

**Identifizierung und funktionale Charakterisierung
neuartiger Acyltransferasen
aus Mikroalgen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Martin Wagner
aus
Eschwege

Göttingen 2008

D 7

Referent: Prof. Dr. I. Feußner

Korreferent: Dr. I. Heilmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 01. 2009

FÜR SANDRA

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Fettsäuren und Lipide	2
1.1.1 Glycerolipide und Glyceroglykolipide	3
1.1.2 Glycerophospholipide	5
1.1.3 Nomenklatur der Fettsäuren	5
1.2 Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden	7
1.2.1 Biosynthese von Fettsäuren	7
1.2.2 Biosynthese von Glyceroglykolipiden und Glycerophospholipiden	8
1.2.3 Biosynthese von Triacylglycerinen	11
1.3 Die Familie der Acyltransferasen	14
1.3.1 Acyl-CoA:Lyso-PtdCho-Acyltransferasen	14
1.3.2 Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen	16
1.3.3 Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferasen	18
1.4 Sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren	19
1.4.1 Vorkommen und Biosynthese von VLCPUFA	20
1.4.2 Bedeutung von Fettsäuren für die humane Ernährung	23
1.4.3 Physiologische Aspekte der VLCPUFA im Menschen	24
1.4.4 Biosynthese von VLCPUFA in höheren Pflanzen	25
1.5 Zielsetzung der Arbeit	29
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien	30
2.2 Geräte und Materialien	31
2.3 Software	31
2.4 Phylogenetische Analysen	32
2.5 Vektoren	32
2.6 Antikörper	33
2.7 Organismen	33
2.7.1 Bakterien	33
2.7.2 Hefen	34
2.7.3 Pflanzen	34
2.7.4 Algen	34
2.8 Kultivierung der Organismen	35
2.8.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	35
2.8.2 Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.8.3 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.8.4 Kultivierung von <i>Mantoniella squamata</i> , <i>Ostreococcus tauri</i> und <i>Ostreococcus lucimarinus</i>	38
2.8.5 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.9 Transformation von <i>E. coli</i>	40
2.9.1 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen zur Elektroporation	40
2.9.2 Transformation	41

2.10	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	41
2.10.1	Präparation chemisch-kompetenter <i>A. tumefaciens</i>	41
2.10.2	Transformation	42
2.11	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	42
2.11.1	Präparation chemisch-kompetenter <i>S. cerevisiae</i>	42
2.11.2	Transformation	42
2.12	Transformation von <i>A. thaliana</i>	43
2.13	Herstellen von <i>S. cerevisiae</i>-Deletionsmutanten	44
2.14	Präparation von DNA	45
2.14.1	Präparation von genomischer DNA aus Algen und Pflanzen	45
2.14.2	Präparation von genomischer DNA aus Hefen	45
2.14.3	Präparation von RNA aus <i>O. tauri</i>	45
2.14.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	46
2.15	Polymerase-Kettenreaktion	46
2.15.1	Kolonie-PCR	47
2.15.2	DNA-Sequenzanalyse	48
2.15.3	cDNA-Synthese und Reverse Transkriptions-PCR	49
2.16	Klonierungsmethoden	49
2.16.1	Restriktion von DNA	49
2.16.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	50
2.16.3	Elution von DNA aus Agarosegelen	51
2.16.4	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	51
2.16.5	Generierung von <i>blunt-end</i> -Fragmenten	51
2.16.6	Ligation	51
2.17	Erzeugung der verwendeten cDNA-Klone	52
2.17.1	Isolierung der LPAAT aus <i>M. squamata</i> und <i>P. patens</i>	52
2.17.2	Isolierung der OILPCAT aus <i>O. lucimarinus</i>	53
2.17.3	Isolierung der OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C aus <i>O. tauri</i>	54
2.17.4	Isolierung der OtPDAT aus <i>O. tauri</i>	54
2.18	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	55
2.18.1	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von LPAAT aus Algen und Moosen in <i>S. cerevisiae</i>	55
2.18.2	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von OILPCAT in <i>S. cerevisiae</i>	56
2.18.3	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von PtΔ6 und PSE1 in <i>S. cerevisiae</i>	58
2.18.4	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von DGAT2 aus <i>O. tauri</i> in <i>S. cerevisiae</i>	58
2.18.5	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von OtPDAT in <i>S. cerevisiae</i>	61
2.19	Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in <i>A. thaliana</i>	63
2.20	Heterologe Expression von cDNA in <i>S. cerevisiae</i>	64
2.21	¹⁴C-Fettsäure-Markierungs-Experiment	65
2.22	Western-Blot und Immundetektion von Proteinen	66
2.22.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	66
2.22.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	68
2.22.3	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	68
2.22.4	Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membranen	69
2.22.5	Immundetektion der Proteine	70
2.23	Enzymaktivitätsbestimmungen	71
2.23.1	Präparation von Zellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für Enzymaktivitätsbestimmungen	71

2.23.2	DGAT-Aktivitätsnachweis.....	71
2.23.3	PDAT-Aktivitätsnachweis	72
2.24	Fluoreszenz-Markierung von Lipidkörpern.....	73
2.25	Präparation von Lipidextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	74
2.26	Präparation von Lipidextrakten aus Samen von <i>A. thaliana</i>.....	74
2.26.1	Präparation von Neutrallipiden, Glykolipiden und Phospholipiden aus Lipidextrakten	75
2.27	Dünnschichtchromatographie.....	75
2.27.1	Dünnschichtchromatographie nicht-radioaktiv markierter Lipidextrakte.....	75
2.27.2	Dünnschichtchromatographie radioaktiv markierter Lipidextrakte.....	76
2.28	Derivatisierung von freien und veresterten Fettsäuren.....	76
2.29	Gaschromatographie.....	77
2.30	<i>High performance liquid chromatography</i>	78
2.30.1	Bestimmung von Acyl-CoA-Estern mittels HPLC	78
2.30.2	Extraktion von Acyl-CoAs.....	78
2.30.3	Derivatisierung von Acyl-CoAs	79
2.30.4	HPLC-Analyse von Acyl- <i>etheno</i> -CoA-Estern.....	80
2.31	LC-MS/MS	81
3.	ERGEBNISSE	82
3.1	Auswahl der Spenderorganismen für die Isolierung von Acyltransferasen.....	82
3.2	Identifizierung und funktionale Charakterisierung von LPCAT.....	83
3.2.1	Identifizierung von LPCAT aus VLCPUFA-produzierenden Organismen	84
3.2.2	Sequenzanalyse der LPAAT-Homologen aus Mikroalgen und Moos.....	86
3.2.3	Versuche zur funktionalen Charakterisierung der LPAAT-Homologen aus <i>M. squamata</i> und <i>P. patens</i>	89
3.2.4	Sequenzanalyse der LPCAT aus <i>O. lucimarinus</i>	96
3.2.5	Versuche zur funktionalen Charakterisierung der LPCAT aus <i>O. lucimarinus</i>	99
3.3	Identifizierung und funktionale Charakterisierung von möglichen DGAT2 aus <i>O. tauri</i> .	112
3.3.1	Identifizierung von DGAT2 aus Mikroalgen.....	112
3.3.2	Sequenzanalyse der DGAT2 aus <i>O. tauri</i>	115
3.3.3	Versuche zur funktionalen Charakterisierung der DGAT2 aus <i>O. tauri</i>	120
3.4	Identifizierung und funktionale Charakterisierung einer PDAT aus <i>O. tauri</i>	135
3.4.1	Identifizierung von PDAT aus Mikroalgen	136
3.4.2	Sequenzanalyse der PDAT aus Mikroalgen	137
3.4.3	Versuche zur funktionalen Charakterisierung der PDAT aus <i>O. tauri</i>	142
3.5	Etablierung eines ARA- und EPA-Biosyntheseweges in <i>A. thaliana</i>	157
3.5.1	Lipidabhängige VLCPUFA-Synthese in <i>A. thaliana</i>	157
3.5.2	Supertransformation transgener <i>A. thaliana</i> mit Acyltransferasegenen	162
3.6	Etablierung von DHA-Biosynthesewegen in <i>A. thaliana</i>.....	166
4.	DISKUSSION	170
4.1	Identifizierung und Charakterisierung von LPCAT	172
4.1.1	Funktionale Charakterisierung von LPAAT-Homologen aus Moosen und Algen.....	173
4.1.2	OILPCAT optimiert das Zusammenspiel lipid- und CoA-abhängiger Enzyme.....	174
4.2	Identifizierung und Charakterisierung von DGAT2	177
4.2.1	OtDGAT2B besitzt ein breites Substratspektrum.....	178

4.3	Identifizierung und Charakterisierung von PDAT	181
4.3.1	OtPDAT ist eine PUFA-spezifische PDAT aus <i>O. tauri</i>	182
4.4	Etablierung von VLCPUFA-Biosynthesewegen in <i>A. thaliana</i>.....	184
5.	ZUSAMMENFASSUNG	188
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	189
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	202
8.	TABELLENVERZEICHNIS.....	204
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	205
10.	ANHANG.....	207

1. Einleitung

Zu den Grundbestandteilen der menschlichen Ernährung zählen neben Kohlenhydraten und Eiweißen auch Fette und Öle, die der Mensch aus pflanzlichen oder tierischen Quellen gewinnt. Die in den Fetten und Ölen enthaltenen Fettsäuren werden im Körper nicht nur zur Gewinnung von Energie verwendet, sondern sie stellen auch die Ausgangsstoffe für die Synthese einer Vielzahl lebensnotwendiger Biomoleküle dar. Von besonderer Bedeutung für den Organismus sind die essenziellen, mehrfach ungesättigten ω 6- und ω 3-Fettsäuren Linolsäure, α - und γ -Linolensäure, die vom menschlichen Organismus nicht selbst hergestellt werden können. Im Körper werden aus diesen Fettsäuren sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure hergestellt, die u.a. wichtige strukturbildende Bestandteile der Membranen von Nervenzellen sind. Aus den essenziellen ω 6- und ω 3-Fettsäuren entstehen darüber hinaus Hormone bzw. Signalsubstanzen, wobei die aus ω 6-Fettsäuren entstandenen Substanzen an der Steuerung entzündlicher Prozesse beteiligt sind und diese Prozesse in ihrer Wirkung fördern. Als Gegenspieler fungieren die Substanzen, die aus den ω 3-Fettsäuren gebildet werden; sie wirken entzündungshemmend. Eine bevorzugte Aufnahme von ω 3-Fettsäuren durch die Ernährung gilt als empfehlenswert, da die positiven Eigenschaften der aus ω 3-Fettsäuren entstandenen Substanzen präventiv auf das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen und lindernd auf die Beschwerden chronisch-entzündlicher Erkrankungen wirken. Die körpereigene Produktion der hochungesättigten, sehr langkettigen ω 3-Fettsäuren ausgehend von α -Linolensäure erreicht nicht die empfohlene Tagesdosis, so dass eine zusätzliche Aufnahme über die Nahrung angeraten wird.

Zurzeit stellt fettreicher Seefisch und das daraus gewonnene Öl die Hauptquelle sehr langkettiger ω 3-Fettsäuren dar. Die Fische sind jedoch nicht Primärproduzenten, sondern vielmehr sind es marine Mikroalgen, die über die enzymatische Ausstattung zur Biosynthese langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren verfügen und diese auch in großen Mengen produzieren. Als Bestandteil des Phyto- und Zooplanktons werden marine Mikroalgen von Seefisch aufgenommen, der die sehr langkettigen Fettsäuren aus den Mikroalgen in seinem Fettgewebe speichert. Der weltweit steigende Bedarf an diesen Fettsäuren bei zugleich rückläufigen Fischbeständen erzwingt die Suche nach alternativen Bezugsquellen für ω 3-Fettsäuren.

Diese Fettsäuren aus dem Samenöl genetisch modifizierter Ölsaaten wie Raps und Lein zu gewinnen, könnte eine solche alternative Quelle darstellen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation von Enzymen, den sogenannten Acyltransferasen, die in Mikroalgen an der Biosynthese von Lipiden mit langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren beteiligt sind. Der Einsatz der entsprechenden Gene in transgenen Ölsaaten könnte möglicherweise eine effizientere Synthese dieser Fettsäuren in Pflanzen bewirken.

1.1 Fettsäuren und Lipide

Lipide bilden zusammen mit Kohlenhydraten, Proteinen und Nukleinsäuren die essenziellen Bestandteile zellulärer Strukturen. Im Allgemeinen lassen sich Lipide als strukturell heterogene Gruppe von organischen, hydrophoben Verbindungen zusammenfassen, die eine Vielzahl biologischer Funktionen erfüllen. Die biophysikalischen Eigenschaften der Lipide werden meist durch Fettsäuren, also in der Kettenlänge variierende, aliphatische Monocarbonsäuren, geprägt. Natürlich vorkommende Fettsäuren variieren in ihrem Aufbau. So werden Fettsäuren mit einer Kettenlänge von sechs bis zu zehn Kohlenstoffatomen als *kurzkettige Fettsäuren* beschrieben. *Mittelkettige Fettsäuren* weisen bis zu vierzehn Kohlenstoffatome, *langkettige Fettsäuren* bis zu 18 Kohlenstoffatome und *sehr langkettige Fettsäuren* weisen über 18 Kohlenstoffatome auf. Neben der Kettenlänge haben vor allem Doppelbindungen oder Methylverzweigungen innerhalb der Kohlenwasserstoffkette einen entscheidenden Einfluss auf die physiologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Fettsäuren. Fahy et al. (2005) entwickelten ein acht-gliedriges System, bei dem die Einteilung der Lipide nach dem jeweiligen chemischen Grundgerüst und der daran gebundenen hydrophoben oder hydrophilen Elemente erfolgt (Tab. 1).

Die in Zellen am häufigsten vorkommenden Lipide gehören den Gruppen der Glycerolipide und Glycerophospholipiden an (Ohlrogge und Browse, 1995). Daher werden die wichtigsten Vertreter dieser beiden Gruppen im Folgenden näher erläutert.

Tab. 1 Übersicht der verschiedenen Lipide mit Vertretern der einzelnen Klassen, sowie deren physiologischen Funktionen (Fahy et al., 2005).

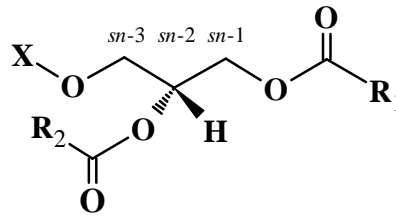
Gruppe	Vertreter	Physiologische Funktion
Fettsäuren und Derivate	Jasmonsäure	Phytohormon
Glycerolipide	Triacylglycerin	Kohlenstoff-Speicher
Glycerophospholipide	Phosphatidylcholin	Struktureller Bestandteil von Membranen
Sphingolipide	Phytosphingosin	Struktureller Bestandteil von Membranen
Sterole	Campesterin	Struktureller Bestandteil von Membranen
Prenolipide	Ubichinon	Elektronentransport der Photosynthese oder Atmungskette
Saccharolipide	Lipid A	Struktureller Bestandteil bakterieller Membranen
Polyketide	Aflatoxine	Sekundäre Metabolite von Schimmelpilzarten

1.1.1 Glycerolipide und Glyceroglykolipide

Glycerolipide sind Fettsäureester des dreiwertigen Alkohols Glycerin. Das mittlere Kohlenstoffatom des Glycerin-Grundgerüsts bildet ein Stereozentrum, das bei den natürlich vorkommenden Lipiden stets L-konfiguriert vorliegt. Zur Unterscheidung der einzelnen Kohlenstoffatome des Grundgerüsts wird eine *stereospezifische Nummerierung* (kurz: *sn*) der verschiedenen Positionen angewendet. Das Kohlenstoffatom, das in der Fischer-Projektion oberhalb der nach links zeigenden, sekundären Hydroxylgruppe liegt, erhält die Bezeichnung *sn-1*. Das mittlere Kohlenstoffatom mit der sekundären Hydroxylgruppe wird als *sn-2* bezeichnet und das darunterliegende Kohlenstoffatom erhält die Bezeichnung *sn-3* (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978). Je nach Substitutionsgrad wird bei den Glycerolipiden zwischen Mono-, Di- und Triacylglycerinen unterschieden. Von besonderer Bedeutung sind für diese Arbeit die Triacylglycerine, die vielen Organismen als Kohlenstoff- oder Energiespeicher dienen (Abb. 1 A und B).

Zu der Gruppe der Glycerolipide zählen ebenfalls die Glyceroglykolipide, die sich strukturell durch das Vorhandensein von Mono-, Di- oder Oligosacchariden an der *sn-3*-Position von den bereits erwähnten Glycerolipiden unterscheiden (Abb. 1 C). Im Gegensatz zu den Membranen der Tiere, Hefen und vieler Bakterien besitzen pflanzliche Membranen hohe Gehalte an den Glyceroglykolipiden Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG), Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG) und Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG). Diese Glykolipide sind besonders häufig in den photosynthetisch aktiven Membranen der Plastiden zu finden (Joyard et al., 1998; Yu et al., 2002).

A Glycerolipide



B

Glycerolipide	Anzahl und Position des Substituenten
1-Monoacylglycerin	Enthält einen Fettsäureester an Position <i>sn-1</i>
1,2-Diacylglycerin	Enthält zwei Fettsäureester an Position <i>sn-1</i> und <i>sn-2</i>
1,2,3-Triacylglycerin	Enthält drei Fettsäureester an Position <i>sn-1</i> , <i>sn-2</i> und <i>sn-3</i>

C

Glyceroglykolipide	Kopfgruppe	Strukturformel
Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG)	Galaktose	
Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG)	Di-Galaktose	
Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG)	Sulfoquinovose	

Abb. 1 Strukturen der häufigsten pflanzlichen Glycerolipide.

(A) Das Grundgerüst der Glycerolipide besteht aus einem Glycerin-Molekül, dessen Hydroxylgruppen je einen (B) Fettsäureester tragen können. (C) Die Kopfgruppen der Glyceroglykolipide MGDG, DGDG und SQDG sind mit der *sn-3*-Position des Glycerin-Grundgerüsts verestert. Diese Lipide stellen den Hauptbestandteil der plastidären Membranen in höheren Pflanzen dar. R, Fettsäurerest; X, Fettsäure als Ester mit der *sn-3*-Position verknüpft oder eine Kopfgruppe der Glyceroglykolipide.

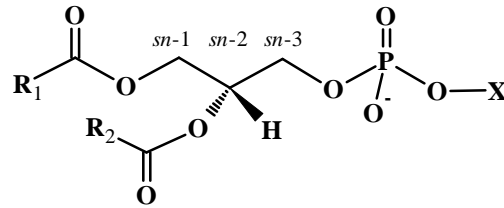
1.1.2 Glycerophospholipide

Die Glycerophospholipide zählen, mit Ausnahme der Phosphatidsäure, zu den wichtigsten Strukturlipiden eukaryoter Membranen (Abb. 2). Sie besitzen an der *sn*-3-Position des Glycerin-Grundgerüsts eine polare, hydrophile Kopfgruppe, die im Fall der Phosphatidsäure (PtdOH) aus einem Phosphorsäuremonoester besteht. Die weiteren Glycerophospholipide stellen Derivate der PtdOH dar, bei denen die Phosphatgruppe mit einem weiteren Alkohol verestert ist. Zu diesen Alkoholen zählen die Aminoalkohole Cholin (Phosphatidylcholin; PtdCho), Ethanolamin (Phosphatidylethanolamin; PtdEtn), Serin (Phosphatidylserin; PtdSer), das zyklische Inositol (Phosphatidylinositol; PtdIns) oder der dreiwertige Alkohol Glycerin (Ohlrogge und Browse, 1995). Das Diphosphatidylglycerin Cardiolipin (CL) gehört zu einer Gruppe innerhalb der Glycerophospholipide, bei denen das Glycerin-Grundgerüst an der *sn*-1- und der *sn*-3-Position mit einem Phosphatidrest verestert ist (Abb. 2). Cardiolipin ist Bestandteil cytoplasmatischer Membranen von Eubakterien und ein charakteristisches Lipid der inneren Mitochondrienmembran von Eukaryoten (Hoch, 1992; Fahy et al., 2005; Schlame, 2008b).

1.1.3 Nomenklatur der Fettsäuren

Natürliche Fettsäuren bestehen in der Regel aus einer geraden Zahl von Kohlenstoffatomen und werden im Allgemeinen in *gesättigte* und *ungesättigte* Fettsäuren eingeteilt. Eine gesättigte Fettsäure weist keine Doppelbindungen zwischen Kohlenstoffatomen der Kohlenwasserstoffkette auf. Dagegen besitzen ungesättigte Fettsäuren innerhalb der Kohlenwasserstoffkette mindestens eine Doppelbindung, die bei biologisch relevanten Fettsäuren meist in *cis*-Konfiguration vorliegt. Liegen mehrere Doppelbindungen vor, sind diese in der Regel durch eine Methylengruppe voneinander getrennt. Die Bezeichnung der Fettsäuren erfolgt meist in Zahlenform. So steht z. B. die Kurzform 18:2 n -6 für Linolsäure. Dabei wird in der Kurzform zuerst die Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül genannt; nach dem Doppelpunkt folgt die Anzahl der Doppelbindungen und zuletzt wird durch die ω - oder *n*-Nomenklatur festgelegt, an welcher Position, ausgehend vom Methylende der Kohlenwasserstoffkette, sich die erste Doppelbindung befindet. Erfolgt die Bestimmung vom Carboxylende aus, so wird dies durch ein „ Δ “ symbolisiert.

A Glycerophospholipide



B

Glycerophospholipid	Kopfgruppe	Strukturformel
Phosphatidsäure (PtdOH)	–	–H
Phosphatidylcholin (PtdCho)	Cholin	–CH ₂ –CH ₂ –N ⁺ (CH ₃) ₃
Phosphatidylethanolamin (PtdEtn)	Ethanolamin	–CH ₂ –CH ₂ –NH ₃ ⁺
Phosphatidylserin (PtdSer)	Serin	–CH ₂ –CH–NH ₃ ⁺ C=O O ⁻
Phosphatidylglycerin (PtdGro)	Glycerin	–CH ₂ –CH–CH ₂ –OH OH
Phosphatidylinositol (PtdIns)	Inosit	
Cardiolipin (CL)		

Abb. 2 Strukturen der häufigsten pflanzlichen Glycerophospholipide.

(A) Das Grundgerüst der Glycerophospholipide besteht aus einem Glycerin-Molekül mit je einem Fettsäurerest an den Positionen *sn*-1 und *sn*-2 und (B) aus einer polaren Kopfgruppe an der *sn*-3-Position und. R, Fettsäurerest; X, Kopfgruppe.

1.2 Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden

Das detaillierte Wissen über die Biosynthesewege von Fettsäuren und Lipiden in Pflanzen bildet die Grundlage für biotechnologische Ansätze zur gezielten Modifikation dieser Wege. In dem nun folgenden Abschnitt wird die Biosynthese der Fettsäuren und Glyceroglykolipide in den Plastiden sowie die Biosynthese der Glycerophospholipide und der Speicherlipide am Endoplasmatischen Retikulum (ER) höherer Pflanzen dargestellt.

1.2.1 Biosynthese von Fettsäuren

Die *de novo* Biosynthese der Fettsäuren erfolgt zyklisch in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten, die durch die Fettsäure-Synthase (FAS) katalysiert werden. Bisher sind zwei hinsichtlich ihres Aufbaus unterschiedliche Typen von FAS bekannt. Im tierischen System und bei Pilzen liegen die einzelnen enzymatischen Aktivitäten auf ein bis zwei Polypeptidketten vereint vor (Typ I). Im Gegensatz dazu sind beim Typ II der Bakterien und Pflanzen die verschiedenen enzymatischen Aktivitäten durch voneinander unabhängige Gene codiert. Die einzelnen Enzyme dieses Typs scheinen sich zu einem funktionellen Komplex anzuordnen (Harwood, 1988; Ohlrogge et al., 1991).

Im Folgenden wird die Biosynthese von Fettsäuren in Pflanzen näher erläutert. In Pflanzen erfolgt die *de novo* Biosynthese der Fettsäuren im Stroma der Plastiden. Jeder der sieben bis acht Zyklen der plastidären Fettsäure-Synthese beginnt mit der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA und dem anschließenden Transfer des Malonyl-CoA auf das Acyl-Carrier-Protein (ACP) des FAS-Komplexes. Es schließt sich eine Kondensation der beiden Substrate an, gefolgt von einer Reduktion, einer Dehydratisierung und einer weiteren, abschließenden Reduktion des Intermediats zu Acyl-ACP. Dieser um zwei Kohlenstoffatome verlängerte Acyl-ACP-Rest durchläuft erneut dieselbe Reaktionsfolge, die mit der Kondensation eines Malonyl-ACP beginnt (Browse und Somerville, 1991). Die Zyklen enden mit den gesättigten Fettsäuren Palmitoyl-ACP (16:0-ACP) oder Stearoyl-ACP (18:0-ACP). Lediglich das gebildete Stearoyl-ACP wird äußerst effizient durch die lösliche, plastidäre Stearoyl-ACP-Desaturase zu Oleoyl-ACP (18:1 n -9) umgesetzt. Palmitoyl-ACP wird nicht durch die Stearoyl-ACP-Desaturase umgesetzt. Damit sind die Hauptprodukte der Fettsäure-Biosynthese 16:0-ACP und 18:1-ACP, die für die Synthese von Lipiden innerhalb oder außerhalb der Plastiden am ER verwendet werden (Browse und Somerville, 1991; Shanklin und Somerville, 1991; Thompson et al., 1991).

1.2.2 Biosynthese von Glyceroglykolipiden und Glycerophospholipiden

In den meisten höheren Pflanzen wird bei der Glycerolipid- und Glycerophospholipidsynthese innerhalb der Plastiden selektiv 18:1 n -9 durch die lösliche Acyl-ACP:*sn*-Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) auf die *sn*-1-Position von Glycerin-3-Phosphat übertragen. Auf das gebildete Lyso-PtdOH wird nun durch die membranständige Acyl-ACP:*sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (LPAAT) ausschließlich 16:0 auf die *sn*-2-Position übertragen, wobei PtdOH entsteht. Da diese Substratspezifitäten der Acyl-ACP-Acyltransferasen und die daraus resultierende Verteilung der Fettsäuren in den Lipiden auch bei Cyanobakterien anzutreffen sind, wird die plastidäre Lipidsynthese auch als *prokaryote Glycerolipidsynthese* bezeichnet (Ohlrogge und Browse, 1995). Das gebildete PtdOH kann nun für die Synthese von PtdGro genutzt werden oder durch die PtdOH-Phosphatase zu DAG umgesetzt werden. DAG dient als Substrat für die am stärksten in den plastidären Membranen vertretenen Lipide MGDG, DGDG und SQDG (Joyard et al., 1994). In den Plastiden existieren neben der löslichen Stearoyl-ACP-Desaturase fünf membranständige Acyl-Lipid-Desaturasen. Die Acyl-Lipid-Desaturase FAD4 verwendet ausschließlich PtdGro und FAD5 verwendet ausschließlich MGDG als Substrat (Somerville und Browse, 1996). Beide Desaturasen haben die gemeinsame Eigenschaft, dass sie jeweils selektiv das an der *sn*-2-Position gebundene 16:0 desaturieren (Browse et al., 1985; Kunst et al., 1989). Die plastidären Acyl-Lipid-Desaturasen FAD6, FAD7 und FAD8 sind weitaus weniger selektiv bezüglich der Kopfgruppe des Lipids und verwenden die in Plastiden synthetisierten Glycerolipide PtdGro, MGDG, DGDG und SQDG als Substrate. 16:1 n -9 bzw. 18:1 n -9 werden durch die Desaturase FAD6 an der ω 6-Position zu 16:2 n -6 bzw. 18:2 n -6 desaturiert. Eine weitere Desaturierung zu 16:3 n -3 und 18:3 n -3 erfolgt durch die Desaturasen FAD7 und FAD8 (Browse et al., 1986; Falcone et al., 1994; Gibson et al., 1994; McConn et al., 1994). Für die Glycerolipidsynthese am ER verwendete Fettsäuren werden in den Plastiden durch Thioesterasen vom ACP abgespalten. Die freien Fettsäuren passieren auf einem bisher unbekannte Weg die innere und äußere Membran der Plastiden und werden noch an der äußeren Hüllmembran durch Acyl-CoA-Synthetasen auf CoA übertragen und in dieser Form der Lipidsynthese am ER zugeführt (Browse und Somerville, 1991). Im Unterschied zu den plastidären Acyl-ACP-Acyltransferasen verwenden die am ER lokalisierten Acyltransferasen Acyl-CoA-Thioester als Substrate. Dabei transferiert die Acyl-CoA:*sn*-Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) bevorzugt 18:1 n -9, aber auch 16:0 auf die *sn*-1-Position von Glycerin-3-Phosphat.

Die Acyl-CoA:*sn*-1-Acylglycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (LPAAT) transferiert nahezu ausschließlich 18:1*n*-9 auf die *sn*-2-Position von Lyso-PtdOH. Die unterschiedliche Spezifität zwischen ER-lokalisierter und plastidärer LPAAT führt zu jeweils charakteristischen Acylierungen der *sn*-2-Positionen und ergibt die eukaryote Fettsäureverteilung der am ER synthetisierten Lipide.

Für die Synthese der Glycerophospholipide existieren verschiedene Reaktionswege (Athenstaedt und Daum, 1999). Ein Weg besteht in der Dephosphorylierung von PtdOH zu DAG. Katalysiert durch die CDP-Cholin:DAG-Phosphocholintransferase (CPT) bzw. CDP-Ethanolamin:DAG-Phosphoethanolamintransferase können die aktivierten Kopfgruppen Cytidin-5'-Cholin oder Cytidin-5'-Ethanolamin auf die *sn*-3-Position von DAG übertragen werden, wodurch PtdCho bzw. PtdEtn entsteht. Durch den zweiten Weg werden die Glycerophospholipide PtdIns, PtdSer und zu einem wesentlich geringeren Anteil PtdGro gebildet. Hierfür wird zuerst die Kopfgruppe von PtdOH durch Cytidin-5'-triphosphat zu CDP-DAG umgesetzt und aktiviert. Anschließend werden Inosit, Serin oder Glycerin auf CDP-DAG übertragen (Ohlrogge und Browse, 1995). Die am ER lokalisierten Desaturasen FAD2 und FAD3 modifizieren die an PtdCho gebundenen Fettsäuren. Das an PtdCho gebundene 18:1*n*-9 wird durch die Acyl-Lipid-Desaturase FAD2 zu 18:2*n*-6 und durch die Desaturase FAD3 weiter zu 18:3*n*-3 umgesetzt (Arondel et al., 1992; Okuley et al., 1994). In Eukaryoten findet die Biosynthese von Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran statt. Dabei katalysiert die Cardiolipin-Synthase den Transfer eines Phosphatidrests von CDP-DAG auf PtdGro (Nowicki et al., 2005; Schlame, 2008a). Am ER synthetisierte Lipide können auch für die Synthese der plastidären Glycerolipide verwendet werden. Der Reimport in die Plastiden erfolgt in Form von PtdOH (Xu et al., 2003; Xu et al., 2005). Dadurch wird in den Plastiden MGDG, DGDG und SQDG mit einer eukaryoten Fettsäureverteilung gebildet. Anhand des 16:3*n*-3/18:3*n*-3-Verhältnisses an der *sn*-2-Position von MGDG ist es möglich, das Ausmaß des Reimportes zu bestimmen, worüber eine Klassifizierung in 16:3- und 18:3-Pflanzen erfolgt.

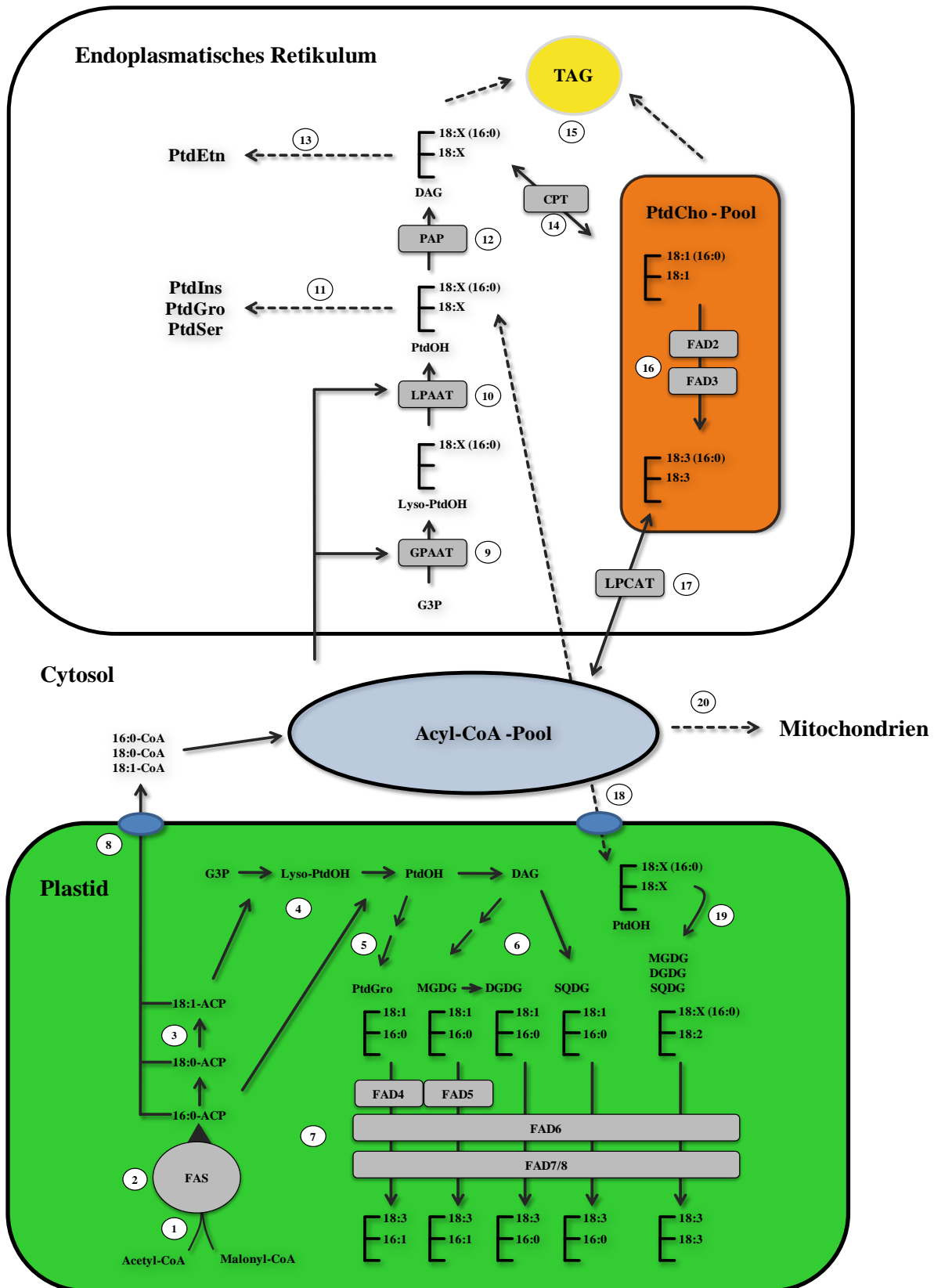


Abb. 3 Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden in Pflanzen (modifiziert nach Ohlrogge & Browse, 1995).
 An der Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden sind verschiedene Zellkompartimente beteiligt.
 –Fortsetzung auf Seite 11–

Abb. 3 –Fortsetzung–

In den Plastiden erfolgen die Fettsäuresynthese und die Synthese von Glyceroglykolipiden. (1) Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase; (2) Reaktionssequenz der Fettsäuresynthese (FAS); (3) Desaturierung von 18:0 durch die lösliche, plastidäre Stearoyl-ACP-Desaturase; (4) Transfer der Fettsäurereste von Acyl-ACP auf Glycerin-3-Phosphat und die sukzessive Bildung von PtdOH und DAG mit der für Prokaryoten charakteristischen Fettsäureverteilung; (5) Synthese des Glycerophospholipids PtdGro; (6) Synthese der Glyceroglykolipide MGDG, DGDG und SQDG; (7) Desaturierung der Fettsäuren von Glyceroglykolipiden durch die plastidären, membranständigen Acyl-Lipid-Desaturasen; (8) Export der neugebildeten Fettsäuren in das Cytosol unter gleichzeitiger Übertragung der Fettsäuren auf CoA. Am Endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Synthese der Glycerolipide und Glycerophospholipide mit der für Eukaryoten charakteristischen Fettsäureverteilung. (9) Transfer der Fettsäurereste von Acyl-CoA auf Glycerin-3-Phosphat und die sukzessive Bildung von (10) Lyso-PtdOH und (11) PtdOH; (11) Synthese von PtdIns, PtdGro und PtdSer über den CDP-DAG-Weg; (12) Dephosphorylierung von PtdOH zu DAG; (13) Synthese von PtdEtn und (14) PtdCho. (15) An der Synthese von TAG sind DAG und PtdCho beteiligt. (16) Desaturierung der Fettsäuren an PtdCho durch die membranständigen Acyl-Lipid-Desaturasen; (17) Transfer der lipidgebundenen Fettsäuren aus der *sn*-2-Position von PtdCho auf CoA. (18) Der eukaryote und der prokaryote Glycerolipidsynthese-Weg sind über den Reimport des DAG-Restes aus PtdCho oder aus Lyso-PtdCho in die Plastiden miteinander verbunden; (19) Verwendung des reimportierten DAG-Restes für die Glyceroglykolipidsynthese. (20) Der Acyl-CoA-Pool stellt Fettsäuren auch für andere Zellorganellen, wie z. B. Mitochondrien, bereit (Erläuterungen und Erklärung der Abkürzungen siehe Text).

1.2.3 Biosynthese von Triacylglycerinen

Triacylglycerine (TAG) haben im Samen der Pflanzen vor allem die Funktion eines Kohlenstoffspeichers, der während der Etablierung des Keimlings mobilisiert wird und den notwendigen Kohlenstoff für die frühen Biosyntheseprozesse des Keimlings bereitstellt. Die Speicherung des TAG erfolgt während der späten Phase der Samenreifung am ER (Baud et al., 2002). Das gebildete TAG lagert sich zunächst innerhalb der Doppelmembran eines definierten Bereichs des ER ab, dehnt diesen Bereich aus und schnürt sich schließlich als Ölkörper mit einer umgebenden Glycerophospholipid-Membran ab (Huang, 1996). Die am häufigsten in TAG vorkommenden Fettsäuren sind Palmitat (16:0), Stearat (18:0), Oleat (18:1 n -9), Linoleat (18:2 n -6) und α -Linolenat (18:3 n -3 (Browse und Somerville, 1991). Neben diesen *gewöhnlichen Fettsäuren* akkumulieren in vielen Samenölen auch sogenannte *ungewöhnliche Fettsäuren*. *Ungewöhnliche Fettsäuren* unterscheiden sich von den gewöhnlichen C16- und C18-Fettsäuren in der Kettenlänge, in der Position oder Anzahl der Doppelbindungen oder durch das Auftreten anderer funktioneller Gruppen in der Kohlenstoffkette (Napier, 2007). Gemeinsame Merkmale dieser Fettsäuren sind, dass sie in höheren Mengen nur im Samenöl vorkommen und meist keine Bestandteile der Lipide biologischer Membranen darstellen (Millar et al., 2000). Folglich können sich die Speicherlipide von den Membranlipiden in der Fettsäurezusammensetzung erheblich unterscheiden.

So beträgt der Anteil an Ricinolsäure, einer einfach ungesättigten, hydroxylierten C18-Fettsäure, im Samenöl von *Ricinus communis* bis zu 90 % der gesamten Fettsäuren. Obwohl Ricinolsäure durch eine membranständige Acyl-Lipid-Desaturase am ER gebildet wird, stellt sie nur einen kleinen Anteil der Membranlipide während der Samenreifung dar (Bafor et al., 1991; van de Loo et al., 1995; Kroon et al., 2006). Dies zeigt beispielhaft, dass Samenpflanzen ein hochaktives System besitzen, mit dem sie selektiv ungewöhnliche Fettsäuren vom Ort der Biosynthese in die Speicherlipide überführen können. Dieses System besteht aus mehreren, netzwerkartigen miteinander verknüpften enzymatischen Aktivitäten, die während der Samenreifung die Fettsäuren des Acyl-CoA-Pools im Cytosol und des PtdCho-Pools am ER für die Bildung von TAG nutzen (Abb. 4). Beide Pools sind so miteinander verknüpft, dass ein ständiger Fettsäureaustausch zwischen ihnen stattfinden kann.

Die Acyl-CoA:Lyso-PtdCho-Acyltransferasen (LPCAT) katalysieren den Austausch von Fettsäuren aus dem Acyl-CoA-Pool mit denen der *sn*-2-Position von PtdCho (Lands, 1960; Stymne und Stobart, 1984). Phospholipasen A₂ hydrolysieren selektiv die Fettsäuren von der *sn*-2-Position des PtdCho. Die daraus entstehenden freien Fettsäuren werden anschließend durch Acyl-CoA-Synthetasen sehr effizient auf CoA übertragen (Fulda et al., 1997). Dadurch können die im PtdCho-Pool modifizierten Fettsäuren dem CoA-Pool zugeführt und für die Synthese von PtdOH, DAG und TAG genutzt werden. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren 18:2_n-6 und 18:3_n-3 sowie die ungewöhnlichen Fettsäuren des PtdCho-Pools können auch über die reversible Reaktion der CDP-Cholin:DAG-Phosphocholintransferase (CPT) für die TAG-Synthese verfügbar gemacht werden. Bei dieser Reaktion wird PtdCho in DAG überführt, das allen TAG-synthetisierenden Enzymen als Substrat dient (Slack et al., 1983). Auf die *sn*-3-Position von DAG wird durch die Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (DGAT) eine Fettsäure des Acyl-CoA-Pools übertragen und TAG gebildet. Neben den monofunktionellen DGAT existiert eine Gruppe neuartiger bifunktionaler Wachsester-Synthase/Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (WS/DGAT). So speichert das Gram-negative Bakterium *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 neben geringen Mengen TAG hauptsächlich Wachsester, an dessen Synthese die bifunktionalen WS/DGAT beteiligt sind (Kalscheuer et al., 2004). An einem weiteren Weg sind PtdCho und DAG beteiligt. Katalysiert durch Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferasen (PDAT) werden Fettsäuren von der *sn*-2-Position des PtdCho auf die *sn*-3-Position von DAG übertragen, wobei TAG und Lyso-PtdCho entstehen (Dahlqvist et al., 2000).

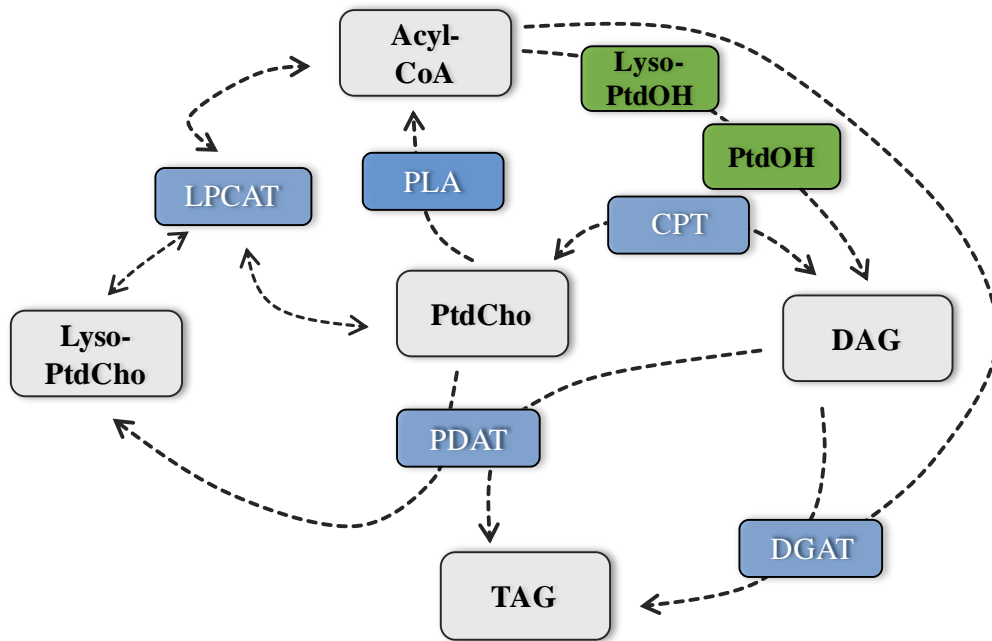


Abb. 4 Transfer von Fettsäuren zwischen Lipiden am ER (modifiziert nach Singh et al., 2005).

Der netzwerkartige Austausch von Fettsäuren zwischen den Lipiden am ER (Acyl-CoA, Lyso-PtdCho, PtdCho, DAG und TAG) wird durch Phospholipasen (PLA) und verschiedenen Acyltransferasen (LPCAT, PDAT, CPT, PDAT und DGAT) katalysiert. Die Substrat- und Positionsspezifitäten der Acyltransferasen bestimmen die Fettsäurezusammensetzungen der direkt an der TAG-Synthese beteiligten Lipide PtdCho, DAG sowie des Acyl-CoA-Pools. Somit haben die Acyltransferasen einen entscheidenden Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung des TAG. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die Enzymaktivitäten der MGAT, der bifunktionellen DGAT/WS und der DAG:DAG-Transacylasen nicht in das Schema mit aufgenommen.

Alternativ wurde auch eine Transacylierungsreaktion in Membranpräparaten der Färberdistel *Carthamus tinctorius* beobachtet, an der ausschließlich DAG beteiligt ist. Hierbei überträgt eine DAG:DAG-Transacylase eine Fettsäure von einem Molekül DAG auf ein weiteres Molekül DAG, so dass TAG und MAG entstehen (Stobart et al., 1997). Vor allem aus dem tierischen System sind sogenannte Acyl-CoA:Monoacylglycerin-Acyltransferasen (MGAT) bekannt. MGAT synthetisieren DAG aus MAG und einer an CoA gebundenen Fettsäure. In Pflanzen ist die MGAT-Aktivität bislang nur in Kotyledonen der Erdnuss *Arachis hypogea* beobachtet worden (Tumaney et al., 2001).

1.3 Die Familie der Acyltransferasen

Die enzymatischen Funktionen, die direkt oder indirekt an der pflanzlichen TAG-Synthese beteiligt sind, sind schon seit langem bekannt. Jedoch sind viele der Gene, die für diese Enzyme codieren, erst seit wenigen Jahren bekannt. Enzyme, die den Transfer von Fettsäuren auf Glycerin-3-Phosphat oder Lyso-PtdOH (GPAT und LPAAT) oder den Austausch von Fettsäuren zwischen PtdCho und Acyl-CoA (LPCAT) katalysieren, werden in Pflanzen durch große Genfamilien codiert (Zheng et al., 2003; Kim et al., 2005; Stahl et al., 2008). Die Familie der DGAT gliedert sich in drei Gruppen; neben zwei Gruppen membranständiger DGAT wurde auch eine Gruppe löslicher DGAT identifiziert (Saha et al., 2006). Für PDAT wurden im Genom von *A. thaliana* zwei Gene identifiziert. Der Beweis, ob beide PDAT-Gene gleichermaßen oder nur eines der beiden entscheidend an der TAG-Synthese im Samen beteiligt sind, steht noch aus. Insgesamt gilt, dass für viele der beteiligten Acyltransferasen zwar die enzymatischen Aktivitäten in heterologen Expressionssystemen wie *E. coli* oder *S. cerevisiae* dargestellt werden konnten, aber die exakten stoffwechselphysiologischen Funktionen in den nativen Organismen sind in vielen Fällen noch völlig unbekannt.

Dieser Abschnitt soll anhand bereits publizierter Arbeiten einen Überblick zu dem Wissensstand von Acyltransferase-Familien geben, die auch für den praktischen Teil dieser Arbeit von Bedeutung waren.

1.3.1 Acyl-CoA:Lyso-PtdCho-Acyltransferasen

PtdCho stellt das am häufigsten vorkommende Glycerophospholipid eukaryoter Membranen dar. Wie bereits beschrieben, wird PtdCho ausgehend von Glycerin-3-phosphat synthetisiert (siehe 1.2.2). Die Fettsäurezusammensetzung des PtdCho wird durch die Acyl-Lipid-Desaturasen und den Substratspezifitäten der Acyltransferasen bestimmt, die an der Synthese von PtdCho beteiligt sind (siehe 1.2.2). Andererseits ist die Fettsäurezusammensetzung des PtdCho ständigen Änderungen unterworfen. Dieses sogenannte *fatty acid remodelling* des Lands-Zyklus erfolgt über eine CoA-unabhängige Hydrolyse durch Phospholipasen und CoA-abhängige Transacylierungsreaktionen der Acyl-CoA:Lyso-PtdCho-Acyltransferasen (Lands, 1960). Neben den LPCAT, die spezifisch PtdCho als Substrat verwenden, existieren auch für PtdOH- und PtdIns-spezifische Enzyme (LPAAT, LPIAT; Kim und Huang, 2004; Lee et al., 2008).

Die Acyl-CoA:Lyso-Glycerophospholipid-Acyltransferasen (LPLAT) vermögen als einzige Enzymfamilie aktivierte Fettsäuren direkt in Glycerophospholipide einzubauen. Auf diese Weise kann die Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide als Reaktion auf veränderte Bedingungen schnell modelliert werden. Die Familie der LPLAT wurde zuerst in Rattenleber-Mikrosomen beschrieben (Lands, 1960). In Invertebraten, Pilzen, Pflanzen und Tieren scheinen zwei LPLAT-Familien zu existieren, die evolutiv voneinander unabhängig entstanden sein könnten; zumindest weisen sie keine ausgeprägte Aminosäuresequenz-Homologie zueinander auf. Die genauen stoffwechselphysiologischen Unterschiede beider Familien sind bislang noch völlig unbekannt. Im Folgenden werden diese beiden Familien anhand einiger repräsentativer Vertreter aus Pflanzen und Invertebraten vorgestellt.

Von der ersten Familie sind fünf Vertreter im Genom von *A. thaliana* als LPAAT1 bis 5 identifiziert worden (Kim und Huang, 2004; Kim et al., 2005). Die physiologischen Funktionen sind bisher von LPAAT1, 2 und 3 bekannt. LPAAT1, der einzige in Plastiden lokalisierte Vertreter aus dieser Familie, hat eine essenzielle Funktion während der Embryogenese. Es wurde gezeigt, dass eine für diesen Genlocus homozygote *A. thaliana*-Mutante keinen normal entwickelten Samen bildet. Der Samen wurde nicht vollständig ausgebildet, sondern die Embryogenese kam in einer frühen Phase (Herz-Torpedo-Stadium) zum Stillstand. Als Grund für diesen letalen Effekt wurde vermutet, dass die prokaryote Fettsäureverteilung mit 16:0 in der *sn*-2-Position der plastidären Lipide aufgrund der fehlenden LPAAT1-Aktivität nicht mehr vorhanden sei. Diese Fettsäureverteilung könnte jedoch essenziell für die korrekte Funktion der Plastiden sein, ohne die eine normale Embryogenese nicht erfolgen kann (Kim und Huang, 2004). Eine ebenfalls essenzielle Funktion wurde für LPAAT2 beschrieben. In diesem Genlocus heterozygote *A. thaliana*-Mutanten entwickelten zu 50 % normalen Samen und zu 50 % abortierte, unbefruchtete Samenanlagen. Die abortierten Samenanlagen waren auf einen degenerierten weiblichen Gametophyten zurückzuführen. Die Zentralzelle des weiblichen Gametophyten der heterozygoten *A. thaliana*-Mutante zeigte in einem frühen Stadium nur schwach ausgebildetes ER und stattdessen abnorme Stärke-Einlagerungen. Aus der Zentralzelle geht nach der Befruchtung das Endosperm hervor. Das Endosperm stellt das Nährgewebe des Embryos dar. Degeneriertes Endosperm hat damit den Abort des Embryos zur Folge. Dass nur der weibliche Gametophyt von dem Stoffwechseldefekt betroffen war, wurde darauf zurückgeführt, dass LPAAT3 vermutlich die analogen Funktionen im männlichen Gametophyten, dem Pollen, erfüllt (Kim et al., 2005).

Die zweite LPLAT-Familie gehört zu der Superfamilie der am ER lokalisierten membrangebundenen *O*-Acyltransferasen (MBOAT; Hofmann, 2000; Ghaemmaghami et al., 2003). Diese Superfamilie vereint Acyltransferasen, deren Gemeinsamkeit der Transfer organischer Säuren auf Hydroxylgruppen membranständiger Akzeptoren bildet. Dazu zählen u.a. Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (DGAT), Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferasen (ACAT), Acyl-CoA:Sterin-Acyltransferasen (ASAT) oder Wachssynthasen (Hofmann, 2000). Im Genom von *A. thaliana* sind bislang zwei Genloci identifiziert worden, die für LPCAT aus dieser Superfamilie codieren (AtLPCAT1 und AtLPCAT2; Stahl et al., 2008). Da außer den enzymatischen Eigenschaften beider Enzyme keine weiteren Erkenntnisse über die stoffwechselphysiologischen Funktionen vorliegen, wird im Folgenden ein homologes Gen aus dem VLCPUFA produzierenden Organismus *Caenorhabditis elegans* vorgestellt. Die Funktion der LPCAT *mboa-6* aus *C. elegans* wurde mittels RNA-Interferenz untersucht. Hierbei führte die gezielte Hemmung der Expression von *mboa-6* zu einer verringerten Inkorporation von exogenen VLCPUFAs in die Glycerophospholipide PtdCho, PtdEtn und PtdSer (Matsuda et al., 2008). Darüber hinaus führte die verminderte Genexpression von *mboa-6* zu verlangsamtem Wachstum und zu einer abnormen Morphologie. Für den Transfer von VLCPUFAs auf PtdIns scheint es in *C. elegans* eine weitere LPLAT zu geben (Lee et al., 2008).

1.3.2 Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen

Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (DGAT) sind meist membranständige Enzyme, die den letzten Reaktionsschritt der Biosynthese von TAG in Pflanzen, Pilzen und Tieren katalysieren. Als Substrat für die Bildung von TAG nutzen diese Enzyme Fettsäuren des Acyl-CoA-Pools, die auf die *sn*-3-Position von DAG übertragen werden, wodurch TAG entsteht. In eukaryoten Organismen wurden bisher drei verschiedene DGAT-Typen beschrieben. DGAT-Enzyme des Typs 1 (DGAT1) haben eine hohe Homologie zu tierischen Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferasen (ACAT), die Fettsäurereste von Acyl-CoA auf Cholesterin übertragen (Chang et al., 1997). Anhand dieser Homologie wurde die erste DGAT1 aus *Mus musculus* (MmDGAT1) isoliert (Cases et al., 1998). Die heterologe Expression der *MmDGAT1* in Insektenzellen führte nicht zu der vermuteten ACAT-Aktivität in den Membranen dieser Zellen. Stattdessen wurde der erhöhte Transfer von Fettsäureresten aus Acyl-CoA auf DAG festgestellt.

In den darauffolgenden Jahren wurden weitere DGAT1-Enzyme aus verschiedenen Organismen isoliert. Darunter waren pflanzliche DGAT1 aus der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (Hobbs et al., 1999; Zou et al., 1999; Bouvier-Nave et al., 2000), der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* (Bouvier-Nave et al., 2000) und dem Tungölbaum *Vernicia fordii* (Shockey et al., 2006). Die Beteiligung der DGAT1-Enzymfamilie an der TAG-Biosynthese im Samen wurde durch Überexpressionsstudien und Gen-Mutationsstudien anhand der DGAT1 aus *A. thaliana* gezeigt (Katavic et al., 1995; Routaboul et al., 1999; Jako et al., 2001).

Vertreter der DGAT-Enzyme des Typs 2 (DGAT2) wurden bislang unter anderem in Pilzen, Pflanzen und Säugern identifiziert (Cases et al., 2001; Oelkers et al., 2002; Lardizabal et al., 2008). Die ersten Vertreter dieser Enzymfamilie wurden in dem Pilz *Mortierella ramanniana* entdeckt (MrDGAT2A und MrDGAT2B; Lardizabal et al., 2001). DGAT des Typs 2 zeigen auf Ebene der Aminosäuresequenz keine Homologie zu den Vertretern des Typs 1. Über die jeweiligen stoffwechselphysiologischen Funktionen der DGAT1- und DGAT2-Enzyme ist bislang wenig bekannt. Im Genom des Tungöl-Baums *Vernicia fordii* sind DGAT1 und DGAT2 als einzige DGAT-Gene gefunden worden (VfDGAT1 und VfDGAT2). Während VfDGAT1 konstitutiv in verschiedenen Geweben exprimiert wird, ist die Expression von VfDGAT2 spezifisch auf den reifenden Samen beschränkt und erreicht im Gegensatz zu VfDGAT1 das höchste Expressionsniveau während der Akkumulation von TAG im reifenden Samen (Shockey et al., 2006). Darüber hinaus zeigte VfDGAT2 in Hefe-Expressionsstudien eine Substratspezifität gegenüber der im Tungöl akkumulierenden Fettsäure α -Eleostearinsäure ($18:3^{\Delta 9Z,11E,13E}$), was zu einer vermehrten Bildung von TAG mit α -Eleostearinsäureestern in allen drei *sn*-Positionen führte. Diese bevorzugte Verwendung von α -Eleostearinsäure als Substrat wurde für VfDGAT1 in den Hefe-Expressionsstudien nicht beobachtet. Neben der unterschiedlichen Substratspezifität sind VfDGAT1 und VfDGAT2 außerdem in verschiedenen Bereichen der ER-Membran lokalisiert. Aufgrund dieser Beobachtungen vermuteten die Autoren, dass DGAT1 und DGAT2 völlig verschiedene physiologische Funktionen in Pflanzen erfüllen, wobei DGAT2 eine Schlüsselrolle während der Akkumulation von ungewöhnlichen Fettsäuren im TAG des reifenden Samen einnehmen könnte.

Die bislang am geringsten charakterisierte Familie umfasst lösliche, im Cytosol lokalisierte DGAT-Enzyme. Der bislang einzige Vertreter dieser Familie konnte aus der Erdnuss *A. hypogaea* isoliert werden (AhDGAT; Saha et al., 2006). AhDGAT zeigt keine ausgeprägte Aminosäuresequenz-Homologie zu DGAT1 und DGAT2.

Die heterologe Expression von AhDGAT führte bei *in vivo*-Studien im Bakterium *Escherichia coli* zur Bildung von TAG und Wachsestern. Allerdings wurde bei *in vitro*-Studien mit *E. coli*-Zelllysaten lediglich die Bildung von TAG beobachtet.

1.3.3 Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferasen

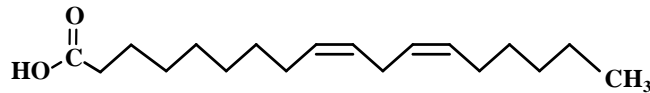
Die Familie der membranständigen Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferasen (PDAT) ist an der Acyl-CoA-unabhängigen Synthese von TAG beteiligt, bei dem ein Fettsäurerest bevorzugt von der *sn*-2-Position eines Glycerophospholipids auf DAG übertragen wird. Als Quellen der Fettsäuren wurden PtdCho und PtdEtn identifiziert, wobei PtdCho den bevorzugten Fettsäure-Donor darstellt (Dahlqvist et al., 2000; Oelkers et al., 2000). Vertreter der PDAT-Familie weisen hohe Aminosäuresequenz-Homologien zu Lecithin:Cholesterin-Acyltransferasen (LCAT) aus Säugern auf, die ebenfalls ohne Beteiligung des Acyl-CoA-Pools Fettsäuren von Glycerophospholipiden auf Cholesterin übertragen (Glomset, 1968; Jonas, 2000). Die PDAT-Aktivität wurde zuerst mit Hilfe pflanzlicher Membranpräparationen aus reifenden Samen des Wolfsmilchgewächses *Ricinus communis* und der Korbblütler *Crepis palaestina* und *Helianthus annuus* (Sonnenblume) dargestellt (Dahlqvist et al., 2000). Die Samenöle von *R. communis* und *C. palaestina* weisen hohe Gehalte an ungewöhnlichen Fettsäuren auf (van de Loo et al., 1995; Lee et al., 1998). Ausgehend von der Aminosäuresequenz-Homologie zur LCAT-Familie aus Säugern wurde die erste PDAT-Gensequenz in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (*LROI*, *LCAT related open reading frame 1*; Dahlqvist et al., 2000; Oelkers et al., 2000). Weitere LCAT-homologe Proteine aus *S. cerevisiae* sind die Acyl-CoA: Sterin-Acyltransferasen *ARE1* und *ARE2*. Pflanzliche PDAT-Enzyme wurden bislang hauptsächlich in *A. thaliana* untersucht. Im Genom von *A. thaliana* wurden sechs Genloci mit einer hohen Homologie zur LCAT-Familie aus Säugern gefunden, deren Genprodukte jeweils unterschiedliche stoffwechselphysiologische Funktionen erfüllen. Neben den zwei PDAT-Enzymen AtPDAT1 und AtPDAT2 (Dahlqvist et al., 2000; Mhaske et al., 2005) zählen zu dieser Enzymfamilie eine Phospholipase des Typs A1 (AtPLA1; Noiri et al., 2004), eine Phospholipid: Sterol-Acyltransferase (AtPSAT) und eine Lecithin: Cholesterin-Acyltransferase (AtLCAT1; Banas et al., 2005). Die physiologischen Funktionen der zwei PDAT-Enzyme aus *A. thaliana* sind weitestgehend unbekannt. Es wurde gezeigt, dass AtPDAT1 in Blättern, Wurzeln, Blüten und reifenden Samen gleichermaßen stark exprimiert wird, während die Expression von AtPDAT2 auf den reifenden Samen beschränkt ist.

Daher wird vermutet, dass nur AtPDAT2 an der Akkumulation von TAG beteiligt ist (Stahl et al., 2004). Diese Vermutung wurde durch Gen-Deletionsstudien indirekt bestätigt. Eine AtPDAT1-defiziente *A. thaliana*-Mutante zeigte im reifen Samen keine Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Mhaske et al., 2005). Allerdings schlossen die Autoren der Studie nicht aus, dass andere Enzyme, wie z.B. AtPDAT2 oder die DGAT-Enzyme, den Verlust der ATPDAT1-Aktivität kompensieren könnten, so dass ein möglicher Phänotyp nicht erkennbar wird. Für AtPDAT1 konnte durch *in vitro*-Analysen festgestellt werden, dass PtdCho und PtdEtn als Substrate der Enzymreaktion akzeptiert werden. Dabei werden selektiv die Fettsäuren der *sn*-2-Position für den Transfer auf DAG verwendet. Des Weiteren zeigt AtPDAT1 eine Substratspezifität gegenüber mehrfach ungesättigten C18-Fettsäuren (Stahl et al., 2004).

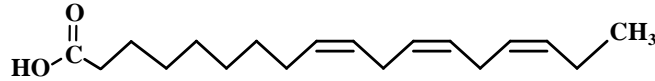
1.4 Sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Sehr langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*very long chain polyunsaturated fatty acids*, VLCPUFA) sind Monocarbonsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 18 Kohlenstoffatomen und mindestens drei methylenunterbrochenen Doppelbindungen. VLCPUFAs werden nach der relativen Position der zum Methylen am nächsten gelegenen Doppelbindung in *n*-6 und *n*-3-Fettsäuren eingeteilt. In Bezug auf das Kohlenstoffatom der endständigen Methygruppe von Fettsäuren wird alternativ auch die Bezeichnung ω 6- und ω 3-Fettsäuren verwendet. Zu den am weitesten verbreiteten VLCPUFAs zählen Arachidonsäure (ARA; 20:4 n -6), Eicosapentaensäure (EPA; 20:5 n -3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 n -3). Obwohl *n*-6- und *n*-3-VLCPUFA im menschlichen Organismus bedeutende Funktionen übernehmen, zählen sie zu den essenziellen Fettsäuren, deren Bedarf mit der täglichen Ernährung gedeckt werden muss. In den folgenden Abschnitten werden das natürliche Vorkommen von VLCPUFAs, deren Biosynthesewege in höheren Pflanzen und die ernährungsphysiologische Bedeutung der VLCPUFAs näher betrachtet.

Linolsäure (18:2^{Δ9,12})



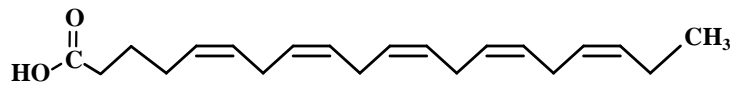
α-Linolensäure (18:3^{Δ9,12,15})



Arachidonsäure (20:4^{Δ5,8,11,14})



Eicosapentaensäure (20:5^{Δ5,8,11,14,17})



Docosahexaensäure (22:6^{Δ4,7,10,13,16,19})

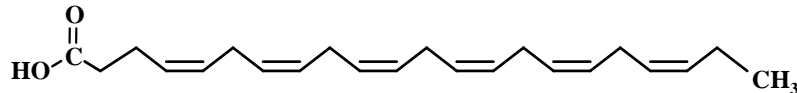


Abb. 5 Strukturen stoffwechselphysiologisch besonders relevanter LCPUFA und VLCPUFA.

Die Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäuren wird durch die Zahl vor dem Doppelpunkt und die Anzahl der Doppelbindungen durch die Zahl nach dem Doppelpunkt angegeben. Die Position der Doppelbindungen wird durch die hochgestellten Zahlen wiedergegeben.

1.4.1 Vorkommen und Biosynthese von VLCPUFA

Im Lauf der Evolution haben anaerob und aerob lebende Organismen verschiedene Strategien zu Synthese von VLCPUFA entwickelt. Prokaryote Vertreter unter den VLCPUFA-produzierenden Organismen sind vor allem bei marinen Bakterien, wie z.B. den Gattungen *Shewanella* und *Vibrio*, zu finden (Nichols et al., 1997; Kato und Nogi, 2001). Gemeinsam mit dem eukaryoten Protist *Schizochytrium* produzieren diese Mikroorganismen VLCPUFA anaerob mittels Polyketid-Synthasen (PKS; Metz et al., 2001). Es wird dabei zwischen zwei PKS-Komplexen unterschieden. PKS des Typs I sind aus einem Multidomänenprotein aufgebaut, die alle notwendigen enzymatischen Funktionen vereinen. Bei PKS des Typs II sind die einzelnen enzymatischen Funktionen auf mehrere monofunktionelle Polypeptide verteilt. Diese Organisation ähnelt den Fettsäuresynthasen aus Bakterien und Plastiden.

Beide Typen haben gemein, dass die katalytische Reaktionssequenz der entstehenden Polyketide den Schritten der FAS entspricht, wobei die PKS-Komplexe auch selbst die Einführung der Doppelbindungen in die wachsende Acylkette katalysieren (Hopwood und Sherman, 1990; Metz et al., 2001).

Die VLCPUFA-Synthese bei den aerob lebenden eukaryoten Organismen, wie den Säugern, Pflanzen oder Pilzen, verläuft entlang des ω 6-/ ω 3-Synthesewegs oder bei einigen wenigen Mikroalgen entlang des alternativen Δ 8-Synthesewegs. Für beide Wege ist kennzeichnend, dass sie desaturierende und kettenverlängernde Reaktionsschritte miteinander kombinieren, die jedoch von voneinander getrennten Enzymen katalysiert werden. Als Ausgangssubstanzen dienen beiden Wegen $18:2n-6$ und $18:3n-3$. Der ω 6-/ ω 3-Syntheseweg beginnt mit der Desaturierung von $18:2n-6$ und $18:3n-3$ zu $18:3n-6$ (γ -Linolensäure, GLA) und $18:4n-3$ durch die Aktivität einer Δ 6-Desaturase. Diese Intermediate werden anschließend durch eine Δ 6-Elongase zu den entsprechenden C20-Fettsäuren $20:3n-6$ und $20:4n-3$ elongiert. Eine Δ 5-Desaturase fügt im folgenden Schritt eine weitere Doppelbindung ein, wodurch ARA und EPA entstehen. Der ω 6- und der ω 3-Syntheseweg stehen in manchen Organismen über Δ 15- oder ω 3-Desaturasen in Verbindung, die $n-6$ -Fettsäuren in die entsprechenden $n-3$ -Fettsäuren überführen können (Spychalla et al., 1997; Voelker und Kinney, 2001; Sayanova und Napier, 2004). Im alternativen Δ 8-Syntheseweg werden die Ausgangssubstrate zunächst durch eine Δ 9-Elongase zu den entsprechenden C20-Fettsäuren $20:2n-6$ und $20:3n-3$ elongiert und erst danach fügt eine Δ 8-Desaturase eine weitere Doppelbindung in die Fettsäuren ein, gefolgt von der Δ 5-Desaturierung, wobei ARA und EPA entstehen (Wallis und Browse, 1999; Qi et al., 2002). Die Bildung von DHA erfolgt im ω 6-/ ω 3-Syntheseweg und im alternativen Δ 8-Syntheseweg ausgehend von EPA durch eine Δ 5-Elongase und die abschließende Δ 4-Desaturierung zu DHA.

Die Biosynthese von VLCPUFA in Säugetieren beginnt ebenfalls mit den Ausgangssubstraten $18:2n-6$ und $18:3n-3$. Jedoch sind Säugetiere nicht in der Lage diese Substrate *de novo* zu synthetisieren, da sie nicht über Δ 12- und Δ 15-Desaturasen verfügen, die eine Doppelbindung in die $n-6$ -Position von $18:1n-9$ oder in die $n-3$ -Position von $18:2n-6$ einfügen können (Marszalek und Lodish, 2005). Säugetiere können lediglich zwischen dem Carboxylende einer Fettsäure und deren Δ 9-Position eine Doppelbindung einfügen. Aus diesem Grund müssen die $n-6$ - und $n-3$ -Fettsäuren mit der Nahrung aufgenommen werden; sie sind essenziell. Jedoch sind Säugetiere in der Lage aufgenommenes $18:2n-6$ und $18:3n-3$ zu nutzen und durch das Zusammenspiel spezifischer Elongasen und Desaturasen zu ARA und EPA entlang des ω 6- bzw. des ω 3-Synthesewegs umzusetzen.

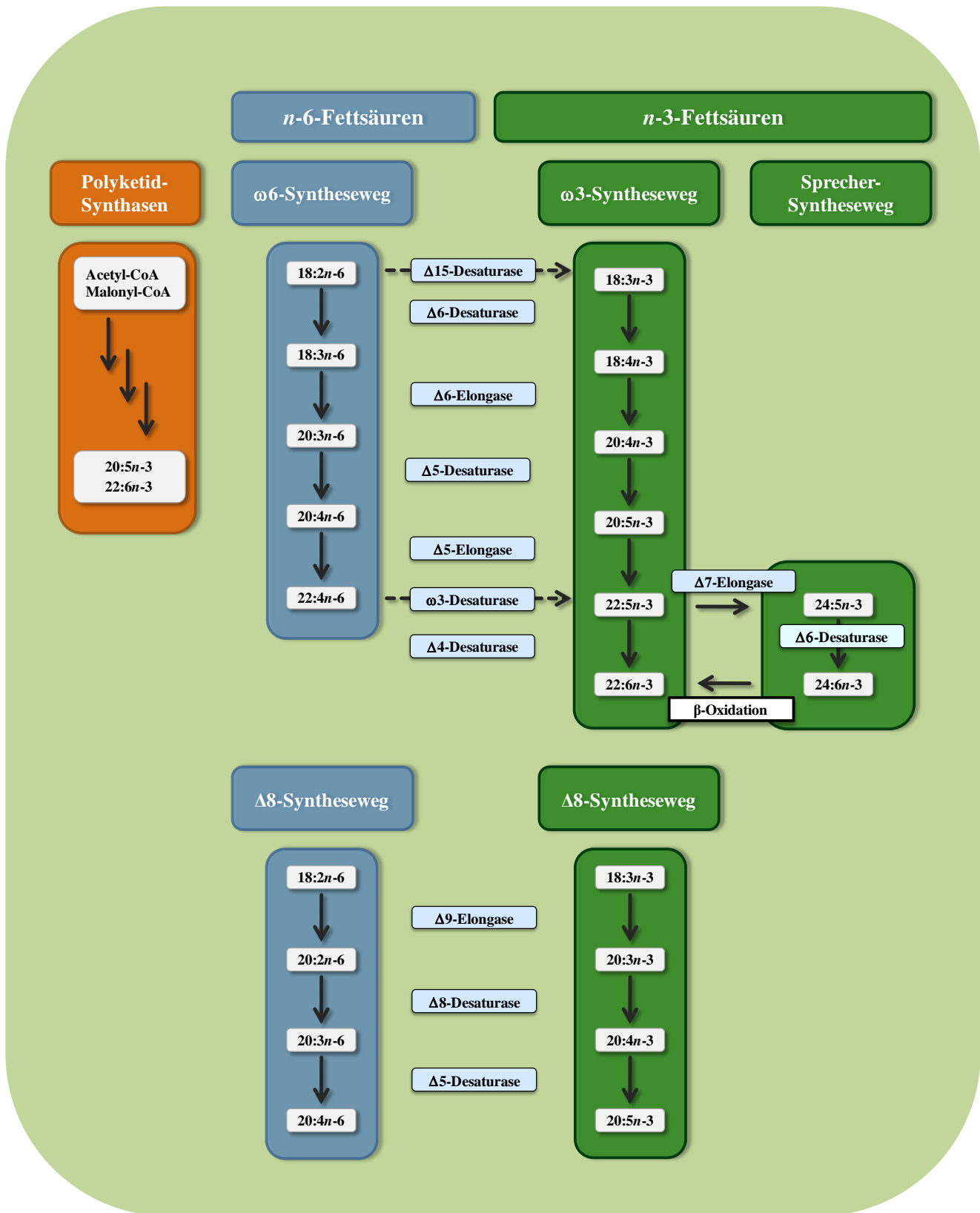


Abb. 6 Schematische Darstellung verschiedener VLCPUFA-Biosynthesewege.

Die verschiedenen Biosynthesewege zur Bildung von ARA, EPA und DHA sind der ω6- und ω3-Syntheseweg, die Synthese durch Polyketidsynthasen und der Sprecher-Weg. Der ω6-Syntheseweg ist in einzelnen Organismen über Desaturasen mit dem ω3-Syntheseweg verbunden. Der anaerobe Syntheseweg durch Polyketidsynthasen ist vor allem bei marinen Bakterien zu finden. Der in Säugern beschriebene Sprecher-Weg enthält neben den Desaturierungs- und Elongationsschritten zusätzliche eine partielle β-Oxidation der Fettsäurekette.

Die weitere Umsetzung von EPA zu DHA verläuft jedoch unterschiedlich zu dem bereits erläuterten Weg. Bei diesem alternativen Biosyntheseweg, dem sogenannten Sprecher-Weg, wird EPA zunächst am ER in zwei Schritten um vier Kohlenstoffatome zu Tetra-cosapentaensäure ($24:5n-3$) elongiert und anschließend durch eine $\Delta 6$ -Desaturase zu Tetra-coasha-hexaensäure ($24:6n-3$) desaturiert. Die gebildete Fettsäure $24:6n-3$ wird in die Peroxisomen transportiert, wo sie durch partielle β -Oxidation um zwei Kohlenstoffatome verkürzt und zu DHA umgesetzt wird und abschließend wieder zurück an das ER transportiert wird (Sprecher, 2000; Ferdinandusse et al., 2001).

1.4.2 Bedeutung von Fettsäuren für die humane Ernährung

Als Energie- und Kohlenstoffquelle sind Fette und Öle wichtige Bestandteile der humanen Ernährung. Im Gegensatz zu den gesättigten kurzkettigen und mittelkettigen Fettsäuren werden den einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren ein positiver Einfluss auf die menschliche Gesundheit zugeschrieben (Schaefer, 1997; Binkoski et al., 2005). Die am häufigsten konsumierten pflanzlichen Fette und Öle werden aus Soja, Raps, Lein, Sonnenblume oder dem Palm- und Distelöl gewonnen. Während z.B. das Palmkernöl der Ölpalme *Elaeis guineensis* einen hohen Anteil der mittelkettigen, gesättigten Fettsäure 12:0 (Laurinsäure) aufweist, sind Raps und Lein reich an den essenziellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren $18:2n-6$ und $18:3n-3$. Diese beiden Fettsäuren dienen dem menschlichen Organismus als Vorläufer vieler Fettsäure-Derivate, wobei die aus $n-6$ - und $n-3$ -Fettsäuren abgeleiteten Derivate einen gegensätzlichen Effekt (siehe 1.4.3) aufweisen. $18:2n-6$ und $18:3n-3$ werden jedoch nicht ausschließlich für die VLCPUFA-Synthese eingesetzt, vielmehr konkurrieren verschiedene Stoffwechselwege um diese beiden Fettsäuresubstrate. Hierbei stellt die β -Oxidation den hauptsächlichen Verwerter dar. Durch diese unterschiedliche Aufteilung steht nur ein geringer Anteil der über die Nahrung aufgenommenen $n-6$ - und $n-3$ -Fettsäuren der VLCPUFA-Synthese zur Verfügung (Brenna, 2002). Die meisten konsumierten pflanzlichen Öle und tierischen Fette weisen kein ausgeglichenes Verhältnis von $n-6$ - zu $n-3$ -Fettsäuren auf, so dass sich das $n-6/n-3$ -Verhältnis der Ernährung immer mehr zu Gunsten des $n-6$ -Anteils verschiebt und in den westlich geprägten Staaten ein Verhältnis von 15:1 (Simopoulos, 2006) erreicht. Ein ausgeglichenes $n-6/n-3$ -Verhältnis in der Ernährung gilt aber als vorteilhaft (Hibbeln et al., 2004; Wada et al., 2007). Dieses ungünstige Verhältnis wird zusätzlich durch den immer schwieriger werdenden Zugang zu marinem Seefisch, der Hauptquelle sehr langkettiger $n-3$ -Fettsäuren, verstärkt.

Der steigende Zugriff auf diese Ressource führt zu einer Überfischung weiter Teile der Meere. Gleichzeitig wird den Fischbeständen, bedingt durch die industriell geprägte Vorgehensweise, oft nicht die notwendige Zeit zur Regeneration der Populationen gegeben, was zum Zusammenbruch einzelner Fischbestände oder dem Aussterben einzelner Arten führen kann (Pauly et al., 2002). Mariner Fisch stellt somit nicht länger eine verlässliche Quelle für sehr langkettige $n-3$ -Fettsäuren dar, die nachhaltig den wachsenden Bedarf an Fischölen allein befriedigen kann (Hites et al., 2004). Die Aufzucht von marinem Seefisch in Fischfarmen stellt keine Alternative dar, da dieser Fisch einen niedrigeren $n-3$ -Anteil im Fettgewebe im Vergleich zu Wildfisch aufweist (Blanchet et al., 2005). Die fermentative Herstellung von $n-3$ -VLCPUFA unter kontrollierten Bedingungen mit Hilfe von Bakterien, Pilzen und Mikroalgen liefert jahreszeitenunabhängig $n-3$ -VLCPUFA von gleichbleibender Qualität. Als entscheidender Nachteil gelten hierbei hohe Investitions- und Betriebskosten. Eine weitere Quelle, die vor allem in Regionen ohne Zugang zu Seefisch von Bedeutung war, war das Gehirn von Schlachttieren. Kalbshirn und Kalbsbries stellten dabei Nahrungsmittel dar, die jedoch heutzutage auch aufgrund der BSE-Problematik als Quellen ausscheiden.

1.4.3 Physiologische Aspekte der VLCPUFA im Menschen

VLCPUFAs übernehmen im menschlichen Organismus eine Vielzahl physiologischer Aufgaben. Im Folgenden wird daher beispielhaft die physiologische Bedeutung von hormonähnlichen Substanzen, die sich aus VLCPUFAs ableiten, näher erläutert. Im Körper werden die aus der Nahrung aufgenommenen VLCPUFA-Vorstufen $18:2n-6$ und $18:3n-3$ nur zu einem geringen Teil zu ARA, EPA und DHA umgesetzt (Sprecher, 2000; Brenna, 2002). Das Enzymsystem zur VLCPUFA-Synthese konkurriert dabei kompetitiv um die Vorstufen $18:2n-6$ und $18:3n-3$, d.h., das Verhältnis dieser mit der Nahrung aufgenommenen Fettsäuren bestimmt die Art der gebildeten VLCPUFAs und somit auch die Art der sich daraus abgeleiteten Signalsubstanzen, die sich in ihren Wirkungen deutlich unterscheiden. Tritt im Körper eine Entzündung auf, werden VLCPUFAs mittels Phospholipasen aus Glycerophospholipiden freigesetzt und zur Synthese der Signalmoleküle bereitgestellt. Aus ARA und EPA entstehen dabei Eicosanoide, zu denen die Prostaglandine und Leukotriene zählen. Aus DHA entstehen unter anderem die zu den Docosanoiden zählenden Resolvine (Funk, 2001; Marszalek und Lodish, 2005; Smith, 2005).

Im Allgemeinen wirken die von der Fettsäure ARA abgeleiteten Eicosanoide stark entzündungsfördernd, vasokonstriktorisch, immunsuppressiv und fördern die Aggregation der Blutplättchen. Im Gegensatz dazu fungieren die aus den Fettsäuren EPA und DHA gebildeten Derivate als Antagonisten. Der erhöhte Anteil der *n*-6-Fettsäuren in der Ernährung spiegelt sich in einer erhöhten ARA-Syntheserate und folglich in einer erhöhten Syntheserate der entzündungsfördernden Eicosanoide wider. Da die ARA-Derivate ihre biologische Aktivität bereits in geringen Konzentrationen entfalten, können sie durch eine vermehrte Bildung zu einem erhöhten Auftreten lokaler Entzündungen oder hypersensitiven Reaktionen beitragen (Simopoulos, 2006). Ein ausgeglichenes *n*-6/*n*-3-Verhältnis in der Ernährung oder eine *n*-3-Fettsäure reiche Ernährungstherapie bei entzündlichen chronischen Erkrankungen ist daher wünschenswert (Hibbeln et al., 2004; Wada et al., 2007).

1.4.4 Biosynthese von VLCPUFA in höheren Pflanzen

Im Gegensatz zu der bereits beschriebenen *de novo* Biosynthese von VLCPUFA in prokaryoten und eukaryoten Organismen sind die meisten höheren Pflanzen nicht in der Lage VLCPUFAs *de novo* zu synthetisieren. Dies gilt besonders für die landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, deren Samenöl für verschiedene Anwendungen von großem Interesse ist (Napier, 2007). Die Samenöle von einjährigen Nutzpflanzen wie Raps (*Brassica napus*) und Lein (*Linum usitatissimum*) weisen einen hohen Gehalt an den VLCPUFA-Vorstufen 18:2*n*-6 bzw. 18:3*n*-3 auf. Aufgrund dieses Fettsäureprofils eignen sich diese beiden Ölsaaten besonders gut für die Etablierung eines der in Abb. 6 dargestellten Biosynthesewege.

Die in Mikroalgen, Moosen oder Pilzen vorkommenden Biosynthesewege für VLCPUFAs stellen den Ausgangspunkt für die Etablierung eines solchen Stoffwechselwegs in Ölsaaten dar. Ihre genetische Ausstattung bildet die Grundlage für die Etablierung eines VLCPUFA-Biosynthesewegs in Kulturpflanzen. Das primäre Ziel ist dabei die Identifizierung und Isolierung von für die VLCPUFA-Synthese relevanten Genen aus einem oder mehreren Spenderorganismen und deren Transfer in höhere Pflanzen. Bislang ist es gelungen die Biosynthese von VLCPUFA entlang des ω 6-/ ω 3-Syntheswegs und des Δ 8-Synthesewegs in höheren Pflanzen darzustellen. Als Expressionswirte für die Gene dienten *Arabidopsis thaliana* (Qi et al., 2004; Hoffmann et al., 2008), Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Lein (*Linum usitatissimum*; Abbadi et al., 2004), Raps (*Brassica juncea*; Wu et al., 2005), Soja (*Glycine max*; Kinney, 2004).

Im Folgenden werden drei verschiedene Strategien für die transgene VLCPUFA-Synthese in höheren Pflanzen vorgestellt, die alle gleichermaßen das Potenzial für die VLCPUFA-Produktion besitzen (Abb. 7). Der $\Delta 8$ -Syntheseweg wurde zuerst von Qi et al. (2004) in *A. thaliana* eingebracht. Die dabei verwendeten Gene wurden aber ubiquitär unter Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert. Mit diesem Ansatz konnte der $\Delta 8$ -Syntheseweg erfolgreich in *A. thaliana* dargestellt werden. Dieser Syntheseweg setzte sich zusammen aus einer $\Delta 9$ -Elongase aus der Mikroalge *Isochrysis galbana*, einer $\Delta 8$ -Desaturase aus der Mikroalge *Euglena gracilis* und einer $\Delta 5$ -Desaturase aus dem Pilz *Mortierella alpina*. Der erste Reaktionsschritt dieses Synthesewegs ist die Elongation von CoA-gebundenem $18:2n-6$ und $18:3n-3$. Nach dem Transfer der Produkte $20:2n-6$ bzw. $20:3n-3$ auf PtdCho erfolgt zunächst die Desaturierung zu $20:3n-6$ bzw. $20:4n-3$. Die anschließende Desaturierung zu ARA und EPA erfolgte ebenfalls an den PtdCho-gebundenen Fettsäuren. Neben verschiedenen intermediären Fettsäuren des $\Delta 8$ -Synthesewegs wurden in den analysierten Blättern ARA-Gehalte von etwa 7 % und EPA-Gehalte von etwa 3 % des Gesamtfettsäuregehalts festgestellt. In einer davon unabhängigen Studie wurde berichtet, dass die im Acyl-CoA-Pool durch die $\Delta 9$ -Elongase gebildeten Fettsäuren $20:2n-6$ und $20:3n-3$ nicht effizient aus dem Acyl-CoA-Pool entfernt werden, sondern dort scheinbar akkumulieren. Es wurde vermutet, dass die endogene LPCAT die C20-Fettsäuren nicht als bevorzugtes Substrat verwendet und somit keine direkte Verbindung mit dem PtdCho-Pool herstellt, die allerdings für eine effiziente Prozessierung notwendig wäre (Sayanova et al., 2006). Jedoch lässt sich anhand dieser Ergebnisse nur bedingt auf die Eignung der verwendeten Enzymkombination in Ölsaaten schließen, da bei diesem Versuchsansatz nicht Samen, sondern Blattgewebe für die Expression der Gene und Analysen verwendet wurden. Blattgewebe zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Glyceroglykolipiden und Glycerophospholipiden aus. Triacylglycerin, das im Samen akkumulierende Lipid, ist in Blättern nur zu einem äußerst geringen Anteil vertreten. Über die spezifische Akkumulation der VLCPUFAs im TAG lassen sich daher keine Aussagen treffen. Ein $\omega 6$ -Syntheseweg für die Bildung von VLCPUFAs wurde von Abbadi et al. (2004) in *N. tabacum* und *L. usitatissimum* etabliert. Die Ergebnisse dieser Studie werden hier nur für *L. usitatissimum* erläutert. Für diesen Stoffwechselweg wurde die $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und die $\Delta 5$ -Desaturase Pt $\Delta 5$ aus *Phaeodactylum tricoratum* (Domergue et al., 2002) und die $\Delta 6$ -Elongase PSE1 aus dem Moos *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002) verwendet. Im Gegensatz zu dem von Qi et al. etablierten Weg wurde die Expression der Gene des $\Delta 6$ -Synthesewegs durch einen samenspezifischen Promotor reguliert.

Bei diesem Stoffwechselweg erfolgt die erste Desaturierung an PtdCho-gebundenem $18:2n-6$ bzw. $18:3n-3$. Anschließend müssen die Fettsäurereste für die Elongation zu $20:2n-6$ bzw. $20:3n-3$ von PtdCho auf CoA übertragen werden. Die Endprodukte ARA und EPA entstehen wie auch bei dem von Qi et al. etablierten VLCPUFA-Syntheseweg an PtdCho-gebundenen Fettsäuren. Daraus folgt, dass für den letzten Reaktionsschritt die Fettsäuren $20:2n-6$ bzw. $20:3n-3$ wieder zurück auf PtdCho übertragen werden müssen.

Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung im reifen Samen zeigte, dass bereits die primären Stoffwechselprodukte GLA und SDA zu einem relativ hohen Anteil im Samen akkumulierten und zusammen rund 42 % des Gesamtfettsäuregehalts bildeten. Die Endprodukte ARA und EPA hatten im reifen Samen einen wesentlich geringeren Anteil am Gesamtfettsäuregehalt von zusammen lediglich etwa 2 %. Die detaillierte Analyse der Fettsäurezusammensetzung im reifenden Samen zeigte die vermutlichen Gründe für den hohen Anteil der intermediären Stoffwechselprodukte und deren ineffiziente Prozessierung zu den Endprodukten auf. Einerseits scheint die endogene LPCAT nicht in der Lage zu sein, einen effizienten Austausch der C18- und C20-PUFAs zwischen PtdCho und CoA zu vermitteln, was die niedrigen Gehalte an C20-Fettsäuren erklären könnte. Andererseits wurde vermutet, dass im reifenden Samen Acylgruppen-übertragende Enzyme wie LPCAT, CPT und PDAT um die Fettsäure-Substrate konkurrieren, denn diese drei Enzyme haben gemein, dass sie Fettsäuren des PtdCho als Substrate nutzen. Die gleichmäßige Verteilung des primären Produkts $18:3n-6$ zwischen PtdEtn, DAG und MGDG könnte auf die CPT-Aktivität zurückzuführen sein, während der hohe Anteil an $18:4n-3$ in den TAG auf die PDAT-Aktivität zurückzuführen sein könnte. Vermutlich sind es diese beiden Aktivitäten, die dazu führen, dass die primären Intermediate aus dem transgenen Biosyntheseweg entfernt werden, wodurch sie den weiteren Umsetzungen hin zu ARA und EPA nicht mehr zur Verfügung stehen und somit die geringen Erträge an $n-6$ - und $n-3$ -VLCPUFAs erklären.

Ein $\omega 3$ -Syntheseweg für die Bildung von EPA, dessen Reaktionsschritte ausschließlich unter Beteiligung von CoA-gebundenen Fettsäuren verlaufen, wurde im Samen von *A. thaliana* etabliert (Hoffmann et al., 2008). Hierfür wurden die Desaturasen Ms $\Delta 6$ und Ms $\Delta 5$ aus der Mikroalge *Mantoniella squamata* und die $\Delta 6$ -Elongase PSE1 aus dem Moos *P. patens* verwendet. Die Fettsäurezusammensetzung des reifen Samens wies einen $20:4n-3$ -Anteil von etwa 0,8 % und einen EPA-Anteil von etwa 0,4 % des Gesamtfettsäuregehalts auf. Die unvollständige Umsetzung des $20:4n-3$ wurde auf die geringe Aktivität der Ms $\Delta 5$ -Desaturase zurückgeführt. Bei diesem Ansatz konnte der limitierende Austausch der Intermediate zwischen CoA und PtdCho umgangen werden.

1. Einleitung

Zusätzlich wurden nahezu keine intermediären Stoffwechselprodukte detektiert, d.h., vermutlich wurde das primäre Produkt 18:4 n -3 nahezu vollständig der Elongation zu 20:4 n -3 zugeführt. Des Weiteren akkumulierten 92 % des gebildeten EPA im TAG.

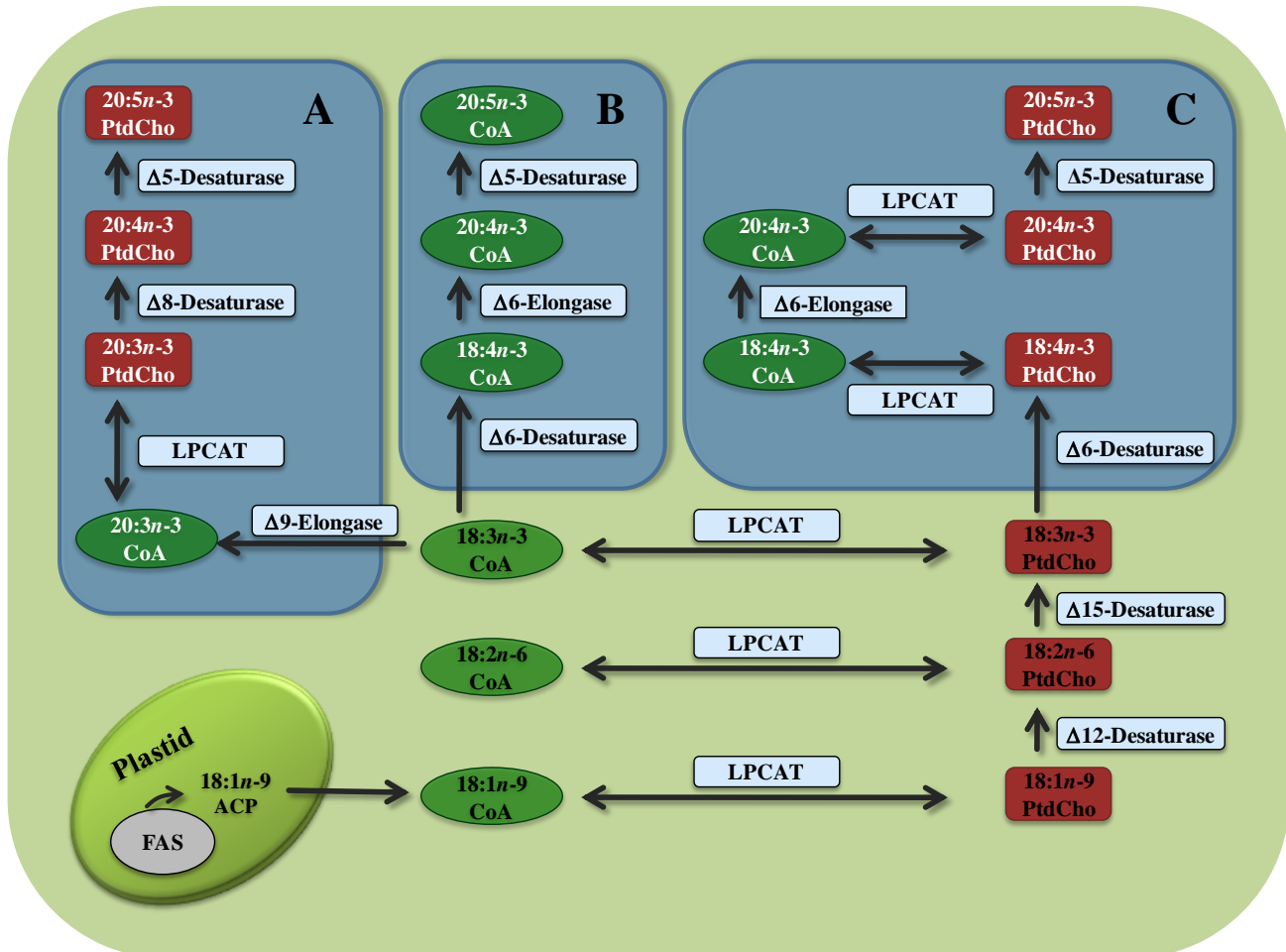


Abb. 7 Schematische Darstellung verschiedener Strategien zur VLCPUFA-Biosynthese in höheren Pflanzen.

(A) Der Δ 8-Syntheseweg zur Bildung von EPA in Blättern von *A. thaliana* verläuft unter Beteiligung des PtdCho- und Acyl-CoA-Pools (Qi et al., 2004). (B) ω 3-Syntheseweg zu Bildung von EPA im Samen von *A. thaliana* (Hoffmann et al., 2008). Die Reaktionsschritte erfolgen ausschließlich an CoA-gebundenen Fettsäuren ohne Beteiligung des PtdCho-Pools. (C) Kombiniertes ω 6- und ω 3-Syntheseweg zur Bildung von ARA. An der Reaktionsfolge sind abwechselnd Lipid- und CoA-gebundene Fettsäuren beteiligt (Abbadi et al., 2004). Schwarze Schriftzeichen stellen endogene Fettsäuren dar. Weiße Schriftzeichen stellen transgen produzierte Fettsäuren dar.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und funktionale Charakterisierung verschiedener Acyltransferasen mit neuartigen Substratspezifitäten, die in Mikroalgen an der Biosynthese von VLCPUFA und deren Akkumulation in den Reservelipiden beteiligt sind.

Die Biosynthesewege der VLCPUFA und der Reservelipide am ER umfassen ein umfangreiches Netzwerk verschiedener Reaktionen zu denen neben der Fettsäuremodifikation auch der Transfer von Fettsäuren zwischen den verschiedenen Lipiden am ER zählen. Acyltransferasen höherer Pflanzen verwenden normalerweise C16- oder C18-Fettsäuren als Substrate für den Acyl-CoA-abhängigen oder Acyl-CoA-unabhängigen Fettsäuretransfer im Zuge der Glycerolipid-Synthese am Endoplasmatischen Retikulum. Die Acyltransferasen aus Mikroalgen könnten sich möglicherweise in ihren Substratspezifitäten insofern von denen höherer Pflanzen unterscheiden, dass sie neben den C16- und C18-Fettsäuren auch oder sogar ausschließlich VLCPUFA als Substrate verwenden. Die Verwendung der Acyltransferasen mit neuartigen Substratspezifitäten in transgenen Ölsaaten als Teil eines VLCPUFA-Biosyntheseweges könnte eine unter Umständen effizientere Synthese und höhere Akkumulation von VLCPUFA im Samenöl zur Folge haben.

Zunächst sollten geeignete Kandidatengene identifiziert und isoliert werden, die in Mikroalgen für die enzymatischen Funktionen von LPCAT, DGAT und PDAT codieren. Im Anschluss daran sollte die Genfunktion durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* dargestellt werden. Durch detaillierte Lipidanalytik der mit den neuartigen Acyltransferasen transformierten Hefen sollte festgestellt werden, ob diese LCPUFA und VLCPUFA als Fettsäuresubstrate präferieren.

Parallel zu der funktionalen Charakterisierung in *S. cerevisiae* sollten verschiedene VLCPUFA-Biosynthesewege in *A. thaliana* etabliert werden, an denen die neu isolierten Kandidatengene beteiligt sind. Mit diesem Ansatz sollte überprüft werden, ob die neuartigen Acyltransferasen aus Mikroalgen zu einer Steigerung der Synthese und höheren Akkumulation von VLCPUFA im Samenöl beitragen.

2. Material und Methoden

Die molekular- und mikrobiologischen Methoden sind, soweit nicht anders erwähnt, aus *Current Protocols In Molecular Biology* (Ausubel et al., 1993) entnommen. Für die im Folgenden beschriebenen Materialien und Methoden wurden hitzesterilisierte Glasgeräte (6 h bei 180 °C) und autoklavierte Plastikmaterialien (20 min bei 120 °C) benutzt. Es wurde tridestilliertes Wasser (A. dest.) verwendet.

2.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien

Tab. 2 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	Bezugsquelle
Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Complete, EDTA-free; Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Complete Supplement Mixture	MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich)
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Warrington, Großbritannien)
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Hybond-P PVDF Membrane	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Nucleospin® Plasmid	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Nourseothricin (clonNat)	WERNER BioAgents (Jena, Deutschland)
<i>Pfu</i> Ultra™ High-Fidelity DNA-Polymerase	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
Phusion™ DNA-Polymerase	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) New England Biolabs (Ipswich, Großbritannien)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
TaKaRa <i>Ex Taq</i> ™ DNA Polymerase	Cambrex BioScience (Potsdam, Deutschland)
<i>Tfl</i> -Polymerase™	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
YNB with ammoniom sulfate	MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Baker (Griesheim, Deutschland), Cayman, (Lörrach, Deutschland), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Larodan (Malmö, Schweden), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe,

Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

2.2 Geräte und Materialien

Tab. 3 Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller
Automatic TLC Sampler (ATS 4)	CAMAG (Berlin, Deutschland)
Chromatogram Immersion Device III	CAMAG (Berlin, Deutschland)
Electroporator 2510	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Horizontal-Entwicklungskammer	CAMAG (Berlin, Deutschland)
IDA Gel-Detektionssystem	Raytest (Straubenhardt, Deutschland)
Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Netzgerät Consort E835	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
Phospho- und Fluoreszenz-Imager Fuji <i>FLA-3000</i>	Raytest (Straubenhardt, Deutschland)
Schwingmühle MM 200	Retsch GmbH (Haan, Deutschland)
TGradient Thermal Cycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
TLC/HPTLC-Sprayer	CAMAG (Berlin, Deutschland)
TLC Plate Heater	CAMAG (Berlin, Deutschland)
TLC Spray Cabinet	CAMAG (Berlin, Deutschland)
Photometer Ultrospec 1100 pro	Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Optima™ L-80 K Ultracentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)

2.3 Software

Zur Analyse von DNA-Sequenzen und Proteinen wurden die in Tab. 4 aufgeführten Programme genutzt.

Tab. 4 Verwendete Software zur Analyse von DNA-Sequenzen und Proteinen.

Programm	Bezugsquelle	Referenz
BOXSHADE 3.21	www.ch.embnet.org	-
Graphical Codon Usage Analyser 2.0	gcu.schoedl.de/	Fuhrmann et al., 2004
ProtScale	www.expasy.ch/tools/protscale.html	Gasteiger et al., 2005
TMHMM	www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Sonnhammer et al., 1998; Krogh et al., 2001
WoLF PSORT	wolfsort.org	Horton et al., 2007
VecorNTI® Suite v10.0	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	-

2.4 Phylogenetische Analysen

Die Analyse der Aminosäuresequenzen (*multiple sequence alignments*) wurde mit der Software AlignX (VecorNTI[®] Suite v10.0; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. AlignX verwendet den ClustalW-Algorithmus (Thompson et al., 1994). Mit den erzeugten Alignments wurden die phylogenetischen Beziehungen untersucht. Dazu wurden Programme des Software-Pakets PHYLIP (Felsenstein, 1989) eingesetzt: PROTDIST in Kombination mit FITCH als *neighbor-joining* Methode, PROML als *maximum likelihood* Methode. Die verwendeten Parameter waren: Jones-Taylor-Thornton-Model, *global rearrangements*, zufällige Reihenfolge der Sequenzeingabe. Die *bootstrap*-Werte wurden mit SEQBOOT und CONDENSE berechnet. Die Darstellung des Phylogramms wurde mit der Software TreeIllustrator berechnet (Trooskens et al., 2005).

2.5 Vektoren

In dieser Arbeit wurden folgende Klonierungs- und Expressionsvektoren verwendet:

Tab. 5 Klonierungsvektoren für *E. coli*

Vektor	Selektionsmarker	Bezugsquelle
pGEM [®] -T-Vektor	Amp ^R	Promega (Mannheim, Deutschland)
pJET1.2	Amp ^R	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)
pUC57	Amp ^R	GenScript Corp. (Piscataway, NJ, USA)
pUC19-USP-OCS123	Amp ^R	Dr. M. Fulda, Abt. Biochemie der Pflanze, Georg-August-Universität Göttingen

Der pUC19-USP-OCS123-Vektor (modifiziert nach Abbadi et al., 2004) diente zur Subklonierung von cDNA-Fragmenten, die in den Expressionsvektor für Pflanzen kloniert wurden. Dieser Vektor enthält drei verschiedene Insertionsstellen für cDNA-Fragmente (*multiple cloning sites*, mcs) zwischen jeweils einem USP-Promotor (Bäumlein et al., 1991) und einem OCS-Terminator (MacDonald et al., 1991).

Tab. 6 Expressionsvektoren für *S. cerevisiae*

Vektor	Selektionsmarker	Bezugsquelle
pESC-URA	Amp ^R , URA3	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
pESC-LEU	Amp ^R , LEU2	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
pYES2/CT	Amp ^R , URA3	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

Tab. 7 Transformationsvektoren für Pflanzen

Vektor	Selektionsmarker	Bezugsquelle
pCAMBIA2300	Kan ^R (Bakterien) <i>nptII</i> (Pflanzen)	Dr. M. Fulda, Abt. Biochemie der Pflanze, Georg-August-Universität Göttingen (modifiziert nach Abbadi et al., 2004)
pCAMBIA3300	Kan ^R (Bakterien) Glufosinat (<i>bar</i> -Gen; Pflanzen)	Dr. M. Fulda, Abt. Biochemie der Pflanze, Georg-August-Universität Göttingen (modifiziert nach Abbadi et al., 2004)

2.6 Antikörper

Es wurden die folgenden Antikörper verwendet:

Tab. 8 Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper (Bezugsquelle)	Sekundärer Antikörper (Bezugsquelle)
Anti V5 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	Anti-Maus-IgG-HRP (zur Verfügung gestellt von Dr. Danuta Kaczmarzyk, Abt. Biochemie der Pflanze, Georg-August-Universität, Göttingen)

2.7 Organismen

2.7.1 Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme sind im Folgenden aufgeführt:

Tab. 9 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz / Hersteller
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F^c proAB, lacq, lacZΔM15, Tn10 (Tet^R)]</i>	Klonierung	(Bullock et al., 1987); Stratagene, Heidelberg, Deutschland)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105	pTiBo542ΔT-DNA Rif	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	(Hood et al., 1993)

2.7.2 Hefen

Die in dieser Arbeit verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme und Gen-Deletionsmutanten sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10 Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Reference
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
BY4741 <i>ale1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ale1-Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 <i>lro1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lro1-Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lro1-Δ::kanMX4 dga1-Δ::natMX4</i>	diese Arbeit
BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ tes1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lro1-Δ::kanMX4 dga1-Δ::natMX4 tes1-Δ::hphMX4</i>	diese Arbeit
BY4741 <i>slc1Δ</i>	<i>Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; slc1-Δ::kanMX4</i>	diese Arbeit
W303	<i>MATa; ADE2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3 trp1-1 ura3-1</i>	Sten Stymne (Scandinavian Biotechnology Research, Alnarp, Sweden)
W303 H1246	<i>MATa ADE2-1 can1-100 ura3-1 are1-Δ::HIS3 are2-Δ::LEU2 dga1-Δ::KanMX4 lro1-Δ::TRP1</i>	Sten Stymne (Scandinavian Biotechnology Research, Alnarp, Sweden)

2.7.3 Pflanzen

A. thaliana L var. Columbia (Col-0)

2.7.4 Algen

O. tauri, Stamm OTTH0595-Genome (Roscoff Culture Collection (RCC), Roscoff, Frankreich)

Ostreococcus lucimarinus, Stamm CCE9901 (Provasoli-Guillard Culture Collection of Marine Phytoplankton (CCMP), Acc.-Nr. CCMP2514, West Boothbay Harbor, Maine, USA)

2.8 Kultivierung der Organismen

2.8.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm von *Escherichia coli* wurde auf festem oder in flüssigem Vollmedium (LB-Medium, SOC-Medium) bei 37 °C angezogen. Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (200 rpm) belüftet. Antibiotika wurden dem Medium, wie in Tab. 11 beschrieben, steril zugesetzt. Die Antibiotika wurden als tausendfache Stammlösungen gelöst und bei -20 °C gelagert.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

(Sambrook et al., 1989)

- 1 % (w/v) Trypton
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
- 1 % (w/v) NaCl

SOC-Medium

(Hanahan, 1983)

- 2 % (w/v) Trypton
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
- 5 mM NaCl
- 5 mM KCl

Direkt vor Gebrauch wurde als autoklavierte Lösung hinzugegeben:

- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM Glukose

Für die Herstellung von Festmedium wurden 2 % Micro Agar (w/v) dem Flüssigmedium hinzugefügt. Das fertig angesetzte Medium wurde für 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Bei Klonierungen in den Vektor pGEM[®]-T-Vektor wurde den Selektionsplatten IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) und X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid) zugesetzt (Blau-Weiß-Selektion). Mithilfe der Blau-Weiß-Selektion können Klone aufgrund ihrer Färbung sehr einfach charakterisiert werden.

IPTG Stammlösung: 100 mM IPTG in A. dest., bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert
Endkonzentration: 200 μM

X-Gal: Stammlösung: 2 % (w/v) X-Gal in *N,N*-Dimethylformamid, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert
Endkonzentration: 80 $\mu\text{g/ml}$

2.8.2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm von *A. tumefaciens* wurde auf festem oder in flüssigem Vollmedium (LB-Medium) bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen. Die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (180 rpm) belüftet. Antibiotika wurden dem Medium, wie in Tab. 11 beschrieben, steril zugesetzt. Die Antibiotika wurden als tausendfache Stammlösungen gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tab. 11 Antibiotika zur Selektion von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin	100 mg/ml in A. dest.	100 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	50 mg/ml in A. dest.	25 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO	50 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol	10 $\mu\text{g/ml}$

2.8.3 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung der Hefe *S. cerevisiae* erfolgte auf festem oder in flüssigem Vollmedium (YPD-Medium) oder in einem Minimalmedium (*Synthetic Defined Media*, SD-Medium) mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Flüssigkulturen wurden durch Schütteln (210 rpm) belüftet.

Zur Selektion plasmidhaltiger Hefen wurde das SD-Medium eingesetzt, das die erforderlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen bereitstellte. Durch Zugabe eines Gemisches essenzieller Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen (*dropout base*, DOB), dem jeweils die Komponente nicht zugesetzt wurde, auf deren Synthese durch den verwendeten Auxotrophie-Marker selektiert werden sollte, wurde die Zusammensetzung des Mediums entsprechend angepasst.

YPD-Medium

1 % (w/v) Hefeextrakt

2 % (w/v) Pepton

Direkt vor Gebrauch wurde als autoklavierte Lösung hinzugegeben:

2 % (w/v) Glukose

SD-Medium

0,67 % (w/v) CSM (*Complete Supplement Mixture*)

Direkt vor Gebrauch wurden als autoklavierte oder sterilfiltrierte Lösungen hinzugegeben:

1 % (w/v) YNB (*yeast nitrogen base with ammonium sulfate*)

2 % (w/v) Glukose (Festmedium) oder Raffinose (Flüssigmedium)

Expressionskulturen enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Galaktose (sterilfiltriert).

Complete Supplement Mixture (CSM)

10 mg/l Adenin (Hemisulfat)

50 mg/l L-Arginin-HCl

80 mg/l L-Aspartat

20 mg/l L-Histidin-HCl

50 mg/l L-Isoleucin-HCl

100 mg/l L-Leucin

50 mg/l L-Lysin-HCl

20 mg/l L-Methionin

50 mg/l L-Phenylalanin

100 mg/l L-Threonin

50 mg/l L-Tryptophan

50 mg/l L-Tyrosin

20 mg/l Uracil

140 mg/l L-Valin

Antibiotika wurden den Medien, wie in Tab. 12 beschrieben, steril zugesetzt. Die Antibiotika wurden als tausendfache Stammlösungen in A. dest. gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tab. 12 Antibiotika zur Selektion von *S. cerevisiae*

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Hygromycin B	300 mg/ml	300 µg/ml
Nourseothricin (clonNat)	100 mg/ml	100 µg/ml

Die Festmedien enthielten zusätzlich 2 % (w/v) Micro Agar, das vor dem Autoklavieren (20 min bei 120 °C) dem Flüssigmedium hinzugegeben wurde.

2.8.4 Kultivierung von *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri* und *Ostreococcus lucimarinus*

Die Kultivierung von Algen erfolgte in Brackwassermedium bei 20 °C.

Brackwassermedium

2 mM KNO₃
0,1 mM KH₂PO₄
0,17 mM MgSO₄·4 H₂O
5 ml Spurenelementelösung
30 ml Erdextrakt
455 ml gefiltertes Seewasser
450 ml A. dest.

Direkt vor Gebrauch wurde als autoklavierte Lösung hinzugegeben:

5 µg/l Vitamin B₁₂

Die Spurenelementelösungen (siehe Tab. 13) wurden zunächst getrennt angesetzt und autoklaviert (20 min bei 120 °C). Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml der Spurenelementelösung II zu der Spurenelementelösung I hinzugegeben.

Der Erdextrakt wurde durch dreimaliges Autoklavieren (20 min bei 120 °C) eines Vorgartenerde-Wasser-Gemisches hergestellt. Feste Bestandteile wurden durch Filtration abgetrennt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Tab. 13 Zusammensetzung der Spurenelementlösungen

Spurenelementlösung I	Stammlösung	Volumen für 1l Brackwassermedium
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	1 g/l	1 ml
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	1 g/l	2 ml
H ₃ BO ₃	2 g/l	5 ml
Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	0,2 g/l	5 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,2 g/l	5 ml
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,005 g/l	1 ml
A. dest.		881ml
Spurenelementlösung II	Stammlösung	Volumen für 1l Brackwassermedium
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	7 g/l	100 ml
EDTA	8 g/l	

2.8.5 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

2.8.5.1 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Saatgut

Die Anzucht von *A. thaliana* auf MS-Selektionsmedium erfolgte mit oberflächensterilisiertem Saatgut. Hierfür wurden 10 – 80 mg Saatgut mit 1 ml 70 % Ethanol (v/v) für 5 min langsam geschwenkt. Nach dem Absinken der Samen wurde das Ethanol abgenommen und die Samen in einer 1 % NaOCl-Lösung (w/v) mit 0,1 % Triton X-100 (v/v) für 20 min schwenkend inkubiert. Anschließend wurde der Samen sechsmal in sterilem A. dest. gewaschen. Das Saatgut wurde nun in 0,1 % Agar (w/v) aufgenommen und bei 4 °C inkubiert (2 d). Dieses Vorgehen dient dem Brechen der Dormanz und wirkt sich positiv auf eine gleichmäßige Keimung der Samen aus.

2.8.5.2 Kultivierung auf MS-Medium

Zur sterilen Anzucht auf MS-Medium wurde stratifiziertes, oberflächensterilisiertes Saatgut (siehe 2.8.5.1) ausgelegt. Die Inkubation erfolgte bei 23 °C und konstanter Lichtmenge von 120 µE unter Dauerlicht. Zur Selektion transgener *A. thaliana* wurde dem MS-Medium Kanamycin (50 g/ml) zugefügt. 4,3 g/l (1x MS) bzw. 2,2 g/l (1/2x MS) MS-Mischung (Duchefa, Haarlem, Niederlande) und 7 g/l Mikroagar wurden mit destilliertem Wasser und 1 % Saccharose (w/v) hinzugefügt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 5,9 eingestellt.

2.8.5.3 Kultivierung auf Erde

Für die Anzucht von *A. thaliana* in Phytokammern wurde entweder unsteriles Saatgut direkt auf Erde ausgelegt oder etablierte Keimlinge von MS-Platten auf Erde (Frühstorfer Erde[®] Typ: EP Nr. 340, Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod, Deutschland) umgesetzt. Vor Gebrauch wurde die Erde bei 180 °C für 4 h inkubiert, was die Keimzahl reduzierte. Die Pflanzen wurden bei 60 % Feuchte und 22 °C in Phytokammern mit einer Lichtperiode von 16 h (120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Licht) und einer Dunkelperiode von 8 h angezogen.

Das Herbizid Glufosinat (basta[®]) wurde zur Selektion transgener Pflanzen eingesetzt. Dazu wurde unsteriles Saatgut auf Erde ausgebracht und für 10 – 14 Tage unter den o.a. Bedingungen angezogen. Danach wurden die Keimlinge im Abstand von sieben Tagen mit Glufosinat behandelt. Sieben Tage nach der zweiten Glufosinat-Behandlung wurden resistente Keimlinge vereinzelt und bis zur vollständigen Samenreife kultiviert.

2.9 Transformation von *E. coli*

2.9.1 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen zur Elektroporation

Für die Präparation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurde ein Ausstrich des Bakterienstamms auf einer LB-Selektionsplatte angelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von einer Einzelkolonie wurde eine 25 ml Vorkultur (LB-Medium und Antibiotika) angesetzt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Die 250 ml enthaltende Hauptkultur wurde mit der Vorkultur beimpft und unter gleichen Bedingungen bis zur *mid log*-Phase (OD₆₀₀ von 0,8 – 1,0) inkubiert. Die Zellen wurden in einer Sorvall[®] RC-5B-Kühlzentrifuge mit GS-3-Rotor (DuPont, Bad Homburg) bei 4 °C 10 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Mit gekühlten Puffern (4 °C) wurden die Zellen mehrfach gewaschen und jeweils in folgenden Volumina resuspendiert: 1x 1 Vol. 10 % Glycerol in A. dest., 1x ½ Vol. 10 % Glycerol in A. dest. und 1x 1/20 Vol. 10 % Glycerol in A. dest. Das Zellsediment wurde in 1/500 bis 1/1000 des ursprünglichen Kulturvolumens aufgenommen. Die Zellen wurden aliquotiert (45 μl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –85 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.9.2 Transformation

Für die Transformation von *E. coli* wurden 45 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und unter sterilen Bedingungen mit bis zu 5 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.16.1) oder Plasmid-DNA (siehe 2.14.4) vermischt. Dieser Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (Biozym Hess, Oldendorf, Deutschland) überführt, mit einem Deckel verschlossen, in das Elektrotransformationsgerät (Electroporator 2510; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gesteckt und mit einem Strompuls von 1,9 kV versetzt. Die Pulsdauer lag zwischen 3,0 und 4,5 ms. Unmittelbar nach dem Strompuls wurden die Zellen in 950 µl SOC-Medium (4 °C) aufgenommen, in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß oder ein PPN-Röhrchen überführt und 60 – 90 min bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Zwischen 75 µl und 500 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Selektionsplatten (siehe 2.8.1) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien einer Transformation wurden mittels Kolonie-PCR (siehe 2.15.1) oder mittels eines analytischen Restriktionsverdaus (siehe 2.16.1) untersucht.

2.10 Transformation von *A. tumefaciens*

2.10.1 Präparation chemisch-kompetenter *A. tumefaciens* (Höfgen und Willmitzer, 1988)

Zur Präparation chemisch-kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurden 5 ml LB-Selektionsmedium mit einigen Bakterienzellen inokuliert und über Nacht bei 28 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden in 50 ml LB-Selektionsmedium überführt. Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen für weitere 5 h bei 28 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert (10 min, 2300 g). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden zweimal in 10 ml 150 mM NaCl gewaschen (10 min, 2.300 g, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment wurde in 75 mM CaCl₂ (4 °C) resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert (200 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –85 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.10.2 Transformation

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen in der Hand aufgetaut und mit 5 µl Plasmid-DNA (siehe 2.14.4) gemischt. Der Ansatz wurde nun für 5 – 10 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nachdem die Zellen bei RT wieder aufgetaut waren, wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und das Gemisch für 4 h oder über Nacht bei 28 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.11 Transformation von *S. cerevisiae*

(modifiziert nach Ito et al., 1983)

2.11.1 Präparation chemisch-kompetenter *S. cerevisiae*

Von einer 5 ml Übernachtskultur in YPD wurden 20 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft und für etwa 4 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,2 bei 30 °C schüttelnd (210 rpm) inkubiert. Jeweils 10 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation (3 min, 1800 g, 1 min, RT) geerntet und die Überstände verworfen. Anschließend wurden die Zellen zweimal in sterilem A. dest. gewaschen und in jeweils 400 µl 0,1 M LiAc-TE-Lösung aufgenommen.

10 x TE-Puffer

100 mM Tris/HCl
10 mM EDTA pH 8.0

LiAc-TE-Lösung

10 % (v/v) 10 x TE-Puffer
0,1 M LiAc

2.11.2 Transformation

200 µl der chemisch-kompetenten Hefezellen wurden mit 2 bis 5 µl Plasmid-DNA und 800 µl LiAc-PEG-Mix vermischt. Der Transformationsansatz wurde kräftig geschüttelt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 25 min. Im abschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Zellen bei 4500 g für 60 s sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 250 µl SD-Medium aufgenommen und auf SD- oder YPD-Selektionsplatten ausplattiert und bei 30 °C für 3 bis 4 Tage inkubiert.

LiAc-PEG-Mix

4 ml 50 % (w/v) PEG 4000

0,5 ml 1 M LiAc

0,5 ml 10 x TE-Puffer

2.12 Transformation von *A. thaliana*

(Clough und Bent, 1998)

Für eine Transformation wurden jeweils etwa 40 – 50 *A. thaliana*-Pflanzen (Col-0) verwendet, die auf Erde für etwa 28 Tage angezogen (siehe 2.8.5.3) wurden. Bei der *Floral-Dip*-Transformationsmethode werden mit Hilfe von *A. tumefaciens* Gene, die auf einem binären Vektor codiert sind, in Pflanzenzellen übertragen. Die sogenannte Transfer-DNA, die einen Teil des Vektors darstellt, wird in den Zellkern einer Pflanzenzelle übertragen und an einer zufälligen Stelle des Chromosoms integriert. Hierfür wurde eine Kolonie eines transformierten Agrobakteriums (siehe 2.10) über Nacht in 5 ml LB-Selektionsmedium bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 400 ml LB-Selektionsmedium inokuliert über Nacht bei 28 °C schüttelnd (220 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (15 min, 1500 g, 4 °C).

Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 ml 5 % Saccharose (w/v) aufgenommen. Unmittelbar vor der *A. thaliana*-Transformation wurden zu der Agrobakterien-Suspension 35 µl Silwet L-77 (Endkonzentration 0,05 % (v/v); OSI Specalties, Danbury, CT, USA) gegeben. Nun wurden die Blütenstände der zu transformierenden *A. thaliana*-Pflanzen für 5 – 8 s unter leichtem Schwenken in die Agrobakterien-Suspension getaucht. Anschließend wurden die infiltrierten Pflanzen in eine Pflanzschale gestellt und mit einer Plastikhaube bedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Die Hauben wurden nach 24 h entfernt und die Pflanzen bis zur Entwicklung reifer Schoten 4 bis 6 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. Die Selektion erfolgreich transformierter Pflanzen ist in Abschnitt 2.8.5 beschrieben.

2.13 Herstellen von *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten

(Guldener et al., 1996; Goldstein und McCusker, 1999)

Für das Herstellen von *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten wurden Deletionskassetten verwendet, die entweder aus dem Nourseothricin-Acetyltransferasegen (*nat1*, *Streptomyces noursei*) oder dem Hygromycin B-Phosphotransferasegen (*hph*, *Streptomyces hygroscopicus*) bestanden. Hierbei wird die Expression des Resistenzvermittelnden Gens von der TEF-Promotor- und der TEF-Terminator-Sequenz aus *Ashbya gossypii* kontrolliert. Diese Expressionseinheit wird von zwei LoxP-Sequenzen flankiert (loxP-natMX4-loxP bzw. loxP-hphMX4-loxP) und befindet sich auf einem pUG-Vektor.

Zur Gendeletion wurde mittels präparativer PCR-Reaktion (siehe 2.15) ein PCR-Fragment hergestellt, das sich aus der loxP-natMX4-loxP-Sequenz bzw. loxP-hphMX4-loxP-Sequenz, flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des zu entfernenden Gens, zusammensetzte. Durch homologe Rekombinationsereignisse stromabwärts und stromaufwärts des offenen Leserahmens des zu deletierenden Gens wurde dieses PCR-Fragment in das Hefegenom integriert. Der gesamte Leserahmen des zu deletierenden Gens wurde somit ersetzt. Für die Transformation in Zellen von *S. cerevisiae* (siehe 2.11) wurde der 100 µl umfassende PCR-Ansatz aufgereinigt (siehe 2.16.3) und vollständig eingesetzt. Die Transformation der linearen DNA-Fragmente erfolgte wie in 2.11 beschrieben. Abweichend zu der in 2.11 beschriebenen Vorgehensweise wurden zusätzlich 20 µl Heringssperma-DNA (direkt vor Gebrauch für 5 min bei 65 °C inkubiert) mit dem zu transformierenden, linearen DNA-Fragment vermischt.

Der Ansatz wurde dann zusammen mit 800 µl LiAc-PEG-Mix zu den chemisch-kompetenten Zellen gegeben. Des Weiteren erfolgte nach dem Hitzeschock eine zwei bis dreistündige Inkubation der Zellen in 1 ml YPD bei 30 °C. Die Isolierung erfolgreich transformierter Zellen erfolgte durch Wachstum auf YPD-Selektionsplatten mit Antibiotika (siehe 2.8.3). Von den resistenten Transformanten wurde genomische DNA isoliert (siehe 2.14.2) und die Gen-Deletion mittels PCR verifiziert (siehe 2.15). Für die Genotypisierung der Hefe-Deletionsmutanten wurden mindestens zwei voneinander unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt. Hierfür wurden sowohl die Deletionskassetten flankierende Primer, interne Primer als auch genspezifische Primer verwendet. Dadurch konnten nur bei erfolgreicher Deletion spezifische PCR-Produkte der erwarteten Größe entstehen.

2.14 Präparation von DNA

2.14.1 Präparation von genomischer DNA aus Algen und Pflanzen

Für die Präparation von genomischer DNA aus Algen und Pflanzen wurde das Gene Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verwendet. Sämtliche im Handbuch als optional aufgeführten Schritte wurden ebenfalls durchgeführt. Die Lagerung der isolierten genomischen DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.14.2 Präparation von genomischer DNA aus Hefen

Für die Präparation von genomischer DNA aus Hefen wurde das Master Pure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Im Unterschied zur Anleitung des Herstellers erfolgte die Aufnahme der DNA in A. dest. anstelle des empfohlenen Puffers. Die Lagerung der isolierten genomischen DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.14.3 Präparation von RNA aus *O. tauri*

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus *O. tauri* wurde bis zu 200 mg Algenmaterial eingesetzt. Das Algenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff unter Zugabe von 1 ml Trizol gemörsert bis ein feines Homogenat entstand. Das Homogenat wurde in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es für 10 min bei 20000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit 200 μl Chloroform versetzt und für 30 s kräftig geschüttelt.

Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 3 min. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 20000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde die wässrige Oberphase abgenommen und mit $\frac{1}{2}$ Vol. Isopropanol und $\frac{1}{2}$ Vol. *High Salt Precipitation Buffer* versetzt und durch Invertieren gemischt. Nachdem der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, folgte eine erneute Zentrifugation (15 min, 20000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde zweimal mit 900 μl 75 % Ethanol (v/v) gewaschen (5 min 16000 g $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der RNA-haltige Niederschlag wurde in A. dest. aufgenommen.

Trizol

3,8 ml	Roti-Phenol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
2 ml	4 M Guanidiniumthiocyanat
1 ml	4 M Ammoniumthiocyanat
334 µl	3 M Natriumacetat (pH 5,0)
500 µl	Glycerol
ad 10 ml	A. dest.

High Salt Precipitation Buffer

800 mM	Natriumcitrat
1,2 M	NaCl

2.14.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium mit Antibiotika (siehe Tab. 11) und einigen Zellen der betreffenden Bakterienkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) kultiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA entsprechend des Handbuches des Nucleospin™ Plasmid Kit isoliert. Sämtliche im Handbuch als optional aufgeführten Schritte wurden ebenfalls durchgeführt. Im Unterschied zur Anleitung des Herstellers erfolgte die Elution mit A. dest. anstelle des empfohlenen Puffers. Die Lagerung der isolierten Plasmide erfolgte bei –20 °C.

2.15 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ermöglicht die selektive Anreicherung eines DNA-Fragments. Ein PCR-Reaktionsansatz enthält neben der zu amplifizierenden DNA, eine thermostabile DNA-Polymerase, die vier Desoxy-nukleotide (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) und zwei sequenzspezifische Oligo-nukleotide (Primer). Eine PCR verläuft zyklisch in drei Schritten bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen (siehe Tab. 14).

In dieser Arbeit wurden die *PfuUltra*[™] High-Fidelity DNA-Polymerase, die *Tfl*-DNA-Polymerase[™] und die TaKaRa *Ex Taq*[™] DNA Polymerase nach Anweisung der Hersteller verwendet, wobei eine PCR für analytische Zwecke in 25 µl und für präparative Zwecke in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt wurden.

Für eine PCR werden zwei sequenzspezifische Primer eingesetzt, die mit der komplementären DNA-Sequenz hybridisieren und so den Startpunkt der DNA-Synthese bilden. An das freie 3'-Hydroxyl-Ende des Primers addiert die DNA-Polymerase Desoxyribonukleotide entsprechend der Vorgabe durch die Matrizen-DNA. Durch die Sequenzhomologie der Primer lassen sich Anfang und Ende des amplifizierten DNA-Stranges exakt definieren.

Die Schmelztemperatur T_m (°C) der Primer wurde nach (Suggs et al., 1981) berechnet:

$$T_m[°C] = 2 \times (\text{Summe der A} + \text{T}) + 4 \times (\text{Summe der G} + \text{C})$$

Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland und Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sind im Anhang aufgeführt.

Tab. 14 Standard-Temperaturprofil einer PCR-Reaktion

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	2 bis 10 min	94 °C
2. <i>hot start</i>	Halten	80 °C
3. Denaturierung	30 s	94 °C
4. Annealing	30 s	$T_m - 5$ °C
5. Elongation	1 min pro kb	72 °C
	Die Schritte 2. – 4. wurden 25 – 35 x wiederholt	
6. Elongation	5 bis 10 min	72 °C
7. Abschluss	Halten	4 °C

2.15.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Analyse von transformierten *E. coli*-Zellen verwendet. Hierzu wurden einzelne Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in 10 µl A. dest. überführt und in einer PCR als *Template* verwendet. Zusätzlich wurde auf einer Selektionsplatte ein Ausstrich der Bakterienkolonien angelegt und dieser über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht (siehe 2.16.2). Wurde ein DNA-Fragment der erwarteten Größe identifiziert, wurde aus der entsprechenden Kolonie des Ausstrichs die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.2).

2.15.2 DNA-Sequenzanalyse

(modifiziert nach Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung wurde in einem ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Rodgau, Deutschland) mittels einer nicht-radioaktiven Methode durchgeführt. Der Reaktionsansatz der verwendeten *Cycle-Sequencing*-Methode enthält hierbei neben den vier Desoxynukleotiden zusätzlich deren 2',3'-Dideoxynanaloga, die basenspezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Die Dideoxynanaloga führen bei einer DNA-Polymerase-Reaktion zum Kettenabbruch, da sie aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe keine Phosphodiesterbindung ausbilden können. Die so erhaltenen Abbruchfragmente mit ihren basenspezifisch fluoreszierenden Enden ermöglichen die Feststellung der Basenabfolge einer DNA-Sequenz.

Die Reaktion wurde mit dem Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit 2 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 50 µl 96 % Ethanol (v/v) vermischt und für 15 min bei RT inkubiert, um die DNA zu fällen. Danach wurden die DNA-Fragmente durch Zentrifugation (15 min, 16000 g, 4 °C) sedimentiert und der Überstand anschließend möglichst vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 70 µl 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min 16000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 2 min bei 90 °C getrocknet und anschließend in 15 µl deionisiertem Formamid aufgenommen und zur Sequenzierung bereitgestellt.

Reaktionsansatz

150-300 ng Plasmid-DNA

2,5 µl Ready Reaction Mix

2,0 µl 5 x Sequencing Buffer

1,0 µl Primer (10 mM)

ad 10 µl A. dest.

Tab. 15 Temperaturprofil der Sequenzierung

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	1 min	96 °C
2. Denaturierung	10 s	96 °C
3. Annealing	15 s	55 °C
4. Elongation	4 min	60 °C
Die Schritte 2. – 4. wurden 25 x wiederholt		
5. Abschluss	Halten	4 °C

2.15.3 cDNA-Synthese und Reverse Transkriptions-PCR

Für die cDNA-Synthese und Reverse Transkriptions-PCR wurde die SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.16 Klonierungsmethoden

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese zunächst über ein präparatives Agarosegel gereinigt (siehe 2.16.3) und danach in den Klonierungsvektor pGEM®-T-Vektor oder pJET1.2 ligiert (siehe Tab. 5). Nach Identifikation positiver Klone (siehe 2.15.1 oder 2.16.1) erfolgte stets eine DNA-Sequenzanalyse (siehe 2.15.2). Für die Klonierung in die Hefe-Expressionsvektoren wurden die DNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen aus dem Klonierungsvektor geschnitten, deren Schnittstellen zuvor über die Primer-Sequenz angefügt worden waren (siehe Anhang). Die Fragmente konnten dann in den mit den gleichen Enzymen restringierten Vektor ligiert werden.

2.16.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die palindrome DNA-Sequenzen erkennen und an diesen Stellen den DNA-Strang schneiden und so Fragmente erzeugen. Die Restriktion von DNA erfolgte für 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei 37 °C. Das Ergebnis der Restriktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.16.2) und die erhaltenen Fragmente über präparative Agarosegele aufgereinigt (siehe 2.16.3).

Der Verdau mit Restriktionsenzymen diente auch der Charakterisierung von Klonen, die nach einer Transformation von *E. coli* auf den LB-Selektionsplatten gewachsen waren. Im Allgemeinen wurden präparative Restriktionsverdau in 50 µl und analytische Restriktionsverdau in 20 µl Restriktionsvolumen durchgeführt.

2.16.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die aufzutrennenden PCR-Produkte und DNA-Restriktionsansätze wurden in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgrößen 0,7 – 1 %-ige Agarosegele (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch kurzes Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst und anschließend in die Gelträger gegossen. Die aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden vor dem Einfüllen in die Geltaschen mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Zusätzlich wurden 3 µl eines Größenstandards mit DNA-Fragmenten definierter Größe in einer separaten Geltasche mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Kammer bei einer Spannung von 95 – 115 V in 1x TAE als Laufpuffer.

Für die Auswertung wurden die Gele nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (10 µg/ml in 1xTAE). Durch UV-Licht konnten nun die DNA-Fragmente im Geldetektionssystem AIDA (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) visualisiert und dokumentiert werden.

TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl, pH 7,0
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA pH 8,0

DNA-Probenpuffer

100 mM EDTA
0,1 % (w/v) SDS
40 % (w/v) Glycerol
0,025 % (w/v) Bromphenolblau
0,025 % (w/v) Xylencyanolblau

2.16.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung eines PCR-Produkts oder eines Restriktionsverdaus wurden diese über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit dem NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers aus dem Gel eluiert. Abweichend zur Empfehlung des Herstellers erfolgte die Elution mit 25 – 35 µl A. dest. anstelle des im Handbuch aufgeführten Elutionspuffers. Die Lagerung der aufgereinigten DNA erfolgte bei –20 °C.

2.16.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Religation von linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen der restringierten Vektor-DNA enzymatisch abgespalten. Hierfür wurde die *Antarctic Alkaline Phosphatase* (New England Biolabs, Ipswich, Großbritannien) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.16.5 Generierung von *blunt-end*-Fragmenten

Zum Glätten der Enden (*blunt-end*) von restringierter DNA wurde die T4 DNA Polymerase (Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.16.6 Ligation

Über Ligation können DNA-Fragmente in einen Vektor integriert werden. Die Verknüpfung von Vektor-DNA mit Donor-DNA erfolgte durch die T4-DNA-Ligase, wobei die Ligase die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und 5'-Phosphatgruppe zweier DNA-Stränge katalysiert. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Für eine Transformation von *E. coli* wurden 2 bis 4 µl eines Ligationsansatzes verwendet (siehe 2.9.2).

Ligationsansatz

3-5 µl	Donor-DNA
1 µl	Vektor-DNA
1 µl	T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
2 µl	10 x Ligationspuffer
ad 20 µl	A. dest.

Die bei einer Ligation mit dem pGEM[®]-T-Vektor eingesetzten PCR-Fragmente besitzen an beiden Enden einen 3'-A-Überhang (*sticky-ends*), die mit dem 3'-T-Überhang des pGEM[®]-T Vektors ligieren. Um PCR-Fragmente, die glatte Enden (*blunt-ends*) besitzen, mit dem pGEM[®]-T-Vektor ligieren zu können, wurde ein A-Tailing durchgeführt, das die notwendigen 3'-A-Überhänge erzeugte. Die Ligation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

A-Tailing

30-35 µl	PCR-Produkt
2 µl	20 x Tfl-Puffer
4 µl	MgCl ₂ (25mM)
1 µl	dATP (0,2 mM)
0,5 µl	Tfl-Polymerase (1 U/µl)

Der Ansatz wurde 30 min bei 71 °C inkubiert.

2.17 Erzeugung der verwendeten cDNA-Klone

2.17.1 Isolierung der LPAAT aus *M. squamata* und *P. patens*

Anhand der bekannten Sequenz der LPAAT aus *C. elegans* und *M. squamata* (Cirpus, 2006) wurde mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul et al., 1990) in der JGI-Datenbank (DOE The Joint Genome Institute; <http://genome.jgi-psf.org/>; Palenik et al., 2007) nach weiteren LPAAT-ähnlichen Sequenzen im Genom von *P. patens* gesucht. Die offenen Leserahmen der LPAAT-Sequenzen wurden mit der Phusion[™] DNA-Polymerase durch PCR mit cDNA als Matrize amplifiziert.

Zur Klonierung der Expressionskonstrukte wurden die codierenden Bereiche der cDNA-Klone zunächst über PCR modifiziert. Die hierbei verwendeten Primer enthielten Restriktionsschnittstellen, die an die jeweiligen 5'- und 3'-Enden des offenen Leserahmens angefügt wurden. Die verwendeten Primer enthielten ebenfalls die Basenfolge ACATA (Donahue und Cigan, 1990) zwischen der Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und dem Startcodon zur Erhöhung der Translationseffizienz im verwendeten Expressionswirt *S. cerevisiae*. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Zur Amplifikation wurde das folgende Temperaturprofil verwendet: 2 min bei 98 °C, *hot start*, 35 Zyklen von 30 s bei 98 °C, 30 s 67 °C ($\Delta T = -0,4$ °C pro Zyklus), 75 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C. Das erhaltene PCR-Produkt wurde elektrophoretisch über ein 1 %-iges Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Bande der entsprechenden Größe ausgeschnitten und mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract II Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt (siehe 2.16.3).

2.17.2 Isolierung der OILPCAT aus *O. lucimarinus*

Anhand der bekannten Sequenz der LPCAT *ALE1* (Riekhof et al., 2007a; Riekhof et al., 2007b) wurde mit Hilfe des Programms BLAST in der JGI-Datenbank (DOE The Joint Genome Institute; <http://genome.jgi-psf.org/>) nach weiteren LPCAT-Sequenzen im Genom von *O. lucimarinus* gesucht (Altschul et al., 1990; Palenik et al., 2007). Der offene Leserahmen der LPCAT-Sequenz wurde mit der Phusion™ DNA-Polymerase durch PCR mit genomischer *O. lucimarinus*-DNA als Matrize amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Zur Amplifikation wurde das folgende Temperaturprofil verwendet: 2 min bei 98 °C, *hot start*, 35 Zyklen von 30 s bei 98 °C, 30 s 67 °C ($\Delta T = -0,4$ °C pro Zyklus), 75 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C. Das erhaltene PCR-Produkt wurde elektrophoretisch über ein 1 %-iges Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Bande der entsprechenden Größe ausgeschnitten und mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract II Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt (siehe 2.16.3).

2.17.3 Isolierung der OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C aus *O. tauri*

Anhand der bekannten Sequenzen MrDGAT2A und MrDGAT2B aus *Mortierella ramanniana* (Lardizabal et al., 2001) wurde mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul et al., 1990) in der JGI-Datenbank (DOE The Joint Genome Institute; <http://genome.jgi-psf.org/>; Palenik et al., 2007) nach weiteren DGAT2-Sequenzen im Genom von *O. tauri* gesucht. Die mutmaßlichen DGAT2-Gene OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C wurden mit der PhusionTM DNA-Polymerase und *O. tauri*-cDNA als Matrize sowie den im Anhang aufgeführten Primern amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Zur Amplifikation wurde das folgende Temperaturprofil verwendet: 2 min bei 98 °C, 35 Zyklen von 30 s bei 98 °C, 30 s bei 66 °C ($\Delta T = -0,37$ °C pro Zyklus), 75 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C. Das erhaltene PCR-Produkt wurde elektrophoretisch über ein 1 %-iges Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Bande der entsprechenden Größe ausgeschnitten und mit Hilfe des „NucleoSpin[®] Extract II Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt (siehe 2.16.3).

2.17.4 Isolierung der OtPDAT aus *O. tauri*

Anhand der bekannten Sequenzen der PDAT At3g44830 und At5g13640 aus *A. thaliana* (Stahl et al., 2004) wurde mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul et al., 1990) in der JGI-Datenbank (DOE The Joint Genome Institute; <http://genome.jgi-psf.org/>; Palenik et al., 2007) nach weiteren PDAT-Sequenzen im Genom von *O. tauri* gesucht. Das mutmaßliche PDAT-Gen wurde aus zwei überlappenden Teilsequenzen (N-terminales Fragment und C-terminales Fragment) mit der PhusionTM DNA-Polymerase und *O. tauri*-cDNA als Matrize amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten ebenfalls die in Abschnitt 2.17.1 genannten Modifikationen und sind im Anhang aufgeführt.

Zur Amplifikation wurde das folgende Temperaturprofil verwendet: 8 min bei 98 °C, *hot start*, 2 min bei 98 °C, 20 Zyklen von 45 s bei 98 °C, 45 s bei 72 °C ($\Delta T = -0,25$ °C pro Zyklus), 90 s bei 72 °C, danach 20 Zyklen von 45 s bei 98 °C, 45 s bei 67 °C ($\Delta T = -0,7$ °C pro Zyklus), 90 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch über ein 1 %-iges Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Banden der entsprechenden Größen ausgeschnitten und mit Hilfe des „NucleoSpin[®] Extract II Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt (siehe 2.16.3). Nach Subklonierung in den pGEM[®]-T-Vektor (siehe 2.16.6) und Sequenzierung der Fragmente erfolgte die Fusion der beiden Fragmente zum vollständigen offenen Leserahmen. Zunächst wurde der pGEM[®]-T-Vektor mit dem C-terminalen Fragment mittels HindIII, BamHI-Restriktionsverdau linearisiert. Anschließend wurde das N-terminale Fragment mittels Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII, BamHI aus dem pGEM[®]-T-Vektor herausgeschnitten und mit dem im pGEM[®]-T-Vektor enthaltene C-terminale Fragment fusioniert. Die Sequenz des Fusionsprodukts wurde durch Sequenzierung (siehe 2.15.2) verifiziert.

2.18 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in *S. cerevisiae*

2.18.1 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von LPAAT aus Algen und Moosen in *S. cerevisiae*

Für die heterologe Expression wurde die cDNA-Sequenz der mutmaßlichen MsLPAAT (Cirpus, 2006) und PpLPAAT zunächst via PCR amplifiziert, aufgereinigt und in den pGEM[®]-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben ligiert (siehe 0 und 2.17.1). Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (siehe 2.9.2). Die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone wurde mit dem „NucleoSpin[™] Plasmid-Kit“ (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) isoliert (siehe 2.14.4) und mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein und korrekte Insertion des DNA-Fragments überprüft (siehe 2.16.1). Positive Klone wurden durch Sequenzierung mit dem „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1“ (Applied Biosystems, Foster, USA) und dem „ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser“ (Applied Biosystems, Foster, USA) verifiziert (siehe 2.15.2). Anschließend wurde die offenen Leserahmen der MsLPAAT und PpLPAAT mit Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstellen aus dem pGEM[®]-T-Vektor herausgeschnitten, in den linearisierten und dephosphorylierten Hefe-Expressionsvektor pESC-URA ligiert und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Von den resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1).

2.18.2 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von OILPCAT in *S. cerevisiae*

2.18.2.1 Native Gensequenz

Für die heterologe Expression wurde die cDNA-Sequenz der mutmaßlichen OILPCAT zunächst via PCR amplifiziert, aufgereinigt und in den pJet1.2-Vektor-Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben ligiert (siehe 0 und 2.17.2). Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (siehe 2.9.2). Die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone wurde mit dem „NucleoSpin™ Plasmid-Kit“ (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) isoliert (siehe 2.14.4) und mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein und korrekte Insertion des DNA-Fragments überprüft (siehe 2.16.1). Positive Klone wurden durch Sequenzierung mit dem „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1“ (Applied Biosystems, Foster, USA) und dem „ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser“ (Applied Biosystems, Foster, USA) verifiziert (siehe 2.15.2). Anschließend wurde der offene Leserahmen der OILPCAT mit Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstellen aus dem pJet1.2 (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) herausgeschnitten, in den linearisierten und dephosphorylierten Expressionsvektor pYES2/CT ligiert und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Von den resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1).

Die cDNA der OILPCAT wurde ebenfalls als eine C-terminal verkürzte Variante kloniert, der das Stop-Codon fehlte. Dies ermöglichte eine Fusion der OILPCAT-cDNA mit dem im Expressionsvektor pYES2/CT enthaltenen V₅-Epitop (siehe Tab. 6). Hierdurch sollte eine spätere Immundetektion des exprimierten Proteins ermöglicht werden.

Basierend auf dem Konstrukt pJet1.2-OILPCAT wurden die bereits beschriebenen Klonierungsschritte auf entsprechende Weise durchgeführt. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Die erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tab. 16 dargestellt.

2.18.2.2 Vollständig Codon-optimierte Gensequenz

Die Anpassung des Codongebrauchs (*codon usage*) eines Fremdgens an den Codongebrauch in *S. cerevisiae* kann für eine erfolgreiche heterologe Überexpression zwingend erforderlich sein. Daher wurde der offene Leserahmen der OILPCAT als synthetisches Gen mit einem für die heterologe Expression in *S. cerevisiae* optimierten Codongebrauch von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen. Das synthetische Gen wurde inklusive der N-terminalen Basenfolge ACATA (Donahue und Cigan, 1990), der für die weiteren Klonierungsschritte notwendigen Restriktionsschnittstellen und ohne das Stop-Codon vom Hersteller in den Vektor pUC57 subkloniert. Das Gen wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI aus dem pUC57-Vektor herausgeschnitten (siehe 2.16.1), mittels Elektrophorese aufgetrennt (siehe 2.16.2), in den linearisierten, dephosphorylierten Expressionsvektor pYES2/CT ligiert (siehe 2.16.4 und 2.16.6) und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Von den resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1).

Der codon-optimierte offene Leserahmen wurde ebenfalls ohne Fusion mit dem pYES2/CT eigenen V₅-Epitop kloniert. Hierfür wurden, basierend auf dem Konstrukt pUC57-OILPCAT-cuo, die bereits beschriebenen Klonierungsschritte (siehe 2.17.2 für die PCR-Bedingungen und 2.18.2.1 für die Klonierungsschritte) auf entsprechende Weise durchgeführt. Anstelle des Klonierungsvektor pJet1.2-Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde der pGEM[®]-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Die erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die funktionale Charakterisierung der LPCAT aus *O. lucimarinus*.

Plasmid	Eigenschaften der cDNA-Sequenz
pYES2/CT-OILPCAT nativ	native cDNA-Sequenz inkl. Stop-Codon
pYES2/CT-OILPCAT nativ V5	native cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OILPCAT cuo	vollständig optimierte cDNA-Sequenz inkl. Stop-Codon
pYES2/CT-OILPCAT cuo V5	vollständig optimierte cDNA Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pESC-LEU-PtΔ6, PSE1	native cDNA-Sequenzen inkl. Stop-Codon

2.18.3 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von Pt Δ 6 und PSE1 in *S. cerevisiae*

Die funktionale Charakterisierung der OILPCAT in *S. cerevisiae* erfolgte durch Co-Expression mit der Δ 6-Destaurase Pt Δ 6 aus der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* und der Δ 6-Elongase PSE1 aus dem Moos *Physcomitrella patens* (Domergue et al., 2002; Zank et al., 2002). Die offenen Leserahmen der Pt Δ 6 und der PSE1 wurden jeweils in den Hefe-Expressionsvektor pESC-LEU (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) entsprechend der in 2.17 und 2.18.1 beschriebenen Vorgehensweise kloniert.

Die cDNA wurde freundlicherweise von Frau Silke Schlenczek (Abt. Biochemie der Pflanze, Georg-August-Universität, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Die erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die heterologe Expression von Pt Δ 6 und PSE1 in *S. cerevisiae*.

Plasmid	Eigenschaften der cDNA-Sequenz
pESC-LEU-PSE1	native cDNA-Sequenzen inkl. Stop-Codon
pESC-LEU-Pt Δ 6, PSE1	native cDNA-Sequenzen inkl. Stop-Codon

2.18.4 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von DGAT2 aus *O. tauri* in *S. cerevisiae*

2.18.4.1 Native Gensequenzen

Für die heterologe Expression wurden die cDNA-Sequenzen der mutmaßlichen OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C zunächst via PCR amplifiziert, aufgereinigt und in den pGEM[®]-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben ligiert (siehe 0 und 2.17.3). Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (siehe 2.9.2). Die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone wurde mit dem „NucleoSpin[™] Plasmid-Kit“ (Macherey & Nagel, Düren) isoliert und mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein und korrekte Insertion der DNA-Fragmente überprüft (siehe 2.16.1).

Positive Klone wurden durch Sequenzierung mit dem „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1“ (Applied Biosystems, Foster, USA) und dem „ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser“ (Applied Biosystems, Foster, USA) verifiziert (siehe 2.15.2). Anschließend wurden die offenen Leserahmen der OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C mit Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstellen aus dem pGEM[®]-T-Vektor herausgeschnitten, in den linearisierten und dephosphorylierten Expressionsvektor pYES2/CT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Von den resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1).

Die cDNAs der OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C wurden ebenfalls als C-terminal verkürzte Varianten kloniert, denen das Stop-Codon fehlte. Dies ermöglichte eine Fusion der cDNA-Sequenzen mit dem im Expressionsvektor pYES2/CT enthaltenen V₅-Epitop (siehe Tab. 6). Hierdurch sollte eine spätere Immundetektion des exprimierten Proteins ermöglicht werden. Basierend auf den cDNA-Konstrukten pGEMT_OtDGAT2A, pGEMT_OtDGAT2B und pGEMT_OtDGAT2C wurden die in diesem Abschnitt beschriebenen Klonierungsschritte auf entsprechende Weise durchgeführt.

Für vergleichende Charakterisierungen wurde die cDNA der DGAT2 *DGAI* aus *S. cerevisiae* in entsprechender Weise wie die DGAT2 aus *O. tauri* in den Hefe-Expressionsvektor pYES2/CT kloniert. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt.

2.18.4.2 Teilweise Codon-optimierte Gensequenzen

Eine Anpassung des Codongebrauchs (*codon usage*) eines Fremdgens an den Codongebrauch in *S. cerevisiae* kann für eine erfolgreiche heterologe Überexpression zwingend erforderlich sein. Meist ist die Optimierung der ersten 20 bis 25 Codons ausreichend. Die optimierte Gensequenz wurde anhand des *Graphical Codon Usage Analyser 2.0* (Fuhrmann et al., 2004) ermittelt. Anhand dieser Daten wurden Primer erstellt, die die optimierte Sequenz am 5'- und die zum nativen Gen komplementäre Sequenz am 3'-Ende enthielten, so dass die ersten 25 Codons optimiert werden konnten. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen und die für die weiteren Klonierungsschritte erforderlichen Restriktionsschnittstellen.

Basierend auf den cDNA-Konstrukten pGEMT_OtDGAT2A, pGEMT_OtDGAT2B und pGEMT_OtDGAT2C wurden die bereits beschriebenen Klonierungsschritte (siehe 2.18.4.1) auf entsprechende Weise durchgeführt. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Die erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tab. 18 aufgeführt.

2.18.4.3 Vollständig Codon-optimierte Gensequenzen

Die Anpassung des Codongebrauchs (*codon usage*) eines Fremdgens an den Codongebrauch in *S. cerevisiae* kann für eine erfolgreiche heterologe Überexpression zwingend erforderlich sein. Daher wurden die offenen Leserahmen der OtDGAT2A und OtDGAT2C als synthetische Gene mit einem für die heterologe Expression in *S. cerevisiae* optimierten Codongebrauch von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen. Diese synthetischen Gene wurden inklusive der N-terminalen Basenfolge ACATA (Donahue und Cigan, 1990), der für die weiteren Klonierungsschritte notwendigen Restriktionsschnittstellen und ohne das Stop-Codon vom Hersteller in den Vektor pUC57 subkloniert. Die Gene wurden mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI für OtDGAT2A und OtDGAT2C aus dem pUC57-Vektor herausgeschnitten (siehe 2.16.1), mittels Elektrophorese aufgetrennt (siehe 2.16.2), in den linearisierten, dephosphorylierten Expressionsvektor pYES2/CT ligiert (siehe 2.16.4 und 2.16.6) und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Von den resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1).

Der codon-optimierte offene Leserahmen wurde ebenfalls ohne Fusion mit dem pYES2/CT eigenen V₅-Epitop kloniert. Basierend auf den pUC57-Konstrukten der OtDGAT2A und OtDGAT2C wurden die bereits beschriebenen Klonierungsschritte auf entsprechende Weise durchgeführt. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Die erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tab. 18 aufgeführt.

Tab. 18 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die funktionale Charakterisierung der DGAT2 aus *O. tauri*.

Plasmid	Eigenschaften der cDNA-Sequenz
pYES2/CT-OtDGAT2A nativ	native cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2B nativ	native cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2C nativ	native cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2A pcuo	partiell optimierte cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2B pcuo	partiell optimierte cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2C pcuo	partiell optimierte cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2A cuo	vollständig optimierte cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2C cuo	vollständig optimierte cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-OtDGAT2A nativ V5	native cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtDGAT2B nativ V5	native cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtDGAT2C nativ V5	native cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtDGAT2A pcuo V5	partiell optimierte cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtDGAT2B pcuo V5	partiell optimierte cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtDGAT2C pcuo V5	partiell optimierte cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtDGAT2A cuo V5	vollständig optimierte cDNA <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtDGAT2C cuo V5	vollständig optimierte cDNA <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-DGA1	native cDNA-Sequenz inkl. StopCodon
pYES2/CT-DGA1 V5	native cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop

2.18.5 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression von OtPDAT in

S. cerevisiae

2.18.5.1 Native Gensequenz

Für die heterologe Expression wurde die cDNA-Sequenz der mutmaßlichen OtPDAT zunächst via PCR amplifiziert, aufgereinigt und in den pGEM[®]-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben ligiert (siehe 2.17.4 und 0). Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (siehe 2.9.2). Die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone wurde mit dem „NucleoSpin[™] Plasmid-Kit“ (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) isoliert und mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein und korrekte Insertion der DNA-Fragmente überprüft (siehe 2.16.1). Positive Klone wurden durch Sequenzierung mit dem „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1“ (Applied Biosystems, Foster, USA) und dem „ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser“ (Applied Biosystems, Foster, USA) verifiziert (siehe 2.15.2).

Anschließend wurde der offene Leserahmen der OtPDAT mit Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstellen aus dem pGEM[®]-T-Vektor herausgeschnitten, in den linearisierten und dephosphorylierten Expressionsvektor pYES2/CT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Von den resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1). Die cDNA der OtPDAT wurde ebenfalls als C-terminal verkürzte Variante kloniert, der das Stop-Codon fehlte. Dies ermöglichte eine Fusion der cDNA-Sequenz mit dem im Expressionsvektor pYES2/CT enthaltenen V₅-Epitop (siehe Tab. 6). Hierdurch sollte eine spätere Immundetektion des exprimierten Proteins ermöglicht werden. Basierend auf dem Konstrukt pGEMT_OtPDAT wurden die bereits beschriebenen Klonierungsschritte auf entsprechende Weise durchgeführt. Die hierzu verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Für vergleichende Charakterisierungen wurde die cDNA der PDAT aus Hefe (*LROI*) in entsprechender Weise wie die PDAT aus *O. tauri* in den Hefe-Expressionsvektor pYES2/CT kloniert. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Die erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tab. 19 aufgeführt.

2.18.5.1 Teilweise Codon-optimierte Gensequenz

Eine Anpassung des Codongebrauchs (*codon usage*) eines Fremdgens an den Codongebrauch in *S. cerevisiae* kann für eine erfolgreiche heterologe Überexpression zwingend erforderlich sein. Meist ist die Optimierung der ersten 20 bis 25 Codons ausreichend. Die optimierte Gensequenz wurde anhand des *Graphical Codon Usage Analyser 2.0* (Fuhrmann et al., 2004) ermittelt. Anhand dieser Daten wurden Primer erstellt, die die optimierte Sequenz am 5'- und die zum nativen Gen komplementäre Sequenz am 3'-Ende enthielten, so dass die ersten 25 Codons optimiert werden konnten. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen und die für die weiteren Klonierungsschritte erforderlichen Restriktionsschnittstellen. Basierend auf dem cDNA-Konstrukt pGEMT_OtPDAT wurden die bereits beschriebenen Klonierungsschritte (siehe 2.18.5.1) auf entsprechende Weise durchgeführt. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Die erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tab. 19 aufgeführt.

Tab. 19 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die funktionale Charakterisierung der PDAT aus *O. tauri*.

Plasmid	Eigenschaften der cDNA-Sequenz
pYES2/CT-OtPDAT nativ	native cDNA-Sequenz inkl. Stop-Codon
pYES2/CT-OtPDAT pcuo	partiell optimierte cDNA-Sequenz inkl. Stop-Codon
pYES2/CT-OtPDAT nativ V5	native cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-OtPDAT pcuo V5	partiell optimierte cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop
pYES2/CT-LROI	native cDNA-Sequenz inkl. Stop-Codon
pYES2/CT-LROI V5	native cDNA-Sequenz <i>in frame</i> mit V ₅ -Epitop

2.19 Rekombinante Plasmide für die heterologe Expression in *A. thaliana*

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide für die heterologe Expression in *A. thaliana* wurden die betreffenden cDNA-Sequenzen via PCR amplifiziert und in den pGEM[®]-T-Vektor kloniert. Die hierbei verwendeten Primer enthielten ebenfalls die unter 2.17.1 genannten Modifikationen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt. Positive Klone wurden durch Sequenzierung mit dem „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1“ (Applied Biosystems, Foster, USA) und dem „ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser“ (Applied Biosystems, Foster, USA) verifiziert (siehe 2.15.2). Anschließend wurden die cDNA-Sequenzen mit Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstellen in eine von drei *multiple cloning sites* des pUC19-USP-OCS123-Vektors kloniert. Dieser pUC19-basierte Vektor enthielt durch verschiedene Modifikationen eine Dreifachexpressionskassette, bestehend aus drei USP-Promotoren (*unknown seed protein*; Bäumlein et al., 1991) drei OCS-Terminationssequenzen (*octopine synthase terminator*; MacDonald et al., 1991) und drei *multiple cloning sites* zwischen je einem USP-Promotor und einer korrespondierenden Terminatorsequenz. Von den resultierenden pUC19-USP-OCS123-Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1). Anschließend wurden die Expressionskassetten, die jeweils drei codierende cDNA-Sequenzen unter Kontrolle eines USP-Promotors und gekoppelt an jeweils einen OCS-Terminator enthielten, mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem pUC19-USP-OCS123-Vektor herausgeschnitten und in den binären Pflanzentransformationsvektor pCAMBIA-2300 oder pCAMBIA-3300 (siehe Tab. 7) ligiert. Von den resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.14.4). Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde mittels Restriktionsverdau verifiziert (siehe 2.16.1). Die so entstandenen Konstrukte wurden zur Transformation von *A. thaliana* eingesetzt (siehe 2.10).

2.20 Heterologe Expression von cDNA in *S. cerevisiae*

Die funktionale Charakterisierung von Enzymen erfolgte durch heterologe Expression im eukaryoten System der Hefe. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsversuche wurden verschiedene *S. cerevisiae*-Stämme verwendet (siehe 2.7.2).

Die verschiedenen Auxotrophien der Hefestämme wurden für die Selektion transgener Zellen genutzt, die einen oder mehrere Expressionsvektoren mit den zu untersuchenden Genen, gekoppelt an die Auxotrophie-Marker, enthielten. Die Erstellung der rekombinanten Plasmide für die heterologe Expression ist im Abschnitt 0 erläutert. Die Anzucht der Hefen erfolgte in 5 bis 20 ml SD-Minimalmedium mit 2 % (v/v) Raffinose als Kohlenstoffquelle (siehe 2.8.3). Hierfür wurde SD-Selektionsmedium mit einer Kolonie eines Hefeklons inokuliert und für 48 h bei 30 °C schüttelnd (210 rpm) kultiviert. Die Expressionskulturen wurden mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 – 0,3 angeimpft und in Abhängigkeit des jeweiligen Versuches bis zu 48 h bei 30 °C schüttelnd (210 rpm) inkubiert. Die Expressionskulturen enthielten zusätzlich 2 % (v/v) Galaktose. Die verwendeten Expressionsvektoren (siehe Tab. 6) enthalten jeweils einen Galaktose-induzierbaren Promotor, *GAL1* oder *GAL10*, unter deren Regulation die Expression der klonierten cDNAs gesteuert wird. Zusätzlich wurden verschiedene freie Fettsäuren als Substratvorstufen der zu untersuchenden Enzymen zu den Expressionskulturen gegeben. Diese applizierten Fettsäuren werden von den Hefezellen aufgenommen und dem Lipidstoffwechsel als aktivierte Fettsäuren in Form von Acyl-CoA-Thioestern zugeführt. Die Aufnahme und Aktivierung von Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen findet mit einer hinreichenden Effizienz statt. Im Gegensatz dazu werden Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 20 und mehr Kohlenstoffatomen nur äußerst ungenügend aufgenommen. Durch gleichzeitige Zugabe von 1 % Igepal CA 630 (,NP40'; Fluka, München, Deutschland) zu den Expressionskulturen kann die Aufnahme der sehr langkettigen Fettsäuren gesteigert werden.

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (5 min, 1500 g, 4 °C) geerntet und durch zweimaliges Waschen mit 0,1 M NaHCO₃ wurden Reste des Selektionsmediums und nicht inkorporierter Fettsäuren entfernt. Die Zellsedimente wurden direkt für die Lipidanalytik (siehe 2.23, 2.25, 2.28 und 2.30) und Proteinanalytik (siehe 2.22) weiterverwendet.

2.21 ¹⁴C-Fettsäure-Markierungs-Experiment

Die Anzucht der Hefen erfolgte in 10 ml SD-Minimalmedium mit 2 % (v/v) Raffinose als Kohlenstoffquelle (siehe 2.8.3). Hierfür wurde SD-Selektionsmedium mit einer Kolonie eines Hefeklons inokuliert und für 48 h bei 30 °C schüttelnd (210 rpm) kultiviert. Die Expressionskulturen wurden mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,3 inokuliert (Endvolumen: 4 ml). 18 h nach Induktion der Expression wurden jeweils 0,27 µCi ¹⁴C-markierte Fettsäuren (18:2*n*-6 und 18:3*n*-3) zu den Expressionskulturen hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte in 13 ml PP-Röhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) für weitere 12 h bei 30 °C und 210 rpm. Für die Präparation des Lipidextrakts wurden 3 ml der Expressionskulturen für 5 min bei 950 g sedimentiert und zweimal mit 0,1 M NaHCO₃ gewaschen, um Reste des Selektionsmediums und nicht inkorporierter Fettsäuren zu entfernen. Zu dem Zellsediment wurden 100 µl Glasperlen (Ø 0,25 – 0,5 mm; Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1,5 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) und 50 µl HCl (32 %) gegeben. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch starkes Schütteln für 5 h auf einem Vortex-Schüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland). Anschließend wurden die Lipide durch Zugabe von 500 µl 0,45 % NaCl-Lösung (w/v) und starkem Schütteln für 5 min extrahiert. Die organische Lösungsmittelphase wurde entnommen, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 40 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei –20 °C gelagert. Die so präparierten Lipidextrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie (siehe 2.27.2) in die einzelnen Lipidklassen aufgetrennt.

2.22 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen

2.22.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(modifiziert nach Laemmli, 1970)

Proteine lassen sich in Anwesenheit von einem denaturierenden Detergenz in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Das verwendete Laemmli-System besteht aus zwei Komponenten: einem Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration vom gewünschten Auftrennungsbereich abhängt, und einem Sammelgel, mit dem das auspolymerisierte Trenngel überschichtet wird. Zu geernteten und gewaschenen Hefezellen (siehe 2.20) wurden 300 µl Probenpuffer und 300 µl Glasperlen (Ø 0,25 – 0,5 mm; Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch wiederholtes Schütteln in einer Schwingmühle (Schwingmühle MM 200; Retsch, Haan, Deutschland) für sechsmal 30 s. Zur Kühlung wurden die Proben nach jedem Schütteln für 60 s auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur vollständigen Abtrennung der Zelltrümmer für weitere 5 min (1500 g, 4 °C) zentrifugiert. Der daraus resultierende Rohextrakt wurde nun zur Bestimmung des Proteingehalts (siehe 2.22.2) und anschließender SDS-PAGE weiterverwendet. Jeweils 25 µg Gesamtprotein des Rohextrakts wurden pro Geltasche eingesetzt und vor dem Auftragen mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis aufbewahrt. Mit Hilfe des anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) im SDS-Probenpuffer wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Die SDS-PAGE erfolgte in einer Gelelektrophoreseapparatur (Mini-PROTEAN® 3 Cell; Bio-Rad, München, Deutschland) zunächst für 15 min bei einer Stromstärke von 15 mA bis zum Erreichen des Trenngels, und dann für 40 – 45 min bei 25 mA im Bereich des Trenngels. Als Größenstandard wurde der *Prestained Molecular Weight Marker* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in einer separaten Geltasche mitgeführt. Zur Visualisierung der Proteine nach der Elektrophorese schloss sich eine Coomassie-Färbung (2.22.3) oder ein Western-Blot (2.22) an.

Protein-Aufschlusspuffer

50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4

1 mM EDTA

5 % (w/v) Glycerol

1× *Complete, EDTA-free; Protease Inhibitor Cocktail Tablet*

SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer (pH 8,3)

25 mM Tris/HCl
200 mM Glyzin
0,1 % (w/v) SDS

Sammelgel (3,5 %)

125 mM Tris/HCl pH 6,8
3,75 % (w/v) Acrylamid
1 % (w/v) Bisacrylamid
0,1 % (w/v) SDS
0,4 % (v/v) TEMED
0,08 % (w/v) APS

Trenngel (10 %)

250 mM Tris/HCl, pH 8,8
10 % (w/v) Acrylamid
2,7 % (w/v) Bisacrylamid
0,1 % (w/v) SDS
5 % (w/v) Glycerol
0,4 % (v/v) TEMED
0,05 % (w/v) APS

SDS-Probenpuffer

100 mM	Tris/HCl, pH 6,8
20 % (w/v)	Glycerol
10 % (w/v)	β -Mercaptoethanol
2 % (w/v)	SDS
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau

2.22.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

(Bradford, 1976)

Der bei diesem Verfahren verwendete Farbstoff Coomassie-Briliant-Blue G-250 interagiert mit Proteinen. Diese Interaktion lässt sich durch die Zunahme der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmen. Ein Aliquot der Probe, dessen Proteinkonzentration bestimmt werden sollte, wurde mit A. dest. auf 100 μ l aufgefüllt und anschließend mit 2 ml Bradford-Reagenz vermischt. Die Proben wurden nun für 15 min bei RT inkubiert. Zur Kalibrierung der Messung wurde eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Dazu wurden wässrige Lösungen von BSA mit 0 – 20 μ g BSA erstellt mit 2 ml Bradford-Reagenz aufgefüllt und im Photometer vermessen. Über die Korrelation mit den Werten der Eichreihe wurden Proteinmenge und Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

Bradford-Reagenz

0,01 % (w/v)	Coomassie-Briliant-Blue G-250
50 ml 96 % (v/v)	Ethanol
100 ml 85 % (v/v)	Phosphorsäure
ad 1 l	A. dest.

2.22.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zu visualisieren, wurde das Polyacrylamidgel zunächst für 1 h bei RT in einer Färbelösung geschwenkt. Im Anschluss daran wurde das Gel in Entfärberlösung geschwenkt, bis nur noch die aufgetrennten Proteine zu sehen waren. Die Färbelösung enthält als Lösungsmittel des Coomassie-Farbstoffs Methanol sowie Essigsäure, um die Proteine im Polyacrylamidgel zu fixieren. Der Coomassie-Farbstoff lagert sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an und färbt so alle Proteine unspezifisch an.

Färbelösung

- 0,25 % (w/v) Coomassie Blue (Serva Blau R)
- 40 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärberlösung

- 50 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

2.22.4 Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membranen

Um Proteine durch eine Antikörperreaktion zu detektieren und nachzuweisen, wurden die Proteine zunächst in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.22.1) und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Hierfür wurden zwei Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran entsprechend der Größe des SDS-Gels zugeschnitten und zusammen mit dem SDS-Gel für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Nassblot-Apparatur für den Western-Blot wurde nach Anleitung des Herstellers (Mini Trans-Blot[®] Cell-Apparatur; Bio-Rad, München, Deutschland) zusammengesetzt und verwendet. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und ein elektrisches Feld angelegt, so dass die Proteine für 1 h bei 60 V und etwa 8 °C transferiert wurden. Die Proteine bleibe bei diesem Verfahren aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membran haften.

Transferpuffer (pH 8,4)

- 25 mM Tris
- 250 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS
- 20 % (v/v) Methanol

2.22.5 Immundetektion der Proteine

Im Anschluss an den Proteintransfer (siehe 2.22.4) wurde die Nitrozellulosemembran kurz in TBST-Puffer gewaschen und zur Absättigung überschüssiger Bindungsstellen über Nacht in Blockierungslösung bei 4 °C schwenkend inkubiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei RT unter kontinuierlichem Schwenken. Nachdem die Membran für viermal 10 min in TBST-Puffer gewaschen wurde, erfolgte eine 2-stündige Inkubation in 15 ml TBST mit dem primären Antikörper (siehe Tab. 8). Durch viermaliges Waschen für 10 min in TBST-Puffer wurden schwächer haftende, unspezifisch gebundene primäre Antikörper von der Membran entfernt. Die Lösung des sekundären Antikörpers (siehe Tab. 8) wurde für 1 h mit der Membran geschwenkt. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper. Anschließend wurde die Membran viermal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Zur Visualisierung wurden sekundäre Antikörper verwendet, die ein Konjugat mit der Peroxidase aus Meerrettich (*horseradish peroxidase*) bildeten. Hierfür wurden die ECLTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

TBST-Puffer

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

Blockierungslösung

3 % (w/v) Milchpulver in TBS-Puffer

2.23 Enzymaktivitätsbestimmungen

2.23.1 Präparation von Zellextrakten aus *S. cerevisiae* für Enzymaktivitätsbestimmungen

Zu geernteten und gewaschenen Zellen wurden Probenpuffer und Glasperlen (\emptyset 0,25 – 0,5 mm; Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch wiederholtes Schütteln in einer Schwingmühle (Schwingmühle MM 200; Retsch, Haan, Deutschland) für sechsmal 30 s. Zur Kühlung wurden die Proben nach jedem für 60 s auf Eis gelagert. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und zur vollständigen Abtrennung der Zelltrümmer für weitere 5 min (1500 g, 4 °C) zentrifugiert. Der daraus resultierende Rohextrakt wurde nun zur Bestimmung des Proteingehalts (siehe 2.22.2) und anschließend für Enzymaktivitätsbestimmungen eingesetzt.

2.23.2 DGAT-Aktivitätsnachweis (Czabany et al., 2008)

Für den Acyl-CoA:DGAT-Aktivitätsnachweis wurden 50 ml einer Hefe-Expressionskultur aufgeschlossen (siehe 2.23.1). Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt (siehe 2.22.2). 100 μ g des Protein-Homogenats wurden mit 14 C-Oleoyl-CoA (80.000 dpm), 6 nmol Oleoyl-CoA, 10 μ l DAG-CHAPS-Lösung vermischt und mit Probenpuffer auf 100 μ l aufgefüllt. Die Proben wurden bei 30 °C bis zu 60 min inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l 0,9 % NaCl (w/v) und 500 μ l Chloroform wurde die Reaktion gestoppt. Die Lipide wurden durch starkes Schütteln für 5 min extrahiert und zur Phasentrennung für 5 min bei 11000 g zentrifugiert. Die organische Lösungsmittelphase wurde abgenommen, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 40 μ l Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei –20 °C gelagert.

1× Probenpuffer

150 mM Tris-HCl, pH 7,0

15 mM KCl

15 mM MgCl₂

DAG-CHAPS-Lösung

0,5 mM di-18:1-DAG

10 mM CHAPS

ad 500 µl Probenpuffer

Das di-18:2-DAG wurde vorgelegt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurden CHAPS und Probenpuffer hinzugefügt und die gesamte Lösung für 15 min mit Ultraschall behandelt. Die DAG-CHAPS-Lösung wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Direkt vor Gebrauch wurde die DAG-CHAPS-Lösung kräftig geschüttelt und erneut für 10 min mit Ultraschall behandelt.

2.23.3 PDAT-Aktivitätsnachweis (Czabany et al., 2008)

Für den PDAT-Aktivitätsnachweis wurden 50 ml einer Hefe-Expressionskultur wie beschrieben (siehe 2.23.1) aufgeschlossen und anschließend für 1,5 h bei 100.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Optima™ L-80 K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Krefeld, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 100 µl Probenpuffer aufgenommen. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (1976) bestimmt (siehe 2.22.2). 100 µg Protein des Membranextrakts wurde mit ^{14}C -markiertem Phosphatidylcholin (^{14}C -PtdCho, L- α -1-Palmitoyl-2-linoleoyl-[linoleoyl-1- ^{14}C]-phosphatidylcholin ; 100.000 dpm), 6 nmol Oleoyl-CoA, 10 µl PC-DAG-CHAPS-Lösung vermischt und mit Probenpuffer auf 100 µl aufgefüllt.

Die Proben wurden bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 60 min inkubiert. Alle 5 min wurden die Proben für 60 sec stark geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 0,9 % NaCl (w/v) und 500 µl Chloroform gestoppt. Die Lipide wurden durch starkes Schütteln für 5 min extrahiert und zur Phasentrennung für 5 min bei 11000 g zentrifugiert. Die organische Lösungsmittelphase wurde abgenommen, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 40 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

1× Probenpuffer

150 mM Tris-HCl, pH 7,0

15 mM KCl

15 mM MgCl₂**PC-DAG-CHAPS-Lösung**

2 mM di-18:2-PC

0,5 mM di-18:2-DAG

10 mM CHAPS

ad 500 µl Probenpuffer

Das di-18:2-PC und di-18:2-DAG wurde vorgelegt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurden CHAPS und Probenpuffer hinzugefügt und die gesamte Lösung für 15 min mit Ultraschall behandelt. Die PC-DAG-CHAPS-Lösung wurde bei -20 °C gelagert. Direkt vor Gebrauch wurde die DAG-CHAPS-Lösung kräftig geschüttelt und für 10 min mit Ultraschall behandelt.

2.24 Fluoreszenz-Markierung von Lipidkörpern

(Greenspan et al., 1985)

Lipidkörper sind intrazelluläre Lipideinschlüsse, die hauptsächlich aus Triacylglycerinen und Sterolestern bestehen (Murphy und Vance, 1999). Mit Hilfe des Farbstoffs Nile Red (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) ist es möglich, Lipidkörper *in vivo* in *S. cerevisiae*-Zellen nachzuweisen (Greenspan et al., 1985). Für die Nile Red-Markierung von Lipidkörpern wurden 500 µl einer Hefe-Expressionskultur (siehe 2.20) sedimentiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde in 150 µl 1xPBS sowie 5 µl Nile-Red-Lösung (1 mg/ml Aceton) zum Anfärben der Zellen aufgenommen. Nachdem die Zellen für 15 – 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden, wurden die Zellen mit 200 µl 1xPBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die angefärbten Zellen wurden in 100 µl 1xPBS aufgenommen und für die Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet.

2.25 Präparation von Lipidextrakten aus *S. cerevisiae*

Für die Präparation von Lipidextrakten aus *S. cerevisiae* wurden gewaschene Zellsedimente (siehe 2.20) verwendet. Die Zellsedimente wurden in 8 ml Chloroform/Methanol (1:2, v/v) und 2 ml Glasperlen (\varnothing 0,25 – 0,5 mm; Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und für 4 h bei 4 °C stark geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Zelltrümmer sedimentiert (5 min, 1500 g, 4 °C). Die Überstände wurden abgenommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei 4 °C aufbewahrt. Die Zelltrümmer wurden in 8 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen, über Nacht bei 4 °C stark geschüttelt durch anschließende Zentrifugation abgetrennt (5 min, 1500 g, 4 °C). Die resultierenden Überstände wurden abgenommen und mit denen des Vortags vereint. Zu den vereinigten Überständen wurden 3,6 ml 0,9 % NaCl (w/v) gegeben. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 5 min stark geschüttelt. Durch Zentrifugation (5 min, 1500 g, 4 °C) wurde die Phasentrennung unterstützt. Die organische Lösungsmittelphase wurde entnommen, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 100 – 200 μ l Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei –20 °C gelagert.

2.26 Präparation von Lipidextrakten aus Samen von *A. thaliana*

Für die Präparation von Lipidextrakten aus reifen Samen von *A. thaliana* wurden 50 mg Samen abgewogen und in 10 ml Chloroform/Methanol (1:2, v/v) homogenisiert. Der homogenisierte Samen wurde für 4 h bei 4 °C stark geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Zelltrümmer sedimentiert (5 min, 1500 g, 4 °C). Die Überstände wurden abgenommen und bis zum nächsten Tag unter einer Argon-Atmosphäre bei 4 °C aufbewahrt.

Die Zelltrümmer wurden in 10 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C stark geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation abgetrennt (5 min, 1500 g, 4 °C). Die resultierenden Überstände wurden abgenommen und mit denen des Vortags vereint. Zu den vereinigten Überständen wurden 4,5 ml 0,9 % NaCl (w/v) gegeben. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 5 min stark geschüttelt. Durch Zentrifugation (5 min, 1500 g, 4 °C) wurde die Phasentrennung unterstützt. Die organische Lösungsmittelphase wurde entnommen, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und anschließend in 500 μ l Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei –20 °C gelagert.

2.26.1 Präparation von Neutrallipiden, Glykolipiden und Phospholipiden aus Lipidextrakten

Für die Präparation von Neutrallipiden, Glykolipiden und Phospholipiden aus Lipidextrakten von *S. cerevisiae* oder *A. thaliana*-Samen wurden die jeweiligen Lipidextrakte (siehe 2.25 und 2.26) unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in 200 – 500 µl Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden zur Fraktionierung des Lipidextrakts auf eine Kieselgelsäule (Strata SI-1 Silica, 55 µm, 70 Å, 500 mg/6 ml; Phenomenex, Torrance, USA) geladen, die zuvor mit 5 ml Chloroform konditioniert wurde. Die Neutrallipide wurden mit 9 ml Chloroform von der Säule eluiert, die Glykolipide mit 10 ml Aceton/Isopropanol (9:1, v/v) und zuletzt wurden die Phospholipide mit 10 ml (Methanol/Essigsäure 9:1, v/v) eluiert. Die Eluate wurden in einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in 50 – 200 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung (siehe 2.27 und 2.28) unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei –20 °C gelagert.

2.27 Dünnschichtchromatographie

2.27.1 Dünnschichtchromatographie nicht-radioaktiv markierter Lipidextrakte

Die präparierten Lipidextrakte wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) weiter aufgetrennt. Die Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, 10 × 20 cm oder 20 × 20 cm; Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden über den Automatic TLC Sampler (ATS 4; Camag, Muttenz, Schweiz) mit einem Aliquot der Lipide beladen. Neutrallipide wurden in Hexan/Diethylether/Eisessig (80:20:1, v/v/v) und Phospholipide wurden in Chloroform/Methanol/Eisessig (65:25:8, v/v/v) als Laufmittel entwickelt. Für die Identifizierung der verschiedenen Lipide wurde die Co-Migration von Standardlipiden genutzt. Die Visualisierung der Lipide erfolgte für analytische Zwecke durch Inkubation in einer CuSO₄-Lösung (10 g CuSO₄ × 5 H₂O, 92 ml H₂O, 8 ml H₃PO₄) und anschließender Erhitzung der Dünnschichtplatte auf 170 °C. Für präparative Zwecke wurden die Lipide im Anschluss an die Auftrennung durch 1-Anilino-8-naphthalinsulfonat (0,2% w/v in Methanol) unter UV-Licht (λ = 365 nm und 254 nm) visualisiert. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit dem Kieselgel von der Dünnschichtplatte abgekratzt und direkt für die Derivatisierung der Fettsäuren eingesetzt (siehe 2.28).

2.27.2 Dünnschichtchromatographie radioaktiv markierter Lipidextrakte

Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung radioaktiv markierter Lipidextrakte wurden DC-Alufolien (Kieselgel 60, 20 × 20 cm; Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Auftragsvolumen war von der Konzentration der Lipide in der Probe abhängig. Für die Identifizierung der verschiedenen Lipide wurde die Co-Migration von Standardlipiden genutzt. Für die Auftrennung der Lipide wurden zwei verschiedene Laufmittel genutzt. Phospholipide wurden in Essigsäuremethylester/Isopropanol/Chloroform/Methanol/0,25 % KCl (w/v) (25/25/28/10/7, v/v/v/v/v) aufgetrennt. Nachdem die Proben eine Laufstrecke von 7 bis 10 cm zurückgelegt hatten, wurde die DC-Alufolie getrocknet und für die Auftrennung der Neutrallipide in Hexan/Diethylether/Eisessig (80/20/1, v/v/v) ein weiteres Mal entwickelt. Die Visualisierung erfolgte durch Exposition eines „*Phosphor-Storage-Screens*“ an einem „*Fluorescent Image Analyzer*“ (FujiFilm, Japan).

2.28 Derivatisierung von freien und veresterten Fettsäuren

(Miquel und Browse, 1992)

Zur Analyse der Fettsäurezusammensetzung wurden die freien und veresterten Fettsäuren durch saure Methanolyse in Fettsäuremethylester überführt. Als Ausgangsmaterial dienten gewaschene Zellsedimente aus Expressionskulturen (siehe 2.20) oder Lipidextrakte (siehe 2.26). Für die Derivatisierung der Fettsäuren wurden die Proben in 1,5 ml FAMES-Lösung aufgenommen und für 1 h bei 80 °C in einem Wasserbad schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden den auf RT abgekühlten Proben 200 µl 5 M NaCl zum Abstoppen der Reaktion hinzugefügt. Die Extraktion der Fettsäuremethylester erfolgte durch Zugabe von 2 ml *n*-Hexan und kräftigem Schütteln (30 s – 5 min). Die organische Lösungsmittelphase wurde abgenommen und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Die Fettsäuremethylester wurden in 10 – 50 µl Acetonitril aufgenommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei –20 °C bis zur gaschromatographischen Analyse (siehe 2.29) gelagert.

FAMES-Lösung

2,75 % (v/v) H₂SO₄ (95-97 %)

2 % (v/v) Dimethoxypropan

ad Methanol

2.29 Gaschromatographie

Fettsäuremethylester (FAME) sind bei hohen Temperaturen in die Gasphase überführbar. Diese Eigenschaft wurde während der gaschromatographischen Trennung mit der Agilent GC 6890 Serie (Agilent, Waldbronn, Deutschland) genutzt. Das Injektionsvolumen war von der Konzentration der FAME in der Probe abhängig und lag zwischen 0,2 – 1,0 µl. Zur Bestimmung der Retentionszeiten der FAME diente ein FAME-Standardgemisch (F.A.M.E. Mix, C4-C24; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland).

Säule: DB-23, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm

Trägergas: Helium (konstante Flussrate: 1 ml/min)

Injektion: Split-Modus, 220 °C

Temperatur-Gradient:

Rate	Temperatur	Dauer
	150 °C	1 min
8 °C /min	200 °C	0 min
25 °C /min	250 °C	6 min

Detektor: Flammen-Ionisations-Detektor (FID)

Auswertung: ChemStation-Software

Säule: DB-23, 15 m x 0,18 mm, Filmdicke: 0,2 µm

Trägergas: Helium (konstante Flussrate: 0,8 ml/min)

Injektion: Split-Modus, 220 °C

Temperatur-Gradient

Rate	Temperatur	Dauer
	160 °C	1 min
10 °C /min	200 °C	0 min
25 °C /min	250 °C	1,5 min

Detektor: Flammen-Ionisations-Detektor (FID)

Auswertung: ChemStation-Software

2.30 *High performance liquid chromatography*

2.30.1 **Bestimmung von Acyl-CoA-Estern mittels HPLC**

(Larson und Graham, 2001)

Die HPLC-Analysen wurden mit einem Agilent 1100 HPLC-System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Das Prinzip der auf Fluoreszenzdetektion basierenden Methode besteht darin, dass die aus biologischen Proben gewonnenen Acyl-CoA-Ester in fluoreszierende Acyl-*etheno*-CoA-Ester überführt werden. Diese werden anschließend durch *high performance liquid chromatography* (HPLC) aufgetrennt und mittels eines Fluoreszenzdetektors detektiert.

Zum Integrieren und Quantifizieren der Signalflächen wurde die *ChemStation-Software* (Rev. A. 10.02; Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet.

2.30.2 **Extraktion von Acyl-CoAs**

(modifiziert nach Rosendal und Knudsen, 1992)

Für die Analyse der Acyl-CoA-Thioester aus *S. cerevisiae* wurden 20 ml einer *S. cerevisiae*-Kultur (siehe 2.20) nach Zugabe von 2 ml 6,6 M Perchlorsäure durch Zentrifugation geerntet (5 min, 3200 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde in 3 ml 10 mM Perchlorsäure gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei –80 °C gelagert. Alle folgenden Schritte der Extraktion wurden unter Kühlung der Proben auf Eis durchgeführt. Als interner Standard wurden Heptadecanoyl-CoA (0,05 nmol) mitgeführt. Das Zellsediment wurde mit 3 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v), 800 µl A. dest., 5 µl internem Standard (17:0-CoA, 50 µM) und 200 mg Glasperlen versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch extrem starkes Schütteln für 30 min bei 4 °C. Anschließend wurden 1 ml Chloroform und 1 ml A. dest. hinzugegeben und die Proben erneut für 30 s stark geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (3200 g, 5 min, 4 °C). Nach Entnahme der Ober- und der Unterphase wurde die verbleibende Acyl-CoA-haltige Interphase mit den Glasperlen unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Die Extraktion der Acyl-CoA-Ester erfolgte durch Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer, 10 µl gesättigter Ammoniumsulfatlösung und 1,2 ml Chloroform/Methanol (1:2, v/v) und kräftigem Schütteln für mindestens 3 min. Die Ansätze wurden nun für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 5 min 3200 g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt, mögliche feste Rückstände wurden für 2 min bei 20000 g und 4 °C sedimentiert. Der klare, reine Überstand wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß transferiert, bei 50 °C unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und zur Derivatisierung eingesetzt.

Extraktionspuffer

- 2 ml Isopropanol
- 2 ml KH₂PO₄ (50mM) pH 7,2
- 50 µl Essigsäure
- 80 µl BSA (50 mg/ml, entfettet)

2.30.3 Derivatisierung von Acyl-CoAs

Für die Derivatisierung der Adenineinheit des Coenzym A zu den entsprechenden *Etheno*-Derivaten wurden die Acyl-CoAs mit 100 – 300 µl Derivatisierungsreagenz bei 85 °C für 30 min inkubiert. Nachdem die Proben für wenigstens 30 min bei 4 °C abgekühlt wurden, konnten diese zur HPLC-Analyse verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

Derivatisierungsreagenz

- 500 mM Chloroacetaldehyd
- 150 mM Citratpuffer, pH 4,0
- 0,5 % (w/v) SDS

2.30.4 HPLC-Analyse von Acyl-etheno-CoA-Estern

Die Elution der Acyl-etheno-CoA-Ester von der Säule erfolgte unter alkalischen Bedingungen in der Gegenwart von Triethylamin unter Nutzung eines quaternären Pumpensystems.

<u>Gerät:</u>	LC Agilent 1100 Serie
<u>Säule:</u>	LUNA 150 x 2,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
<u>Vorsäule:</u>	4 x 2mm Phenylpropyl guard (Phenomenex, Aschaffenburg)
<u>Detektor:</u>	Fluoreszenzdetektor
	Anregungswellenlänge: 230 nm
	Emissionswellenlänge: 420 nm
<u>Auswertung:</u>	ChemStation-Software

Laufmittel

Laufmittel	Zusammensetzung (v/v)
A	100:1 H ₂ O: HOAc
B	90:9:1 MeCN:H ₂ O:HOAc
C	100:0,25 H ₂ O:TEA
D	90:10 MeCN:H ₂ O

Durchfluss-Gradient

Zeit (min)	% B	% C	% D	Fluss (ml/min)	Druck (bar)
0	10	0	0	0,4	300
5	80	0	0	0,4	300
5,1	0	80	0	0,4	300
7	0	97	3	0,4	300
10	0	95	5	0,4	300
10,1	0	95	5	0,4	300
50	0	55	45	0,4	300
51,1	0	0	100	0,4	300
52	0	0	100	0,4	300
62	0	0	100	0,4	300
62,1	10	0	0	0,4	300

2.31 LC-MS/MS

Zur Analyse der Neutrallipide (DAG und TAG) wurden die entsprechenden Lipidextrakte 400-fach in 300:665:35 CHCl₃:MetOH:300 mM NH₄OAc verdünnt. Mit einer Flussrate von ~250 nl/min wurden 8 µl in ein „Applied Biosystems“ 3200 Hybrid-Triplequadrupol/Lineare-Ionenfalle-Massenspektrometer (MDS Sciex, Ontario, Canada) infundiert. Die Nanoelektrospray-Analyse von positiven Ionen erfolgte mit einer Chip-gesteuerten Ionenquelle (TriVersa NanoMate; Advion BioSciences, Ithaca, NY, USA) bei einer Ionisierungsspannung von 1,2 kV und einem Gasdruck von 0.1 psi. Die Neutrallipide wurden durch Neutralverlustanalysen der Ammoniumaddukte der entsprechenden Fettsäurereste detektiert (Schwudke et al., 2006). Diese Neutralverlustanalysen wurden in einem Massenbereich von m/z 550 bis 950 und bei einer Kollisionsenergie von 30 V mit Stickstoff in der Kollisionszelle, einem Entclusterungspotential von 90 bis 140 V sowie einem Eingangspotential von 10 V durchgeführt. Die Fragmentionen wurden mit einer Schrittweite von 0,2 Da und bei den Geräteeinstellungen für „low“-Massenauflösung detektiert. Die automatische Identifizierung der Lipidspezies und Erstellung der Lipidprofile erfolgte mit der Software „LipidProfiler“ (MDS Sciex, Ontario, Canada; Ejsing et al., 2006).

Neutralverlustanalysen	$\Delta m/z$
16:0	273,3
16:1	271,3
18:0	301,3
18:1	299,3
18:2	297,3
18:3	295,3
18:4	293,3

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Acyltransferasen mit neuartigen Substratspezifitäten, die in Mikroalgen und Moosen an den Biosyntheseprozessen und der Akkumulation von sehr langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (VLCPUFA) wie Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure beteiligt sein könnten. Besonderes Interesse galt dabei der Identifizierung und Charakterisierung von Acyl-CoA:Lyso-Phosphatidylcholin-Acyltransferasen (LPCAT), Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (DGAT) und Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferasen (PDAT). Acyltransferasen mit neuartigen Substratspezifitäten könnten als Bestandteil von VLCPUFA-Biosynthesewegen in transgenen Ölsaaten wie Raps oder Lein eingesetzt werden. Während die neuartigen LPCAT zu einer verbesserten Biosyntheserate von VLCPUFA beitragen könnten, sollen spezifische DGAT und PDAT eine gesteigerte Akkumulation von VLCPUFA in den Reservelipiden des Samens bewirken.

3.1 Auswahl der Spenderorganismen für die Isolierung von Acyltransferasen

Marines Phytoplankton zeichnet sich durch eine hohe Artenvielfalt aus. Das photoautotrophe Plankton setzt sich hauptsächlich aus Grünalgen, Kieselalgen (Bacillariophyta), Dinoflagellaten (Dinoflagellata) und Blaualgen (Cyanobacteria) zusammen. All diese Gruppen bilden ihre Biomasse mithilfe der Photosynthese und Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle. Aufgrund dieser elementaren Fähigkeit zur Bildung von Biomasse bildet das Phytoplankton die Basis der Nahrungskette in oligotrophen Gewässern. Innerhalb dieses Phytoplanktons sind auch die kleinsten, bekannten eukaryoten Organismen anzutreffen. Zu diesen Organismen zählen auch die Gattungen *Mantoniella* und *Ostreococcus*. Beide Gattungen werden phylogenetisch den Prasinophyceae zugeordnet, einer Klasse innerhalb der zu Grünalgen zählenden Chlorophyta mit einem einfachen zellulären Aufbau (Chrétiennot-Dinet et al., 1995). Vertreter dieser Gattungen wurden aus verschiedenen marinen Habitaten isoliert (Courties et al., 1994; Diez et al., 2001; Guillou et al., 2004; Worden et al., 2004; Countway und Caron, 2006).

Mantoniella squamata, *Ostreococcus tauri* und *Ostreococcus lucimarinus* sind in der Lage DHA über den kombinierten $\omega 6$ -/ $\omega 3$ -Syntheseweg zu synthetisieren und verfügen demzufolge über die enzymatische Ausstattung zur Biosynthese dieser Fettsäuren. So wurden aus diesen Algen bereits Desaturasen und Elongasen isoliert und beschrieben, die an der Bildung von VLCPUFA beteiligt sind (Meyer et al., 2003; Meyer et al., 2004; Domergue et al., 2005; Hoffmann et al., 2008). Des Weiteren zeigte die Analyse der Fettsäurezusammensetzung beider Algenarten, dass der Anteil an *n*-3-VLCPUFA im Vergleich zu *n*-6-Fettsäuren stark erhöht ist und *n*-3-VLCPUFA vorwiegend in Glycerophospholipiden und TAG auftreten (M. Heilmann, Dissertation). Darüber hinaus sind die Sequenzinformationen beider Genome in öffentlichen Datenbanken hinterlegt und frei zugänglich (Derelle et al., 2006; Palenik et al., 2007). Zu den EPA-Produzenten zählt auch das Moos *P. patens*, dessen Genom ebenfalls in Datenbanken hinterlegt und öffentlich zugänglich ist. Aufgrund dieser Ausgangssituation wurden für diese Arbeit *O. tauri*, *O. lucimarinus* und *P. patens* als Spenderorganismen für die Isolierung und funktionale Charakterisierung von Acyltransferasen mit neuartigen Substratspezifitäten verwendet, die möglicherweise an der Biosynthese von VLCPUFA und deren Akkumulation in den Reservelipiden beteiligt sein könnten.

3.2 Identifizierung und funktionale Charakterisierung von LPCAT

Acyl-CoA:Lyso-Phosphatidylcholin-Acyltransferasen (LPCAT) katalysieren den Austausch von Fettsäuren zwischen dem zytosolischen Acyl-CoA-Pool und dem PtdCho-Pool des ER (Stymne und Stobart, 1984). Abbadi et al. (2004) postulierten, dass der unzureichend ablaufende Fettsäureaustausch zwischen den beiden an der VLCPUFA-Synthese beteiligten Pools limitierend auf die Biosyntheserate von VLCPUFA in transgenen Pflanzen wirken könnte, da die endogenen LPCAT im reifenden Samen der untersuchten transgenen Tabak- und Leinpflanzen die intermediären Fettsäuren der VLCPUFA-Synthese nicht als Substrate akzeptieren würden. LPCAT aus pflanzlichen VLCPUFA produzierenden Organismen hingegen könnten über die passenden Substratspezifitäten verfügen, mit denen der in Tabak und Lein etablierte transgene Biosyntheseweg erweitert und vervollständigt werden könnte.

3.2.1 Identifizierung von LPCAT aus VLCPUFA-produzierenden Organismen

Zur Identifizierung mutmaßlicher LPCAT aus VLCPUFA synthetisierenden Organismen wurden Genom-Datenbanken der Mikroalgen von *O. tauri*, *O. lucimarinus* und dem Moos *P. patens* durchsucht (DOE Joint-Genome Institute, <http://genome.jgi-psf.org/>).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Sequenzinformationen zu Genen aus eukaryoten Organismen vor, die für Enzyme mit LPCAT-Aktivität codieren. Daher wurden in einem ersten Ansatz Gensequenzen aus der Ackerschmalwand *A. thaliana* als Sequenzvorlagen für die Datenbanksuche verwendet, von denen bekannt war, dass sie für Enzyme mit LPAAT-Aktivität codieren (Kim und Huang, 2004; Kim et al., 2005). Obwohl die Enzyme aus *A. thaliana* keine Kopfgruppenspezifität für PtdCho aufweisen, wurde angenommen, dass LPCAT und LPAAT identische konservierte Aminosäure-Motive enthalten und daher einer gemeinsamen Enzymfamilie angehören könnten. Diese Annahme wurde durch die biochemischen Eigenschaften von zwei Enzymen aus dem Fadenwurm *C. elegans* und der Alge *M. squamata* bestätigt. CeLPAAT und MsLPAAT sollen Lyso-PtdCho und Acyl-CoA als Substrate verwenden können (Cirpus, 2006). Diese beiden Enzyme wurden aufgrund ihrer Homologie zu einer LPAAT aus der Maus *Mus musculus* identifiziert. *In vitro*-Studien zeigten für diese MmLPAAT eine spezifische Acylierung von Lyso-PtdOH mit Arachidonyl-CoA (20:4n-6-CoA; Kume und Shimizu, 1997). Die Datenbanksuche mit den Sequenzen AtLPAAT1 bis AtLPAAT5, CeLPAAT und MsLPAAT als Vorlagen ergaben als Ergebnisse jeweils ein homologes Protein aus *O. lucimarinus* (OILPAAT), *O. tauri* (OtLPAAT) und *P. patens* (PpLPAAT; siehe Abb. 8).

Im Laufe der Arbeiten zur Identifizierung von LPCAT aus VLCPUFA-akkumulierenden Organismen wurde die LPCAT *ALE1* aus der Hefe *S. cerevisiae* beschrieben, bei der zweifelsfrei eine Kopfgruppenspezifität für PtdCho vorliegt (Benghezal et al., 2007; Chen et al., 2007; Jain et al., 2007; Riekhof et al., 2007a; Riekhof et al., 2007b; Tamaki et al., 2007). Zusätzlich handelt es sich bei Ale1p um ein Protein, das keine ausgeprägte Sequenzhomologie zu MmLPAAT zeigt. Basierend auf der Sequenzinformation der LPCAT aus *S. cerevisiae* wurden in entsprechenden Datenbanksuchen drei mutmaßliche LPCAT aus *P. patens* (PpLPCAT1-3), zwei aus *A. thaliana* (AtLPCAT1 und AtLPCAT2) und jeweils eine LPCAT aus *O. lucimarinus* (OILPCAT) und *O. tauri* (OtLPCAT) identifiziert (siehe Abb. 8).

Vertreter dieser Enzymfamilie sind in vielen eukaryoten Organismen, wie Hefen, Invertebraten, Pflanzen und Tieren zu finden. Sie gehören einer gemeinsamen Superfamilie an, den sogenannten membranständigen-*O*-Acyltransferasen (*membrane-bound O-acyl transferases*, *MBOAT*), die ein breites Spektrum verschiedener Acyltransferasen umfassen. Neben LPCAT gehören dieser Superfamilie auch Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (DGAT), Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferasen (ACAT), Acyl-CoA:Sterin-Acyltransferasen (ASAT) oder Wachs-Synthasen an (Hofmann, 2000). Außer einem konservierten Histidin-Rest innerhalb eines relativ großen hydrophoben Aminosäuresequenzabschnitts existieren keine besonders stark ausgeprägten Aminosäuresequenz-Homologien innerhalb der MBOAT-Superfamilie. Die gemeinsame katalytische Aktivität der Enzymfamilie besteht in dem Transfer organische Säuren auf Hydroxylgruppen membranständiger Akzeptoren.

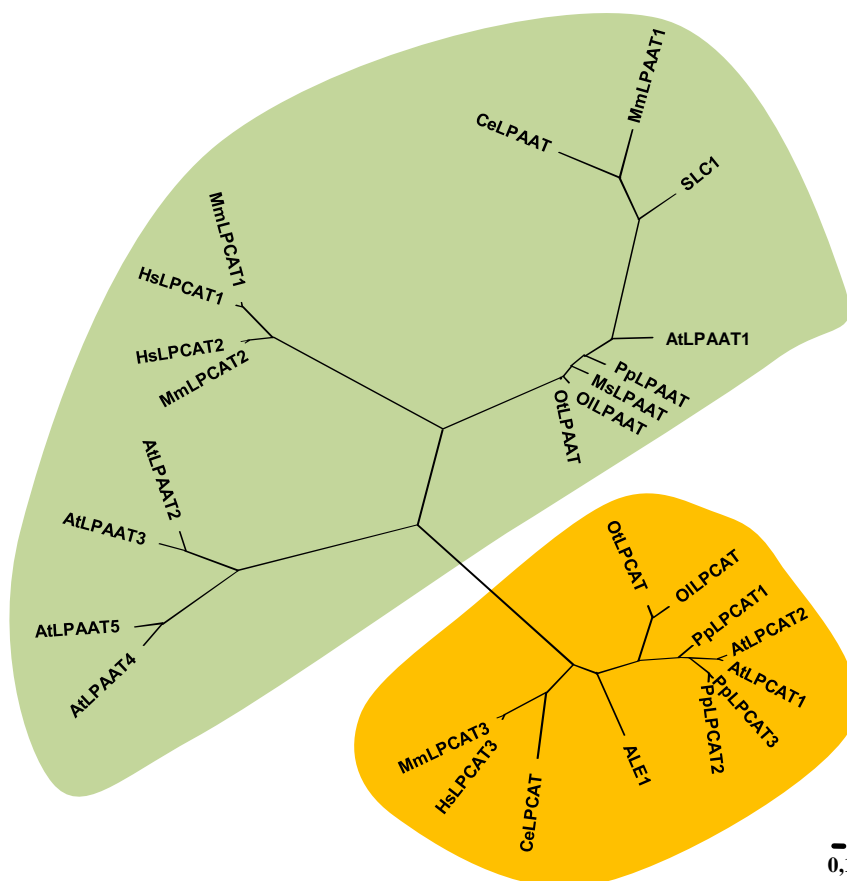


Abb. 8 Phylogramm der LPAAT und LPCAT aus Pflanzen, Hefen, Invertebraten und Säugern.

Das Phylogramm zeigt neben bereits funktional identifizierten Enzymen auch die in dieser Arbeit identifizierten möglichen LPAAT und LPCAT sowie einige funktional noch nicht charakterisierte Enzyme, deren Sequenzen aus verschiedenen genomischen Datenbanken entnommen wurden und aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den LPAAT- und LPCAT-Proteinen dem Phylogramm hinzugefügt wurden. Grün hinterlegt ist die LPAAT/LPCAT-Familie, die den gelb hinterlegten LPCAT der MBOAT-Superfamilie gegenüberstehen. Die Genbank-Identifikationsnummern sind im Anhang 7 aufgeführt. Details zur Berechnung und Erstellung des Phylogramms können dem Abschnitt 2.4 entnommen werden. Die Skala gibt einen Sequenzunterschied von 10 % wieder (*number of replacement*).

Das in Abb. 8 dargestellte Phylogramm wurde aus einem Aminosäuresequenz-Alignment LPAAT- und LPCAT-ähnlicher Proteine berechnet. Die LPCAT aus Hefe bildet zusammen mit den Homologen aus Invertebraten, Säugern und Pflanzen eine monophyletische Gruppe (gelb hinterlegt). Diese Gruppe teilt sich auf, wobei die pflanzlichen LPCAT und die LPCAT aus Säugern und Invertebraten jeweils eine eigene Subfamilie bilden. Die LPCAT aus Hefe gruppiert zwischen den beiden Subfamilien.

Den LPCAT der MBOAT-Superfamilie steht die LPAAT/LPCAT-Familie der Invertebraten, Säugern und Pflanzen gegenüber (grün hinterlegt). Zwischen beiden Enzymfamilien besteht keine erkennbare Sequenzhomologie. Innerhalb der LPAAT/LPCAT-Familie teilen sich die Sequenzen ebenfalls auf; in pflanzliche am ER lokalisierte LPAAT (AtLPAAT2 bis 5), in plastidäre LPAAT aus Algen, Moos und *A. thaliana* sowie die LPAAT/LPCAT aus Säugern und Invertebraten.

3.2.2 Sequenzanalyse der LPAAT-Homologen aus Mikroalgen und Moos

Aus dem Moos *P. patens* sowie aus den beiden Mikroalgen *O. tauri* und *O. lucimarinus* wurden insgesamt drei offene Leserahmen mit hoher Sequenzhomologie zu MsLPAAT und AtLPAAT1 bei der Datenbanksuche identifiziert. Der offene Leserahmen der möglichen PpLPAAT hat eine Länge von 1119 bp, welcher für ein Polypeptid von 372 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 40,5 kDa codiert. Die offenen Leserahmen der beiden möglichen LPAAT OtLPAAT und OILPAAT haben je einer Länge von 645 bp, die jeweils für ein Polypeptid von 214 Aminosäuren codieren. Mit einem Molekulargewicht von 23,8 kDa bzw. 24,1 kDa unterscheiden sie sich deutlich von PpLPAAT.

Eine bioinformatische Analyse der Polypeptidsequenzen ergibt für PpLPAAT Hinweise auf eine N-terminal gelegene Signalsequenz für die Lokalisierung in Chloroplasten oder Mitochondrien (WoLF PSORT; Horton et al., 2007). Dagegen wird für MsLPAAT, OtLPAAT und OILPAAT eine Lokalisierung im Cytoplasma vorhergesagt. Allerdings sind letztere Vorhersagen nur unter Vorbehalt zulässig, da LPAAT als membranständige Enzyme gelten und bislang keine verlässlichen Methoden für Vorhersage der Lokalisation von Membranproteinen existieren.

Abb. 9 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei möglichen LPAAT mit den bereits identifizierten AtLPAAT1, CeLPAAT und Slc1p. Die dargestellten Proteine dieser Enzymfamilie weisen eine relativ hohe Ähnlichkeit zueinander auf, dies gilt insbesondere innerhalb der pflanzlichen Vertreter dieser Familie. Diese Ähnlichkeit zeigt sich vor allem anhand mehrerer konservierter Bereiche, die sich über die gesamte Aminosäuresequenz erstrecken. Lediglich im N- und C-terminalen Bereich sind die Sequenzen weniger stark konserviert. Die höchsten Übereinstimmungen weisen OtLPAAT und OILPAAT mit 84 % Identität auf. Die MsLPAAT der nah verwandten Alge *M. squamata* weist mit 66 % bzw. 63 % Identität zu OtLPAAT und OILPAAT ebenfalls eine hohe Übereinstimmung auf. PpLPAAT zeigt die höchste Übereinstimmung mit 60 % zu MsLPAAT. PpLPAAT, OtLPAAT und OILPAAT haben zu der bekannten plastidären AtLPAAT1 Identitätswerte zwischen 41 % und 50 %. Diese relativ hohe Übereinstimmung ist insofern interessant, als AtLPAAT1 eine essenzielle Funktion während der Embryogenese zugeschrieben wird. Es wurde beobachtet, dass homozygote *A. thaliana* LPAAT1-Mutanten keinen normal entwickelten Samen ausbilden, da die Embryogenese bereits in einer sehr frühen Phase (Herz-Torpedo-Stadium) zum Stillstand kommt (Kim und Huang, 2004).

LPAAT weisen mindestens vier charakteristische, hochkonservierte Aminosäure-Motive auf, die als Bestandteil des katalytischen Zentrums für die Funktion der Enzyme essenziell sind und in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Tieren anzutreffen sind (Heath und Rock, 1998; Lewin et al., 1999; Kim und Huang, 2004). Die identifizierten, möglichen LPAAT aus *O. lucimarinus*, *O. tauri* und *P. patens* besitzen ebenfalls diese für LPAAT charakteristischen Sequenzen. In Abb. 9 sind diese hochkonservierten Aminosäure-Motive dargestellt (schwarze Balken I bis IV). Während die beiden Motive NHXSXXD und FPEGTR (I und II in Abb. 9) charakteristisch für die gesamte LPAAT/LPCAT-Familie sind, scheinen die konservierten Bereiche III und IV dagegen nur bei wenigen Proteinen der LPAAT/LPCAT-Familie aufzutreten.

3. Ergebnisse

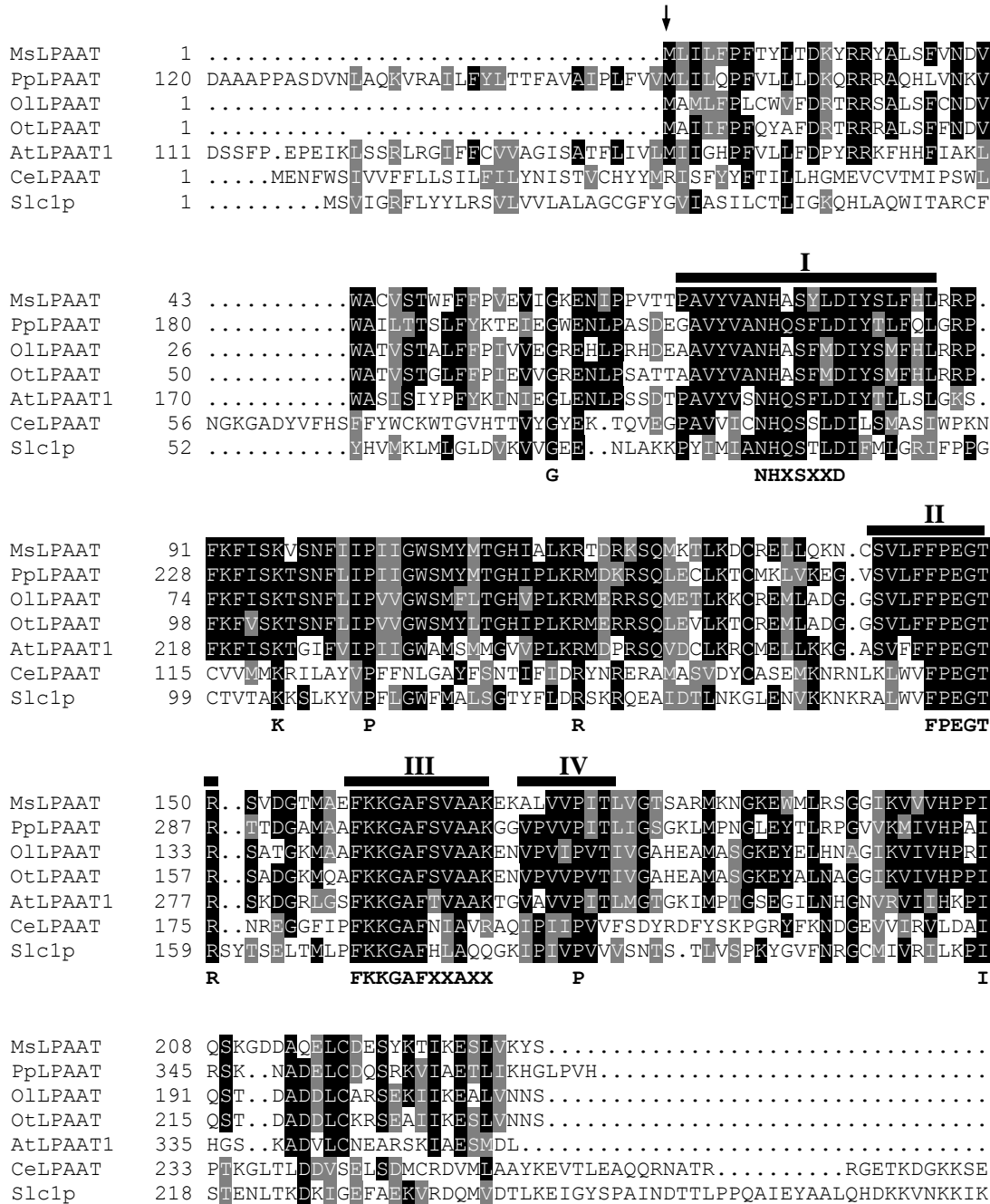


Abb. 9 Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Vertretern der LPAAT/LPCAT-Familie.

Vergleich der Aminosäuresequenzen der LPAAT-Homologen aus *O. tauri*, *O. lucimarinus* und *P. patens* mit bekannten LPAAT aus *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *M. squamata*. Das Alignment zeigt für PpLPAAT, AtLPAAT1 und Slc1p nicht die vollständigen Aminosäuresequenzen, sondern nur die Bereiche mit ausgeprägter Ähnlichkeit zu den anderen LPAAT. Die konservierten Bereiche der LPAAT/LPCAT-Familie mit den charakteristischen Sequenzmotiven sind durch schwarze Balken gekennzeichnet (I, II, III und IV). Hochkonservierte Aminosäuren sind unterhalb des Alignments dargestellt. Das Alignment wurde mit dem Programm VecorNTI[®] Suite v10.0 errechnet und das Abbild wurde durch das Programm Boxshade 3.21 erzeugt.

3.2.3 Versuche zur funktionalen Charakterisierung der LPAAT-Homologen aus *M. squamata* und *P. patens*

Die Aufklärung einer Genfunktion kann prinzipiell auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen besteht die Möglichkeit des partiellen oder vollständigen Ausschaltens des zu untersuchenden Gens in dem Organismus, in dem das Gen identifiziert wurde. Der Vergleich des Phänotyps von Wildtyp und dem mutierten Organismus liefert Hinweise auf die stoffwechselphysiologische Funktion des Gens. Eine weitere Möglichkeit stellt die funktionale Expression eines Gens in einem heterologen System dar. Durch die Analysen der resultierenden Phänotypen in den transgenen Organismen können Rückschlüsse auf die Funktion des Gens im Ursprungsorganismus gezogen werden. Für die heterologe Expression von Genen, deren Genprodukte als Reaktionsumgebung das eukaryote Endomembransystem benötigen, ist der Hefestamm *S. cerevisiae* besonders gut geeignet. Enzyme, die am Lipid-Stoffwechsel beteiligt sind, lassen sich in Hefen aus mindestens zwei Gründen besonders gut untersuchen. Zum einen lässt sich die Fettsäurezusammensetzung von *S. cerevisiae* leicht modifizieren. Hefe ist in der Lage exogene Fettsäuren aus dem Nährmedium aufzunehmen, sie in den Lipid-Stoffwechsel zu integrieren und diese exogenen Fettsäuren in seine Lipide zu inkorporieren. Solche exogenen Fettsäuren können den zu untersuchenden Enzymen als mögliche Substrate oder Substratvorstufen dienen. Ein zweiter Grund besteht in dem relativ schlichten Fettsäuremuster der Hefe. Die endogenen Fettsäuren der Hefe setzen sich lediglich aus den gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure bzw. den einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitolein- und Ölsäure zusammen, so dass sich die exogen zugeführten Fettsäuren, wie LCPUFA und VLCPUFA, leicht von den hefeeigenen Fettsäuren unterscheiden lassen. Für die funktionale Charakterisierung von Genen im Rahmen dieser Arbeit wurden die dargestellten Möglichkeiten miteinander kombiniert.

Nach der Identifizierung von geeigneten Kandidatengen aus VLCPUFA-produzierenden Organismen in den Datenbanken wurden deren Homologe aus dem Genom von *S. cerevisiae* entfernt bzw. vorhandene Deletionsmutanten der Euroscarf-Kollektion (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Anschließend wurden deren biochemische Phänotypen charakterisiert. Die heterologe Expression der Kandidatengene aus pflanzlichen VLCPUFA-produzierenden Organismen in den Hefe-Deletionsmutanten sollte den beobachteten Stoffwechseldefekt kompensieren können, um Hinweise auf die stoffwechselphysiologische Funktion im Ursprungsorganismus zu erhalten.

Über die weitere biochemische Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften sollte eine Bewertung hinsichtlich der Eignung der Kandidatengene für die Beteiligung an der VLCPUFA-Biosynthese in höheren Pflanzen erfolgen.

Zur funktionalen Charakterisierung von MsLPAAT und PpLPAAT wurden deren cDNA-Sequenzen jeweils stromabwärts eines Galaktose-induzierbaren Promotors des Hefe-Expressionsvektors pESC-URA kloniert. Die $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und die $\Delta 6$ -Elongase PSE1 wurden zusammen in den Hefe-Expressionsvektor pESC-LEU kloniert; ebenfalls unter Kontrolle je eines Galaktose-induzierbaren Promotors.

3.2.3.1 Funktionale Charakterisierung der LPAAT-Homologen in *S. cerevisiae*

Zur Identifizierung der Funktionen der LPAAT-Homologen MsLPAAT aus *M. squamata* und PpLPAAT aus *P. patens* wurden die cDNA-Sequenzen jeweils in *S. cerevisiae* exprimiert. Hierfür wurden die Hefen entweder mit dem Leervektor pESC-URA oder eines der Expressionskonstrukte pESC-URA-PpLPAAT oder pESC-URA-MsLPAAT transformiert. Zusätzlich wurden dieselben Hefen mit dem Expressionskonstrukt pESC-LEU-Pt $\Delta 6$ -PSE1 transformiert. Durch diese Cotransformation der pESC-URA- und pESC-LEU-Expressionskonstrukte sollten transgene Hefen erzeugt werden, die in der Lage sind, VLCPUFA zu synthetisieren. Der Vergleich der Fettsäureprofile von transgenen Hefen, die das Expressionskonstrukt pESC-LEU-Pt $\Delta 6$ -PSE1 und den Leervektor pESC-URA enthielten, mit den Hefen, die neben dem Expressionskonstrukt pESC-LEU-Pt $\Delta 6$ -PSE1 zusätzlich eines der LPAAT-Kandidatengene trugen, sollte die vermutete Beteiligung der MsLPAAT bzw. PpLPAAT am VLCPUFA-Stoffwechsel darstellen.

Von besonderem Interesse ist dabei, ob die LPPAT-Aktivität das Zusammenspiel der Aktivitäten der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ aus *P. tricornutum* (Domergue et al., 2002) und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 aus *P. patens* (Zank et al., 2002) verbessern kann. Die für diese Versuche gewählte $\Delta 6$ -Desaturase nutzt an PtdCho gebundene Fettsäuren als Substrate und die gewählte $\Delta 6$ -Elongase nutzt an CoA gebundene Fettsäuren als Substrate (Domergue et al., 2003). Beide Enzyme haben insofern aufeinander abgestimmte Substratspezifitäten, als die $\Delta 6$ -Desaturase und die $\Delta 6$ -Elongase nur geringfügig um das Substrat konkurrieren und die $\Delta 6$ -Desaturase das bevorzugte Substrat der $\Delta 6$ -Elongase produziert. Damit die $\Delta 6$ -Elongase ausreichend mit Substrat versorgt wird, muss folglich ein effizienter Transfer des an PtdCho gebildeten Substrates auf CoA erfolgen.

Aus dem Genom des verwendeten Hefestamms wurde das *SLC1*-Gen entfernt, das vermutlich auch für diesen Transfer verantwortlich sein könnte und eine hohe Homologie zu MsLPAAT und PpLPAAT aufweist (Nagiec et al., 1993). Somit sollte ein mutmaßlicher Phänotyp des *SLC1*-defizienten Hefestamms durch die heterologe Expression von MsLPAAT oder PpLPAAT kompensiert werden. Der Hefestamm BY4741 wurde mit dem Expressionskonstrukt pESC-LEU-Pt Δ 6-PSE1 und dem Leervektor pESC-URA transformiert. Die Deletionsmutante BY4741 *slc1* Δ wurde mit dem Expressionskonstrukt pESC-LEU-Pt Δ 6-PSE1 und pESC-URA-MsLPAAT oder pESC-URA-PpLPAAT oder pESC-URA als Leervektor-Kontrolle transformiert. Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (2.20). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte auch die Applikation von 18:2*n*-6. Diese Fettsäure stellt das Substrat der Desaturase Pt Δ 6 dar, das zu dem bevorzugten Substrat 18:3*n*-6 der Elongase PSE1 desaturiert wird. Die Expression erfolgte für 48 h bei 22 °C. Weder die Applikation von 18:2*n*-6 noch die Überexpression der drei Gene führten zu einer Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Die Ernte der Hefezellen und die Derivatisierung der Fettsäuren wurden wie in den Abschnitten 2.20 und 2.28 beschrieben durchgeführt. In Abb. 10 und Abb. 11 sind Ausschnitte der Fettsäureprofile von transgenen Hefekulturen nach Coexpression von MsLPAAT bzw. PpLPAAT mit Pt Δ 6 und PSE1 in Gegenwart von 250 μ M 18:2*n*-6 dargestellt. Die abgebildeten Gaschromatogramme zeigen neben den hefeeigenen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren 18:0, 18:1*n*-9, 18:1*n*-7, dass große Mengen der exogen applizierten Fettsäure 18:2*n*-6 von den Hefezellen aufgenommen wurden. Exogene Fettsäuren werden von den Hefezellen nach der Aufnahme sofort auf CoA übertragen. In dieser aktivierten Form sind sie dem Lipid-Stoffwechsel der Hefe zugänglich. Der Anteil der hefeeigenen Fettsäure 18:1*n*-7 am Gesamtfettsäuregehalt der Expressionskulturen war aufgrund der PSE1-Aktivität leicht erhöht. PSE1 besitzt keine ausgeprägte Substratspezifität, die sich auf eine einzelne C16- oder C18-Fettsäure beschränkt. Das Enzym akzeptiert verschiedene C16- und C18-Fettsäuren als Substrate, allerdings mit stark unterschiedlicher Affinität. Im Allgemeinen werden die C18-Fettsäuren mit einer Doppelbindung in der Δ 6-Position gegenüber den anderen gesättigten und ungesättigten C16- und C18-Fettsäuren deutlich bevorzugt als Substrate verwendet (Zank et al., 2002). In den Fettsäureprofilen waren außerdem das Desaturaseprodukt 18:3*n*-6 und die Elongaseprodukte 20:2*n*-6 und 20:3*n*-6 zu erkennen. 20:2*n*-6 entstand als Nebenprodukt durch die direkte Elongation der applizierten Fettsäure 18:2*n*-6 durch PSE1.

PSE1 besitzt ein breites Fettsäuresubstrat-Spektrum, weist allerdings auch eine Fettsäuresubstrat-Selektivität für 18:3n-6 und 18:4n-3 auf (Zank et al., 2002). 20:3n-6 hingegen konnte nur aus dem Desaturaseprodukt 18:3n-6 entstehen, nachdem 18:3n-6 von PtdCho, dem Reaktionspartner der Desaturase, auf CoA, dem Reaktionspartner der Elongase übertragen wurde. In Abb. 10 und Abb. 11 ist die katalytische Effizienz der beteiligten Enzyme in den verschiedenen Expressionskulturen dargestellt. Die Werte bilden den prozentualen Anteil des Substrats ab, der durch die enzymatische Aktivität eines Enzyms umgesetzt wurde. Der Umsatz der exogenen Fettsäure 18:2n-6 erfolgte unabhängig vom Genotyp des Expressionswirts in allen Kulturen mit vergleichbarer Effizienz. In den Expressionskulturen der Versuche in Abb. 10 lag die Umsetzung von 18:2n-6 im Wildtyp bei etwa 13 % und in der *slc1Δ*-Mutante bei 11 %. Die Elongationseffizienz von 18:2n-6 lag im Wildtyp mit 7,5 % unterhalb der entsprechenden Werte der *slc1Δ*-Mutante mit 11 % für Kulturen mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA und 11 % mit dem Expressionskonstrukt pESC-URA-MsLPAAT. Unterschiede in den Elongationseffizienzen waren hingegen für die Fettsäure 18:3n-6 zu beobachten. Während in den Kulturen des Wildtyps 18:3n-6 zu 34 % umgesetzt wurde, erreichte die Elongation von 18:3n-6 in den Kulturen der *slc1Δ*-Mutante einen geringeren Wert von 24 %. Die geringere Elongation von 18:3n-6 zu 20:3n-6 durch die $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in Abwesenheit von *SLC1* könnte einen ineffizienteren Transfer der Fettsäure 18:3n-6 von PtdCho auf CoA widerspiegeln. Durch den resultierenden, niedrigeren Anteil von 18:3n-6 im CoA-Pool steht der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 weniger Substrat zur Verfügung. Die Expression von MsLPAAT schien keinen Einfluss auf die Elongation von 18:3n-6 zu haben, da in diesen Kulturen die Elongationseffizienz ebenfalls bei 24 % lag.

Eine vergleichbare Situation ergab die Analyse des Fettsäureprofils nach heterologer Expression von PpLPAAT (Abb. 11). Während die Elongationseffizienz von 18:3n-6 im Wildtyp 48 % betrug, lagen die entsprechenden Werte der *slc1Δ*-Mutante für Kulturen mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA bei 36 % und mit dem Expressionskonstrukt pESC-URA-MsLPAAT bei 34 %. Für die übrigen enzymatischen Reaktionen, die bei diesem Versuchsaufbau betrachtet wurden, ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Fettsäureprofil nach Expression von PpLPAAT im Vergleich zu den *SLC1*-defizienten Hefekulturen mit dem Leervektor pESC-URA als Kontrolle. Bei den in Abb. 11 gezeigten Daten handelt es sich nicht um die Expression des kompletten offenen Leserahmens von PpLPAAT, sondern um eine N-terminal verkürzte Variante, die ein im offenen Leserahmen von PpLPAAT natürlich vorkommendes ATG-Triplett als Start-Codon nutzt.

Die Position dieses für das Experiment genutzten, mutmaßlich artifiziellen, initialen Methionins ist in Abb. 9 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die relative Position dieses Methionins innerhalb des in Abb. 9 gezeigten Aminosäure-Sequenzalignments stimmt mit den relativen Positionen der initialen Methionine von MsLPAAT, OtLPAAT und OILPAAT sowie der relativen Position eines internen Methionins von AtLPAAT1 überein. Wie in Abschnitt 3.2.2 dargestellt, enthält PpLPAAT vermutlich ein N-terminal gelegenes Signalsequenz für die Lokalisierung in Chloroplasten oder Mitochondrien, das sich stromaufwärts des in Abb. 9 durch einen Pfeil gekennzeichneten Methionins befindet. Die in einem weiteren Experiment durchgeführte heterologe Expression des gesamten offenen Leserahmens von PpLPAAT führte ebenfalls nicht zu einer Steigerung der Elongationseffizienz von 18:3n-6 (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend gilt: Durch die heterologe Expression in Hefe ergaben sich für die beiden Kandidatengene MsLPAAT und PpLPAAT keine Hinweise für einen positiven Einfluss auf die VLCPUFA-Syntheseleistung. Möglicherweise besitzen diese Enzyme eine reine LPAAT-Aktivität, d.h., sie könnten in den Ursprungsorganismen ausschließlich an der Synthese von PtdOH beteiligt sein. LPAAT-Aktivitäten könnten jedoch durchaus zu einer gesteigerten Akkumulation definierter Fettsäuren Samenöl beitragen, indem sie als Teil der TAG-Synthese entlang des Kennedy-Weges solche Fettsäuren vermehrt aus dem CoA-Pool entnehmen und diese auf Lyso-PtdOH transferieren. Aus dem so gebildeten PtdOH könnte TAG entstehen, das an der *sn*-2-Position mit einer definierten Fettsäure angereichert ist. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch eine Enzymaktivität gesucht wurde, die am Fettsäureaustausch zwischen CoA-Pool und PtdCho-Pool beteiligt sein sollte, wurde die Darstellung der tatsächlichen Funktionen von MsLPAAT und PpLPAAT zugunsten der weiteren Problemstellungen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

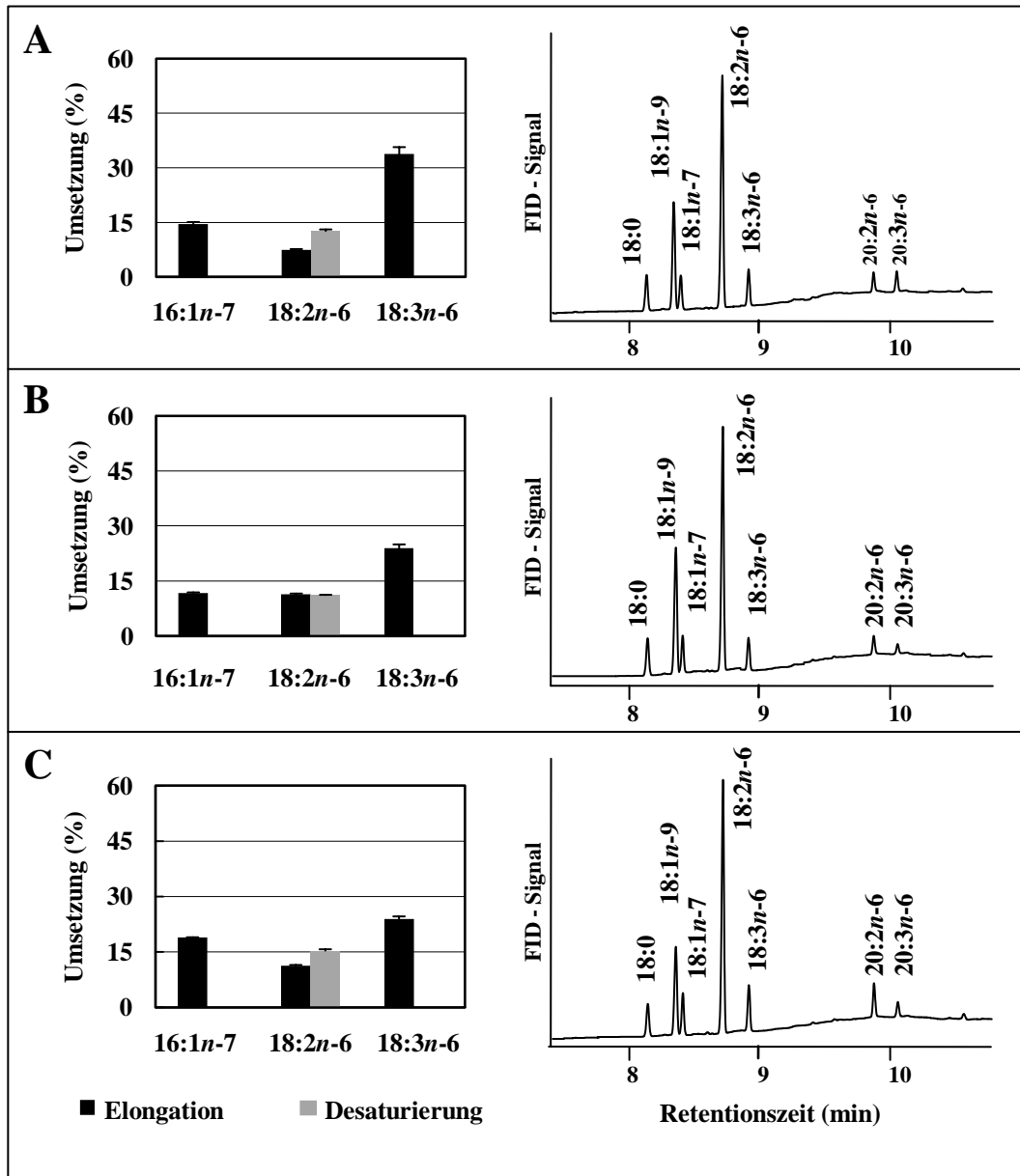


Abb. 10 Heterologe Expression der MsLPAAT in *S. cerevisiae*.

Die MsLPAAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in Gegenwart von $250 \mu\text{M}$ $18:2n-6$ in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Hefen wurden für 48 h bei 22°C kultiviert. **(A)** BY4741 mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA **(B)** BY4741 *slc1* Δ mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA **(C)** BY4741 *slc1* Δ mit dem Expressionskonstrukt pESC-URA-MsLPAAT. Die Elongations- und Desaturierungseffizienz (Umsetzung %) wurde aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Fettsäure als $(100 \times \text{Produkt}) / (\text{Produkt} + \text{Edukt})$ berechnet. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen (links) und die Fettsäureprofile (rechts) repräsentierten die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

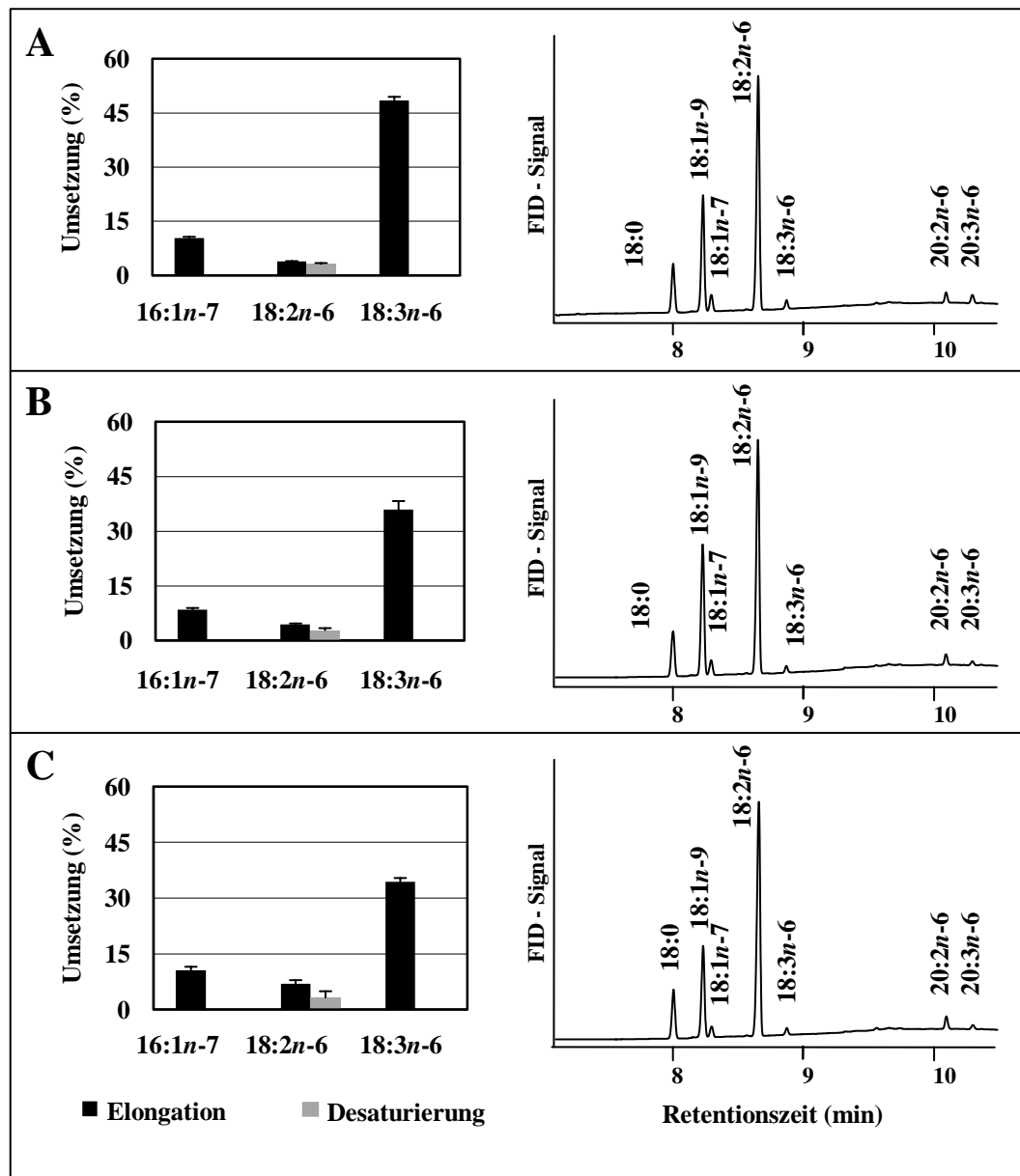


Abb. 11 Heterologe Expression der PpLPAAT in *S. cerevisiae*.

Die PpLPAAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in Gegenwart von 250 μM 18:2n-6 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Hefen wurden für 48 h bei 22 °C kultiviert. (A) BY4741 mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA (B) BY4741 *slc1* Δ mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA (C) BY4741 *slc1* Δ mit dem Expressionskonstrukt pESC-URA-PpLPAAT. Die Elongations- und Desaturierungseffizienz (Umsetzung %) wurde aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Fettsäure als $(100 \times \text{Produkt}) / (\text{Produkt} + \text{Edukt})$ berechnet. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen (links) und die Fettsäureprofile (rechts) repräsentierten die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Sequenzanalyse der LPCAT aus *O. lucimarinus*

Der aus der Datenbanksuche erhaltene offene Leserahmen der OILPCAT mit 1209 bp codiert für ein Protein mit 402 Aminosäuren. Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 45,1 kDa. Die Aminosäuresequenz von OILPCAT weist mit 68 % die höchste Identität zu einer bisher nicht charakterisierten LPCAT aus der nah verwandten Mikroalge *O. tauri* auf. Ungleich niedrigere Identitäten bestehen zu den bereits charakterisierten LPCAT aus *S. cerevisiae* und *A. thaliana* (Riekhof et al., 2007b; Stahl et al., 2008). Zu Ale1p besteht eine Identität von 25 %, zu AtLPCAT1 und AtLPCAT2 bestehen Aminosäure-Identitäten von 33 % bzw. 32 %. Zu den ebenfalls bei der Datenbanksuche identifizierten, mutmaßlichen LPCATI bis III aus *P. patens* bestehen Aminosäuresequenz-Identitäten von 32 % für PpLPCATI und 34 % zu PpLPCATII und III. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von OILPCAT mit den Sequenzen aus *O. tauri*, *A. thaliana*, *P. patens* und *S. cerevisiae* ist in Abb. 12 dargestellt. Vertreter der MBOAT-Familie weisen zwei charakteristische, hochkonservierte Aminosäuren auf. Die erste hochkonservierte Position besteht entweder aus einem Histidin- oder Asparagin-Aminosäurerest und die zweite Position stets aus einem Histidin-Aminosäurerest, der inmitten eines längeren hydrophoben Bereichs innerhalb der Polypeptidkette liegt. Bei den untersuchten pflanzlichen LPCAT ist die erste hochkonservierte Position mit der Aminosäure Asparagin besetzt. Diese beiden hochkonservierten Aminosäuren werden als mögliche essenzielle Bestandteile des katalytischen Zentrums angesehen (Hofmann, 2000). Außerdem sind die in Abb. 12 dargestellten LPCAT-Homologen vermutlich am ER lokalisiert. Die Konzentration der basischen Aminosäurereste Lysin und Arginin am C-terminalen Ende mit den Konsensussequenzen KKXX, RKXX oder KKKXX sind in allen dargestellten Proteinen vertreten. Diese C-terminalen Konsensussequenzen fungieren als typische ER-Retentionssignale von Membranproteinen (Shin et al., 1991; Teasdale und Jackson, 1996). Eine Hydropathieanalyse der ER-lokaliserten, membranständigen LPCAT ist in Abb. 13 dargestellt. Im Hydropathie-Profil sind die typischen hydrophoben Bereiche der untersuchten LPCAT aus der MBOAT-Superfamilie zu erkennen. Hierbei liegen im N- und C-terminalen Bereich vier hydrophobe, transmembrane Bereiche (I, II, III und IV; schwarze Balken) und im mittleren Bereich des Proteins vermutlich zwei hydrophobe, periphere Membranbereiche (i, ii und iii; graue Balken) vor. Besonders deutlich ist der für MBOAT charakteristische, lange hydrophobe Abschnitt zu erkennen, in dem Teile des katalytischen Zentrums vermutet werden (Hofmann, 2000).


```

O1LPCAT      1 .....
OtLPCAT      1 MDAALDAAARWDDVVREVSIAALAPRGSTMFLLGLALAPVFGGFPPTIDWICGDDRARR
AtLPCAT1     1 .....MDMSSMAGSIGVSVAVLRFLLCFVATIPVSFACRIVP.....S
AtLPCAT2     1 .....MELLDMNSMAASIGVSVAVLRFLLCFVATIPISFLWRFIIP.....S
PpLPCAT1     1 .....MVTLEDVSSVLGYSVSVTRFLLCFVGSIPCSALAREMP.....S
PpLPCAT2     1 .....MITMRDVAGALGIGIFVLWFLMAFNASIPVSWLRRFVR.....G
PpLPCAT3     1 .....MEDVAGTLGIGVFPVLWFLASFVASIPVSWLWRRAF.....G
Ale1p        1 ...MYPVDAVITKIITNYGIDSFSTLRYATCLLGSFPLNAILKRIIP.....E.KRIG
    
```

```

O1LPCAT      1 .....MLSAAAFGRATVVCAHFGACAYATMLATRRRCGYVVVFAFSFAYLMR
OtLPCAT      61 AMCRSVYALLAGVALSLMSFG.RQTVVCAHFGAVAYAVMALARRRCGVVVVFLGSFAYLIR
AtLPCAT1     39 RLKGHLYAAASGAFLSYLSFGSSNLHFLVPMITIGYASMAIYRFPKCGIITFFLGFAYLIG
AtLPCAT2     42 RLKGHLYSAASGAFLSYLSFGSSNLHFLVPMITIGYASMAIYRPLSGFITFFLGFAYLIG
PpLPCAT1     40 GRVRSVYAVATGILLSSYYSFGPEANLFFIIPPLAVGYGSMLLAPRHCGAITFFVAFALLT
PpLPCAT2     40 VTARHLYAAASGALLSHCAFGEENLYLMVPICVSYGAMVVSRRMCGVISAVFAFGFLIY
PpLPCAT3     37 VAARHLYAAASGAFLAHCAFGEANLYMMIPICVSYGAMMLNRRMCGVVSATFAFGFLVY
Ale1p        49 LKCCFIISMSMFYIFGVNLVSGFRTLFIISTMFTYLIISRFYRSKFMPHLNFMEVMGHLAI
    
```

L

```

O1LPCAT      47 YHEVADTATAWKSCEVDISGLMLMVLVLKVTACALNYQDAATKASE...MSEFQNRRLHK
OtLPCAT      120 FHMADTANTWKAGEVDISGLMLMVMTLKVTACAMNYQDGATVAASE...MTEHQHRRHLK
AtLPCAT1     99 CHVFYMSGDAWKEGGIDSTGALMVLTLKVISCSMNYNDGMLKEEG...LREAQKKNRLI
AtLPCAT2     102 CHVFYMSGDAWKEGGIDSTGALMVLTLKVISCSMNYNDGMLKEEG...LREAQKKNRLI
PpLPCAT1     100 CHVMMLSGDAWKNGGIDTTGALMVLTLKVISASMSYQDGLVKKED...LRVSQKKNRLK
PpLPCAT2     100 CHVMFMSGDAWKS GGIDHTGSMVVLTLKVTSAAFNYQDGLIKDEES...LREAQKKSRLG
PpLPCAT3     97 CHVMFMSGDAWKS GGIDHTGSMVVLTLKVTSAAFNYQDGLIKDGDS...LREAQKKYRLI
Ale1p        109 NHHAQFLNEQTQTVDITSSQMVLMKLTSEAFWSYYDGSC TSE SDFKDLTEHQKSRAVR
    
```

H D MV K Y D Q

```

O1LPCAT      104 RLPSALDYASMLMFPCTLVSGPAIEFRDYSDWLRDRGVYAR.....GTP
OtLPCAT      177 TLPNVLDYASMLMFPCTLVSGPAVEFRDYSDWLNDRGVVWSG.....EAP
AtLPCAT1     155 QMPSLIEYFGYCLCCGSHFAGPVFEMKDYLEWTEGKGIWDITTE.....KRKKP
AtLPCAT2     158 QMPSLIEYFGYCLCCGSHFAGPVFEMKDYLEWTEEKGIWAVSE.....KGKRP
PpLPCAT1     156 ELPSLVQYLYGYCLNCGTHLAGPVYEIRDYIDWTEKGLWRSRDS.....ARPLP
PpLPCAT2     157 KLPSFLAYLGYCFNCGTILVGPVFEIRDYMDWTEKGLWDPQA.....ENQPP
PpLPCAT3     154 KBPSFIAYLGYCYNCGSILVGPVFEIRDYMDWTEKGLWDPKA.....EKRPP
Ale1p        169 GHEPLLKFLAYAFFYSTLLTGPSEFDYADFDSWLNCEMFRDLPESSKPKMRRHHPGERROIP
    
```

P GP D W P

```

O1LPCAT      148 NRVAPATRKLGLGAIACLGIIQAVAMRYTIENTYLNPSWA.QYSLAERLWHVYVYQGNRA
OtLPCAT      221 SRVAATAKFFGAATCVALFOVLSVKYTLSESVYLAPNWLTDYSFLERVWHMNVMGQTNRE
AtLPCAT1     203 SPYGATTRAILQAACMALYLYLVPOYPLT..RFTEPVYQEWGFLRKFSYQYMGFTARW
AtLPCAT2     206 SPYGATTRAVFQAACMALYLYLVPOYPLT..RFTEPVYQEWGFLRKFRGYQYMGFTARW
PpLPCAT1     204 SPYGAAIRALFOAALCMAVYMTLLPRIPLS..MFDSPYQKWFWRHRYGYMYSGLFTARW
PpLPCAT2     205 SPYFAAFLAAVKAFVCMGIYMYMTGTYPPLS..FLTTPYMKREFGFRVWYQILCGFGARW
PpLPCAT3     202 QPYGATFLVVVKAFTICMGIYMYITGTYPPLS..FLTEPDEMKGFWHRVGYQILCGFGARW
Ale1p        229 KNGKIALWKVVQGLAWMILSTLGMKHFPPVK.YVLDKDGEPTRSFIFRIHYLELLGFIFHRF
    
```

G R

```

O1LPCAT      207 KYFVWMMADFAATVSGLGFSGYD....AMGKARWDTAANIYPIGVEKSVTLNATPLSW
OtLPCAT      281 KYFVWMMADFAATVSGLGFSGYD....AKGVARFDTAANIHPLGCERAITLNSFPLSW
AtLPCAT1     261 KYFVWWSISEASIIISGLGFSGWTD...DDASPKPKWDRAKNVDILGVELAKSAVQIPLVW
AtLPCAT2     264 KYFVWWSISEASIIISGLGFSGWTD...DETQTKAKWDRAKNVDILGVELAKSAVQIPLVW
PpLPCAT1     262 KYFVWWSISEAVAVIISGLGFSGWATPDDDKKAKPLWTRAKNVDIMKVELAKSGVEIPLCW
PpLPCAT2     263 KYFVWWSISEAAVMISGFGFSGWKPTPSDEPKAKFSRAENVDIINVELATSAAEIPKYW
PpLPCAT3     260 KYFVWWSISEAAVMISGFGFSGWTKSASSDESKPQFSRAQNVDIINVELATSAAEIPKYW
Ale1p        288 KYVAAWIISEGSCILCGLGYNNGYDS...KTQKIRWDRVRNIDIWTVETAONTREMLEAW
    
```

KYY W G G G N E W

3. Ergebnisse

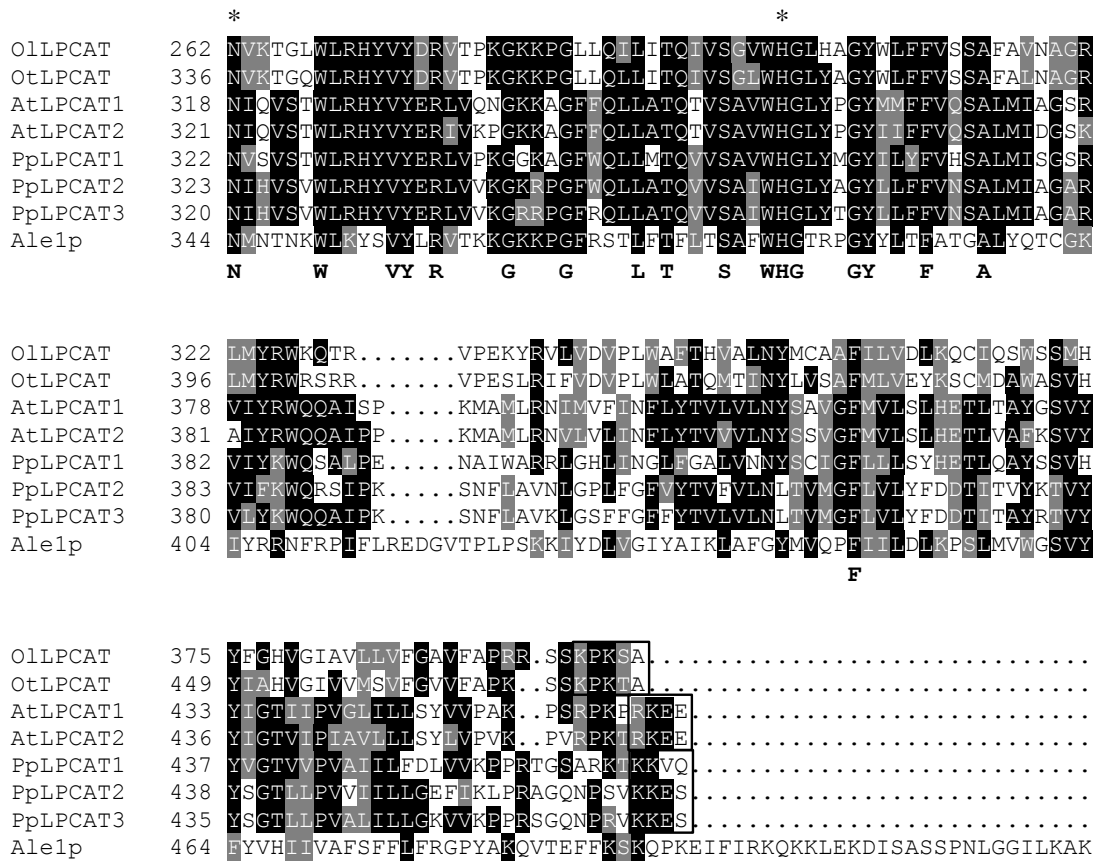


Abb. 12 Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Vertretern der LPCAT-Familie.

Vergleich der Aminosäuresequenzen der LPCAT-Homologen aus *O. tauri*, *O. lucimarinus* und *P. patens* mit bekannten LPCAT aus *A. thaliana* und *S. cerevisiae*. Es ist ein C-terminal verkürzter Ausschnitt von Ale1p dargestellt. Durch Sternchen sind Aminosäuren gekennzeichnet, die im katalytisch aktiven Zentrum vermutet werden. Die C-terminalen ER-Retentionssignale sind schwarz umrandet. Hochkonservierte Aminosäuren sind unterhalb des Alignments dargestellt. Das Alignment wurde mit dem Programm VecorNTI® Suite v10.0 errechnet und das Abbild wurde durch das Programm Boxshade 3.21 erzeugt.

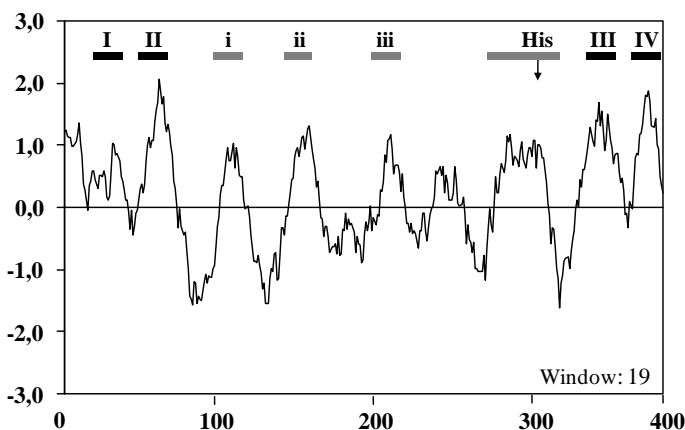


Abb. 13 Hydropathieanalyse der LPCAT aus *O. lucimarinus*.

Die mit römischen Zahlen versehenen schwarzen Balken kennzeichnen potenzielle transmembrane Helices (I bis IV). Potenzielle periphere Membranbereiche wurden mit grauen Balken in das Profil eingezeichnet und mit i bis iii gekennzeichnet. His, hochkonservierter Histidinrest. Das Hydropathie-Profil wurde mit Hilfe des Programms ProtScale berechnet (Gasteiger et al., 2005); die Vorhersage der transmembranen Bereiche erfolgte durch das Programm TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

3.2.5 Versuche zur funktionalen Charakterisierung der LPCAT aus *O. lucimarinus*

Zur funktionalen Charakterisierung der OILPCAT wurden Expressionsexperimente in *S. cerevisiae* durchgeführt. Der hierbei verwendete Versuchsaufbau entspricht prinzipiell dem in Abschnitt 3.2.3.1 geschilderten Ansatz. Anstelle der Deletionsmutante BY4741 *slc1Δ* wurde für die im Folgenden geschilderten Versuche die Deletionsmutante BY4741 *ale1Δ* verwendet. *ALE1* ist die hefeeigene LPCAT mit einer relativ hohen Homologie zu OILPCAT (siehe 3.2.4 und Riekhof et al., 2007b). Für die Expressionsstudien wurde die cDNA-Sequenz der OILPCAT stromabwärts eines Galaktose-induzierbaren Promotors des Hefe-Expressionsvektors pYES2/CT kloniert. Darüber hinaus wurde der offene Leserahmen der OILPCAT als synthetisches Gen von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen. Der synthetische offene Leserahmen wurde anschließend in den Hefe-Expressionsvektor pYES2/CT unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors kloniert.

Zur Darstellung der enzymatischen Funktion der OILPCAT wurden Coexpressionen mit einer pflanzliche Acyl-Lipid-Desaturase und einer pflanzlichen Elongase durchgeführt. Dazu wurden die $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und die $\Delta 6$ -Elongase PSE1 ebenfalls unter Kontrolle je eines Galaktose-induzierbaren Promotors zusammen in den Hefe-Expressionsvektor pESC-LEU kloniert. Für die homologe Komplementation der *ale1Δ*-Mutanten wurde ein Expressionskonstrukt verwendet, das den offenen Leserahmen von *ALE1* stromabwärts eines Galaktose-induzierbaren Promotors enthält. Dieses Expressionskonstrukt wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Ulf Ståhl (Department of Plant Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden) zur Verfügung gestellt.

3.2.5.1 Analyse der Proteinmenge von OILPCAT in *S. cerevisiae*

In einem ersten Ansatz zur funktionalen Charakterisierung der OILPCAT sollte überprüft werden, ob der Expressionswirt *S. cerevisiae* für die heterologe Expression des Gens aus *O. lucimarinus* geeignet ist. Dazu wurde mittels des *graphical codon usage analysers 2.0* (<http://gcu.schoedl.de/>; Fuhrmann et al., 2004) der Codongebrauch von *O. lucimarinus* und *S. cerevisiae* miteinander verglichen. Anhand des offenen Leserahmens von OILPCAT wurde gezeigt, dass *O. lucimarinus* und *S. cerevisiae* eine stark unterschiedliche Codonpräferenz aufweisen.

Da die Adaption des Codongebrauchs eines Fremdgens an den Codongebrauch von *S. cerevisiae* für eine erfolgreiche heterologe Expression zwingend erforderlich sein kann (Bennetzen und Hall, 1982; Hoekema et al., 1987), wurde der offene Leserahmen der OILPCAT als synthetisches Gen mit einem für die heterologe Expression in *S. cerevisiae* optimierten Codongebrauch von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen.

Um die Proteinmengen von OILPCAT in *S. cerevisiae* zu analysieren, wurden die native und die optimierte DNA-Sequenz von OILPCAT in einen Leserahmen mit dem V₅-Epitop des pYES2/CT-Vektors kloniert. Die so erstellten Expressionskonstrukte wurden für die Transformation des Hefestamms BY4741 *ale1Δ* eingesetzt. Die mit dem Expressionsvektor pYES2/CT transformierten Hefen BY4741 und BY4741 *ale1Δ* stellten hierbei die Leervektor-Kontrollen dar. Die Expression erfolgte für 20 h bei 30 °C. Die Überexpression der Gene führte zu keiner Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Der Zellaufschluss, die Präparation der Proteine im Anschluss an die Expression sowie der Western-Blot und die Immundetektion der Proteine wurden, wie in Abschnitt 2.22 beschrieben, durchgeführt. Die Proteine wurden mittels eines V₅-Antikörpers, der spezifisch das C-terminale V₅-Epitop detektiert, nachgewiesen (Abb. 14).

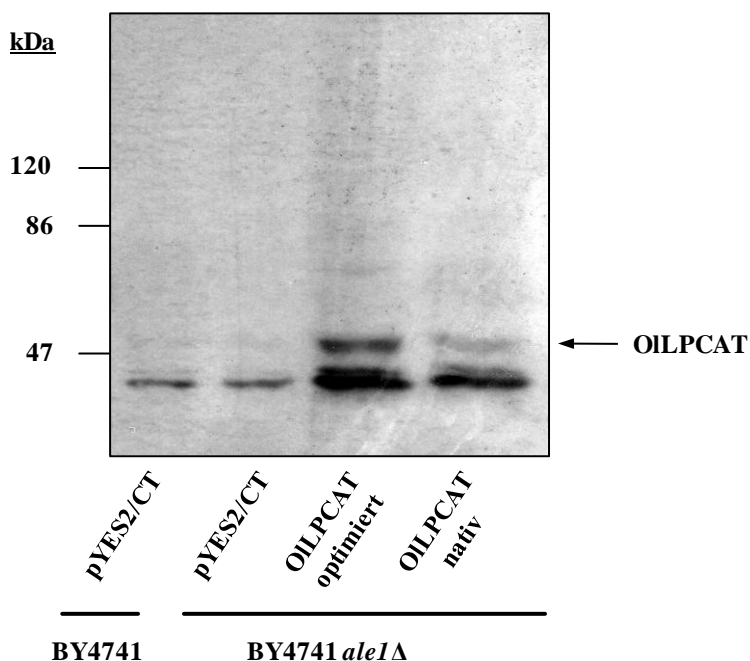


Abb. 14 Immundetektion von OILPCAT nach heterologer Expression in BY4741 *ale1Δ*.

Je 25 µg der Gesamtproteinextrakte aus *S. cerevisiae* wurden in ein-dimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einem Antiserum gegen das C-terminale V₅-Epitop inkubiert. Die unterschiedlichen Signalintensitäten ließen auf unterschiedliche Proteinmengen schließen. Das Molekulargewicht von OILPCAT beträgt inklusive des V₅-Epitops ca. 50 kDa. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Der für den Codongebrauch in Hefe optimierte offene Leserahmen von OILPCAT hatte eine höhere Proteinsyntheserate zur Folge. Die stärkere Signalintensität in den Proben mit der optimierten OILPCAT-Sequenz spiegelt eine wesentlich höhere Proteinmenge wider. Wie zu erwarten war, erfolgte in den Kulturen mit dem Expressionsvektor pYES2/CT als Leervektor-Kontrolle kein spezifischer Proteinnachweis. Aufgrund des Ergebnisses der Western-Blot-Analyse wurde für die folgenden Experimente der optimierte, offene Leserahmen verwendet. Dadurch war gewährleistet, dass in *S. cerevisiae* eine ausreichend hohe Proteinmenge für die Darstellung der enzymatischen Funktion von OILPCAT synthetisiert wird.

3.2.5.2 Funktionale Charakterisierung der OILPCAT in *S. cerevisiae*

Für die Versuche zu Darstellung der enzymatischen Funktion der OILPCAT wurde die Deletionsmutante BY4741 *ale1* Δ mit dem Expressionskonstrukt pESC-LEU-Pt Δ 6-PSE1 und pYES2/CT-OILPCAT bzw. pYES2-*ALE1* oder dem Expressionsvektor pYES2/CT als Leervektor-Kontrolle transformiert. Der Hefestamm BY4741 wurde mit dem Expressionskonstrukt pESC-LEU-Pt Δ 6-PSE1 und dem Expressionsvektor pYES2/CT als Leervektor-Kontrolle transformiert. Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (siehe 2.20). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte auch die Zugabe des Fettsäuresubstrats der Desaturase Pt Δ 6. Als Substrate wurden entweder 18:2 n -6 oder 18:3 n -3 eingesetzt. Mit diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob OILPCAT eine Fettsäure-Substratspezifität für PUFA aufweist. Die Expression erfolgte für 48 h bei 22 °C. Weder die Applikation von 18:2 n -6 oder 18:3 n -3 noch die Überexpression der Gene führten zu einer Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Die Ernte der Hefezellen und die Derivatisierung der Fettsäuren wurden, wie in 2.20 und 2.28 beschrieben, durchgeführt.

Abb. 15 zeigt Ausschnitte der Fettsäureprofile von transgenen Hefen nach Coexpression von Pt Δ 6 und PSE1 in Gegenwart von 250 μ M 18:2 n -6. Neben den hefeeigenen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren 18:0, 18:1 n -9, 18:1 n -7 und der exogen applizierten Fettsäure 18:2 n -6 sind die Produkte der Desaturase und Elongase zu erkennen. Die Desaturierung der exogenen Fettsäure 18:2 n -6 erfolgte unabhängig vom Genotyp des Expressionswirts in allen Kulturen mit vergleichbarer Effizienz (Abb. 15 A und B). Eine erhöhte Desaturierungseffizienz der Fettsäure 18:2 n -6 ergab sich mit etwa 12 % Umsetzung für Kulturen, die OILPCAT exprimierten (Abb. 15 C).

Die entsprechenden Werte lagen für die in Abb. 15 A, B und C gezeigten Hefekulturen zwischen 3 und 7 %. 18:2*n*-6 ist nicht nur das Substrat der Desaturase Pt Δ 6, sondern wird auch von der Elongase PSE1 als Substrat akzeptiert. Da die Fettsäure 18:2*n*-6 nach der Aufnahme durch die Hefezellen auf CoA übertragen wird und zuerst dem Acyl-CoA-Pool zugeführt wird, kann 18:2*n*-6 direkt zu 20:2*n*-6 elongiert werden. Die Elongationseffizienz von 18:2*n*-6 erreichte in Hefekulturen mit OILPCAT den höchsten Wert von etwa 18 %, verglichen 7 – 8 % für die Kulturen ohne OILPCAT bzw. mit *ALE1*. Abb. 15 A zeigt das Fettsäureprofil des Wildtyp-Hefestamms BY4741. Die Elongations-effizienz von 18:3*n*-6 betrug etwa 45 %. Damit erreichte die Elongationseffizienz des Wildtyps in etwa den doppelten Wert im Vergleich zu der Mutante BY4741 *ale1* Δ . In der Mutante wurden nur etwa 21 % des gebildeten 18:3*n*-6 zu 20:3*n*-6 elongiert (Abb. 15 B). In Gegenwart der OILPCAT erreichte die Elongationseffizienz von 18:3*n*-6 einen Wert von etwa 31 % (Abb. 15 C) und unterschied sich damit deutlich von dem Wert der Leervektor-Kontrolle. Die Steigerung der Elongationseffizienz in Gegenwart der OILPCAT spiegelt eine Beteiligung dieses Enzyms am Transfer von Fettsäuren zwischen Lipiden und CoA wider. Nach Expression von *ALE1* wurde eine äußerst starke Steigerung der Elongationseffizienz von 18:3*n*-6 in dem Hefemutantenstamm beobachtet (Abb. 15 D). Mit einem Wert von etwa 80 % erfolgte eine nahezu vollständige Elongation des gebildeten 18:3*n*-6 zu 20:3*n*-6. Dieser hohe Wert zeigt, dass der Transfer von 18:3*n*-6 auf CoA mit einer hohen Effizienz unter Beteiligung von Ale1p stattfindet. Darüber hinaus vermag Ale1p auch nicht-hefeeigene Fettsäuren als Substrate zu nutzen. Des Weiteren war der Anteil der Fettsäure 18:1*n*-7 am Gesamtfettsäuregehalt in Hefekulturen mit OILPCAT gegenüber den anderen Hefekulturen deutlich erhöht (Abb. 15 C). 18:1*n*-7 wird aus 16:1*n*-7 durch die Elongase PSE1 gebildet. PSE1 besitzt eine hohe Selektivität für Δ 6-PUFA, d.h., mehrfach ungesättigte C18-Fettsäuren, die eine Doppelbindung in der Δ 6-Position aufweisen, werden gegenüber anderen C18- und C16-Fettsäuren bevorzugt als Substrate verwendet (Zank et al., 2002). In der Literatur ist 16:3*n*-3 als die bislang einzige mehrfach ungesättigte C16-Fettsäure beschrieben, die als Substrat von der PSE1-Elongase akzeptiert wird (Zank et al., 2002). Ein gegenüber 18:2*n*-6 und 18:3*n*-6 deutlich erhöhter Anteil der Fettsäure 16:1*n*-7 im Acyl-CoA-Pool der Hefe könnte zur Akzeptanz dieser Fettsäure durch PSE1 führen und somit die vermehrte Bildung von 18:1*n*-7 erklären. Eine vergleichbare Situation ergab sich in Gegenwart der *n*-3-Fettsäuren 18:3*n*-3, 18:4*n*-3 und 20:4*n*-3 (Abb. 16).

Die Desaturierungseffizienz von 18:3n-3 lag in Hefekulturen mit OILPCAT bei etwa 13 % (Abb. 16 C) und war damit wesentlich höher als in den Kulturen des Wildtyps BY4741 (Abb. 16 A) oder den Kulturen der Mutante BY4741 *ale1*Δ mit oder ohne homolog exprimiertem *ALE1* (Abb. 16 B und D). Auch die direkte Elongation der applizierten Fettsäure 18:3n-3 erfolgte in den Hefekulturen mit OILPCAT am effizientesten. Im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle BY4741 *ale1*Δ mit pYES2/CT war die Elongationseffizienz in den OILPCAT-Kulturen um das 2,3-fache erhöht (Abb. 16 B und C). Deutliche Unterschiede waren ebenfalls für die Elongationseffizienzen von 18:4n-3 zu beobachten. Die *ale1*Δ-Mutante setzte 25 % des gebildeten 18:4n-3 zu 20:4n-3 um. Im Gegensatz dazu waren die Werte der Wildtyp-Kulturen mit 45 %, den OILPCAT-exprimierenden Kulturen mit 37 % und den *ALE1*-exprimierenden Kulturen mit 67 % eindeutig erhöht. Auch in dieser Versuchsreihe war der Anteil von 18:1n-7 am Gesamtfettsäuregehalt nach Coexpression der OILPCAT im Vergleich zu den anderen Kulturen deutlich erhöht (Abb. 16 C). Die partielle Komplementation des *ale1*Δ-Phänotyps zeigte die mögliche enzymatische Aktivität von OILPCAT auf. Die massive Steigerung der Elongationseffizienzen von 18:3n-6 und 18:4n-3 nach Expression von *ALE1* lässt vermuten, dass es sich bei den LPCAT der MBOAT-Superfamilie um die von Abbadi et al. (2004) geforderte, zusätzliche enzymatische Aktivität zur Steigerung der VLCPUFA-Synthese in transgenen Ölsaaten handeln könnte.

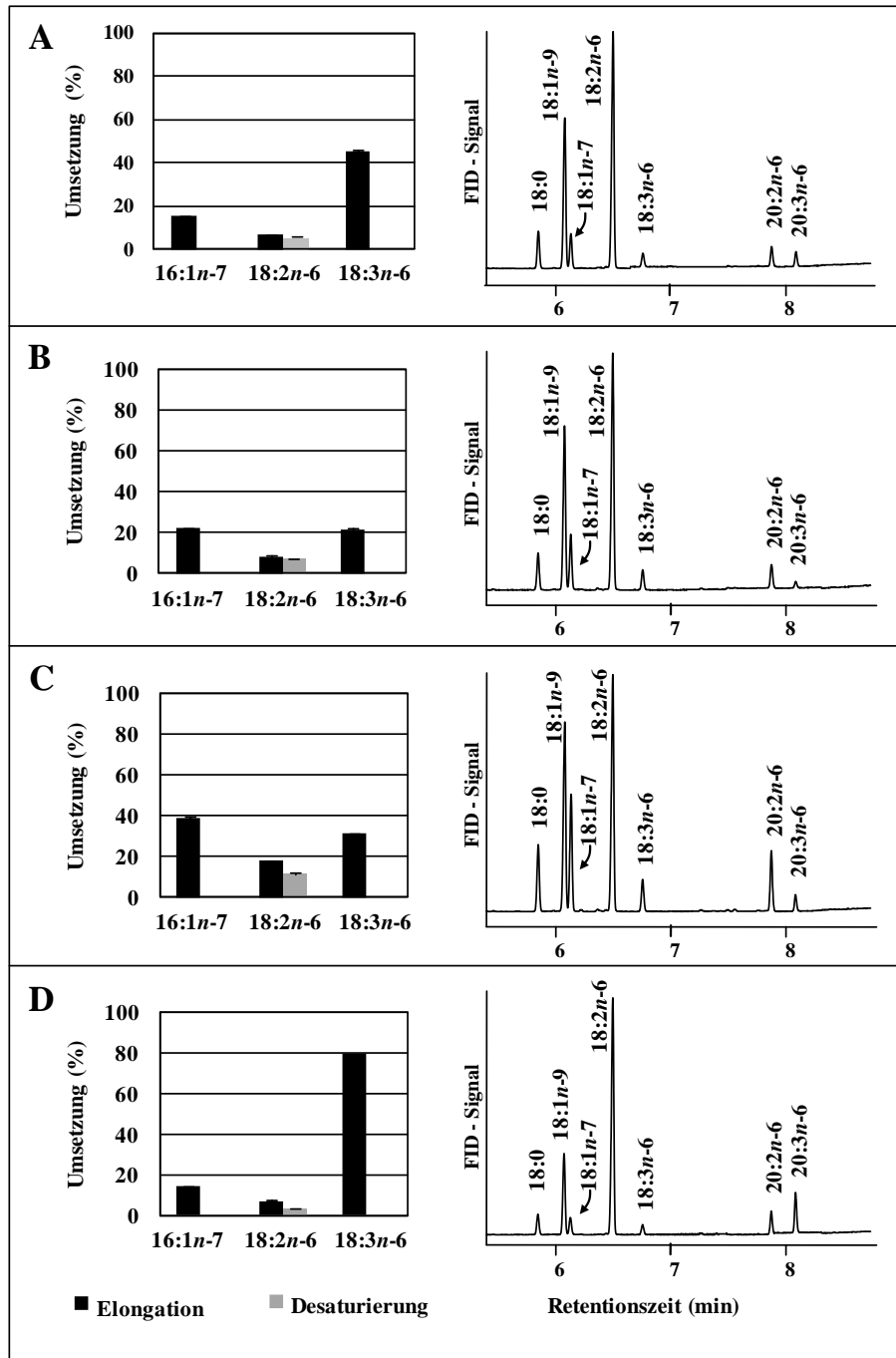


Abb. 15 Partielle Komplementation des *ale1Δ*-Phänotyps in Gegenwart von *n*-6-PUFA.

Die OILPCAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in Gegenwart von 250 μ M 18:2*n*-6 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Hefen wurden für 48 h bei 22 °C kultiviert. Die Zugabe der Fettsäure erfolgte nach 19 h. (A) BY4741 mit der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT; (B) BY4741 *ale1Δ* mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA; (C) BY4741 *ale1Δ* mit dem Expressionskonstrukt pYES2/CT-OILPCAT; (D) BY4741 *ale1Δ* mit dem Expressionskonstrukt pYES2-ALE1. Die Effizienz der Elongation und Desaturierung (Umsetzung %) wurde aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Fettsäure als $(100 \times \text{Produkt}) / (\text{Produkt} + \text{Edukt})$ berechnet. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen (links) und die Fettsäureprofile (rechts) repräsentierten die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

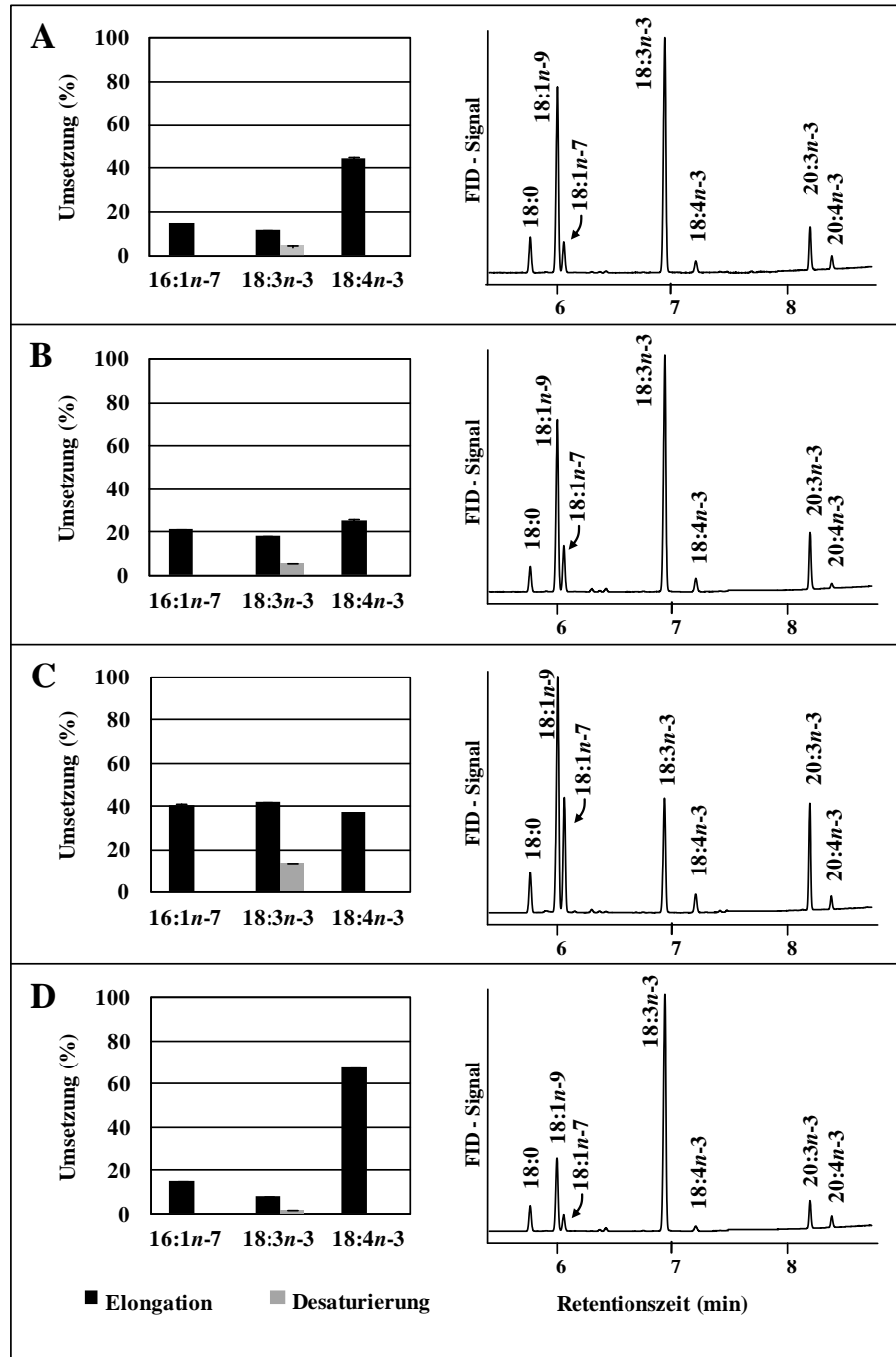


Abb. 16 Partielle Komplementation des *ale1Δ*-Phänotyps in Gegenwart von *n-3*-PUFA.

Die OILPCAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in Gegenwart von 250 μM 18:3n-3 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Hefen wurden für 48 h bei 22 °C kultiviert. Die Zugabe der Fettsäure erfolgte nach 19 h. (A) BY4741 mit der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT; (B) BY4741 *ale1Δ* mit der Leervektor-Kontrolle pESC-URA; (C) BY4741 *ale1Δ* mit dem Expressionskonstrukt pYES2/CT-OILPCAT; (D) BY4741 *ale1Δ* mit dem Expressionskonstrukt pYES2-ALE1. Die Effizienz der Elongation und Desaturierung (Umsetzung %) wurde aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Fettsäure als $(100 \times \text{Produkt}) / (\text{Produkt} + \text{Edukt})$ berechnet. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen (links) und die Fettsäureprofile (rechts) repräsentierten die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.5.3 Zeitverlauf der Coexpression von Pt Δ 6, PSE1 und LPCAT-Genen

Um den Zeitverlauf der Coexpression von Pt Δ 6, PSE1 und LPCAT-Genen zu analysieren, wurde zunächst die Expression der Gene induziert. Die Zugabe der Fettsäuren 18:2 n -6 bzw. 18:3 n -3 erfolgte nach 19 h zu einem Zeitpunkt als sich die Kulturen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befanden und eine OD₆₀₀ von etwa 1,5 aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt wurde von den Expressionskulturen die Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools und der Lipide bestimmt. Die dominierenden Fettsäuren des Acyl-CoA-Pools waren zu diesem Zeitpunkt 16:0 und 16:1 n -7. In den OILPCAT exprimierenden Kulturen waren es dagegen 16:1 n -7 und 18:1, wobei sich das Signal der Acyl-CoA-Messung für 18:1 vermutlich aus 18:1 n -9 und 18:1 n -7 zusammensetzt. Dieses Verhältnis ist auch in den gebundenen Fettsäuren zu erkennen, in denen der Anteil von 18:1 n -7 in den Kulturen mit OILPCAT am höchsten ist. 5 h nach Zugabe der Fettsäuren konnte im Acyl-CoA-Pool neben den hefeeigenen Fettsäuren vor allem die applizierten Fettsäuren 18:2 n -6 bzw. 18:3 n -3 und deren direkte Elongationsprodukte detektiert werden. Die Produkte der Desaturase wurden nicht als Acyl-CoA-Thioester detektiert, jedoch in Form von lipidgebundenen Fettsäuren. Als Teil von Lipiden waren zum Zeitpunkt 5 h neben den hefeeigenen Fettsäuren auch die Produkte der Δ 6-Desaturase 18:3 n -6 bzw. 18:4 n -3 und deren Elongationsprodukte 20:3 n -6 bzw. 20:4 n -3 nachweisbar. Ihre Anteile variierten jedoch stark. 20:3 n -6 hatte den größten Anteil in der Kultur nach Expression von *ALE1* bei gleichzeitig niedrigem 18:3 n -6-Gehalt, was eine sehr effiziente Elongation und einen effizienten Transfer von 18:3 n -6 in den CoA-Pool widerspiegelt. Während die Werte für 20:3 n -6 in den Wildtyp- und OILPCAT-Kulturen vergleichbar waren, wies die *ale1* Δ -Kultur den niedrigsten Anteil von 20:3 n -6 auf.

Nach Zugabe von 18:3 n -3 ergab sich eine entsprechende Situation für das Δ 6-Desaturaseprodukt. Dagegen war der Gehalt an 20:4 n -3 in der *ale1* Δ -Kultur deutlich niedriger als in den anderen Kulturen, die vergleichbar hohe Gehalte aufwiesen. Die Verhältnisse der einzelnen lipidgebundenen Fettsäuren zueinander änderten sich im Gegensatz zur Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools über die Zeitdauer des Versuchs nicht mehr wesentlich. Der Anteil der applizierten Fettsäuren nahm über die Zeit ab. Nur in der *ALE1*-Expressionskultur wurde 20:3 n -6 im CoA-Pool detektiert. 20:2 n -6 war besonders stark in der *ale1* Δ -Kultur vertreten und 18:1 n -7 dominierte den Acyl-CoA-Pool der OILPCAT-Kultur wie zum Zeitpunkt der Fütterung. 18:4 n -3 war in allen Kulturen gleichermaßen nachweisbar.

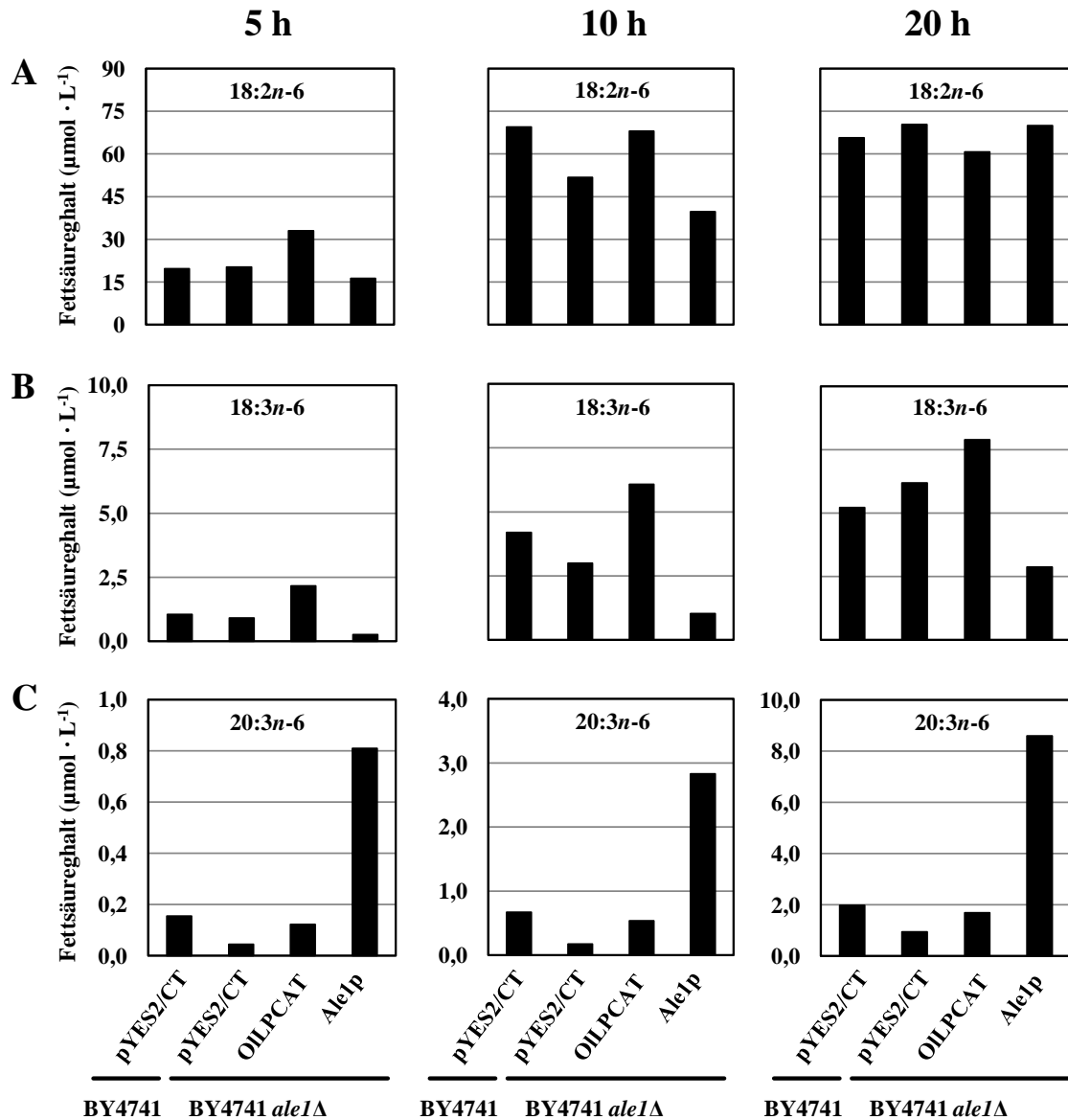


Abb. 17 Heterologe Expression der OILPCAT in *S. cerevisiae*.

Die OILPCAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Kulturen wurden für 19 h bei 22 °C kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 μM 18:2n-6. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Fettsäure wurden die veresterten Fettsäuregehalte mittels saurer Methanolyse und Gaschromatographie analysiert. Dargestellt sind die Fettsäuregehalte von (A) 18:2n-6, (B) 18:3n-6 und (C) 20:3n-6 5 h, 10 h und 15 h nach Zugabe der Fettsäure. Die Werte sind das Ergebnis einer Messung.

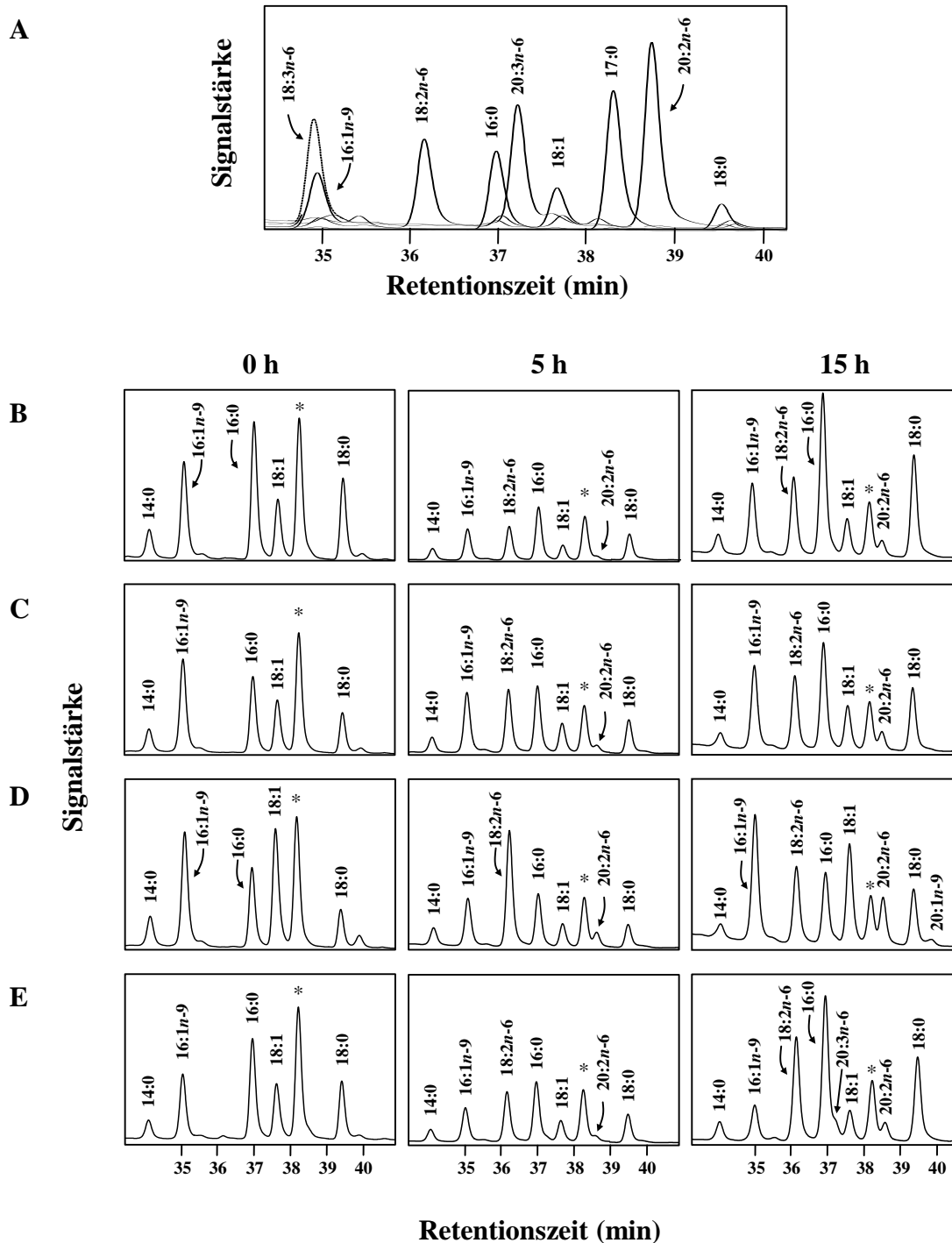


Abb. 18 Analyse der Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools von *S. cerevisiae* nach Expression von OILPCAT.

Die OILPCAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Kulturen wurden für 19 h bei 22 °C kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 μ M 18:2n-6. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Fettsäure wurde die Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools mittels HPLC analysiert. (A) Elutionsprofil der verwendeten Standards mit denen die derivatisierten Acyl-CoA-Thioester identifiziert wurden. (B) BY4741 mit der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT, (C) BY4741 *ale1* Δ mit der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT, (D) BY4741 *ale1* Δ mit dem Expressionskonstrukt pESC-URA-OILPCAT und (E) BY4741 *ale1* Δ mit dem Expressionskonstrukt pYES2-ALE1. Mit * gekennzeichnete Flächen stellen den internen Standard 17:0-CoA dar. Die Werte stellen das Ergebnis einer Messung dar.

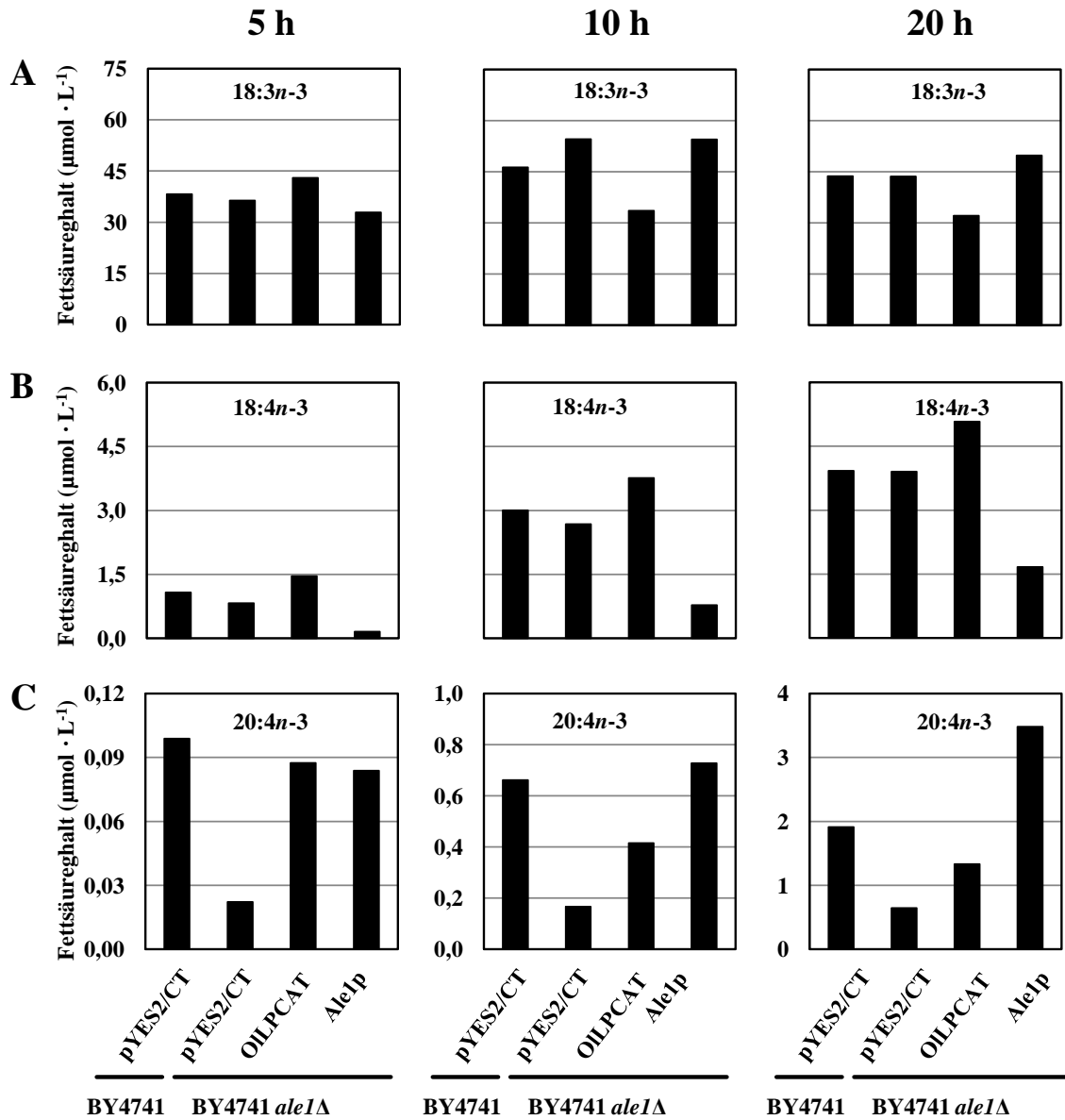


Abb. 19 Heterologe Expression der OILPCAT in *S. cerevisiae*.

Die OILPCAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Kulturen wurden für 19 h bei 22 °C kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 μM 18:3n-3. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Fettsäure wurden die veresterten Fettsäuregehalte mittels saurer Methanolyse und Gaschromatographie analysiert. Dargestellt sind die Fettsäuregehalte von (A) 18:3n-3, (B) 18:4n-3 und (C) 20:4n-3 5 h, 10 h und 15 h nach Zugabe der Fettsäure. Die Werte stellen das Ergebnis einer Messung dar.

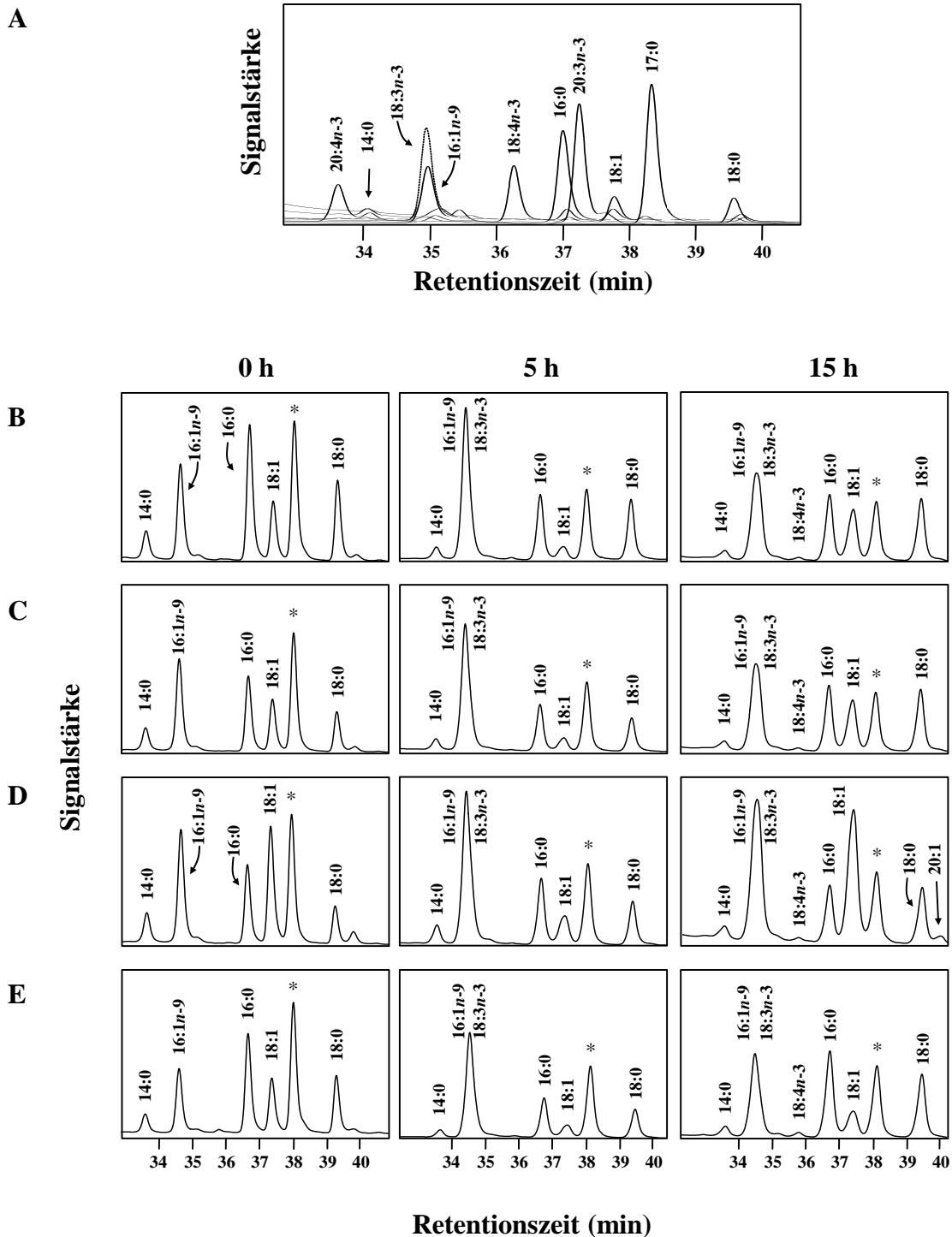


Abb. 20 Analyse der Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools von *S. cerevisiae* nach Expression von OILPCAT.

Die OILPCAT wurde mit der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die Kulturen wurden für 19 h bei 22 °C kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 μ M 18:3n-3. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Fettsäure wurde die Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools mittels HPLC analysiert. **(A)** Elutionsprofil der verwendeten Standards mit denen die derivatisierten Acyl-CoA-Thioester identifiziert wurden. **(B)** BY4741 mit der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT, **(C)** BY4741 *ale1* Δ mit der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT, **(D)** BY4741 *ale1* Δ mit dem Expressionskonstrukt pESC-URA-OILPCAT und **(E)** BY4741 *ale1* Δ mit dem Expressionskonstrukt pYES2-ALE1. Mit * gekennzeichnete Flächen stellen den internen Standard 17:0-CoA dar. Die Werte stellen das Ergebnis einer Messung dar.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Coexpressionen darauf schließen, dass OILPCAT im Ursprungsorganismus am Transfer von Fettsäuren zwischen dem CoA-Pool und dem PtdCho-Pool beteiligt sein könnte. Die heterologe Expression von OILPCAT in der *ale1Δ*-Mutante führte zu einer Transferrate der an PtdCho gebildeten Fettsäuren 18:3 n -6 bzw. 18:4 n -3 auf CoA, die vergleichbar mit den Werten des Wildtyps BY4741 war. Die hier dargestellten Experimente bilden die Grundlage für weitergehende Versuche zur umfassenden funktionalen Charakterisierung von OILPCAT, mit denen die mögliche Substratspezifität des Enzyms sowie weitere potenzielle Glycerophospholipide als Reaktionspartner identifiziert werden könnten.

3.3 Identifizierung und funktionale Charakterisierung von möglichen DGAT2 aus *O. tauri*

Der letzte Reaktionsschritt der Biosynthese von TAG entlang des Kennedy-Wegs (Kennedy und Weiss, 1956) wird von Acyl-CoA:Diacylglycerin-Acyltransferasen (DGAT) katalysiert, die einen Acylrest von Acyl-CoA auf DAG übertragen, wodurch TAG entsteht. In eukaryoten Organismen wurden bisher drei verschiedene DGAT-Familien beschrieben. Neben den am ER lokalisierten membranständigen DGAT des Typs 1 und 2 wurde kürzlich eine im Zytosol lokalisierte lösliche DGAT aus der Erdnuss *A. hypogaea* (AhDGAT) isoliert, die keine Sequenzhomologie zu DGAT1 und DGAT2 aufweist und daher als DGAT Typ 3 klassifiziert wurde (Saha et al., 2006). Heterologe Expressionsstudien in *S. cerevisiae* und *A. thaliana* zeigten, dass in verschiedenen Pflanzen Mitglieder der DGAT2-Enzymfamilie maßgeblich an der Akkumulation von ungewöhnlichen Fettsäuren in den Reservelipiden beteiligt sind (Shockey et al., 2006). Daher könnten DGAT2-Enzyme in Mikroalgen eine vergleichbare Funktionalität für die Anreicherung von VLCPUFA in TAG besitzen. Eine solche Substratspezifität könnte entscheidend zu einem VLCPUFA-angereicherten Samenöl in transgenen Ölsaaten beitragen.

Da zu einem frühen Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit die Sequenzinformationen des Genoms von *O. tauri* öffentlich zugänglich wurden und darüber hinaus bereits verschiedene an der DHA-Biosynthese beteiligte Gene aus diesem Organismus isoliert wurden (Meyer et al., 2004; Domergue et al., 2005), wurde diese Mikroalge als bevorzugter Spender der DGAT-Kandidatengene eingesetzt. In den folgenden Abschnitten werden die Identifizierung und weitere Versuche zur funktionalen Charakterisierung von möglichen DGAT2 aus der Mikroalge *O. tauri* dargestellt.

3.3.1 Identifizierung von DGAT2 aus Mikrolagen

Zur Identifizierung mutmaßlicher Gene, die für DGAT-Enzyme in *O. tauri* codieren, wurde eine Genom-Datenbank dieser Mikrolage durchsucht (DOE Joint-Genome Institute, <http://genome.jgi-psf.org/>). Anhand der homologen DGAT1 aus *M. musculus* (MmDGAT1) und *N. tabacum* (NtDGAT1) wurde die Datenbank durchmustert (Cases et al., 1998). Die Suche ergab, dass *O. tauri* nicht über DGAT1 homologe Proteine verfügt.

Ebenso konnten keine zu der löslichen DGAT3 aus *A. hypogaea* (AhDGAT) homologen Proteine im Genom von *O. tauri* identifiziert werden. Ausgehend von den DGAT2 MrDGAT2A und MrDGAT2B aus dem Pilz *M. ramanniana* (Lardizabal et al., 2001) wurden drei vollständige offene Leserahmen von möglichen DGAT2 im Genom von *O. tauri* identifiziert.

Vertreter der DGAT1- und DGAT2-Familie weisen keine Verwandtschaft zueinander auf. Die DGAT1-Familie wurde aufgrund ihrer Homologie zu ACAT-Enzymen identifiziert und gehört somit der Superfamilie der MBOAT an (siehe 3.2.1, 3.2.4 und Hofmann, 2000). Diese Homologie und Zugehörigkeit zu den MBOAT besteht bei der DGAT2-Familie nicht. Während sich DGAT2-Enzyme meist aus einem Polypeptid von etwa 350 – 400 Aminosäuren zusammensetzten, bestehen DGAT1-Enzyme aus einem Polypeptid von etwa 500 Aminosäuren (Yen et al., 2008). Die beiden Proteinfamilien unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Primärstruktur, sondern auch in ihrer Sekundärstruktur. DGAT1-Enzyme weisen die für MBOAT charakteristischen mehrfachen transmembranen Helices auf und für humane DGAT1 konnte die Ausbildung von Homotetrameren gezeigt werden (Cheng et al., 2001; Shockey et al., 2006). DGAT2 weisen weniger hydrophobe Domänen auf und scheinen lediglich ein bis zwei transmembrane Helices zu besitzen (Cases et al., 2001; Lardizabal et al., 2001). DGAT1 und DGAT2 interagieren *in vivo* möglicherweise auch mit unterschiedlichen Proteinen, was auf verschiedene Funktionen bei der TAG-Synthese hindeutet. So konnte am Modell der Maus *M. musculus* gezeigt werden, dass die Enzyme DGAT2 und die Stearoyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) am ER colokalisieren (Man et al., 2006). Der Verlust der SCD1-Aktivität durch Gendeletion hatte eine Reduktion des TAG-Gehalts und die DGAT2-Gendeletion einen nahezu vollständigen Verlust von TAG zur Folge (Man et al., 2006). Diese Beobachtung wurde durch Gendeletionsstudien in der Hefe *S. cerevisiae* bestätigt. Die Deletion der hefeeigenen DGAT2 *DGAI* bewirkte eine deutliche Reduktion des TAG-Gehalts, während durch die Deletion der DGAT1 homologen Gene *ARE1* und *ARE2* keine signifikanten Änderungen im TAG-Gehalt der Hefezellen festgestellt wurden (Oelkers et al., 2002; Sorger und Daum, 2002). All diese Beobachtungen weisen auf eine dominierende Rolle von Mitgliedern der DGAT2-Familie bei der Akkumulation von TAG hin.

Zur Darstellung der Verwandtschaft der möglichen DGAT2 aus *O. tauri* wurde aus einem Aminosäuresequenz-Alignment DGAT-homologer Enzyme ein Phylogramm berechnet. Dieses beinhaltet auch funktional noch nicht charakterisierte DGAT-ähnliche Proteine aus *O. lucimarinus* und *P. patens*.

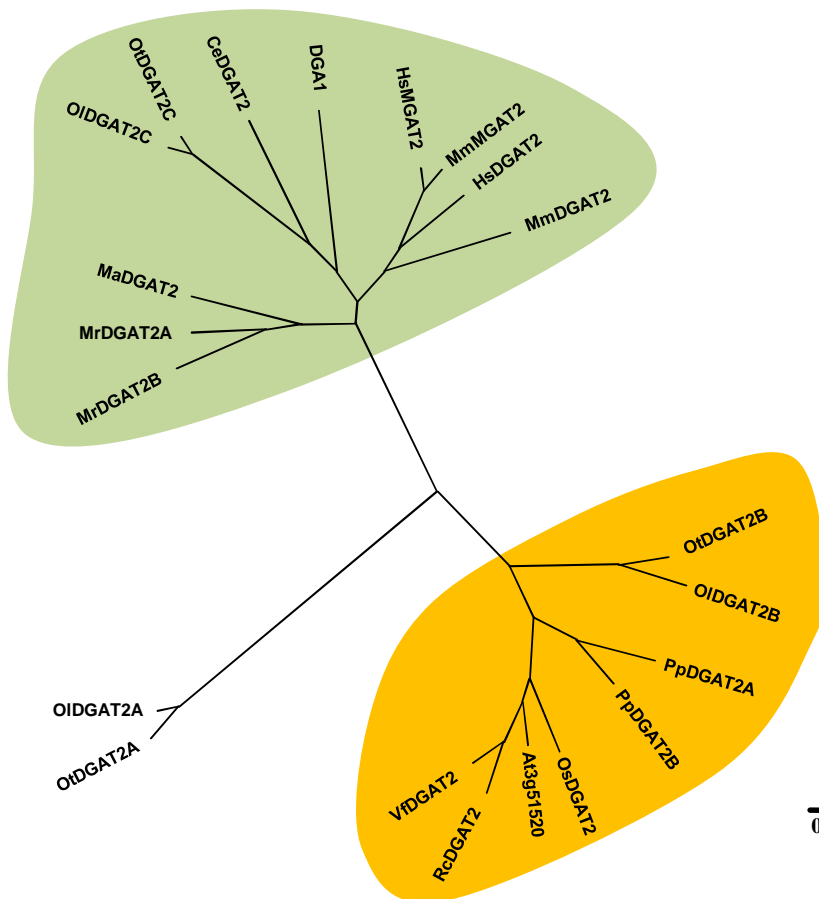


Abb. 21 Phylogramm der DGAT2 und MGAT aus Pflanzen, Hefen, Invertebraten und Säugern.

Das Phylogramm zeigt neben bereits funktional identifizierten Enzymen auch die in dieser Arbeit identifizierten möglichen DGAT2 sowie einige funktional noch nicht charakterisierte Enzyme, deren Sequenzen aus verschiedenen genomischen Datenbanken entnommen wurden und aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den DGAT-Proteinen dem Phylogramm hinzugefügt wurden. Grün hinterlegt sind die Vertreter der DGAT2, die eine relativ hohe Homologie zu den tierischen MGAT zeigen und sich dadurch von den übrigen Vertretern der DGAT2 (gelb hinterlegt) unterscheiden. Die Genbank-Identifikationsnummern sind im Anhang 8 aufgeführt. Details zur Berechnung und Erstellung des Phylogramms können dem Abschnitt 2.4 entnommen werden. Die Skala gibt einen Sequenzunterschied von 10 % wieder (*number of replacement*).

Das in Abb. 21 dargestellte Phylogramm umfasst neben DGAT2 aus verschiedenen pflanzlichen und tierischen Organismen auch tierische Acyl-CoA:Monoacylglycerin-Acyltransferasen (MGAT), die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den DGAT2 in das Phylogramm aufgenommen wurden. Es ist zu erkennen, dass sich die DGAT2-Familie in zwei Klassen gliedert, was auf Unterschiede in hochkonservierten Bereichen der Proteine zurückzuführen ist. Von diesen Bereichen wird angenommen, dass sie das katalytisch aktive Zentrum der Enzyme bilden. Diese Unterschiede werden im folgenden Abschnitt detaillierter betrachtet. Die bei der Datenbanksuche im Genom von *O. tauri* identifizierten OtDGAT2B und OtDGAT2C gruppieren in verschiedenen Ästen des in Abb. 21 gezeigten Phylogramms. Der Ast, in dem sich OtDGAT2C einordnet, zeigt hohe Homologie zu den tierischen MGAT. OtDGAT2A ist keiner der beiden Gruppen zuzuordnen. Vielmehr ordnet sie sich zwischen den Gruppen ein; steht jedoch OtDGAT2B näher als OtDGAT2C.

3.3.2 Sequenzanalyse der DGAT2 aus *O. tauri*

Bei der Datenbanksuche wurden drei offene Leserahmen von möglichen DGAT2 im Genom der Mikroalge *O. tauri* identifiziert (Tab. 20). Die Länge der offenen Leserahmen und die Molekulargewichte der OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C sind in Tab. 20 dargestellt. Die offenen Leserahmen der möglichen DGAT2 aus *O. tauri* weisen eine Länge von 978 bp bis 1041 bp auf, die für Proteine mit 325 bis 346 Aminosäuren codieren. Die Molekulargewichte der Proteine liegen zwischen 36,3 kDa und 39,3 kDa.

Tab. 20 Charakteristika der Sequenzen von OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C.

Gen	ORF	Polypeptid	Molekulargewicht	Konservierte Motive
OtDGAT2A	1041 bp	346 aa	39,3 kDa	RAYLF, HPHG
OtDGAT2B	978 bp	325 aa	36,3 kDa	RAYLF, EPHG
OtDGAT2C	1017 bp	338 aa	38,1 kDa	LDPXXNY, HPHG

Die berechneten Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der in die Aminosäuresequenz-Vergleiche einbezogenen Proteine sind in Tab. 21 und Tab. 22 aufgeführt. Die Identitätswerte der DGAT2-Subfamilie, zu der OtDGAT2A und OtDGAT2B zählen, liegen zwischen 32 und 77 % und die Ähnlichkeitswerte zwischen 49 und 85 % (Tab. 21). OtDGAT2A und OtDGAT2B haben jeweils die größten Ähnlichkeiten zu homologen, bislang nicht charakterisierten DGAT2 aus der nah verwandten Alge *O. lucimarinus*. Darüber hinaus hat OtDGAT2A mit 26 % die höchste Identität zu der funktional charakterisierten VfDGAT2, die in *V. fordii* an der Akkumulation der konjugierten Linolensäure (α -Eleostearinsäure; 18:3 ^{Δ 9Z,11E,13E}) im Samenöl beteiligt ist (Shockey et al., 2006). OtDGAT2B hat zu VfDGAT2 eine Identität von 32 %, aber eine geringfügig höhere Identität von 34 % besteht zu einer DGAT2 aus *A. thaliana*.

Tab. 21 Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der OtDGAT2A und OtDGAT2B zu pflanzlichen DGAT2.

Grau hinterlegt sind die jeweils zwei höchsten Werte. Während die Identitätswerte den prozentualen Anteil von ausschließlich identischen Aminosäuren angeben, geben die Ähnlichkeitswerte den prozentualen Anteil sowohl identischer als auch isofunktioneller Aminosäuren an. Die Berechnungen wurden mit dem Programm VecorNTI[®] Suite v10.0 durchgeführt.

	OtDGAT2B	OIDGAT2A	OIDGAT2B	RcDGAT2	VfDGAT2	At3g51520
OtDGAT2A	22 % / 35 %	76 % / 84 %	23 % / 36 %	24 % / 37 %	26 % / 40 %	25 % / 37 %
OtDGAT2B	-	25 % / 38 %	62 % / 73 %	28 % / 46 %	32 % / 49 %	34 % / 50 %

OtDGAT2C zeigt die höchsten Identitäten zu bislang nicht charakterisierten DGAT2 aus *O. lucimarinus* (83 %) und *C. elegans* (37 %). Die Verwandtschaft zu tierischen MGAT wird anhand der Identität von 36 % zu MmMGAT2 deutlich (Tab. 22).

Tab. 22 Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der OtDGAT2C zu pflanzlichen und tierischen DGAT2 sowie MGAT aus Säugern.

Grau hinterlegt sind die jeweils höchsten Werte. Während die Identitätswerte den prozentualen Anteil von ausschließlich identischen Aminosäuren angeben, geben die Ähnlichkeitswerte den prozentualen Anteil sowohl identischer als auch isofunktioneller Aminosäuren an. Die Berechnungen wurden mit dem Programm VecorNTI[®] Suite v10.0 durchgeführt.

	OIDGAT2C	MrDGAT2A	MrDGAT2B	CeDGAT2	MmMGAT2	HsMGAT2
OtDGAT2C	83 % / 91 %	33 % / 50 %	32 % / 49 %	37 % / 50 %	36 % / 51 %	35 % / 49%

Im Allgemeinen enthalten DGAT2-Enzyme im mittleren Bereich der Polypeptidkette einen konservierten Bereich, der als Teil des katalytisch aktiven Zentrums der Enzyme angesehen wird (Stone et al., 2006). DGAT2 aus Hefen, Invertebraten und Vertebraten und die tierischen MGAT besitzen an dieser Position meist das hochkonservierte Sequenzmotiv HPHG (Abb. 22). Mutationen in diesem Motiv, die mit einem Aminosäureaustausch verbunden sind, führen zu einem Verlust der DGAT-Aktivität (Stone et al., 2006). In geringem Abstand dazu finden sich stromaufwärts davon zwei weitere hochkonservierte Motive (YFP und LDPXXNHI/L/V). Diese Motive sind in der zweiten Subfamilie durch eine unterschiedliche Aminosäurefolge ersetzt. Anstelle des HPHG-Motivs liegt das Motiv EPHSV vor. Die benachbarten, stromaufwärts gelegenen Aminosäuren formen die Motive YFP und RAYV/LFG. Unterschiede in weiter stromabwärts gelegenen konservierten Bereichen sind weniger stark ausgeprägt. Auf diesen Unterschieden basiert die Gliederung der DGAT2-Familie in zwei Klassen. In den Aminosäuresequenzen der OtDGAT2A und OtDGAT2B liegen die verschiedenen konservierten Bereiche beider DGAT2-Klassen vereint vor (siehe Tab. 20 und Abb. 22). Unterschiede bestehen jedoch nicht nur in den Aminosäuren der konservierten Bereiche der beiden DGAT2-Klassen, sondern auch in der Sekundärstruktur. Während die Klasse, zu der u.a. VfDGAT2, RcDGAT2, OtDGAT2A und OtDGAT2B gehören, meist zwei transmembrane Helices am N-Terminus besitzen (Abb. 23 A), worüber die Proteine vermutlich in der ER-Membran verankert sind (Shockey et al., 2006; Burgal et al., 2008), besitzt die Klasse der DGAT2/MGAT-Familie lediglich eine N-terminale transmembrane Helix (Abb. 23 C; Cases et al., 2001). OtDGAT2B bildet hierbei vermutlich eine Ausnahme, da die computergestützte Analyse für OtDGAT2B nur eine transmembrane Helix vorschlägt (Abb. 23 B).

A

OtDGAT2A	1	-----MSRPEPGS	WRQHVRAF	DAVREMRREARG	IADVPWSSLKRL	LVSCVSAIYTSWI		
OldDGAT2A	1	----MGSNAQRGA	WREH-RAVEA	ATIAAMRARG	VRDVPWSSAKRML	AVLCVSAIYTSWI		
OtDGAT2B	1	-----	-----	-----	MSRSIVDHGVL	LIVWLGLFHALVAV		
OldDGAT2B	1	-----	-----	-----	-----	MFVWLGLIHVDVAV		
RcDGAT2	1	MGEANHHNNNNN	NSNDEKNEE	KSNYTVVNSRELY	PTNIFHALLALS	SLWIGSIHFNLFL		
VfdGAT2	1	-----	MGMVEVKNEE	E--VTIFKSGE	IYPTNIFQSVLA	LAIWLGSFHFILFL		
At3g51520	1	-----	MGGSREFRAEEH	-----	-----	SNQFHSIIAMAIWLGAIFHNVAL		
OtDGAT2A	56	LSPVMSALAVWRYEW	LRAYVACYL	FASYALGVAMP	MNALHRRFFC	WLETGEENGWQLVVED		
OldDGAT2A	56	LSPVMSAVAVILIP	SLRAYVGCYL	FASYALGVRVP	MNGLYKFFC	GLECGEENGWELVVED		
OtDGAT2B	25	VVVALVALERRRA	MTVLAALMSLSV	VERRIR-PRWG	VTLARAITRTAK	SYFP-CALTFEN		
OldDGAT2B	15	TALAVWTLPSAMA	VTALATLVAAAA	IPTVATPRWG	ARLARAVTRTAT	AYFP-TRLEFED		
RcDGAT2	61	LFISYLFISFPTFL	LIVGFFVVL	MFIPIDEH-SKL	GRRLCRYVCR	HACSHFP-VTLHVED		
VfdGAT2	46	VSSS-IFLFP	SKFLLVIGLL	FFMFIPI	INDR-SKLG	QCLFSYISRHVCSYFP-ITLHVED		
At3g51520	36	VLCSLIFLPPSL	LMVGLL	LSLFIFIP	IDHR-SKYGR	KLARYICKHACNYFP-VSLYVED		
					L	L E		
OtDGAT2A	116	DCD----	VDCSKRAYL	FAHAPHGLF	ASGCVGNV	VLSGRALKRFR-----ARRIWF		
OldDGAT2A	116	ATAGEKEIDC	SKRAYLFAH	APHGLFASG	CVGNIVL	SDAALRRFR-----ARHVRFF		
OtDGAT2B	83	EEA	LK-GARKGV	GRVLG	LEPHGALP	LSVIAFADYFMFDE	DGIEARGMNAASMNSRALA	
OldDGAT2B	74	EEA	LR-AVRNEE	ACVLG	LEPHGVL	PLSVISFAEYFMHDEE	GARRRGLTPAARRGARALA	
RcDGAT2	119	MNA	FH-----	SDRAYV	FGYEPHSV	FPLGVSVLSDH	FAVLP-----LPKMKVLA	
VfdGAT2	103	INA	FR-----	SDRAYV	FGYEPHSV	FPTGVMLS--L	CLIP-----LPNIKFLA	
At3g51520	94	YEA	FQ-----	PNRAYV	FGYEPHSV	PLPGVVALCD	LTGFMP-----IPNIKVLA	
					PH			
OtDGAT2A	165	ELL	IRVFP	TIKDVLS	MLG	FVFPCTAKM	KKVLRGRGETGLIVVGGVQEV	
OldDGAT2A	169	NLL	ISVFP	TIKDVLS	SLG	FPLPCTAKM	RRVLRGRGETGMIVVGGVQEV	
OtDGAT2B	142	SGA	IHFVPL	VRHLLWT	WLGLEPI	SRRRMTSMLSDG	STCVIVPGGVAEC	
OldDGAT2B	133	SAA	IFKVP	LVKHLWT	WLGLEPI	SKACMLRMLRAG	KTAVIIPGGVAEC	
RcDGAT2	162	SNA	VFRTP	VLRHIWT	WCGLTS	ATKKNFTALLAS	GYSCILVPGGQET	
VfdGAT2	144	SSA	VFYTP	FLRHIWT	WCGLTP	ATKKNFTALLS	SGYSCILVPGGQET	
At3g51520	137	SSA	VFYTP	FLRHIWT	WGLTA	ASRNFTSL	LDSGYSCILVPGGQET	
			P			L G	GGV E	E L
OtDGAT2A	225	KNCF	GFVKVAMQ	AGT	PLVPVYTF	GESLATGPD	WVPFREIRKRLS---	
OldDGAT2A	229	KNCF	GFVKVAIQ	VGTP	PLVPVYTF	GESLATGPD	WVPFREIRKRLS---	
OtDGAT2B	201	KRRY	GFVKIAIQ	TGAALV	PAYTFGQ	TRAYK-YWRLG	PPLVPTSVANWFS	
OldDGAT2B	192	RKRY	GFVKIAIQ	VTGAKL	PAYTFGQ	SRTYG-YWRLG	PPLVVPKRVADW	
RcDGAT2	221	KARR	GFVRVAMEM	GKPLVP	VFCFGQSN	VYK-WWKPD	GELFMK-----IARAIK	
VfdGAT2	203	KARR	GFTRIAMQ	TGTP	PLVPVFCFGQ	MTEFK-WWKPD	GELFMK-----IARAIK	
At3g51520	196	SRRR	GFVRVAMEM	QGSPLVP	VFCFGQ	ARVYK-WWKPD	CDLYLK-----LSAIRFT	
			GF	A	G L P	FG	W	F
OtDGAT2A	282	HRW	GLCFPKAK-	LT	TVVGA	PIEVKQNP	NPTREEVA	
OldDGAT2A	286	HRW	GCFPRGK-	LT	TVVGP	PIEVKQND	RPSREEVA	
OtDGAT2B	260	GKW	FIP	IPYAT	PLHTV	VGELIETT	QNDNPSREEV	
OldDGAT2B	251	GKF	CTPI	IPYATA	LNTV	VGKPIEVK	QNPDSKEEV	
RcDGAT2	275	GVL	GSHL	PLQRP	MHV	VVGKPIEVK	QNPQPTVEEV	
VfdGAT2	257	GVL	GSHL	PLQRP	MHV	VVGKPIEVK	QNPQPTVEEV	
At3g51520	250	GVE	GSP	LPCR	QPMHV	VVGKPIEV	TKTKLPTDEE	
			P		VVG	IE	P EE	K GY
OtDGAT2A	341	QRT	KL					
OldDGAT2A	345	QVTR	LV					
OtDGAT2B	320	VD	LVVC					
OldDGAT2B	311	VRL	VIC					
RcDGAT2	335	LT	LEIL					
VfdGAT2	317	LK	LEIF					
At3g51520	309	LE	LKIL					

3. Ergebnisse

B

OtDGAT2C	1MIYAFLLSAIFITYPTVGV	
OldGAT2C	1MIYAWIISAIFFVYPAMGV	
CeDGAT2	1MLNYQIHKKLTDIKWNIFSPWDRQRAYFALVVWFGLIYFPCCLCQVAP	
MmMOGT2	1MVEFAPLLVPWERRLQTFAVLQWVFSFLALAQLCIVLIVVG	
HsMOGT2	1MVEFAPLEMPWERRLQTLAVLQFVFSFLALAEICTVGEIA	
MrDGAT2A	1	MASKDQHLQQVKHTLEAIPSPRYAPLR...VPLRRRLQTLAVLLWCSMMSICMFIFFFL	
MrDGAT2B	1MEQVQVTALLDHIPKVVHAPLRG..IPLKRRRLQTSADVTLWALLPICLIYLYL	
OtDGAT2C	19	FGHATWMRNFALGYIGWYVLLDRSDSSGTRFVAVSRRLPFWRILADYFPVRLYKSGF	
OldGAT2C	19	FGPSMWLKNFFLGYIAWYATLDRKTASSGKRFARWSRRLPFWRILAEYFPVRLHVSAKLD	
CeDGAT2	50	FVLFFTGQWIIILGLYAVWYLYDRESFRRGGYRDNWFRNLSLHKWFAEYFPVKLHKIAELD	
MmMOGT2	41	LLFTREWLFVSVLYATWYLDWDKPRQ..GGRPIQEFERLAIWKYMKDYFPVSLVKIAELD	
HsMOGT2	41	LLFTREWLLTVLYAAWYLDWDKPRQ..GGRHIQAIRCWITWKYMKDYFPIISLVKIAELD	
MrDGAT2A	58	CSIPVLLWFPIILYLTWILLVWDKAPEN..GGRPIRWRNAAWKLEAGYFPAHVIKEADLD	
MrDGAT2B	53	FTIP..LLWPILIMYTIWLFDFKAPEN..GGRRLSLVRKLPWKHFAANYFPVTLIKEGDLD	
			D G R YFP LD
OtDGAT2C	79	PKGNYLFGYHPHGVIGVGALMTFAEATGTFYEAFPGILDRLLLTSMNFKFPFTREVLMAI	
OldGAT2C	79	PSGNYLFGYHPHGVIGVGALLTFAEATGTFYEAFPGILDRLLLTSMNFKFPFTREVLMAI	
CeDGAT2	110	PNQNYLFGYHPHGILGVGAWSCFGEFDACNVKQVFKGIRFNICTLPGNEFAMFRREILLSI	
MmMOGT2	99	PSRNYIAGFHPHGVLAACAFNLNCTESTGFTSLFPGIRSYLMMLTVWFRAPFFRDYIMSG	
HsMOGT2	99	PSRNYIAGFHPHGVLAAGAFANLCTESTGFSSIFPGIRPHLMMLTVWFRAPFFRDYIMSA	
MrDGAT2A	117	PSKNYIFGYHPHGIISMGSFCTFSINATGFDDLFPGIRPSLLTLLSNFNIPLYRDYIMAC	
MrDGAT2B	110	PKGNYIMSYHPHGIISMAAFANFAEATGTFSEQYPGIVPSLLTLASNFRLLPLYRDFMMSL	
			P NY HPHG G L R
OtDGAT2C	139	GINSVTKASVMTNLTIRAPG.ASVAIVIGGAAEALDARPGSATLTLARRKGFVKMALRTGA	
OldGAT2C	139	GINSVTKSSVETNLTIRAPG.ASVAIVIGGASEALDARPGWATLTLARRKGFVKMALRTGA	
CeDGAT2	170	GMISSKESIEHVLNSEEKGRAVIVVGGAAEALAAHPGKHTLTLANRKGFRVREAVRTGA	
MmMGAT2	159	GLVSSSEKVSADHILSRKGGGNLAIIVGGAAEALDARPGAYRLLLRNRKGFIRLAIAMHGA	
HsMGAT2	159	GLVTSSEKESAAHILNRKGGGNLGIIVGGAAEALDARPGSFTLLLRNRKGFVRLALTHGA	
MrDGAT2A	177	GLCSVSKTSCQNILTKGGPGRSIAIVVGGASESLNARPGVMDLVLKRFGFKIAIVQTGA	
MrDGAT2B	170	GMCSVSRHSCEAIIIRSG.PGRSIVIVVGGASESLNARPGTNDLTLKRLRGIIRLAINGA	
			G S L I GGA E L PG L L R GF A GA
OtDGAT2C	198	SLVPVFAAFGENDIFEQVENPDGGRLRKFQTYIKQLIGISPPAFYGRSLSRGVWRRIFGRK	
OldGAT2C	198	SLVPVFAAFGENDIFEQVENPEGGRLRNEQMYIKQLIGITPPAFYGRSLSRGMWRRIFGRK	
CeDGAT2	230	HLVPVFAAFGENDIFEQIDNPEGSRLRQIOWGKKKMGISLPLIYG...RGYFQMAIG..	
MmMGAT2	219	ALVPIFSFGENLIFNOVENTPGIWRWIQNRLQKIMGISLPLFHG...RGVFOYSFG..	
HsMGAT2	219	PLVPIFSFGENDLFDQIPNSSGSLRYIQNRLQKIMGISLPLFHG...RGVFOYSFG..	
MrDGAT2A	237	SLVPTISFGENELYEQIESNENSILHRWQKKIQHALGFTMPLFHG...RGVFNYDFG..	
MrDGAT2B	229	SLVPIFSFGENDIFEQYDNKKGSLIWRYQKWFQKITGFTVPLAHA...RGIFNYNAG..	
			LVP FGEN Q Q G P RG G
OtDGAT2C	258	GVLPKREPIEVIIGNPIHVPOVDDPSPD...VIDKYHQLYTVGLKELYELHRRQFHQLN	
OldGAT2C	258	GVLPKREPIEVVGNPIAVPKVVDPSNE...IIDKYHALYTESLKELYELHRRQFHLN	
CeDGAT2	284	LLPMSRAVNVVCAPIQVEKELDPSKE...VIDETHGVYMEKLAELFEHKKAKFVVS..	
MmMGAT2	273	LLPFRQPIITIVGKPIEVQMTQPSRE...EVDRLHQRYIKELCKLEEHKLLKFNIP..	
HsMGAT2	273	LLPFRQPIITIVGKPIEVQKTLPSSE...EVDRLHQRYIKELCNLEEAHKLKFNIP..	
MrDGAT2A	291	LLPFRHPPIYTVGKPIPVPSIKYGQTK..DEIIRELHDSYMHAVODLYDRYKDIYAKDR	
MrDGAT2B	283	FLPFRHPPIVTVGKPIAVPLLAEGETEPSEEQHQVQAQYIESLQATYDKYKDIYAKDR	
			P P I V Y
OtDGAT2C	314	RGSSDDLSDLIKRRNNLQAMTFK	
OldGAT2C	314	RGSSDDLSDLLTRQGKLNMQFK	
CeDGAT2	338	..KDTRLVFQ.....	
MmMGAT2	327	...EDQHLEFC.....	
HsMGAT2	327	...ADQHLEFC.....	
MrDGAT2A	348	...VKELEFVE.....	
MrDGAT2B	342	...IKDMTMIA.....	

Abb. 22 Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Vertretern der DGAT2- und MGAT-Familie.

(A) OtDGAT2A und OtDGAT2B (B) OtDGAT2C. Durch schwarze Balken sind Bereiche gekennzeichnet, die vermutlich am katalytisch aktiven Zentrum beteiligt sind. Die C-terminalen ER-Retentionssignale sind schwarz umrandet. Konservierte Aminosäuren sind unterhalb des Alignments dargestellt. Das Alignment wurde mit dem Programm VecorNTI[®] Suite v10.0 errechnet und das Abbild wurde durch das Programm Boxshade 3.21 erzeugt.

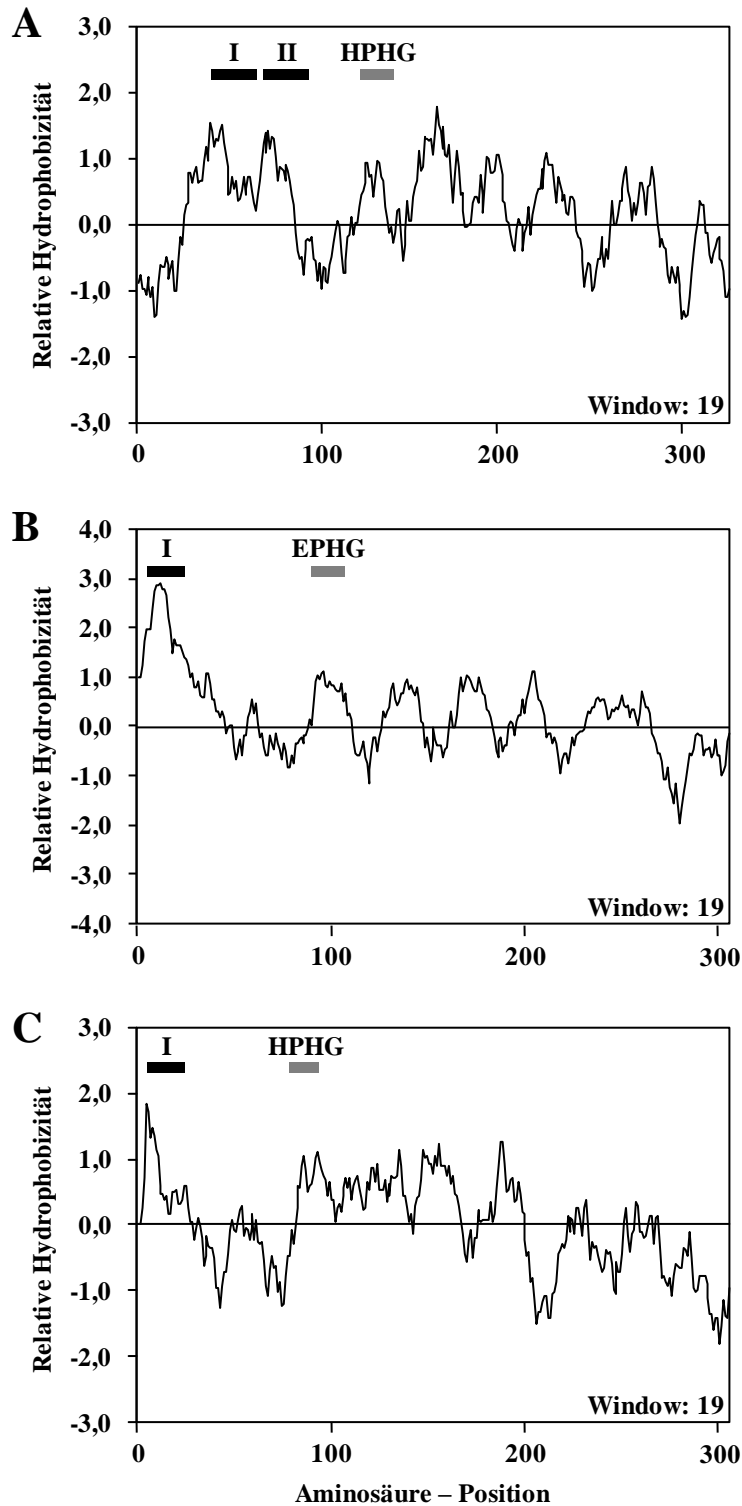


Abb. 23 Hydropathieanalysen der DGAT2 aus *O. tauri*.

Die mit römischen Zahlen versehenen schwarzen Balken kennzeichnen potenzielle transmembrane Helices. Die Positionen der hochkonservierten Aminosäure-Motive sind durch graue Balken gekennzeichnet. (A) OtDGAT2A; (B) OtDGAT2B und (C) OtDGAT2C. Das Hydropathie-Profil wurde mit Hilfe des Programms ProtScale berechnet (Gasteiger et al., 2005). Die Vorhersage der transmembranen Bereiche erfolgte durch das Programm TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

3.3.3 Versuche zur funktionalen Charakterisierung der DGAT2 aus *O. tauri*

Zur funktionalen Charakterisierung der möglichen DGAT2 aus *O. tauri* wurden heterologe Komplementationsstudien in *S. cerevisiae* durchgeführt. Für die im Folgenden geschilderten Versuche wurden zwei Hefe-Deletionsmutanten verwendet, die nicht in der Lage sind TAG zu synthetisieren. *S. cerevisiae* besitzt vier Gene, die für TAG-synthetisierende Enzyme codieren. An der Biosynthese von TAG in *S. cerevisiae* sind hauptsächlich die Enzyme Dga1p (DGAT2) und Lro1p (PDAT) beteiligt (Sorger und Daum, 2003). Die hefeeigenen Acyl-CoA:Sterin-Acyltransferasen Are1p und Are2p nehmen bezüglich der Bildung von TAG nur eine untergeordnete Rolle ein (Oelkers et al., 2002; Sandager et al., 2002). Bereits durch den Verlust der Genfunktionen von *DGAI* und *LRO1* wird TAG in Hefezellen kaum nachweisbar (Shockey et al., 2006; Bural et al., 2008).

Für die Komplementationsstudien wurden die Doppelmutante BY4741 *lro1Δ dga1Δ* und die Vierfachmutante H1246 eingesetzt (Sandager et al., 2002). Da H1246 bei den durchgeführten Versuchen eine äußerst hohe Sensitivität gegenüber exogenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufwies, die meist zum Zelltod führte (Daten nicht gezeigt), wurde die Doppelmutante BY4741 *lro1Δ dga1Δ* für die überwiegende Zahl der Experimente verwendet. Für einige wenige Komplementationsstudien, die auch die Abwesenheit von *ARE1* und *ARE2* erforderten, wurde die Vierfachmutante H1246 verwendet. Für die heterologe Expression der möglichen DGAT2 aus *O. tauri* wurden die nativen und die codon-optimierten cDNA-Sequenzen der jeweiligen Kandidatengene stromabwärts eines Galaktose-induzierbaren Promotors des Hefe-Expressionsvektors pYES2/CT kloniert. Die Adaption des Codongebrauchs wurde wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Darüber hinaus wurden die offenen Leserahmen von OtDGAT2A und OtDGAT2C als synthetische Gene mit einem an *S. cerevisiae* adaptierten Codongebrauch von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen. Die synthetischen offenen Leserahmen wurden anschließend in den Hefe-Expressionsvektors pYES2/CT unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors kloniert. Für die homologe Komplementation der TAG defizienten Hefe-Mutanten wurde ein Expressionskonstrukt verwendet, das die cDNA-Sequenz von *DGAI* stromabwärts eines Galaktose-induzierbaren Promotors enthielt.

3.3.3.1 Analyse der Proteinmengen der DGAT2 aus *O. tauri* in *S. cerevisiae*

Zunächst sollte festgestellt werden, ob der Expressionswirt *S. cerevisiae* für die heterologe Expression der DGAT2-Gene aus *O. tauri* geeignet ist. Um die Proteinmengen der DGAT2 in *S. cerevisiae* zu analysieren, wurden die nativen bzw. die optimierten cDNA-Sequenzen von OtDGAT2A, OtDGAT2B, OtDGAT2C und *DGA1* jeweils in einen Leserahmen mit dem V₅-Epitop des pYES2/CT-Vektors kloniert. Die so erstellten Expressionskonstrukte wurden für die Transformation des Hefestamms BY4741 *lro1Δ dga1Δ* eingesetzt. Die mit dem Expressionsvektor pYES2/CT transformierten Hefen BY4741 und BY4741 *lro1Δ dga1Δ* stellten hierbei die Leervektor-Kontrollen dar. Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (2.20). Die Expression erfolgte für 20 h bei 30 °C. Die Überexpression der Gene führte zu keiner Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Der Zellaufschluss, die Präparation des Zelllysates im Anschluss an die Expression sowie der Western-Blot und die Immundetektion der Proteine wurden, wie in Abschnitt 2.22 beschrieben, durchgeführt. Vermutlich führte die Expression der nativen Gensequenzen von OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C zu keiner Proteinsynthese in Hefe, da die Proteine nicht im Western-Blot detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Optimierung der ersten 25 Codons der offenen Leserahmen der Kandidatengene ermöglichte nur für OtDGAT2B die Proteinsynthese in Hefe (Abb. 24). Erst die vollständige Adaption der offenen Leserahmen der OtDGAT2A und OtDGAT2C an die Codonverwendung in *S. cerevisiae* bewirkte die erfolgreiche Expression und Synthese der Proteine in Hefe (Abb. 24).

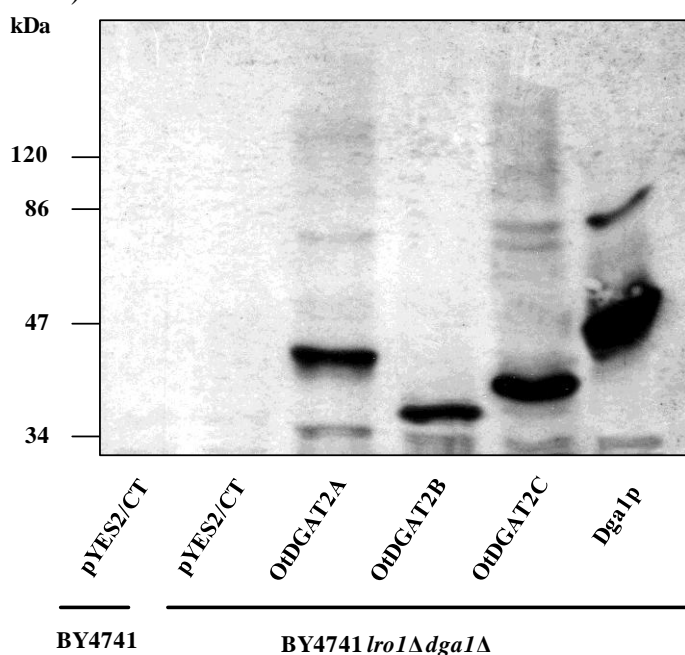


Abb. 24 Immundetektion der DGAT2 aus *O. tauri* nach heterologer Expression in BY4741 *lro1Δ dga1Δ*.

Je 25 µg des Proteinextrakts von OtDGAT2A (44,3 kDa), OtDGAT2B (41,3 kDa), OtDGAT2C (33,1 kDa) und den Leervektor-Kontrollen sowie 12,5 µg des Proteinextrakts von Dga1p (52,8 kDa) wurden in ein-dimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einem Antiserum gegen das C-terminale V₅-Epitop inkubiert. Die hier angegebenen Molekulargewichte verstehen sich inkl. des V₅-Epitops. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

3.3.3.2 Komplementationsstudien der DGAT2 aus *O. tauri* in *S. cerevisiae*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C mit einer an *S. cerevisiae* adaptierten Codonverwendung zur Synthese der Proteine führte, sollte nun untersucht werden, ob die heterologe Expression auch zur Komplementation des *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyps bezüglich der Triacylglycerin-Synthese führt. Dazu wurde der Hefestamm BY4741 *lro1Δ dga1Δ* mit dem Expressionskonstrukt pYES2/CT-OtDGAT2A, pYES2/CT-OtDGAT2B, pYES2/CT-OtDGAT2C, pYES2/CT-*DGA1* oder dem Expressionsvektor pYES2/CT als Leervektor-Kontrolle transformiert. Zusätzlich wurde der Hefestamm BY4741 mit dem Expressionsvektor pYES2/CT als Leervektor-Kontrolle transformiert. In einem ersten Ansatz wurde untersucht, ob die möglichen DGAT2 aus *O. tauri* die hefeeigenen Fettsäuren 16:0, 16:1 n -7, 18:0, 18:1 n -9 und 18:1 n -7 für die Acylierung von DAG verwenden können. Daher erfolgte die Kultivierung der transgenen Hefen ohne Zugabe von nicht-hefeeigenen Fettsäuren in das Selektionsmedium. Im Anschluss an die Expression wurden Lipidextrakte der transgenen Hefen hergestellt (siehe 2.26). Die einzelnen Lipidklassen der Extrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie voneinander getrennt, so dass nach einer erfolgreichen Komplementation TAG zu detektieren wäre.

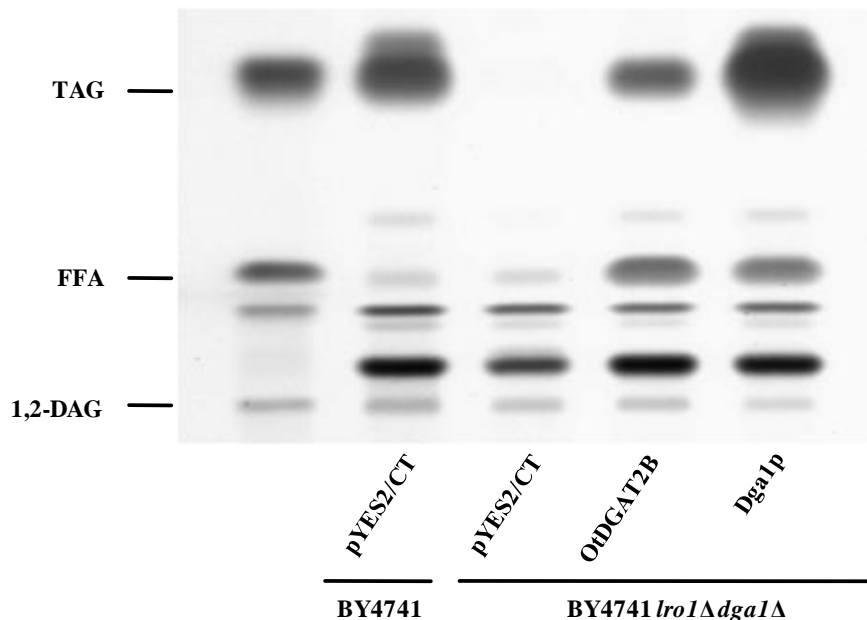
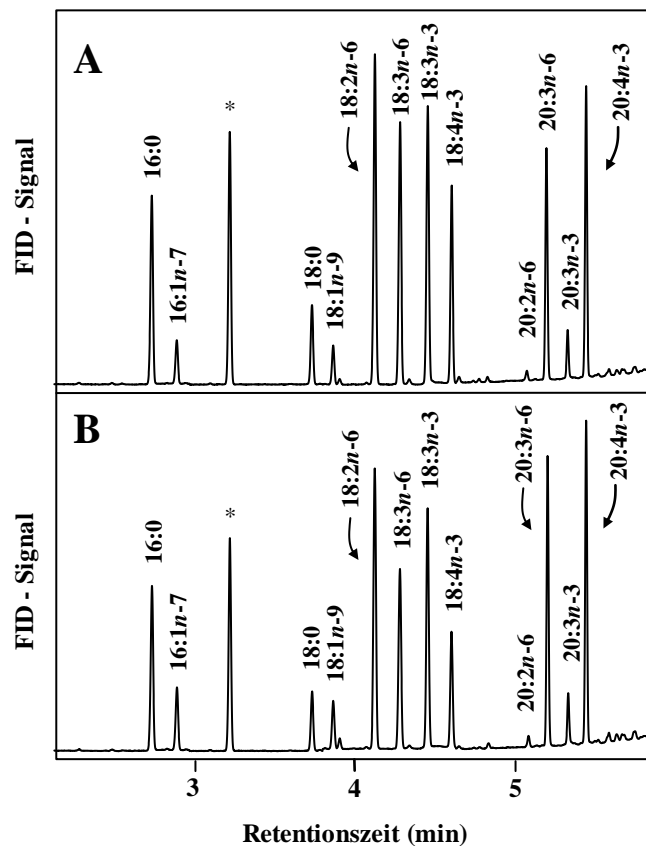


Abb. 25 Komplementation der Doppelmutante BY4741 *lro1Δ dga1Δ* durch OtDGAT2B.

Dargestellt ist ein Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte von transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2/CT oder einem der Expressionskonstrukte pYES2/CT-OtDGAT2B bzw. pYES2/CT-*DGA1* transformiert wurden. Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (siehe 2.20). Die Expression erfolgte für 28 h bei 30 °C. Die Überexpression der Gene führte zu keiner Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

Es zeigte sich, dass die Expression von OtDGAT2B und *DGA1* zu einer Komplementation des *lro1Δ dgalΔ*-Phänotyps führte (Abb. 25), jedoch nicht die Expression von OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C (Daten nicht gezeigt). Damit wurde die OtDGAT2B funktional als DGAT2 identifiziert. Es wurde spekuliert, dass die fehlende Komplementation von OtDGAT2A und OtDGAT2C auf besondere Substratspezifitäten der mutmaßlichen Enzyme hindeuten könnte, die im Gegensatz zu OtDGAT2B, gesättigte und einfach ungesättigte C16- und C18-Fettsäuren als Substrate diskriminieren. Es wurde vermutet, dass OtDGAT2A und OtDGAT2C stattdessen ausschließlich PUFA und/oder VLCPUFA als Substrate verwenden könnten. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden weitere Komplementationsstudien durchgeführt. Für diese Studien sollte das hefeeigene Fettsäuremuster um PUFA und VLCPUFA erweitert werden. Dazu wurden die Hefestämme BY4741 und BY4741 *lro1Δ dgalΔ* entweder mit dem Leervektor pYES2/CT oder einem der Expressionskonstrukte pYES2/CT-OtDGAT2A, pYES2/CT-OtDGAT2C bzw. pYES2/CT-*DGA1* transformiert.



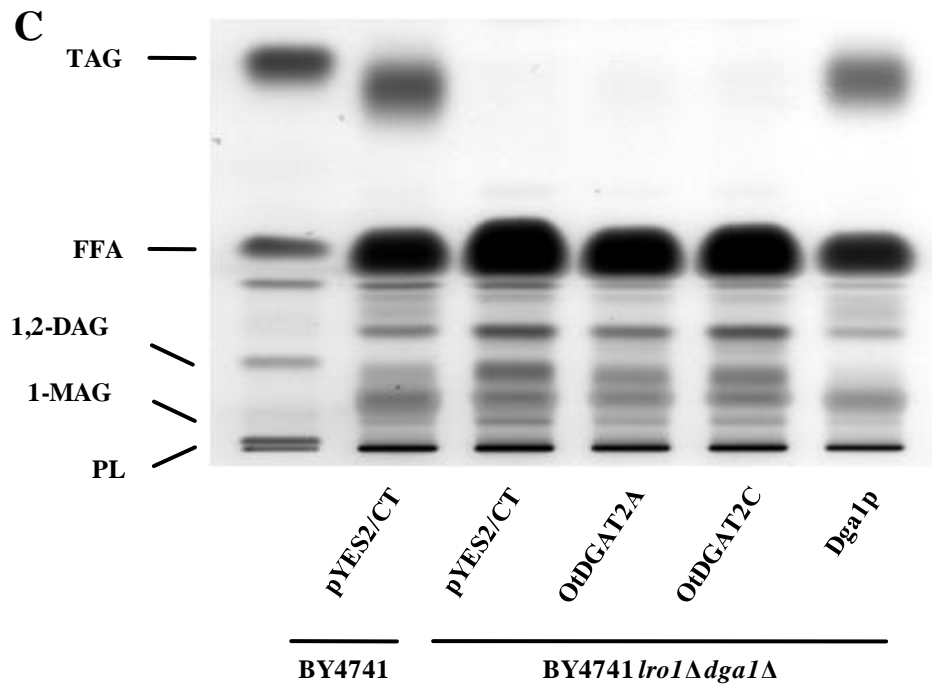


Abb. 26 Coexpression von PSE1 und OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C in BY4741 *lro1Δ dga1Δ*.

Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (siehe 2.20). Die Expression erfolgte für 28 h bei 30 °C in Gegenwart von jeweils 100 µM der Fettsäuren 18:2*n*-6, 18:3*n*-6, 18:3*n*-3 und 18:4*n*-3, die von der Δ6-Elongase PSE1 als Substrate verwendet werden können. Die Überexpression der Gene führte zu keiner Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Dargestellt sind die GC-Profile von transgenen Hefen, die mit den Expressionskonstrukten pESC-LEU-PSE1 und (A) pYES2/CT-OtDGAT2A oder (B) pYES2/CT-OtDGAT2C transformiert wurden. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. (C) Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte von Hefekulturen nach Coexpression von PSE1 und OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C in BY4741 *lro1Δ dga1Δ*. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurden dieselben Hefen mit dem Expressionskonstrukt pESC-LEU-PSE1 transformiert. Durch diese Cotransformation der Expressionskonstrukte sollten transgene Hefen erzeugt werden, die exogene, mehrfach ungesättigte C18-Fettsäuren zu den korrespondierenden C20-Fettsäuren umsetzen können. Abb. 26 zeigt beispielhaft die Fettsäurezusammensetzung der transgenen Hefen nach Coexpression von PSE1 und OtDGAT2A (Abb. 26 A) bzw. OtDGAT2C (Abb. 26 B). Neben den hefeeigenen C16- und C18-Fettsäuren sind deutlich die applizierten C18-PUFA und die Produkte der Δ6-Elongase PSE1 (20:2*n*-6, 20:3*n*-6, 20:3*n*-3 und 20:4*n*-3) zu erkennen. Dies zeigt, dass das hefeeigene Fettsäuremuster erfolgreich erweitert werden konnte. Abb. 26 C zeigt die mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Lipidextrakte nach den Coexpressionen der OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C mit PSE1. In den Lipidextrakten der Leervektor-Kontrolle BY4741 und der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach Expression von *DGA1* wurde TAG detektiert.

Die Leervektor-Kontrolle der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante zeigte wie erwartet kein TAG. Das um C18-PUFA und C20-VLCPUFA erweiterte Fettsäurespektrum sollte den heterolog exprimierten Genen weitere potentielle Substrate neben den hefeeigenen Fettsäuren anbieten. Jedoch bewirkte dies nicht die Komplementation des *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyps nach Expression von OtDGAT2A oder OtDGAT2C.

Obwohl die in Abb. 26 C dargestellten Ergebnisse eindeutig keine DGAT-Aktivität nach Expression der Kandidatengene aus *O. tauri* erkennen lassen, sollte ein weiterer sensitiverer Versuchsansatz Aufschluss über die mögliche Genfunktion von OtDGAT2A und OtDGAT2C geben. Hierfür wurden ebenfalls die in Abb. 26 dargestellten Expressionskonstrukte verwendet und die Kulturen mit radioaktiv markierten Fettsäuren inkubiert. Abb. 27 zeigt die aufgetrennten Lipidextrakte der transgenen Hefen nach den Coexpressionen mit PSE1. Die radioaktive Markierung der Fettsäuren wurde in freien Fettsäuren und den Glycerolipiden einschließlich TAG detektiert. Wie erwartet, konnten in den Lipidextrakten des Hefestamms BY4741 und der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach Expression von *DGA1* die Bildung von TAG festgestellt werden. In der Doppelmutante BY4741 *lro1Δ dga1Δ* konnte unabhängig von der heterologen Expression der OtDGAT2A und OtDGAT2C kein TAG nachgewiesen werden.

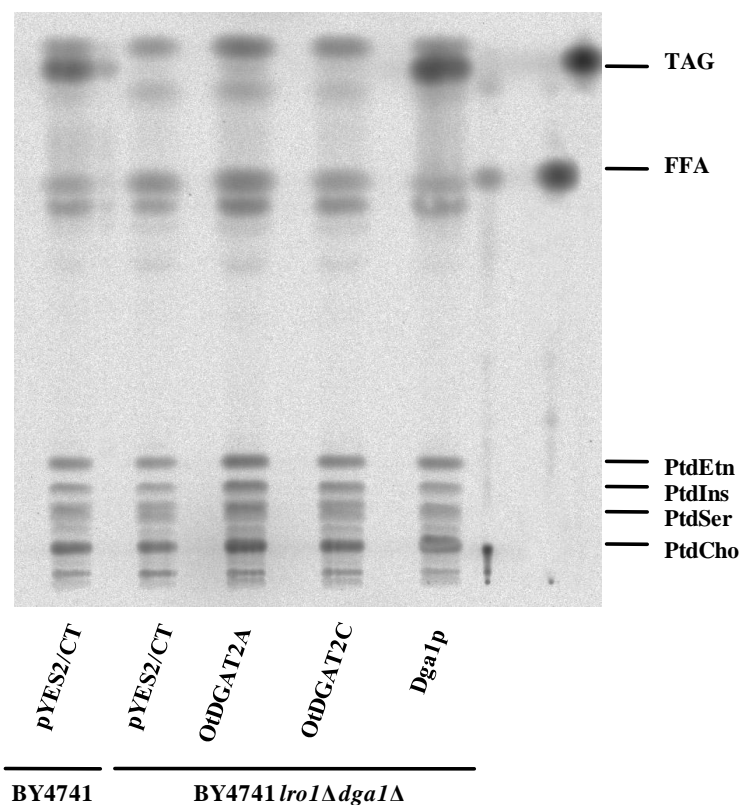


Abb. 27 Coexpression von PSE1 und OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C in BY4741 *lro1Δ dga1Δ*.

Die transgenen Hefen wurden in Gegenwart der radioaktiv markierten Fettsäuren 18:2 n -6 und 18:3 n -3 kultiviert, die den Kulturen 18 h nach Induktion der Expression hinzugefügt wurden. Die Präparation der Lipidextrakte erfolgte nach der in Abschnitt 2.21 beschriebenen Methode. Die Auftrennung der einzelnen Lipidklassen erfolgte über Dünnschichtchromatographie. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt.

Der Nachweis der möglichen Funktionen von OtDGAT2A und OtDGAT2C wurde zugunsten der weiteren Problemstellungen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die heterologe Expression OtDGAT2B den *lro1Δ dga1Δ*-Mutanten-Phänotyp komplementieren kann, sollte dieses Enzym durch weitere Expressionsstudien biochemisch charakterisiert werden.

3.3.3.3 Nachweis von Lipidkörpern in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* werden TAG und Sterolester (SE), wie in den meisten eukaryoten Zellen, am ER synthetisiert und anschließend in Lipidkörpern (*lipid bodies*) eingelagert (Murphy, 2001). Die Lipidkörper der Hefe bilden kleine sphärische Kompartimente mit einem Durchmesser von etwa 0,4 µm aus, die nahezu ausschließlich aus Neutrallipiden, TAG, SE und zu einem geringen Anteil aus Glycerophospholipiden bestehen (Leber et al., 1994). Die Glycerophospholipide bilden dabei eine einzelne Glycerophospholipidschicht aus, die den hydrophoben Kern der Lipidkörper umgibt, in dem TAG und SE akkumulieren (Athenstaedt et al., 1999). In dieser Glycerophospholipidoberfläche der Lipidkörper lagern sich Proteine ein, die überwiegend an der Lipid-Biosynthese teilhaben (Oelkers et al., 2002; Athenstaedt und Daum, 2005). Aufgereinigte Lipidkörper aus *S. cerevisiae* zeigten hohe Dga1p-Aktivität. Dies führte zu der Annahme, dass Dga1p an der Oberfläche der Lipidkörper lokalisiert sein könnte (Sorger und Daum, 2002). Die Arbeiten von Sandager et al. (2002) belegten, dass die Anwesenheit von Dga1p, Lro1p, Are1p oder Are2p essenziell für die Bildung von Lipidkörpern in *S. cerevisiae* ist. Dem Hefestamm H1246 fehlen diese vier Gene.

Lipidkörper lassen sich *in vivo* mit dem fluoreszierenden Farbstoff Nile Red nachweisen (Greenspan et al., 1985). Zum Nachweis von Lipidkörpern in H1246 wurden Hefezellen nach Expression von OtDGAT2B mit Nile Red angefärbt. Während Lipidkörper in den Hefezellen des Wildtyps W303 nachweisbar waren (Abb. 28 A), waren sie in den Hefezellen der Vierfachmutante H1246 abwesend (Abb. 28 D). Nach Expression von OtDGAT2B in H1246 wurden auch in diesem Hefestamm Lipidkörper sichtbar (Abb. 28 B). Dies bestätigte die Aktivität von OtDGAT2B, die bereits durch die Lipidanalyse nach Expression von OtDGAT2B in der Doppelmutante BY4741 *lro1Δ dga1Δ* gezeigt worden war (Abb. 25). Wie erwartet, komplementierte die Expression von *DGA1* den Mutanten-Phänotyp von H1246 (Abb. 28 C). Damit konnte durch einen zweiten unabhängigen Versuchsansatz die Aktivität von OtDGAT2B *in vivo* dargestellt werden.

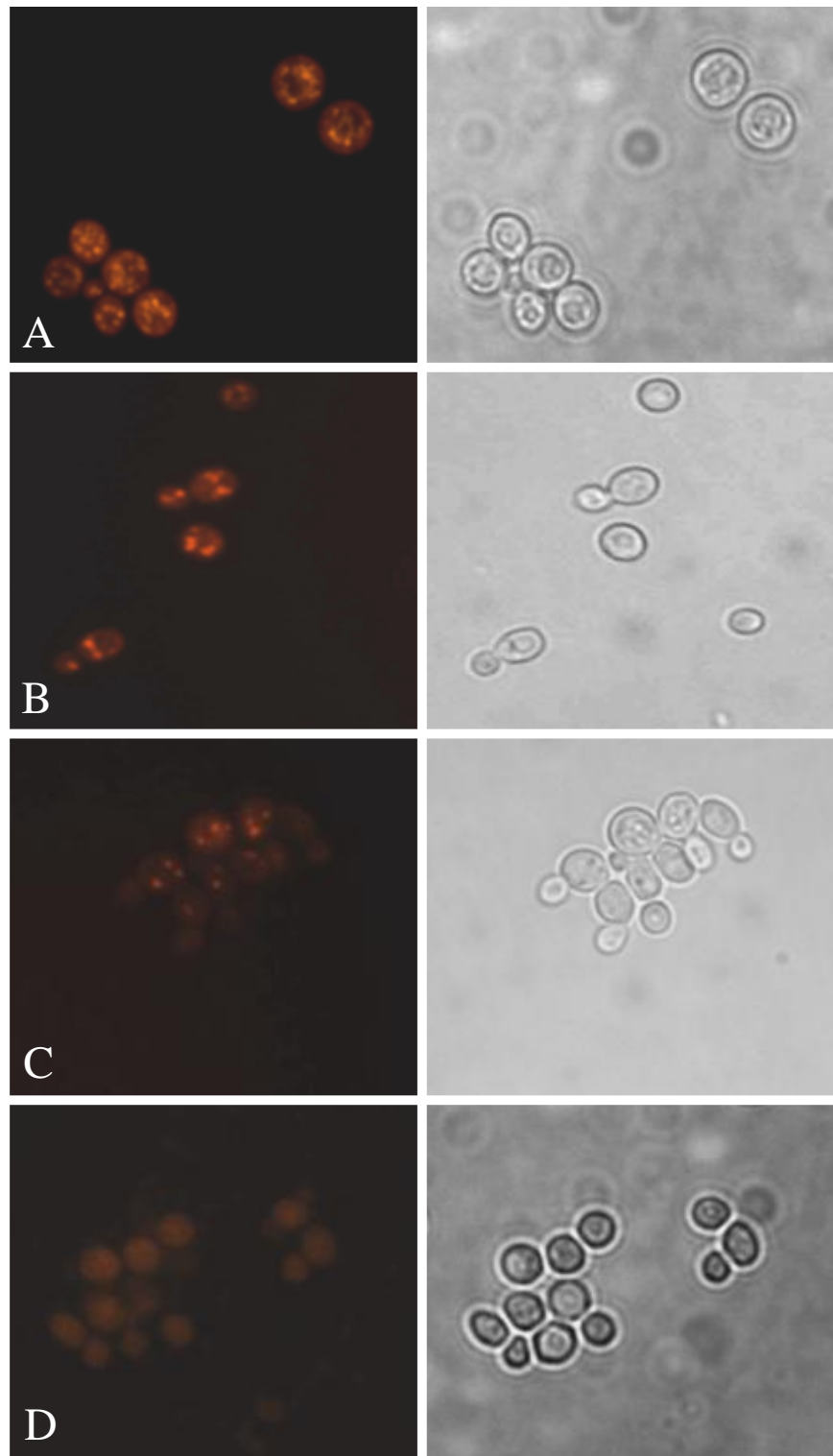


Abb. 28 Nachweis von Lipidkörpern im Hefestamm H1246 nach Expression von OtDGAT2B.

Für die Fluoreszenz-Markierung von Lipidkörpern wurden 500 μ l der Hefe-Expressionskulturen sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 150 μ l PBS-Puffer sowie 5 μ l Nile-Red-Lösung (1 mg/ml Aceton) zum Anfärben der Zellen aufgenommen. Nach Inkubation für 15 – 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen mit 200 μ l PBS-Puffer gewaschen. (A) W303-Leervektor-Kontrolle; (B) H1246-pYES2/CT-OtDGAT2B; (C) H1246-pYES2/CT-DGA1; (D) H1246-Leervektor-Kontrolle Diese Untersuchungen wurden im Rahmen eines Gastaufenthaltes in unserem Labor von Tibor Czabany (Technische Universität Graz, Österreich) durchgeführt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten.

3.3.3.4 *In vitro*-Untersuchungen zur Aktivität von OtDGAT2B

Für die *in vitro*-Untersuchungen der Enzymaktivität von OtDGAT2B wurde der Hefestamm BY4741 *lro1Δ dga1Δ tes1Δ* mit den Expressionskonstrukten pYES2/CT-OtDGAT2B, pYES2/CT-DGA1 oder dem Leervektor als Kontrolle transformiert. Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (siehe 2.20). Der Zellaufschluss, die Präparation des Zellextrakts (Protein-Homogenat) im Anschluss an die Expression wurden, wie in Abschnitt 2.23.1 beschrieben, durchgeführt.

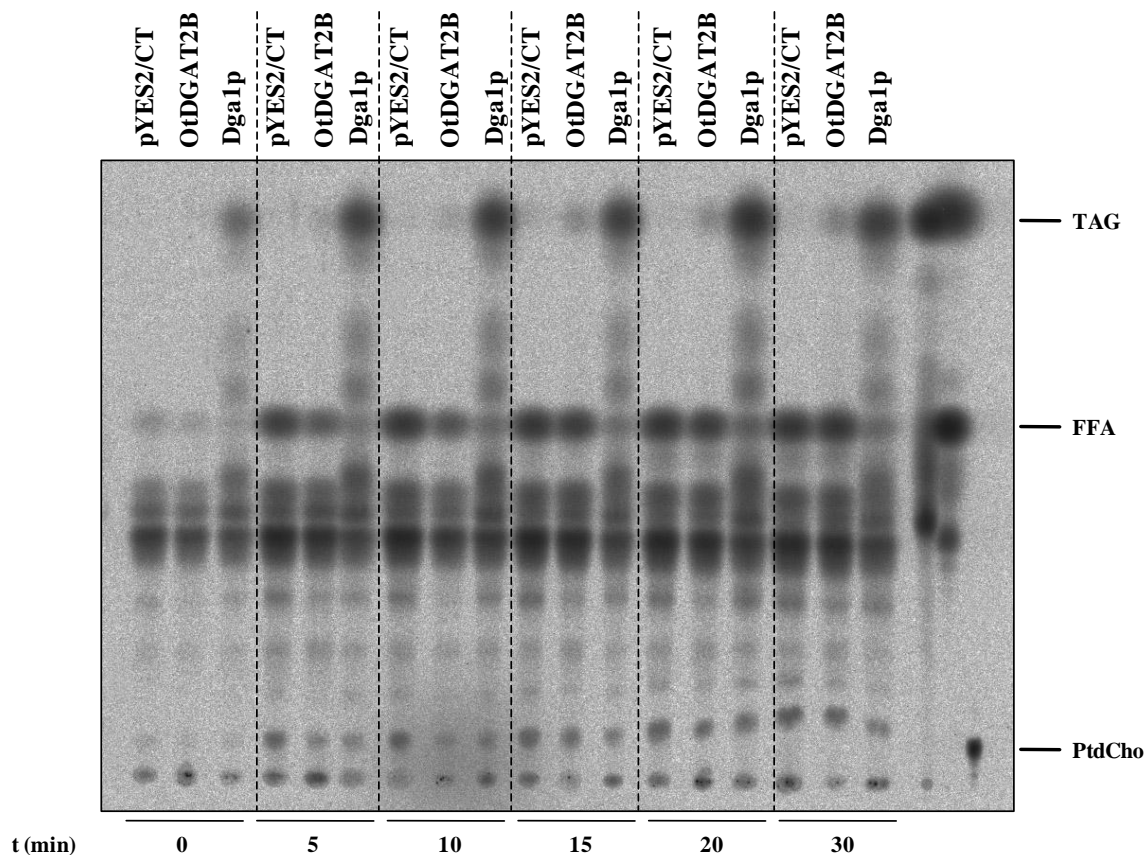


Abb. 29 *In vitro*-Untersuchungen zur Aktivität von OtDGAT2B.

Zur Darstellung der Aktivität von OtDGAT2B *in vitro* wurden von den Expressionskulturen Zellextrakte (Protein-Homogenat) hergestellt. 100 µg des Protein-Homogenats wurden mit radioaktiv markiertem ^{14}C -Oleoyl-CoA (80.000 dpm) und di-18:1 $^{\Delta 9}$ -DAG bei 30 °C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 20 und 30 min sowie unmittelbar nach Zugabe der Substrate wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Lipide mit Chloroform aus dem Reaktionsansatz extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Abb. 29 zeigt die aufgetrennten Lipidextrakte der *in vitro*-Enzymaktivitätsuntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Substrate. Es ist zu erkennen, dass in den Lipidextrakten der Hefemutante mit dem Expressionsvektor pYES2/CT als Leervektor-Kontrolle kein TAG nachweisbar war.

Die Aktivität von OtDGAT2B wurde erst zehn Minuten nach Zugabe der Substrate anhand der TAG-Bande sichtbar. Der TAG-Gehalt in den OtDGAT2B-Proben nahm über einen Zeitraum von 20 min stetig zu, was an der intensiver werdenden Schwärzung des Signals zu erkennen ist. Im Vergleich dazu zeigte Dga1p eine höhere Aktivität. Obwohl die Reaktion unmittelbar nach Zugabe der Substrate gestoppt wurde (Zeitpunkt $t=0$ min), kam es in dieser sehr kurzen Zeit bereits zur Bildung von TAG in den Dga1p-Proben. Die Menge des gebildeten TAG änderte sich in den Dga1p-Proben nur innerhalb der ersten fünf Minuten. Für die späteren Zeitpunkte wurde keine weitere Zunahme des TAG-Gehalts beobachtet.

3.3.3.5 Untersuchungen zur Fettsäure-Substratspezifität von OtDGAT2B

Die Versuche zur Komplementation des *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyps zeigten, dass OtDGAT2B TAG auf Basis der hefeeigenen Fettsäuren synthetisieren kann, also gesättigte und einfach ungesättigte C16- und C18-Fettsäuren als Substrate nutzen kann (Abb. 25). In den nun folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob auch LCPUFA und VLCPUFA als Substrate von OtDGAT2B akzeptiert werden. Zu diesem Zweck wurden weitere Expressionsversuche in transgenen Hefen durchgeführt, die entweder den Leervektor pYES2/CT oder eines der Expressionskonstrukte pYES2/CT-OtDGAT2B bzw. pYES2/CT-DGA1 enthielten. Der Vergleich der Fettsäureprofile des in Hefe gebildeten TAG sollte mögliche Unterschiede in den Fettsäure-Substratspezifitäten von OtDGAT2B und Dga1p aufzeigen.

Die transgenen Hefen wurden in Gegenwart von 18:3 n -6, 18:3 n -3 (Abb. 30 A und B), 20:3 n -6 oder 20:3 n -3 (Abb. 30 C und D) kultiviert. Die Inkorporation beschreibt das prozentuale Verhältnis des Anteils der jeweiligen Fettsäure an TAG zu dem gesamten Anteil der jeweiligen Fettsäure an den Glycerolipiden. In der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante, die den Expressionsvektor pYES2/CT als Leervektor-Kontrolle enthielt, wurde kein TAG detektiert. Die C18-Fettsäuren 18:3 n -6 und 18:3 n -3 wurden von den transgenen Wildtyp-Hefen jeweils zu ungefähr gleichen Anteilen in TAG inkorporiert. Die Expression von OtDGAT2B resultierte in einer Inkorporation von 30 % 18:3 n -6 in TAG während die Expression von Dga1p einen entsprechenden Wert von 38 % ergab. Für 18:3 n -3 ergab sich das gegenteilige Verhältnis. Hier inkorporierte OtDGAT2B mit 37 % etwas mehr 18:3 n -3 in TAG als Dga1p mit einer Inkorporation von 31 % (Abb. 30 A und B).

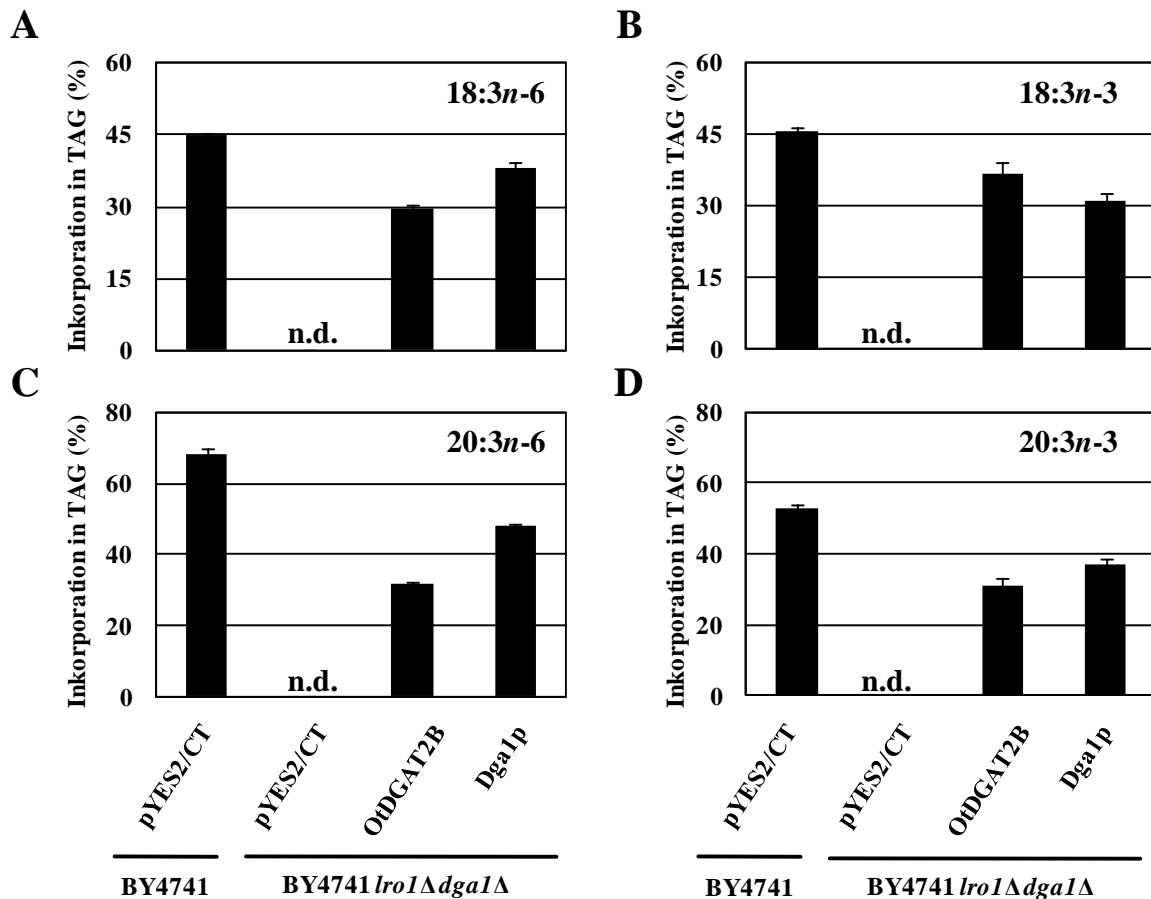


Abb. 30 Expression von OtDGAT2B in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter Fettsäuren.

Die Expression erfolgte in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die jeweils einzeln appliziert wurden. Im Anschluss an die Expressionen wurden Lipidextrakte präpariert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die TAG- und Glycerophospholipid-enthaltenen Fraktionen wurden daraufhin isoliert und deren Fettsäurezusammensetzung gaschromatographisch analysiert. Die Inkorporation von (A) 18:3n-6, (B) 18:3n-3, (C) 20:3n-6, (D) 20:3n-3 in TAG wurde aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Fettsäure als $(100 \times \text{TAG}\%) / (\text{TAG}\% + \text{Glycerophospholipid}\%)$ berechnet. Die dargestellten Werte repräsentieren die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Nach Expression in Gegenwart der C20-Fettsäuren 20:3n-6 und 20:3n-3 ergaben sich für OtDGAT2B jeweils niedrigere Werte für die Inkorporation im Vergleich zu Dga1p (Abb. 30 C und D). Für die Wildtyp-Hefen wurde eine erhöhte Inkorporation von 20:3n-6 in TAG im Vergleich zu 20:3n-3 beobachtet. Die Fettsäureprofile des TAG zeigten, dass OtDGAT2B zum einen nicht zwischen PUFA und VLCPUFA der n-6- und n-3-Serie unterscheidet und zum anderen keine ausgeprägte Präferenz für C18- oder C20-Fettsäuren aufweist. Während die Werte für die Inkorporation für 18:3n-6, 20:3n-6 und 20:3n-3 nahezu identisch waren, war die Inkorporation von 18:3n-3 leicht erhöht.

3.3.3.6 Analyse der molekularen TAG-Spezies nach Expression von OtDGAT2B

OtDGAT2B zeigte bisher keine enge Fettsäure-Substratspezifität. Vielmehr scheint das Enzym gesättigte und ungesättigte Fettsäuren gleichermaßen gut als Substrate zu akzeptieren. Für weitergehende Charakterisierungen der Enzymaktivität wurde OtDGAT2B in Gegenwart äquimolarer Mengen verschiedener Fettsäuren exprimiert, um die molekularen Spezies des von OtDGAT2B gebildeten TAG aufzuzeigen. Die zu testenden Fettsäuresubstrate waren 18:2 n -6, 18:3 n -6, 18:3 n -3 und 18:4 n -3. Im Anschluss an die Expression wurden Lipidextrakte präpariert und die molekularen Spezies des TAG und des DAG mittels LC-MS/MS analysiert. Anhand dieses Ansatzes sollte versucht werden Hinweise auf die Substratspezifität und die Substratelektivität zu erhalten. Die Messungen ergaben insgesamt 34 verschiedene TAG-Spezies und 18 verschiedene DAG-Spezies. Ein Vergleich der molekularen TAG-Spezies im Wildtyp BY4741, der Doppelmutante BY4741 *lro1Δ dga1Δ* nach Expression von OtDGAT2B, *DGA1* bzw. der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT ist in Abb. 31 dargestellt. In der Abbildung sind von links nach rechts zuerst die DAG-Spezies und danach die TAG-Spezies dargestellt. Während im Wildtyp und in der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach *DGA1*-Expression kaum DAG vorliegt, scheint DAG in der Leervektor-Kontrolle der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante zu akkumulieren. Dies ist nicht unerwartet, da DAG als direkte TAG-Vorstufe von der Doppelmutante nicht bzw. kaum verwertet werden kann. In Abb. 31 B ist außerdem zu erkennen, dass in der Doppelmutante zwei TAG-Spezies vorliegen, die ausschließlich aus den gesättigten Fettsäuren 16:0 und 18:0 bestehen (TAG-52:0 und TAG-54:0). Die Synthese dieser TAG-Spezies ist vermutlich auf die Nebenaktivitäten von Are1p und Are2p zurückzuführen. Beide Enzyme sind Acyl-CoA:Sterin-Acyltransferasen, deren Nebenprodukt TAG darstellt (Sandager et al., 2002). Interessanterweise sind keine weiteren TAG-Spezies in der Doppelmutante zu erkennen, so dass Are1p und Are2p vermutlich exklusiv gesättigte DAG-Spezies mit gesättigten Fettsäuren acylieren. Dagegen haben TAG-52:0 und TAG-54:0 im Wildtyp und in der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach *DGA1*-Expression nur einen sehr geringen Anteil an den verschiedenen TAG-Spezies. Nach Expression von OtDGAT2B waren die TAG-52:0- und TAG-54:0-Anteile in der Doppelmutante ebenfalls erniedrigt. Dennoch waren auch hier verschiedene DAG-Spezies vorhanden, die im Wildtyp und in der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach Expression von *DGA1* nicht sichtbar waren.

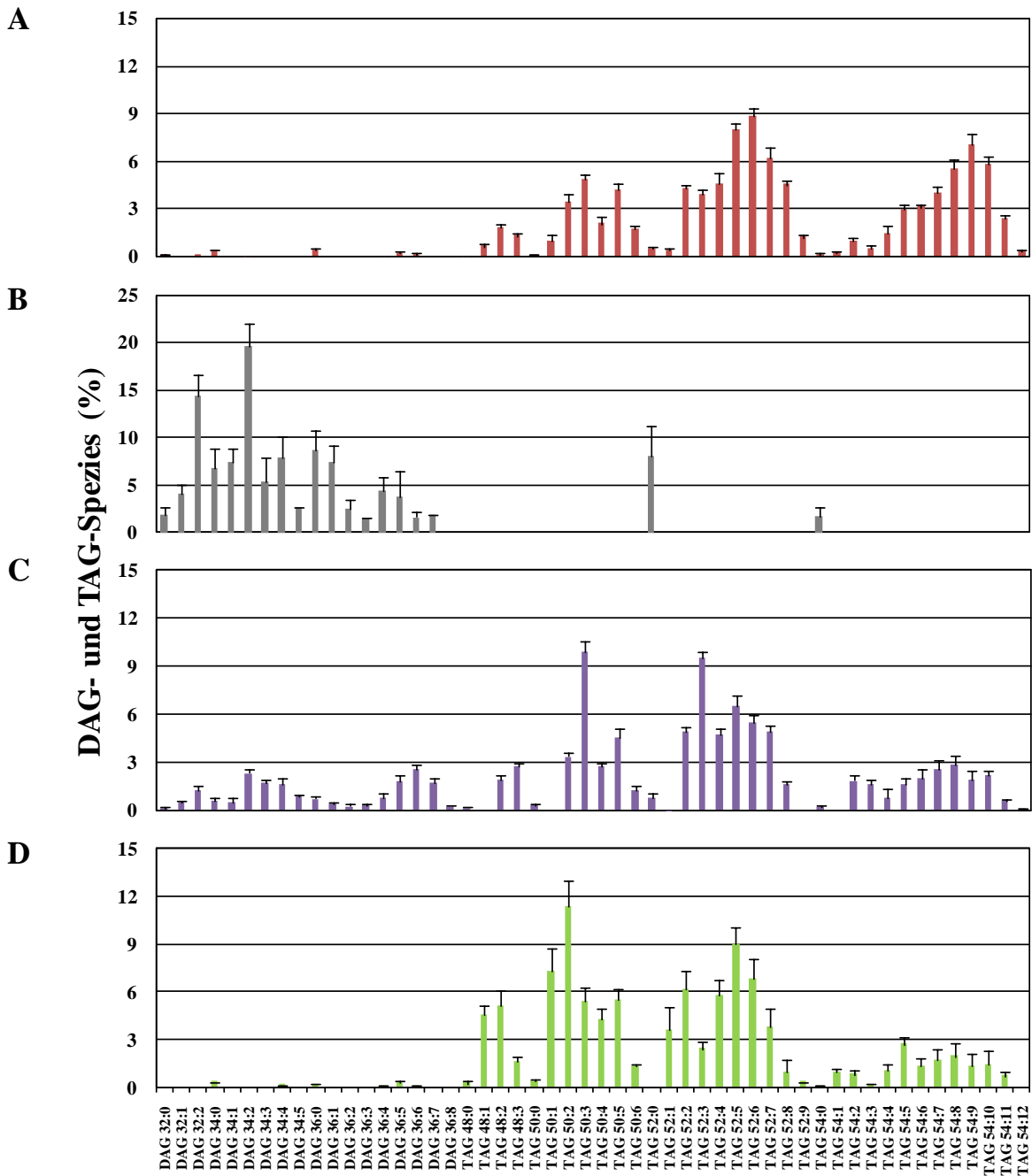


Abb. 31 Analyse der molekularen DAG- und TAG-Spezies nach Expression von OtdGAT2B.

Die Expression erfolgte in Gegenwart äquimolarer Mengen der Fettsäuren 18:2n-6, 18:3n-6, 18:3n-3 und 18:4n-3. Im Anschluss an die Expressionen wurden Lipidextrakte präpariert und mittels LC-MS/MS analysiert. Die prozentualen Anteile der jeweiligen DAG- und TAG-Spezies wurden berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von (A) der Leervektor-Kontrolle des Wildtyps BY4741, (B) der Leervektor-Kontrolle der Mutante BY4741 *lro1Δ dgalΔ*, (C) der Mutante BY4741 *lro1Δ dgalΔ* nach Expression von OtdGAT2B und (D) der Mutante BY4741 *lro1Δ dgalΔ* nach Expression von *DGA1*. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Expressionskulturen.

Weitere Unterschiede zwischen den molekularen TAG-Spezies in den Kulturen von OtDGAT2B und Dga1p sind in Abb. 32 zu erkennen. Während die molekularen TAG-Spezies 48:1, 50:1, 52:1 und 54:1 in Dga1p-Expressionskulturen auftraten, fehlten diese in den OtDGAT2B-Expressionskulturen. Die TAG-Spezies 54:12, die an allen *sn*-Positionen des TAG-Moleküls die Fettsäure 18:4 n -3 aufweist, trat umgekehrt nur in den OtDGAT2B-Expressionskulturen auf. Abb. 32 bildet die relativen Verhältnisse der jeweiligen TAG-Spezies aus den OtDGAT2B-Lipidextrakten und den Dga1p-Lipidextrakten als Quotienten ab. TAG-Spezies mit Werten oberhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in den OtDGAT2B-Lipidextrakten als in den Dga1p-Lipidextrakten vor und TAG-Spezies mit Werten unterhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in Dga1p-Lipidextrakten vor. Die auffälligsten Unterschiede in der TAG-Zusammensetzung waren der etwa 8-fach höhere Anteil der 54:3-Spezies und der etwa 4-fach höhere Anteil der Spezies 52:3. Eine weitere Beobachtung war, dass TAG-Spezies mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den OtDGAT2B-Lipidextrakten tendenziell einen höheren Anteil hatten als in den Lipidextrakten von Dga1p. Im Allgemeinen war der Anteil an TAG-Spezies mit C18-Fettsäuren an allen drei Positionen und sieben, acht, neun oder zehn Doppelbindungen in den OtDGAT2B-Kulturen um etwa das 1,5-fache erhöht (Abb. 32).

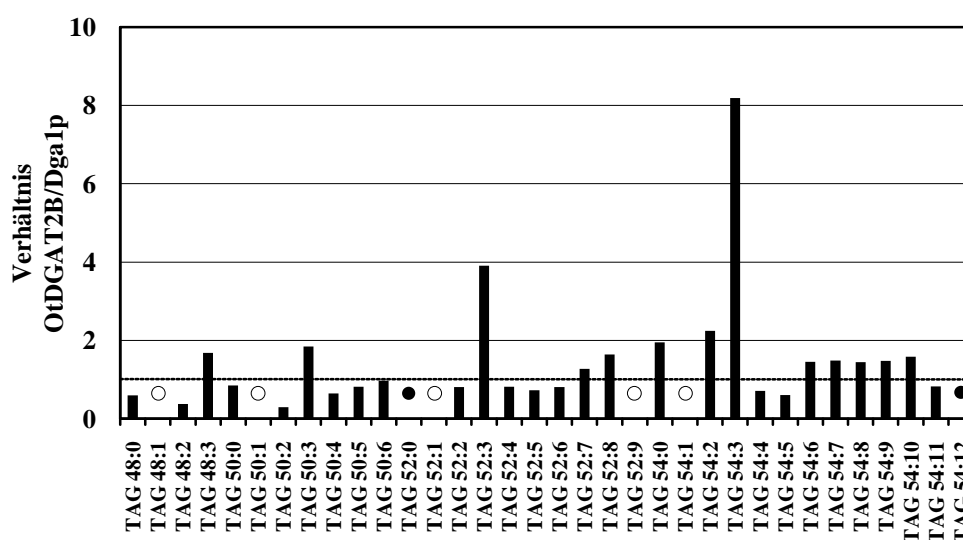


Abb. 32 Verhältnis der TAG-Spezies aus OtDGAT2B- und Dga1p-Expressionskulturen.

Die Werte geben das Verhältnis von TAG-Spezies aus Kulturen nach Expression von OtDGAT2B bzw. *DGA1* aus Abb. 24 an. TAG-Spezies mit Werten oberhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in den OtDGAT2B-Lipidextrakten als in den Dga1p-Lipidextrakten vor und TAG-Spezies mit Werten unterhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in Dga1p-Lipidextrakten vor. Mit ○ markierte TAG-Spezies sind nur in OtDGAT2B-Kulturen und mit ● markierte TAG-Spezies sind nur in Dga1p-Kulturen zu finden.

Zusammenfassend gilt, dass im Genom von *O. tauri* drei mögliche DGAT2-Kandidatengene identifiziert werden konnten. Die Mikroalge *O. tauri* scheint nicht über DGAT1 oder DGAT3 zu verfügen, so dass auf eine Beteiligung der identifizierten OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C an der TAG-Synthese geschlossen werden kann. Obwohl die Proteine der drei möglichen DGAT2 aus *O. tauri* in transgenen Hefen nach heterologer Expression nachgewiesen wurden, konnten OtDGAT2A und OtDGAT2C den *lro1Δ dgal1Δ*-Phänotyp nicht komplementieren. Dagegen ließ sich OtDGAT2B erfolgreich in Hefe exprimieren, so dass in verschiedenen Versuchsansätzen die enzymatische Aktivität von OtDGAT2B dargestellt werden konnte. Von besonderem Interesse war bei den durchgeführten Arbeiten die Substratspezifität der OtDGAT2B. Hierbei wurde festgestellt, dass das Enzym vermutlich gesättigte und ungesättigte C16- und C18-Fettsäuren als Substrate gleichermaßen gut akzeptiert und keine signifikante Substratspezifität für VLCPUFA aufweist.

3.4 Identifizierung und funktionale Charakterisierung einer PDAT aus *O. tauri*

Die Familie der membranständigen Phospholipid:Diacylglycerin-Acyltransferasen (PDAT) ist an der Acyl-CoA-unabhängigen Synthese von TAG beteiligt (Dahlqvist et al., 2000; Oelkers et al., 2000). Während in der Hefe *S. cerevisiae* die TAG-Synthese der stationären Wachstumsphase vornehmlich über den Acyl-CoA-abhängigen Weg erfolgt, dominiert der Acyl-CoA-unabhängige Weg die TAG-Synthese während der exponentiellen Wachstumsphase (Oelkers et al., 2002). In Pflanzen wurde die Acyl-CoA unabhängige TAG-Synthese zuerst in Membranpräparationen von reifenden Samen des Wolfsmilchgewächses *Ricinus communis* und der Korbblütler *Crepis palaestina* bzw. *Helianthus annuus* beobachtet (Dahlqvist et al., 2000). Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass die Reservelipide von *R. communis* und *C. palaestina* hohe Gehalte einer ungewöhnlichen Fettsäure aufweisen (van de Loo et al., 1995; Lee et al., 1998). Ungewöhnliche Fettsäuren werden häufig durch Enzyme gebildet, die den Δ^{12} -Acyl-Lipid-Desaturasen ähnlich sind und meist an PtdCho gebundene Fettsäuren als Substrate nutzen. Im Allgemeinen sind die ungewöhnlichen Fettsäuren in höheren Pflanzen keine strukturellen Bestandteile biologischer Membranen, sondern sie akkumulieren vielmehr spezifisch im Samenöl (Millar et al., 2000). Die in Membranpräparationen von *R. communis* und *C. palaestina* beobachteten PDAT-Aktivitäten, sowie die Substratspezifitäten der PDAT beider Pflanzen deuten eine aktive Beteiligung dieser Enzymfamilie an der Akkumulation von ungewöhnlichen Fettsäuren im Samenöl an. Marine Mikroalgen, die VLCPUFA in Reservelipiden akkumulieren, könnten daher über PDAT mit entsprechenden Substratspezifitäten für VLCPUFA verfügen.

In den folgenden Abschnitten werden die Identifizierung und die Versuche zur funktionalen Charakterisierung einer PDAT aus der Mikroalge *O. tauri* dargestellt.

3.4.1 Identifizierung von PDAT aus Mikroalgen

Für die Identifizierung von PDAT-Enzymen in der Mikroalge *O. tauri* wurde eine Genom-Datenbank dieses Algen-Stammes nach Homologen zu den PDAT aus *S. cerevisiae* und *A. thaliana* durchsucht (DOE Joint-Genome Institute, <http://genome.jgi-psf.org/>). Hierbei konnte der vollständige Leserahmen einer möglichen PDAT-Sequenz identifiziert werden. Die Aminosäuresequenz der OtPDAT wurde zusammen mit weiteren durch Datenbanksuchen identifizierten möglichen PDAT aus *P. patens* und *O. lucimarinus* in einem Phylogramm zusammengefasst (Abb. 33). Zudem besitzen die drei möglichen PDAT aus *O. tauri*, *O. lucimarinus* und *P. patens* begrenzte Sequenzähnlichkeit zu Enzymen, deren gemeinsame Substrate Glycerophospholipide darstellen. Diese Enzyme bilden zusammen mit den PDAT die Superfamilie der Lecithin:Cholesterin-Acyltransferasen (LCAT), die verschiedene enzymatische Funktionen vereint (Dahlqvist et al., 2000; Noiriël et al., 2004; Banas et al., 2005). LCAT-Aktivität ist vor allem aus dem tierischen System bekannt. Dort bilden LCAT aus Cholesterin und Fettsäuren des PtdCho (Lecithin) die Cholesterinester (Jonas, 2000).

Verschiedene Proteine der LCAT-Superfamilie sind im Phylogramm der Abb. 33 dargestellt. Im Genom von *A. thaliana* wurden bisher sechs Gene identifiziert, die eine hohe Homologie zu den tierischen LCAT aufweisen. Die Aktivitäten der sechs LCAT-Homologen teilen sich auf in PDAT-Aktivität (At5g13640, At3g44830; Stahl et al., 2004), PSAT-Aktivität (At1g04010), LCAT-Aktivität (At1g27480; Noiriël et al., 2004) und Phospholipase A1-Aktivität (At3g03310, At4g19860; Noiriël et al., 2004). Die vermuteten Genfunktionen von At1g27480 und At4g19860 wurden bisher experimentell noch nicht bestätigt. Während im Genom der pflanzlichen Vertreter *A. thaliana*, *P. patens* und des Schneckenklee *Medicago truncatula* die vier LCAT-Homologen PDAT, PSAT, LCAT und PLA1 zu finden sind, scheinen die Genome von *O. tauri* und *O. lucimarinus* nur über PDAT zu verfügen (Abb. 33). Außerdem ist zu erkennen, dass die beiden möglichen PDAT der Mikroalgen-Gattung *Ostreococcus* eine nähere Verwandtschaft zu den PDAT aus den Hefen *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* als zu den pflanzlichen PDAT zeigen (Oelkers et al., 2000; Zhang et al., 2003). Die mögliche PDAT des EPA-produzierenden Moos *P. patens* scheint dagegen den PDAT aus *A. thaliana* und *M. truncatula* evolutiv näherzustehen.

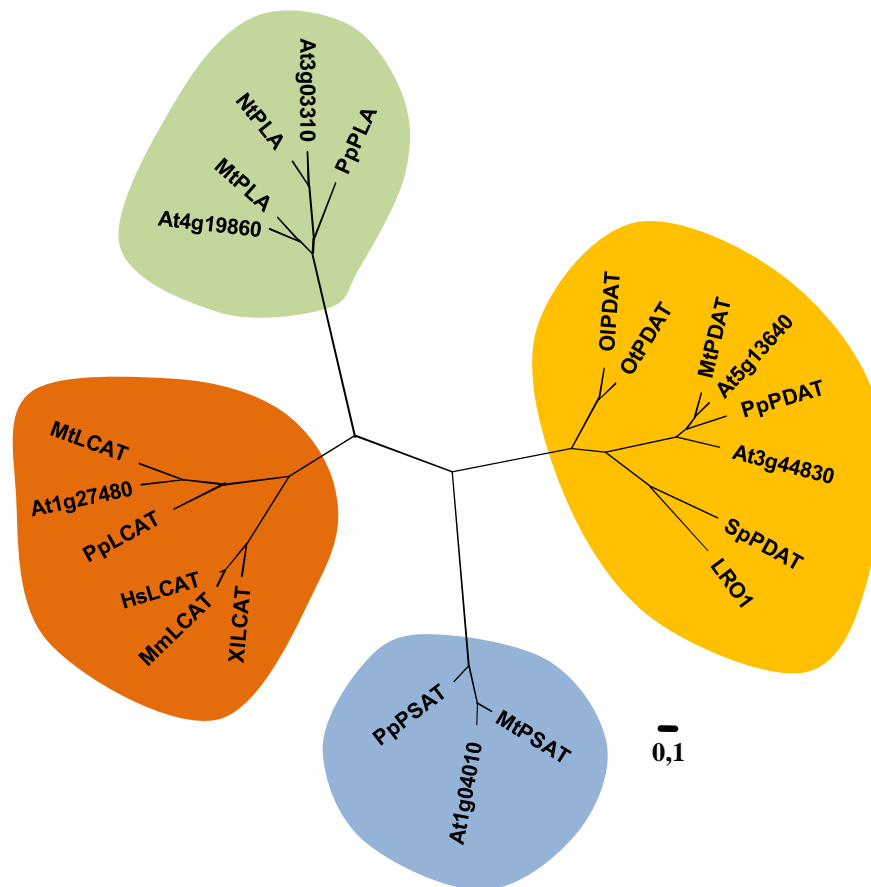


Abb. 33 Phylogramm von Vertretern der LCAT-Familie aus Pflanzen, Hefen, Amphibien und Säugern.

Das Phylogramm zeigt neben bereits funktional identifizierten Enzymen, die in dieser Arbeit identifizierten möglichen PDAT sowie einige funktional noch nicht charakterisierte Enzyme, deren Sequenzen aus verschiedenen genomischen Datenbanken entnommen wurden und aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den PDAT-Proteinen dem Phylogramm hinzugefügt wurden. Die PDAT wurden gelb hinterlegt, die PSAT wurden blau hinterlegt, die LCAT wurden rot hinterlegt und die PLA wurden grün hinterlegt. Die Genbank-Identifikationsnummern sind im Anhang 9 aufgeführt. Details zur Berechnung und Erstellung des Phylogramms können dem Abschnitt 2.4 entnommen werden. Die Skala gibt einen Sequenzunterschied von 10 % wieder (*number of replacement*).

3.4.2 Sequenzanalyse der PDAT aus Mikroalgen

Der bei der Datenbanksuche identifizierte Leserahmen der möglichen PDAT aus *O. tauri* mit 1998 bp codiert für ein Protein mit 665 Aminosäuren. Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 73,2 kDa. Der offene Leserahmen der OtPDAT war in der Datenbank unvollständig annotiert. Der dort annotierte Leserahmen mit 1542 bp ist deutlich kürzer als die offenen Leserahmen der meisten bisher bekannten PDAT, die eine durchschnittliche Länge von etwa 2000 bp besitzen. Zudem beginnt der annotierte Leserahmen mit einem für die Aminosäure Isoleucin codierenden Codon, anstelle des initialen Methionins. Das zu diesem Isoleucin stromaufwärts am nächsten gelegene Methionin-codierende Triplet wurde als das native Start-Codon der OtPDAT angesehen.

Die Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der OtPDAT zu PDAT aus Pflanzen und Hefen sind in Tab. 23 aufgeführt. Zu der bisher nicht charakterisierten PDAT aus *O. lucimarinus* besteht eine Identität von 67 %. Des Weiteren bestehen sowohl zu den pflanzlichen PDAT als auch zu der PDAT aus *S. pombe* vergleichbare Identitätswerte von 28 bis 30 %.

Tab. 23 Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der OtPDAT zu PDAT aus Pflanzen und Hefen.

Grau hinterlegt sind die jeweils zwei höchsten Werte. Während die Identitätswerte den prozentualen Anteil von ausschließlich identischen Aminosäuren angeben, geben die Ähnlichkeitswerte den prozentualen Anteil sowohl identischer als auch isofunktioneller Aminosäuren an. Die Berechnungen wurden mit dem Programm VecorNTI[®] Suite v10.0 durchgeführt.

	OIPDAT	At3g44830	At5g13640	PpPDAT	MtPDAT	SpPDAT
OtPDAT	67 % / 76 %	28 % / 41 %	28 % / 42 %	23 % / 32 %	29 % / 42 %	30 % / 45 %

Elf charakteristische konservierte Bereiche sind in Abb. 34 markiert. Die Proteine der LCAT-Superfamilie weisen zumindest in einigen wenigen Bereichen eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Dies zeigt sich vor allem anhand von vier konservierten Bereichen (I, IV, V und XI in Abb. 34 B), die zwischen allen Enzymen konserviert sind. Ferner existieren zwölf hochkonservierte Aminosäuren, die in allen Proteinen dieser Superfamilie vorhanden sind (schwarz hinterlegt unterhalb des Alignments in Abb. 34 A). Drei dieser Aminosäuren bilden die sogenannte katalytische Triade der LCAT-Superfamilie (Peelman et al., 1998). Bezogen auf die Aminosäuresequenz der OtPDAT sind es die Reste S297 (Serin), D560 (Aspartat) und H613 (Histidin), die am Transfer von Fettsäuren der *sn*-2-Position von PtdCho beteiligt sind. Eine Besonderheit der möglichen PDAT aus *O. tauri* und *O. lucimarinus* tritt im hochkonservierten Bereich V auf. Dort befindet sich in allen bisher bekannten Mitgliedern der LCAT-Superfamilie eine Position stromabwärts des für die katalytische Aktivität wichtigen S297 stets ein Methioninrest oder ein Leucinrest. OtPDAT und OIPDAT besitzen in diesem äußerst hochkonservierten Bereich stattdessen ein Tyrosin (Abb. 34 A und B). Des Weiteren ist eine Position von besonderem Interesse, die in den meisten LCAT-Proteinen von einem Serin besetzt wird. Der Serinrest S262 liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem hochkonservierten Bereich IV und scheint eine Determinante der Substratspezifität zu sein (Abb.34 A; Zhao et al., 2003). Die Bereiche II, III, VI bis X sind zwischen den LCAT-Proteinen weniger stark konserviert und eher als charakteristisch für die PDAT anzusehen. Besonders auffällig sind die Unterschiede in den Bereichen VIII und IX zwischen OtPDAT bzw. OIPDAT und den übrigen PDAT aus Pflanzen und Hefe (Abb. 34 B). Zu der Bedeutung dieser Unterschiede in der Primärstruktur in Bezug auf die katalytische Aktivität der OtPDAT und OIPDAT können keine Aussagen getroffen werden.

A

OtPDAT 1 MAVTRRTRTRAGARAPGTGASSRAPRPA. IRASSRRTKTASKRSSAWARAEIGGARARRS
 OlPDAT 1 MAPARRRPAVRAPSRRASSASRAGARDA. SRASPSPTTAWTVLSRLFATTFSSRRRAARE
 At3g44830 1MSPLLRFKLSSEEDTINPK.PKQSATVEK...PKR.....RRSGRCS
 At5g13640 1 .MPLIHRKKPTE..KPSPPSEEVVHDE. DSQKKPHESKSHHKS.....NGGKWS
 MtPDAT 1 .MALIRRRKRGSEPEKQSENSEPKIQKK. EDEDDNDKNKKNKKNKDEVGVFKKSTRW
 Lrolp 1 MGTLEFRNVQNKSDSDENNKGGSVHNKRESRNIHHQOGLGHKRRRIGISGSAKRNBERGK
 PpPDAT 1

OtPDAT 60 WFVRVWAFDWSS. AGASKRVRAFVAVVLAACAATYLRDYYVPERVAVVGTLP.....
 OlPDAT 60 DVER.....RRTRARALAVACVACAATYLRVYVPAAVRDTFVDSL.....
 At3g44830 41 CVDS.....CCWLLIGYICTAWWLLLFYH.....
 At5g13640 50 CIDS.....CCWFIGCVCTWWFLFLYN.....
 MtPDAT 59 CVDS.....CCWFVGCICTLWWFLFLFMYN.....
 Lrolp 61 DFRKRDRGNGRKRWRDSRRLIFILGAFI GVLLEPFSFGAYHVHNSDSDLFDNFVNFDSLKV
 PpPDAT 1

OtPDAT 112EWNNDTVLARLPALAYVPD SGARG. VIQR TMA LGGAEFKHPVVIVPG
 OlPDAT 102DWNNDTVLARLPAL ELQPE TRSRERGGVELRERGLTFKHPVVIVPG
 At3g44830 65SVPVPAMLOAPE.....SPGTRLSRDGVKAFHPVIVPG
 At5g13640 74AMPASFPOYVTERITGPLDPDPGVKLLKKEGLKAKHPVVFIPG
 MtPDAT 83VMPASFPOYVTEAITGMPDPDPGLKLLKKEGLSVKHPVVFVPG
 Lrolp 121 YLDDWKDVL PQGISSFIDDIQAGNYSTSSLDLSENFAVGKQLLRDYNLEAKHPVVMVPG
 PpPDAT 1
 HPVXXXPC

OtPDAT 158 FVSTGLELWRGQ...ACGEHFRFRRMWGT PAMARAFESNQK CWMEHMR L DAKTGS DPED
 OlPDAT 149 FVSTGLELWRGK...ACGAHFRFRRMWGT PAMARAFESNQK CWMEHMR L DGR TGS DPES
 At3g44830 99 IVTGGLELWEGR...PCA EGLFRKRLWG..ASFSEILRRPLCWLEHSLDSE TGLDPSG
 At5g13640 116 IVTGGLELWEGR...QCADGLFRKRLWG..GT FGEVYKRPLCWVEHMSLDNETGLDPAG
 MtPDAT 125 IVTGGLELWEGR...QCAEGLFRKRLWG..GT FGEVYKRPSCWVEHMSLDNETGMDPPG
 Lrolp 181 VISTGIESWGVIGDDECDSSAHFRKRLWGSFYMLRTVMMDKVCWLKHVM LDPETGLDPPG
 PpPDAT 1MEHMSLDNETGLDPEG
 GXELW FRXRKXG CW H LD TG DP

OtPDAT 214 IRLRAVRGLEGVDFVPGYFVWARIIEELGGLGYDANTHSAAYDWRLSPHMLEVRDGYF
 OlPDAT 205 VRLRAVRGLEGVDFVPGYFVWGVIEELSELGYDSNTLHSAAYDWRLSPTMLERRDGYF
 At3g44830 153 IRVRAVPLVAADYFAPCYFAVAVLIENLAKIGYEGKNLHMASYDWRLSEHNTVEVRDQSL
 At5g13640 170 IRVRAVSGLVAADYFAPGYFVWAVLIANLAHIGYEEKMYMAAYDWRLSEQNTVEVRDQIL
 MtPDAT 179 ITVRVPSGLVAADYFAAGYFVWADLIANLARIGYEEKMYMAAYDWRLSEQNTVEVRDQIL
 Lrolp 241 FTLRRAQGFESTDYFIAGYWIWNKVFQNLGVIGYEPNKMTSAAYDWRLAMLDLERRDRYF
 PpPDAT 17 IRVRVPSGLVAADYFAPGYFVWAVLIENLARIGYEEKMYMAAYDWRLSEQNTVEVRDQSL
 R G D F Y W L GY A YDWRX E RD

OtPDAT 274 SRLKSVIETLHGVSGERVAILAHSYGDTVTRYFFEWVETFPVAKGGGGGGKRWVDAHTHA
 OlPDAT 265 IRLKSVIETLYSVHGERVALLAHSYGDTISRYFFEWVETFPVAKGGGGGGKRWVDKHVHA
 At3g44830 213 SRLKSKIELMYATNGFKV VVPHSMGATYFLHFLKWWETPLPDGGGGGGPWC AKHIKS
 At5g13640 230 SRMKSNIELMVSTNGGKAVIVPHSMGVLYFLHFMKWEAPAPLGGGGG.PDWC AKYIKA
 MtPDAT 239 SRIKSNIELMVSTNGGKAVIIPHSMGVLYFLHFMKWEAPAPMGGGGG.PDWC SKYIKA
 Lrolp 301 TKLKEQIELFHQLSG.EKVC LIGHSMGSIIFYFMKWEAEGPLYGNNG.RGVVNEHIDS
 PpPDAT 77 SRLKSTIESMVRTSG.NKAVVIPHSMSGSLYFLHFLKWWVEAPAPMGGGGG.PD WVARHIKA
 K IE G HSG F WVE GXGG W

3. Ergebnisse

OtPDAT 333 YVDIAGPMLGIPKTI~~PSLLS~~GE~~MRD~~TA~~IL~~GELE~~GMLGG~~ILE~~NA~~MGR~~FIG~~SQI~~KEV~~CETFR
 OlPDAT 324 YVDIAGPMLGIPKTI~~PSLLS~~GE~~MRD~~TA~~IL~~GELE~~GMLGG~~ILE~~TA~~VGR~~LIG~~TQI~~KEV~~CDTFR
 At3g44830 273 VVNI~~GPA~~FLGVPKAVSNLL~~SAE~~GKDI~~AYA~~...RS~~LAP~~GL~~LDS~~EL~~LK~~LQ...TLE~~HIM~~RM~~SH~~
 At5g13640 289 VMNIGGPFLGVPKAVAGL~~FSAE~~AKD~~VAVA~~...RA~~IAP~~GFL~~DT~~D~~IF~~RLQ...TLO~~HVM~~RM~~TR~~
 MtPDAT 298 IVNIGGPFLGVPKAVAGL~~FSAE~~ARD~~VAVA~~...RA~~IAP~~GFL~~DND~~M~~FRI~~Q...TLO~~HVM~~KM~~TR~~
 Lrolp 359 F~~TNA~~AG~~TL~~L~~GA~~PKAMPALIS~~GE~~MK~~DTI~~QLN...T~~LAMY~~GLE~~KFF~~S~~R~~IER...V~~K~~...MLQ
 PpPDAT 135 T~~MNI~~AGPFLGVPKAFAGI~~FSAE~~AKD~~VAVA~~...RA~~IAP~~G~~VLD~~N~~D~~I~~F~~GLQ...TLO~~YI~~M~~KV~~TR

L G PK S E D L

VII

OtPDAT 393 TWGALWAMPLPRGGSKI~~WGD~~ERSGTP~~DVD~~.....
 OlPDAT 384 TWGALWAMPLPRGCAAV~~WGD~~DDAGAPES.....
 At3g44830 328 SWDSIVSILPKGCEAI~~WGD~~LD~~SHAE~~EGLNCIYS~~ARK~~SSQLS~~LN~~LHKQ~~NY~~SLK~~PV~~SRVKE
 At5g13640 344 TWDSTMSMLPKGGDTI~~WGD~~LD~~WSP~~E~~K~~HTCCGK~~Q~~KNNETCGEAGENGVS.....KKS
 MtPDAT 353 TWDSTMSMLPKGGDTI~~WGD~~LD~~WSP~~E...SCGL~~TR~~KQSSNNTQLTEQKT.....NKT
 Lrolp 410 TWGCTPSMLPKGE~~EWI~~WGD~~MKS~~SE~~DAL~~N.....NN
 PpPDAT 190 TWDSCLSMLPKGKTI~~WGD~~AS~~WSP~~E~~E~~G.YDCST~~K~~SDDAADGLVK~~Q~~TESGVQVGAHGK~~P~~

W P G WG

VIII

OtPDAT 421 .AAG.DSVNFFLQI~~RES~~GSQSSEKS.....FN..HSIMSATS~~SL~~LEHLADSVPHN...
 OlPDAT 411GALNFFLO~~MRA~~AGTSRETS.....FN..HTVDSALG~~FL~~FEQLADSVPHN...
 At3g44830 388 PAKYGRIVSFGKRA~~SSEL~~PSQLSTLNVKELSRVDGNSNDSTSC~~GE~~EFWSEYNEMSRES...
 At5g13640 397 PVNYGRMISFGK~~VAE~~AAPSEINN..IDFRGAVKQ~~SIP~~NHTCR~~DV~~WTEYHDMGIAG...
 MtPDAT 403 NVNYGRMISFGK~~VAE~~ADSSKIDI..VDFRGAIKGPNVANTS~~CR~~DVWTEYHDMGVEGVRA
 Lrolp 441 TDTYGNFIR~~FER~~NTSDAFNKNLTM.....KDAINMTLSISPEW~~LQ~~.....RR.
 PpPDAT 249 SAHYGRMVAFGKEAAAMSHEV~~I~~VNRKKEIKTP~~TNT~~TLRNTTAC~~G~~DVWTEYQ~~EL~~TWDD...

F

IX

OtPDAT 466 ..VAEF~~SH~~FLDEATRARL~~LKR~~IP~~ST~~IKSKVAPN~~EG~~.....DSITSP
 OlPDAT 453 ..VAEFSS~~TID~~RASRERL~~KTR~~VP~~DL~~EAKTAPN~~EG~~.....DPLRSA
 At3g44830 445 IVKVAENTAYTAT~~TV~~LDL~~LR~~FTAPKMMRRAEAHF~~SH~~GIAD~~DL~~DPKY~~G~~H~~Y~~KYWSNPLETK
 At5g13640 452 IKATAEYK~~VY~~TAGEAID~~LL~~HYVAPKMMARGAAHF~~SY~~GIAD~~DL~~DPKY~~Q~~DPKYWSNPLETK
 MtPDAT 461 VAAVAEHK~~VY~~TAGS~~IID~~LLQ~~F~~VAPKMMARGSDHF~~SY~~GVAD~~NLD~~DPKY~~E~~H~~Y~~KYWSNPLETK
 Lrolp 483 ...VHEQ~~YS~~FGYSKNEEELR~~KNE~~.....LHHKH~~W~~SNPMEV~~P~~
 PpPDAT 306 VEEIASREI~~FN~~AD~~DL~~VEVLRK~~VAP~~KLMARGEDN~~W~~SFNIAD~~DP~~SEKY~~Q~~H~~Y~~R~~Y~~WANPLETT

L

OtPDAT 504 LPHAPNMKVYCLYGVGK~~P~~SERAYAYERVD....DALR~~PY~~Q~~LD~~V~~D~~QS...RNGV~~L~~TRGVW
 OlPDAT 491 LPRAPNMKIFCLYGA~~CK~~P~~T~~ERAY~~V~~YERFDA....DALR~~PY~~Q~~LD~~V~~D~~QS...RDAAL~~T~~HGVW
 At3g44830 505 LPEAPEMEMYCLYGVGI~~P~~TERS~~Y~~YK~~L~~ATSSGKCKSS~~I~~PFRID~~G~~SLDG...DDV~~CL~~KGGTR
 At5g13640 512 LPNAPEME~~IY~~SLYGVGI~~P~~TERAY~~V~~YKLNQSP...DSC~~IP~~FQ~~I~~FTSAHEEDED~~S~~CLKAGVY
 MtPDAT 521 LPNAPDMEI~~FS~~LYGVGL~~P~~TERAY~~V~~YKLT~~P~~FA...E~~CY~~IP~~F~~EID~~P~~NAEGGDK~~V~~SLK~~D~~GVY
 Lrolp 516 LPEAPHMKIYCYGV~~NN~~P~~T~~ERAY~~V~~YKEEDDS...SALN~~L~~TIDY~~E~~SKQ.....P~~V~~F
 PpPDAT 366 LPNAPDMEVYCLYGVGI~~P~~TERS~~Y~~YK~~V~~S~~P~~SAD..NCY~~I~~P~~F~~RID~~T~~SADGGSEG.~~CL~~K~~G~~GVQ

LP AP M YG P E R Y Y

* X

OtPDAT 556 QVDGDGSIPLVSLGY~~VCR~~.HWRDNRKLN~~PAN~~VSVVSREYH~~HR~~ALPLGVGGFQ~~G~~KTEGDHV
 OlPDAT 543 QVDGDGSIPLASLGY~~VCR~~.EWRVNRALN~~PAN~~VSVVTREYAH~~R~~PLPLSVGGFQ~~G~~KSEGDHV
 At3g44830 563 FADGDESVPV~~IS~~AGFMCAK~~GWR~~GKTRFN~~PS~~GM~~DT~~FI~~REY~~KHKPPG~~S~~LLES~~R~~.GT~~ES~~GAHV
 At5g13640 569 NVDGDETV~~PV~~LSAGY~~MCA~~KAW~~R~~GKTRFN~~PS~~G~~IK~~TYIREYNH~~S~~PPANLLEGR.GT~~Q~~SGAHV
 MtPDAT 578 TVDGDDETV~~PV~~LSGY~~MCA~~KG~~WR~~GKTRFN~~PS~~G~~IR~~TYVREYD~~H~~SPANLLEGR.GT~~Q~~SGAHV
 Lrolp 563 L~~T~~EGD~~G~~TVP.LVAHSM~~CH~~K~~W~~QA~~G~~SPY~~N~~PAGINVTIVEMKH~~Q~~DRFD~~I~~RGG..AKS~~A~~EHV
 PpPDAT 423 FVDGDETV~~P~~ALSAGYL~~CH~~AP~~W~~GKTKFN~~P~~GGSPSYVREY~~K~~HAP~~S~~NLLEGR.GT~~Q~~SGAHV

GDXXXP C NP E H HV

OtPDAT 615 NIMGNE~~MI~~ADI~~L~~SVVAG..RA~~D~~V~~R~~ERIVSDI~~HL~~SSV~~I~~DARFASANPRESF
 OlPDAT 602 NIMGNE~~M~~IRD~~L~~ITVAG..RAH~~V~~PPRVVSDV~~D~~ALAATIR.....
 At3g44830 622 DIMGNVGLIEDV~~L~~RIAAGAS~~Q~~E~~T~~GG~~D~~RIYSDV~~MR~~SERISIKL.....
 At5g13640 628 DIMGNFALIEDIM~~R~~VAAAGNGSDI~~G~~H~~D~~QVHSGIFEW~~S~~ERID~~L~~KL.....
 MtPDAT 637 DIMGNFALIEDVM~~R~~VAAAGAK~~G~~E~~L~~GG~~D~~KVYSDI~~F~~K~~W~~SERIK~~L~~PL.....
 Lrolp 620 DI~~L~~GS~~A~~ELNDY~~I~~LK~~T~~ASG..NGDI~~V~~EP~~R~~OLS~~N~~SQ~~W~~SQ~~M~~PP~~F~~M.....
 PpPDAT 482 DIMGNFALIEDIL~~K~~VAAAGMT~~G~~E~~D~~IG~~N~~RIF~~S~~DL~~R~~EW~~S~~ERIK~~L~~KL.....

I G G S

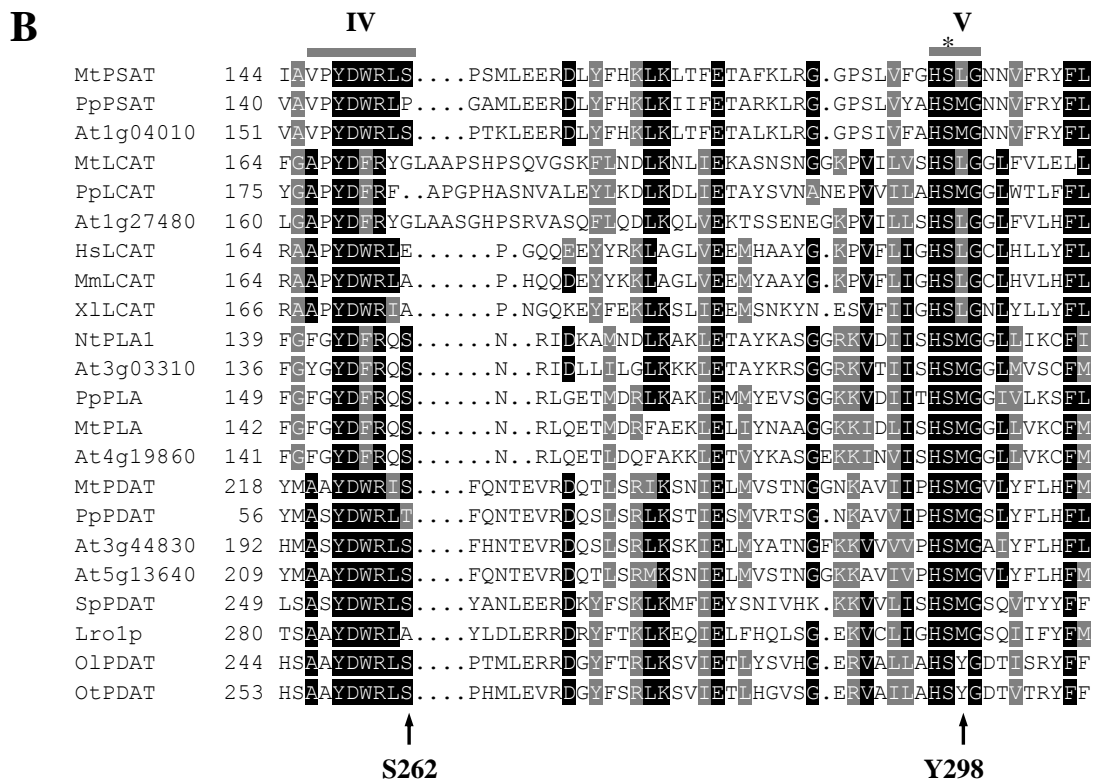


Abb. 34 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Vertretern der LCAT-Superfamilie.

(A) Vergleich der Aminosäuresequenzen der möglichen PDAT aus *O. tauri* und *O. lucimarinus* mit PDAT aus *A. thaliana*, *M. truncatula*, *P. patens* und *S. cerevisiae*. Durch Sternchen gekennzeichnet sind die Aminosäurereste der katalytischen Triade von LCAT-Enzymen. Die C-terminalen ER-Retentionssignale sind schwarz umrandet. Die grauen Balken markieren konservierte Aminosäuresequenzen der LCAT-Familie und schwarze Balken konservierte Bereiche der PDAT. Während hochkonservierte Aminosäurereste der LCAT-Superfamilie unterhalb des Alignments schwarz hinterlegt dargestellt sind, sind die konservierten Aminosäurereste der PDAT-Familie unterhalb des Alignments in fettgedruckten Buchstaben dargestellt. (B) Partielles Aminosäuresequenz-Alignment bekannter Proteine der LCAT-Superfamilie. Der Ausschnitt zeigt zwei hochkonservierte Bereiche innerhalb der LCAT-Superfamilie. Abweichend zu den konservierten Aminosäureresten Methionin und Leucin findet man in OtPDAT und OIPDAT einen Tyrosinrest in Position 298. Der Serinrest in Position 262 ist eine Determinante der Fettsäure-Substratspezifität in der humanen LCAT HsLCAT (Zhao et al., 2003). X, beliebiger Aminosäurerest innerhalb einer Konsensussequenz. Das Alignment wurde mit dem Programm VectorNTI® Suite v10.0 errechnet und das Abbild wurde durch das Programm Boxshade 3.21 erzeugt.

Die Unterschiede in der Primärstruktur wirken sich jedoch nicht auf die Sekundärstruktur aus. Hier zeigen OtPDAT und OIPDAT die typischen Charakteristika der LCAT mit einer N-terminalen transmembranen Helix, die vermutlich der Verankerung in der Membran dient (Abb. 35). Jedoch zeigen die möglichen PDAT aus *O. tauri* und *O. lucimarinus* gemeinsam mit Lro1p keine C-terminalen ER-Retentionssignale wie sie in anderen pflanzlichen PDAT vorhanden sind (Abb. 34 B; Shin et al., 1991; Teasdale und Jackson, 1996; McCartney et al., 2004).

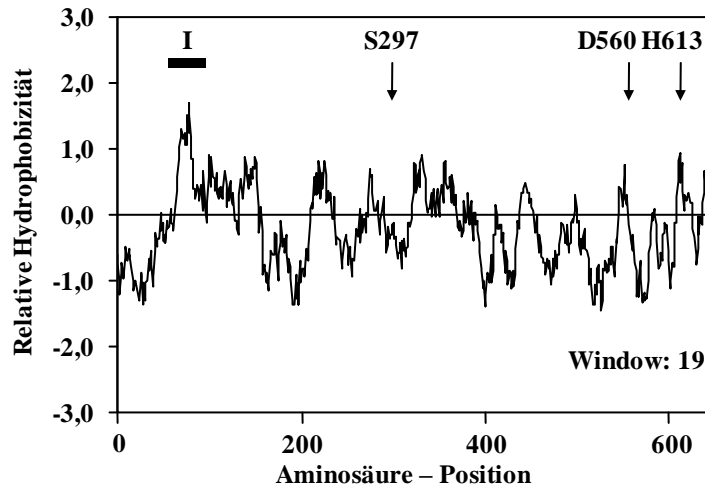


Abb. 35 Hydropathieanalyse der PDAT aus *O. tauri*.

Die Lage der für LCAT-Enzyme charakteristischen N-terminalen transmembranen Helix ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die sogenannte katalytische Triade der LCAT-Enzyme umfasst die drei Aminosäurereste Serin, Aspartat und Histidin, deren Positionen durch Pfeile markiert sind. Das Hydropathie-Profil wurde mit Hilfe des Programms ProtScale berechnet (Gasteiger et al., 2005); die Vorhersage der transmembranen Bereiche erfolgte durch das Programm TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

3.4.3 Versuche zur funktionalen Charakterisierung der PDAT aus *O. tauri*

Zur Darstellung der Funktion von OtPDAT wurden ebenfalls Expressionsexperimente in *S. cerevisiae* durchgeführt. Die hierbei verwendeten Hefestämme entsprechen denen in Abschnitt 3.3.3.

Für die heterologe Expression der möglichen PDAT aus *O. tauri* wurden die nativen und teilweise codon-optimierten cDNA-Sequenzen der jeweiligen Kandidatengene stromabwärts eines Galaktose-induzierbaren Promotors des Hefe-Expressionsvektors pYES2/CT kloniert. Die Adaption der Codonverwendung wurde auch für OtPDAT, wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Für die homologe Komplementation der TAG-defizienten Hefe-Mutanten wurde das Expressionskonstrukt pYES2/CT-*LROI* verwendet, das die cDNA-Sequenz von *LROI* stromabwärts eines Galaktose-induzierbaren Promotors enthält.

3.4.3.1 Analyse der Proteinmengen von OtPDAT in *S. cerevisiae*

Die Eignung von *S. cerevisiae* als Expressionswirt für die funktionale Expression der OtPDAT wurde, wie in den vorangehenden Abschnitten dieser Arbeit, als erstes überprüft. Für die Analyse der Proteinmengen in *S. cerevisiae* wurde die native bzw. die am 5'-Ende optimierte cDNA-Sequenz von OtPDAT sowie der offene Leserahmen von *LRO1* jeweils in einen Leserahmen mit dem V₅-Epitop des pYES2/CT-Vektors kloniert. Die Expressionskonstrukte wurden für die Transformation des Hefestamms BY4741 *lro1Δ dga1Δ* eingesetzt. Die mit dem Expressionsvektor pYES2/CT transformierten Hefen BY4741 und BY4741 *lro1Δ dga1Δ* stellten hierbei die Leervektor-Kontrollen dar. Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (siehe 2.20). Die Expression erfolgte für 20 h bei 30 °C. Die Überexpression der Gene führte zu keiner Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Der Zellaufschluss, die Präparation des Zelllysates im Anschluss an die Expression sowie der Western-Blot und die Immundetektion der Proteine wurden, wie in Abschnitt 2.22 beschrieben, durchgeführt. Wie bereits für die möglichen DGAT2 aus *O. tauri* beobachtet, führte auch die Expression der nativen Gensequenz von OtPDAT nicht zur Proteinsynthese in Hefe (Daten nicht gezeigt). Die Optimierung der ersten 25 Codons des offenen Leserahmens ermöglichte jedoch die Proteinsynthese der OtPDAT in Hefe (Abb. 36).

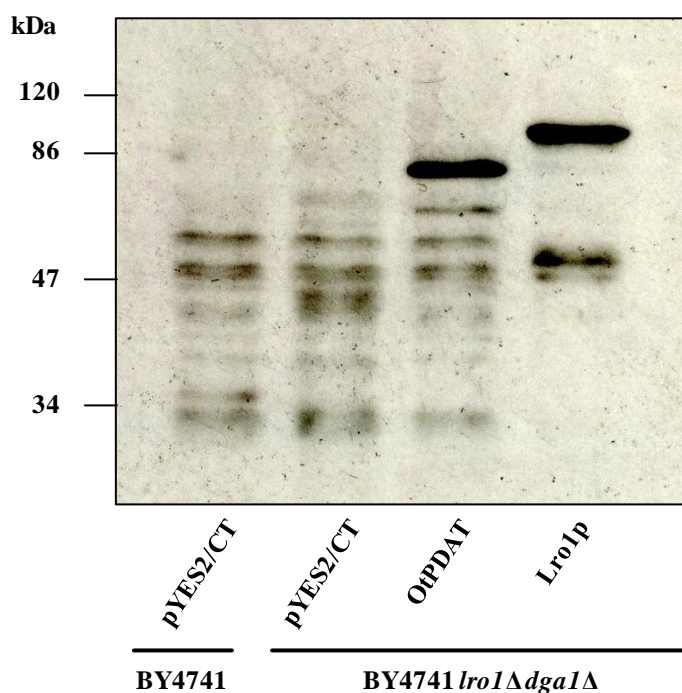
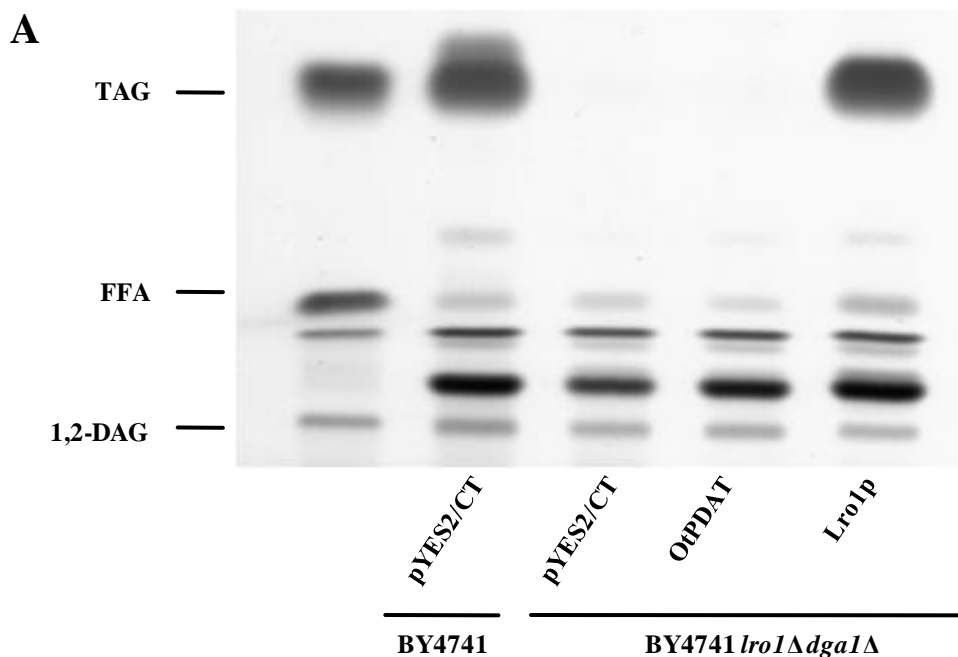


Abb. 36 Immundetektion der PDAT aus *O. tauri* nach heterologer Expression in BY4741 *lro1Δ dga1Δ*.

Je 25 µg des Gesamtproteinextrakts von OtPDAT (78,1 kDa) und den Leervektor-Kontrollen sowie 12,5 µg des Gesamtproteinextrakts von Lro1p (80,5 kDa) wurden in ein-dimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einem Antiserum gegen das C-terminale V₅-Epitop inkubiert. Die hier angegebenen Molekulargewichte verstehen sich inkl. des V₅-Epitops. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

3.4.3.2 Komplementationsstudien der OtPDAT in *S. cerevisiae*

Nachdem die erfolgreiche Proteinsynthese von OtPDAT in *S. cerevisiae* nachgewiesen wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, ob OtPDAT den *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyp komplementieren kann. Dazu wurden weitere Expressionsversuche in transgenen Hefen durchgeführt, die entweder den Leervektor pYES2/CT oder eines der Expressionskonstrukte pYES2/CT-OtPDAT bzw. pYES2/CT-*LRO1* enthielten. Als erstes sollte untersucht werden, ob die mögliche PDAT aus *O. tauri* die hefeeigenen gesättigten und einfach ungesättigten C16- und C18-Fettsäuren als Substrate für die Synthese von TAG aus DAG und PtdCho akzeptiert. Zu diesem Zweck wurden die transgenen Hefen ohne den Zusatz von nicht-hefeeigenen Fettsäuren kultiviert. Im Anschluss an die Expression wurden Lipidextrakte der transgenen Hefen hergestellt (siehe 2.25) und die einzelnen Lipidklassen der Extrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie voneinander getrennt. Während die Expression von *LRO1* zur Bildung von TAG in der BY4741 *lro1Δ dga1Δ*-Mutante führte, kam es nach Expression von OtPDAT in Abwesenheit exogener Fettsäuren nicht zu einer Komplementation des *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyps (Abb. 37 A). Auch nach Zusatz von 18:1n-9 in das Kulturmedium, was vermutlich eine Anreicherung dieser Fettsäure in den Glycerolipiden der Hefen bewirkte, konnte die Bildung von TAG nicht beobachtet werden (Abb. 37 B). Dies führte zu der Annahme, dass OtPDAT möglicherweise die hefeeigenen gesättigten und einfach ungesättigten C16- und C18-Fettsäuren als Substrate der TAG-Synthese diskriminiert.



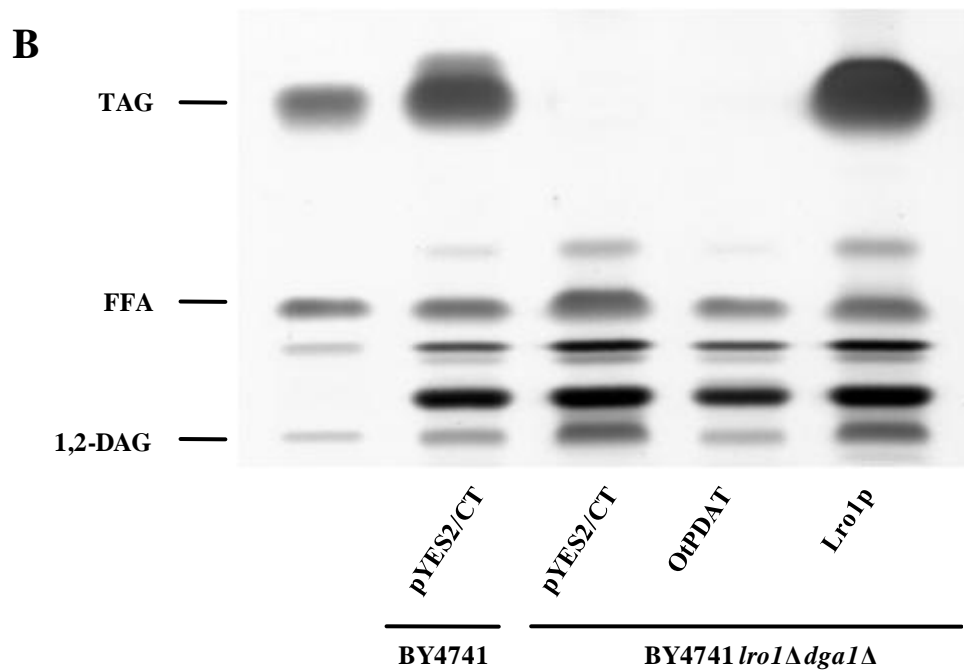


Abb. 37 Hefeeigene Fettsäuren werden von OtPDAT nicht zur Bildung von TAG verwendet.

Während im Wildtyp BY4741 und in der BY4741 *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach Expression von *LRO1* TAG nachgewiesen werden konnte, konnte die Expression von OtPDAT nicht den *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyp komplementieren. (A) Kultivierung ohne Zugabe von Fettsäuren und (B) Kultivierung in Gegenwart von 18:1*n*-9. Dargestellt ist ein Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte von transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2/CT oder einem der Expressionskonstrukte pYES2/CT-OtPDAT bzw. pYES2/CT-*LRO1* transformiert wurden. Nach der Transformation wurden die transgenen Hefen in Selektionsmedium kultiviert und die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert (siehe 2.20). Die Expression erfolgte für 28 h bei 30 °C. Die Überexpression der Gene führte zu keiner Veränderung des Wachstumsverhaltens der transgenen Hefen. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden weitere Komplementationsstudien durchgeführt, bei denen die transgenen Hefen in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter Fettsäuren kultiviert wurden, die als potenzielle Substrate der PDAT erkannt werden könnten. Abb. 38 zeigt die aufgetrennten Lipidextrakte nach Expression in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter C18- und C20-Fettsäuren. Im Einzelnen verwendet wurden die Fettsäuren 18:2*n*-6, 18:3*n*-6, 20:3*n*-6 und 20:4*n*-6 der *n*-6-Reihe und 18:3*n*-3, 18:4*n*-3, 20:3*n*-3 und 20:5*n*-3 der *n*-3-Reihe. Im Gegensatz zu der Situation mit lediglich hefeeigenen Fettsäuren, zeigte sich in Gegenwart dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren die Synthese von TAG nach Expression von OtPDAT. Es wird davon ausgegangen, dass die Fettsäurezusammensetzung durch die jeweils applizierte Fettsäure so verändert wurde, dass OtPDAT die Lipide PtdCho und DAG als Substrate akzeptierte und der Transfer einer Fettsäure von PtdCho auf die *sn*-3-Position von DAG erfolgen konnte. Dabei scheint OtPDAT nicht zwischen mehrfach ungesättigten Fettsäuren der *n*-3- und *n*-6-Reihe zu unterscheiden, da der *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyp davon unabhängig in allen Fällen komplementiert wurde. Diese Beobachtung deutet eine Substratspezifität der OtPDAT für mehrfach ungesättigte Fettsäuren an.

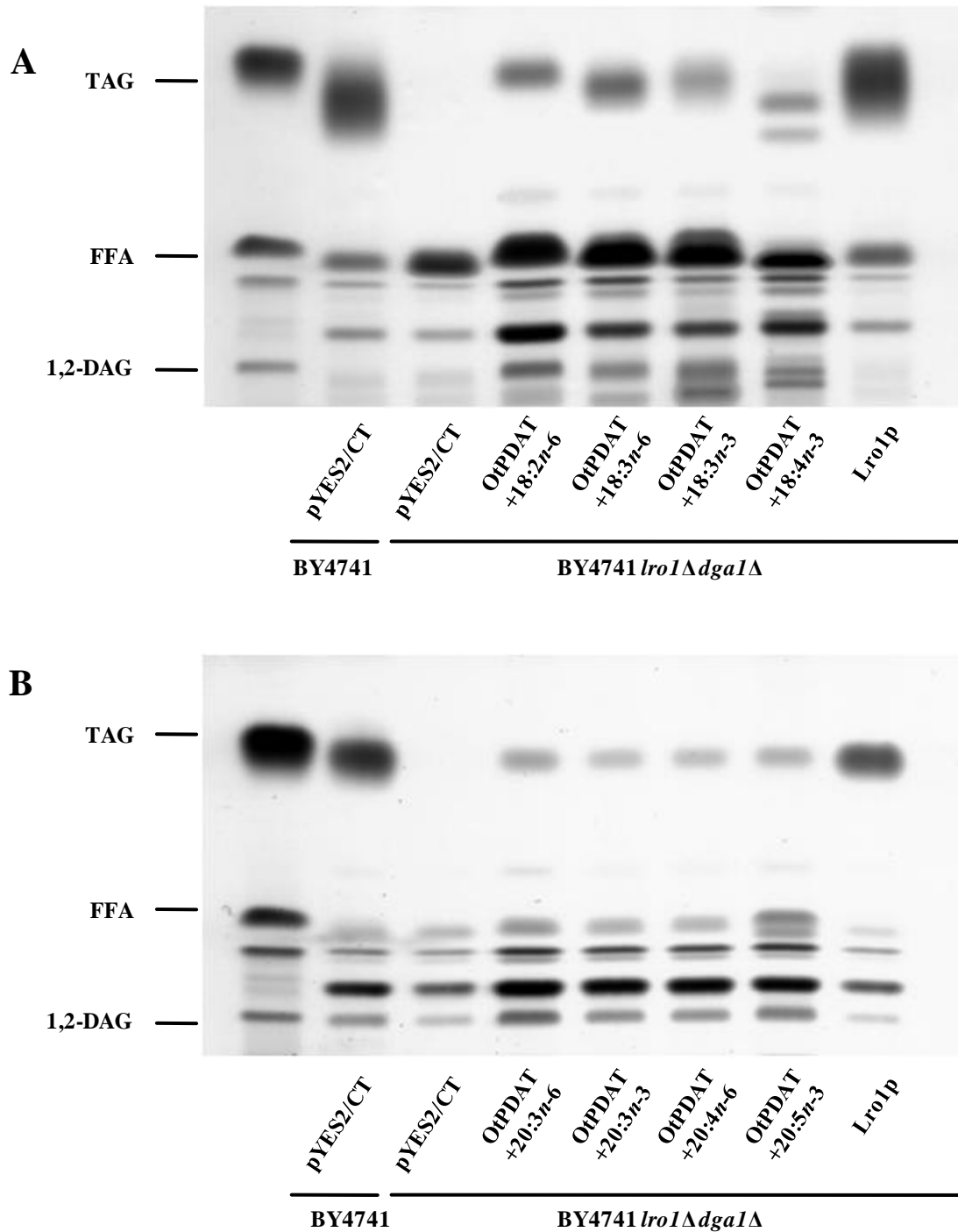
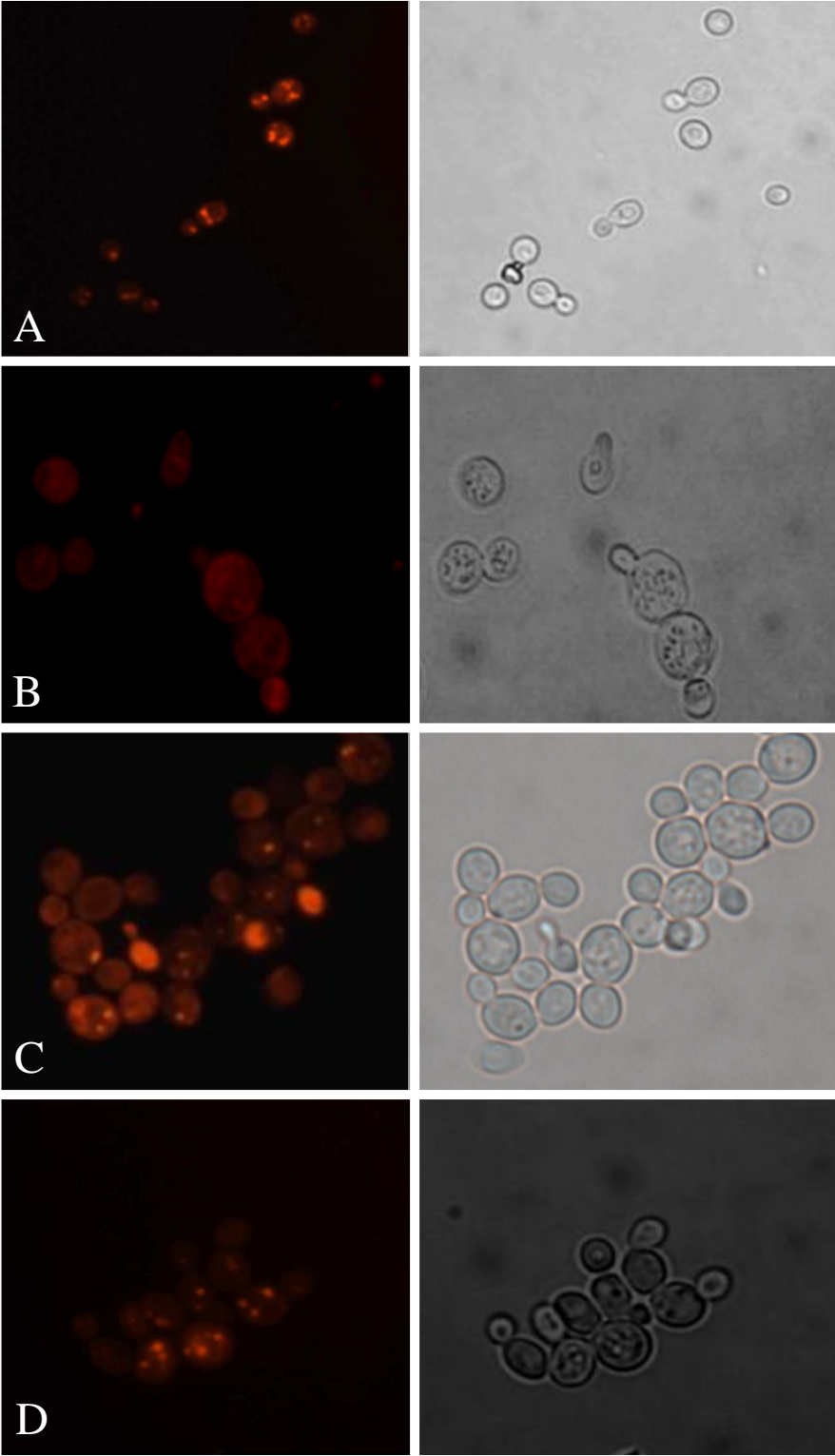


Abb. 38 In Gegenwart von LCPUFA und VLCPUFA wurde der *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyp nach Expression von OtPDAT komplementiert.

(A) Kultivierung in Gegenwart von mehrfach ungesättigten C18-Fettsäuren und (B) Kultivierung in Gegenwart von mehrfach ungesättigten C20-Fettsäuren. Dargestellt ist ein Dünnschichtchromatogramm der Lipidextrakte von transgenen Hefen, die mit dem Leervektor *pYES2/CT* oder einem der Expressionskonstrukte *pYES2/CT-OtPDAT* bzw. *pYES2/CT-LRO1* transformiert wurden. Die Expression erfolgte für 28 h bei 30 °C. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

3.4.3.3 Nachweis von Lipidkörpern in *S. cerevisiae*

Nachdem die Komplementation des *lro1Δ dga1Δ*-Mutanten-Phänotyps durch OtPDAT in Gegenwart von mehrfach ungesättigten Fettsäuren dargestellt werden konnte, sollte die PUFA-Spezifität der OtPDAT anhand der Bildung von Lipidkörpern im Hefestamm H1246 bestätigt werden. Die Versuchsbedingungen und der Lipidkörper-Nachweis entspricht der in Abschnitt 3.3.3.3 dargestellten Vorgehensweise. Wie erwartet, konnten in Zellen des Wildtyps W303 und in Zellen H1246 nach Expression von *LRO1* Lipidkörper detektiert werden (Abb. 39 A und E). Der H1246-Mutantenphänotyp wurde durch das Fehlen von Lipidkörpern sichtbar (Abb. 39 F). In den transgenen Hefezellen, die das Expressionskonstrukt pYES2/CT-OtPDAT enthielten, waren nach Zugabe von 18:1n-9 keine Lipidkörper nachweisbar (Abb. 39 B). Im Unterschied dazu waren Lipidkörper in den Hefezellen deutlich erkennbar, die in Gegenwart von 18:2n-6 oder 18:3n-3 kultiviert wurden (Abb. 39 C und D). Die Komplementation durch OtPDAT in Anwesenheit von mehrfach ungesättigten C20-Fettsäuren ist mit dem gewählten Versuchsaufbau nicht darstellbar, da diese nur in äußerst geringen Mengen von den Hefezellen aufgenommen werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch bestätigten sich die Beobachtungen der vorangehenden Experimente (siehe 3.4.3.2). Nur in Gegenwart von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wird die TAG-Synthese in den Hefestämmen H1246 und BY4741 *lro1Δ dga1Δ* wiederhergestellt, so dass OtPDAT als PUFA-spezifische PDAT angesehen werden kann.



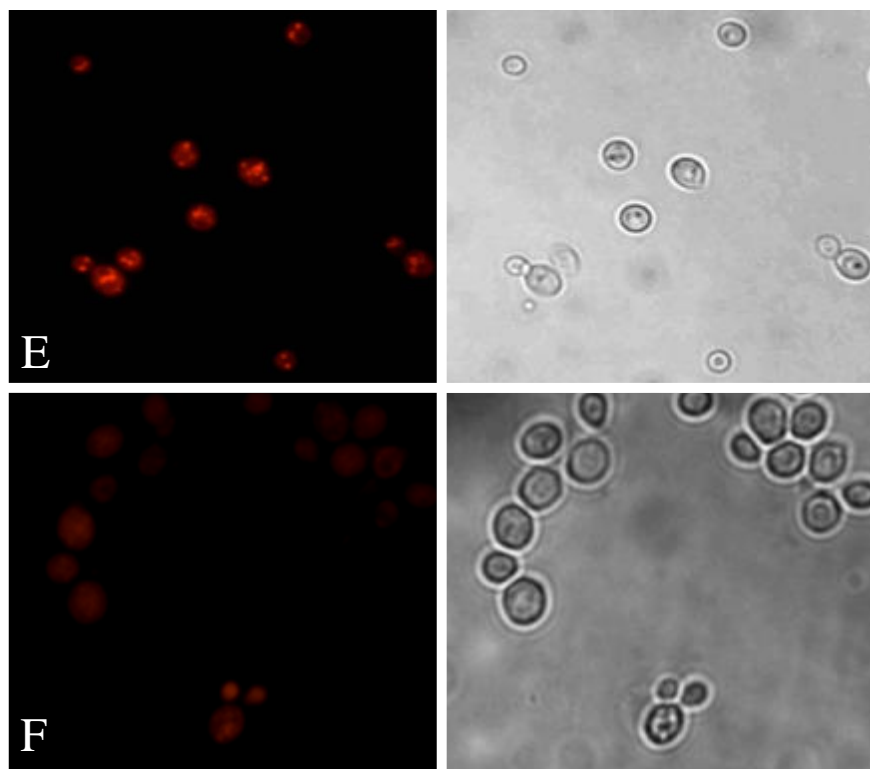


Abb. 39 Nachweis von Lipidkörpern im Hefestamm H1246 nach Expression von OtPDAT.

Für die Fluoreszenz-Markierung von Lipidkörpern wurden 500 μ l der Hefe-Expressionskulturen sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 150 μ l PBS-Puffer sowie 5 μ l Nile-Red-Lösung (1 mg/ml Aceton) zum Anfärben der Zellen aufgenommen. Nach Inkubation der Zellen für 15 – 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurden die Zellen mit 200 μ l PBS-Puffer gewaschen. (A) W303-Leervektor-Kontrolle; (B) H1246-pYES2/CT-OtPDAT in Gegenwart von 18:1*n*-9; (C) wie (B), jedoch in Gegenwart von 18:2*n*-6; (D) wie (B), jedoch in Gegenwart von 18:3*n*-6; (E) H1246-pYES2/CT-*LRO1*; (F) H1246-Leervektor-Kontrolle. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen eines Gastaufenthaltes in unserem Labor von Tibor Czabany (Technische Universität Graz, Österreich) durchgeführt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis von zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten.

3.4.3.4 *In vitro*-Untersuchungen zur Aktivität von OtPDAT

Da es sich bei OtPDAT vermutlich um ein membranständiges Protein handelt, wurden für die Darstellung der OtPDAT-Enzymaktivität *in vitro* Membranpräparationen von BY4741 *lro1* Δ *dga1* Δ -Expressionskulturen verwendet. Abb. 40 zeigt die Immundetektion des Proteins von OtPDAT nach Expression in Hefe. Im Zellextrakt lag die Proteinkonzentration von OtPDAT unterhalb des Detektionslimits, wodurch der Proteinnachweis im Anschluss an einen Western-Blot negativ ausfiel. Die intrazellulären Membranen der Hefe wurden durch Zentrifugation des Zellextrakts bei 100.000 g von den löslichen cytoplasmatischen Bestandteilen abgetrennt. Dies führte gleichzeitig zu einer Anreicherung des Proteins von OtPDAT in dem Membranextrakt, so dass das Protein im Anschluss an einen Western-Blot nachgewiesen werden konnte (Abb. 40). Anschließend wurden 100 μ g der Membranpräparation für die *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt.

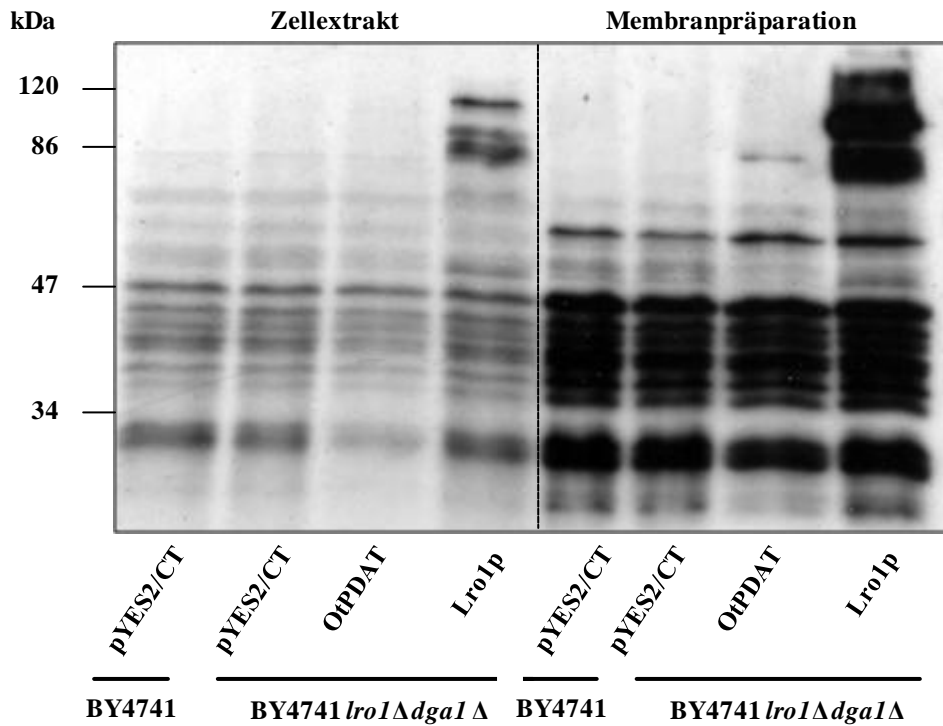


Abb. 40 Immundetektion von OtPDAT in Zellextrakten und Membranpräparationen nach Expression in BY4741 *lro1Δ dga1Δ*.

Je 25 µg des Rohextrakts von OtPDAT (78,1 kDa), Lro1p (80,5 kDa) und den Leervektor-Kontrollen sowie 15 µg der Membranpräparationen wurden in eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einem Antiserum gegen das C-terminale V5-Epitop inkubiert. Die hier angegebenen Molekulargewichte verstehen sich inkl. des V₅-Epitops. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experimentes.

Die Membranextrakte wurden bei 30 °C für 60 min inkubiert. In Abb. 41 werden die aufgetrennten Lipidextrakte nach der Durchführung des *in vitro*-Versuchs gezeigt. Die radioaktive Markierung findet sich hauptsächlich im nicht umgesetzten Anteil des PtdCho und in Form freier Fettsäuren wieder. Wie erwartet, fand in der Leervektor-Kontrolle der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante keine TAG-Synthese statt. In der Leervektor-Kontrolle des Wildtyps BY4741 und in der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach Expression von *LRO1* sind TAGs zu erkennen. Somit sind die gewählten Versuchsbedingungen für die *in vitro*-Darstellung der Lro1p-Aktivität ausreichend gut geeignet. Unter diesen *in vitro*-Versuchsbedingungen war jedoch keine TAG-Synthese im Membranextrakt der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach Expression von OtPDAT feststellbar.

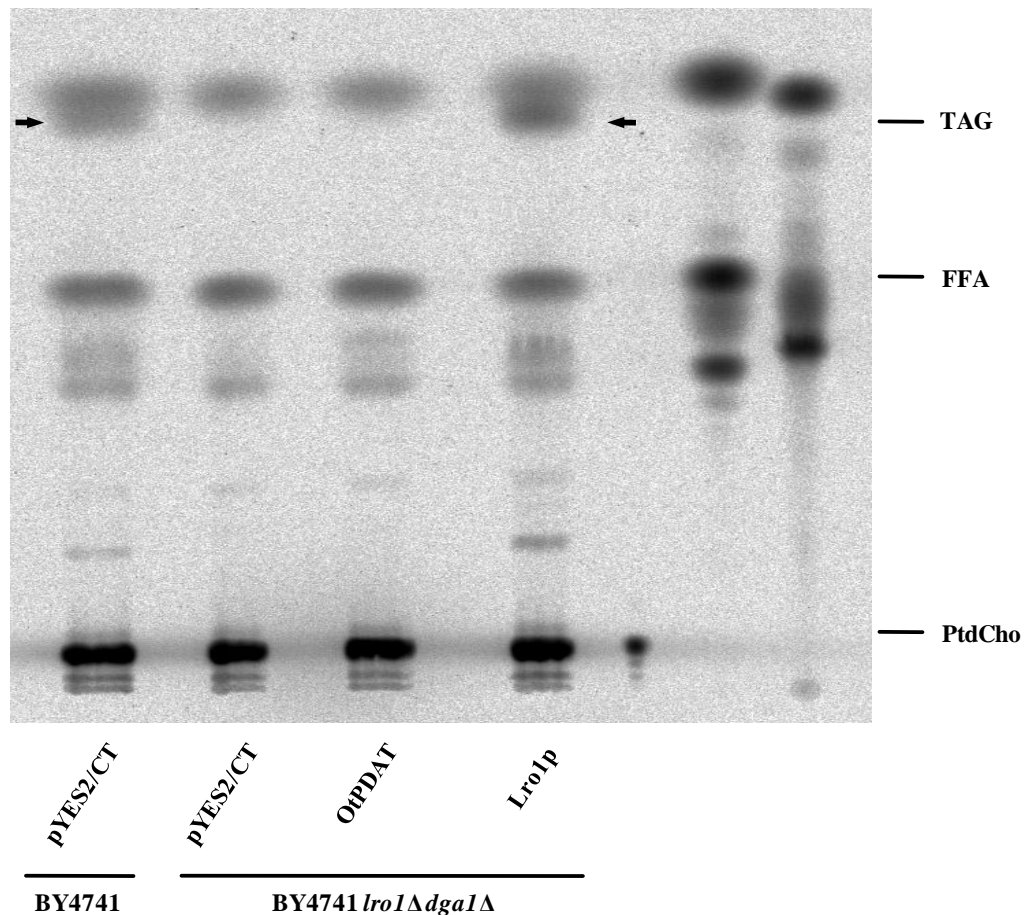


Abb. 41 *In vitro*-Untersuchungen zur Aktivität von OtPDAT.

Zur Darstellung der Aktivität von OtPDAT *in vitro* wurden von den Expressionskulturen Membranpräparationen hergestellt. 100 µg der Membranpräparationen wurden mit ^{14}C -markiertem PtdCho (L- α -1-Palmitoyl-2-linoleoyl-[linoleoyl-1- ^{14}C]-phosphatidyl-cholin; 100.000 dpm) und di-18:2 $^{\Delta 9,12}$ -DAG bei 30 °C inkubiert. Nach 60 min und unmittelbar nach Zugabe der Substrate wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Lipide mit Chloroform aus dem Reaktionsansatz extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt.

3.4.3.5 Untersuchungen zur Substratspezifität von OtPDAT

Bei den Komplementationsstudien zur Darstellung der Funktion von OtPDAT konnte bereits gezeigt werden, dass die PDAT aus *O. tauri* vermutlich nur an der Inkorporation von PUFA in TAG beteiligt ist. Eine weitergehende Bestimmung der Substratspezifität erfolgte durch Expressionsversuche in Gegenwart verschiedener, einzeln applizierter PUFA. Die Ergebnisse sind in Abb. 42 zusammengefasst. Die Inkorporation von 18:3n-6 in TAG erfolgte in den Kontrollhefen zu 45 % für den Wildtyp BY4741 und 46 % für die *LRO1*-exprimierende Doppelmutante (Abb. 42 A). Für OtPDAT-exprimierende Kulturen lag dieser Wert bei 53 %. Für die n-3-Fettsäure 18:3n-3 konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede bei den Werten für die Inkorporation beobachtet werden (Abb. 42 B).

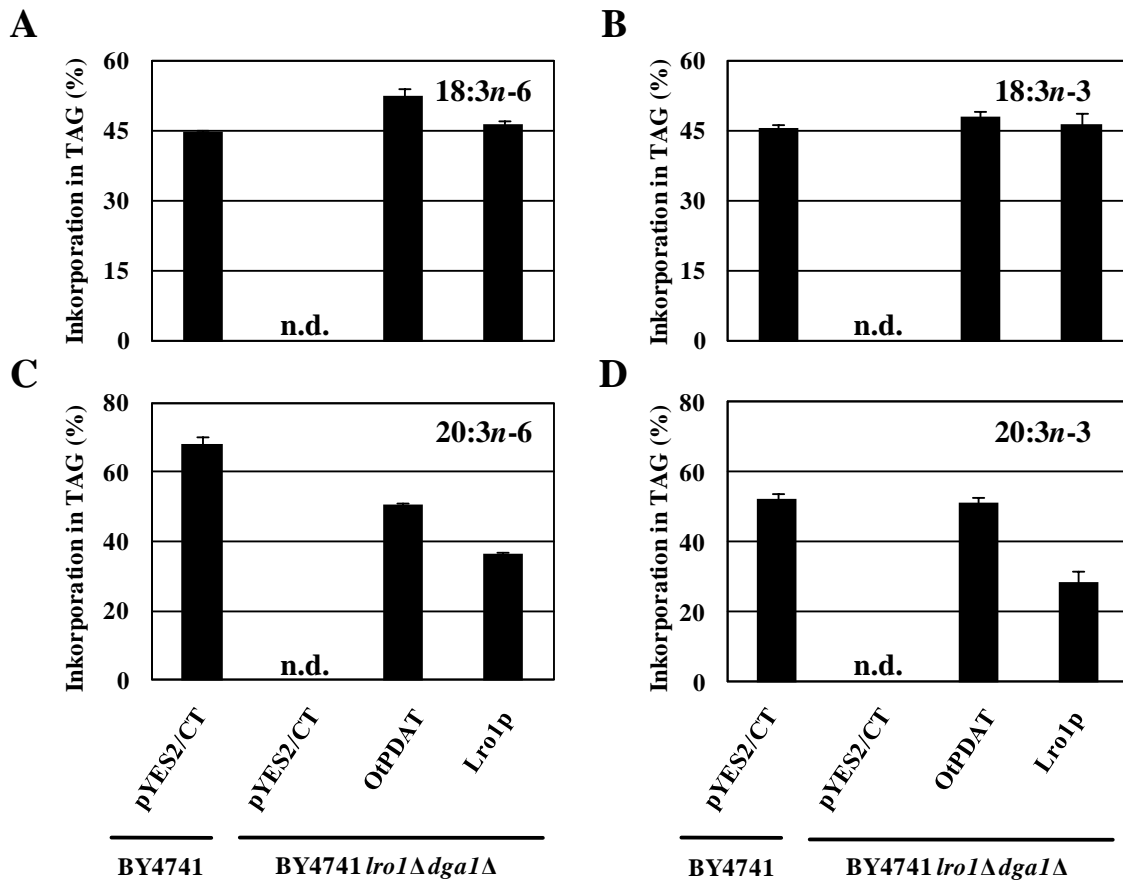


Abb. 42 Expression von OtPDAT in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter Fettsäuren.

Die Expression erfolgte in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die jeweils einzeln appliziert wurden. Im Anschluss an die Expressionen wurden Lipidextrakte präpariert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die TAG- und Glycerophospholipid-enhaltene Fraktionen wurden daraufhin isoliert und deren Fettsäurezusammensetzung gaschromatographisch analysiert. Die Inkorporation von (A) 18:3n-6, (B) 18:3n-3, (C) 20:3n-6, (D) 20:3n-3 in TAG wurde aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Fettsäure als $(100 \times \text{TAG-\%}) / (\text{TAG-\%} + \text{Glycerophospholipide-\%})$ berechnet. Die dargestellten Werte repräsentieren die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Während 20:3n-6 bei den Kontrollhefen eine Inkorporation von 68 % im Wildtyp und 36 % in der *LRO1*-komplementierten Doppelmutante erreichte, lag der entsprechende Wert der OtPDAT-exprimierenden Kulturen bei ungefähr 51 % (Abb. 42 C). Als letzte Fettsäure wurde 20:3n-3 analysiert. Mit 51 % Inkorporation nach Expression der OtPDAT zeigte die komplementierte Doppelmutante einen nur geringfügig niedrigeren Wert als der Wildtyp mit 53 %, aber einen deutlich erhöhten Wert im Vergleich zu Lro1p mit 29 % Inkorporation von 20:3n-3 (Abb. 42 D). Anhand der in Abb. 42 dargestellten Werte konnte keine ausgeprägte Fettsäure-Substratspezifität festgestellt werden, da die Werte der einzelnen Fettsäuren sich nur geringfügig voneinander unterscheiden. Vielmehr scheint OtPDAT mehrfach ungesättigte C18- und C20-Fettsäuren, möglicherweise auch unabhängig von der Zugehörigkeit zur *n*-6- oder *n*-3-Reihe, mit vergleichbarer Präferenz als Substrate zu akzeptieren.

3.4.3.6 Analyse der molekularen TAG-Spezies nach Expression von OtPDAT

Für OtPDAT konnte bisher eine Substratspezifität gezeigt werden, die gesättigte und einfach ungesättigte C16- und C18-Fettsäuren diskriminiert und mehrfach ungesättigte C18- und C20-Fettsäuren als Substrate für die Acylierung von DAG nutzt. Weitere Expressionsstudien von OtPDAT in Gegenwart äquimolarer Mengen verschiedener Fettsäuren sollten mögliche Unterschiede in den molekularen Spezies des gebildeten TAG belegen. Als Substrate wurden 18:2 n -6, 18:3 n -6, 18:3 n -3 und 18:4 n -3 eingesetzt. Im Anschluss an die Expression wurden Lipidextrakte präpariert und die molekularen Spezies des TAG und DAG mittels LC-MS/MS analysiert, um die molekularen Spezies des synthetisierten TAG darzustellen. Das Spektrum der molekularen TAG-Spezies des Wildtyp-Hefestamms BY4741, der Doppelmutante BY4741 *lro1* Δ *dga1* Δ nach Expression von OtPDAT, *LRO1* bzw. der Leervektor-Kontrolle pYES2/CT ist in Abb. 43 dargestellt. In Abb. 43 sind von links nach rechts zuerst die DAG-Spezies und danach die TAG-Spezies dargestellt. Die Komplementationsstudien wurden parallel zu den in Abschnitt 3.3.3.6 beschriebenen Experimenten durchgeführt wurden, so dass die hier gezeigten Messwerte des Wildtyps und der *lro1* Δ *dga1* Δ -Mutante den in Abb. 31 gezeigten Messwerten entsprechen. Aus diesem Grund wird auf eine detaillierte Darstellung der Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *lro1* Δ *dga1* Δ -Mutante an dieser Stelle verzichtet und stattdessen auf den Abschnitt 3.3.3.6 verwiesen.

Zusammenfassend sei erwähnt, dass in der *lro1* Δ *dga1* Δ -Mutante aufgrund der äußerst geringen TAG-Synthese DAG intrazellulär akkumulierte und die einzigen detektierten TAG-Spezies in der Doppelmutante 52:0 und 54:0 waren. Beide Spezies resultierten aus der Aktivität von Are1p und Are2p (Sandager et al., 2002), die vermutlich ausschließlich DAG-Spezies mit gesättigten Fettsäuren als Substrate erkennen und diese möglicherweise ausschließlich mit gesättigten C16- und C18-Fettsäuren acylieren. Nach Expression von OtPDAT waren die TAG-Spezies 52:0 und 54:0 in der Doppelmutante ebenfalls deutlich zu erkennen. Die Profile der Leervektor-Kontrolle und der OtPDAT-Expression unterschieden sich auch deutlich durch die DAG-Akkumulation von dem Profil des Wildtyps und der Doppelmutante nach *LRO1*-Komplementation.

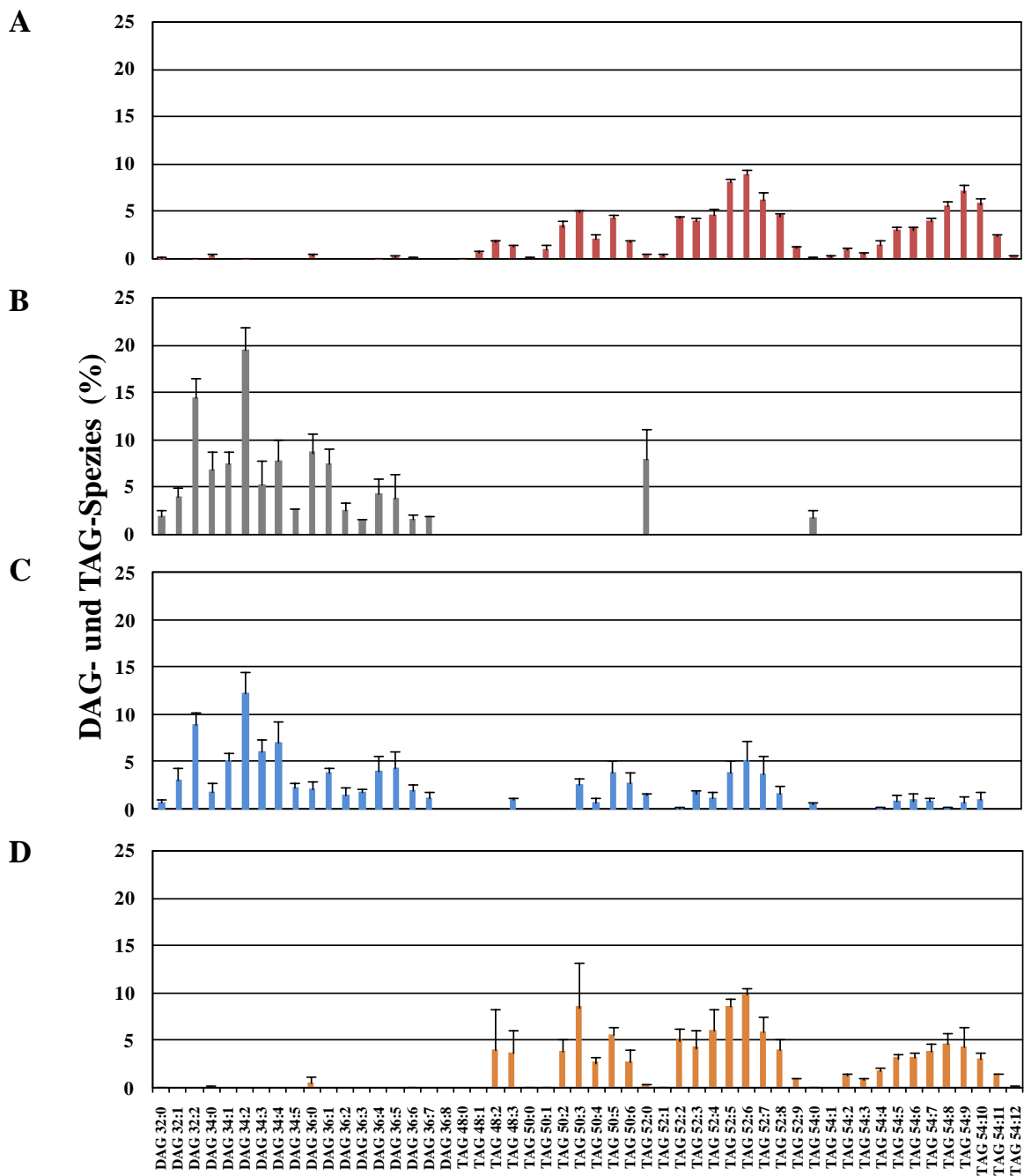


Abb. 43 Analyse der molekularen DAG- und TAG-Spezies nach Expression von OtPDAT.

Die Expression erfolgte in Gegenwart äquimolarer Mengen der Fettsäuren 18:2*n*-6, 18:3*n*-6, 18:3*n*-3 und 18:4*n*-3. Im Anschluss an die Expressionen wurden Lipidextrakte präpariert und mittels LC-MS/MS analysiert. Die prozentualen Anteile der jeweiligen DAG- und TAG-Spezies wurden berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von (A) der Leervektor-Kontrolle des Wildtyps BY4741, (B) der Leervektor-Kontrolle der Mutante BY4741 *lro1Δ dgalΔ*, (C) der Mutante BY4741 *lro1Δ dgalΔ* nach Expression von OtPDAT und (D) der Mutante BY4741 *lro1Δ dgalΔ* nach Expression von *LROI*. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Expressionskulturen.

In Abb. 44 wird die Akkumulation von DAG und die unvollständige Umsetzung von DAG zu TAG in der Doppelmutante nach Expression von OtPDAT deutlich. Während in den Kulturen des Wildtyps und der *DGA1*-Komplementation nahezu 100 % des DAG zu TAG umgesetzt wurden, führte die Expression von OtPDAT nur zu einer unvollständigen Umsetzung von etwa 31 %. Für die *lro1Δ dga1Δ*-Mutante wurde eine Umsetzung von etwa 9 % festgestellt (Abb. 44). Diese Werte zeigen, dass OtPDAT den *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyp im Vergleich zu Lro1p vermutlich nur unvollständig komplementierte. Weitere Unterschiede zwischen den molekularen TAG-Spezies in den Kulturen von OtPDAT und Lro1p sind in Abb. 45 zu erkennen. Während die molekularen TAG-Spezies 48:0, 48:1 und 54:1 sowohl in den Lipidextrakten von OtPDAT als auch Lro1p fehlten, gab es einige molekulare Spezies, die nur in den Lipidextrakten von Lro1p-Lipidextrakten auftraten (Abb. 45). Diese waren meist Spezies deren Fettsäuren gesättigt oder nur einfach ungesättigt waren. Dass rein gesättigte TAG-Spezies, abgesehen von 52:0 und 54:0, sowie TAG-Spezies mit einer einfach ungesättigten Fettsäure nicht in den Lipidextrakten von OtPDAT vorkamen, bestätigte die beobachtete Substratspezifität der OtPDAT für mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Allerdings wurden die TAG-Spezies mit der höchsten Anzahl von Doppelbindungen 54:11 und 54:12 nur in Lro1p-Lipidextrakten detektiert. Abb. 45 bildet die relativen Verhältnisse der jeweiligen TAG-Spezies aus den OtPDAT-Lipidextrakten und Lro1p-Lipidextrakten als Quotienten ab. TAG-Spezies mit Werten oberhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in den OtPDAT-Lipidextrakten als in den Lro1p-Lipidextrakten vor und TAG-Spezies mit Werten unterhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in Lro1p-Lipidextrakten vor.

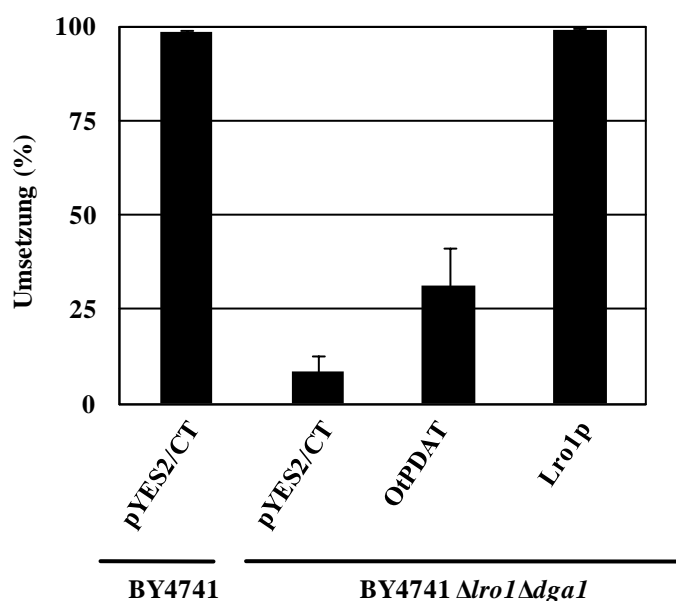


Abb. 44 DAG wird in OtPDAT-Expressionskulturen nur unvollständig zu TAG umgesetzt.

Die Effizienz der Umsetzung von DAG (Umsetzung %) wurde aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Lipide aus Abb. 43 als $(100 \times \text{TAG}) / (\text{TAG} + \text{DAG})$ berechnet. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen repräsentierten die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Die auffälligsten Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung des TAG bestanden in dem etwa 7-fach höheren Anteil der 52:0-Spezies und dem etwa 4-fach höheren Anteil der Spezies 54:0. Da sich diese beiden Spezies aus den gesättigten C16- bzw. C18-Fettsäuren zusammensetzen und diese als einzige TAG-Spezies in der *lro1Δ dgalΔ*-Mutante vorkommen, ist anzunehmen, dass der relative hohe Anteil auf die Aktivität von Are1p und Are2p zurückzuführen ist. Da OtPDAT den Transfer von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysiert, war zu erwarten, dass bestimmte molekulare TAG-Spezies in den OtPDAT-Lipidextrakten häufiger auftreten könnten als in den Lro1p-Lipidextrakten. Diese Annahme bestätigte sich nicht. Es gab keine solchen molekularen TAG-Spezies mit einer Häufung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die im Vergleich zu den Lro1p-Lipidextrakten häufiger in den OtPDAT-Lipidextrakten vorkamen. Lediglich die Spezies 50:6 war in den OtPDAT- und Lro1p-Lipidextrakten etwa gleich häufig vertreten. Ansonsten lag der relative Anteil an mehrfach ungesättigten TAG-Spezies in den OtPDAT-Lipidextrakten niedriger als in den Lro1p-Lipidextrakten (Abb. 45).

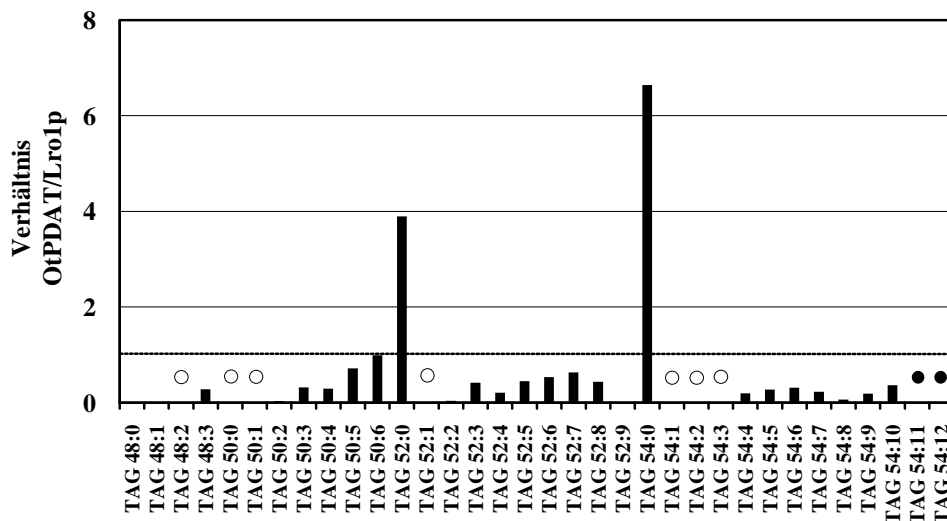


Abb. 45 Verhältnis der TAG-Spezies aus OtPDAT- und *LRO1*-Expressionskulturen.

Die Werte geben das Verhältnis von TAG-Spezies aus Kulturen nach Expression von OtPDAT bzw. *LRO1* aus Abb. 43 an. TAG-Spezies mit Werten oberhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in den OtPDAT-Lipidextrakten als in den Lro1p-Lipidextrakten vor und TAG-Spezies mit Werten unterhalb der gepunkteten Linie kommen häufiger in Lro1p-Lipidextrakten vor. Mit ○ markierte TAG-Spezies sind nur in OtPDAT-Kulturen und mit ● markierte TAG-Spezies sind nur in Lro1p-Kulturen zu finden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Expressionsstudien schließen, dass es sich bei OtPDAT um eine Acyltransferase mit neuartiger Substratspezifität handelt. Das aus der Mikroalge *O. tauri* stammende Gen konnte erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert werden und führte dort zur Komplementation des *lro1Δ dgalΔ*-Phänotyps. Hierfür verwendete das Enzym keine gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren als Substrate, sondern die Synthese von TAG erfolgte ausschließlich in Gegenwart mehrfach ungesättigter Fettsäuren.

3.5 Etablierung eines ARA- und EPA-Biosyntheseweges in *A. thaliana*

In Analogie zu den von Abbadi et al. (2004) veröffentlichten Arbeiten wurden für die Etablierung eines EPA-Biosyntheseweges in *A. thaliana* die $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ aus *P. tricornutum*, die $\Delta 6$ -Elongase PSE1 aus *P. patens* und die $\Delta 5$ -Desaturase aus *P. tricornutum* eingesetzt. Die erstellten rekombinanten Expressionskonstrukte wurden durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in das Genom von *A. thaliana* integriert. Die Expression der beteiligten Gene wurde durch den im reifenden Samen aktiven USP-Promotor (*Unknown Seed Protein*) reguliert. Die Expressionskonstrukte waren so gestaltet, dass jedes Gen einzeln reguliert wurde. Zur Identifizierung von Transgenen enthielten die Expressionskonstrukte zusätzlich das ubiquitär exprimierte Kanamycinresistenz-vermittelnde nptII-Gen.

Nach der Selektion antibiotikaresistenter T1-Pflanzen sollten zunächst transgene *A. thaliana*-Linien identifiziert werden, die über mehrere Generationen hinweg relativ stabile ARA- und EPA-Anteile im Samenöl aufweisen. Eine solche Linie sollte dann für die Supertransformation der Acyltransferasegene aus *O. tauri*, *M. squamata* und *P. patens* dienen. Mit diesem experimentellen Ansatz sollte versucht werden, den möglichen Einfluss der verschiedenen Acyltransferasen auf die transgene VLCPUFA-Biosynthese *in planta* darzustellen. In den nun folgenden Abschnitten wird zunächst die Identifizierung einer transgenen *A. thaliana*-Linie mit relativ stabilen ARA- und EPA-Anteilen im Samenöl beschrieben. Darauf folgend werden die Arbeiten zu der Supertransformation der Acyltransferasegene dargestellt.

3.5.1 Lipidabhängige VLCPUFA-Synthese in *A. thaliana*

Aus den Transformationsereignissen erhaltene Pflanzen der T1-Generation wurden nach der Selektion bis zur vollständigen Reife der Samen unter Gewächshausbedingungen angezogen. Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung des T2-Samens von 38 T1-Pflanzen ist in Abb. 46 dargestellt. Dabei bilden die endogenen Fettsäuren 18:2 $n-6$ und 18:3 $n-3$ die primären Substrate der lipidabhängigen VLCPUFA-Synthese (Abb. 46 A), die von der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ umgesetzt werden. Während die Produkte der initialen Desaturierung 18:3 $n-6$ und 18:4 $n-3$ noch in 24 der 38 analysierten Pflanzen detektiert wurden, konnten die korrespondierenden Produkte der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 in nur 14 Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 46 B und C).

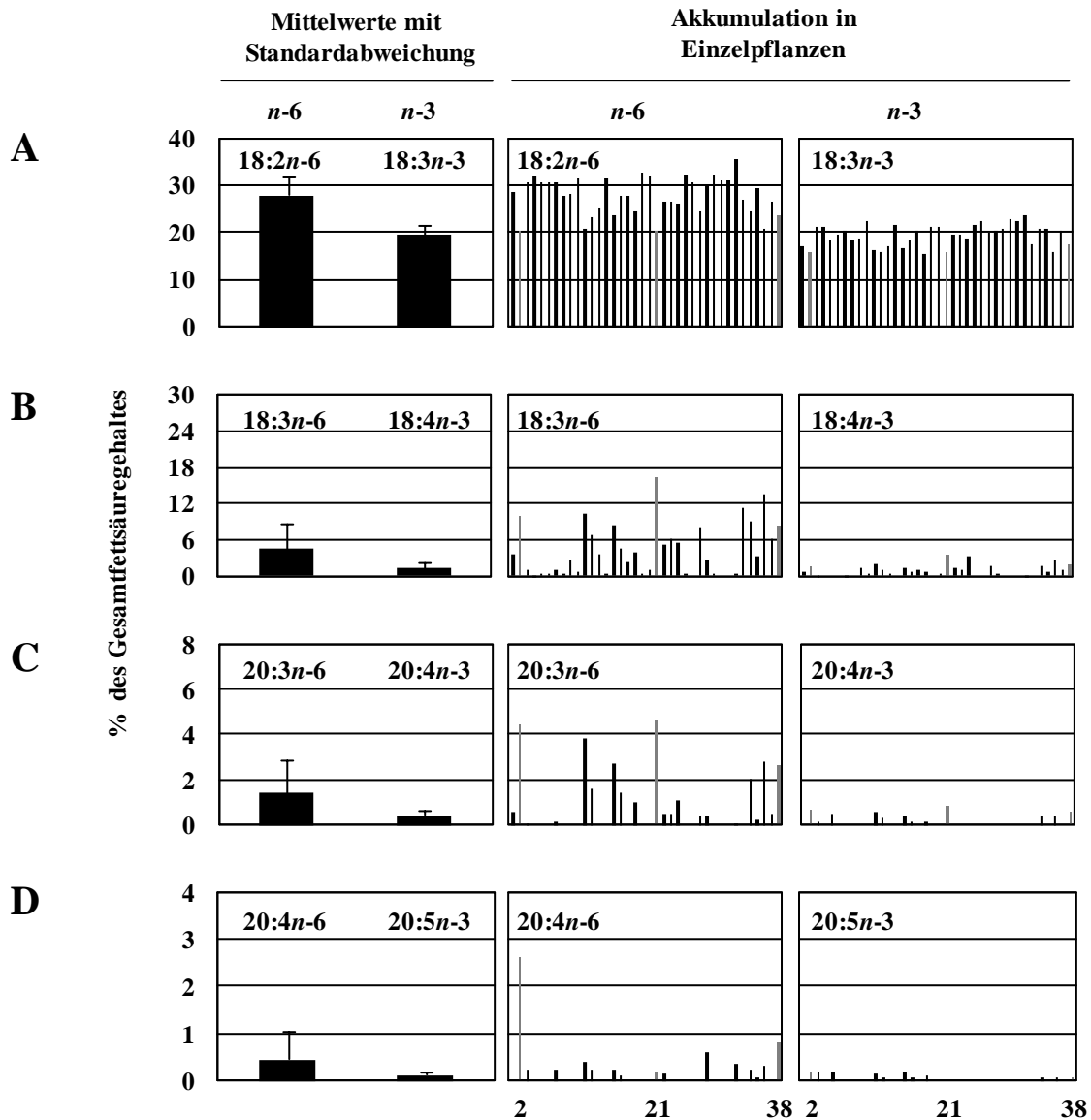


Abb. 46 Ausschnitt der Fettsäureprofile von T2-Samen transgener *A. thaliana*-Pflanzen.

Nach der Selektion wurden 38 Pflanzen unter Gewächshausbedingungen bis zur vollständigen Reife der Samen angezogen. Jeweils 1 mg Samen wurde für die Analyse der Fettsäureprofile eingesetzt. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Pflanzen und die daraus resultierenden Mittelwerte (A) der endogenen Fettsäuren 18:2n-6 und 18:3n-3, (B) der Produkte der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ 18:3n-6 und 18:4n-3, (C) der Produkte der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 20:3n-6 und 20:4n-3 und (D) der Produkte der $\Delta 5$ -Desaturase 20:4n-6 und 20:5n-3. Graue Balken markieren die Werte der Linien, die für die Anzucht der Folgegeneration ausgewählt wurden.

Von diesen 14 Pflanzen enthielten zehn Pflanzen auch die beiden Folgeprodukte der $\Delta 5$ -Desaturase 20:4n-6 und 20:5n-3 im Samen (Abb. 46 D). Die Linien 2, 21 und 38 wurden anhand der Fettsäureprofile für die Anzucht der Folgegeneration ausgewählt. Die Auswahlkriterien waren hierbei der prozentuale Anteil aller transgener Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt und insbesondere die Höhe des 20:4n-6- und 20:5n-3-Anteils. Von der folgenden Generation wurde der T3-Samen von insgesamt 20 T2-Pflanzen hinsichtlich der VLCPUFA-Synthese analysiert.

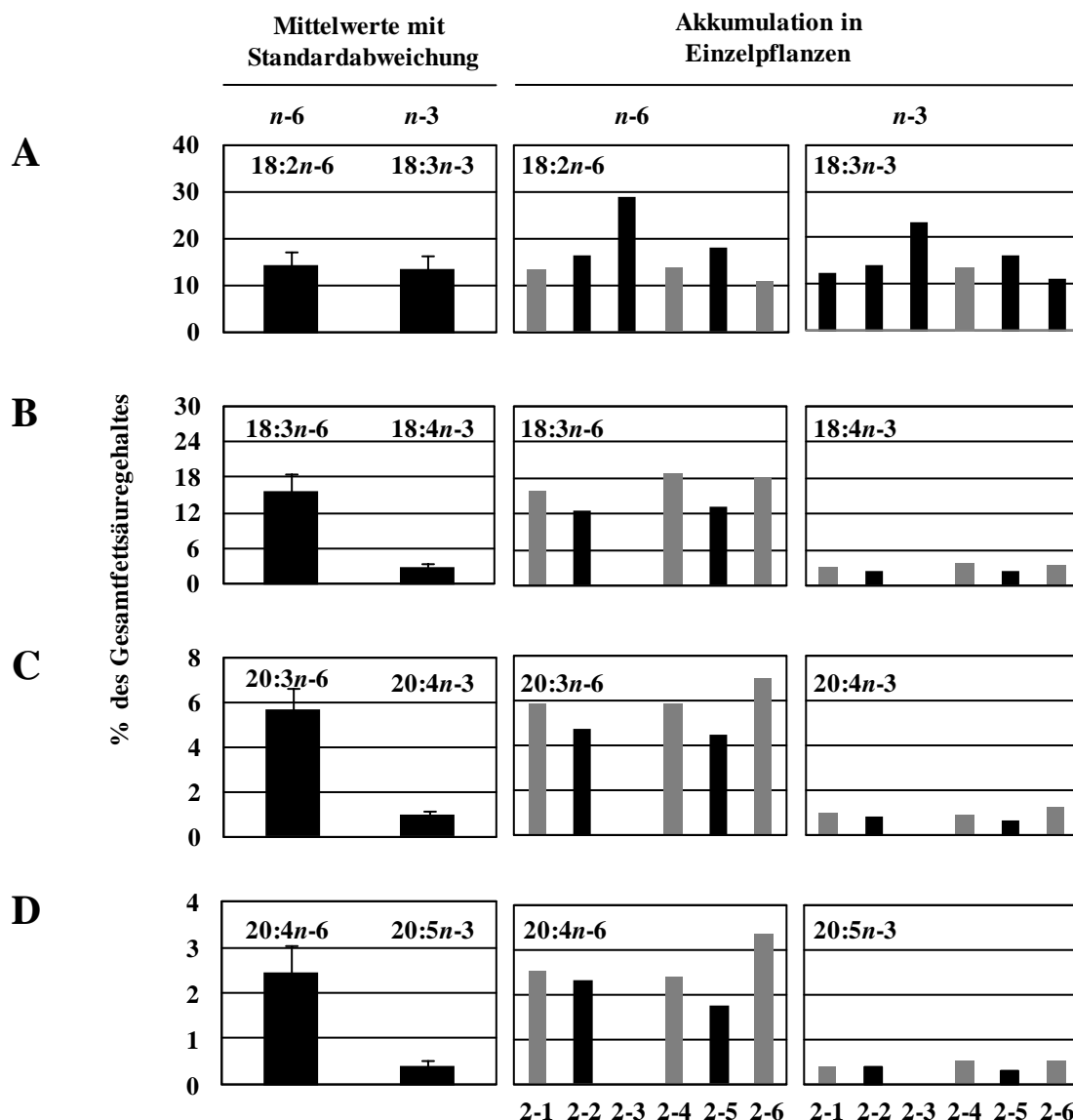


Abb. 47 Ausschnitt der Fettsäureprofile von T3-Samen transgener *A. thaliana*-Pflanzen.

Von den Nachkommen der Linie 2 wurden jeweils etwa 1 mg Samen von sechs Einzelpflanzen analysiert. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Pflanzen und die daraus resultierenden Mittelwerte (A) der endogenen Fettsäuren 18:2*n-6* und 18:3*n-3*, (B) der Produkte der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ 18:3*n-6* und 18:4*n-3*, (C) der Produkte der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 20:3*n-6* und 20:4*n-3* und (D) der Produkte der $\Delta 5$ -Desaturase 20:4*n-6* und 20:5*n-3*. Graue Balken markieren die Werte der Linien, die für die Anzucht der Folgegenerationen ausgewählt wurden.

Die Ergebnisse der Analysen von sechs Nachkommen der Pflanze 2 sind hier repräsentativ dargestellt (Abb. 47). Im Vergleich zu den Werten der T2-Samen ist im T3-Samen eine deutlich erhöhte Syntheserate von VLCPUFA zu erkennen. Besonders auffällig ist die Reduktion des endogenen 18:2*n-6*-Anteils am Gesamtfettsäuregehalt zugunsten des gebildeten 18:3*n-6* (Abb. 47 A und B). 18:3*n-6* machte im T3-Samen in etwa 16 % aus, während der Wert im T2-Samen der Pflanze 2 noch bei etwa 9,9 % lag. Die höhere Syntheserate der *n-6*-Fettsäure geht jedoch nicht mit einem gleich starken Anstieg der Folgeprodukte 20:3*n-6* und 20:4*n-6* einher (Abb. 47 A und B).

Für die transgenen $n-3$ -Fettsäuren gilt ähnliches. Zwar steigt der $18:4n-3$ -Anteil von etwa 0,7 % im T2-Samen der Pflanze 2 auf durchschnittlich 2,9 % im T3-Samen, jedoch fällt der Anstieg der Folgeprodukte $20:4n-3$ und $20:5n-3$ weniger stark aus. Dies bestätigt die Beobachtungen von Abbadi et al. (2004) in Lein und Tabak auch für *A. thaliana*. Eine der sechs analysierten Pflanzen (2-3 in Abb. 47) zeigt keine transgenen Fettsäuren, was möglicherweise den Verlust des Expressionskonstrukts widerspiegelt und Heterozygotie der ausgewählten Linie 2 andeutet. Der Samen der Pflanzen 2-1, 2-4 und 2-6 (Abb. 47) wurde für die Anzucht der Folgegenerationen ausgewählt.

Im T3-Samen der Nachkommen aus den Linien 21 und 38 (Abb. 46) akkumulierten die intermediären Fettsäuren $18:3n-6$, $18:4n-3$, $20:3n-6$ und $20:4n-3$ zu wesentlich geringeren Anteilen und darüber hinaus wurden die Endprodukte $20:4n-6$ und $20:5n-3$ meist nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der geringeren Syntheseleistung im Vergleich zu den Nachkommen der Linie 2 und der fehlenden $20:4n-6$ - und $20:5n-3$ -Synthese wurde die Linien 21 und 38 von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen.

Der T4-Samen der T3-Pflanzen zeigte keine weitere Steigerung in den VLCPUFA-Anteilen (Abb. 48). Die Gehalte erzielten zu der T3-Generation vergleichbare Werte. Ebenfalls ist sehr deutlich zu erkennen, dass die Intermediate der $20:4n-6$ - und $20:5n-3$ -Biosynthese im Samen akkumulieren und nur äußerst unvollständig zu den gewünschten Endprodukten prozessiert werden. Fünf der 20 analysierten Pflanzen der Linie 2-4 zeigten neben den endogenen Fettsäuren keine weiteren transgenen Fettsäuren im Samen. Aufspaltung könnte auch hier die fehlende Genaktivität erklären. Von den Linien 2-1 und 2-6 wurden ebenfalls T4-Samenanalysen von jeweils 12 bzw. 21 Pflanzen durchgeführt. Auch bei diesen Nachkommen konnte keine Steigerung der VLCPUFA-Akkumulation beobachtet werden, meist lagen die Werte sogar unterhalb denen der 2-4-Nachkommen. Vermutlich segregierten die Nachkommen von 2-1 und 2-6 in einem noch stärkeren Maße als es bei den Nachkommen von 2-4 der Fall war. Allerdings kann auch die Inaktivierung der Genexpression (*gene silencing*) als Grund für die fehlenden Aktivitäten nicht außer Acht gelassen werden. Acht der analysierten 12 Nachkommen von 2-1 und 16 der analysierten 21 Nachkommen von 2-6 zeigten keine transgenen Fettsäuren im Samenöl.

Obwohl zu erwarten war, dass die Nachkommen der Linie 2-4-11 erneut segregieren könnten und somit ein bestimmter Anteil der Nachkommenschaft wieder das Fettsäureprofil des Wildtyps aufweisen könnte, wurde die Linie 2-4-11 für die Supertransformation der Acyltransferasegene als am ehesten geeignet bewertet.

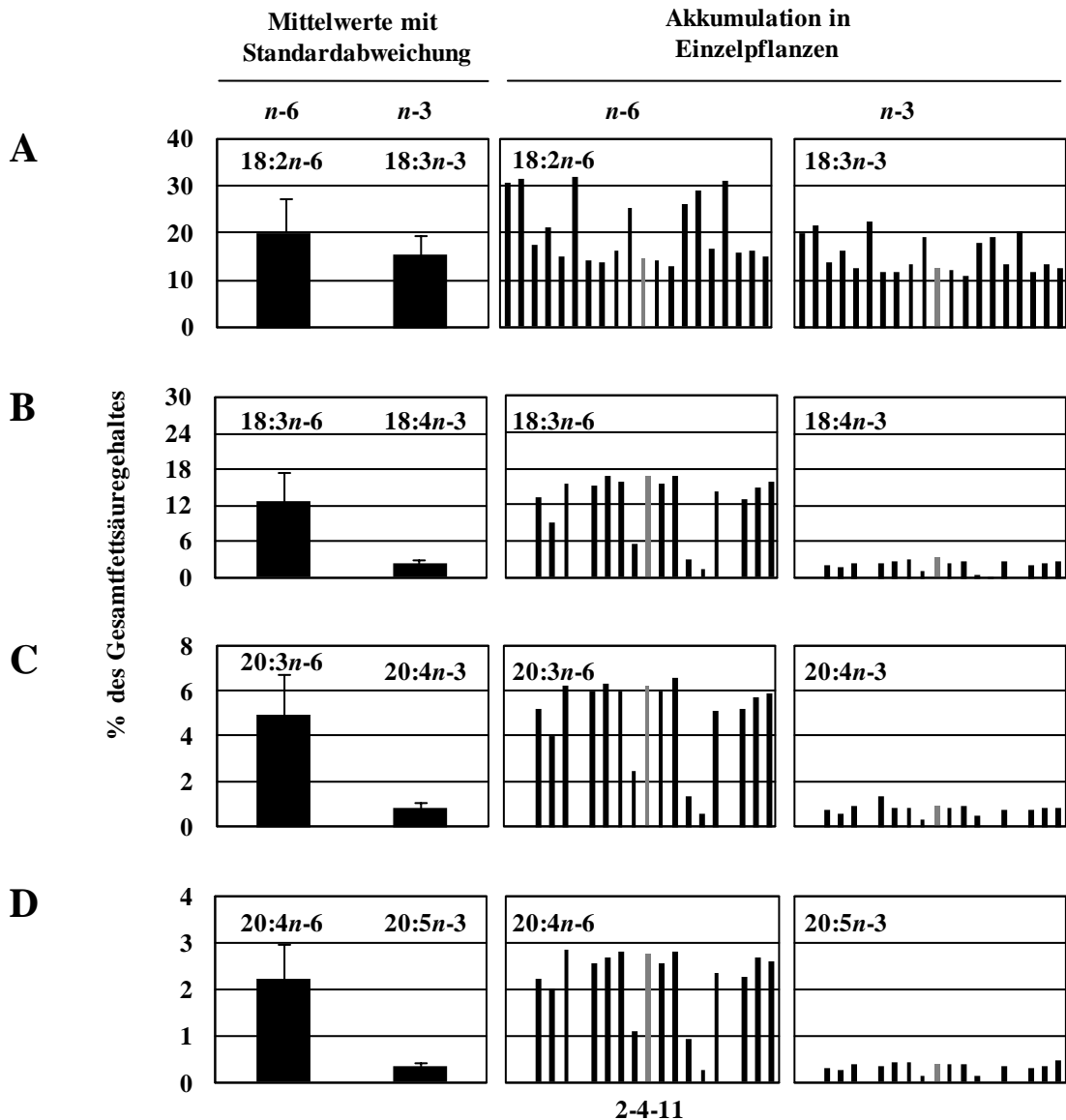


Abb. 48 Ausschnitt der Fettsäureprofile von T4-Samen transgener *A. thaliana*-Pflanzen.

Von den Nachkommen der Linie 2-4 wurden jeweils etwa 1 mg Samen von 20 Einzelpflanzen analysiert. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Pflanzen und die daraus resultierenden Mittelwerte (A) der endogenen Fettsäuren 18:2n-6 und 18:3n-3, (B) der Produkte der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ 18:3n-6 und 18:4n-3, (C) der Produkte der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 20:3n-6 und 20:4n-3 und (D) der Produkte der $\Delta 5$ -Desaturase 20:4n-6 und 20:5n-3. Graue Balken markieren die Werte der Linie, die für die Anzucht der Folgegeneration und für die Supertransformation ausgewählt wurden.

3.5.2 Supertransformation transgener *A. thaliana* mit Acyltransferasegenen

Für die Supertransformation der transgenen *A. thaliana*-Linie wurden rekombinante Expressionskonstrukte mit den einzelnen Kandidatengen der LPAAT/LPCAT-Familie (siehe 3.2.1), den DGAT2-Kandidatengen (siehe 3.3.1) und dem PDAT-Kandidatengen aus *O. tauri* (siehe 3.4.1) erstellt. Dabei wurden MsLPAAT und PpLPAAT jeweils einzeln in die Expressionskonstrukte kloniert. Die DGAT2-Kandidatengene und das PDAT-Kandidatengen wurden entweder einzeln oder miteinander kombiniert in die Expressionskonstrukte kloniert und anschließend transformiert (Tab. 24). Die Expressionskonstrukte waren so gestaltet, dass die Expression der Gene durch den samenspezifischen USP-Promotor reguliert wurde. Für die Selektion der supertransformierten Pflanzen wurde ein Herbizidresistenz-vermittelndes Gen (*bar*-Gen) eingesetzt. Aus den Transformationsereignissen erhaltene Pflanzen der T1-Generation wurden nach der Selektion bis zur vollständigen Reife der Samen unter Gewächshausbedingungen angezogen. Als Referenz wurde der Leervektor pCAMBIA 3300, der lediglich den Pflanzen die Resistenz gegenüber Glufosinat vermittelt, in die Linie 2-4-11 supertransformiert. Zusätzlich wurden die nach der Selektion erhaltenen Pflanzen mittels PCR genotypisiert. Dazu wurde genomische DNA aus Rosettenblättern präpariert und als Matrize in zwei voneinander unabhängigen PCR-Reaktionen eingesetzt. Zum Nachweis des Expressionskonstruktes für die Synthese von 20:4 n -6 und 20:5 n -3 wurden sequenzspezifische Oligonukleotide eingesetzt, mit denen die Δ 6-Elongase PSE1 im Genom detektiert werden sollte. Für die zweite PCR-Reaktion wurden sequenzspezifische Oligonukleotide eingesetzt mit denen das jeweilige Acyltransferasegen im Genom der supertransformierten *A. thaliana*-Pflanzen detektiert werden sollte. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Tab. 24 zusammenfassend dargestellt. Von allen Linien wurden jeweils 30 glufosinatresistente Pflanzen selektiert und genotypisiert. Die Anzahl der Pflanzen mit positivem Genotyp, d.h. beide PCR-Reaktionen ergaben ein positives Ergebnis, variiert stark zwischen den einzelnen Transformationsereignissen. Während von 30 glufosinatresistenten Pflanzen, die neben dem VLCPUFA-Expressionskonstrukt auch das Doppelkonstrukt OtDGAT2A-OtPDAT enthalten sollten, nur eine einzige Pflanze mit positivem Genotyp identifiziert wurde, waren es bei dem Expressionskonstrukt der PpLPAAT 15 Pflanzen mit positivem Genotyp. Häufig war ein negativer Genotyp durch den fehlenden Nachweis von PSE1 bei gleichzeitiger Anwesenheit des jeweiligen Acyltransferasegens bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Abwesenheit von PSE1 wurde als Fehlen des gesamten VLCPUFA-Expressionskonstruktes gewertet. Aus diesem Grund wurden von den 270 selektierten Pflanzen nur diejenigen weitergehend analysiert, die einen positiven Genotyp aufwiesen.

Die Anzahl der Pflanzen einer Linie, die VLCPUFA inkl. der Endprodukte 20:4n-6 und 20:5n-3 Samen enthielten, sind ebenfalls in Tab. 24 aufgeführt.

Tab. 24 Übersicht der Expressionskonstrukte für die Supertransformation transgener *A. thaliana*-Pflanzen.

Die verschiedenen Expressionskonstrukte wurden in den Transformationsvektor pCAM3300 kloniert. Des Weiteren gibt die Übersicht die Anzahl der selektierten Pflanzen nach Herbizid-Behandlung, die Ergebnisse der Genotypisierung sowie die Anzahl der Pflanzen, deren Samen 20:4n-6 und 20:5n-3 beinhaltet an. Mit * markierte Linien wurden nicht genotypisiert.

Konstrukt pCAM330	Anzahl selektierter Pflanzen	positiver Genotyp	VLCPUFA inkl. 20:4n-6 und 20:5n-3
MsLPAAT	30	4	2
PpLPAAT	30	15	1
OtDGAT2A	30	6	2
OtDGAT2B	30	5	1
OtDGAT2C	30	8	0
OtPDAT	30	9	1
OtPDAT-OtDGAT2A	30	1	0
OtPDAT-OtDGAT2B	30	3	1
OtPDAT-OtDGAT2C	30	8	2
Leervektor	30	-*	12

Obwohl die Analysen mit Samen von Pflanzen durchgeführt wurden, die einen eindeutig positiven Genotyp aufwiesen, sind es in den meisten Linien lediglich zwei oder weniger Pflanzen, die überhaupt VLCPUFA inkl. der beiden Endprodukte im Samen enthalten. In Abb. 49 sind die Ergebnisse der Versuche zur Supertransformation einer transgenen *A. thaliana*-Linie anhand ausgewählter Linien zusammenfassend dargestellt. Abb. 49 A zeigt nochmals Ausschnitte des Fettsäureprofils der Ausgangslinie 2-4-11, deren Nachkommen für die Supertransformation verwendet wurden. Parallel zu den für die Supertransformation vorgesehenen Pflanzen wurden 20 Nachkommen der Linie 2-4-11 angezogen. Die Fettsäureprofile des T5-Samens dieser T4-Pflanzen sind in Abb. 49 B dargestellt. Für die Analyse der Fettsäurezusammensetzung dieser Samen wurde jeweils 1 mg Samen der 20 Pflanzen zu einem Pool vereint und anschließend ein Lipidextrakt präpariert und über Gaschromatographie analysiert. Die in Abb. 49 B dargestellten Werte repräsentieren somit die Fettsäureprofile von 20 Einzelpflanzen.

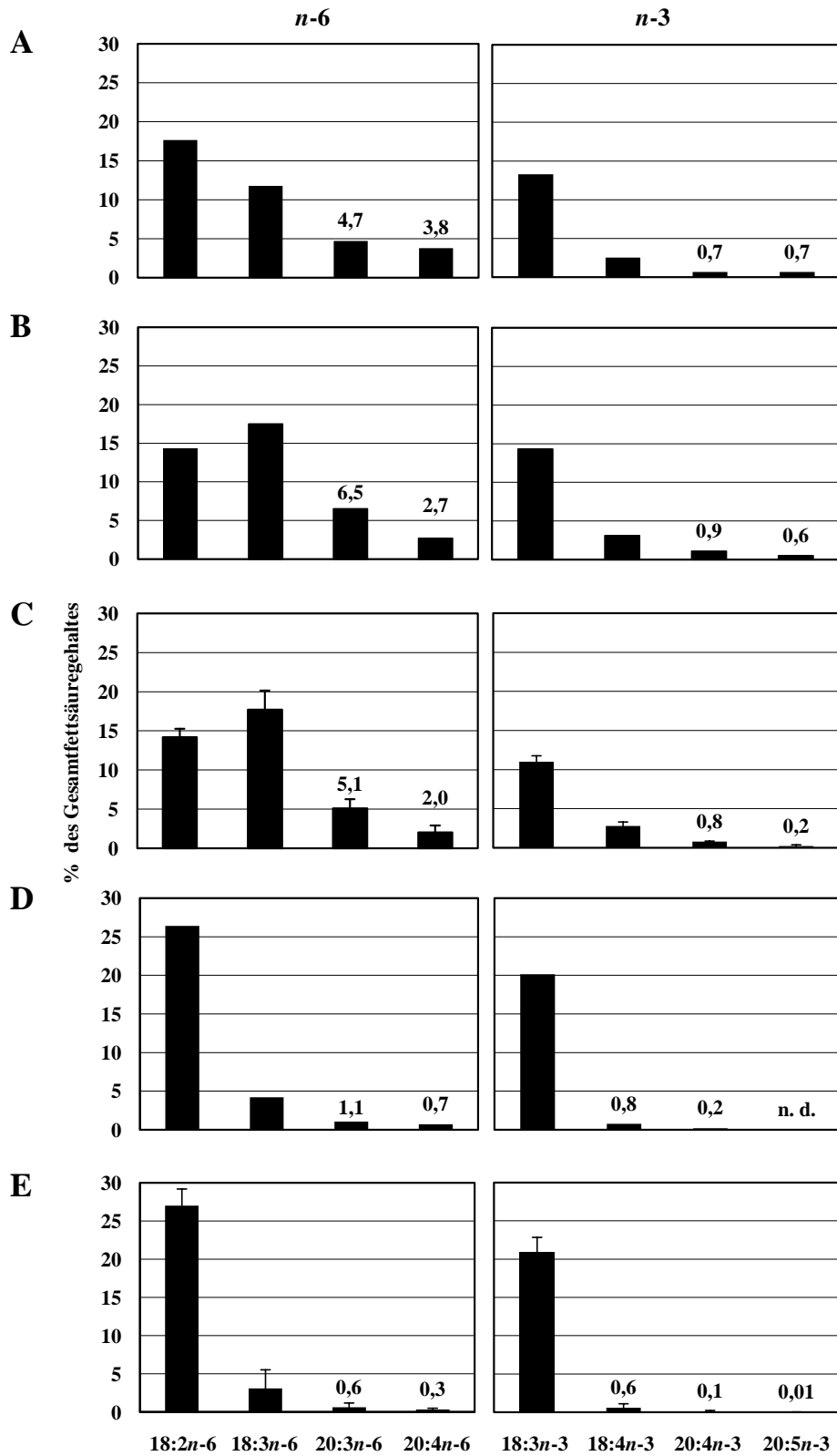


Abb. 49 Ausschnitt der Fettsäureprofile von Samen transgener *A. thaliana*-Pflanzen.

(A) T4-Samen der Linie 2-4-11, (B) T5-Samenpool von 20 Nachkommen der Linie 2-4-11 (C) Mittelwerte der T2-Samenanalyse von zwölf Pflanzen der Leervektor-Kontrolle, (D) T2-Samenanalyse der Pflanze mit dem Expressionskonstrukt OtDGAT2B, die auch VLCPUFA im Samen enthält und (E) T2-Samenanalyse von neun Pflanzen mit dem Expressionskonstrukt OtPDAT.

Es ist zu erkennen, dass die VLCPUFA-Anteile im Vergleich zu den T4-Samen mit Ausnahme von 20:5n-3 leicht erhöht sind. Insbesondere übersteigt in dieser Generation zum ersten Mal der Anteil der transgenen Fettsäure 18:3n-6 den Anteil der endogenen Fettsäure 18:2n-6 im Samen. In Abb. 49 C bis E sind die Fettsäureprofile von T2-Samen ausgewählter T1-Pflanzen der Supertransformationsversuche mit Acyltransferasegenen gezeigt. Das Fettsäureprofil der T2-Samen von den zwölf Pflanzen, die den Leervektor pCAMBIA 3300 und die beiden Endprodukte 20:4n-6 und 20:5n-3 enthielten, ist mit dem Fettsäureprofil der T5-Samen aus Abb. 49 B vergleichbar. Die Werte für die VLCPUFA liegen im selben Bereich. Auch in diesen Samen ist der transgene 18:3n-6-Gehalt höher als der endogene 18:2n-6-Gehalt. Im Gegensatz dazu sind die Werte der transgenen Fettsäuren im T2-Samen der Linien mit OtDGAT2B (Abb. 49 D) und OtPDAT (Abb. 49 E) stark erniedrigt. Ähnliches gilt auch für den Samen der anderen Linien (siehe Tab. 24), bei denen die VLCPUFA-Anteile ebenfalls deutlich unter den Werten der Ausgangslinie 2-4-11 und den in Abb. 49 B und C gezeigten Linien liegen. Es ist nicht davon auszugehen, dass die Reduktion der Gehalte ausschließlich auf die Aktivität der Acyltransferasen zurückzuführen ist, da einige der möglichen Acyltransferasen auch in den Hefe-Komplementationsstudien keine Aktivität zeigten. Darüber hinaus wurden für die Supertransformation nicht die Codon adaptierten offenen Leserahmen eingesetzt. Da *A. thaliana* und *S. cerevisiae* keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Codonverwendung zeigen, werden die beiden Gene der funktional identifizierten Gene OtDGAT2B und OtPDAT vermutlich exprimiert, aber kaum oder gar nicht zu den entsprechenden Proteinen umgesetzt.

3.6 Etablierung von DHA-Biosynthesewegen in *A. thaliana*

Neben der lipidabhängigen VLCPUFA-Biosynthese, dessen Reaktionsschritte unter Beteiligung des Acyl-CoA-Pools und des PtdCho-Pools verlaufen, können VLCPUFA auch ausschließlich im Acyl-CoA-Pool synthetisiert werden. Hierbei erfolgt die Desaturierung, im Gegensatz zu dem lipidabhängigen Weg, an CoA-gebundenen Fettsäuren. Ein solcher ω 3-Syntheseweg für die Bildung von EPA wurde im Samen von *A. thaliana* etabliert (Hoffmann et al., 2008). Bei diesem Ansatz konnte der limitierende Austausch der intermediären Fettsäuren zwischen Acyl-CoA- und PtdCho-Pool umgangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Acyl-CoA-abhängige Biosynthesewege für DHA (22:6n-3) im reifenden Samen von *A. thaliana* etabliert werden. Für die Biosynthese von 22:6n-3 aus 18:3n-3 gilt es, fünf enzymatische Aktivitäten in Pflanzen einzubringen. Zusätzlich zu den bereits in Abschnitt 3.5 erwähnten drei enzymatischen Aktivitäten, die zur Bildung von 20:5n-3 führen, sind eine sich daran anschließende Δ 5-Elongation zur Bildung von 22:5n-3 und eine Δ 4-Desaturierung zur Bildung von 22:6n-3 notwendig. Von vier der benötigten fünf Aktivitäten waren zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit Enzyme bekannt, die eine Acyl-CoA-Spezifität aufweisen (Zank et al., 2002; Meyer et al., 2004; Domergue et al., 2005; Hoffmann et al., 2008). Lediglich eine Acyl-CoA-spezifische Δ 4-Desaturase wurde bisher noch nicht identifiziert. Aus diesem Grund musste für den letzten Reaktionsschritt, der Desaturierung von 22:5n-3 zu 22:6n-3, eine lipidabhängige Δ 4-Desaturase aus der zu den Euglenophyceae zählenden Alge *Euglena gracilis* eingesetzt werden (Meyer et al., 2003).

Die erstellten zwölf Expressionskonstrukte sind in Tab. 25 und Tab. 26 aufgelistet. Die Konstrukte unterscheiden sich hauptsächlich durch die Gene, deren Genprodukte die Synthese von 20:5n-3 katalysieren. Für die Synthese von 22:6n-3 entlang des CoA I-Weges (Tab. 25) wurden die Acyl-CoA-spezifischen Desaturasen Ms Δ 6 und Ms Δ 5 aus *M. squamata*, die Δ 6-Elongase PSE1 aus *P. patens* sowie die Δ 5-Elongase OtELO2 aus *O. tauri* und die lipidabhängige Δ 4-Desaturase Eg Δ 4 aus *E. gracilis* verwendet. Der CoA II-Weg setzt sich zusammen aus den Acyl-CoA-spezifischen Desaturasen Ot Δ 6 und Ot Δ 5, der Elongase OtELO1 aus *O. tauri* sowie der Δ 5-Elongase OtELO2 und Δ 4-Desaturase Eg Δ 4. Die an der DHA-Synthese beteiligten Gene wurden zusätzlich mit den Acyltransferasen OtDGAT2A, OtDGAT2B, OtDGAT2C und OtPDAT sowie der prozessiven bifunktionalen Oleoyl Δ 12/Linoleoyl- ω 3-Desaturase An1 aus dem filamentösen Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* kombiniert (Tab. 25 und Tab. 26).

Die erstellten rekombinanten Expressionskonstrukte wurden durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in das Genom von *A. thaliana* integriert. Die Expression der Gene wurde durch den USP-Promotor reguliert. Zur Identifizierung von Transgenen enthielten die Expressionskonstrukte zusätzlich ein Herbizidresistenz-vermittelndes Gen. Als Referenz wurde der Leervektor transformiert, der den Pflanzen lediglich die Resistenz gegenüber Glufosinat vermittelt.

Tab. 25 Übersicht der Expressionskonstrukte CoA I für die DHA-Biosynthese in *A. thaliana*.

Die verschiedenen Expressionskonstrukte wurden in den Pflanzen-Transformationsvektor pCAM3300 kloniert. Neben den Enzymen für die DHA-Synthese (Ms Δ 6, PSE1, Ms Δ 5, OtEIO2, Eg Δ 4) enthielten die Expressionskonstrukte kein weiteres Gen (-frei-), die Desaturase An1 oder eine der angegebenen Acyltransferasen. Des Weiteren gibt die Übersicht die Anzahl der selektierten Pflanzen nach Herbizid-Behandlung und die Anzahl der Pflanzen, deren Samen 20:4*n*-6 und 20:5*n*-3 beinhaltet an. Mit – gekennzeichnete Linien wurden nicht analysiert.

CoA I Ms Δ 6, PSE1, Ms Δ 5, OtEIO2, Eg Δ 4	Anzahl selektierter Pflanzen	VLCPUFA inkl. DHA
-frei-	50	-
An1	30	-
OtDGAT2A	30	-
OtDGAT2B	30	0
OtDGAT2C	30	-
OtPDAT	30	-

Tab. 26 Übersicht der Expressionskonstrukte CoA II für die DHA-Biosynthese in *A. thaliana*.

Die verschiedenen Expressionskonstrukte wurden in den Pflanzen-Transformationsvektor pCAM3300 kloniert. Neben den Enzymen für die DHA-Synthese (Ot Δ 6, OtELO1, Ot Δ 5, OtELO2, Eg Δ 4) enthielten die Expressionskonstrukte kein weiteres Gen (-frei-), die Desaturase An1 oder eine der angegebenen Acyltransferasen. Des Weiteren gibt die Übersicht die Anzahl der selektierten Pflanzen nach Herbizid-Behandlung und die Anzahl der Pflanzen, deren Samen 20:4*n*-6 und 20:5*n*-3 beinhaltet an. Mit – gekennzeichnete Linien wurden nicht analysiert.

CoA II Ot Δ 6, OtELO1, Ot Δ 5, OtELO2, Eg Δ 4	Anzahl transgener Pflanzen	VLCPUFA inkl. DHA
-frei-	50	-
An1	30	-
OtDGAT2A	30	-
OtDGAT2B	100	0
OtDGAT2C	30	-
OtPDAT	100	-

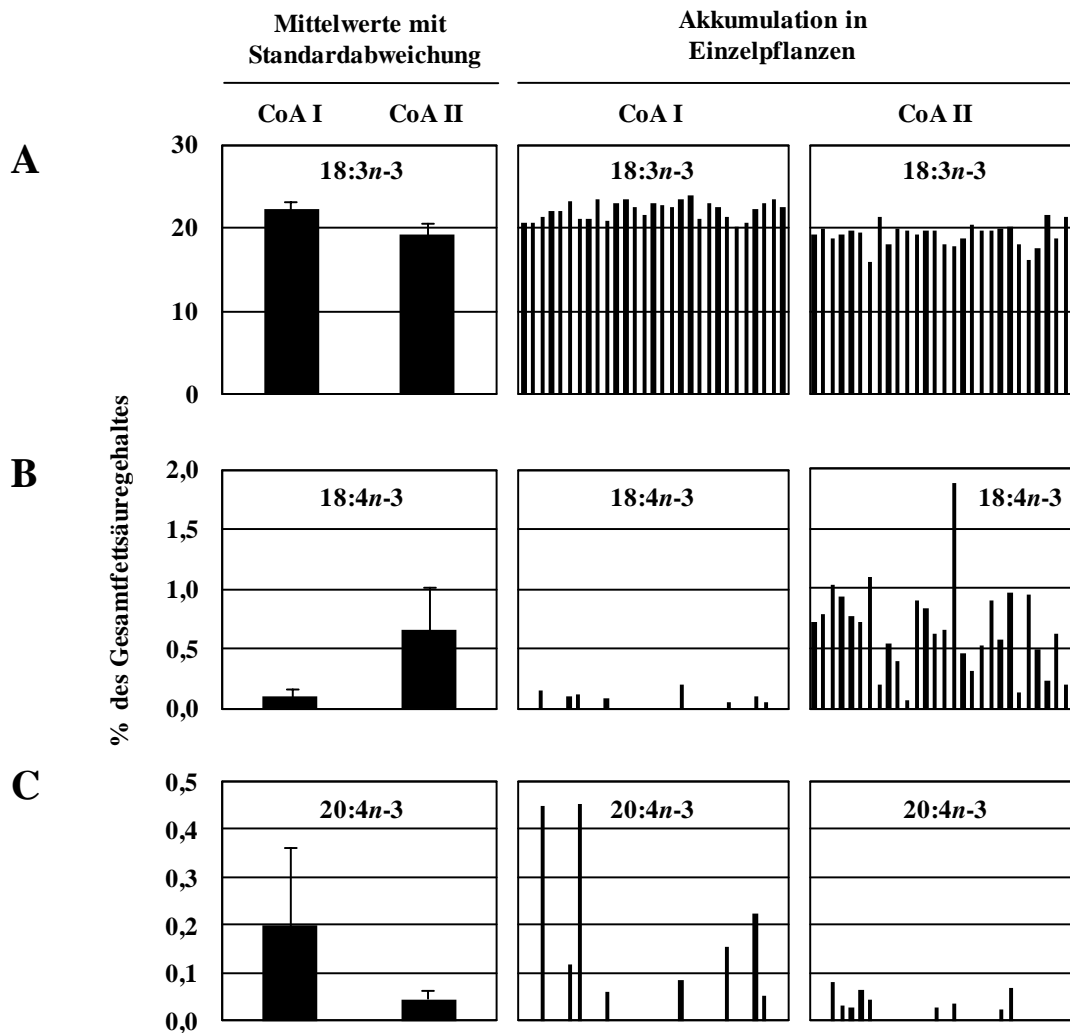


Abb. 50 Mit der gewählten Enzymkombination konnte die DHA-Biosynthese in *A. thaliana* nicht etabliert werden.

Jeweils 1 mg Samen wurde für die Analyse der Fettsäureprofile eingesetzt. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Pflanzen und die daraus resultierenden Mittelwerte (A) der endogenen Fettsäuren 18:3n-3, (B) das Produkt der $\Delta 6$ -Desaturasen 18:4n-3 und (C) das Produkt der Elongase 20:4n-3. Weitere Intermediate der DHA-Biosynthese und DHA selbst wurden nicht detektiert.

Aus den zwölf Transformationsereignissen erhaltene Pflanzen der T1-Generation wurden nach der Herbizid-Selektion bis zur vollständigen Reife der Samen unter Gewächshausbedingungen angezogen. Die Anzahl der selektierten, transgenen Pflanzen ist in Tab. 25 und Tab. 26 aufgelistet. Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung des T2-Samens von zwei ausgewählten Linien ist in Abb. 50 zusammenfassend dargestellt. Unabhängig von den Biosynthesewegen CoA I und CoA II wurde in keinem der analysierten Samen die Bildung von 22:6n-3 festgestellt. Ebenso waren die Vorstufen 22:5n-3 und 20:5n-3 nicht detektierbar. Vermutlich liegt ein Grund für den Abbruch der DHA-Synthese in der geringen oder fehlenden Aktivität der $\Delta 5$ -Desaturasen Ms $\Delta 5$ für CoA I und Ot $\Delta 5$ für CoA II, so dass keine Folgeprodukte in den GC-Analysen zu erkennen waren.

Die ersten beiden Reaktionsschritte der DHA-Synthese waren dagegen in den Fettsäureprofilen wiederzuerkennen. Wie bereits von Hoffmann et al. (2008) beobachtet, führt die Enzymkombination Ms $\Delta 6$ und PSE1 (Abb. 50, CoA I) zu einer nahezu vollständigen Elongation des primären Produktes 18:4 $n-3$ zu 20:4 $n-3$ in transgenen *A. thaliana*-Pflanzen. Diese Beobachtung wird durch die hier vorliegenden Daten bestätigt. Die gewählte Enzymkombination sowie die Elongase OtELO1 (Abb. 50, CoA II) scheinen dagegen für eine effiziente Elongation von 18:4 $n-3$ weniger gut geeignet zu sein. Ähnliches gilt auch für 18:3 $n-6$, dem zweiten Produkt der $\Delta 6$ -Desaturase Ot $\Delta 6$ (Daten nicht gezeigt). Beide C18-Fettsäuren akkumulierten im Samen und wurden nur sehr ineffizient elongiert. Die in Abb. 50 gezeigten Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass auch die weiteren in Tab. 25 und Tab. 26 aufgeführten Linien kein DHA synthetisieren würden. Aus diesem Grund wurde die Analyse der Fettsäureprofile des Samens dieser Linien nicht weiter verfolgt.

4. Diskussion

Der weltweit steigende Bedarf an VLCPUFA als Bestandteil der menschlichen Ernährung erfordert die Suche nach alternativen Bezugsquellen, da sich der nachhaltige Zugang zu fettreichem Seefisch als Hauptquelle für das daraus gewonnene Öl immer schwieriger gestaltet. VLCPUFA aus dem Samenöl genetisch modifizierter Ölsaaten wie Raps und Lein zu gewinnen, könnte einen entscheidenden Beitrag zu der Erschließung alternativer Quellen leisten. Die biotechnologische Umsetzung dieser Idee bis hin zu dem agrarwirtschaftlichen Einsatz solcher Ölsaaten birgt jedoch noch einige Herausforderungen. Während bereits eine Vielzahl an Enzymen identifiziert wurden, die für die Biosynthese von VLCPUFA verantwortlich sind, ist das Wissen über die spezifische Akkumulation von VLCPUFA in Reservelipiden noch sehr begrenzt. Erste Ergebnisse zur transgenen VLCPUFA-Synthese in der Modellpflanze *A. thaliana* und in Nutzpflanzen liegen bereits vor und sie alle zeigen, dass die erwünschten Fettsäuren nur in geringem Maße akkumulieren (Abadi et al., 2004; Kinney, 2004; Qi et al., 2004; Wu et al., 2005; Hoffmann et al., 2008). Diese Beobachtungen der geringen Synthese und Einlagerung von VLCPUFA im Samenöl transgener Pflanzen führt zu der Annahme, dass über die reine Biosynthese dieser Fettsäuren durch Desaturasen und Elongasen hinaus noch weitere enzymatische Funktionen existieren müssen, die in nativen VLCPUFA-Produzenten aktiv die Akkumulation dieser Fettsäuren in Reservelipiden betreiben. Der Einsatz solcher enzymatischen Funktionen könnte den VLCPUFA-Ertrag in transgenen Ölsaaten steigern. Für mittelkettige Fettsäuren (MCFA) ist ähnliches bereits gezeigt worden. So führte die Coexpression einer Acyl-ACP-Thioesterase aus dem Kalifornischen Lorbeer *Umbellularia californica* und einer LPAAT aus der Kokospalme *Cocos nucifera* zu einer gesteigerten Akkumulation von Laurinsäure in transgenem Raps (Voelker, 1996; Knutzon et al., 1999).

Die Fettsäuremodifikation und die Biosynthese von TAG am ER umfassen ein umfangreiches Netzwerk verschiedener Reaktionen zu denen auch der Transfer von Fettsäuren zwischen den verschiedenen Lipiden am ER zählen (Abb. 4). Am Beispiel der Synthese und Akkumulation von Ricinolsäure in *Ricinus communis* werden diese Reaktionen sehr gut erkennbar. Das Samenöl dieser Pflanze kann einen Anteil von bis zu 90 % Ricinolsäure am Gesamtfettsäuregehalt aufweisen.

Obwohl diese Fettsäure durch eine membranständige Acyl-Lipid-Desaturase am ER synthetisiert wird, wird sie während der Samenreifung von der Inkorporation in Membranlipide nahezu ausgeschlossen. Stattdessen findet ein selektiver und hochaktiver Transfer in die Reservelipide statt (Bafor et al., 1991; van de Loo et al., 1995; Kroon et al., 2006). Daraus wird ersichtlich, dass VLCPUFA-akkumulierende Organismen wie Mikroalgen auch über ein entsprechendes Transfersystem verfügen könnten. Diese Acyltransferasen mit neuartigen Substratspezifitäten aus Mikroalgen könnten sich möglicherweise in ihren Substratspezifitäten insofern von denen höherer Pflanzen unterscheiden, als dass sie neben den gewöhnlichen C16- und C18-Fettsäuren auch oder sogar ausschließlich VLCPUFA als Substrate verwenden könnten. Als Teil eines VLCPUFA-Biosynthesewegs in transgenen Ölsaaten könnten die neuartigen Acyltransferasen eine unter Umständen effizientere Synthese und eine höhere Akkumulation von VLCPUFA im Samenöl bewirken. Zusätzlich wären Limitierungen im VLCPUFA-Ertrag aufgrund inkompatibler Substratspezifitäten der endogenen Acyltransferasen vermeidbar.

Die wachsende Verfügbarkeit der genomischen Sequenzinformationen VLCPUFA-produzierender Organismen erlaubte es im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Kandidatengene zu identifizieren, die in Mikroalgen an der Biosynthese und Akkumulation von VLCPUFA teilhaben könnten. Zunächst sollte die Funktion der Kandidatengene von LPAAT, LPCAT, DGAT und PDAT durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* dargestellt werden. Durch detaillierte Lipidanalytik der mit den neuartigen Acyltransferasen transformierten Hefen sollte festgestellt werden, ob diese VLCPUFA und VLCPUFA als Substrate bevorzugen.

Parallel zu der funktionalen Charakterisierung in *S. cerevisiae* sollte überprüft werden, ob die neuartigen Acyltransferasen aus Mikroalgen zu einer Steigerung der Synthese und zu einer höheren Akkumulation von VLCPUFA im Samenöl von Ölpflanzen beitragen können.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung von LPCAT

Die Enzymfamilie der LPCAT katalysiert den Austausch von Fettsäuren zwischen dem zytosolischen Acyl-CoA-Pool und Glycerophospholipiden (Kim und Huang, 2004; Riekhof et al., 2007a; Matsuda et al., 2008). Von einzelnen Vertretern dieser Enzymfamilie ist bekannt, dass sie zum Teil essenzielle stoffwechselphysiologische Funktionen erfüllen (Kim und Huang, 2004; Kim et al., 2005; Lee et al., 2008). Als Teil des sogenannten Lands-Zyklus nehmen sie vermutlich aktiv an der Modellierung der Fettsäurezusammensetzung von Membranlipiden teil, indem sie den Acyl-CoA-Pool und den PtdCho-Pool so miteinander verknüpfen, dass ein ständiger Fettsäureaustausch zwischen beiden Pools gewährleistet ist. Ihre stoffwechselphysiologische Funktion wird dabei meist in einem engen Zusammenspiel mit Phospholipasen gesehen. Im Lands-Zyklus sind es Phospholipasen, die aus den Membranlipiden Fettsäuren über eine von CoA unabhängige Hydrolyse freisetzen, die durch Acyl-CoA-Synthetasen auf CoA übertragen werden und so dem Acyl-CoA-Pool zugeführt werden. In diesem Modell katalysieren LPCAT hauptsächlich die Reacylierung der Membranlipide, d.h., sie entnehmen Fettsäuren aus dem CoA-Pool und transferieren sie auf die Membranlipide (Lands, 1960). Es wird in diesem Zusammenhang aber auch angenommen, dass LPCAT den Fettsäureaustausch in beide Richtungen zu katalysieren vermögen, d.h., sie könnten in einer Hinreaktion den Transfer einer Fettsäure von Acyl-CoA auf Lyso-PtdCho katalysieren und in einer Rückreaktion den Transfer einer Fettsäure aus der *sn*-2-Position von PtdCho auf freies CoA (Stymne und Stobart, 1984). Die Arbeiten von Abbadi et al. (2004) zeigten, dass im Zuge der lipidabhängigen VLCPUFA-Synthese in Ölsaaten vermutlich der unzureichend ablaufende Fettsäureaustausch zwischen beiden Pools limitierend auf die VLCPUFA-Biosyntheserate in transgenem Lein und Tabak wirkte. Die endogene LPCAT schien keine Substratspezifität für die C18- und C20-PUFAs aufzuweisen, wodurch der Fettsäureaustausch nur unzureichend ablief. Für die vorliegende Arbeit waren daher LPCAT aus marinen VLCPUFA produzierenden Mikroalgen von besonderem Interesse, da diese über die geeigneten Substratspezifitäten verfügen könnten, mit denen die Biosyntheserate der lipidabhängigen VLCPUFA-Synthese in transgenen Ölsaaten gesteigert werden könnte. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Sequenzinformationen zu Genen aus eukaryoten Organismen verfügbar, die für die Identifizierung von LPCAT-Kandidatengenen hätten genutzt werden können. Lediglich die Arbeiten zu zwei LPAAT-homologen Genen aus dem Fadenwurm *C. elegans* und der Alge *M. squamata* dienten als erste Anhaltspunkte (Cirpus, 2006).

Erst die Identifizierung und hinreichende biochemische Charakterisierung der LPCAT Ale1p aus *S. cerevisiae* eröffnete neue Möglichkeiten für die Identifizierung von LPCAT aus pflanzlichen Organismen (Benghezal et al., 2007; Chen et al., 2007; Jain et al., 2007; Riekhof et al., 2007a; Riekhof et al., 2007b; Tamaki et al., 2007).

4.1.1 Funktionale Charakterisierung von LPAAT-Homologen aus Moosen und Algen

In den öffentlich verfügbaren Genomen der VLCPUFA-produzierenden Organismen *P. patens*, *O. tauri* und *O. lucimarinus* konnten sowohl zu CeLPAAT homologe Gene als auch zu Ale1p homologe Gene identifiziert werden. Die phylogenetische Analyse belegte, dass die jeweiligen Vertreter keinen gemeinsamen evolutiven Ursprung haben (Abb. 8). Somit stehen sich in Eukaryoten vermutlich zwei nicht miteinander verwandte Enzymfamilien gegenüber, deren gemeinsame Substrate Glycerophospholipide und CoA-gebundene Fettsäuren darstellen. Die mittels Datenbanksuche identifizierten MsLPAAT, PpLPAAT, OtLPAAT und OilLPAAT zeigen auf Ebene der Aminosäuresequenz die höchste Homologie zu der plastidären AtLPAAT1 und sie unterscheiden sich damit deutlich von den anderen pflanzlichen und tierischen Vertretern dieser Enzymfamilie (Abb. 8). Allein von den tierischen LPAAT/LPCAT-Homologen in Abb. 8 ist bisher LPCAT-Aktivität gezeigt worden. Anhand von Komplementationsstudien sollte die vermutete Funktion von MsLPAAT und PpLPAAT in Hefe dargestellt werden. In *S. cerevisiae* existiert ein zu diesen pflanzlichen LPAAT homologes Protein (Slc1p; Nagiec et al., 1993). Die *SLC1*-Mutante wurde daher als Expressionswirt für die heterologe Expression von MsLPAAT und PpLPAAT gewählt. Die gesuchte Enzymaktivität sollte das Zusammenspiel von Acyl-Lipid-Desaturasen und CoA-abhängigen Elongasen verbessern, indem der PtdCho-Pool mit dem bevorzugten Fettsäuresubstrat der Elongase abgereichert und der CoA-Pool gleichzeitig damit angereichert wird. Dieser Anreicherung könnte eine verbesserte Elongationseffizienz und somit eine erhöhte Produktbildung folgen. Die dafür gewählte Enzymkombination Pt Δ 6 und PSE1 wurde auch von Abbadi et al., (2004) als Teil des Biosyntheseweges von 20:4 n -6 und 20:5 n -3 in transgenem Lein und Tabak gewählt. Dort akkumulierten bereits die Produkte der Δ 6-Desaturase Pt Δ 6 im Samenöl, und nur ein geringer Anteil der Produkte wurde der Δ 6-Elongase im CoA-Pool als Substrat zugeführt. Die heterologe Expression von Pt Δ 6 und PSE1 in Gegenwart von 18:2 n -6 hatte in der *slc1* Δ -Mutante einen nur mäßig stark ausgeprägten biochemischen Phänotyp zur Folge, der sich in einer reduzierten Elongationseffizienz zeigte (Abb. 10 und Abb. 11).

Die Reduktion lag bei 10 % bis 12 %. Die heterologen Expressionen von MsLPAAT und PpLPAAT führte nicht zu einer Komplementation dieses schwach ausgeprägten Phänotyps. Das Ergebnis war besonders für MsLPAAT unerwartet. Schließlich hatten Cirpus et al. (2006) MsLPAAT in einem vergleichbaren Versuchsansatz funktional als LPCAT identifiziert. Im Unterschied zu den hier durchgeführten Untersuchungen wurde dort der *S. cerevisiae*-Stamm INVSc1 und die $\Delta 6$ -Desaturase Pp $\Delta 6$ aus *P. patens* verwendet. Es bleibt unklar, inwiefern die Verwendung eines Wildtyp-Hefestamms oder die Verwendung einer unterschiedlichen $\Delta 6$ -Desaturase die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich MsLPAAT begründen könnten. Durch die heterologe Expression in Hefe ergaben sich für die beiden Kandidatengene MsLPAAT und PpLPAAT keine Hinweise für einen positiven Einfluss auf die VLCPUFA-Akkumulation. Die hohen Sequenzhomologien der beiden Kandidatengene zu der plastidären AtLPAAT1 lassen vermuten, dass beide Gene nicht für Proteine codieren, die geeignet sind den Fettsäureaustausch zwischen Acyl-CoA und PtdCho zu erleichtern. Das Vorhandensein der N-terminalen Signalsequenz in PpLPAAT für die Lokalisation in Chloroplasten oder Mitochondrien unterstützt diese Vermutung. Ähnliches gilt auch für MsLPAAT. Das Fehlen eines ER-Retentionssignals am C-Terminus des Proteins deutet ebenfalls darauf hin, dass MsLPAAT nicht an den Prozessen des Lipid-Stoffwechsel am ER beteiligt ist. Zugunsten der weiteren Problemstellungen dieser Dissertation wurden die Bestätigungen der genannten Vermutungen und die Darstellung der tatsächlichen Funktionen nicht weiter verfolgt.

4.1.2 OILPCAT optimiert das Zusammenspiel lipid- und CoA-abhängiger Enzyme

Während in den Genomen der Mikroalgen *O. tauri* und *O. lucimarinus* jeweils eine LPCAT-Sequenz identifiziert wurde, können in anderen pflanzlichen Genomen auch mehrere LPCAT-Isoformen auftreten, wie für *P. patens* und *A. thaliana* gezeigt (Abb. 8). Die identifizierten pflanzlichen LPCAT können der Superfamilie der membrangebundenen-O-Acyltransferasen (MBOAT) zugeordnet werden. MBOAT weisen zwei charakteristische hochkonservierte Aminosäurereste auf, die in den hier beschriebenen Vertretern ebenfalls zu finden sind (Abb. 12). Kennzeichnend für diese Enzymfamilie ist außerdem das Auftreten von mehreren transmembranen Helices, wie eine Hydropathieanalyse der OILPCAT verdeutlicht (Abb. 13). Charakteristische C-terminale Konsensussequenzen deuten darüber hinaus auf eine mögliche Lokalisation der Enzyme in der Membran des ER hin (Abb. 12; Shin et al., 1991; Teasdale & Jackson, 1996).

Wie bereits im vorangehenden Abschnitt dargestellt, wurden für die funktionale Charakterisierung transgene Hefen erzeugt, die Gene der VLCPUFA-Synthese exprimieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich der Stoffwechseldefekt der *ale1Δ*-Mutante auf das enzymatische Zusammenspiel der Desaturase PtΔ6 und der Elongase PSE1 auswirkt. PtΔ6 und PSE1 haben insofern aufeinander abgestimmte Fettsäure-Substratspezifitäten, als die Δ6-Desaturase das bevorzugte Fettsäuresubstrat der Δ6-Elongase produziert. Sowohl in Gegenwart von 18:2 n -6 als auch von 18:3 n -3 wurde eine signifikante Reduktion der Elongationseffizienz von PSE1 in der *ale1Δ*-Mutante festgestellt, was indirekt die ungenügende Verfügbarkeit der Substrate 18:3 n -6 bzw. 18:4 n -3 widerspiegelt (Abb. 15 B und Abb. 16 B). Die Elongationseffizienz war im Vergleich zum Wildtyp um durchschnittlich 50 % reduziert. Nach Expression von OILPCAT wurde der *ale1Δ*-Phänotyp partiell komplementiert. Die Elongationseffizienz stieg im Vergleich zu der *ale1Δ*-Mutante an, erreichte jedoch nicht die Effizienz des Wildtyps bzw. die Effizienz der Mutante nach Expression von *ALE1* (Abb. 15 C und Abb. 16 C). Dennoch zeigte die partielle Komplementation des *ale1Δ*-Phänotyps die mögliche enzymatische Aktivität von OILPCAT auf. Die homologe Komplementation des Phänotyps durch Ale1p führte zu einem deutlichen Anstieg der Elongationseffizienz, die sogar die Werte des Wildtyps deutlich übertrafen (Abb. 15 D und Abb. 16 D). Obwohl das hefeeigene Fettsäureprofil keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufweist, ist bekannt das Ale1p *in vitro* ein breites Fettsäure-Substratspektrum aufweist, das sogar die Fettsäure 20:4 n -6 umfasst (Jain et al., 2007). Die hier gezeigten Daten bestätigen das weit gefasste Substratspektrum von Ale1p zum ersten Mal durch ein *in vivo*-Verfahren. Bisherige Arbeiten nutzten für die Darstellung der Ale1p-Aktivität meist *in vitro*-Techniken (Benghezal et al., 2007; Chen et al., 2007; Tamaki et al., 2007; Stahl et al., 2008). Der Fokus lag dabei meist auf der Hinreaktion, also der Acylierung von Lyso-Phospholipiden. So zeigte sich in den *in vitro*-Studien, dass Ale1p besonders effektiv Lyso-PtdCho acyliert. Möglicherweise werden auch andere Lyso-Phospholipide von Ale1p als Substrate akzeptiert, doch finden sich dazu in der Literatur unterschiedliche Angaben. Für die bislang einzigen bekannten pflanzlichen LPCAT AtLPCAT1 und AtLPCAT2 aus *A. thaliana* wurde gezeigt, dass sie im Vergleich zu Ale1p verschiedene Lyso-Phospholipide nur sehr eingeschränkt als Substrate nutzen (Stahl et al., 2008). Der in dieser Arbeit gewählte *in vivo*-Ansatz betont jedoch die Reversibilität der LPCAT-Reaktion. Das optimierte Zusammenspiel von PtΔ6 und PSE1 nach Expression von OILPCAT bzw. Ale1p deutet zumindest eine mögliche biologische Relevanz der Rückreaktion an.

Diese Vermutung wird auch durch die zeitabhängigen Änderungen der Fettsäurezusammensetzung des CoA-Pools und der gebundenen Lipide bestätigt. Bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach Applikation der Fettsäuren zeigte die *ale1Δ*-Mutante eine verminderte Umsetzung der Desaturaseprodukte 18:3 n -6 und 18:4 n -3 zu den korrespondierenden C20-Fettsäuren (Abb. 17 und Abb. 19) im Vergleich zum Wildtyp und zu der nach OILPCAT- und Ale1p-Expression komplementierten *ale1Δ*-Mutante. Dieser Zustand änderte sich über den gesamten betrachteten Zeitraum von 20 h nicht. Daraus folgt, dass in der *ale1Δ*-Mutante in Gegenwart einer LPCAT die Reaktionsfolge Aktivierung der aufgenommenen Fettsäure, Inkorporation in Glycerophospholipide, Desaturierung durch PtΔ6, Transfer in den Acyl-CoA-Pool, Elongation durch PSE1 und Inkorporation der elongierten Fettsäuren in Lipide insgesamt beschleunigt abläuft. Die Expression von OILPCAT scheint diese Reaktionsfolge ebenfalls zu beschleunigen, erreichte der Gehalt der Elongationsprodukte 5 h nach Fettsäurezugabe doch etwa das Niveau des Wildtyps (Abb. 17 bis Abb. 20). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die Fettsäure-Substratspezifität der LCPAT. OILPCAT schien weder n -6- noch n -3-Fettsäuren zu bevorzugen. Inwiefern gesättigte oder einfach ungesättigte sowie Fettsäuren anderer Kettenlänge als C18 von OILPCAT als Substrate akzeptiert werden, könnte durch *in vitro*-Studien in weiterführenden Arbeiten dargestellt werden. Eine Besonderheit, die möglicherweise auf eine Interaktion der OILPCAT mit einfach gesättigten Fettsäuren hindeutet, wird besonders in den Analysen des Acyl-CoA-Pools deutlich. Vor der Fettsäurezugabe war der Acyl-CoA-Pool der OILPCAT exprimierenden Kulturen mit 18:1-Fettsäuren derart angereichert, dass diese Spezies die dominierende Fettsäure des Acyl-CoA-Pools darstellte (Abb. 18 und Abb. 20). Ob es sich dabei um 18:1 n -9 oder 18:1 n -7 handelte kann nicht eindeutig belegt werden. Vermutlich handelte es sich um 18:1 n -7, da die Fettsäureprofile der Lipide einen erhöhten 18:1 n -7-Anteil im Vergleich zu den anderen Expressionskulturen zeigten (Abb. 15 und Abb. 16). 18:1 n -7 hat als hefeeigene Fettsäure nur einen äußerst geringen Anteil am Gesamtfettsäuregehalt in *S. cerevisiae*. Die Erhöhung ist vermutlich auf die Elongation von 16:1 n -7 durch PSE1 zurückzuführen. Ob OILPCAT eine Spezifität für 16:1 n -7 besitzt und daher den Acyl-CoA-Pool aktiv mit diesem Substrat der PSE1 anreichert kann jedoch nicht eindeutig gesagt werden. Für Ale1p konnte ein solcher Effekt, der sich auf die Fettsäure 16:1 n -7 bezieht, nicht beobachtet werden. Vielmehr ist Ale1p aufgrund der hier dargestellten enzymatischen Eigenschaften auch als geeigneter Kandidat für VLCPUFA-Biosynthesewege in Ölsaaten in Erwägung zu ziehen. Für die LPAAT Slc1p aus *S. cerevisiae* konnte bereits die erfolgreiche Verwendung in transgenen *B. napus*-Pflanzen gezeigt werden.

Dort führte das Hefeenzym im Zusammenspiel mit AtFAE1 (*A. thaliana fatty acid elongase 1*) zu einer deutlichen Steigerung des Erucasäure-Gehalts bis zu 12 % im Samen sowie zu einer Steigerung des Ölgehalts im Samen um 11 % (Katavic et al., 2000, 2001). Die hier dargestellten Ergebnisse zur biochemischen Charakterisierung der ersten funktional identifizierten LPCAT aus VLCPUFA-produzierenden Mikroalgen geben einen Einblick in die enzymatische Aktivität dieses Enzyms, die in weiteren Analysen vertieft werden sollten. Obwohl erst nach umfassender biochemischer Charakterisierung eine Bewertung von OILPCAT hinsichtlich der Verwendung als Teil eines VLCPUFA-Syntheseweges in Ölsaaten erfolgen sollte, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die LPCAT der MBOAT-Superfamilie aktiv an der Modellierung der Fettsäurezusammensetzung von PtdCho teilhaben. In weiterführenden Experimenten sollte jedoch zunächst die Substratspezifität der OILPCAT und die bevorzugte Reaktionsrichtung, d.h., Transfer von Fettsäuren aus dem CoA-Pool heraus auf Lyso-Phospholipide oder Transfer von PtdCho gebundenen Fettsäuren auf CoA, untersucht werden. Da die bislang einzigen bekannten pflanzlichen LPCAT AtLPCAT1 und AtLPCAT2 in *in vitro*-Studien auch andere Lyso-Phospholipide außer Lyso-PtdCho als Substrate akzeptierten, sollte dieses Reaktionsverhalten auch für OILPCAT berücksichtigt und untersucht sowie in die Bewertung mit einbezogen werden. Insgesamt gilt, dass OILPCAT und Ale1p vermutlich über geeignete Enzymaktivitäten verfügen, mit deren Hilfe die VLCPUFA-Biosynthese in transgenen Ölsaaten entlang des lipidabhängigen Weges gesteigert werden könnte.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung von DGAT2

In eukaryoten Organismen wurden bisher zwei membranständige DGAT-Familien (DGAT1 und 2) und eine einzelne lösliche DGAT3 aus *A. hypogea* beschrieben. Bislang ist noch nicht umfassend geklärt, welchen Anteil die verschiedenen Familien an der Akkumulation ungewöhnlicher oder sehr langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren haben. Jedoch zeigten heterologe Expressionsstudien in *S. cerevisiae* und *A. thaliana* bereits, dass vermutlich DGAT2 und nicht DGAT1 überwiegend an der Akkumulation von ungewöhnlichen Fettsäuren in den Reservelipiden beteiligt sind (Shockey et al., 2006; Burgal et al., 2008). Daher könnten homologe DGAT2-Enzyme aus Mikroalgen möglicherweise die Anreicherung von VLCPUFA in TAG bewirken.

4.2.1 OtDGAT2B besitzt ein breites Substratspektrum

Im Genom von *O. tauri* wurden drei Kandidatengene für DGAT2 identifiziert (Tab. 20). Durch die Komplementationsstudien in *S. cerevisiae* konnten die OtDGAT2A und OtDGAT2C funktional nicht als DGAT des Typs 2 identifiziert werden, obwohl die Gene erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert werden konnten (Abb. 24). Die fehlende Aktivität der OtDGAT2A kann nicht zufriedenstellend begründet werden. Die Aminosäuresequenz von OtDGAT2A weist zwar nur 18 % Identität zu der hier funktional identifizierten OtDGAT2B und 24 % Identität zu RcdGAT2 auf (Tab. 21), verfügt aber über die typischen konservierten Aminosäure-Motive der DGAT2-Familie (Abb. 22), so dass eine Funktion als DGAT2 stark vermutet werden kann. Andererseits widerspricht die separierte Stellung der OtDGAT2A im Phylogramm (Abb. 21) einer eindeutigen Klassifizierung als DGAT2. Eine Zuordnung zu DGAT1 bzw. DGAT3 ist ebenfalls ausgeschlossen, so dass abschließend keine begründete Vermutung zur Enzymfunktion gegeben werden kann. Die fehlende Aktivität von OtDGAT2C kann wiederum unterschiedlich interpretiert werden. OtDGAT2C weist eine relativ nahe Verwandtschaft zu den tierischen MGAT auf. Es ist daher nicht auszuschließen, dass OtDGAT2C für ein Protein mit MGAT-Aktivität codieren könnte. In Pflanzen ist die MGAT-Aktivität bislang nur für ein Protein aus den Kotyledonen der Erdnuss *A. hypogea* beschrieben worden (Tumaney et al., 2001). Obwohl das Protein der MGAT aus *A. hypogea* bereits aufgereinigt werden konnte, sind die Aminosäuresequenz und auch die cDNA-Sequenz bislang unbekannt. Daher können nur vage Aussagen über die evolutive Verwandtschaft von pflanzlichen und tierischen MGAT getroffen werden. Während es sich bei der MGAT aus *A. hypogea* um ein lösliches Protein handelt, sind die bislang bekannten tierischen MGAT vermutlich membranständige Proteine (Cao et al., 2003a; Cao et al., 2003b; Yen und Farese, 2003). Über die stoffwechselphysiologische Bedeutung der MGAT aus *A. hypogea* liegen keine Informationen vor. Dass *S. cerevisiae* für die heterologe Expression von DGAT2 prinzipiell geeignet ist, zeigten u.a. die Arbeiten von He et al., (2004), Kroon et al. (2006), Shockey et al. (2006) und Bural et al. (2008), so dass die fehlende Aktivität mit der Wahl des Expressionswirtes nicht hinreichend begründet werden könnte. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass das heterologe System der Hefe nicht die nötige Reaktionsumgebung für die Aktivität der OtDGAT2A und OtDGAT2C bietet. Die Arbeiten von Shockey et al. (2006) zeigten, dass VfdGAT1 und VfdGAT2 in unterschiedlichen Subdomänen des ER lokalisiert an verschiedenen stoffwechselphysiologischen Prozessen teilnehmen.

Möglicherweise unterscheiden sich Hefe und Alge bezüglich der Subkompartimentierung von OtDGAT2A und OtDGAT2C, so dass beide Enzyme im heterologen Expressionssystem der Hefe nicht ihre Aktivität entfalten können und von der TAG-Synthese ausgeschlossen sind (Graham et al., 2007). Erwähnt werden sollte in diesem Zusammenhang, dass in dem Genom der zu *O. tauri* nah verwandten Alge *O. lucimarinus* zwei Gene identifiziert werden, die auf Ebene der Aminosäuresequenzen sehr hohe Identitäten von 76 % bzw. 62 % zu OtDGAT2A und OtDGAT2C aufweisen (Tab. 21 und Tab. 22). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die heterologe Expression von OtDGAT2B den *lro1Δ dga1Δ*-Mutanten-Phänotyp komplementieren konnte, wurde die Darstellung der möglichen Funktionen von OtDGAT2A und OtDGAT2C nicht weiter verfolgt.

Die Aminosäuresequenz von OtDGAT2B ist zu etwa 31 % identisch mit anderen pflanzlichen DGAT2 (Tab. 21). Im Gegensatz zu anderen DGAT2 scheint OtDGAT2B nur über eine transmembrane N-terminale Helix zu und kein C-terminales ER-Retentionssignal zu verfügen (Abb. 22 und Abb.23 B; McCartney et al., 2004; Shockey et al., 2006). Darüber hinaus besteht in der Aminosäuresequenz ein Unterschied in einem für die katalytische Aktivität hochkonservierten Bereich (Stone et al., 2006). Während bisher charakterisierte DGAT2 entweder das Motiv HPHG oder das Motiv EPHSV aufweisen, besitzt OtDGAT2B das Motiv EPHG (Abb. 22). Weitergehende Untersuchungen könnten die mögliche Relevanz der Unterschiede erklären. OtDGAT2B ist in der Lage den *lro1Δ dga1Δ*-Mutanten-Phänotyp *in vivo* und *in vitro* zu komplementieren (Abb. 25 und Abb. 29). Somit zeigte sich, dass es sich bei OtDGAT2B um eine DGAT des Typs 2 handelte. Der Nachweis von Lipidkörpern in dem Hefestamm H1246 nach Expression von OtDGAT2B könnte daraufhin deuten, dass das Enzym trotz des fehlenden typischen ER-Retentionssignals am ER lokalisiert ist (Abb. 28), da Lipidkörper zunächst am ER gebildet werden und sich dann vom ER abschnüren (Huang, 1996). Da in der Glycerophospholipid-Membran der Lipidkörper aus *S. cerevisiae* überwiegend Proteine der Lipid-Biosynthese lokalisiert sind, u.a. auch Dga1p, könnte OtDGAT2B vermutlich auch an Lipidkörpern lokalisiert sein (Athenstaedt et al., 1999; Sorger und Daum, 2002).

Die Untersuchungen zu den möglichen Substraten der OtDGAT2B ergaben, dass das Enzym keine enge Substratspezifität besitzt. Vielmehr scheint das Enzym gesättigte und ungesättigte Fettsäuren gleichermaßen gut als Substrate zu akzeptieren und nicht zwischen PUFA und VLCPUFA der *n*-6- und *n*-3-Serie zu unterscheiden (Abb. 30).

Die auffälligsten Unterschiede in der TAG-Zusammensetzung zwischen Dgalp und OtDGAT2B waren der etwa 8-fach höhere Anteil der 54:3-Spezies und der etwa 4-fach höhere Anteil der Spezies 52:3 und die exklusive Bildung der Spezies 54:12, die an allen drei *sn*-Positionen des TAG-Moleküls die Fettsäure 18:4 n -3 aufweist (Abb. 31 und Abb. 32). Im Allgemeinen war der Anteil an TAG-Spezies mit sieben, acht, neun und zehn Doppelbindungen in den Lipidextrakten der OtDGAT2B exprimierenden Zellen um etwa das 1,5-fache erhöht (Abb. 32). In diesem Zusammenhang ist es überraschend, dass OtDGAT2B nicht zur spezifischen Akkumulation von VLCPUFA beitragen konnte. Hier gilt es allerdings, die Analysen der TAG-Spezies nach Expressionen in Gegenwart äquimolarer Mengen mehrfach ungesättigter C20-Fettsäuren abzuwarten. Die Versuche hierzu sind weitestgehend abgeschlossen, und nach Auswertung der Messdaten könnte das Bild vervollständigt werden. Schließlich wurden in anderen pflanzlichen Organismen, wie dem Tungöl-Baum *V. fordii*, bereits DGAT2 identifiziert, die das höchste Expressionsniveau während der Akkumulation von TAG im reifenden Samen erreichen und zur spezifischen Akkumulation von ungewöhnlichen Fettsäuren im Samenöl beitragen (Shockey et al., 2006; Burgal et al., 2008). Falls nicht OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C, deren Funktionen in Hefe nicht dargestellt werden konnten, entscheidend zur Akkumulation von VLCPUFA beitragen, könnte die Acyl-CoA-abhängige TAG-Synthese während der VLCPUFA-Akkumulation in der Alge nicht den Hauptweg darstellen. Zudem konnten auch keine DGAT1- oder DGAT3-Homologe im Genom von *O. tauri* identifiziert werden, die anstelle der DGAT2 die VLCPUFA-Akkumulation katalysieren könnten. Gegen diese Hypothese könnte jedoch das Vorhandensein von Acyl-CoA-abhängigen Desaturasen in *O. tauri* und der nah verwandten Mikroalge *M. squamata* sprechen (Domergue et al., 2005; Hoffmann et al., 2008). Zusammen mit den Acyl-CoA-abhängigen Elongasen findet sehr wahrscheinlich in diesen Algen die VLCPUFA-Synthese im Acyl-CoA-Pool statt. Der Ausschluss von VLCPUFA-spezifischen DGAT2-Enzymen würde beispielsweise bedeuten, dass die im Acyl-CoA-Pool synthetisierten Fettsäuren zunächst über LPCAT-vermittelten Transfer auf PtdCho übertragen werden, und sie anschließend durch die Aktivität einer PDAT in den Triacylglycerinen akkumulieren. Obwohl dieser Weg unter Beteiligung von Glycerophospholipiden eine stoffwechselphysiologisch aufwendigere Alternative darstellt, ist zu beachten, dass in *M. squamata* neben TAG auch die Glycerophospholipide hohe Gehalte an VLCPUFA aufweisen (Hoffmann et al., 2008).

Zusammenfassend gilt, dass von den drei identifizierten DGAT2-Kandidatengen OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C aus *O. tauri* nur OtDGAT2B im heterologen Expressionssystem der Hefe funktional charakterisiert werden konnte. Zumindest in Hefe zeigte OtDGAT2B keine Präferenz gegenüber VLCPUFA als Substrate für die Acylierung von DAG. Obwohl bislang keine Daten über die enzymatischen Eigenschaften von OtDGAT2B in transgenen Pflanzen vorliegen, ist anzunehmen, dass OtDGAT2B als Teil eines VLCPUFA-Biosyntheseweges in transgenen Ölsaaten vermutlich keine gesteigerte VLCPUFA-Akkumulation im Samenöl bewirken wird.

4.3 Identifizierung und Charakterisierung von PDAT

Neben dem Acyl-CoA-abhängigen Weg der TAG-Synthese existiert ein Acyl-CoA-unabhängiger Weg an dem PtdCho und DAG als Reaktionspartner beteiligt sind. Katalysiert wird diese TAG-Synthese durch die membranständige PDAT (Dahlqvist et al., 2000; Oelkers et al., 2000). Welchen Anteil diese Aktivität an der Ölakkumulation während der Samenreife hat, ist bislang nicht geklärt. In *S. cerevisiae* konnte demonstriert werden, dass beide Wege in Abhängigkeit des Wachstumsstadiums mehr oder weniger stark an der TAG-Synthese beteiligt sind (Oelkers et al., 2002). Speziell während der exponentiellen Wachstumsphase ist eine effiziente Modellierung der Fettsäurezusammensetzung von Membranlipiden von besonderer Bedeutung, was die höhere Aktivität der PDAT Lro1p während dieser Wachstumsphase erklären könnte. Ob eine solche entwicklungspezifische Spezialisierung der einzelnen Synthesewege auch in Pflanzen vorliegt, die möglicherweise von dem Entwicklungsstadium des reifenden Samens reguliert werden könnte, ist bisher unbekannt. Zumindest in *R. communis* scheinen RcDGAT2 und RcPDAT1a gemeinsam an der Ricinolsäure-Akkumulation aktiv beteiligt zu sein (Browse et al., 2006; Bursal et al., 2008). Dies deutet zudem auf eine Substratspezifität von RcPDAT1a hin, die sie von PDAT aus Organismen ohne hohe Anteile ungewöhnlicher Fettsäuren im Samenöl unterscheidbar werden lässt. Daher sind PDAT aus VLCPUFA produzierenden Organismen ebenso wie DGAT2 von besonderem Interesse und könnten eventuell aufgrund ihrer Substratspezifitäten durch ihre gemeinsame Verwendung in transgenen VLCPUFA-Produzenten einen additiven Effekt auf die VLCPUFA-Akkumulationsrate im Samenöl haben.

4.3.1 OtPDAT ist eine PUFA-spezifische PDAT aus *O. tauri*

In den Genomen von *O. tauri*, *O. lucimarinus* und *P. patens* wurde jeweils eine PDAT-Sequenz identifiziert (Tab. 23). Zu anderen pflanzlichen PDAT bestehen Aminosäuresequenz-Identitäten von etwa 27 %. Die hochkonservierten Bereiche I, IV und X in der Aminosäuresequenz sowie die typischen Aminosäurereste der katalytischen Triade kennzeichnen OtPDAT als einen Vertreter der LCAT-Superfamilie (Abb. 34 und Abb. 35). Eine Besonderheit weisen die Aminosäuresequenzen von OtPDAT und OIPDAT auf. Innerhalb des hochkonservierten Bereichs V befindet sich eine Position stromabwärts des für die katalytische Aktivität essenziellen Serinrestes (S297) bei LCAT-Enzymen typischerweise ein Methionin- oder Leucinrest. OtPDAT und OIPDAT besitzen in dieser äußerst hochkonservierten Aminosäureposition ein Tyrosin (Abb. 34 B). Inwiefern sich dieser Aminosäureaustausch auf die enzymatischen Eigenschaften von OtPDAT und OIPDAT auswirken, könnte durch gerichtete Mutagenesestudien in weiterführenden Arbeiten dargestellt werden. Abweichungen zu der charakteristischen Sekundärstruktur von LCAT-Enzymen liegen bei den beiden Enzymen aus *O. tauri* und *O. lucimarinus* vermutlich nicht vor. Hier zeigten die Hydropathieanalysen für OtPDAT und OIPDAT jeweils eine N-terminale transmembrane Helix, die vermutlich der Verankerung in der Membran dient. Jedoch zeigen die beiden PDAT in Analogie zu Lro1p keine C-terminalen ER-Retentionssignale, wie sie u.a. in pflanzlichen PDAT vorhanden sind (Abb. 34 A; Shin et al., 1991; Teasdale & Jackson, 1996; McCartney et al., 2004). Anhand der erfolgreichen Komplementation des *lro1Δ dgal1Δ*-Phänotyps wurde OtPDAT funktional als PDAT identifiziert (Abb. 38). OtPDAT ist, wie auch OtDGAT2B, an der Bildung von Lipidkörpern im Hefestamm H1246 beteiligt (Abb. 39). Bei beiden Komplementationsstudien wurde festgestellt, dass es sich bei OtPDAT um eine PUFA-spezifische PDAT handelt, die keine gesättigten und einfach ungesättigten C16- und C18-Fettsäuren als Substrate nutzt (Abb. 37 bis Abb. 39). Da das Fettsäureprofil und insbesondere das TAG-Fettsäureprofil von *O. tauri* keine signifikante Akkumulation von gesättigten und einfach ungesättigten C20-Fettsäuren zeigt (M. Heilmann, Dissertation), könnten diese Fettsäuren im Ursprungsorganismus möglicherweise ebenfalls keine präferierten Substrate der OtPDAT darstellen. Dagegen dominieren mehrfach ungesättigte C18- und C20-Fettsäuren das typische Fettsäureprofil der Alge *O. tauri*.

OtPDAT weist ein zu diesem Profil passendes Fettsäure-Substratspektrum auf, indem das Enzym die hier überprüften Fettsäuren 18:2n-6, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:3n-6, 20:3n-3, 20:4n-6 und 20:5n-3 als Substrate für den Transfer von PtdCho auf DAG nutzt. Zu den im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüften Substraten zählt auch die Fettsäure 22:6n-3, die einen Hauptbestandteil der VLCPUFA in *O. tauri* darstellt. Im Allgemeinen werden Fettsäuren mit Kettenlängen ab 20 Kohlenstoffatomen von Hefezellen nur äußerst ungenügend aus dem Nährmedium aufgenommen, aktiviert und dem Lipidstoffwechsel zugeführt. U.a. auch aus diesem Grund sollte ein Testverfahren etabliert werden, um die biochemische Charakterisierung *in vitro* mit entsprechenden, radioaktiv markierten DAG- und PtdCho-Spezies als Substrate durchführen zu können. Unter den hier gewählten *in vitro*-Versuchsbedingungen war jedoch keine TAG-Synthese in Membranextrakten der *lro1Δ dga1Δ*-Mutante nach Expression von OtPDAT feststellbar (Abb. 41). Da jedoch die homologe Komplementation des *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyps durch Lro1p erfolgreich in dem *in vitro*-Verfahren dargestellt werden konnte, sind die gewählten Versuchsbedingungen zur Darstellung der PDAT-Aktivität prinzipiell geeignet. Darüber hinaus konnte das Enzym in den Membranextrakten angereichert werden (Abb. 40), und es konnte *in vivo* auch mit dem C-terminalen V5-Epitop den *lro1Δ dga1Δ*-Phänotyp erfolgreich komplementieren. Um die Substratspezifität der OtPDAT bewerten zu können, wurden die TAG-Fettsäureprofile nach Expression von *LRO1* bzw. OtPDAT in Gegenwart verschiedener, einzeln applizierter PUFA miteinander verglichen. Dabei konnte keine ausgeprägte Substratspezifität für eine definierte Fettsäure im Vergleich zu Lro1p festgestellt werden. OtPDAT scheint C18- und C20-Fettsäuren mit vergleichbarer Präferenz als Substrate zu akzeptieren (Abb. 42). Weitere Expressionsstudien von OtPDAT in Gegenwart äquimolarer Mengen verschiedener Fettsäuren sollten mögliche Unterschiede in den molekularen Spezies des gebildeten TAG belegen, und auf eine mögliche Fettsäure-Substratelektivität hinweisen. Wie erwartet, wurden vollständig gesättigte TAG-Spezies, abgesehen von 52:0 und 54:0, und Spezies mit einfach ungesättigten Fettsäuren in den Lipidextrakten von OtPDAT Dies bestätigte die Beobachtungen der vorangehenden Experimente, dass OtPDAT die gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren diskriminiert. Es wurde jedoch keine Häufung von TAG-Spezies festgestellt, die eine Substratelektivität der OtPDAT für eine definierte C18-Fettsäure widerspiegeln könnte (Abb. 43 und Abb. 45). Ein entsprechender Versuchsansatz mit mehrfach ungesättigten C20-Fettsäuren wurde bereits durchgeführt, jedoch lagen die Messdaten bis zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit nicht vollständig vor.

Zusammenfassend gilt, dass es sich bei OtPDAT aus *O. tauri* vermutlich um die erste funktional identifizierte PUFA-spezifische PDAT aus einem pflanzlichen Organismus handelt, die gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren als Substrate diskriminiert. Für die abschließende Bewertung von OtPDAT hinsichtlich der Verwendung dieses Enzyms als Teil der VLCPUFA-Synthese in transgenen Ölsaaten sollten zunächst die Ergebnisse von Expressionsstudien in der Modellpflanze *A. thaliana* abgewartet werden, da die hier erhaltenen Erkenntnisse mit Hilfe des Hefe-Systems nicht direkt auf Pflanzen bzw. Samen übertragbar sind. Sollte sich die Spezifität des Enzyms im pflanzlichen System bestätigen, stellt OtPDAT ein äußerst interessantes Enzym dar, mit dessen Hilfe ernährungsphysiologisch relevante Fettsäuren in Pflanzen effizienter produziert werden könnten.

4.4 Etablierung von VLCPUFA-Biosynthesewegen in *A. thaliana*

Parallel zu den Expressionsstudien in *S. cerevisiae* sollten verschiedene VLCPUFA-Biosynthesewege in *A. thaliana* etabliert werden. Zum einen war dies ein kombinierter ω 6-/ ω 3-Weg für die Synthese von $20:4n-6$ und $20:5n-3$, wie ihn Abbadi et al., (2004) bereits in Tabak und Lein untersuchten und zum anderen waren es zwei DHA-Biosynthesewege, deren einzelne Reaktionen weitestgehend unter ausschließlicher Beteiligung des Acyl-CoA-Pools ablaufen sollten. Mit diesen Versuchsansätzen sollte zusätzlich überprüft werden, ob die neuartigen Acyltransferasen aus Mikroalgen zu einer Steigerung der Synthese und einer höheren Akkumulation von VLCPUFA im Samenöl beitragen können. Dabei wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Für die Bewertung der Acyltransferasegene aus *O. tauri*, *M. squamata* und *P. patens* sollte zunächst eine transgene *A. thaliana*-Linie identifiziert werden, die über mehrere Generationen hinweg relativ stabile Anteile der Fettsäuren $20:4n-6$ und $20:5n-3$ im Samenöl enthält. Eine solche Linie sollte dann für die Supertransformation der Acyltransferase-Expressionskonstrukte dienen. Der kombinierter ω 6-/ ω 3-Weg mit den lipidabhängigen Desaturasen Pt Δ 6 und Pt Δ 5 sowie der Δ 6-Elongase konnte erfolgreich im Samen von *A. thaliana* etabliert werden (Abb. 46 bis Abb. 49). Entsprechend der Substratspezifität der Pt Δ 6 erfolgte eine gegenüber $18:3n-3$ bevorzugte Desaturierung von $18:2n-6$ (Domergue et al., 2002), wodurch die VLCPUFA-Synthese in Richtung des ω 6-Weges gelenkt wurde, so dass die Folgeprodukte $20:3n-6$ und $20:4n-6$ einen höheren Anteil am Samenöl hatten als die Fettsäuren des ω 3-Weges.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Abbadi et al. (2004), erfolgte keine vollständige Prozessierung der $\Delta 6$ -desaturierten Produkte, sondern die intermediären Fettsäuren des VLCPUFA-Synthesewegs akkumulierten zu einem wesentlich höheren Anteil im Samenöl als die Endprodukte $20:4n-6$ und $20:5n-3$. Dies zeigt deutlich, dass die endogenen AtLPCAT1 und 2 vermutlich nicht über die geeigneten Substratspezifitäten verfügen, um die intermediären C18-Fettsäuren dem Acyl-CoA-Pool zuführen zu können. Vielmehr scheinen die $\Delta 6$ -desaturierten Fettsäuren ohne Beteiligung des Acyl-CoA-Pools im Samenöl eingelagert zu werden. Neben PDAT, die ohne Beteiligung des Acyl-CoA-Pools den direkten Transfer von PtdCho-gebundenen Fettsäuren auf DAG katalysieren, könnte möglicherweise auch durch die reversible Aktivität CDP-Cholin:DAG-Phosphocholintransferase (CPT) das PtdCho in DAG umgewandelt werden (Millar et al., 2000; Abbadi et al., 2004). Dadurch würden die transgenen Fettsäuren vorzeitig dem VLCPUFA-Syntheseweg entzogen werden. So gebildetes DAG könnte dann für die Synthese von TAG genutzt werden. Wie oben angeführt sollte für die Transformation eine genetisch stabile Ausgangslinie mit stabilen Gehalten von VLCPUFAs erzeugt werden. Dieses Ziel konnte nur eingeschränkt erreicht werden. Zwar erwiesen sich die VLCPUFA Gehalte in verschiedenen Linien über mehrere Generationen als weitgehend konstant, allerdings waren diese Linien genetisch nicht stabil. Vielmehr spalteten die Linien auch nach mehreren Generationen auf in VLCPUFA produzierende Nachkommen und solche mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Fettsäureprofil. Trotz weitergehender Analysen konnte der Grund für dieses Aufspalten nicht ermittelt werden.

Aufgrund des zeitlichen Rahmens des Projektes wurde entschieden, eine der besten Linien mit stabilen VLCPUFA-Gehalten im T3-Samen (Abb. 47) und im T4-Samen (Abb. 48) und einem günstigen Aufspaltungsverhaltens für die Supertransformation der Acyltransferasegene einzusetzen. Das Fettsäureprofil der T2-Samen von Pflanzen, die den Leervektor und die Endprodukte $20:4n-6$ und $20:5n-3$ enthielten (Abb. 49 C), ist mit dem Fettsäureprofil der T5-Samen (Abb. 49 B) weitestgehend übereinstimmend. Im Gegensatz dazu waren die Werte der transgenen Fettsäuren im T2-Samen der anderen Linien stark erniedrigt (Abb. 49 D und E) und nur wenige der supertransformierten Pflanzen zeigten überhaupt VLCPUFA inklusive der beiden Fettsäuren $20:4n-6$ und $20:5n-3$. In vielen Fällen segregierten die supertransformierten Pflanzen zu einem höheren Anteil als erwartet (Tab. 24). Rund 25 % der analysierten Pflanzen der Ausgangslinie 2-4-11 zeigten keine transgenen Fettsäuren. Bei den mit dem Leervektor supertransformierten Pflanzen stieg der Anteil auf 40 % an.

Vermutlich ist auch die Anzahl der Expressionskonstrukte problematisch für eine effiziente Expression der Gene des VLCPUFA-Biosynthesewegs. Die Expression der Gene des lipidabhängigen VLCPUFA-Wegs werden ebenso wie die Acyltransferasegene durch jeweils einen USP-Promotor reguliert. Möglicherweise ist mit einer Anzahl von vier bis fünf Promotoren desselben Typs ein kritischer Bereich erreicht worden, der sich negativ auf das Expressionsniveau auswirkt. Dies könnte erklären, dass die Pflanzen mit der Leervektor-Kontrolle, die keine Expressionskassette, zum Teil die VLCPUFA-Gehalte der Ausgangslinie 2-4-11 erreicht. Welche Gründe tatsächlich ausschlaggebend für den Verlust der Genaktivität waren, bleibt jedoch in diesem Zusammenhang spekulativ.

Für die Etablierung von DHA-Biosynthesewegen in *A. thaliana* wurden bis zur Stufe von 22:5n-3 Acyl-CoA-abhängige Desaturasen eingesetzt (Tab. 25 und Tab. 26). Mit diesem Versuchsansatz sollte versucht werden, den bereits erwähnten limitierenden Transfer der Intermediate zwischen Acyl-CoA-Pool und dem Lipid-Pool soweit möglich zu umgehen. Da zum Zeitpunkt der durchgeführten Arbeiten keine Acyl-CoA-abhängige $\Delta 4$ -Desaturase für den letzten Reaktionsschritt der Synthese von DHA verfügbar war, wurde stattdessen die lipidabhängige $\Delta 4$ -Desaturase Eg $\Delta 4$ eingesetzt. Zusätzlich wurden die an der DHA-Synthese beteiligten Gene mit den Acyltransferase-Kandidatengen kombiniert, so dass insgesamt bis zu sechs verschiedene enzymatische Funktionen in *A. thaliana* eingebracht wurden. Die analysierten Linien zeigten, dass die Synthese von DHA durchgehend bereits nach den ersten zwei von fünf Reaktionen abbrach. Somit konnte in den Samen der analysierten Linien kein DHA detektiert werden (Tab. 25 und Tab. 26). Möglicherweise wirkt die geringe Aktivität der verwendeten $\Delta 5$ -Desaturasen Ms $\Delta 5$ und Ot $\Delta 5$ limitierend auf die Synthese. Für Ot $\Delta 5$ wurde die geringe Aktivität auch bereits in Hefe-Expressionsstudien und in transgenen *A. thaliana*-Pflanzen als ursächlich für eine geringe EPA-Synthese angesehen (Hoffmann et al., 2008). Die Verwendung von sechs USP-Promotoren zur Regulation der Genexpression könnte sich in diesem Fall ebenfalls als nachteilig ausgewirkt haben. Die Arbeiten von Robert et al. (2005) demonstrieren, dass ein DHA-Biosyntheseweg prinzipiell in *A. thaliana* etabliert werden kann. In den dort vorgestellten Arbeiten wurde ein kombinierter $\omega 6$ -/ $\omega 3$ -Syntheseweg für DHA wurde mit dem Einsatz einer bifunktionelle $\Delta 5/\Delta 6$ -Desaturase erfolgreich im Samen von *A. thaliana* etabliert. Die Anzahl der dort eingesetzten *napin*-Promotoren blieb durch die Bifunktionalität einer der Desaturasen auf vier begrenzt (Robert et al., 2005). Dies zeigt eindeutig, dass die Wahl der Enzyme und möglicherweise auch die Wahl des Promotors bei der Gestaltung der Expressionskonstrukte einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Etablierung von VLCPUFA-Biosynthesewegen in Pflanzen haben.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass für die erfolgreiche Etablierung von transgenen Stoffwechselwegen in höheren Pflanzen nicht nur die Auswahl der beteiligten Genfunktionen entscheidend für eine effiziente Synthese ist, sondern auch individuelle stoffwechselphysiologische Besonderheiten der Wirte hinreichend berücksichtigt werden müssen, wie die lipidabhängige Synthese von EPA in transgenen *A. thaliana*-Pflanzen zeigte. Die Versuche zur Etablierung von DHA-Biosynthesewegen blieben im Rahmen dieser Arbeit erfolglos, dennoch ermutigen die Arbeiten von Robert et al. (2005) neue Ansätze zur DHA-Synthese in höheren Pflanzen zu verfolgen. Ebenso erscheint es sinnvoll, die identifizierten Acyltransferasen aus *O. tauri* und *O. lucimarinus* in modifizierten Ansätzen in Pflanzen auf einen Beitrag zur Akkumulation von VLCPUFAS im Samenöl zu überprüfen. Die im Verlauf der vorliegenden Arbeiten publizierten Ergebnisse zu DGAT2- und PDAT-Enzymen mit einer Spezifität für Hydroxyfettsäuren belegen die prinzipielle Eignung dieser Enzymfamilien für die Anreicherung von ungewöhnlichen Fettsäuren im Samenöl transgener Pflanzen (Browse et al., 2006; Burgal et al., 2008).

5. Zusammenfassung

Die Erschließung alternativer Quellen für die Gewinnung von VLCPUFA-haltigen Ölen gewinnt immer mehr an Bedeutung, gilt eine *n*-3-Fettsäure reiche Ernährung doch als äußerst vorteilhaft für die menschliche Gesundheit. Während sich viele der bisherigen Forschungsarbeiten erfolgreich mit der Suche nach geeigneten Desaturasen und Elongasen für die effiziente VLCPUFA-Biosynthese in transgenen Ölsaaten beschäftigten, gilt es nun durch den Einsatz weiterer enzymatischer Funktionen die spezifische VLCPUFA-Akkumulation im Samenöl zu steigern. Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Acyltransferasen mit neuartigen Substratspezifitäten, deren Verwendung in transgenen Ölsaaten eine Steigerung der Biosynthese und höhere VLCPUFA-Akkumulation bewirken könnte.

Verschiedene LPAAT-, LPCAT-, DGAT- und PDAT-Kandidatengene wurden in den Genomen der Mikrolagen *O. tauri* und *O. lucimarinus* sowie dem Moos *P. patens* identifiziert, aus den jeweiligen Organismen isoliert und anhand von Komplementationsstudien in *S. cerevisiae* funktional charakterisiert. Vertreter der LPAAT-Familie aus *M. squamata* und *P. patens* scheinen dabei nicht an dem Fettsäuretransfer zwischen dem PtdCho-Pool und dem Acyl-CoA-Pool teilzuhaben. Dagegen zeigte die neuartige OILPCAT aus *O. lucimarinus*, dass sie das Zusammenspiel von PtdCho-abhängigen Reaktionsschritten und CoA-abhängigen Reaktionsschritten der transgenen VLCPUFA-Synthese in *S. cerevisiae* optimieren kann. Von drei Vertretern der DGAT2-Enzymfamilie aus *O. tauri* zeigte lediglich OtDGAT2B Aktivität im heterologen Expressionssystem der Hefe. Dabei wurde ein breites Substratspektrum festgestellt, dass vermutlich die Beteiligung an der unspezifischen Akkumulation verschiedener Fettsäuren in den Reservelipiden der Alge widerspiegelt. Des Weiteren wurde die PUFA-spezifische OtPDAT isoliert, die gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren als Substrate diskriminiert und im Ursprungsorganismus *O. tauri* vermutlich aktiv an der VLCPUFA-Akkumulation in Triacylglycerinen teilnimmt. Die Bewertung der enzymatischen Eigenschaften im Zusammenwirken mit transgenen VLCPUFA-Biosynthesewegen in Pflanzen steht noch aus, doch stellen OILPCAT und OtPDAT die attraktivsten neuartigen Acyltransferasen dar, die zukünftig zu einer gesteigerten Akkumulation von VLCPUFA im Samenöl beitragen könnten.

6. Literaturverzeichnis

- Abadi, A., Domergue, F., Bauer, J., Napier, J.A., Welti, R., Zähringer, U., Cirpus, P. und Heinz, E.** (2004). Biosynthesis of Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Transgenic Oilseeds: Constraints on Their Accumulation. *Plant Cell* **16**, 2734-2748.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Aronel, V., Lemieux, B., Hwang, I., Gibson, S., Goodman, H.M. und Somerville, C.R.** (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* **258**, 1353-1355.
- Athenstaedt, K. und Daum, G.** (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.* **266**, 1-16.
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D. und Daum, G.** (1999). Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**, 6441-6448.
- Athenstaedt, K. und Daum, G.** (2005). Tgl4p and Tgl5p, Two Triacylglycerol Lipases of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Are Localized to Lipid Particles. *J. Biol. Chem.* **280**, 37301-37309.
- Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, D.D., Seidmann, J.R., Smith, J.A. und Struhl, K.** (1993). *Current Protocolls in Molecular Biology*. (New York: Green Publishing Associates and John Wiley and Sons Inc.).
- Bafor, M., Smith, M.A., Jonsson, L., Stobart, K. und Stymne, S.** (1991). Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochem. J.* **280**, 507-514.
- Banas, A., Carlsson, A.S., Huang, B., Lenman, M., Banas, W., Lee, M., Noiriel, A., Benveniste, P., Schaller, H., Bouvier-Nave, P. und Stymne, S.** (2005). Cellular Sterol Ester Synthesis in Plants Is Performed by an Enzyme (Phospholipid: Sterol Acyltransferase) Different from the Yeast and Mammalian Acyl-CoA: Sterol Acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **280**, 34626-34634.
- Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Lepiniec, L. und Rochat, C.** (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 151-160.
- Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassuner, R., Van Montagu, M., Inze, D. und Wobus, U.** (1991). A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol Gen Genet* **225**, 459-467.
- Benghezal, M., Roubaty, C., Veepuri, V., Knudsen, J. und Conzelmann, A.** (2007). SLC1 and SLC4 Encode Partially Redundant Acyl-Coenzyme A 1-Acylglycerol-3-phosphate O-Acyltransferases of Budding Yeast. *J. Biol. Chem.* **282**, 30845-30855.
- Bennetzen, J.L. und Hall, B.D.** (1982). Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.* **257**, 3026-3031.
- Binkoski, A.E., Kris-Etherton, P.M., Wilson, T.A., Mountain, M.L. und Nicolosi, R.J.** (2005). Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. *J Am Diet Assoc* **105**, 1080-1086.

- Blanchet, C., Lucas, M., Julien, P., Morin, R., Gingras, S. und Dewailly, E.** (2005). Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* **40**, 529-531.
- Bouvier-Nave, P., Benveniste, P., Oelkers, P., Sturley, S.L. und Schaller, H.** (2000). Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 85-96.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D.** (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenna, J.T.** (2002). Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**, 127-132.
- Browse, J., McCourt, P. und Somerville, C.R.** (1985). A Mutant of *Arabidopsis* Lacking a Chloroplast-Specific Lipid. *Science* **227**, 763-765.
- Browse, J., McCourt, P. und Somerville, C.** (1986). A Mutant of *Arabidopsis* Deficient in C(18:3) and C(16:3) Leaf Lipids. *Plant Physiol.* **81**, 859-864.
- Browse, J. und Somerville, C.** (1991). Glycerolipid synthesis - Biochemistry and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 467-506.
- Browse, J.A., Shockey, J.M. und Burgal, J.J.** (2006). Enhancement of hydroxy fatty acid accumulation in oilseed plants. In PCT/US2006/019829 (USA).
- Bullock, W.D., Fernandez, J.M. und Hort, J.M.S.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transformants *recA Escherichia coli* strain β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Burgal, J., Shockey, J., Lu, C., Dyer, J., Larson, T., Graham, I. und Browse, J.** (2008). Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnol J* **6**, 819-831.
- Cao, J., Burn, P. und Shi, Y.** (2003a). Properties of the mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *J. Biol. Chem.* **278**, 25657-25663.
- Cao, J., Lockwood, J., Burn, P. und Shi, Y.** (2003b). Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *J. Biol. Chem.* **278**, 13860-13866.
- Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusic, A.J., Erickson, S.K. und Farese, R.V., Jr.** (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13018-13023.
- Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K.D., Voelker, T. und Farese, R.V., Jr.** (2001). Cloning of *dgat2*, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Biol. Chem.* **276**, 38870-38876.
- Chang, T.Y., Chang, C.C. und Cheng, D.** (1997). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 613-638.
- Chen, Q., Kazachkov, M., Zheng, Z. und Zou, J.** (2007). The yeast acylglycerol acyltransferase LCA1 is a key component of Lands cycle for phosphatidylcholine turnover. *FEBS Lett.* **581**, 5511-5516.

- Cheng, D., Meegalla, R.L., He, B., Cromley, D.A., Billheimer, J.T. und Young, P.R.** (2001). Human acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein. *Biochem. J.* **359**, 707-714.
- Chrétiennot-Dinet, M.-J., Courties, C., Vaquer, A., Neveux, J., Claustre, H., Lautier, J. und Machado, M.C.** (1995). A new marine picoeukaryote : *Ostreococcus tauri* gen. and sp. nov. (Chlorophyta, prasinophyceae). *Phycologia* **34**, 285-292.
- Cirpus, P.** (2006). Method for producing polyunsaturated long-chain fatty acids in transgenic organisms. In Patent WO/2006/069936 A2.
- Clough, S.J. und Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Countway, P.D. und Caron, D.A.** (2006). Abundance and distribution of *Ostreococcus* sp. in the San Pedro Channel, California, as revealed by quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2496-2506.
- Courties, C., Vaquer, A., Troussellier, M., Lautier, J., Chretiennot-Dinet, M.J. und Machado, C.** (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature* **370**, 255.
- Czabany, T., Wagner, A., Zweytick, D., Lohner, K., Leitner, E., Ingolic, E. und Daum, G.** (2008). Structural and Biochemical Properties of Lipid Particles from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **283**, 17065-17074.
- Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H. und Stymne, S.** (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6487-6492.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A.Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piegue, B., Ball, S.G., Ral, J.-P., Bouget, F.-Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y. und Moreau, H.** (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11647-11652.
- Diez, B., Pedros-Alio, C. und Massana, R.** (2001). Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2932-2941.
- Domergue, F., Lerchl, J., Zahringer, U. und Heinz, E.** (2002). Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4105-4113.
- Domergue, F., Abbadi, A., Ott, C., Zank, T.K., Zahringer, U. und Heinz, E.** (2003). Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 35115-35126.
- Domergue, F., Abbadi, A., Zähringer, U., Moreau, H. und Heinz, E.** (2005). *In vivo*-characterisation of the first acyl-CoA Δ 6-desaturase from the plant kingdom. *Biochem. J.* **389**, 483-490.
- Donahue, T.F. und Cigan, A.M.** (1990). Sequence and structural requirements for efficient translation in yeast. *Methods Enzymol.* **185**, 366-372.

- Ejsing, C.S., Duchoslav, E., Sampaio, J., Simons, K., Bonner, R., Thiele, C., Ekroos, K. und Shevchenko, A.** (2006). Automated identification and quantification of glycerophospholipid molecular species by multiple precursor ion scanning. *Anal. Chem.* **78**, 6202-6214.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Jr., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L. und Dennis, E.A.** (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839-862.
- Falcone, D.L., Gibson, S., Lemieux, B. und Somerville, C.** (1994). Identification of a gene that complements an arabidopsis mutant deficient in chloroplast ω 6 desaturase activity. *Plant Physiol.* **106**, 1453-1459.
- Felsenstein, J.** (1989). PHYLIP - Phylogeny Interference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 163-166.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooijer, P.A., Zhang, Z., Reddy, J.K., Spector, A.A. und Wanders, R.J.** (2001). Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* **42**, 1987-1995.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schodl, T., Heitzer, M. und Hegemann, P.** (2004). Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* **55**, 869-881.
- Fulda, M., Heinz, E. und Wolter, F.P.** (1997). Brassica napus cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol Biol* **33**, 911-922.
- Funk, C.D.** (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, C., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. und Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker, ed (Humana Press), pp. 571-607.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. und Weissman, J.S.** (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-741.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K. und Somerville, C.** (1994). Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **106**, 1615-1621.
- Glomset, J.A.** (1968). The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* **9**, 155-167.
- Goldstein, A.L. und McCusker, J.H.** (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1541-1553.
- Graham, I.A., Larson, T. und Napier, J.A.** (2007). Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 142-147.
- Greenspan, P., Mayer, E.P. und Fowler, S.D.** (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* **100**, 965-973.
- Guillou, L., Eikrem, W., Chretiennot-Dinet, M.J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., Pedros-Alio, C. und Vaultot, D.** (2004). Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist* **155**, 193-214.

- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. und Hegemann, J.H.** (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2519-2524.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harwood, J.L.** (1988). Fatty Acid Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 101-138.
- He, X., Turner, C., Chen, G.Q., Lin, J.T. und McKeon, T.A.** (2004). Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean. *Lipids* **39**, 311-318.
- Heath, R.J. und Rock, C.O.** (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J. Bacteriol.* **180**, 1425-1430.
- Hibbeln, J.R., Nieminen, L.R. und Lands, W.E.** (2004). Increasing homicide rates and linoleic acid consumption among five Western countries, 1961-2000. *Lipids* **39**, 1207-1213.
- Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A. und Schwager, S.J.** (2004). Global Assessment of Organic Contaminants in Farmed Salmon. *Science* **303**, 226-229.
- Hobbs, D.H., Lu, C. und Hills, M.J.** (1999). Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression. *FEBS Lett.* **452**, 145-149.
- Hoch, F.L.** (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta* **1113**, 71-133.
- Hoekema, A., Kastelein, R.A., Vasser, M. und de Boer, H.A.** (1987). Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol Cell Biol* **7**, 2914-2924.
- Hoffmann, M., Wagner, M., Abbadi, A., Fulda, M. und Feussner, I.** (2008). Metabolic engineering of ω 3-very long chain polyunsaturated fatty acid production by an exclusively acyl-CoA-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **283**, 22352-22362.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9877.
- Hofmann, K.** (2000). A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci* **25**, 111-112.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. und Hoekema, A.** (1993). New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants *Transgenic Research* **2**, 208-218.
- Hopwood, D.A. und Sherman, D.H.** (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* **24**, 37-66.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J. und Nakai, K.** (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* **35**, W585-587.
- Huang, A.H.C.** (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* **110**, 1055-1061.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.

- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature.** (1978). The nomenclature of lipids (recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *J. Lipid Res.* **19**, 114-128.
- Jain, S., Stanford, N., Bhagwat, N., Seiler, B., Costanzo, M., Boone, C. und Oelkers, P.** (2007). Identification of a Novel Lysophospholipid Acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282**, 30562-30569.
- Jako, C., Kumar, A., Wei, Y., Zou, J., Barton, D.L., Giblin, E.M., Covello, P.S. und Taylor, D.C.** (2001). Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol.* **126**, 861-874.
- Jonas, A.** (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 245-256.
- Joyard, J., Marechal, E., Malherbe, A., Block, M.A. und Douce, R.** (1994). Importance of diacylglycerol in glycerolipid biosynthesis by spinach chloroplast envelope membranes. *Prog. Lipid Res.* **33**, 105-118.
- Joyard, J., Teyssier, E., Miege, C., Bernyseigneurin, D., Marechal, E., Block, M.A., Dorne, A.J., Rolland, N., Ajlani, G. und Douce, R.** (1998). The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol.* **118**, 715-723.
- Kalscheuer, R., Luftmann, H. und Steinbüchel, A.** (2004). Synthesis of Novel Lipids in *Saccharomyces cerevisiae* by Heterologous Expression of an Unspecific Bacterial Acyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7119-7125.
- Katavic, V., Reed, D.W., Taylor, D.C., Giblin, E.M., Barton, D.L., Zou, J., MacKenzie, S.L., Covello, P.S. und Kunst, L.** (1995). Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol.* **108**, 399-409.
- Kato, C. und Nogi, Y.** (2001). Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 223-230.
- Kennedy, E.P. und Weiss, S.B.** (1956). THE FUNCTION OF CYTIDINE COENZYMES IN THE BIOSYNTHESIS OF PHOSPHOLIPIDES. *J. Biol. Chem.* **222**, 193-214.
- Kim, H.U. und Huang, A.H.C.** (2004). Plastid Lysophosphatidyl Acyltransferase Is Essential for Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134**, 1206-1216.
- Kim, H.U., Li, Y. und Huang, A.H.C.** (2005). Ubiquitous and Endoplasmic Reticulum-Located Lysophosphatidyl Acyltransferase, LPAT2, Is Essential for Female but Not Male Gametophyte Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 1073-1089.
- Kinney, A.J.** (2004). Production of very long chain polyunsaturated fatty acids in oilseed plants. In Patent *WO2004/071467 A2*.
- Knutzon, D.S., Hayes, T.R., Wyrick, A., Xiong, H., Maelor Davies, H. und Voelker, T.A.** (1999). Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut endosperm mediates the insertion of laurate at the sn-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels. *Plant Physiol.* **120**, 739-746.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E.L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-580.
- Kroon, J.T., Wei, W., Simon, W.J. und Slabas, A.R.** (2006). Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. *Phytochemistry* **67**, 2541-2549.

- Kume, K. und Shimizu, T.** (1997). cDNA cloning and expression of murine 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 663-666.
- Kunst, L., Browse, J. und Somerville, C.** (1989). A Mutant of *Arabidopsis* Deficient in Desaturation of Palmitic Acid in Leaf Lipids. *Plant Physiol.* **90**, 943-947.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.
- Lands, W.E.** (1960). Metabolism of glycerolipids. 2. The enzymatic acylation of lysolecithin. *J. Biol. Chem.* **235**, 2233-2237.
- Lardizabal, K., Effertz, R., Levering, C., Mai, J., Pedroso, M.C., Jury, T., Aasen, E., Gruys, K. und Bennett, K.** (2008). Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. *Plant Physiol.* **148**, 89-96.
- Lardizabal, K.D., Mai, J.T., Wagner, N.W., Wyrick, A., Voelker, T. und Hawkins, D.J.** (2001). Dgat2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family. purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 38862-38869.
- Larson, T.R. und Graham, I.A.** (2001). Technical Advance: a novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J.* **25**, 115-125.
- Leber, R., Zinser, E., Zellnig, G., Paltauf, F. und Daum, G.** (1994). Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1421-1428.
- Lee, H.C., Inoue, T., Imae, R., Kono, N., Shirae, S., Matsuda, S., Gengyo-Ando, K., Mitani, S. und Arai, H.** (2008). *Caenorhabditis elegans* mboa-7, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. *Mol Biol Cell* **19**, 1174-1184.
- Lee, M., Lenman, M., Banas, A., Bafor, M., Singh, S., Schweizer, M., Nilsson, R., Liljenberg, C., Dahlqvist, A., Gummeson, P.-O., Sjö Dahl, S., Green, A. und Stymne, S.** (1998). Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. *Science* **280**, 915-918.
- Lewin, T.M., Wang, P. und Coleman, R.A.** (1999). Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry* **38**, 5764-5771.
- MacDonald, M.H., Mogen, B.D. und Hunt, A.G.** (1991). Characterization of the polyadenylation signal from the T-DNA-encoded octopine synthase gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5575-5581.
- Man, W.C., Miyazaki, M., Chu, K. und Ntambi, J.M.** (2006). Membrane topology of mouse stearyl-CoA desaturase 1. *J. Biol. Chem.* **281**, 1251-1260.
- Marszalek, J.R. und Lodish, H.F.** (2005). DOCOSAHEXAENOIC ACID, FATTY ACID INTERACTING PROTEINS, AND NEURONAL FUNCTION: Breastmilk and Fish Are Good for You. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 633-657.
- Matsuda, S., Inoue, T., Lee, H.C., Kono, N., Tanaka, F., Gengyo-Ando, K., Mitani, S. und Arai, H.** (2008). Member of the membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) family encodes a lysophospholipid acyltransferase with broad substrate specificity. *Genes Cells* **13**, 879-888.

- McCartney, A.W., Dyer, J.M., Dhanoa, P.K., Kim, P.K., Andrews, D.W., McNew, J.A. und Mullen, R.T.** (2004). Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant J.* **37**, 156-173.
- McConn, M., Hugly, S., Browse, J. und Somerville, C.** (1994). A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast omega-3 desaturase. *Plant Physiol.* **106**, 1609-1614.
- Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V. und Browse, J.** (2001). Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* **293**, 290-293.
- Meyer, A., Cirpus, P., Ott, C., Schlecker, R., Zahringer, U. und Heinz, E.** (2003). Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a Δ^4 -fatty acyl group desaturase. *Biochemistry* **42**, 9779-9788.
- Meyer, A., Kirsch, H., Domergue, F., Abbadì, A., Sperling, P., Bauer, J., Cirpus, P., Zank, T.K., Moreau, H., Roscoe, T.J., Zahringer, U. und Heinz, E.** (2004). Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res.* **45**, 1899-1909.
- Mhaske, V., Beldjilali, K., Ohlrogge, J. und Pollard, M.** (2005). Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* knockout line for phospholipid: diacylglycerol transacylase gene (*At5g13640*). *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 413-417.
- Millar, A.A., Smith, M.A. und Kunst, I.** (2000). All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends Plant Sci.* **5**, 95-101.
- Miquel, M. und Browse, J.** (1992). *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 1502-1509.
- Murphy, D.J. und Vance, J.** (1999). Mechanisms of lipid body formation. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 109-115.
- Murphy, D.J.** (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* **40**, 325-438.
- Nגיע, M.M., Wells, G.B., Lester, R.L. und Dickson, R.C.** (1993). A suppressor gene that enables *Saccharomyces cerevisiae* to grow without making sphingolipids encodes a protein that resembles an *Escherichia coli* fatty acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 22156-22163.
- Napier, J.A.** (2007). The Production of Unusual Fatty Acids in Transgenic Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 295-319.
- Nichols, D.S., Nichols, P.D., Russell, N.J., Davies, N.W. und McMeekin, T.A.** (1997). Polyunsaturated fatty acids in the psychrophilic bacterium *Shewanella gelidimarina* ACAM 456T: molecular species analysis of major phospholipids and biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1347**, 164-176.
- Noiriel, A., Benveniste, P., Banas, A., Stymne, S. und Bouvier-Nave, P.** (2004). Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3752-3764.
- Nowicki, M., Muller, F. und Frentzen, M.** (2005). Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **579**, 2161-2165.

- Oelkers, P., Tinkelenberg, A., Erdeniz, N., Cromley, D., Billheimer, J.T. und Sturley, S.L. (2000). A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 15609-15612.
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J.T. und Sturley, S.L. (2002). The *DGAI* Gene Determines a Second Triglyceride Synthetic Pathway in Yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, 8877-8881.
- Ohlrogge, J.B., Browse, J. und Somerville, C.R. (1991). The Genetics of Plant Lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1082**, 1-26.
- Ohlrogge, J.B. und Browse, J. (1995). Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957-970.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E. und Browse, J. (1994). Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* **6**, 147-158.
- Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouze, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otilar, R., Merchant, S.S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., Vallon, O., Piganeau, G., Jancek, S., Heijde, M., Jabbari, K., Bowler, C., Lohr, M., Robbens, S., Werner, G., Dubchak, I., Pazour, G.J., Ren, Q., Paulsen, I., Delwiche, C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Van de Peer, Y., Moreau, H. und Grigoriev, I.V. (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7705-7710.
- Pauly, D., Christensen, V., Guenette, S., Pitcher, T.J., Sumaila, U.R., Walters, C.J., Watson, R. und Zeller, D. (2002). Towards sustainability in world fisheries. *Nature* **418**, 689-695.
- Peelman, F., Vinaimont, N., Verhee, A., Vanloo, B., Verschelde, J.L., Labeur, C., Seguret-Mace, S., Duverger, N., Hutchinson, G., Vandekerckhove, J., Tavernier, J. und Rosseneu, M. (1998). A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Sci* **7**, 587-599.
- Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T., Stobart, A.K., Napier, J.A. und Lazarus, C.M. (2002). Identification of a cDNA encoding a novel C18- Δ^9 polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. *FEBS Lett.* **510**, 159-165.
- Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J.A., Stobart, A.K. und Lazarus, C.M. (2004). Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat Biotechnol* **22**, 739-745.
- Riekhof, W.R., Wu, J., Gijon, M.A., Zarini, S., Murphy, R.C. und Voelker, D.R. (2007a). Lysophosphatidylcholine Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: THE ROLE OF P-TYPE ATPases IN TRANSPORT AND A BROAD SPECIFICITY ACYLTRANSFERASE IN ACYLATION. *J. Biol. Chem.* **282**, 36853-36861.
- Riekhof, W.R., Wu, J., Jones, J.L. und Voelker, D.R. (2007b). Identification and Characterization of the Major Lysophosphatidylethanolamine Acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282**, 28344-28352.
- Robert, S.S., Singh, P.S., Zhou, X.-R., Petrie, J.R., Blackburn, S.I., Mansour, P.M., Nichols, P.D., Liu, Q. und Green, A.G. (2005). Metabolic engineering of *Arabidopsis* to produce nutritionally important DHA in seed oil. *Functional Plant Biology* **32**, 473-479.

- Rosendal, J. und Knudsen, J.** (1992). A fast and versatile method for extraction and quantitation of long-chain acyl-CoA esters from tissue: content of individual long-chain acyl-CoA esters in various tissues from fed rat. *Anal. Biochem.* **207**, 63-67.
- Routaboul, J.M., Benning, C., Bechtold, N., Caboche, M. und Lepiniec, L.** (1999). The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 831-840.
- Saha, S., Enugutti, B., Rajakumari, S. und Rajasekharan, R.** (2006). Cytosolic Triacylglycerol Biosynthetic Pathway in Oilseeds: Molecular Cloning and Expression of Peanut Cytosolic Diacylglycerol Acyltransferase. *Plant Physiol.*, pp.106.082198.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sandager, L., Gustavsson, M.H., Stahl, U., Dahlqvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H. und Stymne, S.** (2002). Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, 6478-6482.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sayanova, O., Haslam, R., Qi, B., Lazarus, C.M. und Napier, J.A.** (2006). The alternative pathway C20 Δ 8-desaturase from the non-photosynthetic organism *Acanthamoeba castellanii* is an atypical cytochrome b5-fusion desaturase. *FEBS Lett.* **580**, 1946-1952.
- Sayanova, O.V. und Napier, J.A.** (2004). Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry* **65**, 147-158.
- Schaefer, E.J.** (1997). Effects of dietary fatty acids on lipoproteins and cardiovascular disease risk: summary. *Am J Clin Nutr* **65**, 1655S-1656S.
- Schlame, M.** (2008a). Thematic Review Series: Glycerolipids. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J. Lipid Res.* **49**, 1607-1620.
- Schlame, M.** (2008b). Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J. Lipid Res.* **49**, 1607-1620.
- Schwudke, D., Oegema, J., Burton, L., Entchev, E., Hannich, J.T., Ejsing, C.S., Kurzchalia, T. und Shevchenko, A.** (2006). Lipid Profiling by Multiple Precursor and Neutral Loss Scanning Driven by the Data-Dependent Acquisition. *Anal. Chem.* **78**, 585-595.
- Shanklin, J. und Somerville, C.** (1991). Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2510-2514.
- Shin, J., Dunbrack, R.L., Jr., Lee, S. und Strominger, J.L.** (1991). Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1918-1922.
- Shockey, J.M., Gidda, S.K., Chapital, D.C., Kuan, J.-C., Dhanoa, P.K., Bland, J.M., Rothstein, S.J., Mullen, R.T. und Dyer, J.M.** (2006). Tung Tree DGAT1 and DGAT2 Have Nonredundant Functions in Triacylglycerol Biosynthesis and Are Localized to Different Subdomains of the Endoplasmic Reticulum. *Plant Cell* **18**, 2294-2313.
- Simopoulos, A.P.** (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* **60**, 502-507.

- Singh, S.P., Zhou, X.R., Liu, Q., Stymne, S. und Green, A.G.** (2005). Metabolic engineering of new fatty acids in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 197-203.
- Slack, C.R., Campbell, L.C., Browse, J.A. und Roughton, P.G.** (1983). Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **754**, 10-20.
- Smith, W.L.** (2005). Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 174-182.
- Somerville, C. und Browse, J.** (1996). Dissecting desaturation: plants prove advantageous. *Trends in Cell Biology* **6**, 148-153.
- Sonnhammer, E.L., von Heijne, G. und Krogh, A.** (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **6**, 175-182.
- Sorger, D. und Daum, G.** (2002). Synthesis of Triacylglycerols by the Acyl-Coenzyme A:Diacyl-Glycerol Acyltransferase Dga1p in Lipid Particles of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **184**, 519-524.
- Sorger, D. und Daum, G.** (2003). Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 289-299.
- Sprecher, H.** (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 219-231.
- Spychalla, J.P., Kinney, A.J. und Browse, J.** (1997). Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1142-1147.
- Stahl, U., Carlsson, A.S., Lenman, M., Dahlqvist, A., Huang, B., Banas, W., Banas, A. und Stymne, S.** (2004). Cloning and Functional Characterization of a Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase from Arabidopsis. *Plant Physiol.*, pp.104.044354.
- Stahl, U., Stalberg, K., Stymne, S. und Ronne, H.** (2008). A family of eukaryotic lysophospholipid acyltransferases with broad specificity. *FEBS Lett.* **582**, 305-309.
- Stobart, K., Mancha, M., Lenman, M., Dahlqvist, A. und Stymne, S.** (1997). Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius*L.) seeds. *Planta* **203**, 58-66.
- Stone, S.J., Levin, M.C. und Farese, R.V., Jr.** (2006). Membrane Topology and Identification of Key Functional Amino Acid Residues of Murine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 40273-40282.
- Stymne, S. und Stobart, A.K.** (1984). Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* **223**, 305-314.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H. und Itakura, K.** (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6613-6617.
- Tamaki, H., Shimada, A., Ito, Y., Ohya, M., Takase, J., Miyashita, M., Miyagawa, H., Nozaki, H., Nakayama, R. und Kumagai, H.** (2007). LPT1 Encodes a Membrane-bound O-Acyltransferase Involved in the Acylation of Lysophospholipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282**, 34288-34298.

- Teasdale, R.D. und Jackson, M.R.** (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 27-54.
- Thompson, G.A., Scherer, D.E., Foxall-Van Aken, S., Kenny, J.W., Young, H.L., Shintani, D.K., Kridl, J.C. und Knauf, V.C.** (1991). Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2578-2582.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Trooskens, G., De Beule, D., Decouttere, F. und Van Criekinge, W.** (2005). Phylogenetic trees: visualizing, customizing and detecting incongruence. *Bioinformatics* **21**, 3801-3802.
- Tumaney, A.W., Shekar, S. und Rajasekharan, R.** (2001). Identification, purification, and characterization of monoacylglycerol acyltransferase from developing peanut cotyledons. *J. Biol. Chem.* **276**, 10847-10852.
- van de Loo, F.J., Broun, P., Turner, S. und Somerville, C.** (1995). An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6743-6747.
- Voelker, T.** (1996). Plant acyl-ACP thioesterases: chain-length determining enzymes in plant fatty acid biosynthesis. *Genet Eng (N Y)* **18**, 111-133.
- Voelker, T. und Kinney, A.J.** (2001). Variations in the Biosynthesis of Seed-Storage Lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 335-361.
- Wada, M., DeLong, C.J., Hong, Y.H., Rieke, C.J., Song, I., Sidhu, R.S., Yuan, C., Warnock, M., Schmaier, A.H., Yokoyama, C., Smyth, E.M., Wilson, S.J., FitzGerald, G.A., Garavito, R.M., Sui, D.X., Regan, J.W. und Smith, W.L.** (2007). Enzymes and Receptors of Prostaglandin Pathways with Arachidonic Acid-derived Versus Eicosapentaenoic Acid-derived Substrates and Products. *J. Biol. Chem.* **282**, 22254-22266.
- Wallis, J.G. und Browse, J.** (1999). The Δ^8 -desaturase of *Euglena gracilis*: An alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 307-316.
- Worden, A.Z., Nolan, J.K. und Palenik, B.** (2004). Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography* **49**, 168-179.
- Wu, G., Truksa, M., Datla, N., Vrinten, P., Bauer, J., Zank, T., Cirpus, P., Heinz, E. und Qiu, X.** (2005). Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nat. Biotech.* **23**, 1013-1017.
- Xu, C., Fan, J., Froehlich, J.E., Awai, K. und Benning, C.** (2005). Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 3094-3110.
- Xu, Y.N., Wang, Z.N., Jiang, G.Z., Li, L.B. und Kuang, T.Y.** (2003). Effect of various temperatures on phosphatidylglycerol biosynthesis in thylakoid membranes. *Physiol. Plant.* **118**, 57-63.

- Yen, C.-L.E. und Farese, R.V., Jr.** (2003). MGAT2, a Monoacylglycerol Acyltransferase Expressed in the Small Intestine. *J. Biol. Chem.* **278**, 18532-18537.
- Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C. und Farese, R.V., Jr.** (2008). Thematic Review Series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **49**, 2283-2301.
- Yu, B., Xu, C. und Benning, C.** (2002). Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5732-5737.
- Zank, T.K., Zahringer, U., Beckmann, C., Pohnert, G., Boland, W., Holtorf, H., Reski, R., Lerchl, J. und Heinz, E.** (2002). Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of $\Delta 6$ -polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **31**, 255-268.
- Zhang, Q., Chieu, H.K., Low, C.P., Zhang, S., Heng, C.K. und Yang, H.** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* Cells Deficient in Triacylglycerols Synthesis Undergo Apoptosis upon Entry into the Stationary Phase. *J. Biol. Chem.* **278**, 47145-47155.
- Zhao, Y., Wang, J., Gebre, A.K., Chisholm, J.W. und Parks, J.S.** (2003). Negative charge at amino acid 149 is the molecular determinant for substrate specificity of lecithin: cholesterol acyltransferase for phosphatidylcholine containing 20-carbon sn-2 fatty acyl chains. *Biochemistry* **42**, 13941-13949.
- Zheng, Z., Xia, Q., Dauk, M., Shen, W., Selvaraj, G. und Zou, J.** (2003). Arabidopsis *AtGPAT1*, a Member of the Membrane-Bound Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene Family, Is Essential for Tapetum Differentiation and Male Fertility. *Plant Cell*, tpc.012427.
- Zou, J., Wei, Y., Jako, C., Kumar, A., Selvaraj, G. und Taylor, D.C.** (1999). The *Arabidopsis thaliana TAG1* mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J.* **19**, 645-653.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Strukturen der häufigsten pflanzlichen Glycerolipide.	4
Abb. 2	Strukturen der häufigsten pflanzlichen Glycerophospholipide.	6
Abb. 3	Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden in Pflanzen (modifiziert nach Ohlrogge & Browse, 1995).	10
Abb. 4	Transfer von Fettsäuren zwischen Lipiden am ER (modifiziert nach Singh et al., 2005).	13
Abb. 5	Strukturen stoffwechselphysiologisch besonders relevanter LCPUFA und VLCPUFA.	20
Abb. 6	Schematische Darstellung verschiedener VLCPUFA-Biosynthesewege.	22
Abb. 7	Schematische Darstellung verschiedener Strategien zur VLCPUFA-Biosynthese in höheren Pflanzen. ...	28
Abb. 8	Phylogramm der LPAAT und LPCAT aus Pflanzen, Hefen, Invertebraten und Säugern.	85
Abb. 9	Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Vertretern der LPAAT/LPCAT-Familie.	88
Abb. 10	Heterologe Expression der MsLPAAT in <i>S. cerevisiae</i>	94
Abb. 11	Heterologe Expression der PpLPAAT in <i>S. cerevisiae</i>	95
Abb. 12	Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Vertretern der LPCAT-Familie.	98
Abb. 13	Hydrophathieanalyse der LPCAT aus <i>O. lucimarinus</i>	98
Abb. 14	Immundetektion von OILPCAT nach heterologer Expression in BY4741 <i>ale1Δ</i>	100
Abb. 15	Partielle Komplementation des <i>ale1Δ</i> -Phänotyps in Gegenwart von <i>n</i> -6-PUFA.	104
Abb. 16	Partielle Komplementation des <i>ale1Δ</i> -Phänotyps in Gegenwart von <i>n</i> -3-PUFA.	105
Abb. 17	Heterologe Expression der OILPCAT in <i>S. cerevisiae</i>	107
Abb. 18	Analyse der Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools von <i>S. cerevisiae</i> nach Expression von OILPCAT.	108
Abb. 19	Heterologe Expression der OILPCAT in <i>S. cerevisiae</i>	109
Abb. 20	Analyse der Fettsäurezusammensetzung des Acyl-CoA-Pools von <i>S. cerevisiae</i> nach Expression von OILPCAT.	110
Abb. 21	Phylogramm der DGAT2 und MGAT aus Pflanzen, Hefen, Invertebraten und Säugern.	114
Abb. 22	Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Vertretern der DGAT2- und MGAT-Familie.	118
Abb. 23	Hydrophathieanalysen der DGAT2 aus <i>O. tauri</i>	119
Abb. 24	Immundetektion der DGAT2 aus <i>O. tauri</i> nach heterologer Expression in BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ</i>	121
Abb. 25	Komplementation der Doppelmutante BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ</i> durch OtDGAT2B.	122
Abb. 26	Coexpression von PSE1 und OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C in BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ</i>	124
Abb. 27	Coexpression von PSE1 und OtDGAT2A bzw. OtDGAT2C in BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ</i>	125
Abb. 28	Nachweis von Lipidkörpern im Hefestamm H1246 nach Expression von OtDGAT2B.	127
Abb. 29	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Aktivität von OtDGAT2B.	128
Abb. 30	Expression von OtDGAT2B in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter Fettsäuren.	130
Abb. 31	Analyse der molekularen DAG- und TAG-Spezies nach Expression von OtDGAT2B.	132
Abb. 32	Verhältnis der TAG-Spezies aus OtDGAT2B- und <i>Dga1p</i> -Expressionskulturen.	133
Abb. 33	Phylogramm von Vertretern der LCAT-Familie aus Pflanzen, Hefen, Amphibien und Säugern.	137
Abb. 34	Vergleich der Aminosäuresequenzen von Vertretern der LCAT-Superfamilie.	141
Abb. 35	Hydrophathieanalyse der PDAT aus <i>O. tauri</i>	142
Abb. 36	Immundetektion der PDAT aus <i>O. tauri</i> nach heterologer Expression in BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ</i>	143
Abb. 37	Hefeeigene Fettsäuren werden von OtPDAT nicht zur Bildung von TAG verwendet.	145
Abb. 38	In Gegenwart von LCPUFA und VLCPUFA wurde der <i>lro1Δ dga1Δ</i> -Phänotyp nach Expression von OtPDAT komplementiert.	146
Abb. 39	Nachweis von Lipidkörpern im Hefestamm H1246 nach Expression von OtPDAT.	149
Abb. 40	Immundetektion von OtPDAT in Zellextrakten und Membranpräparationen nach Expression in BY4741 <i>lro1Δ dga1Δ</i>	150
Abb. 41	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Aktivität von OtPDAT.	151
Abb. 42	Expression von OtPDAT in Gegenwart verschiedener mehrfach ungesättigter Fettsäuren.	152
Abb. 43	Analyse der molekularen DAG- und TAG-Spezies nach Expression von OtPDAT.	154
Abb. 44	DAG wird in OtPDAT-Expressionskulturen nur unvollständig zu TAG umgesetzt.	155

Abb. 45 Verhältnis der TAG-Spezies aus OtPDAT- und <i>LROI</i> -Expressionskulturen.	156
Abb. 46 Ausschnitt der Fettsäureprofile von T2-Samen transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.	158
Abb. 47 Ausschnitt der Fettsäureprofile von T3-Samen transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.	159
Abb. 48 Ausschnitt der Fettsäureprofile von T4-Samen transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.	161
Abb. 49 Ausschnitt der Fettsäureprofile von Samen transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.	164
Abb. 50 Mit der gewählten Enzymkombination konnte die DHA-Biosynthese in <i>A. thaliana</i> nicht etabliert werden.	168

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht der verschiedenen Lipide mit Vertretern der einzelnen Klassen, sowie deren physiologischen Funktionen (Fahy et al., 2005).	3
Tab. 2 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	30
Tab. 3 Geräte und Materialien	31
Tab. 4 Verwendete Software zur Analyse von DNA-Sequenzen und Proteinen	31
Tab. 5 Klonierungsvektoren für <i>E. coli</i>	32
Tab. 6 Expressionsvektoren für <i>S. cerevisiae</i>	33
Tab. 7 Transformationsvektoren für Pflanzen	33
Tab. 8 Verwendete Antikörper	33
Tab. 9 Verwendete Bakterienstämme	33
Tab. 10 Verwendete Hefestämme	34
Tab. 11 Antibiotika zur Selektion von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	36
Tab. 12 Antibiotika zur Selektion von <i>S. cerevisiae</i>	38
Tab. 13 Zusammensetzung der Spurenelementlösungen	39
Tab. 14 Standard-Temperaturprofil einer PCR-Reaktion	47
Tab. 15 Temperaturprofil der Sequenzierung	49
Tab. 16 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die funktionale Charakterisierung der LPCAT aus <i>O. lucimarinus</i>	57
Tab. 17 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die heterologe Expression von PtΔ6 und PSE1 in <i>S. cerevisiae</i>	58
Tab. 18 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die funktionale Charakterisierung der DGAT2 aus <i>O. tauri</i> .61	
Tab. 19 Übersicht der rekombinanten Plasmide für die funktionale Charakterisierung der PDAT aus <i>O. tauri</i> ...63	
Tab. 20 Charakteristika der Sequenzen von OtDGAT2A, OtDGAT2B und OtDGAT2C.	115
Tab. 21 Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der OtDGAT2A und OtDGAT2B zu pflanzlichen DGAT2.	115
Tab. 22 Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der OtDGAT2C zu pflanzlichen und tierischen DGAT2 sowie MGAT aus Säugern.....	116
Tab. 23 Identitäts- und Ähnlichkeitswerte der OtPDAT zu PDAT aus Pflanzen und Hefen.	138
Tab. 24 Übersicht der Expressionskonstrukte für die Supertransformation transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.....	163
Tab. 25 Übersicht der Expressionskonstrukte CoA I für die DHA-Biosynthese in <i>A. thaliana</i>	167
Tab. 26 Übersicht der Expressionskonstrukte CoA II für die DHA-Biosynthese in <i>A. thaliana</i>	167

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ACP	Acyl-Carrier-Protein
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribunukleintriphosphat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FAD	<i>fatty acid desaturase</i> (Fettsäure-Desaturase), Flavinadenindinukleotid
FAME	Fettsäuremethylester
G	Guanin
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
l	Liter
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
NADH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADPH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x Nanometern
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymersae-Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>sn</i>	stereospezifische Nummerierung
T	Thymidin
T _m	Schmelztemperatur
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Masse pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

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

10. Anhang

Anhang 1 Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der möglichen LPAAT aus *M. squamata* und *P. patens* eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz
<i>MsLPAAT-fBamHI</i>	5'-GGATCCATGTCTTTTTACCTCGTCACCTTCACC-3'
<i>MsLPAAT-rXhoI</i>	5'-CTCGAGTCACGAGTACTTGACAAGGC-3'
<i>PpLPAAT-f1BamHI</i>	5'-TGGATCCACATAATGATGGTCGCCTGCAGGACCGGGAG-3'
<i>PpLPAAT-f2BamHI</i>	5'-TGGATCCACATAATGCTGATATTACAGCCCTTCGTACTC-3'
<i>PpLPAAT-rNheI</i>	5'-AGCTAGCCTAATGAACAGGAAGACCGTGTGGTGGATCAAGGTC-3'

Anhang 2 Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der $\Delta 6$ -Desaturase Pt $\Delta 6$ aus *P. tricornutum* und der $\Delta 6$ -Elongase PSE1 aus *P. patens* eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz
<i>PSE1-fBamHI</i>	5'-ATGCGGATCCTATGGAGGTCGTGGAGAGAT-3'
<i>PSE1-rNheI</i>	5'-ATGCGCTAGCTCACTCAGTTTTAGCTCCCTT-3'
<i>Pt$\Delta 6$-fNotI</i>	5'-AGCGGCCGCACATAATGGGCAAAGGAGGGGACG-3'
<i>Pt$\Delta 6$-rBglII</i>	5'-AGATCTTTACATGGCGGGTCCATCGCGTAC-3'

Anhang 3 Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Amplifikation von OILPCAT aus *O. lucimarinus* eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz
<i>OILPCAT-fBamHI</i>	5'- TGGATCCACATAATGCTGAGCGCGGCGGCGTTCGGGC-3'
<i>OILPCAT-fXbaNheI</i>	5'- TGCTAGCTCTAGATTACGCCGATTTGGGCTTGGACGAGC-3'
<i>OILPCAT-fXbaNheI-V5</i>	5'- TGCTAGCTCTAGACGCCGATTTGGGCTTGGACGAGC-3'
<i>OILPCAT-fBamHI-cuo</i>	5'- GGATCCACATAATGTTATCTGCCGC-3'
<i>OILPCAT-rXbaNheI-cuo</i>	5'- GCTAGCTCTAGATTAGGCAGACTTAGGTTT-3'

Anhang 4 Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Amplifikation von *OtDGAT2A*, *OtDGAT2B* und *OtDGAT2C* aus *O. tauri* sowie von *DGA1* aus *S. cerevisiae* eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz
<i>OtDGAT2A</i> -fHindIII	5'-AAAGCTTACATAATGCGAACCTCCTCGGGCGCGG-3'
<i>OtDGAT2A</i> -fApaHindIII-cuo	5'-GGGCCCAAGCTTACATAATGTCCAGACCAGAACCAG-3'
<i>OtDGAT2A</i> -rXbaI	5'-ATCTAGATTACACCAACTTTGTGCGTTGCGTCGG-3'
<i>OtDGAT2A</i> -rXbaI-V5	5'-ATCTAGACACCAACTTTGTGCGTTGCGTCGGATAC-3'
<i>OtDGAT2A</i> -rXbaHpaI	5'-GTAACTCTAGAGATTATACCAATTTAGTT-3'
<i>OtDGAT2B</i> -fBamHI	5'-GCGGATCCACATAATGTCGCGCTCGATCGTCGATCACGGCGT-3'
<i>OtDGAT2B</i> -rXbaI	5'-ATCTAGATCAGCACACGACGAGGTCGACGTCGGC-3'
<i>OtDGAT2B</i> -rXbaI-V5	5'-TCTAGAGCACACGACGAGGTCGACGTCGGCATA-3'
<i>OtDGAT2C</i> -fBamHI	5'-TGGATCCACATAATGATTTATGCGTTCCTATTGAGCGCG-3'
<i>OtDGAT2C</i> -fHindBamHI-cuo	5'-GGATCCAAGCTTACATAATGATTTATGCAT-3'
<i>OtDGAT2C</i> -rNotI	5'-TGCGGCCGCTATTTGAATGTCATGGCTTGGAG-3'
<i>OtDGAT2C</i> -rNotI-V5	5'-TGCGGCCGCGTTTGAATGTCATGGCTTGGAGGTTG-3'
<i>OtDGAT2C</i> -rXbaNheI-cuo	5'-GCTAGCTCTAGACTACTTAAATGTCATAGCTTGC-3'
<i>DGA1</i> -fBamHI	5'-GGATCCACATAATGTCAGGAACATTCAATGATATAAG-3'
<i>DGA1</i> -rNotI	5'-TGCGGCCGCTTACCAACTATCTTCAATTCTGCATC-3'
<i>DGA1</i> -rNotI-V5	5'-TGCGGCCGCGGCCCAACTATCTTCAATTCTGCATC-3'

Anhang 5 Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Amplifikation von *OtPDAT* aus *O. tauri* sowie *LROI* aus *S. cerevisiae* eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz
<i>OtPDAT</i> -fintern	5'-TAAGCTTACATAATGGCTTTGGGAGGCGCAGAGCCGAAGC-3'
<i>OtPDAT</i> -rintern	5'-TTATTTGGCTTCCGATGAAACGTCCCATCGC-3'
<i>OtPDAT</i> -fHindIII	5'-TAAGCTTACATAATGGCGGTGACGCGTGAACGACG-3'
<i>OtPDAT</i> -rXbaI	5'-TTCTAGACTAAAACGACTCGCGTGGGTTGGCTG-3'
<i>OtPDAT</i> -rXbaI-V5	5'-TTCTAGAAAACGACTCGCGTGGGTTGGCTGAGG-3'
<i>LROI</i> -fBamHI	5'-TGGATCCACATAATGGGCACACTGTTTCGAAGAAATG-3'
<i>LROI</i> -rNotI	5'-TGCGGCCGCTTACATTGGGAAGGGCATCTGAGAAAC-3'
<i>LROI</i> -rNotI-V5	5'-TGCGGCCGCGGCATTGGGAAGGGCATCTGAGAAAC-3'

Anhang 6 Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Adaption der Codonverwendung eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz
<i>OtDGAT2A-fHindIII-pcuo</i>	5'-TAAGCTTACATAATGGGTTCCAGACCAGAACCAGGTTCTTTG TGGAGACAACACGTTAGAGCTTTCGACGCTGTTAGAAGAGAGATG CGAGAGGCGCGAGGGATCG-3'
<i>OtDGAT2B-fBamHI-pcuo</i>	5'-TGGATCCACATAATGGGTTCCAGATCTATTGTTGACCACGGT GTTTTGTTGGTTTGGTTGGGTTTGTTCACGCTTTGGTTGTTGTTGTT GTTGTTGCGATCGTCGCGCTCGAGCGACGACG-3'
<i>OtDGAT2C-fBamHI-pcuo</i>	5'-TGGATCCACATAATGGGTATTTACGCTTCTTGTGTTGTCTGCTATTT TCATTTACCCAACCTTACTGTGTTTTTCGGTCACGCTACTTGGATGCGG AACGCGTTCTTGGGATACATTGG-3'
<i>OtPDAT-fHindIII-pcuo</i>	5'-TAAGCTTACATAATGGCTGTTACTAGAAGAAGAACTACTAGAGCT GGTGCTAGAGCTCCAGGTAAGTGGTGTCTTCTTCTTAGAGCTCCAA GACCGGCGATTTCGAGCGTCGTCGTCGAGG-3'

Anhang 7 Genbank-Identifikationsnummern, die für die Erstellung des Phylogramms in Abb. 8 verwendet wurden. Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine sind ebenfalls aufgeführt.

Abkürzung	Organismus	Genbank-Identifikationsnummer
AtLPAAT1	<i>A. thaliana</i>	Q8GXU8
AtLPAAT2	<i>A. thaliana</i>	NP_567052
AtLPAAT3	<i>A. thaliana</i>	NP_175537
AtLPAAT4	<i>A. thaliana</i>	NP_565098
AtLPAAT5	<i>A. thaliana</i>	NP_188515
AtLPCAT1	<i>A. thaliana</i>	NP_172724
AtLPCAT2	<i>A. thaliana</i>	NP_176493
CeLPAAT	<i>C. elegans</i>	Cirpus et al., 2006
CeLPCAT	<i>C. elegans</i>	NP_001022735
HsLPCAT1	<i>H. sapiens</i>	Q8NF37
HsLPCAT2	<i>H. sapiens</i>	NP_060309
HsLPCAT3	<i>H. sapiens</i>	NP_005759
MmLPAAT	<i>M. musculus</i>	NP_061350
MmLPCAT1	<i>M. musculus</i>	NP_663351
MmLPCAT2	<i>M. musculus</i>	Q8BYI6
MmLPCAT3	<i>M. musculus</i>	Q91V01
MsLPAAT	<i>M. squamata</i>	Cirpus et al., 2006
OILPAAT	<i>O. lucimarinus</i>	XM_001418707
OILPCAT	<i>O. lucimarinus</i>	XP_001418744
OtLPAAT	<i>O. tauri</i>	Cirpus et al., 2006
OtLPCAT	<i>O. tauri</i>	CAL58542
PpLPAAT	<i>P. patens</i>	XP_001773658
PpLPCAT1	<i>P. patens</i>	XP_001780460
PpLPCAT2	<i>P. patens</i>	XP_001751825
PpLPCAT3	<i>P. patens</i>	XP_001763507
<i>ALE1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	NP_014818
<i>SLC1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	CAA98614

Anhang 8 Genbank-Identifikationsnummern, die für die Erstellung des Phylogramms in Abb. 21 verwendet wurden. Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine sind ebenfalls aufgeführt.

Abkürzung	Organismus	Genbank-Identifikationsnummer
At3g51520	<i>A. thaliana</i>	AAK32844
CeDGAT2	<i>C. elegans</i>	NP_507469
<i>DGA1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	NP_014888
HsDGAT2	<i>H. sapiens</i>	NP_115953
HsMGAT2	<i>H. sapiens</i>	Q35YC2
MmDGAT2	<i>M. musculus</i>	NM_026384
MmMGAT2	<i>M. musculus</i>	NP_803231
MrDGAT2A	<i>M. ramanniana</i>	Q96UY2
MrDGAT2B	<i>M. ramanniana</i>	Q96UY1
OIDGAT2A	<i>O. lucimarinus</i>	XP_001419156
OIDGAT2B	<i>O. lucimarinus</i>	XP_001421576
OIDGAT2C	<i>O. lucimarinus</i>	XP_001421075
OtDGAT2A	<i>O. tauri</i>	CAL54993
OtDGAT2B	<i>O. tauri</i>	CAL58088
OtDGAT2C	<i>O. tauri</i>	CAL56438
PpDGAT2A	<i>P. patens</i>	XP_001758758
PpDGAT2B	<i>P. patens</i>	XP_001777726
RcDGAT2	<i>R. communis</i>	AAY16324
VfDGAT2	<i>V. fordii</i>	ABC94473

Anhang 9 Genbank-Identifikationsnummern, die für die Erstellung des Phylogramms in Abb. 33 verwendet wurden. Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine sind ebenfalls aufgeführt.

Abkürzung	Organismus	Genbank-Identifikationsnummer
At1g04010	<i>A. thaliana</i>	NP_AY989885
At1g27480	<i>A. thaliana</i>	NP_564286
At3g03310	<i>A. thaliana</i>	NP_566201
At3g44830	<i>A. thaliana</i>	NP_190069
At4g19860	<i>A. thaliana</i>	AAAY25440
At5g13640	<i>A. thaliana</i>	NP_196868
HsLCAT	<i>H. sapiens</i>	NP_000220
MmLCAT	<i>M. musculus</i>	NP_032516
MtLCAT	<i>M. truncatula</i>	AAQ10316
MtPLA	<i>M. truncatula</i>	ABN06031
MtPDAT	<i>M. truncatula</i>	AY210981
MtPSAT	<i>M. truncatula</i>	AAN77002
NtPLA	<i>N. tabacum</i>	AF468223
OIPDAT	<i>O. lucimarinus</i>	XP_001419605
OtPDAT	<i>O. tauri</i>	CAL55479
PpLCAT	<i>P. patens</i>	XP_001758018
PpPDAT	<i>P. patens</i>	XP_001782657
PpPLA	<i>P. patens</i>	XP_001782233
PpPSAT	<i>P. patens</i>	XP_001782337
<i>LRO1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	NP_014405
SpPDAT	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O94680
XILCAT	<i>X. laevis</i>	NP_001005715

Danksagung

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Ivo Feußner** für die interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und die stete Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Bei **Dr. Ingo Heilmann** bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Martin Fulda**, der mir stets unterstützend zur Seite stand. Seine intensive Anleitung, sein großes Interesse sowie die vielen anregenden und motivierenden Diskussionen haben einen entscheidenden Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Allen Beteiligten des „OLeRa“-Projektes danke ich für die äußerst angenehme und stets gelungene Kooperation. Stellvertretend sei an dieser Stelle Herrn **Dr. Amine Abbadi** für die Koordination des Projektes gedankt.

Herrn **Dr. Ulf Ståhl** danke ich für die Bereitstellung des *ALE1*-Expressionskonstruktes.

Dr. Cornelia Göbel möchte ich besonders für ihre Hilfe bei allen Fragen zur Lipid-Analytik, für ihr großartiges Engagement über die gesamte Zeit und besonders während meines Endspurts danken.

Einen großen Dank auch an **Dr. Mareike Heilmann** und **Katharina Hoppe** für die stete Hilfsbereitschaft und anregenden Diskussionen im Rahmen von „OLeRa“.

Tibor Czabany danke ich für die Unterstützung bei den *in vitro*-Assays und den Arbeiten zum Nachweis von Lipidkörpern.

Besonderer Dank gilt **Silke Schlenczek** für die harmonische Zusammenarbeit in unserem kleinen Labor sowie für die scheinbar nie endende Geduld beim stets erfolgreichen Bewältigen der kniffligsten molekularbiologischen Herausforderungen. Die gemeinsamen Vormittage werden mir stets in besonders angenehmer Erinnerung bleiben.

Michael Scharnewski danke ich für die Unterstützung und das Erstellen der *S. cerevisiae*-Mutanten und darüber hinaus ganz besonders für die hilfreichen Gespräche und die zahlreichen Unternehmungen während der letzten Jahre, um dem Alltag zu entfliehen.

Susanne Mesters möchte ich besonders für die geduldige Pflege der großen und kleinen grünen Sorgenkinder danken.

Bei allen AG Fulda-Mitgliedern, insbesondere bei **Danuta, Annett, Eva, Gabriel und Dirk** möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft sowie Unterstützung im Laboralltag bedanken, ohne die eine solche Arbeit nicht gelingen könnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Biochemie der Pflanze für das gute Arbeitsklima während der gesamten Zeit bedanken, speziell danke ich den aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen **Maïke, Kristl, Alexandra, Elena, Imke, Mareike, Katharina, Florian, Jan-Gerrit, Volker und Micha**.

Am meisten bedanken ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder, die mich über all die Jahre hinweg, von Beginn des Studiums bis zum heutigen Tag, ermutigt und vorbehaltlos unterstützt haben und somit den Grundstein für das Gelingen der Arbeit gelegt haben. Ganz besonders danke ich an dieser Stelle Sylvia für ihr großes Verständnis und unendliche Geduld sowie ihre liebevolle Unterstützung.

