit KOH, sterilfiltriert.

55 mM MnCl₂, sterilfiltriert

15 mM CaCl₂, sterilfiltriert

250 mM KCl, sterilfiltriert

2.3.2 Transformation

Zur Transformation wurden die in 2.3.1 hergestellten kompetenten Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen auf Eis langsam aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe der DNA in einem Volumen von maximal 20 µl und eine Inkubation für 30 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42° C im Wasserbad und Zugabe von 800 µl SOC-Medium (SOB-Medium mit 0,4 % (w/v) Glukose) wurden die Zellen für 45 min bei 37° C im Roller inkubiert. Danach erfolgte die Übertragung der Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.3.3 Plasmidpräparationen

Je nach benötigter Reinheit und Menge an Plasmid-DNA wurden zwei unterschiedliche Plasmidpräparationsmethoden angewandt.

2.3.3.1 Minipräparation von Plasmiden

Die hier beschriebene Methode zur Plasmidpräparation aus *E. coli* ist modifiziert nach Riggs & McLachlan (1986). Zur Plasmid-Minipräparation wurden Einzelkolonien transformierter Zellen mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht im Roller bei 37° C angezogen. Am Morgen wurden 1,5 ml der Kultur in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die Zellen bei 20.000 x g für 15 sec sedimentiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Sediment in 200 µl BF-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension für eine Minute im Wasserbad aufgeköcht, für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 45 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Aus dem resultierenden Überstand wurden in einem sauberen Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Zugabe von 500 µl IS-Mix und Inkubation bei RT für 30 min die Nukleinsäuren ausgefällt und anschließend bei 20.000 x g für 30 min sedimentiert. Nach einmaligem Waschen der Nukleinsäuren mit 70 %igem Ethanol wurden diese in 50 bis 100 µl Aqua dest. gelöst und 3 µl RNase A (aus einer Stammlösung von 10 mg/ml RNase A in Aqua dest.) dazugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT konnte die Plasmid-DNA für weitere Untersuchungen verwendet oder bei -20° C gelagert werden.

BF-Puffer

8 % Sucrose (w/v)

0,5 % Triton X-100 (w/v)

50 mM EDTA, pH 8,0

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Lysozym-Lösung

20 mg/ml in Aqua dest., bei -20° C gelagert

IS-Mix

0,83 M Ammoniumacetat in 2-Propanol:Aqua dest. 5:1 (v/v)

vor Gebrauch frisch angesetzt aus 2-Propanol und 5 M Ammoniumacetat in Aqua dest.

2.3.3.2 Maxipräparation von Plasmiden

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde ein säulenchromatographisches Verfahren mittels Ionenaustauschersäulen der Firma Qiagen durchgeführt. Die Reinigung der Plasmid-DNA beruht auf einer selektiven Bindung der DNA an das Säulenmaterial unter hohen Salzkonzentrationen und der Elution der DNA unter Niedrigsalzbedingungen. Im allgemeinen wurden zu diesem Zweck Kulturen in einem Volumen von 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht kultiviert und den Angaben des Herstellers entsprechend aufgearbeitet.

2.4 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden zwei unterschiedliche Medien eingesetzt. Als Vollmedium diente YPD, während als Minimal-Medien CMdum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Ausubel et al., 1995) verwendet wurden. Zum normalen Wachstum auf Platten oder in Flüssigkultur enthielt dieses Medium 2 % Glukose (w/v). Im Falle einer Induktion des galaktoseabhängigen Promotors des *E. coli*-*S. cerevisiae*-shuttle-Vektors pYES2 wurde dem Medium Galaktose in einer Endkonzentration von 2 % (w/v) zugesetzt. Als alternative Kohlenstoffquellen wurden 3 % Milchsäure (pH 5,5 mit NaOH), 3 % Glycerol oder 2 % Raffinose anstelle von Glukose eingesetzt.

YPD

1 % Hefeextrakt (w/v) (Duchefa)

2 % Bacto Pepton (w/v) (Duchefa)

2 % Glukose (w/v)

Die Glukose wurde nach dem Autoklavieren aus einer steriltriierten Stammlösung zugegeben. Für Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2 % Agar (w/v; Duchefa) zugegeben.

CMdum "complete minimal dropout uracil medium" (Ausubel et al., 1995)

700 ml Aqua dest. mit 1,16 g DP und einem NaOH-Plätzchen wurden - für Platten gegebenenfalls mit 2 % Agar (w/v; Duchefa) - autoklaviert.

Danach erfolgte die Zugabe von

100 ml Yeast Nitrogen Base 6,7 % in Aqua dest. (w/v), sterilfiltriert
8,3 ml Leucin (720 mg/100 ml) in Aqua dest., sterilfiltriert
8,3 ml Histidin (240 mg/100 ml) in Aqua dest., sterilfiltriert
8,3 ml Tryptophan (480 mg/100 ml) in Aqua dest., sterilfiltriert
20 ml Uracil (1 mg/ml) in Aqua dest., sterilfiltriert
Kohlenstoffquelle (s.o.) aus 20 bis 50 %iger Stammlösung in Aqua dest., sterilfiltriert
ad 1l mit sterilem Aqua dest.

Im Falle von Transformationen, in denen bezüglich des Uracils ein Selektionsdruck ausgeübt werden sollte, wurde auf die Zugabe von Uracil verzichtet.

DP (Dropout Powder)

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

2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen und zur Transformation von *S. cerevisiae* wurde die im "Pichia pastoris Expression Kit Version F" (Invitrogen) beschriebene PEG-Methode modifiziert. Von einer Einzelkolonie wurde über Nacht eine Kultur in 10 ml YPD bei 30° C inkubiert. Am Morgen wurde aus dieser Kultur die Hauptkultur in 100 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 30° C wurden die Zellen bei 3000 x g und 4° C für 10 min sedimentiert. Nach dem Abgießen des Mediums wurden die Zellen in 50 ml Puffer A resuspendiert, unter identischen Bedingungen erneut sedimentiert

und der Überstand abgegossen. Danach wurden die Zellen in 4 ml Puffer A aufgenommen und in Portionen von 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -70° C eingefroren und gelagert.

Puffer A

1 M Sorbitol

10 mM Bicine, pH 8,35 mit NaOH

3 % Ethylenglycol (v/v)

Der Puffer wurde sterilfiltriert.

2.4.2 Transformation

Zur Transformation der kompetenten Zellen (2.4.1) wurden auf die noch gefrorenen Zellen in einem Volumen von maximal 20 µl bis zu 50 µg DNA gegeben. Dann wurden die Zellen bei 37° C im Wasserbad für 5 min inkubiert. Dabei wurde die Suspension mehrfach durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Puffer B, mit dem die Zellen vorsichtig gemischt wurden. Nach Inkubieren der Ansätze bei 30° C für eine Stunde im Wasserbad wurden die Zellen bei 2000 x g und RT für 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1,5 ml Puffer C suspendiert, worauf die Zellen unter identischen Bedingungen, allerdings für nur 10 min, erneut sedimentiert wurden. Der Überstand wurde wieder entfernt und die Zellen in 200 µl Puffer C resuspendiert. Die Suspension konnte dann auf Festmedien mit ausgewähltem Selektionsdruck ausplattiert werden.

Puffer B

40 % Polyethylenglycol 4000 (w/v) (Sigma)

0,2 M Bicine, pH 8,35 mit NaOH

Der Puffer wurde sterilfiltriert.

Puffer C

0,15 M NaCl

10 mM Bicine, pH 8,35 mit NaOH

Der Puffer wurde sterilfiltriert.

2.5 Dauerkulturen

Von allen Mikroorganismen wurden Dauerkulturen hergestellt. Kulturen von *E. coli* wurden in 2 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C unter entsprechendem Selektionsdruck im Roller inkubiert. Kulturen von *S. cerevisiae* wurden, ebenfalls unter Selektionsdruck, in CMDum-Medium für 48 h geschüttelt. Von den entsprechenden Kulturen wurde dann jeweils 1 ml mit 1 ml sterilfiltriertem 70 %igem Glycerol (in Aqua dest. (v/v)) gemischt und bei -70° C gelagert.

2.6 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Sowohl *A. thaliana* Columbia C24 als auch die Mutante *A. thaliana* Columbia C24 JOV wurden unter sterilen Bedingungen zunächst auf Agarplatten und dann in Flüssigmedium kultiviert. Saatgut für beide Linien wurde freundlicherweise von Dr. Sergei Kushnir (Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die JOV-Mutante wurde von Dr. Sergei Kushnir durch die Promotor-Trapping Methode hergestellt. Bislang ist es nicht gelungen, eine homozygote Linie dieser Mutante herzustellen, da diese Mutante nicht in Erde wachsen kann und es unter *in vitro* Bedingungen nicht zur Blüte kommt. Daher spaltet das F1 Saatgut, welches mir zur Verfügung gestellt wurde, entsprechend dem Mendel'schen Gesetz 3:1 auf. Die Mutante hat einen auffälligen Phänotyp, so dass sie anhand ihrer gelben bis blassgrünen Erscheinung ohne weiteres vom Wildtyp oder heterozygoten Pflanzen unterschieden werden kann.

Samen dieser Pflanzen wurden zur Oberflächensterilisierung zunächst mit 70 %igem Ethanol und dann mit sterilem Aqua dest. gewaschen. Darauf folgte eine Behandlung mit 1 % NaClO (w/v), 0,2 % Tween 20 (v/v) in sterilem Aqua dest. für 5 min unter leichtem Schütteln. Anschließend wurden die Samen 5 bis 6 mal in sterilem Aqua dest. gewaschen. Die so sterilisierten Samen wurden dann in sterilem Aqua dest. aufgenommen und mit einer Pipette möglichst einzeln auf MSG-Platten verteilt. Die Platten wurden für 12 h bei 4° C im Dunkeln gelagert und die Pflanzen dann bei 22° C mit 16 h : 8 h Tag-Nacht-Rhythmus kultiviert. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Keimlinge in Flüssigkultur genommen. Hierbei musste gewährleistet werden, dass die Kulturen der gelben Mutante nicht mit Wildtyp oder heterozygoten Pflanzen verunreinigt wurden. Je nach Größe des Erlenmeyerkolbens wurden 5 bis 25 Keimlinge pro Kolben eingesetzt. Es wurde dann soviel MSG-Flüssigmedium

zugegeben, dass zwar der Kolbenboden, aber nicht die Pflanzen bedeckt wurden. In einem 100 ml Erlenmeyerkolben entsprach das etwa 3,5 ml bei 14 Tage alten Keimlingen. Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt und je nach Wachstum der Pflanzen die Menge erhöht. Unter sehr langsamem Schütteln (20-30 upm) wurden die Pflanzen dann unter den oben genannten Bedingungen kultiviert, wobei es bei Wildtyp-Pflanzen zur Blüte kam.

MSG-Medium:

2,2 g Murashige & Skoog Salz Gemisch, incl. Gamborg Vitamine (Duchefa)

50 g Sucrose

7 g Agar (Duchefa) für Platten

ad 1 l mit Aqua dest. autoklaviert

2.6.1 Präparation von mRNA aus *A. thaliana*

Präparation von Gesamt-RNA

Pflanzliches Material wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und dann mit angemessenen, gleichen Volumina Lysipuffer und Phenol:Trichlormethan 1:1 (v/v) für 20 min bei RT geschüttelt. Dabei wurden jeweils 2 ml/g Pflanzenmaterial eingesetzt. Durch Zentrifugation (10.000 x g, 15 min, RT) wurde eine Phasentrennung erreicht, die wässrige Oberphase wurde erneut mit Phenol:Trichlormethan 1:1 (v/v) ausgeschüttelt und zentrifugiert. Das Volumen der Oberphase wurde ermittelt und diese wurde dann mit 0,75 Volumen 8 M LiCl gemischt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Ansatz zentrifugiert (20.000 x g, 20 min, 4° C), und das Sediment, welches die zelluläre RNA repräsentiert, in möglichst geringem Volumen Aqua dest. aufgenommen. Nach erneuter Fällung der RNA mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 3 Volumen Ethanol bei -20° C für mindestens 2 h wurde die RNA durch Zentrifugation (20.000 x g, 20 min, 4° C) erneut sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und schließlich in Aqua dest. aufgenommen.

Lysispuffer

600 mM NaCl

100 mM Tris/HCl, pH 8

20 mM EDTA

4 % SDS (w/v)

Präparation von mRNA aus Gesamt-RNA

Die Präparation von mRNA erfolgte mit den Oligo-dT-Dynabeads der Firma Dynal und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.2 Membranpräparation aus *A. thaliana*

Zum Nachweis von Enzymen, die an der Membranlipidsynthese beteiligt sind, mussten aus *A. thaliana* Columbia C24 und *A. thaliana* Columbia C24 JOV Membranen isoliert werden. Zum Einen sollten Gesamtmembranen und zum Anderen Differentialsedimente präpariert werden.

2.6.2.1 Präparation von Gesamtmembranen aus *A. thaliana*

Ganze Pflanzen wurden kurz mit Aqua dest. gespült und anschließend in eiskaltem 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4, 1 mM PMSF im Waring Blendor bei maximaler Drehzahl für 60 sec homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann mit dem Ultraschallstab für 5 min bei maximaler Leistung mit 2 sec Pulsbetrieb behandelt und schließlich bei 7.000 x g und 4° C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann zur Ultrazentrifugation (150.000 x g, 4° C, 60 min, Rotor 50.2 Ti) eingesetzt und das Membransediment in 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 aufgenommen, mit Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt und bei -20° C gelagert.

2.6.2.2 Isolierung von Differentialsedimenten aus *A. thaliana*

Zur Isolierung von Differentialsedimenten, die Mitochondrien und Plastiden in angereicherter Form enthalten sollten, wurde wie folgt verfahren. Ca. 20 g Pflanzen wurden zunächst in Aqua dest. gespült und dann für 30 sec mit maximaler Drehzahl im Waring Blendor im Aufschlusspuffer homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch Zellstoff filtriert und der Rückstand erneut homogenisiert und filtriert. Die gesammelten Filtrate wurden bei 3.000 x g, 4° C für 10 min zentrifugiert, um verbliebene Zelltrümmer abzutrennen. Aus dem Überstand wurden dann bei 10.000 x g, 4° C für 15 min intakte Plastiden und Mitochondrien sedimentiert. Das Sediment wurde einmal mit Aufschlusspuffer gewaschen, in 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 aufgenommen, mit Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 % versetzt und als 10.000 x g-Fraktion bei -20° C gelagert. Aus dem 10.000 x g-Überstand wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g, 4° C für 60 min verbliebene Membranen sedimentiert. Diese wurden ebenfalls in 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 und mit Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 % versetzt. Anschließend wurden diese Membranen als 100.000 x g-Fraktionen bei -20° C gelagert. Auf diese Weise konnten die pflanzlichen Organellen zumindest teilweise von anderen zellulären Membranen abgetrennt werden.

Aufschlusspuffer:

0,4 M Sorbitol

10 mM Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure], pH 7,4 mit NaOH

1 mM PMSF

1 mM EDTA

2.6.3 ³²P-Phosphat *in vivo*-Markierung von Phospholipiden in *A. thaliana*

Um festzustellen ob das Phospholipidmuster der *A. thaliana* Mutante vom dem des Wildtyps abweicht, wurde ein *in vivo*-Markierungsversuch mit Na₃[³²P]O₄ durchgeführt. Aus steriler Anzucht wurden 2 bis 3 Pflanzen in einem 50 ml Plastikröhrchen in 3 ml MSG-Medium mit 100 µCi Na₃[³²P]O₄ für 30 bis 480 min inkubiert, wobei lediglich die Wurzeln mit Medium bedeckt waren. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Pflanzen entnommen und in einem 50 ml Plastikröhrchen in ca. 20 ml 0,45 % NaCl (w/v) für 10 min gekocht, um Lipasen zu inaktivieren. Anschließend wurden die Lipide mit 10 ml Trichlormethan : Methanol 1:2 (v/v)

für 8 h extrahiert. Die Extrakte wurden entnommen und aufbewahrt, während die Pflanzen mit 10 ml Trichlormethan : Methanol 2:1 (v/v) erneut extrahiert wurden. Die Extrakte wurden vereinigt und durch Zugabe von 10 ml Trichlormethan und 7 ml 0,45 % NaCl in Aqua dest. (w/v) wurde das Verhältnis Trichlormethan : Methanol : 0,45 % NaCl auf 2:1:0,7 (v/v) eingestellt. Es wurde bis zur Phasentrennung zentrifugiert und die organische Unterphase im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt. Anschließend wurde der Rückstand in Trichlormethan : Methanol 2:1 aufgenommen und die enthaltene Radioaktivität am Szintillationszähler festgestellt. Gleiche Mengen Radioaktivität der unterschiedlichen Proben wurden mit je 50 µg PG, PA, PI, PC, PE und CL (Sigma) versetzt und zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung auf Kieselgel 60 Platten (Merck; Laufmittel, Trichlormethan : Methanol : 25 % NH₃ in H₂O, 60:30:3 (v/v)) aufgetragen. Nachdem die Platten entwickelt waren, konnten am Bioimager FLA3000 (Raytest) die Radioaktivitätsmengen visualisiert und verglichen werden, um anschließend die Phospholipide durch Phosphatidreagenz sichtbar zu machen und zuzuordnen.

Phosphatidreagenz (Dittmer & Lester, 1964)

Lösung 1: 40,1 g Molybdänoxid in 1 l 25 M H₂SO₄ unter Erhitzen lösen.

Lösung 2: 1,78 g Molybdän in 500 ml Lösung 1 unter Erhitzen lösen.

1 Volumen Lösung 1 und 1 Volumen Lösung 2 gemischt mit 2 Volumen Wasser ergibt Phosphatidreagenz. Phosphatidreagenz reagiert spezifisch mit den in den Kopfgruppen der Phospholipide enthaltenen Phosphatresten und färbt diese blau.

2.7 Reinigung, Fällung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Reinigung

Zur Abtrennung von Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen wurden diese einer Phenolextraktion unterzogen. Dazu wurden die Lösungen mit 1 bis 2 Volumina Phenol : Trichlormethan 1:1 (v/v) versetzt, gemischt und bis zur Phasentrennung bei 20.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis an der Grenzschicht der zwei Phasen keine weiße Interphase aus präzipitierten Proteinen mehr sichtbar war. Dann wurde, um in der wässrigen Phase verbliebenes Phenol zu entfernen,

einmal mit Trichlormethan extrahiert, wiederum bis zur Phasentrennung zentrifugiert und die wässrige Oberphase abgenommen.

Fällung

Die Fällung von Nukleinsäuren erfolgte zur Konzentrierung sowie zur Entsalzung. Zur Fällung von Nukleinsäuren wurden diese mit dem 2,5fachen Volumen von 96 %igem Ethanol und einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Nach halbstündiger Fällung bei -20° C erfolgte eine Zentrifugation bei 20.000 x g für 20 min. Der Überstand wurde abgegossen, das Sediment mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das Sediment wurde dann in einem angemessenen Volumen 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 gelöst und die Konzentration und Reinheit bestimmt.

Bestimmung von Konzentration und Verunreinigung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für Nukleinsäurekonzentrationen besteht folgender Zusammenhang (Sambrook et al., 1989):

RNA: 1 OD_{260 nm} = 40 µg/µl

DNA: 1 OD_{260 nm} = 50 µg/µl

Oligonukleotide: 1 OD_{260 nm} = 33 µg/µl

Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen mit Proteinen wurden aus dem Verhältnis OD_{260 nm}/OD_{280 nm} abgeschätzt. Dieser Quotient sollte bei DNA zwischen 1,8 und 1,9 liegen. Bei sehr geringen Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden diese mittels Gelelektrophorese mit DNA-Lösungen bekannter Konzentration bestimmt. Parallel zum Marker wurde ein definiertes Volumen der zu bestimmenden Lösung aufgetragen und die Menge der enthaltenen DNA unter UV-Licht abgeschätzt.

2.8 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen, deren Konzentration sich nach den erwarteten Größen der aufzutrennenden DNA-Fragmente richtete (Sambrook et al. 1989). Die Lösung der Agarose erfolgte durch Aufkochen in TAE-Puffer. Anschließend wurde dem noch flüssigen Gel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 3 µg/100 ml zugesetzt und das Gel in einen Gelträger gegossen. Die

DNA-Proben wurden mit einem Zehntel Vol. 10fach Probenpuffer versetzt und mit einer Feldstärke von ca. 4 V/cm in horizontalen Agarosegelkammern (19 cm x 13 cm) aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte durch Vergleich mit unterschiedlichen Längenstandards.

TAE-Puffer

40 mM Tris/Acetat, pH 7,5

20 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

Ethidiumbromid-Stammlösung

1 mg/ml Ethidiumbromid in Aqua dest. (w/v)

10fach-Probenpuffer

250 mM EDTA, pH 8,0

10 % Ficoll (w/v)

0,25 % Bromphenolblau (w/v)

0,25 % Xylenxyanol (w/v)

DNA-Längenstandard 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas)

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

DNA-Längenstandard 100bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas)

3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaex II-Kit der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller.

2.10 PCR, Primer und Klonierung von PCR-Fragmenten

Die PCR (Polymerasekettenreaktion) dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten. Zusätzlich zur spezifischen Amplifikation bietet diese Technik Möglichkeiten der Modifikation, wie gerichtete Mutagenese oder Anheften von Restriktionsschnittstellen an die amplifizierten Fragmente. Den unterschiedlichen Erfordernissen der Versuche Rechnung tragend, wurden unterschiedliche Polymerasen genutzt. Die wesentlichen Unterschiede liegen in Fehlerrate und Prozessivität der Polymerasen und der Eigenart der Taq-Polymerase, an jedes 3'-Ende eines neu synthetisierten Stranges ein Adenin anzuhängen.

2.10.1 PCR mit Taq-Polymerase

Taq-Polymerase (Gibco BRL) wurde genutzt um Amplifikationen durchzuführen, bei denen die relativ hohe Fehlerrate dieser Polymerase von untergeordneter Bedeutung war. Des Weiteren wurde diese Polymerase genutzt, um Amplifikationen von DNA-Abschnitten durchzuführen, die in einen speziellen Vektor (pGemT, Promega) kloniert werden sollten. Dieser Vektor besitzt einen 3'-Thymidin-Überhang, so dass Taq-amplifizierte Fragmente ohne weitere Modifikation direkt in einen Ligationsversuch eingesetzt werden können. Bei der Amplifikation mit dieser Polymerase wurde von einer Prozessivität von 1.000 nt/min ausgegangen. Ein PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl den Angaben des Herstellers entsprechend folgende Bestandteile:

- 1 bis 100 ng Template-DNA
- 2 µM je Primer
- 1-2 Units Taq-Polymerase
- 1/10 Volumen zehnfach PCR-Puffer
- 0,3 – 30 mM MgCl₂
- je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

2.10.2 PCR mit Pfu-Polymerase

Pfu-Polymerase (Stratagene) wurde genutzt, um offene Leserahmen zu amplifizieren, die in Hefen oder *E. coli* exprimiert werden sollten. Diese Polymerase besitzt eine

Fehlerkorrekturfunktion und hinterlässt glatte Enden. Bei Amplifikation mit dieser Polymerase wurde von einer Prozessivität von 500 nt/min ausgegangen. Ein PCR-Ansatz mit Pfu-Polymerase enthielt im Einzelnen:

1 bis 200 ng Template-DNA
je 0,5 μ M Primer
10 μ l 10fach Pfu-Polymerase Puffer
5 Units Pfu-Polymerase (Stratagene)
je 100 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP
ad 100 μ l mit Aqua dest.

2.10.3 PCR-Programme

Ein Standard-PCR-Programm besteht aus drei Phasen. Begonnen wird mit der Denaturierung des Templates. Diese Denaturierung wurde grundsätzlich für 2 min bei 95° C durchgeführt. Anschließend beginnt die Amplifikation der gewünschten DNA. Diese Phase besteht aus zwei bis drei Einzelschritten, die in 25 bis 35 Zyklen wiederholt werden. Abgeschlossen wird die PCR durch eine verlängerte Synthesephase, bei der unvollständige Kopien vervollständigt werden können. Ein normales PCR-Programm durchläuft folgende Schritte:

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	95° C	2 min
2.	95° C	30 sec
3.	Annealing	45 sec
4.	68-72° C	in Abhängigkeit der Prozessivität der eingesetzten Polymerase und der Länge des zu vervielfältigenden Fragmentes
zyklische Wiederholung von 2. bis 4.		
5.	68-72° C	20 min

Die Annealing-Temperatur richtete sich nach den eingesetzten Primern und berechnet sich nach der "4+2-Regel". Hierbei wurden für jedes im Primer enthaltene Adenin und Thymin 2° C und für jedes enthaltene Guanin oder Cytidin 4° C addiert. Dabei wurden Überhänge wie zum Beispiel Restriktionsschnittstellen, die an das zu amplifizierende Fragment angefügt werden sollten, nicht mitgerechnet. In diesem Fall wurde vielmehr die Amplifikationsphase in zwei Stufen unterteilt. Zunächst wurden bei niedriger Annealingtemperatur für zumeist sieben Zyklen die Restriktionsschnittstellen angefügt, um dann bei entsprechend erhöhter Annealingtemperatur fortzufahren.

2.10.4 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Mittels RT-PCR wurde offene Leserahmen von Genen amplifiziert, die durch computergestützte Sequenzanalyse des Genoms von *A. thaliana* als mögliche Gene erkannt wurden. Da die genomischen Sequenzen bekannt sind, können Fehler die durch die Amplifikation entstanden sind, leicht gefunden werden.

Zu diesem Zweck wurde der "One Step RT-PCR Kit" der Firma Qiagen genutzt. Die Anwendung erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers und die eingesetzten Primer entsprachen den durch den Hersteller gegebenen Erfordernissen. In dieser Reaktion wird der durch reverse Transkription mit MMLV-Polymerase synthetisierte cDNA-Erststrang durch Taq-Polymerase amplifiziert, so dass die PCR-Produkte in den Vektor pGemT kloniert werden konnten.

2.10.5 Primer

Tabelle 2.3: Verwendete Primer (Restriktionsschnittstellen sind fett wiedergegeben; Ziel, Bezeichnet zu amplifizierenden ORF; Mod., angefügte Schnittstellen oder andere Modifikationen; ΔAS, deletierte Aminosäuren am N-terminalen Ende kodierte des Genprodukts; Vek., Vektor für den das Amplifikat genutzt werden sollte; Ende, bezeichnet 5'- (5) bzw. 3'-Ende (3) eines ORF, an das der Primer binden soll; T_M; berechnete Annealing-Temperatur des Oligonukleotids).

Primer	Sequenz	Ziel/Mod./Vek./Ende	T _M
FM1	ATG GCT AAA AAG GAG AGA CCT AG	PIS1/-/pBAD/5	66
FM2	TCA AGG CTT CTG CTG CTT CTC	PIS1/-/pBAD/3	64
FM11	ATG GCT AAA CAG AGA CCG	PIS2/-/pBAD/5	54
FM12	TCA AGG CTT CTT ATG CTG	PIS2/-/pBAD/3	52

FM5	ATG CTC AGA TCC GGT CTG GC	PGPS1/-pBAD/5	64
FM6	CTA CTT CAT TAG TAC TTT CCA TAT C	PGPS1/-pBAD/3	66
4697hisC	GCGGCCGCTAATGGTGATGGTGATGATGCTTC ATTAGTACTTTCC	PGPS1/NotI,HIS ₆ /pYES2/3	74
4696K	GGTACC ATGCTCAGATCCGGTC	PGPS1/KpnI/pYES2/5	70
4697N	GCGGCCGCTACTTC ATTAGTACTTTCC	PGPS1/NotI/pYES2/3	86
132yesf	GGTACC ATGGGTGAAGAAGACACCGCGAC	PGPS2/KpnI/pYES2/5	70
132yesr	CTCGAGCTACTTCTTTAGCAGTACTCTCCATAT C	PGPS2/XhoI/pYES2/3	68
132sph	AGCATGCGTGAAGAAGACACCG	PGPS2/PaeI/pQE70/5	68
132bgl	TAGATCTCTTCTTTAGCAGTACTCTC	PGPS2/BglII/pQE70/3	72
FM3	ATG GCG ATT TAC AGA TCT CTA AG	CLS/-pBAD/5	64
FM4	TTA CCT TAG ATA AGT GAT CCA TG	CLS/-pBAD/3	62
118ECL	AGAGCTCATGGCGATTTACAGATCTCTAAG	CLS/SacI/pYES22/5	88
118XHO	ACTCGAGTTACCTTAGATAAGTGATCCATG	CLS/XhoI/pYES2/3	84
118S1	TGCATGCCGATTTACAGATCTCTAAGAAAG	CLS/PaeI/pQE70/5	84
118S2	TGCATGCAAATCAATCACCGGAAAACAAG	CLS/PaeI,Δ10AS/pQE70/5	84
118S3	TGCATGCCGTTGTTCCACATTTCTC	CLS/PaeI, Δ39AS/pQE70/5	78
118S4	TGCATGCCTGCGACACCTTTGCACT	CLS/PaeI,Δ74AS/pQE70/5	84
118B1	TAGATCTTAGATAAGTGATCCATGTCTG	CLS/BglII/pQE70/3	76
118B2	TGGATCCATGGCGATTTACAGATCTCT	CLS/BamHI/pESC-leu/5	78
118H1	TAAGCTTATGGCGATTTACAGATCTCT	CLS/HindIII/pIB4/5	74
118H2	TAAGCTTTTACCTTAGATAAGTGATCC	CLS/HindIII/pESC-leu/3	72
118B3	TGGATCCTTACCTTAGATAAGTGATCC	CLS/BamHI/pIB4/3	76
118FFL	AAGCATGCCGATTTACCGATCTCTAAG	CLS/PaeI/pQE70/5	78
118F100	AAGCATGCATCTTAGATTGGATCGAATTAG	CLS/PaeI, Δ100AS/pQE70/5	82
118F141	AAGCATGCATGTGCCGAATATGATATCAATG	CLS/PaeI, Δ141AS/pQE70/5	86
118RH	AAAGATCTTAGATAAGTGATCCATGTC	CLS/BglII/pQE70/3	72
118d-g1	CTCTGTGGTT GGATCCT ACCTTGATC	CLS/Korrektur	78
118d-g2	GATCAAGGT AGGATCCA ACCACAGAG	CLS/Korrektur	78
118-del85-ecl	AGAGCTCATGGGCTCTGTTTTGAAAAAAG	CLS/SacI,Δ85AS/pYES2/5	82
118hisC	ACTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGCTTTA GATAAGTGATCC	CLS/XhoI,HIS ₆ /pYES2/3	88
SynF	ATGAATATACCCAACTGGGTAAC	Syn.pgsA/-pBAD/5	64
SynR	TTAGCCAGCCTCGACTTTG	Syn.pgsA/-pBAD/3	58

2.11 Arbeiten mit DNA-modifizierenden Enzymen

2.11.1 Restriktionsenzyme

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Enzyme von New England Biolabs und MBI Fermentas genutzt. Alle Enzyme wurden vom Hersteller mit passenden 10fach Puffern und gegebenenfalls mit BSA-Lösung geliefert. Die Enzyme wurden den Angaben der Hersteller entsprechend eingesetzt. Ein Restriktionsansatz enthielt im Einzelnen:

- zu schneidende DNA
- 1/10 Volumen 10fach Puffer
- ca. 1 Unit Restriktionsendonuklease pro μg eingesetzter DNA
- 1 mg/ml BSA
- mit Aqua dest. auf 1 Volumen auffüllen

2.11.2 Alkalische Phosphatase

Zur Verhinderung der Religation der zwei Enden eines aufgeschnittenen Vektors wurde dieser dephosphoryliert. Die Entfernung der Phosphatreste an den 5'-Enden eines DNA-Fragments wurde enzymatisch mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (MBI Fermentas) vorgenommen. Dieses Enzym wurde, unabhängig vom eingesetzten Puffer, 30 min nach Beginn einer Restriktion zum Reaktionsansatz zugegeben. Des Weiteren wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

2.11.3 Polynukleotidkinase

T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas) wurde zur Phosphorylierung von PCR-Produkten aus Amplifikationen mit Pfu-Polymerase benötigt, da die Primer in der Regel am 5'-Ende nicht phosphoryliert sind und die erhaltenen Fragmente folglich nicht in dephosphorylierte Vektoren ligiert werden können. T4-Polynukleotidkinase benötigt ATP zur Phosphorylierung, das in dem entsprechenden Reaktionspuffer nicht enthalten ist. Daher wurde der bereits ATP

enthaltene Reaktionspuffer der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) verwendet. Ansonsten wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.11.4 Ligase

Zur Ligation wurde die T4-DNA-Ligase von MBI Fermentas benutzt. Um eine optimale Ligation zu gewährleisten, muss das Konzentrationsverhältnis zwischen Vektor- und DNA-Fragment stimmen. Das zu klonierende Fragment sollte bezüglich der Molarität etwa dreimal so hoch konzentriert sein wie der Vektor. In einigen Fällen wurde dieses Verhältnis auf 2:1 oder 1:1 erniedrigt, um ein optimales Ergebnis zu erreichen. Es wurden grundsätzlich 5 ng Vektor pro 1 µl Ligationsansatz verwendet. Weitergehend wurde der Vektor, sofern er selbst hergestellt wurde, an den 5'-Enden dephosphoryliert, um eine Rezyklisierung zu verhindern. Eine Ligation wird bei 16° C für mindestens zwei h oder über Nacht durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthält die folgenden Bestandteile:

- 1 µl T4-DNA-Ligase (10 Units)
- 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer
- 50 ng Vektor
- entsprechende Menge an DNA-Fragment
- ad 10 µl Aqua dest.

2.12 Funktionale Expression

2.12.1 Expression in *E. coli*

Zur funktionalen Expression isolierter Gene in *E. coli* wurden zwei unterschiedliche Expressionssysteme genutzt. Die jeweiligen Leervektoren wurden als Kontrollen mitgeführt.

2.12.1.1 Expression in pBAD (Invitrogen)

Der Expressionsvektor pBAD (Invitrogen) erlaubt die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten, die einen 3'-Adenin Überhang besitzen. Die offenen Leserahmen stehen unter Kontrolle eines durch Arabinose induzierbaren Promotors, der in *E. coli* TOP10 eine Expression erlaubt. Zur Expression wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen) Vorkulturen in 2 ml LB-Medium mit Carbenicillin (50 mg/l) über Nacht angezogen. Von der Vorkultur wurde eine Hauptkultur in 50 ml des gleichen Mediums auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37° C im Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 wurde mit L(+)-Arabinose in einer Endkonzentration von 0,1 % die Expression bei 30° C induziert. Nach 4 h Inkubation auf dem Schüttler wurde die Expression abgebrochen und die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g sedimentiert. Das Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen in 10 bis 20 ml 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann zur Membranpräparation genutzt.

Arabinose-Stammlösung

20 % L(+)-Arabinose (Sigma) in Aqua dest. (w/v), sterilfiltriert.

2.12.1.2 Expression in pQE70 (Qiagen)

Zur Expression in dem Vektor müssen an die offenen Leserahmen mittels PCR geeignete Schnittstellen angefügt werden. Die Umgebung des Startcodons ATG muss in eine PaeI-Schnittstelle (GCATGC) überführt werden, während unter Eliminierung des Stopcodons am 3'-Ende eine BglII kompatible Schnittstelle (BamHI, BclI BglII) eingeführt werden muss. In diesem Fall wird das zu exprimierende Protein um zwei Aminosäurereste in Abhängigkeit von der gewählten Schnittstelle und eine Extension bestehend aus 6 Histidinresten verlängert.

Der Promotor dieses Vektors ist durch IPTG induzierbar und wird durch das Genprodukt lacIq, codiert durch den Hilfsvektor pREP4, reprimiert. Dieses Expressionssystem wurde in *E. coli* XL1Blue eingesetzt. Die Expression erfolgte gemäß den Beschreibungen im vorhergehenden Abschnitt, mit dem Unterschied, dass den Medien zur stabilen Replikation von pREP4 Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 mg/l zugegeben wurde und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet wurde.

2.12.1.3 Membranpräparation aus *E. coli*-Zellen

E. coli Zellsedimente wurden in 2-3 Volumen eiskaltem 10 mM Tris/H₂SO₄, pH7,4, 1 mM PMSF aufgenommen. Dann erfolgte die Zugabe von Glasperlen (durchschnittlicher Durchmesser: 0,2-0,5 mm). Das Gemisch wurde 5 min kräftig gevortext und anschließend gekühlt. Das Volumen wurde durch Zugabe des genannten Puffers auf 15 Volumen eingestellt und auf Eis für 5 min mit 2 sec Pulsbetrieb mit dem Ultraschallstab behandelt. Glasperlen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 5.000 x g, 4° C für 10 min sedimentiert und der Überstand zur Ultrazentrifugation bei 150.000 x g (Rotor Beckmann 50.2 Ti) für 1h bei 4° C eingesetzt. Das dabei entstandene Sediment wurde in 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 aufgenommen, mit Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt, bei -20° C gelagert und im wird folgenden als Membranfraktion bezeichnet.

2.12.2 Expression in *S. cerevisiae*

Die *S. cerevisiae*-Stämme UTL7A (Warnecke et al., 1999) und D2000 (freundlicherweise von Prof. Dr. G. Daum, Universität Graz, Österreich zur Verfügung gestellt; Tuller et al., 1998) wurden mit dem Plasmid pYES2 (Invitrogen) und dessen Derivaten transformiert. Dieser Vektor enthält den zu exprimierenden offenen Leserahmen unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors. Der Vektor pYES2 ohne Insert wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Hefen wurden in 100-500 ml CMdum mit 2 % Glukose (w/v) für 72 h bei 30° C angezogen. Diese Vorkultur wurde genutzt, um eine Hauptkultur von 1 l bis 10 l anzuimpfen. Nach 48 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min bei RT sedimentiert und das Sediment in 2 l bis 12 l CMdum mit 2 % Galaktose (w/v) aufgenommen. In diesem Medium wurden die Zellen für weitere 12 h bei 30° C inkubiert, durch Zentrifugation (5.000 x g, RT) sedimentiert und dann einer Membranpräparation unterzogen.

2.12.2.1 Präparation von Gesamtmembranen aus *S. cerevisiae*

Das Zellsediment wurde einmal mit eiskaltem 10 mM Tris/H₂SO₄, pH7,4 gewaschen, in 2 Volumen desselben Puffers aufgenommen und mit 1 mM PMSF versetzt. Zu dieser Suspension wurde 1 Volumen Glasperlen (s. o.) gegeben. Das Gemisch wurde für 5 min

kräftig gevortext, 5 min auf Eis gekühlt und 5 min bei 3.000 x g und 4° C zentrifugiert. Das Sediment, bestehend aus Zellen und Glasperlen, wurde erneut in Puffer mit PMSF aufgenommen und der Vorgang insgesamt 5 mal wiederholt. Die gesammelten Überstände wurden am Ultraschallstab auf Eis für 5 min mit 2 sec Pulsbetrieb behandelt und anschließend bei 5.000 x g und 4° C für 10 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde dann bei 150.000 x g und 4° C für eine Stunde im Rotor 50.2 Ti (Beckmann) zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde in 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 aufgenommen, mit Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt und als Gesamtmembranfraktion bezeichnet.

2.12.2.2 Präparation von Mitochondrien und Mikrosomen aus *S. cerevisiae*

Die Methode zur Präparation von Mitochondrien und Mikrosomen wurden größtenteils im Labor von Prof. Dr. G. Daum (Technische Universität Graz, Österreich) entwickelt, wo mir freundlicherweise die Möglichkeit gegeben wurde, diese Technik zu erlernen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der enzymatischen Lyse der Hefezellwand durch Zymolyase (WAG Chemie, Hamburg) unter leicht hyperosmotischen Bedingungen und einem Aufschluss der Zellen im Dounce-Homogenisator. Im Anschluss können die Organellen durch Differentialzentrifugation, gewonnen und die mikrosomalen ER- und Golgi-Membranen durch Ultrazentrifugation sedimentiert werden.

Das Zellsediment wurde mit Aqua dest. gewaschen und die Hefezellen bei RT mit 4.000 x g für 5 min sedimentiert. Nach Bestimmung des Zellnassgewicht (ZNG) wurden die Zellen einmal in Puffer A gewaschen (4.000 x g, 5 min, RT), in 1 ml Puffer A pro g ZNG aufgenommen und die Suspension mit frisch eingewogenem DTT auf eine Endkonzentration von 10 mM eingestellt. Die Suspension wurde dann für 10 min bei 30° C geschüttelt, die Zellen geerntet (4.000 x g, 5 min, RT), mit Puffer B gewaschen (4.000 x g, 5 min, RT) und in Puffer B (5,7 ml/g ZNG) aufgenommen. Zur Kontrolle (Nullprobe) wurden 50 µl des Gemisches in 5 ml Aqua dest. in einem Reagenzglas verdünnt, kurz gevortext und auf Eis aufbewahrt. Danach erfolgte die Zugabe von Zymolyase (2 mg/g ZNG) zum übrigen Ansatz und eine Inkubation bei 30° C unter leichtem Schütteln. Die Lyse der Zellwand wurde optisch kontrolliert. 50 µl der Suspension wurden wie oben mit 5 ml Aqua dest. gemischt und dann mit der Nullprobe (s.o.) verglichen. Ist die Zellwand der Hefen ausreichend abgebaut, so platzen die Zellen im Wasser. Während die Nullprobe milchig bleibt, klaren die "späteren"

Proben immer mehr auf. Die Zellwände wurde als ausreichend verdaut angesehen, wenn ein schwarzer Text auf weißem Papier in der Schriftgröße 12 im Vergleich zur Nullprobe deutlich besser durch das Reagenzröhrchen lesbar erschien. Gewöhnlich war dies nach einer 45 minütigen Inkubation der Fall. Die Sphäroblasten wurden sedimentiert (4.000 x g, 5 min, 4° C), einmal in eiskaltem Puffer B und einmal in eiskaltem Puffer C gewaschen (4.000 x g, 5 min, 4° C). Anschließend wurden die Sphäroblasten in Puffer C (1 ml/g ZNG) aufgenommen, mit PMSF zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt und durch 15 Schübe im Dounce-Homogenisator aufgebrochen. Die Sphäroblasten wurden sedimentiert (4.000 x g, 5 min, 4° C), erneut in Puffer C aufgenommen und der Vorgang insgesamt dreimal wiederholt. Die gesammelten Überstände enthielten nun Mitochondrien und mikrosomale Membranen. Durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4° C) wurden die Rohmitochondrien sedimentiert und in Puffer C resuspendiert. Aus dem Überstand wurden Verunreinigungen durch Zentrifugation (20.000 x g, 30 min, 4° C) entfernt und aus dem resultierendem Überstand konnten dann durch Ultrazentrifugation (150.000 x g, 60 min, 4° C, Rotor 50.2 Ti) die mikrosomalen Membranen sedimentiert werden, welche in 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 aufgenommen und mit Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt wurden. Die Rohmitochondrien wurden weiter gereinigt. Durch Zentrifugation (3.000 x g, 7-8 min, 4° C) konnten verbliebene Verunreinigungen mit hoher Dichte sedimentiert werden. Die Mitochondrien im Überstand wurden sedimentiert (10.000 x g, 10 min, 4° C), zweimal mit Puffer C gewaschen (10.000 x g, 10 min, 4° C), in 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4 aufgenommen und mit Glycerol zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

Puffer A

100 mM Tris/HCl, pH 9,4

Puffer B

1,2 M Sorbitol

20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

Puffer C

0,6 M Mannitol

10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4

2.13 Reinigung von PGPS1 und PGPS2

Puffer 1:

600 mM NaCl
100 mM Natriumphosphat, pH 7,4
20 mM Imidazol
20 % Glycerol (w/v)
4 % Triton X-100 (w/v)

Puffer 2:

300 mM NaCl
50 mM Natriumphosphat, pH 7,4
10 mM Imidazol
10 % Glycerol (w/v)
2 % Triton X-100 (w/v)

Puffer 3:

300 mM NaCl
50 mM Natriumphosphat, pH 7,4
30 mM Imidazol
10 % Glycerol (w/v)
2 % Triton X-100 (w/v)

Puffer 4:

300 mM NaCl
50 mM Natriumphosphat, pH 7,4
30 mM Imidazol
10 % Glycerol (w/v)
2 % Triton X-100 (w/v)
100 mM EDTA

Die Enzyme PGPS1 und PGPS2 sollten durch Nickelaффinitätschromatographie gereinigt werden. Beide Proteine wurden mit einem C-terminalen His-Domäne, bestehend aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten, exprimiert. PGPS1 wurde in *S. cerevisiae* und PGPS2 in *E. coli* exprimiert. Gemäß den beschriebenen Methoden wurden großen Mengen Gesamtmembranen aus den Organismen isoliert (0,97 g für PGPS1; 0,15 g für PGPS2). In Abweichung zu den oben beschriebenen Methoden wurden die Membranen hier allerdings nicht in einem Tris-Puffer, sondern in 25 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 50 % Glycerol zu einer Proteinkonzentration von ca. 15 mg/ml resuspendiert. Zur Solubilisierung wurden die Membranfraktionen mit Aqua dest. auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml verdünnt und anschließend mit 1 Volumen Puffer 1 versetzt. Die Solubilisierung erfolgte dann unter leichtem Rühren des Gemisches auf Eis für 30 min. Darauf wurden die Ansätze bei 150.000 x g, 4° C für 60 min zentrifugiert (Rotor 50.2 Ti). Der Überstand wurde abgenommen und auf die Säule (9 ml, Nickel-NTI-Agarose, Qiagen) aufgetragen, die zuvor nacheinander mit je 50 ml 1 M Nickelsulfat, 50 mM Nickelsulfat und Puffer 2 equilibriert wurde. Die Säule wurde mit Puffer 3 gewaschen (50 ml) und anschließend die gebundenen Proteine mit Puffer 4 eluiert. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von ca. 3 ml gebildet und die ersten 10 Fraktionen wurden auf PGPS-Aktivität überprüft. Die aktivsten Fraktionen wurden dann über

Nacht in "Slide-A-Lyser" Dialyse-Rahmen (Durchlass 3,5 kDa, Pierce) gegen 10 mM Tris/H₂SO₄, pH 7,4, 2 % Triton X-100 (w/v) dialysiert, bei 150.000 x g, 4° C für 60 min zentrifugiert, die Überstände in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80° C gelagert.

2.14 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden mit dem Protein Assay Kit (BioRad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Triton X-100 enthaltende Proben wurden mit dem Protein Assay DC Kit (BioRad), ebenfalls nach den Angaben des Herstellers, durchgeführt. In beiden Fällen diente BSA (New England Biolabs) als Standard.

2.15 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer vertikalen Gelelektrophoreseapparatur (Mini-Protean II oder Mini-Protean III, Bio-Rad). Für die Aufbereitung der Gele und Durchführung der Elektrophorese wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung	Zusammensetzung
A	30 g Acrylamid; 0,8 g N,N'-Bisacrylamid ad 100 ml Aqua dest.
B	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (Trenngelpuffer)
C	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (Sammelpuffer)
D	20 % (w/v) SDS
E	10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat, frisch ansetzen)
F	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)

Für zwei Gele wurden die Lösungen nach folgendem Schema pipettiert und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED ausgelöst.

Lösung	Trenngel (12,4 %)	Sammelgel (5 %)
A	4 ml	0,83 ml
B	2,5 ml	-
C	-	1,25 ml
Aqua dest.	3,3 ml	2,77 ml
D	50 µl	25 µl
E	100 µl	50 µl
F	10 µl	10 µl

Zur Aufarbeitung der Proteinfractionen wurde eine definierte Menge Protein in 200 µl Aqua dest. mit 50 µl 40 % Trichloressigsäure (w/v) für 15 min auf Eis oder mit 800 µl Aceton über Nacht bei -80° C gefällt und 15 min bei 20.000 x g sedimentiert. Die Sedimente wurden in 1 x Probenpuffer aufgenommen und der pH gegebenenfalls durch Zugabe von 1 bis 2 µl 1 M Tris eingestellt. Anschließend wurden die Proteine durch 3-5 min Kochen bei 95° C denaturiert. Von diesen Ansätzen konnten maximal 20 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen werden. Zur Abschätzung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurden als Standardproteingemische der Molekulargewichtsstandard A ("Low Molecular Weight Protein Standard", Pharmacia) oder B ("Prestained Low Range Molecular Weight Marker", Biorad) eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde während des Einlaufens der Proben bis zum Trenngel bei 35 mA und anschließend etwa 1 h bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt.

Die Proteine wurden im Gel nach Meyer & Lamberts (1965) durch einstündige Inkubation in 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung (w/v) mit 30 % Methanol (v/v) und 10 % Eisessig (v/v) gefärbt, zur Entfärbung des Hintergrundes 1 h in der gleichen Lösung ohne Coomassie Brilliant Blue G-250 inkubiert, in Aqua dest. gewaschen und, in Plastikfolie eingeschweißt, bei 4° C gelagert.

SDS-Probenpuffer

5,8 ml Aqua dest.

1,2 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

1 ml 20 % SDS (w/v)

1 ml Glycerol

in 950 µl Aliquots bei - 20° C lagern, vor Gebrauch 50 µl β-Mercaptoethanol zusetzen

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris/HCl, pH 8,3

192 mM Glycin

0,1 % SDS (w/v)

2.15.1 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen und Detektion

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine in einem Semi-Dry-Elektroblotverfahren (Kyse-Andersen, 1984) auf hydrophobe Nitrocellulosemembranen (Schleicher und Schüll) transferiert. 6 Filterpapiere (Schleicher & Schüll, GB004) und 2 Nitrocellulosemembranen wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. 2 Filterpapiere wurden in Anodenpuffer 1, ein Filterpapier und die Nitrocellulosemembranen wurden in Anodenpuffer 2 sowie 3 Filterpapiere in Kathodenpuffer equilibriert. Nachdem das Gel kurz in Kathodenpuffer gewaschen wurde, erfolgte der Aufbau des Blots. Die untenliegende Anode der Blotapparatur (Eigenbau) wurde mit Anodenpuffer 1 benetzt. Darauf wurden die Filterpapiere, Membranen und das Gel wie folgt gestapelt:

Kathode (-)

3x Filterpapier (Kathodenpuffer)

Gel (Kathodenpuffer)

2x Nitrocellulosemembran (Anodenpuffer 2)

1x Filterpapier in Anodenpuffer 2

2x Filterpapier Anodenpuffer 1

Anode (+)

Die Blotdauer betrug 1 h bei 2 mA/cm^2 . Zur Überprüfung des vollständigen Transfers wurde das Gel anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt. Zur Detektion von Proteinen mit His-Domäne wurde die Nitrocellulosemembran unter Schütteln bei RT mindestens 1 h in ca. 30 ml Blockinglösung (10 % (w/v) Milchpulver in TTBS) inkubiert, bevor anschließend die Inkubation mit ca. 20 ml der ersten Antikörperlösung (1 μg monoklonaler Antikörper gegen His-Domäne (Qiagen) pro ml Antikörperpuffer) für 2-3 h bei RT bzw. über Nacht bei 4° C erfolgte. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TTBS-Puffer wurde die Membran in 20 ml der zweiten Antikörperlösung (Peroxidase-konjugiertes

"Ziege-anti-Maus"-IgG, Dianova, 1:4000 verdünnt in Antikörperpuffer) für mindestens 1 h bei RT inkubiert, erneut in TTBS-Puffer gewaschen und mit Chemolumineszens-Substrat (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) inkubiert, bis spezifische Banden am Chemolumineszenzdetektor (LAS1000, Raytest) sichtbar wurden.

Anodenpuffer 1

0,3 M Tris/HCl, pH 10,4

Anodenpuffer 2

25 mM Tris/HCl, pH 10,4

Kathodenpuffer

40 mM Aminohexansäure

25 mM Tris/HCl, pH 9,4

TTBS-Puffer

20 mM Tris/HCl, pH 7,5

500 mM NaCl

0,05 % Tween 20 (v/v)

Antikörperpuffer

0,5 % Milchpulver (w/v) in TTBS

2.16 Enzymtests

2.16.1 Phosphatidylglycerophosphat-Synthase

Die PGPS katalysiert den Transfer des Phosphatidylrestes aus CDP-Diacylglycerol auf Glycerol-3-phosphat. Bei dieser Reaktion entsteht Phosphatidylglycerolphosphat. In einem Volumen von 100 µl wurden 5 ng bis 50 µg Protein eingesetzt. Des Weiteren enthielt der Test folgende Substanzen:

100 mM Bis-Tris-Propan/HCl, pH 8,5

10 mM MnCl₂

100 µM Glycerol-3-phosphat

5 % Glycerol (w/v)

0,05 µCi [U-¹⁴C] Glycerol-3-phosphat (entspricht 3,2 µM, 154 mCi/mmol, Amersham Pharmacia)

1 % Triton X-100 (w/v)

100 µM CDP-Diacylglycerol (Sigma)

10 mM DTT

Der Enzymtest wurde bei 30° C für maximal 1 Stunde durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,2 ml Trichlormethan : Methanol 1:1 (v/v) und 0,6 ml Salzlösung gestoppt. Nachdem kurz gemischt und bei geringer Drehzahl zentrifugiert wurde, konnte die organische Unterphase direkt zur Szintillationszählung in 10 ml Optiphase Hisafe II (Perkin Elmer) eingesetzt werden. Da keinerlei radioaktives Substrat in der Unterphase auftrat, konnte auf einen Reinigungsschritt durch Dünnschichtchromatographie verzichtet werden.

Salzlösung

1 M KCl

0,2 M H₃PO₄

2.16.2 Phosphatidylinositol-Synthase

Die PIS katalysiert den Transfer des Phosphatidylrestes aus CDP-Diacylglycerol auf *myo*-Inositol. In die Reaktion wurden in einem Volumen von 100 µl 5 ng bis 50 µg Protein eingesetzt. Als weitere Chemikalien wurden zugegeben:

50 mM Tris/HCl, pH 8

2,5 mM MnCl₂

5 % Glycerol (w/v)

0,3 % Triton X-100 (w/v)

0,1 mM CDP-Diacylglycerol (Sigma)

47 nM *myo*-[2-³H]Inositol (21 Ci/mmol, NEN, Boston)

Alternativ wurden unmarkiertes *myo*-Inositol (Endkonzentration 100 μ M) und CDP-Diacyl-[U- 14 C]glycerol (Endkonzentration ca. 0,02 μ Ci; freundlicherweise von Prof. Dr. M. Frentzen zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Der Enzymtest wurde bei 30° C für maximal 1 Stunde durchgeführt und anschließend wie im vorangegangenen Abschnitt gestoppt und ausgewertet.

2.16.3 Phosphatidylserin-Synthase

Die PSS katalysiert den Transfer des Phosphatidylrestes von CDP-DAG auf L-Serin, wodurch PS entsteht. Diese Reaktion wurde in 100 μ l mit 1-20 μ g Protein durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus den aufgeführten Chemikalien und wurde nach Vincent et al. (2001) modifiziert.

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

0,3 % Triton X-100 (w/v)

0,1 mM CDP-Diacylglycerol (Sigma)

10 mM MgCl₂ oder MnCl₂

5 % Glycerol (w/v)

7.6 μ M L-[U- 14 C]Serin (131 mCi/mmol, Hartmann Analytic)

Der Enzymtest wurde bei 30° C für maximal 1 Stunde durchgeführt und anschließend wie im vorangegangenen Abschnitt gestoppt und ausgewertet.

2.16.4 Phosphatidylcholin-Synthase

In diesem Enzymtest wird der Transfer des Phosphatidylrestes aus CDP-DAG auf Cholin überprüft. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß Sohlenkamp et al. (2000) modifiziert. Dieser Mechanismus der PC-Synthese wurde erst kürzlich entdeckt (Sohlenkamp et al., 2000) und unterscheidet sich deutlich von dem bekannten Mechanismus, bei dem der Phosphocholinrest aus CDP-Cholin auf Diacylglycerol übertragen wird. Das in diesen Versuchen eingesetzte CDP-Diacyl-[U- 14 C]glycerol wurde aus L-[U- 14 C]Glycerol-3-phosphat synthetisiert und freundlicherweise von Prof. Dr. M. Frentzen zur Verfügung

gestellt. Bis zu 50 µg Protein wurden in 100 µl Endvolumen mit den folgenden Chemikalien eingesetzt:

25 mM Tris/HCl, pH 8
0,01 % Triton X-100 (w/v)
3 mM MnCl₂ oder MgCl₂
3 µM CDP-Diacyl-[U-¹⁴C]glycerol (154 mCi/mmol)
1 mM Cholin (Sigma)

Der Enzymtest wurde bei 30° C für maximal 1 Stunde durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde, wie oben beschrieben, gestoppt und die organische Unterphase im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in ca. 50 µl Trichlormethan : Methanol 2:1 aufgenommen, mit 50 µg PC versetzt und dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60 Platten (Merck) im Laufmittel Trichlormethan : Aceton : Methanol : Eisessig : H₂O 90:50:20:20:10 (v/v) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte zum Einen durch Visualisierung der Radioaktivität an einen Bioimager FLA3000 (Raytest) und zum Zweiten durch Besprühen der Platte mit Phosphatidreagenz, Abkratzen der sichtbaren PC-Bande und Bestimmung der darin enthaltenen Radioaktivität am Szintillationzähler.

2.16.5 Cardiolipin-Synthase

Dieser Enzymtest ist geeignet, den Transfer des Phosphatidylrestes aus CDP-Diacylglycerol auf PG nachzuweisen und wurde nach Frentzen & Griebau (1994) modifiziert. Das in diesen Versuchen eingesetzte CDP-Diacyl-[U-¹⁴C]glycerol wurde aus L-[U-¹⁴C]Glycerol-3-phosphat synthetisiert und freundlicherweise von Prof. Dr. M. Frentzen zur Verfügung gestellt. Ein Reaktionsansatz beinhaltete die folgenden Reagenzien:

250 µM PG (aus Ei-Lecithin, Sigma)
50 mM Bis-Tris-Propan/HCl, pH 8,8
16 mM MnCl₂
3 µM CDP-Diacyl-[U-¹⁴C]glycerol (154 mCi/mmol)
10 mM DTT

Der Enzymtest wurde bei 30° C für maximal 1 Stunde durchgeführt, wie bereits beschrieben gestoppt und mit 50 µg authentischem Cardiolipin (Sigma) versetzt. Die organische Unterphase wurde im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 50 µl Trichlormethan : Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen und dünnenschichtchromatographisch in Trichlormethan : Aceton : Methanol : Eisessig : H₂O 90:50:20:20:10 (v/v) auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Merck) aufgetrennt. Nach der Entwicklung wurde die Kieselgelplatte mit Phosphatidreagenz besprüht, die sichtbare Cardiolipinbande abgekratzt und die enthaltene Radioaktivität durch Szintillationszählung (s.o.) bestimmt.

2.16.6 Monogalaktosyldiacylglycerol-Synthase

Dieser Enzymtest ist geeignet, um den Transfer von Galaktose aus UDP-Galaktose auf *sn*-1,2-Diacylglycerol nachzuweisen. In Glasröhrchen wurden 0,5 µl UDP-[U-¹⁴C]Galaktose (entspricht 0,01µCi, 278 mCi/mmol; NEN) bis zur Trockene eingedampft und danach erfolgte die Zugabe der aufgeführten Reagenzien:

50 mM Tris/HCl, pH 8

bis zu 20 µg Membranprotein

ad 100 µl mit Aqua dest.

Die Zugabe des Substrates Diacylglycerol ist nicht notwendig, da in den Membranen bereits ausreichende Mengen enthalten sind. Der Enzymtest wurde bei 30° C für maximal 1 Stunde durchgeführt, wie bereits beschrieben gestoppt und die in der organischen Unterphase enthaltene Radioaktivität am Szintillationszähler bestimmt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Phosphatidyltransferasegene im Genom von *A. thaliana*

Zur Identifizierung und Isolierung von Genen für CDP-DAG-abhängige Phosphatidyltransferasen aus Pflanzen stehen eine Reihe von Informationen zur Verfügung. Zum einen wurde die Sequenz des Genoms von *A. thaliana* im Laufe dieser Arbeit komplettiert und in internationalen Gendatenbanken zur Verfügung gestellt, und zum anderen sind eine ganze Reihe von Phosphatidyltransferasegenen unterschiedlichster Herkunft bereits beschrieben und kloniert worden. Mit den bekannten Phosphatidyltransferasesequenzen aus dem Dendrogramm in Abb. 3.1 wurden daher Datenbanken abgesucht und hierbei fünf *A. thaliana* Gene identifiziert. Wie in Abb. 3.1 dargestellt, weisen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der fünf *A. thaliana*-Gene deutlich größere Ähnlichkeiten zu Phosphatidyltransferasen des DGAR-Typs als zu denen des HKD-Typs auf. Interessanterweise enthält das Genom von *A. thaliana* keine Gene, die für Proteine aus der HKD-Gruppe kodieren und gleichzeitig Ähnlichkeiten zu Phosphatidyltransferasen zeigen. Hingegen finden sich einige Transkriptionsfaktoren der Homöobox-Leucin-Zipper-Klasse, welche das HKD-Motiv enthalten. HAT3 (Homöobox *Arabidopsis thaliana*; Abb. 3.1) hat von allen HAT-Proteinen die höchste Ähnlichkeit zu den Phosphatidyltransferasen. Weitere Sequenzanalysen ließen es allerdings für äußerst unwahrscheinlich erscheinen, dass diese Gene Phosphatidyltransferasen kodieren, da HAT3 weitaus höhere Ähnlichkeiten zu anderen HAT-Proteinen (HAT1 bis HAT7) und Transkriptionsfaktoren besitzt. Eine weitere Klasse von Proteinen, die ein bis zwei HKD-Motive enthalten, sind die Phospholipasen des D-Typs (PLD). In gewisser Weise handelt es sich auch bei diesen Enzymen um Phosphatidyltransferasen, denn diese katalysieren den Transfer des Phosphatidylrestes auf Wasser oder, unter *in vitro*-Bedingungen, auch auf Methanol, Ethanol, Propanol oder Butanol (Munnik et al., 1995). Allerdings beschränken sich die Ähnlichkeiten der PLDs zu den Phosphatidyltransferasen allein auf das HKD-Motiv. Alle möglichen Phosphatidyltransferasen aus *A. thaliana* gehören also zu der Gruppe von Proteinen, welche das sogenannte CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv (Dx₂DGx₂ARx₈Gx₃Dx₃D) enthalten. Die fünf identifizierten Gene können aufgrund der Sequenzähnlichkeiten drei Gruppen zugeordnet werden. Demnach werden diese Proteine mit PIS1 (AAG52009.1), PIS2 (CAB37513.1), PGPS1 (AAC28995.1), PGPS2 (CAB82698.1) und CLS (AAD03458.1) bezeichnet (Tab. 3.1).

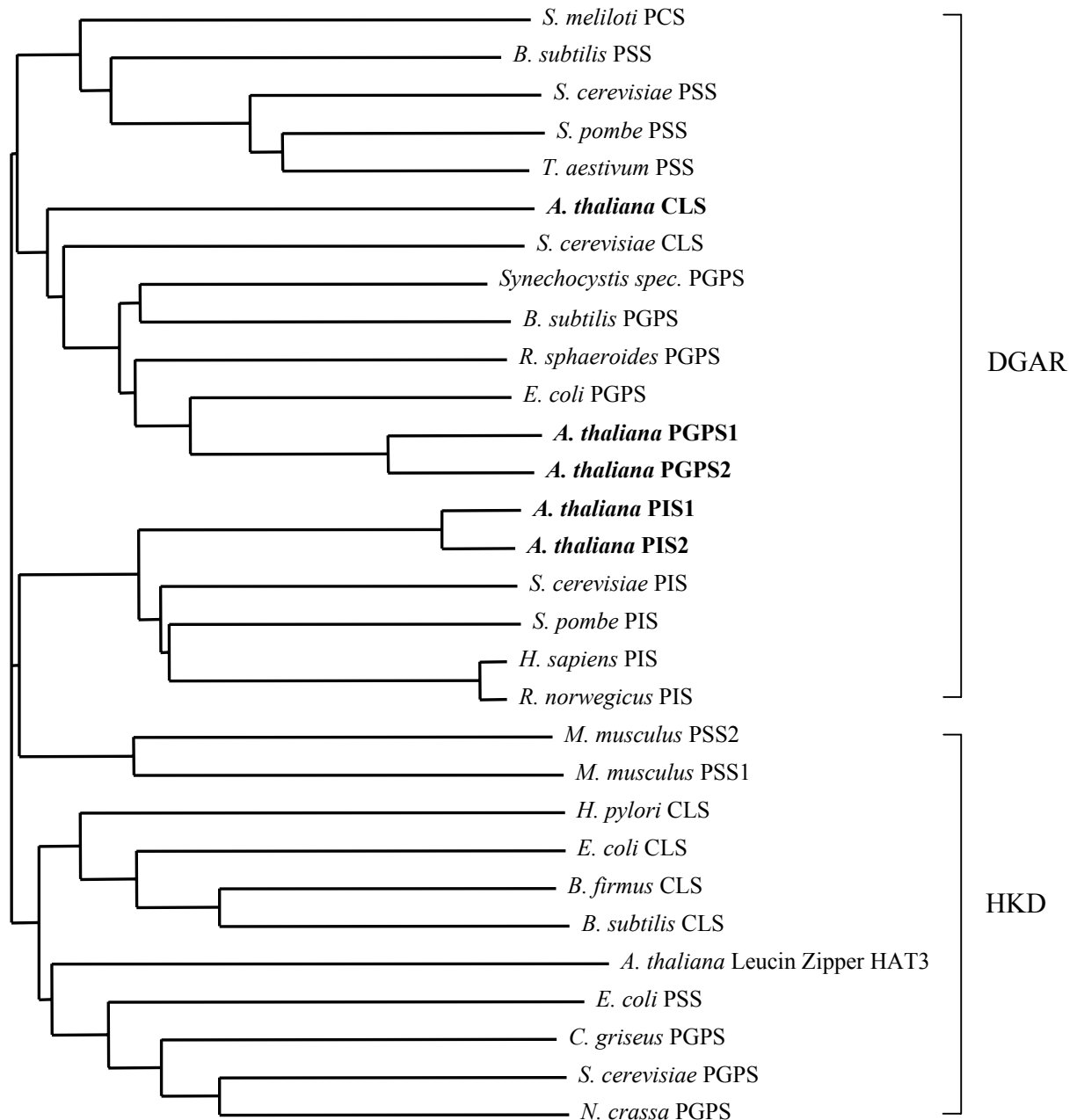


Abb. 3.1: Dendrogramm berechnet aus Aminosäuresequenzen ausgewählter Phosphatidyltransferasen. Die Berechnung erfolgte mit ClustalX (Thompson et al., 1997) und die Darstellung mit Treeview (Version 1.5.2; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>). (Accession Nr.: *S. meliloti* PCS: AF247564.1; *B. subtilis* PSS: P39823; *S. cerevisiae* PSS: P08456; *Schizosaccharomyces pombe* PSS: g3790257; *Triticum aestivum* PSS: U91983; *A. thaliana* CLS: AF118223; *S. cerevisiae* CLS: ydl142c; *Synechocystis spec.* PGPS: D90914; *B. subtilis* PGPS : P46322; *R. sphaeroides* PGPS: U29587; *E. coli* PGPS: P06978; *A. thaliana* PGPS1: AC004697; *A. thaliana* PGPS2: AL132970; *A. thaliana* PIS1: AJ000539; *A. thaliana* PIS2: AL35540; *S. cerevisiae* PIS: P06197; *S. pombe* PIS: Q10153; *Homo sapiens* PIS: gi2338731; *Rattus norvegicus* PIS: D82928; *Mus musculus* PSS2: AF099053; *M. musculus* PSS1: AF042731; *Helicobacter pylori* CLS: AE001456; *E. coli* CLS: U24197; *Bacillus firmus* CLS: U88888; *B. subtilis* CLS: P45860; *A. thaliana* Homöobox Leucin Zipper HAT3: AL138646; *E. coli* PSS: P23830; *Critilegus griseus* PGPS: AB016930.1; *S. cerevisiae* PGPS: ycl004w; *Neurospora crassa* PGPS: AL353820.2.)

Tabelle 3.1: Das Genom von *A. thaliana* enthält 5 Gene, die mögliche Phosphatidyltransferasen des DGAR-Typs kodieren. Die Gene sind über 4 der 5 Chromosomen von *A. thaliana* verteilt. Accession Nummern für EST-Klone und BAC-Klone als auch die Protein IDs sind genannt. Außerdem sind die Längen der vorhergesagten ORFs und Polypeptide sowie die errechneten Werte für deren molekulare Masse (Mol. Masse) und den isoelektrischen Punkt (pI) gegeben. In der letzten Spalte werden die Proteine anhand ihrer Ähnlichkeiten zugeordnet.

Chromosom	EST	BAC	ORF [bp] - Polypeptid [AS]	Protein ID	Mol. Masse [kDa]	pI	Mögliche Funktion
1	AJ000539	AC012563, T23K23	684 227	AAG52009.1	25,86	8,58	PIS1
4	-	AL35540, F20M13	675 224	CAB37513.1	25,47	8,58	PIS2
2	AB048535.1	AC004697, T16B24, F12L6	891 296	AAC28995.1	32,16	10,65	PGPS1
3	AF370186.1	AL132970, T15C9	702 233	CAB82698.1	25,22	9,96	PGPS2
4	-	AF118223, T4B21	936 311	AAD03458.1	34,68	10,45	CLS

Die Einteilung der fünf Gene in drei Gruppen spiegelt sich ebenfalls in deren Exon-Intron-Struktur wieder (Abb. 3.2). Es ist ersichtlich, dass die Spleißmuster der möglichen PISs auf der einen Seite und der möglichen PGPSs auf der anderen Seite erstaunliche Übereinstimmung aufweisen. PIS1 als auch PIS2 setzen sich jeweils aus 10 Exons zusammen und in beiden Fällen erstreckt sich das CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv der korrespondierenden Proteine über die Exons 3 bis 7. Die Länge und Verteilung der Exons ist offenbar konserviert. Im Gegensatz dazu weisen beide mögliche PGPSs 6 kodierende Exons auf. Mit Ausnahme des ersten Exons sind die übrigen aus PGPS1 und PGPS2 nahezu identisch. Auch hier ist die Lage des CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motivs offenbar konserviert. Das erste Exon des Gens für PGPS1 ist deutlich länger als jenes im Gen für PGPS2. Die mögliche CLS lässt sich aufgrund seiner Exon-Intron-Struktur keiner der beiden Gruppen zuordnen. Das Gen besteht aus 7 Exons und das CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv ist auf ein Exon konzentriert. Damit bestehen diesbezüglich keine offensichtlichen Zusammenhänge zwischen CLS und den anderen 4 Genen.

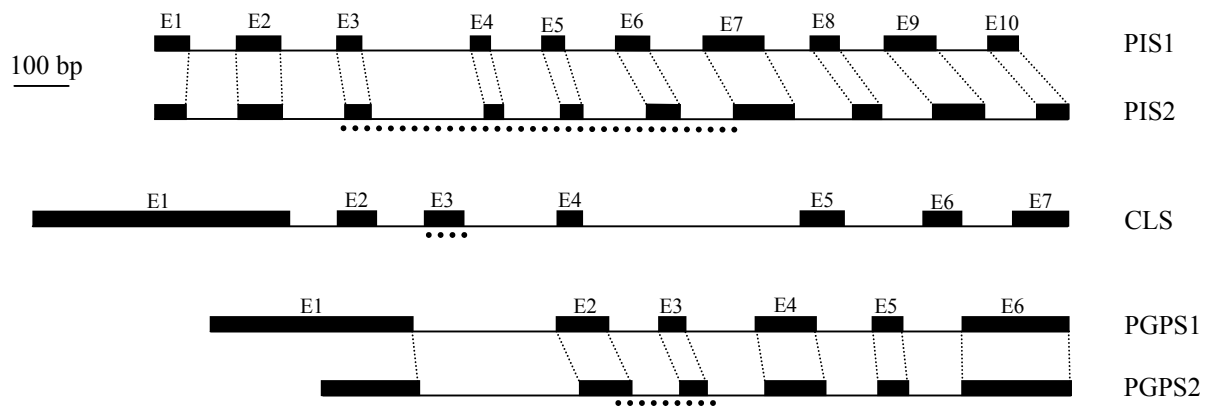


Abb. 3.2: Maßstabsgetreue Darstellung der Exon-Intron-Struktur der möglichen Phosphatidyltransferasen aus *A. thaliana*. Die gepunktete Linie bezeichnet den Bereich, der das CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv in den korrespondierenden Proteinen abdeckt. Die Exons sind mit E1 bis E10 kenntlich gemacht und entsprechen den Balken, während dünne Linien für Introns stehen.

Weitergehende Ähnlichkeiten in der genomischen Organisation zwischen den fünf Phosphatidyltransferasegenen aus *A. thaliana* konnten allerdings nicht festgestellt werden. Eine Analyse der flankierenden Gene aller fünf möglichen Phosphatidyltransferasegene erbrachte keine Hinweise für eine möglichen Duplikation der offenbar homologen Genpaare (Abbildung im Anhang).

3.2 Phosphatidylinositol-Synthasen aus *A. thaliana*

Wie in Abb. 3.3 dargestellt, besitzen die beiden möglichen PISs aus *A. thaliana* hohe Aminosäuresequenzähnlichkeiten. Sie unterscheiden sich nur in 27 Aminosäureresten. Für beide Proteine wurden mit TM Predict (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) vier transmembrane Helices in übereinstimmenden Positionen berechnet. Die *A. thaliana*-Proteine zeigen Sequenzähnlichkeiten zu den PISs aus eukaryoten Organismen (Abb. 3.3) und besitzen fast identische Längen, Massen und isoelektrische Punkte (Tab. 3.1), was die Vermutung nahe legt, dass die beiden *A. thaliana*-Gene für PISs kodieren. Dies sollte durch heterologe Expression in *E. coli* experimentell verifiziert werden.

```

A. thaliana PIS1 : -MAKKERPRPEKLSVYLYIPN-----IVGYMRVLLNCVAFVCF
A. thaliana PIS2 : -...Q---..AT.....I..S...
H. sapiens PIS   : -----MPDENIF.FV.....LI..A.IVFAIIS.YFMP
R. norwegicus PIS : -----MPEENIF.FV.....LI..A.IVFAIIS.YFMP
S. pombe PIS     : ----MRVKFLKLSNDFPFCSGQAMSGVLDTFILTLC.L.FT..F.VLISLYFMS
S. cerevisiae PIS : MSSNSTPEKVTAEH.LW.....KI..V..ITAALS.F.MK
                                     G R

A. thaliana PIS1 : SNKPFSVLYFFSFCCDAVDGWVARRFNQVSTFGAVLDMVTDREVSTACLLVIL
A. thaliana PIS2 : ...T...L.....C..K.....
H. sapiens PIS   : CCPLTA.SF.LL.GLL..F..HA..AL..GTR...M...L...C..M...N.
R. norwegicus PIS : CCPETA.SF.LL.GLL..F..HA..AL..GTR...M...L...CA.M...N.
S. pombe PIS     : WHPNYCTIV.LY.SLL..F...A..KLH.ATN...I.....CA.S...CF.
S. cerevisiae PIS : NHPTA.TW...ST.CLL..L..TM..KY....SL.....S...G.MCF.
                   Y S DA DG AR Q GA LDM TDR T L L

A. thaliana PIS1 : SQIY-RPSLVFLSLLALDIASHWLQMYSTFLAGKSSHKDVKDSTSWLFRLLYYG
A. thaliana PIS2 : ....-.....S..T.....
H. sapiens PIS   : ALL.PGAT.F.QISMS..V....HLH.SVVR.SE...MIDL.GNPVL.I..T
R. norwegicus PIS : ALL.P.AT.L.QLSMS..V....HLH.SVVR.SE...MIDL.GNPVL.I..T
S. pombe PIS     : CAA.PKYAII.QL.VS..L...YMH....LHQ.A...T.TKKHN.ML....
S. cerevisiae PIS : CVQ.PQWCVF.QLM.G...T..YMH..ASLS...T...S.GEGE.R.LH...T
                   Y F LD SH G SHK YY

A. thaliana PIS1 : NRIFMCYCCVSCEVLYIILLIIAKN-QSENLLN-----VVVATLTQISPLS
A. thaliana PIS2 : ..M..G.....T.-.T...M-----KS.M.....
H. sapiens PIS   : S.PAFTL.AGN.LF.CL.Y.FHFS--EGP.VG-----SVG.FRMG---
R. norwegicus PIS : S.PAFTL.AGN.LF.CL.Y.FNFS--EGP.VG-----SVG.FRMG---
S. pombe PIS     : .NKVLFIF.AAN.MFFVA.Y.LSETPRTPPK.GYLPVPSFIYSTGELPL.YPT
S. cerevisiae PIS : R.DVLETTI.AFN.LF.AG.Y.QLFS--NSATFG-----KWT---
                   C E L L

A. thaliana PIS1 : FLLALTLEFGWSMKQTINVIQMKTAAADVCLYDIEKQKQP----
A. thaliana PIS2 : L...SI....I..I.....H.KP---
H. sapiens PIS   : --.WV.APIALL.SL.S..HLI...RNMAAL.AADR-AKKK--
R. norwegicus PIS : --.WI.APIALL.SI.S..HLV...RNMAAL.AADR-AKKK--
S. pombe PIS     : L.AV.CGPICLA..I...V.LVN..NAL.KM.V.QRRAAKKLQ
S. cerevisiae PIS : --TIISFP.YVF...A..V.L.R..LILADN.AKNANEKNKTY
                   K V AA D

```

Abb. 3.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen eukaryoter PISs mit denen der beiden möglichen PISs aus *A. thaliana*, berechnet mit ClustalX. PIS1 stellt die Referenzsequenz dar. Punkte bezeichnen Positionen, in denen die jeweilige Sequenz mit PIS1 übereinstimmt. Unterhalb der Sequenzen sind jene Aminosäurereste aufgeführt, die in allen Proteinen enthalten sind (Ac.-Nr. der Sequenzen siehe Abb. 3.1).

Hierzu wurden die ORFs durch PCR amplifiziert, in den Vektor pBAD (Invitrogen) kloniert (Plasmidkarten im Anhang) und in *E. coli* TOP10 transformiert. Aus den transgenen Bakterien, die eines der beiden Gene oder den Leervektor enthielten, wurden die Membranen von der löslichen Proteinfraction abgetrennt und für *in vitro*-Enzymtests mit radioaktiv markiertem CDP-DAG und unmarkiertem *myo*-Inositol, Glycerol-3-phosphat und Serin genutzt. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte zeigte, dass in der Kontrolle CDP-DAG überwiegend hydrolytisch gespalten wurde, wohingegen die *E.*

coli-Zellen, die die *A. thaliana*-Konstrukte enthielten, ein markiertes Lipid synthetisierten, das mit PI kochromatographierte (Abb. 3.4). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass beide *A. thaliana*-Gene für PISs kodieren. Durch Enzymtests mit unmarkiertem CDP-DAG und markiertem Inositol wurden diese Daten weiter abgesichert. Im Unterschied zu den CDP-[U- ^{14}C]DAG-Inkubationen wurden dabei keine markierten Nebenprodukte gebildet, die auf *E. coli*-eigenen Enzymaktivitäten beruhen. Bei diesen Enzymtests war PIS-Aktivität in den Membranfraktionen der *E. coli*-Zellen, die ein Konstrukt enthielten, nicht aber in den löslichen Proteinfractionen nachweisbar, was darauf hindeutet, dass sowohl PIS1 als auch PIS2 Membranproteine darstellen. Damit war der Beweis erbracht, dass es sich bei den beiden *A. thaliana* Sequenzen AAG52009.1 und CAB37513.1 um PISs handelt. Für PIS1 konnten diese Ergebnisse durch Collin et al. (1999) und Xue et al. (2000) bestätigt werden.

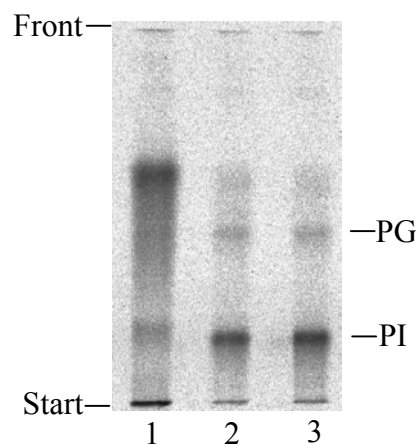


Abb. 3.4: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte eines PIS-Enzymtests in Trichlormethan : Methanol : Eisessig (65:25:8; v/v). Für die Enzymtests wurden je 10 µg Protein der Membranfraktionen aus *E. coli*-Zellen, die den Leervektor (Spur 1), pBAD-PIS2 (Spur 2) oder pBAD-PIS1 (Spur 3) enthielten, eingesetzt. Die Radioaktivität wurde an einem Bioimager (FLA-3000, Raytest) detektiert.

3.3 Die mögliche Cardiolipin-Synthase aus *A. thaliana*

Die einzige eukaryote CLS wurde bislang aus der Hefe *S. cerevisiae* isoliert (ydl142c; Jiang et al., 1997; Chang et al., 1998 B; Tuller et al., 1998). Verwendet man die entsprechende Aminosäuresequenz als Basis für Datenbankrecherchen, so findet man in *A. thaliana* das mit CLS bezeichnete Gen auf Chromosom 4 (AF118223.1). Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von AF118223.1 und ydl142c aus Hefe beträgt 44 %.

```

CLS      : ---MAIYRSLRKLVEINHRKTRPFFTAATASGGTVSLTPPQFSPLFPHFSHRLSPLSKWFVP---
ydl142c  : MIQMVPIYSCSALLRRTIPK-RPFY-----HVLSGLTVRFKVNPNQ
           M   S   L       K RPF                               H L S L   F

CLS      : LNGPLFLSSPPWKLLQSATPLHWRGNGSVLKKVEALNLRDLRIRSRTRFPRQLGLQSVVENILTV
ydl142c  : LNYNLFR-----DLTRR-----EYATNP-----SKTPHIKSKLLN--IPNILT
           LN  LF                               L  R       A  N       S  T       L   PNILT

CLS      : DRNDSKEEDGGKLVKSFVNVPNMISMARLVSGPVLWWMISNEMYSSAFLGLAVSGASDWVCIFFL
ydl142c  : SRIGCTPFIG-----LFIITNNLTP-----ALGLEAFSSITD-----FM
           R       G               I   L               A   A  S   D   F

CLS      : DGYVARRMKINSVVGSYLDPLADKVLIGCVAVAMVQKDLLHPGLVG---IVLLRDVALVGGAVYL
ydl142c  : DGYIARKYGLKTIAGTILDPLADKLLMITTTLALSVPSPGPQIIPVSIAAIILGRDVLLAISALEI
           DGY AR           G  LDPLADK L       A           V   I  L  RDV L   A

CLS      : R-----ALNLDW-----KVNTVFQLT-LVAGAILQP-----
ydl142c  : RYSLKLYKYPGRVAMNSYWDIVRYPSEVRPSQLSKWNTFFQMVYLGSGVLLLLYEKEEGCEKTE
           R               A  N  W               K  NT  FQ   L  G   L

CLS      : ---EFGNPDTQTWITYLR-----
ydl142c  : EDFEDRKQDFQKAFSYLGYVTATTTIMSGVSYALKRNAFKLLK
           E   D  Q   YL

```

Abb. 3.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen der CLS aus *S. cerevisiae* (ydl142c) und der möglichen CLS aus *A. thaliana*, berechnet mit ClustalX. Unterhalb der Sequenzen sind jene Aminosäurereste aufgeführt, die in beiden Proteinen enthalten sind (Ac.-Nr. der Sequenzen siehe Abb. 3.1).

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von ydl142c und dem durch AF118223.1 kodierten Polypeptid zeigt große Übereinstimmungen im zentralen Bereich der Proteine (Abb. 3.5). Dieser Bereich enthält das CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv. Sowohl für ydl142c als auch für CLS werden im zentralen Bereich drei membranspannende Helices berechnet, die sich in gleichen Abständen zueinander und in Bezug auf das DGAR-Motiv befinden (Abb. 3.6). Die N- bzw. C-Termini beider Proteine zeigen hingegen deutlich geringere Übereinstimmungen. Auffallend ist, dass beide Proteine im Vergleich zum jeweils anderen Einschübe von Aminosäuren besitzen (Abb. 3.8). Bei ydl142c liegen die Einschübe hinter, bei der möglichen pflanzlichen CLS vor dem DGAR-Motiv.

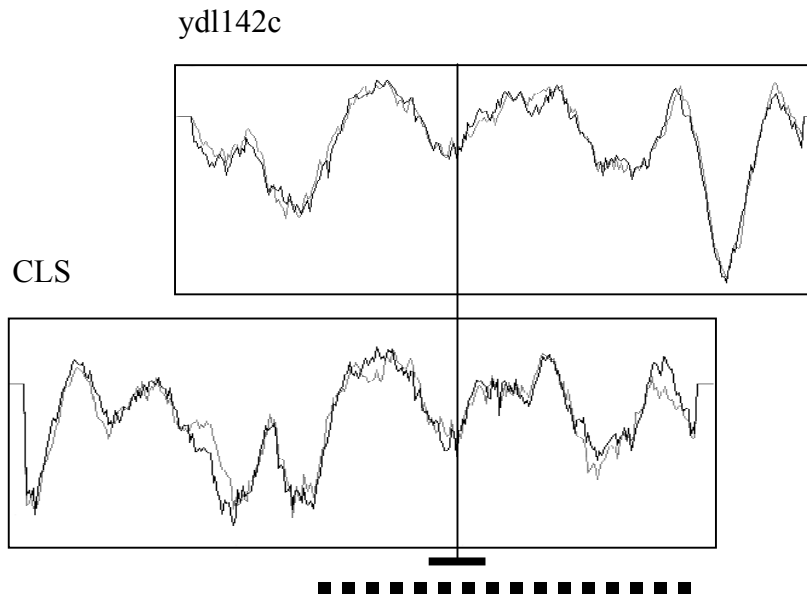


Abb. 3.6: Vergleich der Hydropathie-Plots, berechnet mit TM Predict. Die Plots besitzen den gleichen Maßstab in Bezug auf die Länge der Polypeptide und wurden anhand des DGAR-Motivs (senkrechte Linie) übereinandergelegt. Der schwarze Balken markiert das gesamte CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv und der gepunktete Balken zeigt die Lage der übereinstimmenden membranspannenden Domänen beider Sequenzen an.

Der Vergleich der Hydropathie-Plots lässt die vermeintlichen Einschübe als Extensionen erscheinen (Abb. 3.6). Demnach würde die mögliche pflanzliche CLS im Vergleich zu ydl142c eine N-terminale Extension besitzen. Diese Extension könnte gegebenenfalls als verlängertes Transitpeptid für den Import in Mitochondrien ausgelegt werden. Berechnungen mit PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/cgi-bin/>) stützen diese Vermutung. Demnach würde die mögliche CLS aus *A. thaliana* unter Abspaltung von 33 Aminosäureresten am N-Terminus in die Mitochondrien importiert werden. Die Ähnlichkeit, die die Sequenzen im zentralen Bereich zeigen, ist signifikant und größer als zu den möglichen PGPSs aus *A. thaliana*. Im Vergleich mit PGPS1 und PGPS2 zeigt das durch AF118223.1 kodierte Protein lediglich 26 % bzw. 33 % Ähnlichkeit.

Die mögliche CLS aus *A. thaliana* wurde in unterschiedlichen Vektoren und Organismen exprimiert (Tab. 3.2). Zunächst sollte der ORF mit Hilfe der Expressionsvektoren pQE70 (Qiagen) bzw. pBAD (Invitrogen) in *E. coli* exprimiert werden. In beiden Fällen konnte keine Aktivität festgestellt werden. Daraufhin wurde eine Expression im eukaryoten System Hefe genutzt. Weder im Vektor pESC-leu (Stratagene) noch im Vektor pYES2 (Invitrogen) konnte der ORF funktional exprimiert werden. Im Weiteren wurden N-terminale Deletionen des Proteins in Hefen und *E. coli* exprimiert. Dabei wurden unterschiedliche Parameter genutzt, um festzulegen welche Bereiche des Proteins deletiert werden sollten. Im einfachsten Fall

wurden die Sequenzen von PGPS2 aus *A. thaliana* und der PGPS aus *Synechocystis spec.* PCC6803 jeweils anhand des CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motivs mit der möglichen CLS übereinander gelegt, um dann die CLS gewissermaßen am Startkodon der Vergleichssequenz abzuschneiden ($\Delta 100$ und $\Delta 141$). In anderen Fällen wurde direkt zwischen vorhergesagten α -Helices und β -Faltblättern geschnitten ($\Delta 10$, $\Delta 40$, $\Delta 70$). Im letzten Fall erfolgte die Deletion der möglichen CLS in der Form, dass vor dem CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv genau so viele Aminosäuren zurückblieben wie in der CLS aus *S. cerevisiae* ($\Delta 85$). In keinem der genannten Fälle konnte eine PIS-, PSS-, PGPS-, PCS- oder CLS-Aktivität höher als die der Leervektor-Kontrollen gemessen werden.

Tabelle 3.2: Expressionskonstrukte, die den ORF für die mögliche CLS aus *A. thaliana* oder Teile desselben enthielten. (Plasmidkarten im Anhang, N-terminal: -10 AS bedeutet, dass das korrespondierende Protein N-terminal um zehn Aminosäuren verkürzt und die elfte Aminosäure in ein Methionin umgewandelt wurde; weitere Deletionen entsprechend)

Expressionskonstrukt	Modifikation	Expressionswirt
pBAD118	gesamter ORF	<i>E. coli</i> TOP10
pQE118	gesamter ORF	<i>E. coli</i> XL1blue
pQE118 $\Delta 10$	N-terminal : -10 AS	<i>E. coli</i> XL1blue
pQE118 $\Delta 40$	N-terminal : -39 AS	<i>E. coli</i> XL1blue
pQE118 $\Delta 70$	N-terminal : -70 AS	<i>E. coli</i> XL1blue
pQE118 $\Delta 100$	N-terminal : -100 AS	<i>E. coli</i> XL1blue
pQE118 $\Delta 141$	N-terminal : -141 AS	<i>E. coli</i> XL1blue
pESC118	gesamter ORF	<i>S. cerevisiae</i> UTL7A und D2000 (Δ CLS)
pYES118	gesamter ORF	<i>S. cerevisiae</i> UTL7A und D2000 (Δ CLS)
pYES118 $\Delta 85$	N-terminal : -85 AS	<i>S. cerevisiae</i> UTL7A und D2000 (Δ CLS)

Es bleibt also fraglich, welche Funktion das durch AF118223.1 kodierte Protein besitzt. Durch heterologe Expression kann diese Frage zur Zeit nicht geklärt werden. Es sollte allerdings angemerkt werden, dass die homologe Überexpression der CLS aus Hefe im selben Organismus ebenfalls nicht zum Erfolg führte. In den Versuchen, in denen die CLS in entsprechenden Nullmutanten überexprimiert wurde, konnte gewissermaßen nur die Wildtyp-Aktivität wieder hergestellt werden (Greenberg, persönliche Mitteilung). Zudem haben Greenberg und Mitarbeiter nachgewiesen, dass die CLS aus Hefe Teil eines Proteinkomplexes in der inneren Mitochondrienmembran ist (Zhao et al., 1998; Schlame et al., 2000).

Möglicherweise ist die Verfügbarkeit freier Proteinkomplexe der limitierende Faktor. Allerdings konnte die mögliche CLS aus *A. thaliana* auch in Nullmutanten der Hefe (*S. cerevisiae* D2000) nicht in katalytisch aktiver Form exprimiert werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Protein aus *A. thaliana* nicht funktional in den Proteinkomplex der Hefe integriert werden kann.

Zur Aufklärung der Funktion des Gens AF118223.1 werden zur Zeit Versuche unternommen, um eine Antisense-Inhibierung in *A. thaliana* herbeizuführen (Müller & Frentzen, unveröffentlicht).

3.4 Phosphatidylglycerophosphat-Synthasen aus *A. thaliana*

Die Aminosäuresequenzen der beiden möglichen PGPSs aus *A. thaliana* bestehen aus 296 (PGPS1) und 233 (PGPS2) Aminosäureresten und besitzen hohe Ähnlichkeiten zueinander (79 % Identität). Der Vergleich der Sequenzen in Abb. 3.7 zeigt, dass PGPS1 im Vergleich zu PGPS2 eine N-terminale Extension aufweist und dass der Grad der Identität von den N-Termini zu den C-Termini zunimmt. Auf die Extension folgen in den PGPSs aus *A. thaliana* Abschnitte mit 64 % und dann mit 84 % identischen Aminosäureresten. Der Vergleich der Hydropathie-Plots in Abb. 3.8 verdeutlicht ebenfalls, dass beide Proteine sehr ähnlich sind und auch hier wird offensichtlich, dass PGPS1 eine N-terminale Extension besitzt, die möglicherweise ein Transitpeptid darstellt. Signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp-2.0/>) berechnet für PGPS1 eine plastidäre und mit geringerer Wahrscheinlichkeit eine mitochondriale Lokalisation. Für beide Proteine können zwei mögliche membranspannende Domänen berechnet werden, die sich in gleichen Abständen zueinander und in Bezug auf das DGAR-Motiv befinden (Abb. 3.8). Das CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motiv selbst befindet sich in einem Bereich, der mit geringerer Wahrscheinlichkeit auch eine membranspannende Domäne darstellt.

```

A. thaliana PGPS1 : MLRSGLASLIVDVNLRRTLRPSPTSFPAHLSRCIITSRYSSRTSLRFPIQISRHHQRLS
A. thaliana PGPS2 : -----
Synechocystis PGPS : -----
B. subtilis PGPS : -----
E. coli PGPS : -----
R. sphaeroides PGPS : -----

A. thaliana PGPS1 : YFSSSSSSSEQSRPTSSSRNSFSG-HGQLDSDDNSSPPPS--QSSSKVLTLPVTLTLGRVA
A. thaliana PGPS2 : -----MG.EDTA.VD-Q...G.GKDS.LRNRH...L..PT.L...I.....
Synechocystis PGPS : -----MNI.NWV.VS.LL
B. subtilis PGPS : -----MFN..NKI..A.I.
E. coli PGPS : -----MQFNI..L...F..I
R. sphaeroides PGPS : -----MAKTCGMNWSI.NI..VL.LL
                                                                P   T   R

A. thaliana PGPS1 : AVP-LLVATFYVDSWWG-----TTATTS-----IFIAAAITDWLDGYLARKMRLGSAF
A. thaliana PGPS2 : ...-I.....C...-----R.....I.....E.
Synechocystis PGPS : .L.-.FLWLPTP-----EAETRWWGVG-----LL..S.....RLNQVTEL
B. subtilis PGPS : LI.-IFMIIMLAPFD..RLEVGDSEIPVAHLAAIL..I.ST...V...Y...LN.VTN.
E. coli PGPS : LI.-FF.LV..LPVT.S-----PF.AAL-----CV..V...F...F...RWNQSTR.
R. sphaeroides PGPS : .A.GVA.MFL.FHRP.A-----DWFALT-----L..L..V..FF.....LWKQE.K.
                        P           W           F   A   T D   D G   A R

A. thaliana PGPS1 : GAFLDPVADKLMVAATLILLCTKPIQVAELGPLPWLLTVPSIAIIGREITMSAVREWAAS
A. thaliana PGPS2 : .....MVAVV...V...V.....
Synechocystis PGPS : .K...LV...L.L.P.LI.L.WQ-----VVP--PWAAGL.LA..LVIAGW.VNP--
B. subtilis PGPS : .K...L...L.S.A..I.VQFD-----AP--AWMV.V..S..FAVTGL.L---
E. coli PGPS : .....VL..IAMV.V..EH-----YHS.WV.L.AATM.A...II..L...M.-
R. sphaeroides PGPS : ..M...I...A..VIA.VIITGYS-----GMNPW..IL.VTL.LE..VFV.GL..FLG-
                        G   L D P   D K                               R E           R

A. thaliana PGPS1 : QNGKLLAVAVNNL GKWKATQMTALTILLASR-----
A. thaliana PGPS2 : .....S.....S.....I.....
Synechocystis PGPS : .LASQT.IAGA.LW..V..V..I..I-A..LAP-----
B. subtilis PGPS : VLAGTG.V..A.M...I..WA.II.VSA..LHN-----
E. coli PGPS : EL..R-SS...SWI..V..TA..V..AM..WRP-----
R. sphaeroides PGPS : ---AKASLLK.TK.A...TA..V.IA..FLGTGLEHLEGIARQGMTWEQYARAVSAGEA
                        K   K T   Q   A   L

A. thaliana PGPS1 : -----DSNVGWLVASGAGLLYVSAGLSVWSLAVYMRKIWKVLMK--
A. thaliana PGPS2 : -----..SFER.LP..I.....I...V.....R..L.K-
Synechocystis PGPS : -----LP--EIVG-QI.TVIFWIAVV.TLI.G.I.LFPFGNNKVEAG
B. subtilis PGPS : -----LPF-ELVSFPFADLA.W.AVFET.V.GWE.FS.N.EA.KTSN
E. coli PGPS : -----N--I-.VEYA.IA.FF.A.V.TL..MLQ.LSAARAD.LDQ-
R. sphaeroides PGPS : DPIRSCGMHGCSYATWL.LA.IWIA.A.TFITGWD.F..ALPY.KDEK
                                                                Y

```

Abb. 3.7: Sequenzvergleich bakterieller PGPS mit den beiden möglichen PGPSs aus *A. thaliana*, berechnet mit ClustalX. PGPS1 stellt die Referenzsequenz dar. Punkte bezeichnen Positionen, in denen die jeweilige Sequenz mit PGPS1 übereinstimmt. Unterhalb der Sequenzen sind jene Aminosäurereste aufgeführt, die in allen Proteinen enthalten sind (Ac-Nr. der Sequenzen siehe Abb. 3.1).

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen verdeutlicht zugleich, dass PGPS1 mit 32,2 kDa auch deutlich größer ist als die bakteriellen Proteine, die eine molekulare Masse von durchschnittlich 20 kDa aufweisen (Abb. 3.7). PGPS2 hat eine berechnete molekulare Masse von 25,4 kDa und zeigt darin geringere Abweichungen zu den bakteriellen Enzymen. Die hohe Ähnlichkeit untereinander und die Ähnlichkeiten von 30 % bis 50 % zu den bakteriellen

PGPSs stützen die Vermutung, dass die hier beschriebenen Proteine aus *A. thaliana* in der Tat PGPSs sind. Daher sollten Expressionsstudien und Enzymtests diese Vermutung bestätigen.

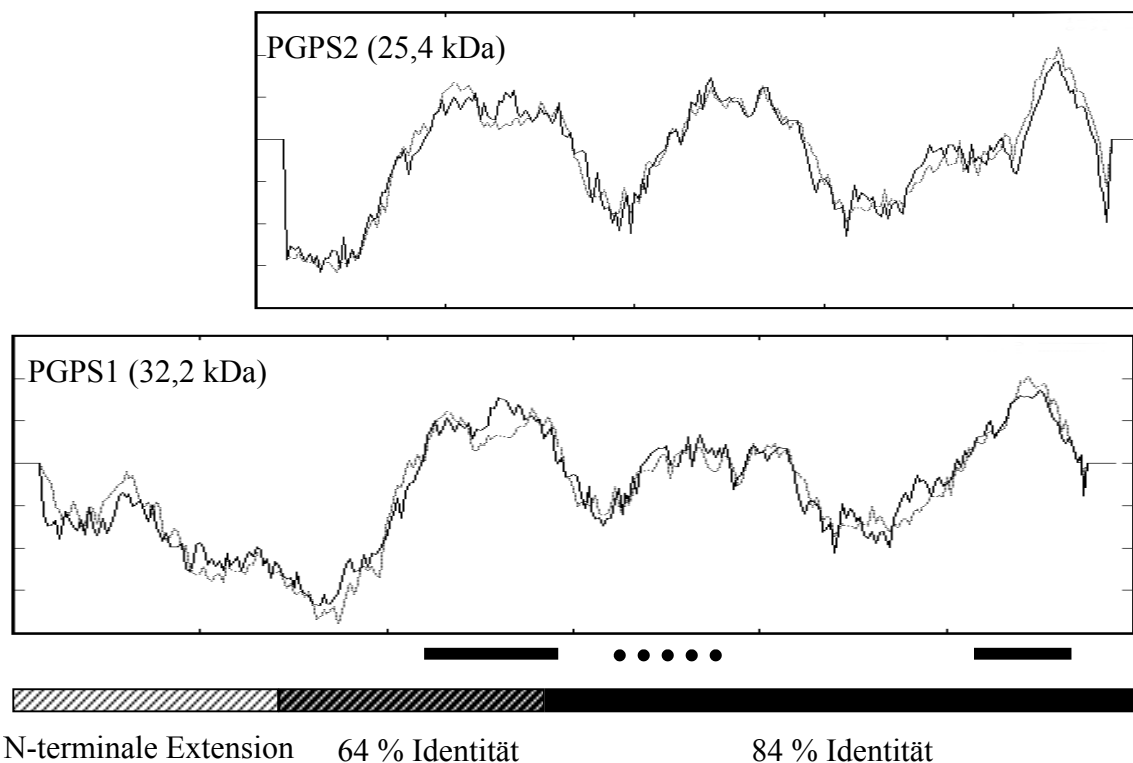


Abb. 3.8: Vergleich der Hydropathie-Plots der Aminosäuresequenzen von PGPS1 und PGPS2, errechnet mit TM Predict (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). Die Plots besitzen den selben Maßstab und wurden anhand des CDP-Alkohol-Phosphotransferase-Motivs (gepunktete Linie) übereinander gelegt. Beide Proteine besitzen zwei mögliche Transmembrandomänen, die durch schwarze Balken angezeigt werden.

3.4.1 Expression von PGPS1 und PGPS2

Die ORFs der Gene für PGPS1 und PGPS2 wurden über PCR mit Restriktionsschnittstellen versehen (PGPS1: KpnI, NotI; PGPS2: KpnI, SacI) und in den entsprechend aufgeschnittenen Vektor pYES2 kloniert (Invitrogen; Plasmidkarten im Anhang). Dieser Vektor erlaubt die induzierbare Genexpression in *S. cerevisiae*-Zellen. Der Stamm *S. cerevisiae* UTL7A hatte sich aufgrund seines genetischen Hintergrunds für heterologe Expressionsversuche als geeignet erwiesen (Warnecke et al. 1999; Leipelt et al., 2001).

Aus den *S. cerevisiae*-Zellen wurden Membranen von den löslichen Proteinfractionen abgetrennt und für Enzymtests mit radioaktiv markiertem Glycerol-3-phosphat und unmarkiertem CDP-DAG eingesetzt. Membranfraktionen aus Hefezellen, die entweder PGPS1 oder PGPS2 überexprimierten, zeigten deutlich höhere PGPS-Aktivitäten als die

Kontrollmembranen (Abb. 3.9). Für PGPS1 wurden spezifischen Aktivitäten um 5,5 nmol/min/mg Protein ermittelt, während der entsprechende Wert für PGPS2 bei 7,5 nmol/min/mg Protein lag. Die Kontrollmembranen wiesen dagegen nur minimale Aktivitäten von 0,02 nmol/min/mg Protein auf. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die Isoenzyme aus *A. thaliana* weder Serin noch *myo*-Inositol, Cholin oder PG als Phosphatidylakzeptor nutzen können. Im Unterschied zu den Membranfraktionen war in den entsprechenden Überstandfraktionen keine signifikante PGPS-Aktivität nachweisbar. Somit verhalten sich sowohl PGPS1 als auch PGPS2 wie Membranproteine, was mit den Hydropathie-Plots der beiden Proteine übereinstimmt (Abb. 3.8).

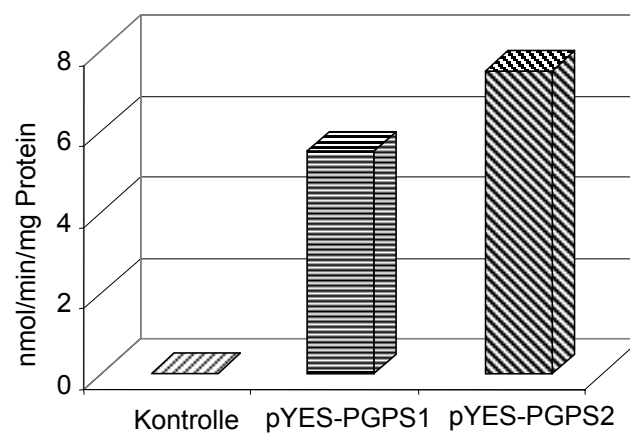


Abb. 3.9: Spezifische PGPS-Aktivitäten der Membranfraktionen aus *S. cerevisiae* UTL7A, die entweder den Kontrollvektor pYES2 oder eines der beiden Konstrukte pYES-PGPS1 bzw. pYES-PGPS2 enthielten.

Interessanterweise zeigten die Membranen aus der Hefe kaum endogene Aktivität, obwohl diese bekanntlich eine PGPS enthalten. *E. coli*-Membranen besaßen hingegen unter den gewählten Enzymtestbedingungen deutlich höhere endogene Aktivitäten (s. unten). Dieser Unterschied beruht darauf, dass die beiden Enzyme den unterschiedlichen Phosphatidyltransferasefamilien zuzuordnen sind. Enzyme, wie die PGPS aus *E. coli* oder die hier beschriebenen PGPSs aus *A. thaliana*, die zur DGAR-Familie gehören, benötigen hohe Triton X-100 Konzentrationen, divalente Kationen und einen alkalischen pH (Hirabayashi et al., 1976; Carman & Wieczorek, 1980). Mitglieder der HKD-Familie, zu der auch die mitochondriale PGPS aus Hefe zählt, zeigen hingegen ohne divalente Kationen bei neutralem pH mit deutlich weniger Triton X-100 die höchsten Aktivitäten (Minskoff & Greenberg, 1997; Jiang et al., 1998; Schlame et al., 2000; Kawasaki et al., 2001). Die minimalen Aktivitäten in den Kontrollmembranen der Hefezellen beruhen somit auf den für pflanzliche PGPSs optimierten Reaktionsbedingungen (s. unten).

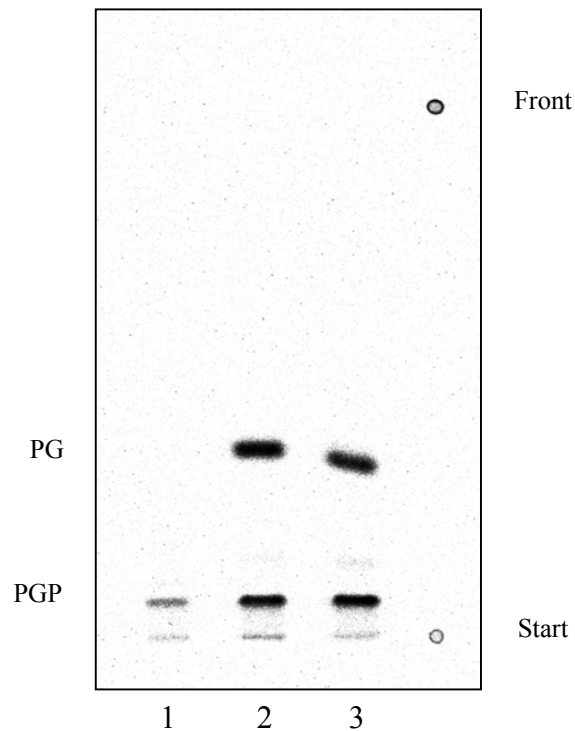


Abb. 3.10: Autoradiogramm der dünnstschichtchromatographisch getrennten Reaktionsprodukte eines PGPS-Enzymtests mit Membranfraktionen aus Hefezellen, die den Leervektor (Spur 1), pYES-PGPS2 (Spur 2) oder pYES-PGPS1 (Spur 3) enthielten. Je 20 µg Protein wurden für 30 min. in den Enzymtest mit radioaktiv markiertem Glycerol-3-phosphat und unmarkiertem CDP-DAG eingesetzt. Die Entwicklung der DC-Platte erfolgte im Laufmittel Trichlormethan : Aceton : Methanol : Eisessig : Wasser, 9:5:2:2:1, v/v; Auftragstelle (Start) und Laufmittelfront (Front) wurden nach der Entwicklung mit $[U^{14}C]$ Glycerol-3-phosphat markiert.

In den Enzymtests mit Membranfraktionen aus den Hefezellen, die eine *A. thaliana*-PGPS exprimierten, zeigten sich zwei Reaktionsprodukte mit unterschiedlichen R_f -Werten (Abb. 3.10). Neben PGP, dem direkten Produkt der PGPS-Reaktion, war ebenfalls PG nachweisbar. Das deutet darauf hin, dass die endogene PGP-Phosphataseaktivität der Hefen das durch die Wirkung der *A. thaliana*-Enzyme gebildete PGP partiell zu PG dephosphoryliert. Die alternative Möglichkeit, dass es sich bei den PGPSs aus *A. thaliana* um bifunktionelle Enzyme handelt, die neben PGPS auch PGP-Phosphataseaktivität aufweisen, wurde durch die Reinigung der Isoenzyme ausgeschlossen (s. unten).

Die Expressionsstudien in Hefezellen zeigen somit klar, dass die beiden *A. thaliana*-Sequenzen in dem eukaryoten System funktional exprimiert werden können und PGPS-Aktivität aufweisen. Wie bereits erwähnt, weist PGPS1 im direkten Vergleich zu PGPS2 eine N-terminale Extension auf, bei der es sich möglicherweise um ein Transitpeptid für Mitochondrien handelt. Es stellte sich die Frage, ob PGPS1 einer eukaryoten Prozessierung unterliegt. Daher sollten nun zunächst zwei Fragen geklärt werden. In welchem Kompartiment der Hefezellen befinden sich die PGPSs und wird PGPS1 prozessiert?

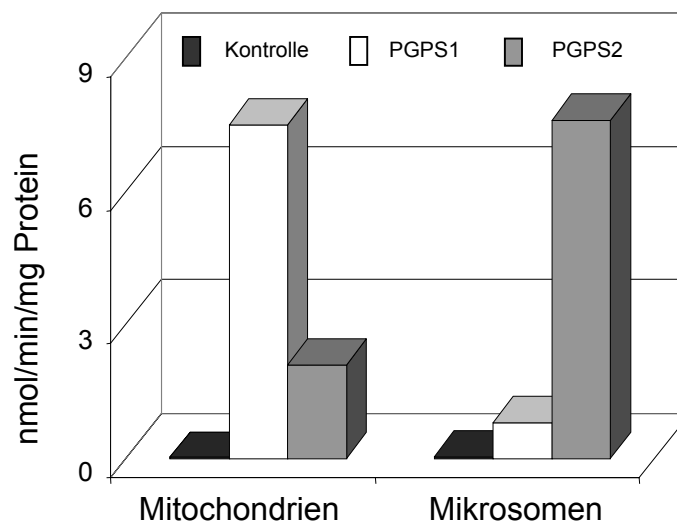


Abb. 3.11: Subzelluläre Lokalisation der spezifischen PGPS-Aktivitäten in Hefezellen, die PGPS1 und PGPS2 exprimieren. Mitochondrien und Mikrosomen stammen jeweils aus derselben Aufarbeitung. Die Versuche wurden wiederholt und die Ergebnisse gemittelt.

Abb. 3.11 verdeutlicht, dass PGPS1 im Gegensatz zu PGPS2 in den Mitochondrien der Hefe lokalisiert ist. PGPS1 zeigte spezifische Aktivitäten von 7,5 nmol/min/mg Protein in Mitochondrien und 0,8 nmol/min/mg Protein in Mikrosomen transgener Hefezellen. PGPS2 erzielte hingegen spezifische Aktivitäten von 1,2 nmol/min/mg Protein in Mitochondrien aber 7,6 nmol/min/mg Protein in Mikrosomen transgener Hefezellen. Die Kontrollfraktionen wiesen wiederum mit 0,02 nmol/min/mg Protein kaum Aktivität auf. Die spezifische Aktivität von PGPS1 ist demnach in Mitochondrien im Vergleich zu den entsprechenden mikrosomalen Fraktionen neunmal höher, während sich das sechsfache der mitochondrialen Aktivität von PGPS2 in der mikrosomalen Fraktion befindet. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass es sich bei PGPS1 um ein Präprotein handelt, dass in Hefemitochondrien importiert und zu einem katalytisch aktiven Protein prozessiert werden kann, während PGPS2 offensichtlich ein mikrosomales Enzym darstellt. Dies wird ebenfalls durch die parallel durchgeführten Expressionsstudien in *E. coli* gestützt (Expressionskonstrukte im Anhang). Wie in Abb. 3.12 dargestellt, wurde PGPS2, nicht aber PGPS1, in diesem prokaryoten System funktional exprimiert. Auch in *E. coli* war PGPS2-Aktivität ausschließlich in den Membranfraktionen nachweisbar. Allerdings wurden deutlich höhere PGPS2-Expressionswerte erzielt, da die Membranfraktionen der *E. coli*-Zellen, die PGPS2 überexprimierten, mit 56 nmol/min/mg Protein achtfach höhere spezifische PGPS-Aktivitäten aufwiesen als die entsprechenden Hefemembranen.

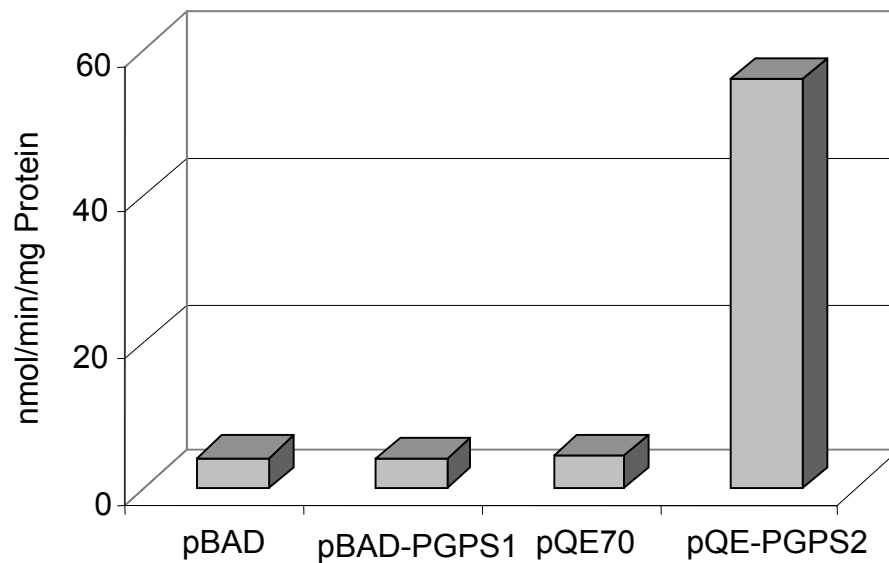


Abb. 3.12: Spezifische PGPS-Aktivitäten der Membranfraktionen aus *E. coli*-Zellen, die PGPS1, PGPS2 oder den entsprechenden Kontrollvektor pBAD oder pQE70 enthielten.

Im Unterschied zu PGPS2 zeigen die Membranfraktionen der *E. coli*-Zellen, die ein PGPS1-Konstrukt enthielten, mit 4,2 nmol/min/mg Protein spezifische Aktivitäten in der gleichen Größenordnung wie die Kontrollmembranen, für die in beiden Fällen Werte um 4,6 nmol/min/mg Protein ermittelt wurden (Abb. 3.12). Die Aktivität beruht somit nicht auf der Expression der eingebrachten PGPS1, sondern auf der *E. coli*-eigenen PGPS-Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Annahme, dass es sich bei PGPS1 um ein katalytisch inaktives Präprotein handelt, das in Hefemitochondrien, nicht aber in *E. coli*-Zellen, zu einem katalytisch aktiven Protein prozessiert wird.

Um Hinweise zu liefern, dass die in den Hefemitochondrien gemessene PGPS-Aktivität in der Tat mit einem prozessierten PGPS1-Protein korreliert, wurden als nächstes die Expressionsprodukte mittels Western Blot analysiert. Zu diesem Zweck wurden beide Proteine mit einer C-terminalen His₆-Domäne versehen. PGPS1 wurde durch PCR mit einer His₆-Domäne fusioniert und wie oben in *S. cerevisiae* UTL7A exprimiert. Für PGPS2 wurde die His₆-Domäne des Vektors pQE70 genutzt, indem der ORF ohne Stop-Kodon in pQE70 eingefügt wurde. Wie enzymatische Untersuchungen zeigten, beeinflusst die His₆-Domäne am C-Terminus der Proteine weder die Aktivitäten von PGPS1 und PGPS2 noch ihre subzelluläre Lokalisation in den Wirtsorganismen. Bei Western Blot-Analysen der aus Hefezellen isolierten mitochondrialen Membranen mit monoklonalen Antikörpern gegen die His₆-Domäne war allerdings PGPS1 nicht als Bande detektierbar. Selbst die Analyse der *E.*

coli-Membranen die, wie oben beschrieben, achtfach höhere spezifische PGPS2-Aktivitäten als die Hefemembranen zeigten, lieferte nur eine sehr schwache PGPS2-Bande. Ein endgültiger Nachweis der Expressionsprodukte mittels Western Blot ist, wie im Folgenden dargestellt, erst nach Solubilisierung und Anreicherung der Isoenzyme gelungen.

3.4.1.1 Reinigung von PGPS1 und PGPS2

Die Optimierung der Enzymtestbedingungen zeigte (s. unten), dass die Aktivitäten von PGPS1 und PGPS2 selbst durch hohe Konzentrationen des nichtionischen Detergenz Triton X-100 nicht gehemmt werden. Daher wurden Solubilisierungsversuche mit Triton X-100 durchgeführt, bei denen sowohl PGPS1 als auch PGPS2 durch den Einsatz von 2 % Triton X-100 (v/v) in Gegenwart von 10 % Glycerol aus den Membranen extrahiert werden konnten. Unter diesen Bedingungen behielten die Isoenzyme ihre Aktivität und waren durch Ultrazentrifugation nicht mehr sedimentierbar. Zur Reinigung von PGPS1 wurden Hefemembranen genutzt, während im Falle von PGPS2 *E. coli*-Membranen eingesetzt wurden, da diese, wie bereits erwähnt, eine deutlich höhere spezifische Aktivität aufwiesen als die entsprechenden Hefemembranen. Die Membranen wurden mit 2 % Triton X-100 extrahiert und nicht solubilierte Proteine durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Die PGPS-Aktivitäten blieben in den Zentrifugationsüberständen erhalten, wobei in den Sedimenten keine signifikanten PGPS-Aktivitäten messbar waren. Eine Anreicherung der Isoenzyme aus *A. thaliana* erfolgte durch Ni^{2+} -Affinitäts-Säulenchromatographie. Die Zentrifugationsüberstände wurden auf eine solche Säule aufgetragen, die Säule gewaschen und die gebundenen Proteine mit 0,1 M EDTA eluiert. Unter diesen Bedingungen wurden die rekombinanten PGPSs von der Säule gelöst und in den dabei gebildeten Fraktionen waren hohe spezifische PGPS-Aktivitäten nachweisbar. Um Verunreinigungen mit EDTA und Ni^{2+} -Ionen zu entfernen, wurden die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten mittels Dialyse entsalzt. Die gereinigten PGPS1- und PGPS2-Fraktionen wiesen spezifische Aktivitäten um 1,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein auf, was für PGPS1 einer 170fachen und für PGPS2 einer 25fachen Anreicherung entsprach (Tab 3.3).

Tabelle 3.3: Reinigung der *A. thaliana*-Proteine PGPS1 und PGPS2 über Ni^{2+} -Affinitäts-Säulenchromatographie.

	PGPS1	PGPS2
Spez. Aktivität der Membranfraktion [nmol/min/mg Protein]	7,5	56
Spez. Aktivität der Säuleneeluat [nmol/min/mg Protein]	1263	1324
Reinigungsfaktor	168	24

Die Analyse der gereinigten Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zeigte, dass die PGPS2-Präparation als weitgehend homogen bezeichnet werden kann (Abb. 3.13 A). Eine deutliche Bande mit einer Masse von 25 kDa korreliert mit der berechneten Masse von 25,4 kDa für PGPS2. Die PGPS1-Fractionen waren hingegen noch mit Proteinen verunreinigt. Allerdings war es jetzt möglich sowohl PGPS1 als auch PGPS2 im Western Blot nachzuweisen (Abb. 3.13 B). Abb. 3.13 verdeutlicht, dass die PGPS1-Aktivität mit einem Protein korreliert, das nicht die berechnete Masse von 32,2 kDa aufweist, sondern sogar eine geringere Masse als PGPS2 besitzt.

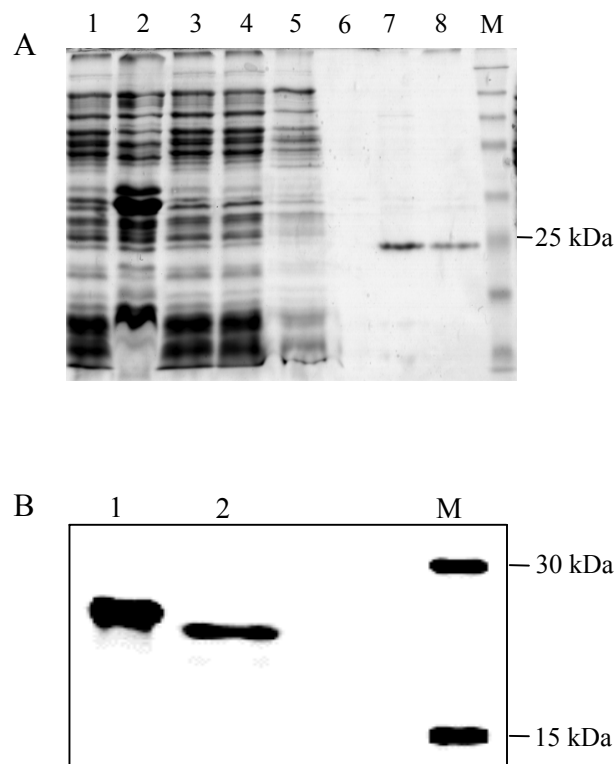


Abb. 3.13: A: Reinigung von PGPS2, dargestellt anhand eines SDS-Polyacrylamidgels, gefärbt mit Coomassie (Spurbelegung: 1, Membranfraktion, 10 μg ; 2, solubilisiertes Protein, 10 μg ; 3, nicht solubilisiertes Protein, 10 μg ; 4, ungebundenes Protein im Säulendurchlauf, 10 μg ; 5, ungebundenes Protein im Waschpuffer, 10 μg ; 6-8, die ersten 3 Fraktionen der Elution mit EDTA, je 100 μl Eluat; M, Marker).

B: Western Blot der gereinigten rekombinanten PGPSs (Spurbelegung: 1, PGPS2; 2, PGPS1; M, His_6 -Domänen Marker).

Die Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass PGPS1 in der Hefe unter Abspaltung eines Transitpeptids in die Mitochondrien importiert und dadurch in seine katalytisch aktive Form überführt wird. PGPS1 besitzt nach der Prozessierung in etwa die Größe von PGPS2, welches, wie bereits geschildert, auch in unprozessierter Form in *E. coli* aktiv ist. Aus diesen Versuchen ist daher zu schließen, dass PGPS1 die pflanzliche mitochondriale PGPS repräsentiert, während PGPS2 ein mikrosomales Enzym darstellt. Drei Kompartimente, das heißt Mitochondrien, Plastiden und Mikrosomen, sind in einer pflanzlichen Zelle zur *de novo*-Biosynthese von PG befähigt (Moore, 1974; Andrews & Mudd, 1985; Griebau & Frentzen, 1994). Es konnten aber lediglich zwei Gene, die PGPSs kodieren, im Genom von *A. thaliana* identifiziert werden. Hagio et al. (2001) ist es gelungen, PGPS1 fusioniert mit GFP in *A. thaliana* zu exprimieren und zu lokalisieren. Dabei stellten die Autoren fest, dass die GFP-Aktivität in den Plastiden und einem weiteren Kompartiment, bei dem es sich wahrscheinlich um Mitochondrien handelt, lokalisiert war. Die Tatsache, dass PGPS1 zugleich in den Plastiden und Mitochondrien detektiert werden konnte, spricht für ein sogenanntes "twin-targeting" dieses Proteins. Ein solches "twin-targeting" ist bereits für andere Proteine beschrieben worden (Fulgosi & Soll, 2001). Kushnir hingegen hat PGPS1, ebenfalls mit GFP fusioniert, stabil in Tabak transformiert und konnte GFP-Aktivität lediglich in den Mitochondrien nachweisen (Kushnir, persönliche Mitteilung). Die voneinander abweichenden Ergebnisse können ihren Ursprung in den unterschiedlichen Pflanzen haben, die für die GFP-Fusionsversuche genutzt wurden. Möglicherweise lassen sich die Unterschiede auch auf die verwendeten Genkonstrukte zurückführen. Es ist nicht bekannt, ob Hagio et al. (2001) das gesamte PGPS1-Protein C-terminal mit GFP fusioniert haben. Kushnir hat lediglich die N-terminale Hälfte des Proteins genutzt. Möglicherweise liegen hier Differenzen vor, die die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf den Import von PGPS1 in die Plastiden bedingen. Fest steht hingegen, dass PGPS1 in drei unterschiedlichen Organismen, von denen zwei Pflanzen sind, offensichtlich in die Mitochondrien geleitet wird.

3.4.2 Charakterisierung der PGPS-Isoenzyme aus *A. thaliana*

Zur Charakterisierung der beiden PGPS-Isoenzyme aus *A. thaliana* wurden vergleichende Untersuchungen mit den angereicherten Enzymfraktionen und den aus den transgenen Mikroorganismen isolierten Membranfraktionen durchgeführt.

Das pH-Optimum beider PGPS-Isoenzyme wurde unter Standardbedingungen in Bis-Tris-Propan-Puffer bestimmt. Abb. 3.18 zeigt deutlich, dass beide Enzyme im pH-Bereich von 8 bis 9 optimale Umsätze aufweisen. Dabei war kein Unterschied zwischen den membrangebundenen oder angereicherten Enzymen festzustellen. Ein Optimum bei pH 8 wurde ebenfalls für die PGPSs aus *C. perfringens* und *E. coli* beschrieben (Hirabayashi et al., 1976; Carman & Wieczorek, 1980). Diese Proteine gehören, wie die Isoenzyme aus *A. thaliana*, zur DGAR-Familie. Mitglieder der HKD-Familie zeigen im allgemeinen ein pH-Optimum im neutralen Bereich. Die PGPSs aus Hamster und *S. cerevisiae* fallen in diese Gruppe und weisen Optima im Bereich von pH 7 auf (Minskoff & Greenberg, 1997; Kawasaki et al., 2001). Darüber hinaus sind diese Ergebnisse auch mit denen anderer Phosphatidyltransferasen vergleichbar. Zum Beispiel zeigen die PSS und die CLS aus Hefe, die beide zur DGAR-Familie gehören, ein Optimum bei pH 8 bzw. pH 9, während die CLS aus *B. firmus* und die PSS2 aus Maus, die Mitglieder der HKD-Familie darstellen, beide optimal bei pH 7,5 arbeiten (Yamashita & Nikawa, 1997; Chang et al., 1998 B; Guo & Tropp, 1998; Stone & Vance, 1999)

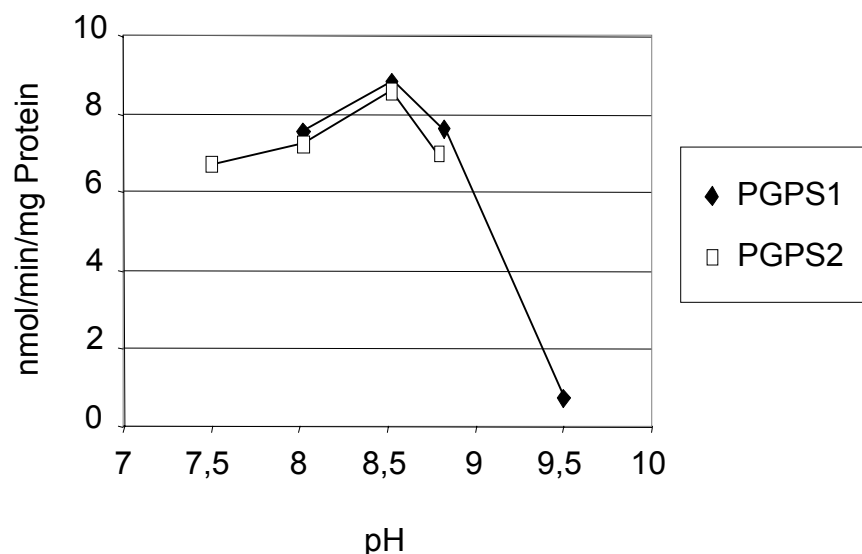


Abb. 3.14: pH-Optimum der membrangebundenen Isoenzyme PGPS1 und PGPS2 aus *A. thaliana* unter Standardbedingungen in Bis-Tris-Propan-Puffer.

Wie in Abb. 3.15 dargestellt, sind die Aktivitäten der beiden membrangebundenen PGPS-Isoenzyme aus *A. thaliana* strikt abhängig von divalenten Kationen, wobei mit den gereinigten Enzymfraktionen vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Für beide Isoenzyme wurden höchste Aktivitäten in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen gemessen. PGPS1 erreicht bereits bei 2,5 mM Mn^{2+} -Ionen ihr Maximum, PGPS2 dagegen erst bei 8 mM. Im Unterschied zu Mn^{2+} -Ionen stimulieren Mg^{2+} -Ionen die Aktivitäten der beiden Isoenzyme nur geringfügig

(Abb. 3.15). Selbst bei optimalen Mg^{2+} -Ionen-Konzentrationen, die für PGPS1 bei 130 mM und für PGPS2 bei 50 mM liegen, werden nur etwa 10 % der Mn^{2+} -Ionen-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Ca^{2+} -Ionen-Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 mM hingegen inhibieren die Mn^{2+} -Ionen-abhängige Reaktion beider Enzyme um 30 bis 70 %. Biochemische Daten sprechen dafür, dass auch die PGPSs anderer Pflanzen mit Mn^{2+} -Ionen höhere Aktivitäten erreichen als mit Mg^{2+} -Ionen (Moore, 1974; Griebau & Frentzen, 1994). Die Abhängigkeit von divalenten Kationen ist typisch für Phosphatidyltransferasen aus der DGAR-Familie. Die PGPSs aus *C. perfringens* und *E. coli*, die beide in die DGAR-Familie gehören, erreichen höchste Aktivitäten mit 0,1 mM Mg^{2+} -Ionen (Hirabayashi et al., 1976; Carman & Wieczorek, 1980). Die PSS aus Hefe wird durch Mn^{2+} -Ionen oder Mg^{2+} -Ionen stimuliert und durch Ca^{2+} -Ionen inhibiert, während die CLS aus Hefe mit Mg^{2+} -Ionen maximale Aktivität zeigt (beides DGAR-Enzyme; Yamashita & Nikawa, 1997; Schlame et al., 2000). Die PGPS aus Hefe hingegen, die zur HKD-Familie gehört, lässt sich kaum durch die Zugabe divalenter Kationen stimulieren (Minskoff & Greenberg, 1997), und für die PGPS aus Hamster, ebenfalls ein HKD-Enzym, wurde lediglich eine schwache Steigerung der Aktivität durch Ca^{2+} -Ionen festgestellt (Kawasaki et al., 2001).

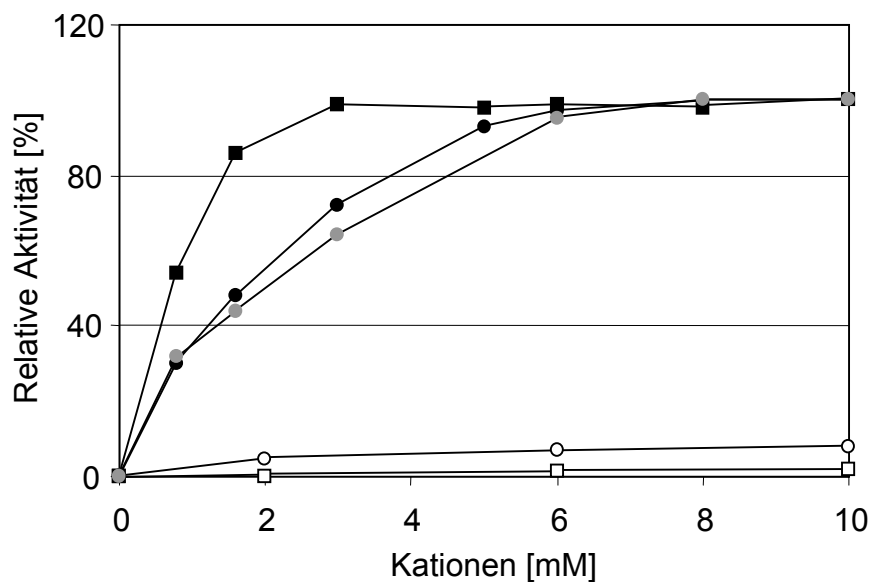


Abb. 3.15: Abhängigkeit der PGPS1- und PGPS2-Aktivitäten in Hefemembranen von divalenten Kationen. Die Aktivitäten von PGPS1 sind in Quadraten und die von PGPS2 in Kreisen dargestellt, wobei gefüllte Symbole die Mn^{2+} - und offene Symbole die Mg^{2+} -Abhängigkeit anzeigen. Zum Vergleich ist die Mn^{2+} -Abhängigkeit von PGPS2 exprimiert in *E. coli* durch graue Kreise dargestellt.

Es bleibt also festzustellen, dass beide PGPSs aus *A. thaliana* durch Mn^{2+} -Ionen stimulierbar sind, ihre maximalen Aktivitäten jedoch bei unterschiedlichen Konzentrationen erreichen. Mit

diesen Eigenschaften besitzen sie die für Enzyme aus der DGAR-Familie typischen Abhängigkeiten für divalente Kationen.

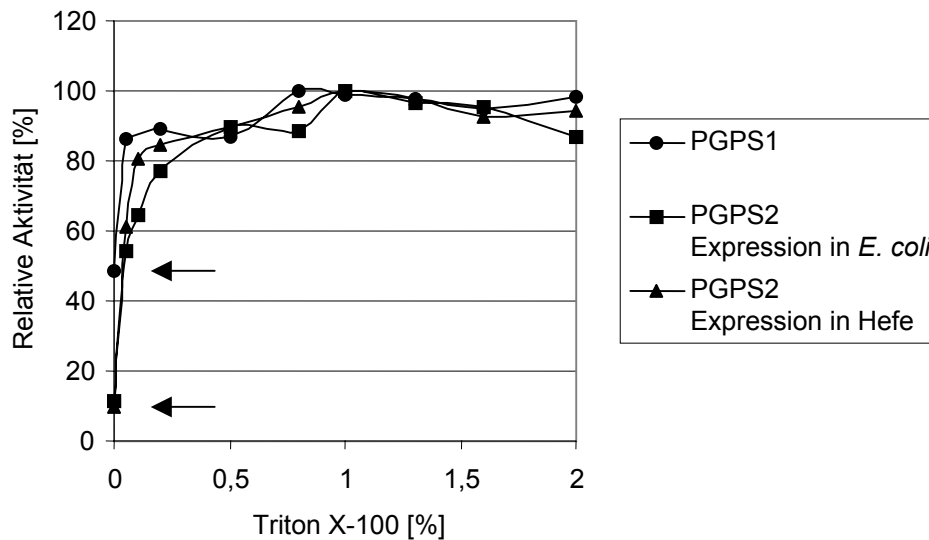


Abb. 3.16: PGPS1- und PGPS2-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Triton X-100 Konzentration. Die Pfeile kennzeichnen die relativen Enzymaktivitäten im Test ohne Triton X-100.

Für eine Reihe von Phosphatidyltransferasen wurde gezeigt, dass diese durch die Zugabe von Triton X-100 stimuliert werden. Die rekombinanten Proteine aus *A. thaliana* weisen ebenfalls ein derartiges Verhalten auf (Abb. 3.16). PGPS1 erreicht bei 0,8 % Triton X-100 ein Maximum, wobei die spezifische Aktivität verdoppelt wird. Dagegen wird die PGPS2-Aktivität durch die Zugabe des Detergenz sogar um den Faktor 10 gesteigert. Dieses Enzym ist im Unterschied zu PGPS1 ohne Triton X-100 im Reaktionsgemisch kaum nachweisbar.

PGPSs sowohl aus der DGAR- als auch aus der HKD-Familie lassen sich durch die Zugabe von Triton X-100 stimulieren (Hirabayashi et al., 1976; Carman & Wieczorek, 1980; Minskoff & Greenberg, 1997; Jiang et al., 1998). Die HKD-Enzyme aus Hamster und *S. pombe* ließen sich mit Triton X-100 sogar in katalytisch aktiver Form solubilisieren und reinigen (Jiang et al., 1998; Kawasaki et al., 2001). Für die gereinigte PGPS aus *S. pombe* wurde postuliert, dass bei gleichbleibender, absoluter CDP-DAG-Konzentration durch steigende Triton X-100-Konzentrationen letztlich eine Verdünnung dieses Substrates eintritt, da das CDP-DAG in den gemischten Mizellen mit hohem Detergenzanteil nicht verfügbar ist (Jiang et al., 1998). Eine derartige kooperative Abhängigkeit von Triton X-100 und CDP-DAG zeigen die Isoenzyme aus *A. thaliana* nicht.

Die gereinigten sowie die membrangebundenen PGPS-Isoenzyme aus *A. thaliana* weisen eine typische Sättigungskinetik in Bezug auf Glycerol-3-phosphat auf. Die Reaktionen wurden

unter Standardbedingungen mit 1 % Triton X-100 durchgeführt. Die K_M -Werte für Glycerol-3-phosphat liegen zwischen 40 μM und 70 μM , wovon lediglich der Wert für PGPS2 ohne His₆-Domäne abweicht (Tab. 3.4). Der um einen Faktor von fünf höher liegende K_M -Wert spricht für eine Stabilisierung von PGPS2 durch die angefügte His₆-Domäne. Die Substratbindung von PGPS1 zeigt sich durch die His₆-Domäne unbeeinflusst.

Tabelle 3.4: K_M -Werte der *A. thaliana*-Isoenzyme PGPS1 und PGPS2 für Glycerol-3-phosphat (die Berechnung erfolgte nach den Methoden von Lineweaver & Burk, Woolf und Eadie & Hofstee). Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

	PGPS1 [μM]	PGPS2 [μM]
Membrangebunden	50	280
Membrangebunden + His ₆ -Domäne	40	50
gereinigt + His ₆ -Domäne	69	52

Darüber hinaus liegen alle K_M -Werte in der gleichen Größenordnung wie die der PGPSs anderer Organismen. Für pflanzliche PGPSs wurden Glycerol-3-phosphat- K_M -Werte zwischen 3 μM für das mitochondriale Enzym aus der Mung Bohne und 50 μM für die mitochondrialen und mikrosomalen Enzyme aus Rizinus berichtet (Moore, 1974; Griebau & Frentzen, 1994). Die heterolog exprimierte PGPS aus *Synechocystis spec.* zeigt einen Glycerol-3-phosphat- K_M -Wert von 150 μM (Müller & Frentzen, unveröffentlicht). Die entsprechenden Werte für die PGPSs aus *C. perfringens* und *E. coli* sind 100 μM bzw. 320 μM und das mitochondriale Enzym aus *S. cerevisiae*, welches zur HKD-Familie gehört, hat einen K_M -Wert von 27 μM für Glycerol-3-phosphat (Hirabayashi et al., 1976; Carman & Wieczorek, 1980; Minskoff & Greenberg, 1997).

Die Sättigungskinetiken der PGPS-Isoenzyme aus *A. thaliana* für unterschiedliche CDP-DAG-Spezies sind in Abb. 3.17 dargestellt. Diese Ergebnisse wurden mit den gereinigten Enzymfraktionen erzielt, aber auch die membrangebundenen Isoenzyme lieferten entsprechende Resultate.

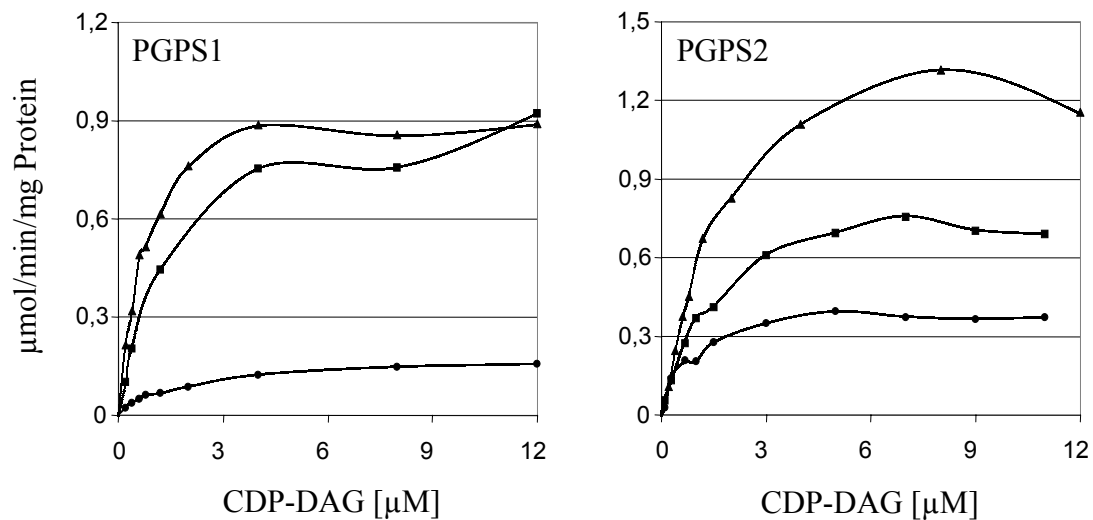


Abb. 3.17: Spezifische Aktivitäten von PGPS1 und PGPS2 in Abhängigkeit von der Konzentration dreier unterschiedlicher CDP-DAG-Spezies (■, Dipalmitoyl-Spezies; ●, Dioleoyl-Spezies; ▲, ein Gemisch, das die 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Spezies als Haupt-Komponente enthält).

Die K_M -Werte für alle molekularen Spezies und beide Enzyme liegen im Bereich von 4 bis 20 μ M. Entsprechende Werte zwischen 2 μ M und 46 μ M sind für die PGPSs aus Rizinus, Mung Bohne, *E. coli* und *S. cerevisiae* beschrieben (Moore, 1974; Hirabayashi et al., 1976; Griebau & Frentzen, 1994; Minskoff & Greenberg, 1994). Dagegen zeigen beide Isoenzyme deutliche Unterschiede in ihren V_{MAX} -Werten. Die höchsten Aktivitäten erreichen beide PGPSs mit Ei-CDP-DAG. CDP-DAG-Spezies, die aus Ei-Lecithin hergestellt sind, enthalten vornehmlich Palmitinsäure in der *sn*-1 Position und Ölsäure in der *sn*-2 Position des Glyceringerüsts (Hostetler et al., 1975). Mit CDP-Dioleoylglycerol weisen beide PGPSs die geringsten V_{MAX} -Werte auf, während zumindest PGPS1 mit CDP-Dipalmitoylglycerol fast den V_{MAX} -Wert für Ei-CDP-DAG erreicht. Hingegen ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, die PGPS2 mit CDP-Dipalmitoylglycerol erzielt, deutlich kleiner als die für Ei-CDP-DAG. Die Spezies-Spezifitäten der PGPS-Isoenzyme aus *A. thaliana* spiegeln sich demnach in den entsprechenden V_{MAX} -Werten wieder (Tab. 3.5). Im Gegensatz zu PGPS2 weist PGPS1 dabei eine deutlich höhere Differenz zwischen den Werten für die Dipalmitoyl-Spezies und die Dioleoyl-Spezies auf. Umgekehrt ist die Differenz zwischen den maximalen Geschwindigkeiten für Ei-CDP-DAG und CDP-Dipalmitoylglycerol bei PGPS2 ausgeprägter als bei PGPS1. Ebenso zeigt auch die PGPS aus Mung Bohnen-Mitochondrien wesentlich höhere Aktivität mit CDP-Dipalmitoylglycerol als mit CDP-Dioleoylglycerol, wobei Ei-CDP-DAG allerdings intermediäre Aktivitäten liefert (Griebau & Frentzen, 1994). Wie bei den *A. thaliana*-Isoenzymen beruhen die CDP-DAG-Spezies-Spezifitäten des Mung Bohnen-Enzyms im wesentlichen auf den unterschiedlichen V_{MAX} -Werten. Dagegen weist auch die mitochondriale PGPS aus Hamster, wie die Isoenzyme aus *A. thaliana*, höhere Aktivitäten mit

Ei-CDP-DAG auf, wobei, im Unterschied zu den *A. thaliana*-Enzymen, CDP-Dipalmitoylglycerol und CDP-Dioleoylglycerol vergleichbare Ergebnisse liefern (Stuhnke-Sekalec & Stanacev, 1989).

Tabelle 3.5: Kinetische Konstanten der *A. thaliana*-Isoenzyme PGPS1 und PGPS2 für unterschiedliche molekulare Spezies des Substrats CDP-DAG. Die Berechnung der Werte erfolgte nach Lineweaver & Burk, Woolf und Eadie & Hofstee. Die Werte für die gereinigten Isoenzyme entsprechen denen, die in Abb. 3.17 grafisch dargestellt sind und werden hier zum Vergleich noch mal aufgeführt. (n.b., nicht bestimmt; 16:0₂, CDP-Dipalmitoylglycerol; 18:1₂, CDP-Dioleoylglycerol; Ei, ein CDP-DAG-Gemisch, das die 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Spezies als Hauptkomponente enthält).

	CDP-DAG-Spezies	CDP-DAG-Spezies		
		16:0 ₂	18:1 ₂	Ei
		K _M [μM]		
		V _{MAX} [nmol/min/mg]		
PGPS1	Membrangebunden	20	6	n.b.
	Membrangebunden, HIS ₆ -Domäne	14	5	n.b.
	Gereinigt, HIS ₆ -Domäne	17	12	13
PGPS2	Membrangebunden	10	16	n.b.
	Membrangebunden, HIS ₆ -Domäne	5	4	n.b.
	Gereinigt, HIS ₆ -Domäne	12	7	7,3

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeiten von 79 % zwischen den Proteinen PGPS1 und PGPS2 sollte untersucht werden, ob sich diese Enzyme hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass PGPS1 beim Import in die Mitochondrien der Hefe prozessiert wird (Abb. 3.13). Damit weisen beide pflanzlichen PGPSs in etwa die gleiche molekulare Masse auf. Ebenso werden dadurch die Unterschiede in der Primärstruktur zwischen beiden Proteinen, die im N-terminalen Bereich konzentriert sind, weiter minimiert. Die resultierenden sehr hohen Aminosäuresequenzähnlichkeiten spiegeln sich in den ähnlichen katalytischen Eigenschaften wieder. Beide PGPS-Isoenzyme aus *A. thaliana* besitzen ein pH-Optimum im alkalischen Bereich, sind strikt abhängig von divalenten Kationen und zeigen die für pflanzliche PGPSs typische Spezifität für Mn²⁺-Ionen. Sie sind durch Triton X-100 stimulierbar und können, wie bereits erläutert, mit diesem Detergenz in katalytisch aktiver Form aus den Membranen extrahiert werden, wodurch eine

Reinigung der Proteine ermöglicht wurde. Beide Enzyme zeigen typische Sättigungskinetiken für die Substrate Glycerol-3-phosphat und CDP-DAG. In Bezug auf die CDP-DAG-Spezies-Spezifitäten traten jedoch Unterschiede zwischen den *A. thaliana*-Isoenzymen auf, die auf unterschiedlichen V_{MAX} -Werten für die verschiedenen molekularen CDP-DAG-Spezies beruhen.

3.5 Die *A. thaliana* Columbia C24 JOV-Mutante mit einem Defekt in PGPS1

Die *A. thaliana*-Mutante JOV trägt einen Defekt im Gen für PGPS1. Die Mutante wurde durch eine T-DNA-Insertion hergestellt, wobei nach der "Promotor-trapping"-Methode verfahren wurde (Kushnir, persönliche Mitteilung). Molekularbiologische Analysen zeigten, dass die verwendete Hygromycin-Kassette unmittelbar am Startkodon von PGPS1 in das Genom integriert wurde (Kushnir, persönliche Mitteilung). Die homozygote Mutante ist blassgelb bis hellgrün und zeigt ein stark verlangsamtes Wachstum (Abb. 3.18). Dieses Wachstum wird aber nur dann erreicht, wenn die Mutante unter sterilen Bedingungen in MS-Flüssigmedium, gewissermaßen "halb-submers", bei hohen Sucrosekonzentrationen (5-10 %) kultiviert wird. Zur Blüte ist es unter diesen Bedingungen allerdings noch nicht gekommen, so dass eine Saatgutvermehrung nur über die heterozygote Linie möglich ist, die sich im Phänotyp nicht vom Wildtyp unterscheidet. Zur Zeit werden Versuche durchgeführt, die Mutante unter sterilen Bedingungen auf MS-Festmedium zur Blüte zu bringen.

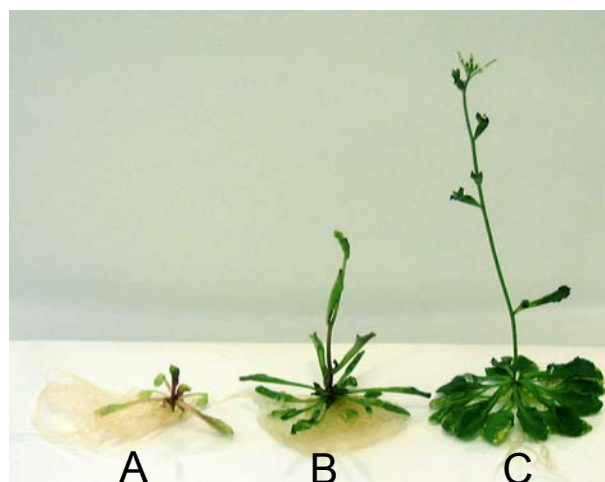


Abb. 3.18: Eine Fotografie unterschiedlicher *A. thaliana* Linien (**A**, *A. thaliana* Columbia C24 JOV; **B**, *A. thaliana* Columbia C24 JOV, komplementiert mit dem genomischen Abschnitt, der für PGPS1 kodiert; **C**, *A. thaliana* Columbia C24. Alle Pflanzen aus 7-wöchiger *in vitro*-Kultur).

Der Phänotyp der JOV-Mutante steht im Einklang mit der bereits diskutierten Hypothese, dass das PGPS1-Gen nicht nur für das mitochondriale, sondern auch für das plastidäre Isoenzym kodiert. Mit Hilfe der JOV-Mutante sollte dies experimentell verifiziert werden. Die Versuche werden parallel in den Laboren von S. Kushnir (Universität Gent, Belgien), H.-P. Braun (Universität Hannover) und M. Frentzen (RWTH Aachen) durchgeführt.

Wie S. Kushnir und Mitarbeiter zeigten, ist der Phänotyp der Mutante tatsächlich auf die T-DNA-Insertion in das PGPS1-Gen zurückzuführen. Die Transformation der Mutante mit Konstrukten, die den ORF bzw. den den ORF repräsentierenden genomischen Abschnitt von PGPS1 unter Kontrolle eines doppelten 35S-Promotors enthielten, stellten den Wildtypcharakter der Pflanzen weitgehend wieder her (Abb. 3.18). Im nächsten Schritt wurde die *Synechocystis*-PGPS-Sequenz mit unterschiedlichen Transitpeptidsequenzen fusioniert, um eine Einschleusung des Expressionsprodukts entweder in die Plastiden oder in die Mitochondrien zu erzielen. Die chimären Sequenzen wurden unter der Kontrolle des 35S-Promotors in die JOV-Mutante transformiert. Die Analyse der Transformanten zeigte allerdings, dass mit Hilfe der *Synechocystis*-Konstrukte der Defekt der Mutante nicht kompensiert wird (Kushnir, Müller & Frentzen; unveröffentlicht). Zur Zeit wird untersucht, ob dieses Ergebnis darauf beruht, dass die chimären *Synechocystis*-Gene in der *A. thaliana*-Mutante nicht funktional exprimiert werden oder ob die Mutante nur dann komplementierbar ist, wenn die PGP-Synthese in beiden Organellen wiederhergestellt wird.

Um den auffälligen Phänotyp der Mutante aufzuklären, werden im Labor von H.-P. Braun Suspensionskulturen der Mutante angelegt. Aus den Zellen dieser Kulturen ist es möglich, intakte Mitochondrien und Plastiden in relativ sauberer Form zu isolieren. Sobald die Suspensionskulturen etabliert sind, sollen Organellfraktionen isoliert und mittels PGPS-Enzymtests analysiert werden, um somit direkte Hinweise auf ein "twin-targeting" des PGPS1-Präproteins in die Mitochondrien und Plastiden zu erhalten.

3.5.1 PGPS-Aktivitäten in der *A. thaliana*-Mutante C24 JOV

Zur Analyse der PGPS-Aktivitäten in der Mutante wurden zunächst Gesamtmembranen aus der Mutante und dem Wildtyp für enzymatische Untersuchungen isoliert. Da der Anteil plastidärer Membranen in Wurzeln und der Anteil von Mitochondrien in den Blättern im Vergleich zum jeweils anderen Organ geringer ist (Forde & Steere, 1976), wurden

Gesamtmembranen aus beiden Organen isoliert. In Enzymtests mit $[U^{14}C]$ Glycerol-3-phosphat und unmarkiertem CDP-DAG zeigte sich, dass die PGPS-Aktivität in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer ist (Abb. 3.19). Diese Daten stehen im Einklang mit den genetischen Untersuchungen, die eine Inaktivierung des PGPS1-Gens in der Mutante zweifelsfrei nachweisen konnten (Kushnir, persönlich Mitteilung). Die Membranfraktionen aus den Wurzeln und Blättern der Mutante wiesen PGPS-Aktivitäten von 48 pmol/min/mg Protein bzw. 76 pmol/min/mg Protein auf. Die entsprechenden Werte für die Wildtyp-Pflanzen lagen bei 183 und 271 pmol/min/mg Protein. Somit ist die PGPS-Aktivität in den Membranfraktionen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp um ca. 73 % reduziert und zwar sowohl in den Wurzel- als auch in der Blattfraktionen (Abb. 3.19). Diese Ergebnisse werden durch die Lipidanalysen von Hagio et al. (2001) gestützt, die zeigten, dass eine *A. thaliana*-Mutante, die eine Punktmutation im PGPS1-Gen trägt, einen im Vergleich zum Wildtyp auf 25 % reduzierten Gesamt-PG-Gehalt aufweist. Dass sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln der Mutante die PGPS-Aktivität in gleichem Maße reduziert ist, deutete darauf hin, dass neben der plastidären auch die mitochondriale PG-Biosynthese beeinträchtigt ist, da sonst nur in dem Organ eine deutliche Reduktion der PGPS-Aktivität zu beobachten sein sollte, in dem das jeweilige Organell stärker vertreten ist. Wenn also nur die mitochondriale PGPS durch die Mutation betroffen wäre, sollte dies einen geringeren Einfluss auf die Gesamtaktivität in den grünen Blättern haben, da hier, wie bereits erwähnt, die plastidären Membranen deutlich stärker vertreten sind. Wäre hingegen nur die plastidäre PGPS defekt, so sollten die Unterschiede in den Werten aus den Wurzelfraktionen geringer ausfallen. Daher deuten diese Daten auf einen Verlust der PGPS-Aktivität in beiden Organellen und damit auf ein "twin-targeting" des PGPS1-Präproteins hin. Zusätzlich liefern diese Daten auch erstmals Hinweise, dass die PGPS2-Aktivität in den pflanzlichen Geweben für ca. 27 % der zellulären PGP-Synthese verantwortlich ist. Dieser Anteil spiegelt sich in den PGPS-Aktivitäten mikrosomaler Fraktionen nicht wieder, da diese neben dem Endomembransystem große Anteile an plastidären und mitochondrialen Membranen enthalten (siehe unten).

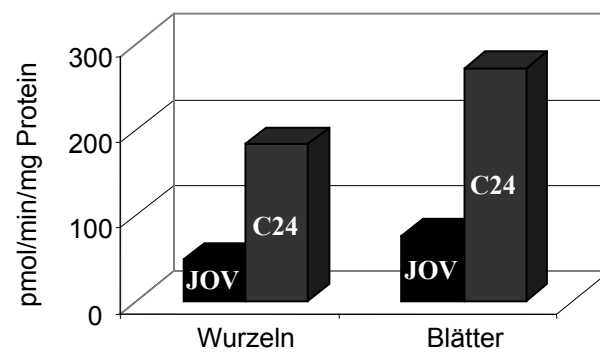


Abb. 3.19: Spezifische PGPS-Aktivitäten in den Gesamtmembranen aus Wurzeln und Blättern der *A. thaliana* Wildtyppflanzen (C24) und der *A. thaliana*-Mutante C24 JOV (JOV).

Um die Ergebnisse weiter abzusichern, wurden zur Anreicherung von Plastiden und Mitochondrien Differentialsedimente aus Blättern und Wurzeln isoliert. Die 10.000 x g-Fraktionen aus Blättern enthielten in der Hauptsache Chloroplasten, während in den entsprechenden Fraktionen aus Wurzeln die Mitochondrien angereichert wurden. Die jeweiligen 100.000 x g-Fraktionen stellen im Gegensatz dazu Anreicherungen der Endomembransysteme dar, die allerdings, bedingt durch die während der Aufarbeitung aufgebrochenen semiautonomen Organellen, in erheblichem Maße mit plastidären und mitochondrialen Membranen verunreinigt sind.

In den Wurzelmembranen der Mutante lagen die spezifischen PGPS-Aktivitäten bei 40 pmol/min/mg Protein in den 10.000 x g-Membranfraktionen und 32 pmol/min/mg Protein in den 100.000 x g-Membranfraktionen (Abb. 3.20). Für die Wildtyp-Pflanzen wurden Werte von 129 und 120 pmol/min/mg Protein in den entsprechenden Fraktionen ermittelt. In den Blätter wies die Mutante spezifische Aktivitäten von 54 pmol/min/mg Protein in den 10.000 x g- und 49 pmol/min/mg Protein in den 100.000 x g-Membranfraktionen auf. Dagegen zeigten die entsprechenden Fraktionen der *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen spezifische Aktivitäten von 202 und 457 pmol/min/mg Protein. Durchschnittlich waren die Aktivitäten in der Mutante wieder um ca. 70 % geringer als die in den Kontrollpflanzen und bestätigten damit die mit den Gesamtmembranfraktionen ermittelten Ergebnisse.

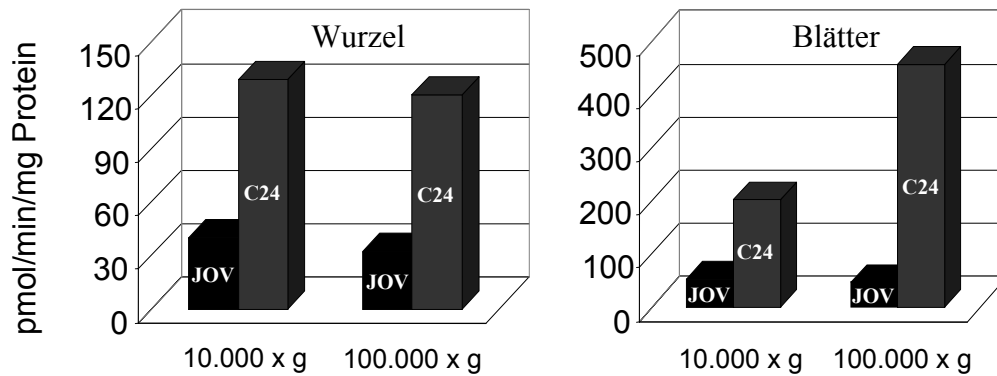


Abb. 3.20: Spezifische PGPS-Aktivitäten in Differentialsedimenten aus Wurzeln und Blättern der *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen (C24) und der *A. thaliana*-Mutante C24 JOV (JOV).

Ein abweichendes Ergebnis lieferten die 100.000 x g-Membranfraktionen der Blätter. In den Fraktionen des Wildtyps wurden die höchsten PGPS-Aktivitäten ermittelt, während die entsprechenden Fraktionen der Mutante nur etwa 11 % der Wildtyp-Aktivität aufwiesen (Abb. 3.20). Diese hohen Enzymaktivitäten in den Wildtyp-Fractionen spiegeln die Verunreinigungen mit plastidären Membranen wieder. Eine entsprechende Kontamination war in den Wurzelfractionen der Wildtyp-Pflanzen nicht so stark ausgeprägt, da in Wurzelzellen der Anteil plastidärer Membranen wesentlich geringer ist als in fotosynthetischen Zellen, in denen diese etwa 75 % der zellulären Membranen repräsentieren (Forde & Steere, 1976). Die unterschiedlich hohe Kontamination der 100.000 x g-Membranfraktionen mit plastidären Membranen wurde durch die Aktivitätsanalyse der UDP-Galaktose : DAG-Galaktosyltransferase, einem Markerenzym für plastidäre Hüllmembranen, experimentell verifiziert. Die Daten der 10.000 x g-Fractionen aus Wurzeln zeigen, dass in der PGPS1-Mutante die mitochondriale PGP-Synthese reduziert ist, während andererseits die im Vergleich zum Wildtyp geringeren Syntheseraten in den 10.000 x g-Fractionen aus Blättern der Mutante für eine plastidäre Lokalisation von PGPS1 sprechen. Somit stützen auch diese Ergebnisse die Annahme, dass in der JOV-Mutante durch die Inaktivierung des PGPS1-Gens die mitochondriale als auch die plastidäre PG-Synthese defekt ist.

3.5.2 ³²P-Markierungsversuche mit *A. thaliana* Columbia C24 JOV

In einem zweiten experimentellen Ansatz zur Charakterisierung der *A. thaliana*-PGPS1-Mutante sollte analysiert werden, ob sich das Phospholipidmuster dieser Pflanzen von dem der Wildtyp-Pflanzen unterscheidet. Zu diesem Zweck wurden die Phosphodiacylglycerole *in*

vivo durch Inkubation der Pflanzen in $[^{32}\text{P}]\text{O}_4^{3-}$ radioaktiv markiert. Nach 0,5, 4 und 8 stündiger Inkubation wurden die Lipide aus den Pflanzen extrahiert und dünnschichtchromatographisch in Trichlormethan : Methanol : 25 % NH_3 in H_2O (60:30:3; v/v) aufgetrennt. Mit diesem Laufmittel können alle Phosphodiacylglycerole voneinander getrennt werden. Lediglich PI und PS haben sehr ähnliche R_f -Werte. Zur Auswertung wurde die Radioaktivität der einzelnen Lipide am Bioimager FLA-3000 und durch Szintillationszählung quantifiziert.

Der Gesamteinbau von $[^{32}\text{P}]\text{O}_4^{3-}$ in die Phosphodiacylglycerole der Wildtyp-Pflanzen als auch der PGPS1-Mutante stieg mit zunehmender Inkubationszeit deutlich an (Tabelle 3.6). Hierin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante, da in der Mutante die Biosynthese der dominierenden Phosphodiacylglycerole PC, PE und PI nicht gestört ist. Die ermittelten Markierungsmuster korrelieren recht gut mit denen, die bei Markierungsexperimenten mit unterschiedlichen Substanzen und verschiedenen Pflanzen erzielt wurden (Roughan, 1970; Williams et al., 1976; Ohnishi & Yamada, 1980; Stobart et al., 1980; Meijer et al., 2001).

Tabelle 3.6: Phosphodiacylglycerolmarkierungsmuster der PGPS1-Mutante und des *A. thaliana*-Wildtyps.

	JOV-Mutante			Wildtyp		
	Inkubationszeit [h]			Inkubationszeit [h]		
	0,5	4	8	0,5	4	8
	Lipidgesamtmarkierung [dpm]			Lipidgesamtmarkierung [dpm]		
	$0,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$0,1 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$
	relative Markierung [%]			relative Markierung [%]		
CL	0,3	0,4	2,5	0,2	0,3	3,9
PG	0,2	0,3	5,6	0,1	0,2	10,7
PE	4,2	5,1	36,4	11,3	8,8	30,1
PC	77,7	58,9	33,5	76,7	61,7	35,1
PI/PS	17,7	35,4	21,3	11,8	29	19,7

PC wurde sowohl im Wildtyp als auch in der JOV-Mutante als Hauptprodukt markiert. Die Radioaktivität im PC nahm mit zunehmender Inkubationszeit in Relation zu den anderen Lipiden aber nicht absolut ab. Das ist darauf zurückzuführen, dass PC das primäre Hauptprodukt der mikrosomalen Phosphodiacylglycerolbiosynthese darstellt, das mit den höchsten Syntheseraten am ER gebildet wird (Williams et al., 1976). Vom ER wird PC zu den verschiedenen Organellen transportiert und dient in den Plastiden als Substrat für die Synthese der dominierenden Glycodiacylglycerole (Williams et al., 1976). Da bei dieser Glycodiacylglycerolsynthese aus PC die radioaktiv markierte phosphathaltige Kopfgruppe abgespalten wird, nimmt die prozentuale PC-Markierung mit zunehmender Inkubationszeit ab.

Die PE-Markierung stieg im Wildtyp und in der Mutante im Vergleich zu PC erst sehr spät an. Auch dies steht im Einklang mit anderen Versuchen (Roughan, 1975) und ist ein Anzeichen dafür, dass ein Teil des PE durch Decarboxylierung des mikrosomal synthetisierten PS hergestellt wird. Die Markierung von PI und PS zeigte ein relatives Maximum nach 4 Stunden, während die Gesamtmarkierung dieser Lipide zwischen 4 und 8 stündigen Inkubationszeiten relativ konstant blieb.

Die Markierung von PG und CL erfolgte dagegen sehr spät und war erst nach einer 8 stündigen Inkubation zweifelsfrei nachweisbar. Aus dem Vergleich der Daten für den Wildtyp und die JOV-Mutante wird allerdings deutlich, dass in der PGPS1-Mutante der PG-Anteil im Vergleich zum Wildtyp um ca. 50 % reduziert ist. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus 3.5.1 und spiegeln deutlich die reduzierte Biosyntheserate für PG in der Mutante wieder. Ebenso war die Markierung von CL, das in Mitochondrien CDP-DAG-abhängig aus PG synthetisiert wird, in der Mutante klar beeinträchtigt. Geht man allerdings davon aus, dass in der JOV-Mutante, wie oben beschrieben, die mitochondriale PG-Synthese vollständig inaktiviert ist, so sollte kein Substrat für die mitochondriale CLS verfügbar sein und somit kein CL akkumulieren. Dies wurde an den PGPS-Mutanten der Hefen und Hamsterzellen beobachtet, in denen kein CL nachweisbar war (Ohtsuka et al.1993A; Ohtsuka et al.1993B; Janitor et al., 1996; Dzugasova et al., 1998). Somit stellte sich die Frage, warum die *A. thaliana*-PGPS1-Mutante in ihren CL-Gehalten lediglich reduziert ist. Dies kann verschiedene Gründe haben. Für eine *E. coli* CLS-Mutante konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die PSS in einer Nebenreaktion geringe Mengen CL synthetisiert (Nishijima et al., 1988). Allerdings erreicht diese Mutante bei weitem nicht die CL-Gehalte des Wildtyps, so dass es auch im Falle der *A. thaliana*-Mutante als unwahrscheinlich angesehen werden kann, dass

eine solchen Nebenreaktion ausreicht, um die ermittelten PG- und CL-Gehalte zu erreichen (Tabelle 3.6). Wahrscheinlicher scheint ein PG-Import aus dem ER in die Mitochondrien der Mutante zu sein. Ein solcher Import ist bislang nur anhand von *in vitro*-Versuchen mit permeabilisierten Rattenherzzellen gezeigt worden (Cao & Hatch, 1995). Somit besitzt die *A. thaliana*-Mutante durch ihren Defekt im PGPS1-Gen nicht nur einen komplexen Phänotyp, sondern liefert darüber hinaus auch Hinweise auf einen für Pflanzen bislang unbekannten Lipidtransfermechanismus.

4. Fazit und Aussicht

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung von Genen für CDP-Diacylglycerol : Glycerol-3-phosphat-Phosphatidyltransferasen (E.C. 2.7.8.5; Phosphatidylglycerophosphat-Synthase; PGPS) aus *Arabidopsis thaliana*.

Durch das wiederholte Absuchen der Datenbanken von *A. thaliana*, deren Genom Ende 2000 vollständig sequenziert war, wurden fünf Gene identifiziert, die aufgrund von Sequenzvergleichen für drei unterschiedliche Phosphatidyltransferasen kodieren. Diese Einteilung wurde durch funktionale Expressionsstudien in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* bestätigt. Die Translationsprodukte der Gene AC012563 und AL35540 katalysieren den Transfer eines Phosphatidylrestes aus CDP-Diacylglycerol (CDP-DAG) auf *myo*-Inositol. Demnach handelt es sich bei diesen Genen um CDP-DAG : *myo*-Inositol-Phosphatidyltransferasen. Das Gen AF118223.2 kodiert vermutlich für eine Cardiolipinsynthase. Da die Sequenz in Mikroorganismen nicht funktional exprimierbar war, soll der im Rahmen dieser Arbeit klonierte offene Leserahmen dieses Gens dazu verwendet werden, die Expression in *A. thaliana* zu hemmen und somit die Identität des Gens experimentell zu verifizieren. Die beiden Gene AC004697.2 und AL132970.2 wurden als PGPS-Gene identifiziert, da ihre Translationsprodukte spezifisch den Transfer des Phosphatidylrestes aus CDP-DAG auf Glycerol-3-phosphat katalysieren. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen hohe Ähnlichkeiten in ihren zentralen und C-terminalen Bereichen. Sie unterscheiden sich aber im N-terminalen Bereich, in dem PGPS1 im Unterschied zu PGPS2 eine Extension aufweist. Funktionale Expressionsstudien in *S. cerevisiae* lieferten Hinweise, dass PGPS2 ein mikrosomales Enzym ist, wohingegen es sich bei PGPS1 um ein Präprotein handelt, das unter Abspaltung der N-terminalen Extension in Hefemitochondrien importiert und in seine katalytisch aktive Konformation überführt wird.

Sowohl PGPS1 als auch PGPS2 konnten durch den Einsatz des Detergenz Triton X-100 in ihrer katalytisch aktiven Form aus den Membranen der Expressionswirte extrahiert werden. Mit den rekombinanten Membranproteinen, die C-terminal mit einer His₆-Domäne fusioniert waren, ist es gelungen, die *A. thaliana*-Isoenzyme in einem einzigen Schritt zu reinigen und eine fast homogene PGPS2-Fraktion zu gewinnen.

Mit diesen gereinigten Proteinfractionen sowie mit den membrangebundenen Formen der Isoenzyme wurden vergleichende biochemische Untersuchungen durchgeführt, um herauszufinden, ob sich die PGPSs nicht nur in ihrer subzellulären Lokalisation, sondern auch in ihren katalytischen Eigenschaften unterscheiden. Die biochemische Charakterisierung zeigte deutlich, dass beide Proteine vergleichbare Eigenschaften in Bezug auf pH-Optimum, Detergenz-Stimulierung und Kationen-Abhängigkeit besitzen. Ebenso weisen die Isoenzyme für beide Substrate fast gleiche K_M -Werte auf. Sie unterscheiden sich aber in ihren V_{MAX} -Werten für CDP-Dioleoylglycerol und CDP-Dipalmitoylglycerol, was darauf hindeutet, dass in den verschiedenen Zellkompartimenten der Pflanze durch die Wirkung der PGPS-Isoenzyme Phosphatidylglycerolmoleküle mit unterschiedlichen Fettsäuremustern als Hauptkomponenten synthetisiert werden.

Das erarbeitete Reinigungs-Protokoll für die PGPS-Isoenzyme eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit, Antikörper gegen die pflanzlichen Enzyme zu gewinnen und ihren Gehalt in den verschiedenen Kompartimenten sowie in den verschiedenen Pflanzengeweben und Entwicklungsstadien zu analysieren.

Anhand einer *A. thaliana*-Mutante, die eine T-DNA-Insertion im PGPS1-Gen trägt, wurde zum einen demonstriert, dass dieses Gen für ca. 70 % der PGPS-Aktivität in der Pflanze verantwortlich ist. Zum Zweiten konnte die Annahme, dass das PGPS1-Präprotein in pflanzlichen Zellen nicht nur in Mitochondrien, sondern auch in Plastiden transportiert und zu einem katalytisch aktiven Protein prozessiert wird, durch Enzymtests mit Membranfraktionen aus der Mutante und durch radioaktive Markierung der Phosphodiacylglycerole bekräftigt werden. Darüber hinaus deuten die erzielten Ergebnisse auf einen bislang in Pflanzen unbekannten Import des Lipids Phosphatidylglycerol aus den Endomembranen in die Mitochondrien hin.

Durch die Klonierung der PGPS-Gene aus *A. thaliana* und die Identifizierung der Mutante eröffnet sich nun die Möglichkeit, die Funktion der anionischen Membranlipide

Phosphatidylglycerol und Cardiolipin in den unterschiedlichen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle zu analysieren.

5. Literatur:

- Andrews, J. und Mudd, J. B.** Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts; Pathway and Localisation. *Plant Phys.* **1985**; 79: 259-265.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D. Seidman, J.G., Smith, J.A, Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. und Varki, A.** Current Protocols in Molecular Biology. **1995** New York: John Wiley & Sons.
- Bligny, R. und Douce R.** A precise localization of cardiolipin in plant cells. *Biochim Biophys Acta.* **1980**; 617(2):254-63.
- Bleasdale, J. E. und Johnston, J. M.** CMP-dependent incorporation of [¹⁴C]Glycerol 3-phosphate into phosphatidylglycerol and phosphatidylglycerol phosphate by rabbit lung microsomes. *Biochim Biophys Acta.* **1982**; 710(3):377-90.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard. J. und Douce R.** Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem.* **1983**; 258(21):13281-6.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., und Short, J.M.** XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* with β -galactosidase selection. *Biotechniques* **1987**; 5:376-378.
- Cao, S.G. und Hatch, G.M.** Cardiolipin is synthesized from exogenous phosphatidylglycerol in rat heart. *Biochim Biophys Acta.* **1995**;1256(1):97-102.
- Carman, G. M. und Wieczorek, D. S.** Phosphatidylglycerophosphate synthase and phosphatidylserine synthase activities in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol.* **1980**; 142(1):262-7.
- Castuma, C. E., Crooke, E. und Kornberg, A.** Fluid membranes with acidic domains activate DnaA, the initiator protein of replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **1993**; 268(33):24665-8.
- Chang, S. C., Heacock, P.N., Clancey, C. J, und Dowhan, W.** The PEL1 gene (renamed PGS1) encodes the phosphatidylglycero-phosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **1998 A**; 273(16):9829-36.
- Chang, S. C., Heacock, P. N., Mileykovskaya, E., Voelker, D. R. und Dowhan, W.** Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **1998 B**; 273(24):14933-41.
- Collin, S., Justin, A. M., Cantrel, C., Arondel, V. und Kader, J. C.** Identification of AtPIS, a phosphatidylinositol synthase from *Arabidopsis*. *Eur J Biochem.* **1999**; 262(3):652-8.
- Crooke, E.** *Escherichia coli* DnaA protein--phospholipid interactions: in vitro and in vivo. *Biochimie* **2001**; 83(1):19-23.

- Crooke, E., Castuma, C.E. und Kornberg, A.** The chromosome origin of *Escherichia coli* stabilizes DnaA protein during rejuvenation by phospholipids. *J Biol Chem.* **1992**; 267(24):16779-82.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M. und Dickson, R.** Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **1998**; 14(16):1471-510.
- Daum, G. und Vance, J. E.** Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res.* **1997**; 36(2-3):103-30.
- Delhaize, E., Hebb, D. M., Richards, K. D., Lin, J. M., Ryan, P. R. und Gardner, R. C.** Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *J Biol Chem.* **1999**; 274(11):7082-8.
- Dennis, E.A. und Kennedy E.P.** Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *J Lipid Res.* **1972**;13(2):263-7.
- de Rudder, K. E., Sohlenkamp, C. und Geiger, O.** Plant-exuded choline is used for rhizobial membrane lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem.* **1999**; 274(28):20011-6.
- Dewey, R. E., Wilson, R.F., Novitzky, W. P. und Goode, J. H.** The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. *Plant Cell.* **1994**; 6(10):1495-507.
- Dittmer, J. C. und Lester, R. L.** A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thinlayer chromatograms. *J. Lipid Res.* **1964**; 5:126-127.
- Dorne, A., Joyard, J. und Douce, R.** Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1990**; 87(1):71-4.
- Dorne, A.-J. und Heinz, E.** Position and pairing of fatty acids in phosphatidylglycerol from pea leaf chloroplasts and mitochondria. *Plant Science* **1989**; 60:39-46.
- Dryden, S. C. und Dowhan, W.** Isolation and expression of the *Rhodobacter sphaeroides* gene (pgsA) encoding phosphatidylglycerophosphate synthase. *J Bacteriol.* **1996**; 178(4):1030-8.
- Dubertret, G., Mirshahi, A., Mirshahi. M., Gerard-Hirne, C. und Tremolieres, A.** Evidence from in vivo manipulations of lipid composition in mutants that the delta 3-trans-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol is involved in the biogenesis of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem.* **1994**; 226(2):473-82.
- Duchene, S., Smutny, J. und Siegenthaler, P. A.** The topology of phosphatidylglycerol populations is essential for sustaining photosynthetic electron flow activities in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta.* **2000**; 1463(1):115-20.

- Dzugasova, V., Obernauerova, M., Horvathova, K., Vachova, M., Zakova, M. und Subik, J.** Phosphatidylglycerolphosphate synthase encoded by the PEL1/PGS1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* is localized in mitochondria and its expression is regulated by phospholipid precursors. *Curr Genet.* **1998**; 34(4):297-302.
- Exton, J. H.** Phospholipase D. *Ann N Y Acad Sci.* **2000**; 905:61-8.
- Flachmann, R. und Kühlbrandt, W.** Crystallization and identification of an assembly defect of recombinant antenna complexes produced in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**; 93(25):14966-71.
- Forde, J. und Steer, M. W.** The use of quantitative electron microscopy in the study of lipid composition of membranes. *J. Exp. Bot.* **1976**; 27:1137-1141.
- Frentzen, M. und Griebau, R.** Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria. *Plant Phys.* **1994**; 106: 1527-1532.
- Fulgosi, H. und Soll, J.** A gateway to chloroplasts - protein translocation and beyond. **2001** *J. Plant Phys* 158,273.284
- Garner, J., Durrer, P., Kitchen, J., Brunner, J. und Crooke, E.** Membrane-mediated release of nucleotide from an initiator of chromosomal replication, *Escherichia coli* DnaA, occurs with insertion of a distinct region of the protein into the lipid bilayer. *J Biol Chem.* **1998**; 273(9):5167-73.
- Griebau, R. und Frentzen, M.** Biosynthesis of Phosphatidylglycerol in Isolated Mitochondria of etiolated Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Seedlings. *Plant Phys.* **1994**; 105: 1269-1274
- Guo, D. und Tropp, B. E.** A second *Escherichia coli* protein with CL synthase activity. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jan 17;1483(2):263-74.
- Guo, D. und Tropp, B. E.** Cloning of the *Bacillus firmus* OF4 cls gene and characterization of its gene product. *Biochim Biophys Acta.* **1998**; 1389(1):34-42.
- Hagio, M., Gombos, Z., Varkonyi, Z., Masamoto, K., Sato, N., Tsuzuki, M. und Wada H.** Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiol.* **2000**; 124(2):795-804.
- Hagio, M., Sakurai, I., Gombos, Z. und Wada, H.** Function of phosphatidylglycerol in photosynthesis. NPLC meeting South Lake Tahoe **2001**, Abstract P4.
- Hankamer, B., Barber, J. und Boekema, E. J.** Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1997 B**; 48: 641-67.
- Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S. und Barber, J.** Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur J Biochem.* **1997 A**; 243(1-2):422-9.

Häder, D.-P. Photosynthese. Thieme Verlag, 1999; Stuttgart.

Härtel, H., Dörmann, P. und Benning, C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(19):10649-54.

Härtel, H., Essigmann, B., Lokstein, H., Hoffmann-Benning, S., Peters-Kottig, M. und Benning, C. The phospholipid-deficient pho1 mutant of *Arabidopsis thaliana* is affected in the organization, but not in the light acclimation, of the thylakoid membrane. Biochim Biophys Acta. 1998; 1415(1):205-18.

Hase, M., Yoshimi, T., Ishikawa, Y., Ohba, A., Guo, L., Mima, S., Makise, M., Yamaguchi, Y., Tsuchiya, T. und Mizushima, T. Site-directed mutational analysis for the membrane binding of DnaA protein. Identification of amino acids involved in the functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids. J Biol Chem. 1998; 273(44):28651-6.

Heacock, P. N. und Dowhan, W. Construction of a lethal mutation in the synthesis of the major acidic phospholipids of *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1987; 262(27):13044-9.

Heacock P. N. und Dowhan W. Alteration of the phospholipid composition of *Escherichia coli* through genetic manipulation. J Biol Chem. 1989; 264(25):14972-7.

Henneberry, A. L., Wistow, G. und McMaster, C. R. Cloning, genomic organization, and characterization of a human cholinephosphotransferase. J Biol Chem. 2000; 275(38):29808-15.

Hirabayashi, T., Larson, T. J. und Dowhan, W. Membrane-associated phosphatidylglycerophosphate synthetase from *Escherichia coli*: purification by substrate affinity chromatography on cytidine 5'-diphospho-1,2-diacyl-sn-glycerol sepharose. Biochemistry 1976; 15(24):5205-11.

Hjelmstad, R. H. und Bell, R. M. sn-1,2-diacylglycerol choline- and ethanolaminephosphotransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence of the EPT1 gene and comparison of the CPT1 and EPT1 gene products. J Biol Chem. 1991; 266(8):5094-103.

Hobe, S., Forster, R., Klingler, J. und Paulsen, H. N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll a/b complex. Biochemistry. 1995; 34(32):10224-8.

Hostetler, K. Y., Galesloot, J. M., Boer, P. und van den Bosch, H. Further studies on the formation of Cardiolipin and phosphatidylglycerol in rat liver mitochondria, effect of divalent cations and the fatty acid composition of CDP-diglyceride. Biochim Biophys Acta 1975; 380: 382-389.

Hostetler, K.Y., Van den Bosch, H. und Van Deenen, L.L. Biosynthesis of cardiolipin in liver mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1971; 239(1):113-9.

Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 1990, 96: 23-28.

- Jackson, M., Crick, D.C. und Brennan, P.J.** Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. *J Biol Chem.* **2000**; 275(39):30092-9.
- Janitor, M., Jarosch, E., Schweyen, R. J. und Subik, J.** Molecular characterization of the PEL1 gene encoding a putative phosphatidylserine synthase. *Yeast.* **1995**; 11(13):1223-31.
- Janitor, M., Obernauerova, M., Kohlwein, S. D. und Subik, J.** The pell mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is deficient in cardiolipin and does not survive the disruption of the CHO1 gene encoding phosphatidylserine synthase. *FEMS Microbiol Lett.* **1996**; 140(1):43-7.
- Janitor, M. und Subik, J.** Molecular cloning of the PEL1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* that is essential for the viability of petite mutants. *Curr Genet.* **1993**; 24(4):307-12.
- Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C. und Chory, J.** Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97(14):8175-9.
- Jiang, F., Gu, Z., Granger, J.M. und Greenberg, M. L.** Cardiolipin synthase expression is essential for growth at elevated temperature and is regulated by factors affecting mitochondrial development. *Mol Microbiol.* **1999**; 31(1):373-9.
- Jiang, F., Kelly, B. L., Hagopian, K. und Greenberg, M. L.** Purification and characterization of phosphatidylglycerolphosphate synthase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* **1998**; 273(8):4681-8.
- Jiang, F., Rizavi, H. S. und Greenberg, M. L.** Cardiolipin is not essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on fermentable or non-fermentable carbon sources. *Mol Microbiol.* **1997**; 26(3):481-91.
- Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N. und Greenberg, M. L.** Absence of cardiolipin in the crd1 null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem.* **2000**; 275(29):22387-94.
- Katayama, T. und Crooke, E.** DnaA protein is sensitive to a soluble factor and is specifically inactivated for initiation of in vitro replication of the *Escherichia coli* minichromosome. *J Biol Chem.* **1995**; 270(16):9265-71.
- Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E. und Sekimizu, K.** The Initiator Function of DnaA Protein Is Negatively Regulated by the Sliding Clamp of the *E. coli* Chromosomal Replicase. *Cell* **1998**; 94:61–71.
- Kawasaki, K., Kuge, O., Chang, S. C., Heacock, P. N., Rho, M., Suzuki, K., Nishijima, M. und Dowhan, W.** Isolation of a chinese hamster ovary (CHO) cDNA encoding phosphatidylglycerophosphate (PGP) synthase, expression of which corrects the mitochondrial abnormalities of a PGP synthase-defective mutant of CHO-K1 cells. *J Biol Chem.* **1999**; 274(3):1828-34.

- Kawasaki, K., Kuge, O., Yamakawa, Y. und Nishijima, M.** Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from Chinese hamster ovary cells. *Biochem J.* **2001**; 354(Pt 1):9-15.
- Kikuchi, S., Shibuya, I. und Matsumoto, K.** Viability of an *Escherichia coli* pgsA null mutant lacking detectable phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J Bacteriol.* **2000**; 182(2):371-6.
- Kitchen, J. L., Li, Z. und Crooke, E.** Electrostatic interactions during acidic phospholipid reactivation of DnaA protein, the *Escherichia coli* initiator of chromosomal replication. *Biochemistry.* **1999**; 38(19):6213-21.
- Koshkin, V. und Greenberg, M. L.** Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem J.* **2000**; 347 Pt 3:687-91.
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G. H. und Barber, J.** Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J Biol Chem.* **2000**; 275(9):6509-14.
- Kyse-Anderson, J.** Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem.* **1984**; 10: 203-209.
- Leipelt, M., Warnecke, D., Zähringer, U., Ott, C., Müller, F., Hube, B. und Heinz, E.** Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi. *J Biol Chem.* **2001**; 276(36):33621-9.
- Loewus, F.A. und Murthy, P.P.N.** *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* **2000**; 150:1-19.
- Makewicz, A., Radunz, A. und Schmid, G. H.** Comparative immunological detection of lipids and carotenoids on peptides of photosystem I from higher plants and cyanobacteria. *Z Naturforsch [C].* **1996**; 51(5-6):319-28.
- Makise, M., Mima, S., Tsuchiya, T. und Mizushima, T.** Molecular mechanism for functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids: identification of important amino acids. *J Biol Chem.* **2001**; 276(10):7450-6.
- Manoharan, K., Chae, H. S., Cha, J. M., Cho, S. H., Shin, S. H., Cho, B. H. und Lee, W. S.** Synthesis of phosphatidylserine in carrot cells cultured under carbon-source starvation. *Plant Cell Physiol.* **2000**; 41(10):1143-8.
- Matsumoto, K.** Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids. *Mol Microbiol.* **2001**; 39(6):1427-33.
- Matsumoto, K.** Phosphatidylserine synthase from bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1997**; 1348(1-2):214-27.
- Messing, J.** New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* **1983**; 101: 20.

- Meijer, H.J., Arisz, S.A., Van Himbergen, J.A., Musgrave, A. und Munnik, T.** Hyperosmotic stress rapidly generates lyso-phosphatidic acid in *Chlamydomonas*. *Plant J.* **2001**;25(5):541-8.
- Messer, W., Blaesing, F., Jakimowicz, D., Krause, M., Majka, J., Nardmann, J., Schaper, S., Seitz, H., Speck, C., Weigel, C., Wegrzyn, G., Welzeck, M. und Zakrzewska-Czerwinska, J.** Bacterial replication initiator DnaA. Rules for DnaA binding and roles of DnaA in origin unwinding and helicase loading. *Biochimie.* **2001**; 83(1):5-12.
- Meyer, T. S. und Lamberts, B. L.** Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of micropgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochem. Biophys. Acta* **1965**; 107: 144-145.
- Minskoff, S. A. und Greenberg, M. L.** Phosphatidylglycerophosphate synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta.* **1997**; 1348(1-2):187-91.
- Moore, T.S.** Phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1982**; 33:235-59.
- Moore, T. S.** Phosphatidylglycerol Synthesis in Castor Bean Endosperm. *Plant Phys.* **1974**; 54: 164-168.
- Munnik, T., Arisz, S.A., de Vrije, T. und Musgrave, A. G** Protein Activation Stimulates Phospholipase D Signaling in Plants. *Plant Cell* **1995**; 7:2197-2210.
- Nikawa, J. und Yamashita, S.** Molecular cloning of the gene encoding CDPdiacylglycerol-inositol 3-phosphatidyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* **1984**; 143(2):251-6.
- Nishijima, S., Asami, Y., Uetake, N., Yamagoe, S., Ohta, A. und Shibuya I.** Disruption of the *Escherichia coli* *cls* gene responsible for cardiolipin synthesis. *J Bacteriol.* **1988**; 170(2):775-80.
- Nussberger, S., Dorr, K., Wang, D. N. und Kühlbrandt, W.** Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol.* **1993**; 234(2):347-56.
- Ohta, A., Obara, T., Asami, Y. und Shibuya, I.** Molecular cloning of the *cls* gene responsible for cardiolipin synthesis in *Escherichia coli* and phenotypic consequences of its amplification. *J Bacteriol.* **1985**; 163(2):506-14.
- Ohta, A., Waggoner, K., Radomska-Pyrek, A. und Dowhan, W.** Cloning of genes involved in membrane lipid synthesis: effects of amplification of phosphatidylglycerophosphate synthase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **1981**; 147(2):552-62.
- Okada, M., Matsuzaki, H., Shibuya, I. und Matsumoto, K.** Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus subtilis* gene for phosphatidylserine synthase. *J Bacteriol.* **1994** Dec;176(24):7456-61.

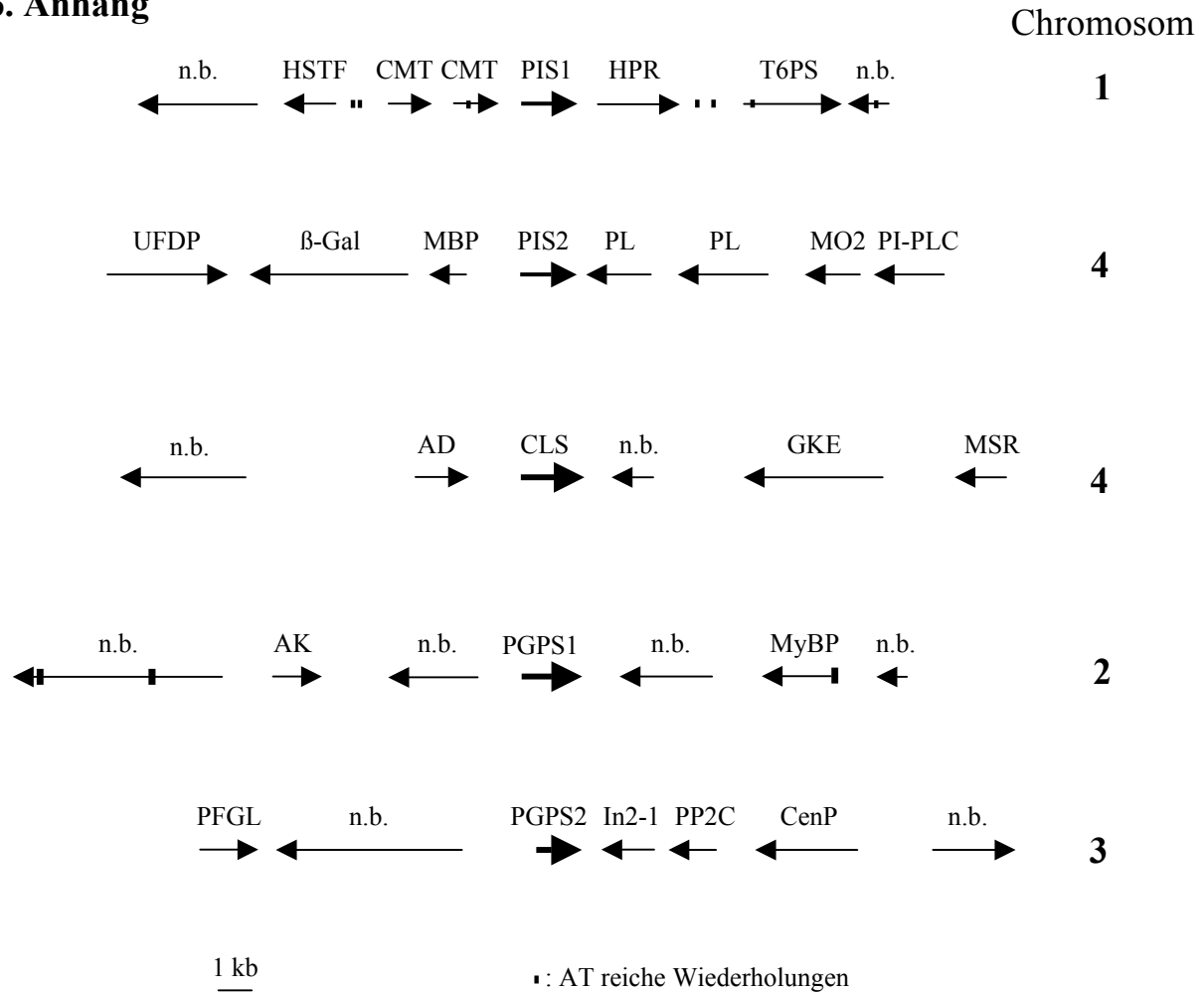
- Ohnishi, J.-I. und Yamada, M.** Glycerolipid synthesis in *Avena* leaves during greening of etiolated seedlings II. α -linolenic acid synthesis. *Plant Cell Physiol.* **1980**; 21(8): 1607-1618.
- Ohtsuka, T., Nishijima, M. und Akamatsu, Y.** A somatic cell mutant defective in phosphatidylglycerophosphate synthase, with impaired phosphatidylglycerol and cardiolipin biosynthesis. *J Biol Chem.* **1993A**; 268(30):22908-13.
- Ohtsuka, T., Nishijima, M., Suzuki, K. und Akamatsu, Y.** Mitochondrial dysfunction of a cultured Chinese hamster ovary cell mutant deficient in cardiolipin. *J Biol Chem.* **1993B**; 268(30):22914-9.
- Ostrander, D. B., Zhang, M., Mileykovskaya, E., Rho, M. und Dowhan, W.** Lack of mitochondrial anionic phospholipids causes an inhibition of translation of protein components of the electron transport chain. A yeast genetic model system for the study of anionic phospholipid function in mitochondria. *J Biol Chem.* **2001**; 276(27):25262-72.
- Ponting, C. P. und Kerr, I. D.** A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci* **1996**; 5(5):914-22.
- Rawlyer, A. und Siegenthaler, P. A.** Transmembrane distribution of phospholipids and their involvement in electron transport, as revealed by phospholipids A₂ treatment of spinach thylakoids. *Biochim Biophys Acta.* **1981**; 635(2):348-58.
- Riggs, M. G. und McLachlan, A.** A simplified screening procedure for large numbers of plasmid miniprepations. *Biotechniques* **1986**; 4: 310-313.
- Roper RL, Moss B.** Envelope formation is blocked by mutation of a sequence related to the HKD phospholipid metabolism motif in the vaccinia virus F13L protein. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):1108-17.
- Roughan, P.G.** Phosphatidyl choline: Donor of 18-carbon unsaturated fatty acids for glycerolipid biosynthesis. *Lipids.* **1975**;10(10):609-14.
- Roughan, P.G.** Turnover of the glycerolipids of pumpkin leaves. The importance of phosphatidylcholine. *Biochem J.* **1970**; 117(1):1-8.
- Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M. und Murata, N.** delta 9 Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups. *J Biol Chem.* **1994**; 269(41):25576-80.
- Salman, M., Lonsdale, J. T., Besra, G. S. und Brennan, P. J.** Phosphatidylinositol synthesis in mycobacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1999**; 1436(3):437-50.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** Molecular cloning: A laboratory manual. **1989**; Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sato, N., Hagio, M., Wada, H. und Tsuzuki, M.** Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97(19):10655-60.
- Schlame, M., Rua, D. und Greenberg, M. L.** The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res.* **2000**; 39(3):257-88.
- Schlame, M., Rüstow, B., Kunze, D., Rabe, H. und Reichmann, G.** Phosphatidylglycerol of rat lung. Intracellular sites of formation de novo and acyl species pattern in mitochondria, microsomes and surfactant. *Biochem J.* **1986**; 240(1):247-52.
- Sekimizu, K., Bramhill, D. und Kornberg, A.** ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* **1987**; 50(2):259-65.
- Sekimizu, K. und Kornberg, A.** Cardiolipin activation of dnaA protein, the initiation protein of replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **1988**; 263(15):7131-5.
- Shiao, Y.J., Lupo, G. und Vance, J.E.** Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine. *J Biol Chem.* **1995**; 270(19):11190-8.
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K. E., Rohrs, V. V., Lopez-Lara, I. M. und Geiger, O.** Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem.* **2000**; 275(35):27500.
- Stobart, A.K., Stymne, S. und Appelqvist, L.-A.** Desaturation of oleate-[¹⁴C] in leaves of Barley. *Phytochemistry*; **1980**; 19:1397-1402.
- Stone, S. J. und Vance, J. E.** Cloning and expression of murine liver phosphatidylserine synthase (PSS)-2: differential regulation of phospholipid metabolism by PSS1 and PSS2. *Biochem J.* **1999**; 342 (Pt 1):57-64.
- Stone, S. J., Cui, Z. und Vance, J. E.** Cloning and expression of mouse liver phosphatidylserine synthase-1 cDNA. Overexpression in rat hepatoma cells inhibits the CDP-ethanolamine pathway for phosphatidylethanolamine biosynthesis. *J Biol Chem.* **1998**; 273(13):7293-302.
- Stuhnke-Sekalec, L. und Stanacev, N. Z.** Modification of the biosynthesis and composition of polyglycerophosphatides in outer and inner mitochondrial by cytidine liponucleotides. *Membr Biochem* **1989**; 8:165-175.
- Stuhnke-Sekalec, L. und Stanacev, N. Z.** Mechanism and localization of cardiolipin biosynthesis revisited: evidence for the identical mechanism and different localization in mitochondrial and submitochondrial membranes isolated from guinea pig and rat liver. *Biochem Cell Biol.* **1990**; 68(6):922-35.
- Sturbois-Balcerzak, B., Stone, S. J., Sreenivas, A. und Vance, J. E.** Structure and expression of the murine phosphatidylserine synthase-1 gene. *J Biol Chem.* **2001**; 276(11):8205-12.

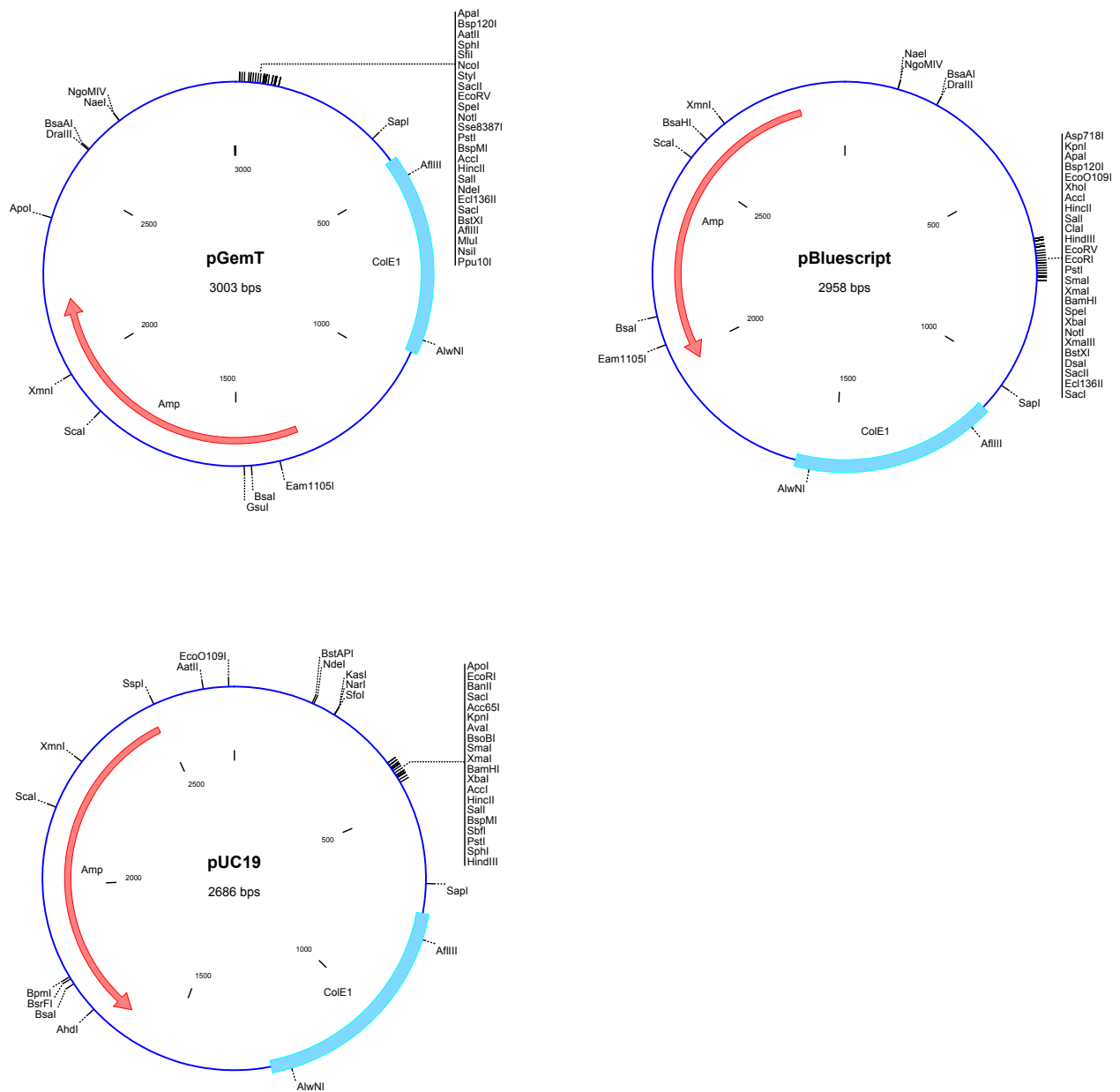
- Suzuki, E., Kondo, T., Makise, M., Mima, S., Sakamoto, K., Tsuchiya, T. und Mizushima, T.** Alteration in levels of unsaturated fatty acids in mutants of *Escherichia coli* defective in DNA replication. *Biol Pharm Bull.* **1998**; 21(7):657-61.
- Tanaka, S., Nikawa, J., Imai, H., Yamashita, S. und Hosaka, K.** Molecular cloning of rat phosphatidylinositol synthase cDNA by functional complementation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *pis* mutation. *FEBS Lett.* **1996**; 393(1):89-92.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **1997**; 24:4876-4882.
- Tremolieres, A., Dainese, P. und Bassi, R.** Heterogenous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts. *Eur J Biochem.* **1994**; 221(2):721-30.
- Tremolieres, A., Roche, O., Dubertret, G., Guyon, D. und Garnier, J.** Restoration of thylakoid Δ^3 -trans-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**; 1059:286-292.
- Tropp, B. E.** Cardiolipin synthase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* **1997**; 1348(1-2):192-200.
- Tuller, G., Hrastnik, C., Achleitner, G., Schiefthaler, U., Klein, F. und Daum, G.** YDL142c encodes cardiolipin synthase (Cls1p) and is non-essential for aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1998**; 421(1):15-8.
- Vance, J.E. und Vance, D.E.** Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion? *J Biol Chem.* **1988**;263(12):5898-909.
- Vincent, P., Maneta-Peyret, L., Cassagne, C. und Moreau, P.** Phosphatidylserine delivery to endoplasmic reticulum-derived vesicles of plant cells depends on two biosynthetic pathways. *FEBS Lett.* **2001**; 498(1):32-6.
- Vincent, P., Maneta-Peyret, L., Sturbois-Balcerzak, B., Duvert, M., Cassagne, C. und Moreau, P.** One of the origins of plasma membrane phosphatidylserine in plant cells is a local synthesis by a serine exchange activity. *FEBS Lett.* **1999**; 464(1-2):80-4.
- Warnecke, D., Erdmann, R., Fahl, A., Hube, B., Müller, F., Zank, T., Zähringer, U. und Heinz, E.** Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* **1999**; 274(19):13048-59.
- Williams, J.G. und McMaster C.R.** Scanning alanine mutagenesis of the CDP-alcohol phosphotransferase motif of *Saccharomyces cerevisiae* cholinephosphotransferase. *J Biol Chem.* **1998**; 273(22):13482-7.
- Williams, J. P., Watson, G. R. und Leung, S.P.K.** Galactolipid synthesis in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiol.* **1976**; 57: 179-184.

- Yamashita, S. und Nikawa, J.** Phosphatidylserine synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta*. **1997**; 1348(1-2):228-35.
- Yannish-Perron, C., Vierra, J., Messing, J.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **1985**; 33: 103.
- Xia, W. und Dowhan, W.** In vivo evidence for the involvement of anionic phospholipids in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995**; 92(3):783-7.
- Xue, H. W., Hosaka, K., Plesch, G. und Müller-Röber, B.** Cloning of *Arabidopsis thaliana* phosphatidylinositol synthase and functional expression in the yeast *pis* mutant. *Plant Mol Biol*. **2000**; 42(5):757-64.
- Yamaguchi, Y., Hase, M., Makise, M., Mima, S., Yoshimi, T., Ishikawa, Y., Tsuchiya, T. und Mizushima, T.** Involvement of Arg-328, Arg-334 and Arg-342 of DnaA protein in the functional interaction with acidic phospholipids. *Biochem J*. **1999**; 340 (Pt 2):433-8.
- Yung, B. Y., Crooke, E. und Kornberg, A.** Fate of the DnaA initiator protein in replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome in vitro. *J Biol Chem*. **1990**; 265(3):1282-5.
- Yung, B. Y. und Kornberg, A.** Membrane attachment activates dnaA protein, the initiation protein of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1988**; 85(19):7202-5.
- Zhao, M., Schlame, M., Rua, D. und Greenberg, M. L.** Cardiolipin synthase is associated with a large complex in yeast mitochondria. *J Biol Chem*. **1998**; 273(4):2402-8.
- Zheng, W., Li, Z., Skarstad, K. und Crooke, E.** Mutations in DnaA protein suppress the growth arrest of acidic phospholipid-deficient *Escherichia coli* cells. *EMBO J*. **2001**; 20(5):1164-72.

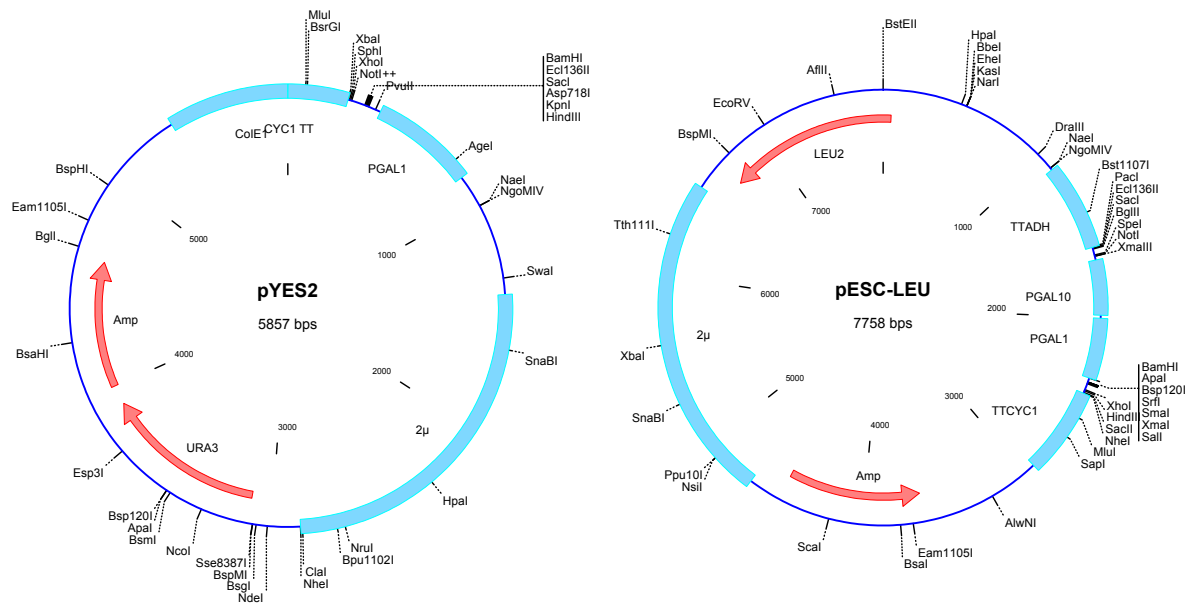
6. Anhang



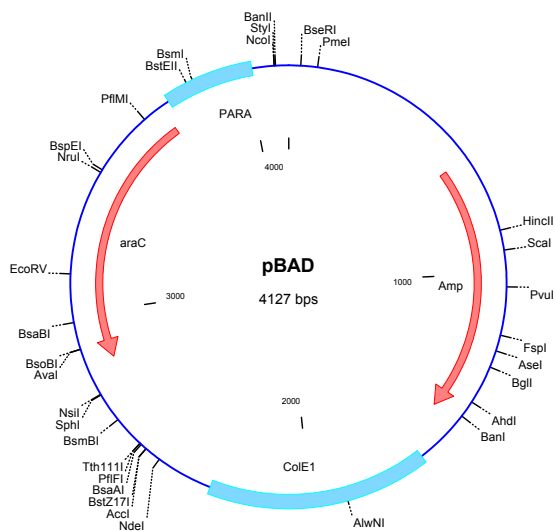
Die Umgebungen der Gene für mögliche PTs aus *A. thaliana* in maßstabsgetreuer Darstellung. Außerhalb der transkribierten Regionen der möglichen PTs sind keine Ähnlichkeiten zwischen diesen zu finden. Dargestellt sind die benachbarten Gene (n.b., Gen mit nicht bekannter Funktion; T6PS, Trehalose-6-Phosphat Synthase, putativ; HPR, Hydroxypyruvat Reduktase, putativ; CMT, S-Adenosylmethionin : trans-Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase, putativ; HSTF, ähnlich zu "heat shock" Transkriptionfaktor; PI-PLC, Phosphoinositid spezifische Phospholipase C, putativ; MO2, Monooxygenase 2; PL, Phospholipase, putativ; MBP, Metal Binde Protein, putativ; β-Gal, β-Galaktosidase; UFDP, Ubiquitin-Fusion Degradations Protein, putativ; AD, Adenin Deaminase, putativ; GKE, Gluthathion reguliertes K⁺ Efflux System Protein, putativ; MSR, Methioninsulfoxid Reduktase, putativ; AK, Adenylat Kinase, putativ; MyBP, Myrosinase Binde Protein, putativ; PFGL, Phosphoribosylformylglycinamidin Cyclo-Ligase, putativ; In2-1, homolog zu In2-1 aus *Zea mays*; PP2C, Protein Phosphatase 2C, putativ; CenP, Centromer Binde Protein, putativ)



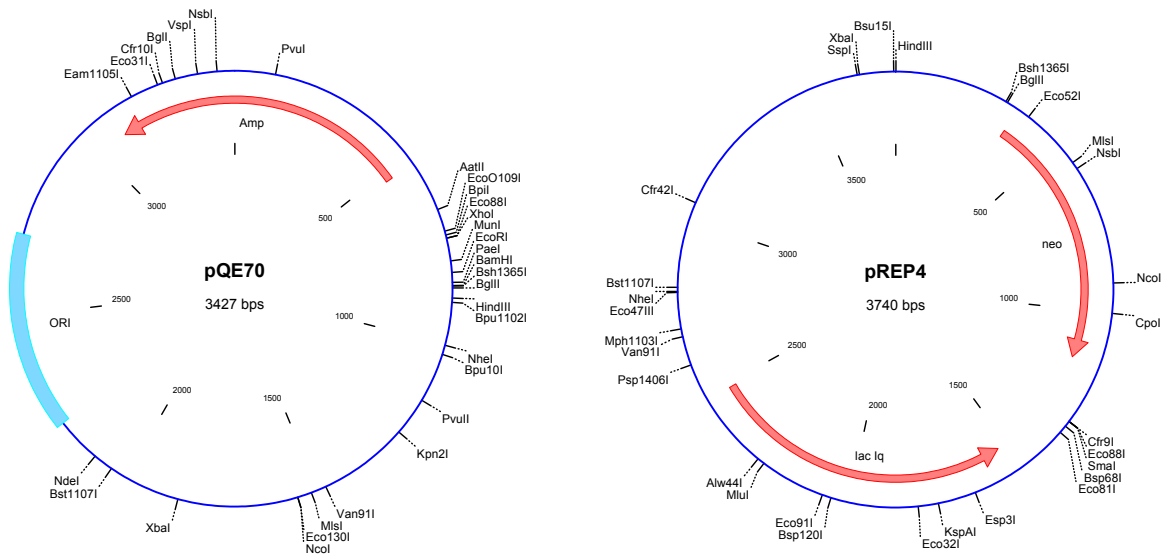
Plasmidkarten der Klonierungsvektoren pGemT, pBluescript SK(-) und pUC19 (ColE1, Replikationsursprung; Amp, Gen für β -Laktamase).



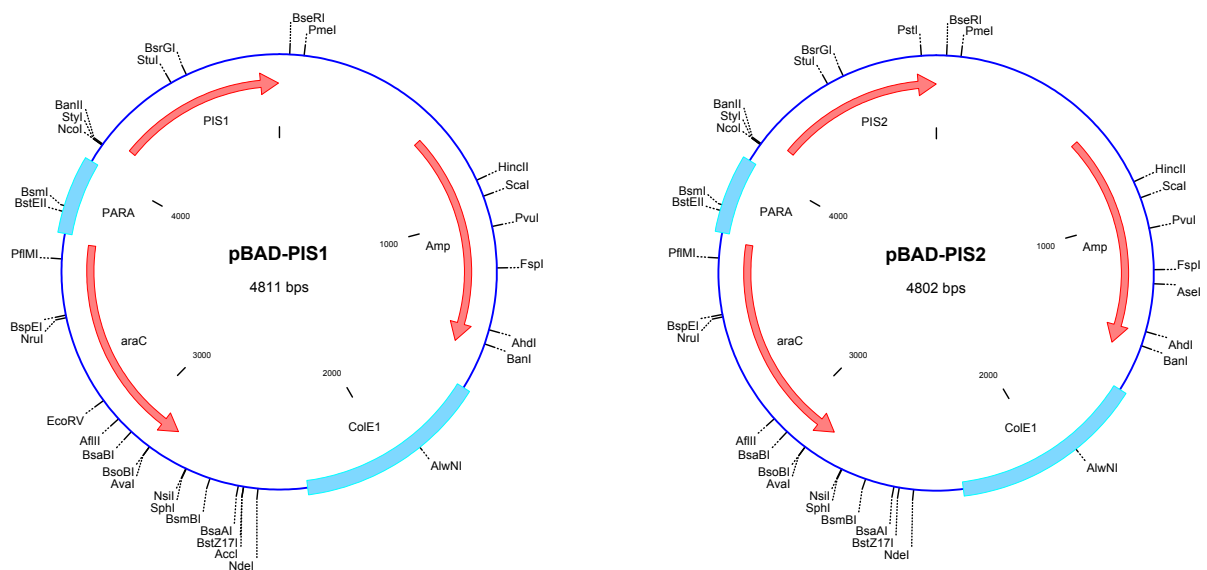
Plasmidkarten der *S. cerevisiae*-Expressionsvektoren pYES2 und pESC-Leu (PGAL1, PGAL10, Galaktose induzierbare Promotoren, TTCYC1, TTADH, Transkriptionsterminatorsequenzen; ColE1, Replikationsursprung in *E. coli*; URA3, LEU2, Selektionsmarker in *S. cerevisiae*; 2μ, Replikationsursprung in *S. cerevisiae*; Amp, β-Laktamase).



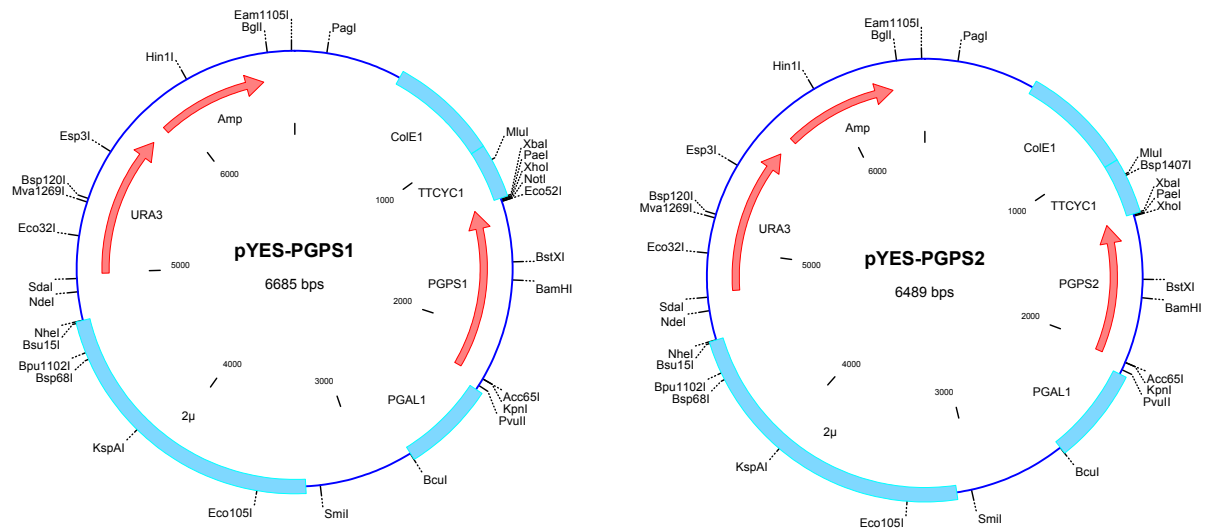
Der *E. coli*-Expressionsvektor pBAD (PARA, Arabinose-abhängiger Promotor; Amp, β-Laktamase; ColE1, Replikationsursprung; araC, an PARA bindender Transkriptionsfaktor).



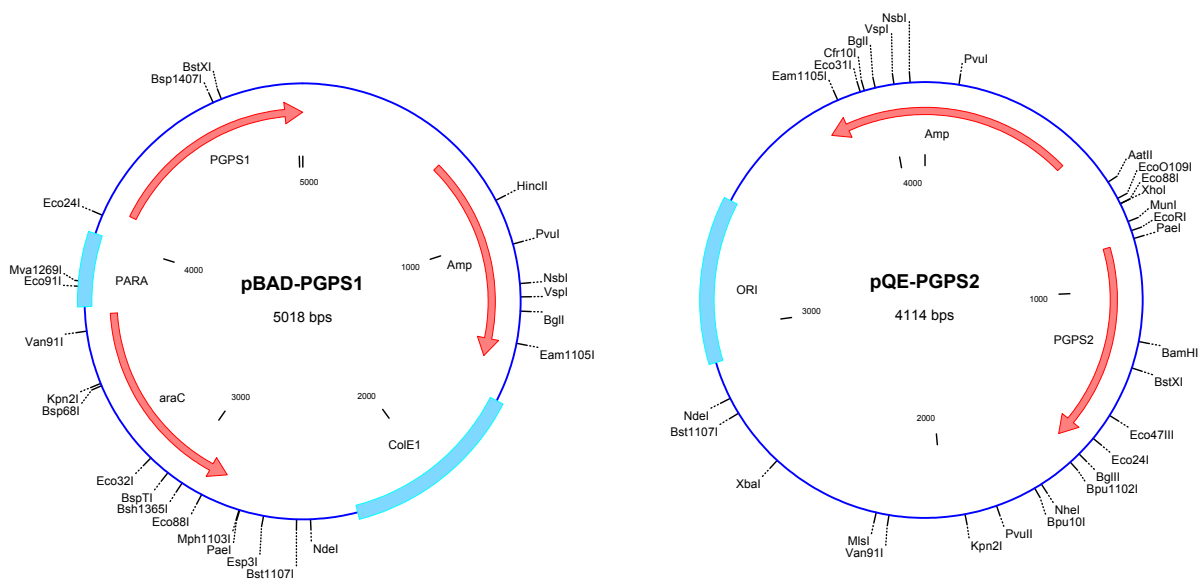
Der *E. coli*-Expressionsvektor pQE70 und Hilfsplasmid pREP4 (Amp, β -Laktamase; neo, Neomycinphosphotransferase; Ori, Replikationsursprung, LacIq, Transkriptionsfaktor der den IPTG-induzierbaren Promotor auf pQE70 reprimiert).



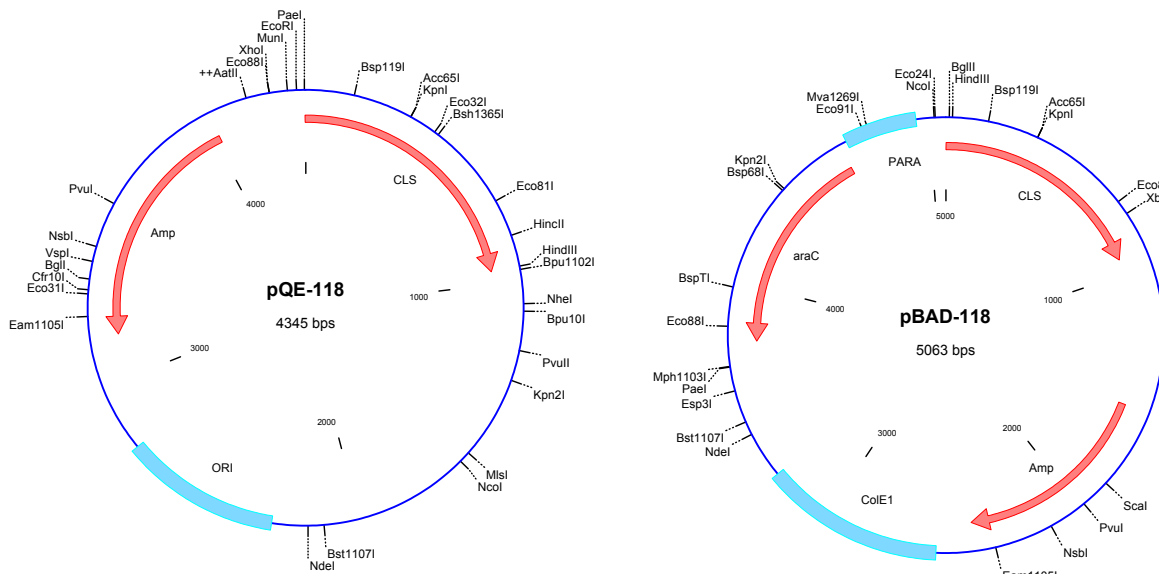
Plasmidkarten der *E. coli*-Expressionskonstrukte pBAD-PIS1 und pBAD-PIS2. Die ORFs der Gene stehen unter Kontrolle eines Promotors (PARA), der durch Zugabe von Arabinose zum Medium induziert werden kann. araC kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der den Promotor bei Zugabe von Arabinose einschaltet. ColE1 repräsentiert den Replikationsursprung aus dem Plasmid ColE1. Amp kodiert für eine β -Lactamase und verleiht Resistenz gegen Penicillinderivate.



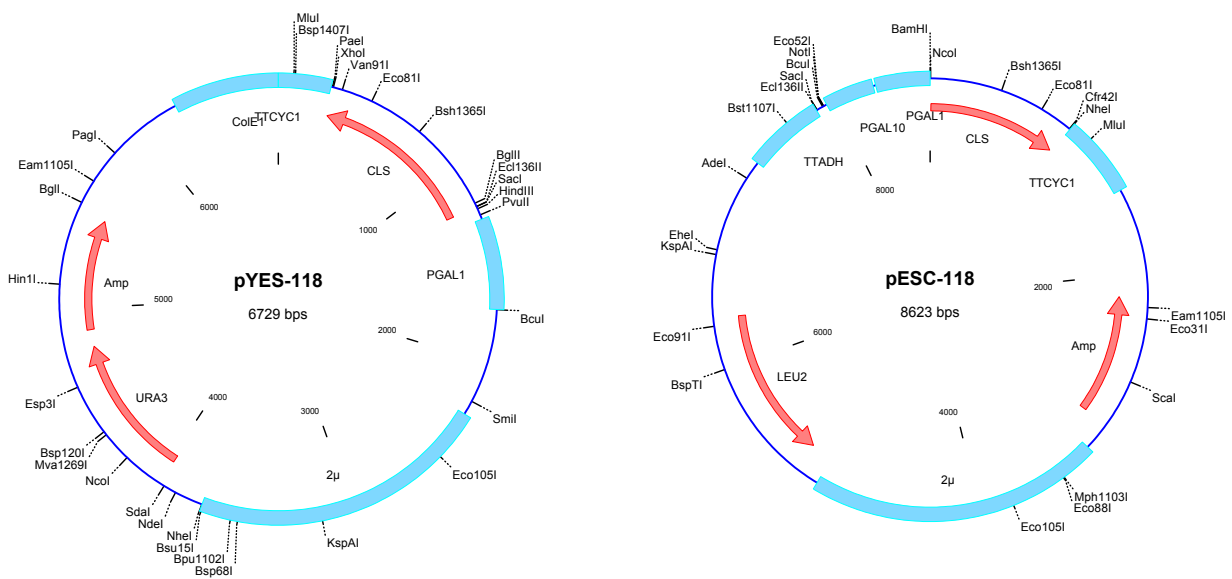
Plasmidkarten der *S. cerevisiae*-Expressionskonstrukte pYES-PGPS1 und pYES-PGPS2. Die ORF stehen in diesem Plasmid unter Kontrolle des durch Galaktose induzierbaren Promotors PGAL1. (URA3, Selektionsmarker in Hefen, komplementiert entsprechende Nullmutanten; Amp, β -Lactamase; ColE1, Replikationsursprung; TTCYC1, Transkriptionsterminator; 2 μ , Replikationsursprung des Hefeplasmides 2 μ)



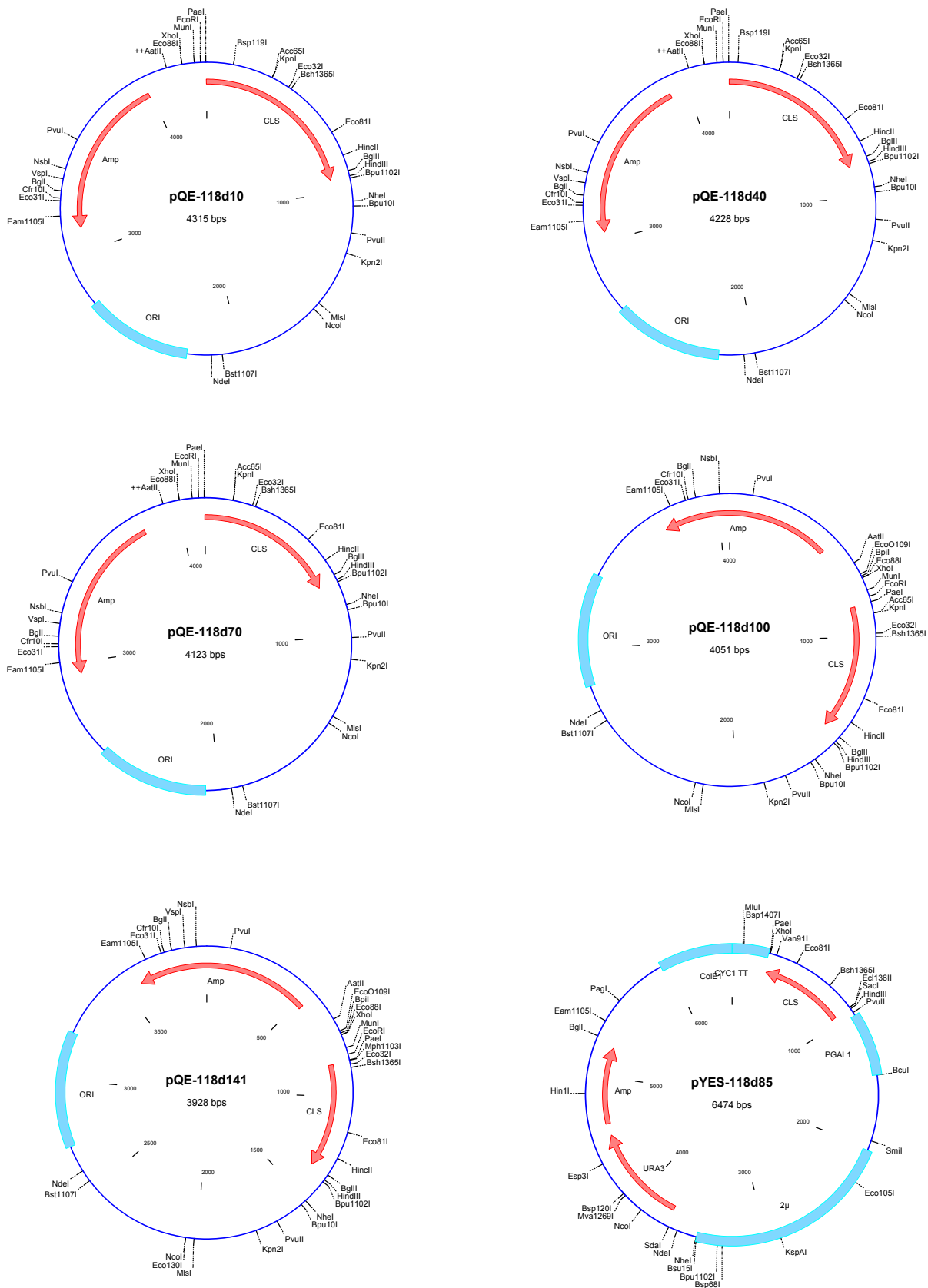
Plasmidkarten der *E. coli*-Expressionskonstrukte pBAD-PGPS1 und pQE-PGPS2. Der ORF von PGPS1 steht unter Kontrolle des Promotors PARA. Dieser Promotor wird unter anderem durch einen Transkriptionsfaktor, kodiert durch *araC*, reguliert. Durch Zugabe von Arabinose wird PARA induziert. PGPS2 steht unter Kontrolle des Promotors PLacZ (nicht eingezeichnet) dieser Promotor ist durch Zugabe des Laktose-Analogons Isopropyl- β ,D-thiogalaktosid induzierbar. Ein Transkriptionsfaktor, welcher diesen Promotor im nicht-induzierten Zustand reprimiert, wird durch den Hilfsvektor pREP4 kodiert. (ColE1, der Replikationsursprung aus dem gleichnamigen Plasmid; Amp, β -Laktamase-Gen).



Plasmidkarten der *E. coli*-Expressionskonstrukte pQE-118 und pBAD-118, die den ORF der möglichen CLS aus *A. thaliana* unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren enthalten



Plasmidkarten der *S. cerevisiae*-Expressionskonstrukte pYES-118 und pESC-118, die den ORF der möglichen CLS aus *A. thaliana* unter der Kontrolle des durch Galaktose induzierbaren Promotors PGAL1 enthalten.



Plasmidkarten der *E. coli*-Expressionskonstrukte die unterschiedliche Teile des ORF der möglichen CLS aus *A. thaliana* enthalten (Für die Deletionen wurden die Vektoren pQE70 und pYES2 genutzt; die Zahl hinter dem "d" der jeweiligen Plasmidbezeichnung gibt an, wie viele Aminosäurereste am N-Terminus des Korrespondierenden Proteins deletiert wurden).

Danksagung

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit vom März 1999 bis Oktober 2001 in der Abteilung Spezielle Botanik am Institut für Biologie 1 der RWTH Aachen unter Anleitung von Frau Prof. Dr. M. Frentzen durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt daher Frau Prof. Dr. M. Frentzen für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, die vielen, intensiven Diskussionen und reichhaltigen Anregungen sowie ihr ständiges Interesse.

Frau Prof. Dr. U. Priefer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und vor allem dem Spaß an der Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt Dr. Alexandra Münster für die Ideen und Anregungen sowie die Unterstützung, die mir zu Teil wurde.

Lebenslauf

12.03.2002

Frank Müller
Asteneter Str. 8
4730 Hauset-Raeren
Belgien

Familienstand: ledig

Geburt:	22.08.1970	Bad Oldesloe, Schleswig Holstein
Grundschule:	1977-1981	Grundschule Am Hagen, Ahrensburg, Schleswig-Holstein
Gymnasium:	1982-1988 1988-1990	Stormarn Schule, Ahrensburg Gymnasium Oldenfelde, Hamburg
Abitur:	1990	Gymnasium Oldenfelde, Hamburg
Wehrdienst:	Okt. 1991	Scharnhorst Kaserne, Lüneburg, Niedersachsen
Zivildienst:	1991-1992	Diakonische Behindertenwerkstatt Ahrensburg
Studium der Biologie:	1993-1999	Universität Hamburg
Diplomarbeit:	1998-1999	Institut für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten, Universität Hamburg
Wissenschaftliche Arbeit:	seit März 1999	RWTH Aachen, Institut für Biologie I, spezielle Botanik, Nordrhein-Westfalen