

**Mobilisierung von Speicherlipiden in**  
*Cucumis sativus*- und *Arabidopsis thaliana*-  
**Keimlingen**

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

vorgelegt von  
**Maike Rudolph**  
aus  
Hamburg

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. I. Feußner

Korreferent: Prof. Dr. O. Einsle

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2008

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Phospholipasen</b>	<b>1</b>
1.1.1 Phospholipase A <sub>2</sub>	2
<b>1.2 Triacylglycerin-Lipasen</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Lipidkörper</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Mobilisierung von Speicherlipiden während der Keimung</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Zugänglichkeit des Lipidkörpers für lipidmobilisierende Enzyme</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>12</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht</b>	<b>14</b>
2.2.1 Anzucht von <i>Cucumis sativus</i> -Keimlingen	14
2.2.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Keimlingen	14
2.2.3 Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i> -Pflanzen	15
2.2.4 Verwundung von <i>N. tabacum</i>	15
<b>2.3 Bakterien</b>	<b>15</b>
<b>2.4 <i>Pichia pastoris</i></b>	<b>17</b>
<b>2.5 Insektenzellen</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Molekularbiologische Techniken</b>	<b>18</b>
2.6.1 Klonierung von AtTGL1 und AtTGL2 zur Expression in Insektenzellen	18
2.6.2 Klonierung von AtTGL1 und AtTGL2 zur Expression in <i>P. pastoris</i>	19
2.6.3 Klonierung von CsPAT zur Expression in <i>E. coli</i>	19
2.6.4 Klonierung von CsPAT und CsLbLOX zur Expression in <i>N. tabacum</i>	20
2.6.5 Transformation von <i>N. tabacum</i>	20
2.6.6 Isolierung genomischer DNA aus <i>N. tabacum</i>	21
<b>2.7 Phylogenetische Untersuchungen</b>	<b>21</b>
<b>2.8 Aufschluss des Pflanzenmaterials</b>	<b>21</b>
<b>2.9 Isolierung von Lipidkörpern</b>	<b>22</b>
<b>2.10 Isolierung von Lipidkörperproteinen</b>	<b>23</b>
2.10.1 Aceton/Ethanol-Extraktion	23
2.10.2 Trichloressigsäure (TCA)-Extraktion	23
<b>2.11 Expression rekombinanter Proteine</b>	<b>24</b>
2.11.1 Expression in <i>E. coli</i>	24
2.11.2 Expression in Insektenzellen	24
2.11.3 Expression in <i>P. pastoris</i>	25
<b>2.12 Ammoniumsulfat-Fällung und Dialyse von Proteinen</b>	<b>25</b>

<b>2.13 Proteinreinigung über Talon-Säulen</b>	<b>26</b>
<b>2.14 Proteinreinigung mit Anionenaustauschchromatographie</b>	<b>27</b>
<b>2.15 Proteinbestimmung nach Bradford</b>	<b>27</b>
<b>2.16 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)</b>	<b>28</b>
<b>2.17 Coomassie-Färbung</b>	<b>29</b>
<b>2.18 Western-Blot</b>	<b>30</b>
2.18.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen	30
2.18.2 Immunodetektion der Proteine	30
<b>2.19 Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie</b>	<b>32</b>
<b>2.20 Proteinsequenzierung</b>	<b>32</b>
<b>2.21 Enzymaktivitätsbestimmungen</b>	<b>33</b>
2.21.1 Lipoxygenase-Aktivität	33
2.21.1.1 Polarographische Messung der Lipoxygenase-Aktivität	33
2.21.1.2 Messung der Lipoxygenase-Aktivität mittels Produktanalyse	33
2.21.2 Phospholipase-Aktivitätsnachweis mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate	34
2.21.2.1 Aktivität an isolierten Lipidkörpern	34
2.21.2.2 Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 nach Expression in Insektenzellen	34
2.21.3 Phospholipase-Aktivitätsnachweis mittels Produktanalyse	35
2.21.4 Lipase-Aktivitätsnachweis mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate	35
2.21.5 DAG-DAG-Acyltransferase-Aktivitätsnachweis	36
2.21.5.1 Herstellung von radioaktiv markiertem Substrat	36
2.21.5.2 DAG-DAG-Acyltransferase-Aktivitätsnachweis	37
2.21.6 Steroidester-Hydrolaseaktivitätsnachweis	38
<b>2.22 Lipidextraktion</b>	<b>38</b>
2.22.1 Extraktion der Lipide nach Bligh und Dyer	38
2.22.2 Extraktion der Lipide mit n-Hexan/Isopropanol	38
<b>2.23 Methylierung von freien Fettsäuren</b>	<b>39</b>
<b>2.24 Transesterifizierung von veresterten Fettsäuren und Oxylipinen</b>	<b>40</b>
<b>2.25 „High performance liquid chromatography“(HPLC-) Analysen</b>	<b>40</b>
2.25.1 Trennung von Oxylipinen und Fettsäuren mittels RP-HPLC	40
2.25.2 Trennung von oxygenierten Triacylglyceriden mittels RP-HPLC	41
2.25.3 Trennung und Quantifizierung von Oxylipinen mittels SP-HPLC	42
<b>2.26 Analyse von Fettsäuremethylestern durch Gaschromatographie</b>	<b>42</b>
<b>2.27 Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid</b>	<b>43</b>
<b>2.28 GC/MS-Analyse von Pentafluorobenzylestern</b>	<b>43</b>
<b>2.29 Isolierung von Membranphospholipiden aus Lipidkörpern</b>	<b>44</b>
<b>2.30 Isolierung von Neutrallipiden und Glykolipiden aus Lipidkörpern</b>	<b>44</b>
<b>2.31 Dünnschichtchromatographie von Lipidkörperlipiden</b>	<b>45</b>
<b>2.32 Analyse von Neutrallipiden mittels LC/MS (TOF)</b>	<b>45</b>

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Die Zusammensetzung des Lipidkörpers im Gurkenkeimling</b>	<b>47</b>
3.1.1 Lipidkörper-assoziierte Proteine während der Keimlingsentwicklung	47
3.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung von CsPAT und CsLbLOX	49
3.1.3 Untersuchung der Phospholipaseaktivität am Lipidkörper	50
3.1.3.1 Ermittlung des pH-Optimums von CsPAT	51
3.1.3.2 Enzymaktivitäten am isolierten Lipidkörper	51
3.1.3.3 Zusammensetzung der Membranphospholipide	52
3.1.4 Untersuchung der Lipoxygenaseaktivität am Lipidkörper	54
3.1.5 Zusammensetzung der Neutrallipide	56
3.1.6 Zusammensetzung der Glykolipide des Lipidkörpers	60
3.1.7 <i>In vitro</i> Untersuchungen der CsPAT-abhängigen CsLbLOX-Aktivität	62
3.1.8 Überexpression von CsPAT und CsLbLOX in Tabakpflanzen	64
3.1.8.1 Immunochemischer Nachweis der CsPAT- und CsLbLOX-Expression	65
3.1.8.2 Nachweis von CsPAT und CsLbLOX auf genomischer Ebene in transgenen Tabakpflanzen	66
3.1.8.3 Oxylinprofil in Blättern nach Verwundung von CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten	67
3.1.8.4 Oxylinprofil von T2-Samen der CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten	71
3.1.9 Phylogenetische Analyse des CsPAT	75
3.1.10 Sequenzierung von Lipidkörperproteinen aus Gurkenkeimlingen	77
<b>3.2 Abbau von Speicherlipiden durch TGLs in Arabidopsis</b>	<b>78</b>
3.2.1 Ungerichtete Proteomanalyse von Lipidkörpern aus Arabidopsis-Keimlingen	78
3.2.2 Expression der mutmaßlichen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 in Insektenzellen	80
3.2.3 Untersuchung der TGL-Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2	81
3.2.4 Analyse von AtTGL1 und AtTGL2 auf weitere Enzymaktivitäten	83
3.2.4.1 DAG-DAG-Acyltransferaseaktivität	83
3.2.4.2 Phospholipaseaktivität	84
3.2.4.3 Steroidester-Hydrolaseaktivität	86
3.2.5 Trennung der in Insektenzellen exprimierten AtTGL1 und AtTGL2 von Insektenzellprotein mit TGL-Aktivität	87
3.2.6 Expression der mutmaßlichen TGL AtTGL1 und AtTGL2 in <i>Pichia pastoris</i>	90
<b>4. Diskussion</b>	<b>93</b>
<b>4.1 Mobilisierung der Speicherlipide in Gurkenkeimlingen</b>	<b>93</b>
4.1.1 Analyse der Zusammensetzung des Lipidkörpers	96
4.1.2 Phylogenetische Eingruppierung des CsPAT	106
4.1.3 Funktionelle Analyse der PLA <sub>2</sub> CsPAT in transgenen Tabakpflanzen	107
<b>4.2 Abbau von Speicherlipiden durch TGLs</b>	<b>111</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>115</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>126</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASG	acetyliertes Sterylglycosid
bp	Basenpaar
BSA	engl. bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	engl. complementary DNA
Cer	Cerebrosid
Cs	<i>Cucumis sativus</i> ; chinesische Schlangengurke
C-terminal	Carboxy-terminal
DAG	Diacylglycerin
DC	Dünnschichtchromatographie
DGD	Digalactosyldiacylglycerin
DNA	engl. deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
FAME	Fettsäuremethylester
FG	Frischgewicht
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
GC	Gaschromatographie
GFP	engl. green fluorescent protein
h	engl. hour(s) = Stunde
HPLC	engl. high pressure liquid chromatography = Hochdruckflüssigkeitschromatographie
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	bidestilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktosid
9-HOD	(9 <i>S</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> )-9-Hydroxy-10,12-octadecadiensäure
9-HOT	(9 <i>S</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> )-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatriensäure
13-H(P)OD	(13 <i>S</i> ,9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> )-13-Hydro(pero)xy-9,11-octadecadiensäure
13-H(P)OT	(13 <i>S</i> ,9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> )-13-Hydro(pero)xy-9,11,15-octadecatriensäure
JA	Jasmonsäure
kDa	Kilodalton
L.	Linné
LA	engl. linoleic acid = Linolsäure
LB	Luria Bertani
Lb	engl. lipid body = Lipidkörper
LC	engl. liquid chromatography = Flüssigkeitschromatographie
LK	Lipidkörper
LK-FG	Lipidkörper-Frischgewicht

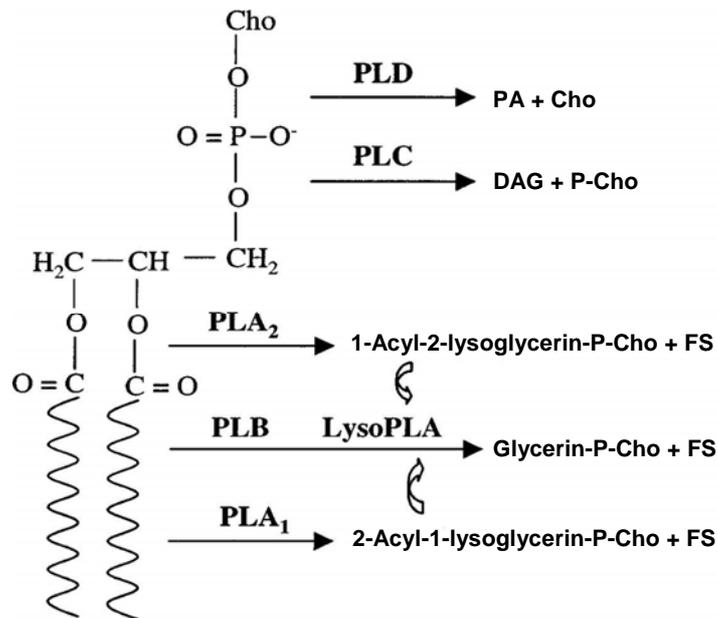
LOX	Lipoxygenase
LPC	Lysophosphatidylcholin
M	molar
mA	Milliampère
MAG	Monoacylglycerin
MGD	Monogalactosyldiacylglycerin
mM	millimolar
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NMR	engl. nuclear magnetic resonance spectroscopy = Kernspinresonanzspektroskopie
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
oPDA	12-Oxophytodiensäure
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PCR	engl. polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Phosphatidylinositol
PIP2	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PLA	Phospholipase A
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PS	Phosphatidylserin
R <sub>f</sub> -Wert	Retentionsfaktor
RP	engl. reverse phase
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
SG	Sterylglycosid
<i>sn</i>	stereospezifische Nummerierung
SP	engl. straight phase
T	transgen
TAG(s)	Triacylglycerin(e)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-tetrametylendiamin
TGL(s)	Triacylglycerin-Lipase(n)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
USP	engl. unknown seed protein
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	engl. weight per volume = Gewicht pro Volumen

## 1. Einleitung

Während des Lebenszyklus von Pflanzen zeichnen sich diverse Entwicklungsprozesse unter anderem durch Veränderungen der intrazellulären Lipidzusammensetzung aus. Der Lebenszyklus der Samenpflanzen beginnt mit der Keimung, die in Ölsaaten durch die Mobilisierung von Speicherlipiden charakterisiert ist (Gerhardt, 1993). Speicherlipide setzen sich überwiegend aus Triacylglycerinen (TAGs) zusammen. Diese werden der Gruppe der Glycerolipide zugerechnet, so dass der erste abbauende Schritt durch lipolytische Enzyme erfolgt. Hierbei wird in einer Esterasereaktion die Esterbindung zwischen Glycerin und Fettsäure hydrolysiert. Die Familie der Lipasen kann man aufgrund ihrer Kopfgruppenspezifität für verschiedene Substrate unterteilen.

### 1.1 Phospholipasen

Phospholipasen sind hydrolysierende Enzyme des Katabolismus von Phospholipiden, die neben dem Umbau und Abbau der Phospholipide über die Freisetzung von Lipidmetaboliten an der Regulation physiologischer Prozesse beteiligt sind (Rhee und Bae, 1997; Assmann und Shimazaki, 1999; Williams, 1999; Liscovitch *et al.*, 2000). Die Aktivierung von Phospholipasen stellt dabei oft den initialen Schritt zur Generierung von Signalmolekülen, sogenannten „second messenger“, dar. Phospholipasen lassen sich entsprechend der Stellen, an denen sie die Phospholipide hydrolysieren, in Phospholipase D (PLD; E.C. 3.1.4.4), C (PLC; E.C. 3.1.4.3), A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>; E.C. 3.1.1.4), A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>; E.C. 3.1.1.32) und B (PLB; E.C. 3.1.1.5) klassifizieren (Abb. 1). PLD und PLC sind Phosphodiesterasen, während es sich bei PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub> und PLB um Acylhydrolasen handelt, welche die Acylesterbindung spezifisch am C1- oder C2-Atom des Glycerins bzw. im Fall von PLB beide Acylesterbindungen eines Phospholipids nacheinander hydrolysieren. Eine nahe verwandte Klasse von Enzymen beinhaltet die Lysophospholipasen (LysoPLAs; E.C. 3.1.1.5), die die Produkte der PLAs hydrolysieren (Abb. 1). Auf der Basis ihrer Sequenzen und/oder biochemischen Eigenschaften können die einzelnen Phospholipaseklassen in weitere Unterfamilien aufgeteilt werden (Wang, 2001).



**Abb. 1 Hydrolyse von Phosphatidylcholin durch PLD, PLC, PLA<sub>2</sub>, PLA<sub>1</sub>, PLB und LysoPLA und die entsprechenden Reaktionsprodukte (Wang, 2001).** Die Pfeile für PLD, PLC und PLA<sub>2</sub> geben, im Gegensatz zu den Pfeilen für PLB, LysoPLA und PLA<sub>1</sub>, die Stellen der jeweiligen Hydrolyse an. PLA<sub>1</sub> hydrolysiert die sn-1-Acylesterbindung, während LysoPLA die letzte Fettsäure (FS) von Lysophospholipiden entfernt, die durch PLA<sub>2</sub> und PLA<sub>1</sub> entstanden sein können (gedrehte Pfeile). PLB hydrolysiert nacheinander die Acylesterbindungen von zwei FS und die Reaktionsprodukte entsprechen denen von LysoPLA. Cho, Cholin; P-Cho, Phosphocholin, DAG, Diacylglycerin; PA, Phosphatidsäure.

### 1.1.1 Phospholipase A<sub>2</sub>

Bei Tieren können die PLA<sub>2</sub>s vereinfacht in vier Gruppen unterteilt werden: die sekretorischen PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>), die zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PLA<sub>2</sub>s (cPLA<sub>2</sub>), die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen PLA<sub>2</sub>s (iPLA<sub>2</sub>) und die „Platelet Activating Factor“-spezifischen Acylhydrolasen (PAF-PLA<sub>2</sub>) (Meijer und Munnik, 2003). Aufgrund ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit werden nur die iPLA<sub>2</sub>s detaillierter beschrieben. Im Tierreich haben diese Enzyme eine Größe von durchschnittlich 85 kDa und weisen neben der Lipasekonsensussequenz (GX<sub>2</sub>SXG) ein mögliches ATP-bindendes Motiv auf. Sie benötigen direkt keine Kalziumionen für ihre Aktivität, werden aber durch Calmodulin oder durch Änderungen in der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert (Akiba und Sato, 2004). Die iPLA<sub>2</sub>s induzieren bei Tieren die Freisetzung von Arachidonsäure und Lysophospholipid und sind somit an der Eicosanoidsynthese beteiligt, welches auf eine Funktion in der Entzündungs- und Immunantwort schließen lässt (Maggi *et al.*, 2002).

In Pflanzen weisen die heute bekannten intrazellulären PLAs auf der Ebene der Aminosäuresequenz Ähnlichkeit mit Patatinen und den iPLA<sub>2</sub>s der Tiere auf. Patatine wurden ursprünglich als eine Gruppe eng verwandter Speicherproteine in der Kartoffelknolle (*Solanum tuberosum*) beschrieben. Sie besitzen Acylhydrolaseaktivität und wurden zuerst als vakuoläre Glykoproteine identifiziert (Hirschberg *et al.*, 2001; Shewry, 2003). Neben drei Patatin-ähnlichen PLA<sub>2</sub>-Isoformen, die aus Tabakblättern (*Nicotiana tabacum*) isoliert werden konnten (Dhondt *et al.*, 2000), wurden Patatin-ähnliche Phospholipasen auch in dem Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) und der Augenbohne (*Vigna unguiculata*) gefunden (Sowka *et al.*, 1998; Matos *et al.*, 2001). Die Größe dieser Proteine liegt zwischen 40 und 48 kDa. Desweiteren konnten ein nach Elicitoreinwirkung induziertes zytosolisches Enzym aus Kartoffel und ein während der Keimung an Lipidkörpern der Gurke (*Cucumis sativus*) auftretendes Protein als Patatin-ähnliche PLAs identifiziert werden (Senda *et al.*, 1996; May *et al.*, 1998). Letzteres wird als ein wesentliches Objekt dieser Arbeit in 1.5 ausführlicher erläutert. In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) sind zehn verschiedene Isoformen Patatin-ähnlicher PLAs bekannt (*AtPLA*), die aufgrund ihrer Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz, der Größe und der Intron-Exonsequenzen der Gene in drei Gruppen eingeteilt werden (Holk *et al.*, 2002). Nach Isolierung der cDNA der vier Patatin-ähnlichen PLAs, *AtPLA* IA, *AtPLA* IIA, *AtPLA* IVA und *AtPLA* IVC, konnten diese Enzyme im Zytosol lokalisiert werden. Für *AtPLA* IVA und *AtPLA* IIA wurde zusätzlich PLA-Aktivität nachgewiesen, und Inhibitorstudien führten zu der Annahme, dass die *AtPLA*-Familie eine Funktion in der Auxinsignaltransduktion besitzt (Holk *et al.*, 2002; Rietz *et al.*, 2004).

## 1.2 Triacylglycerin-Lipasen

Triacylglycerin-Lipasen (TGLs; E.C. 3.1.1.3) katalysieren die Hydrolyse von TAGs zu Glycerin und freien Fettsäuren. In Pflanzen findet man diese Enzyme insbesondere in den fettspeichernden Organen, den Samen, Pollen und in einigen Fällen auch den Wurzeln oder Blättern. Bisher wurden nur die TGLs aus Samen näher untersucht, da sie in diesem Organ in ausreichender Menge für eine biochemische Analyse zugänglich sind (Huang, 1993).

Während der Keimung sind die TGLs für die Hydrolyse der in den Lipidkörpern fettreicher Samen gespeicherten TAGs verantwortlich. Je nach Pflanzenspezies kann die

entsprechende TGL direkt am Lipidkörper oder auch in anderen subzellulären Kompartimenten wie in den Glyoxysomen und im Zytosol lokalisiert sein (Huang, 1993).

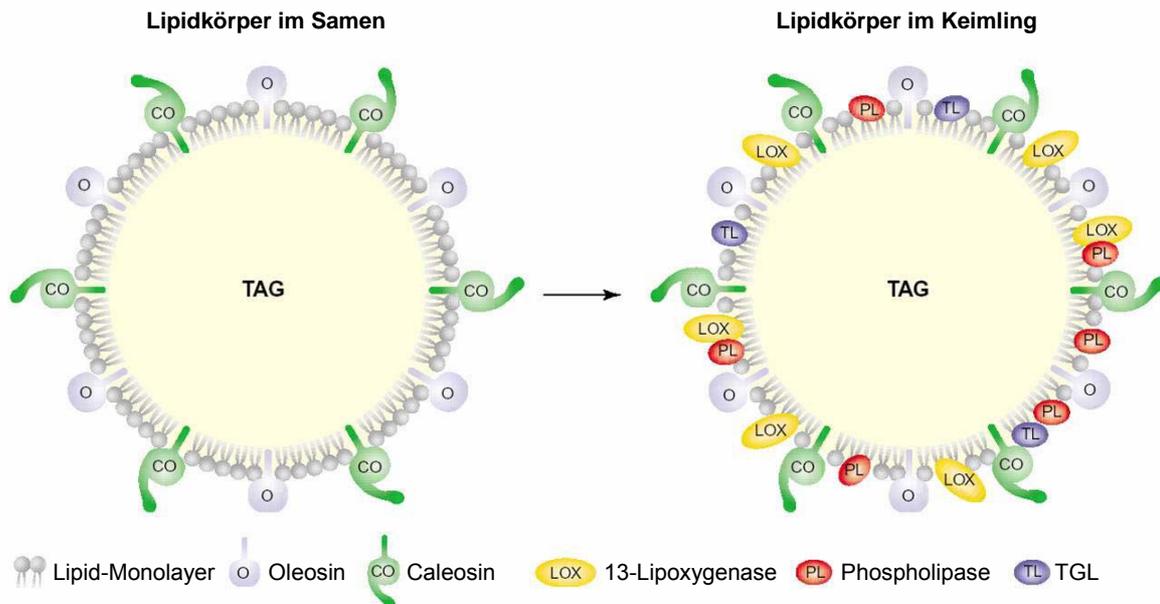
Alle bisher untersuchten TGLs zeigen keine Aktivität im ruhenden Samen, sondern werden erst während der Keimung aktiv (Huang, 1993). Eine Ausnahme bildet dabei die saure TGL aus Ricinussamen (*Ricinus communis*; Ory, 1969; Altaf *et al.*, 1997; Eastmond, 2004). Unterschiede findet man jedoch in der Substratspezifität, dem pH-Optimum, der Hydrophobizität des Moleküls, der Reaktivität gegenüber Sulfhydrylgruppen und der bereits erwähnten subzellulären Verteilung der Enzyme (Huang, 1993).

Diverse TGLs, die in den Samen verschiedener Ölsaaten nachgewiesen wurden, einschließlich der TGLs aus Ricinus-, Mais- (*Zea mays*), Raps- (*Brassica napus*), Senf- (*Sinapsis* spp.) und Jojobasamen (*Simmondsia chinensis*), konnten an der Membran von Lipidkörpern lokalisiert werden. 50 - 80 % der TGL-Aktivität eines Samenextraktes können mit der Lipidkörperfraktion assoziiert sein, trotzdem dürfte die Proteinmenge der TGLs an diesem Organell eher gering sein (Huang, 1993).

Bisher konnten TGLs aus Samen von Pflanzen wie Mais (Lin und Huang, 1984), Ricinus (Maeshima und Beevers, 1985; Fuchs *et al.*, 1996), Raps (Fuchs, 1994) und *Vernonia galamensis* (Ncube *et al.*, 1995) gereinigt werden. In der jüngsten Vergangenheit wurden erste Gene kloniert, die für Proteine mit TGL-Aktivität kodieren (Eastmond, 2004; Matsui *et al.*, 2004; El-Kouhen *et al.*, 2005; Padham *et al.*, 2007), wobei zu Beginn dieser Arbeit für kein TGL-Gen gezeigt worden war, dass es eine physiologische Rolle bei der Hydrolyse von Speicherlipiden während der Keimung spielt. Kürzlich konnte jedoch in *A. thaliana* mit Hilfe von Mutantanalysen das Gen *SDPI* identifiziert werden, das für eine TGL kodiert, die eine Patatin-ähnliche Acylhydrolasedomäne aufweist und die Mobilisierung der Speicherlipide in Keimlingen initiiert (Eastmond, 2006). Desweiteren wurde in dem Genom von *A. thaliana* eine TGL-Gen-Familie mit neun Mitgliedern identifiziert, von der die zwei mutmaßlichen keimungsspezifischen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 lipolytische Aktivität zeigten (Körner, 2005). Homologievergleiche ergaben, dass diese beiden TGLs auf der Ebene der Aminosäuren 88 % identisch sind. Nach heterologer Expression in *E. coli* konnte für AtTGL1 und AtTGL2 eine lipolytische Aktivität gegenüber TAGs detektiert werden. Die TGL-Aktivität dieser beiden Proteine konnte zusätzlich durch die Komplementation der TGL-defizienten Hefemutante  $\Delta tgl3$  nachgewiesen werden (Körner, 2005).

### 1.3 Lipidkörper

In fettreichen Samen werden die TAGs als Speicherlipide in den sogenannten Lipidkörpern gelagert und dienen als alleinige Kohlenstoffquelle in den Anfangsstadien der Keimung. Lipidkörper, die früher auch als Sphärosomen oder Oleosomen bezeichnet wurden, sind sphärische Organellen mit einem Durchmesser von 0,5 - 2  $\mu\text{m}$ . Sie bestehen aus einer TAG-Matrix, die von einer Phospholipideinfachmembran begrenzt wird (Abb. 2; Kindl, 1987), und werden während der Samenreifung am endoplasmatischen Retikulum gebildet (Wanner *et al.*, 1981; Huang, 1992; Murphy, 2001). Proteine, die in dieser Membran lokalisiert sind, haben sowohl strukturelle als auch enzymatische Funktionen (Kindl, 1987). Die dominierenden Proteine am Lipidkörper sind die Oleosine. Sie können bis zu 8 % (w/w) des Gesamtproteins im Samen ausmachen und nehmen nicht nur den größten Anteil der Lipidkörperproteine ein, sondern sind in ihrem Vorkommen auch auf dieses Organell beschränkt (Huang, 1994; Murphy *et al.*, 2001). Es handelt sich um hydrophobe, alkalische Proteine ( $\text{pI} < 6,2$ ) mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 26 kDa. Oleosine bedecken die gesamte Oberfläche der Lipidkörper und haben vermutlich eine strukturelle Funktion. Aufgrund der Wechselwirkung der Oleosine mit den Phospholipiden wird eine stabile amphipathische Schicht auf der Oberfläche der TAGs gebildet, welche die Integrität der Lipidkörper aufrecht erhält und verhindert, dass sie miteinander fusionieren (Huang, 1994). Desweiteren wird vermutet, dass Oleosine als Ankerproteine für Enzyme dienen, die während der Keimung neu synthetisiert werden und an der Metabolisierung der Speicherlipide beteiligt sind. Diese Funktion wird auch für die Caleosine angenommen, weitere Strukturproteine des Lipidkörpers, die eine konservierte C-terminale phosphatbindende sowie eine konservierte N-terminale kalziumbindende Domäne aufweisen (Abb. 2; Chen *et al.*, 1999). Kürzlich konnte mit Hilfe von Arabidopsis-Insertions-Mutanten gezeigt werden, dass Caleosin am Abbau der Speicherlipide während der Keimung beteiligt ist. Die Rolle des Caleosins bezieht sich dabei sowohl auf die Modifikation der Membran der Speichervakuole als auch auf die Interaktion der Lipidkörper mit den Speichervakuolen (Poxleitner *et al.*, 2006). Ein weiteres Protein, das nur in geringen Mengen am Lipidkörper gefunden werden kann, zeigt eine Steroidbindedomäne sowie Dehydrogenase/Reduktase-Aktivität und wird als Steroleosin bezeichnet. Es wird vermutet, dass Steroleosine an der Signaltransduktion beteiligt sind (Lin *et al.*, 2002).



**Abb. 2 Zusammensetzung der Lipidkörper während der Keimung von *Cucumis sativus* (nach Feussner *et al.*, 2001).** Lipidkörper bestehen aus Triacylglycerinen (TAG), die von einer Phospholipideinfachmembran begrenzt werden. In ruhenden Samen können die zwei integralen Membranproteine Oleosin und Caleosin gefunden werden. Während der Keimung werden mindestens drei weitere Proteine an der Lipidkörpermembran detektierbar: eine 13-Lipoxygenase, eine Patatin-ähnliche Phospholipase und eine Triacylglycerin-Lipase (TGL).

Während die Oleosine permanent am Lipidkörper nachweisbar sind, können andere Proteine nur zu bestimmten Entwicklungsstadien der Pflanze an diesem Organell gefunden werden. Insbesondere während der Keimung wird der Lipidkörper mit einem neuen Satz von Proteinen ausgestattet, die überwiegend Funktionen beim Abbau der Speicherlipide einnehmen, wie z.B. TGLs und Phospholipasen (Abb. 2). Eine zentrale Rolle besitzen hierbei die TGLs, die nach ihrer *de novo* Synthese im Zytosol an die Lipidkörper binden und dort die TAGs hydrolysieren (Huang, 1992). An der Lipidkörpermembran von Gurkenkeimlingen können während der Keimung neben einer TGL eine Lipoxygenase (LOX) und eine Phospholipase nachgewiesen werden (Kindl, 1997), die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

## 1.4 Mobilisierung von Speicherlipiden während der Keimung

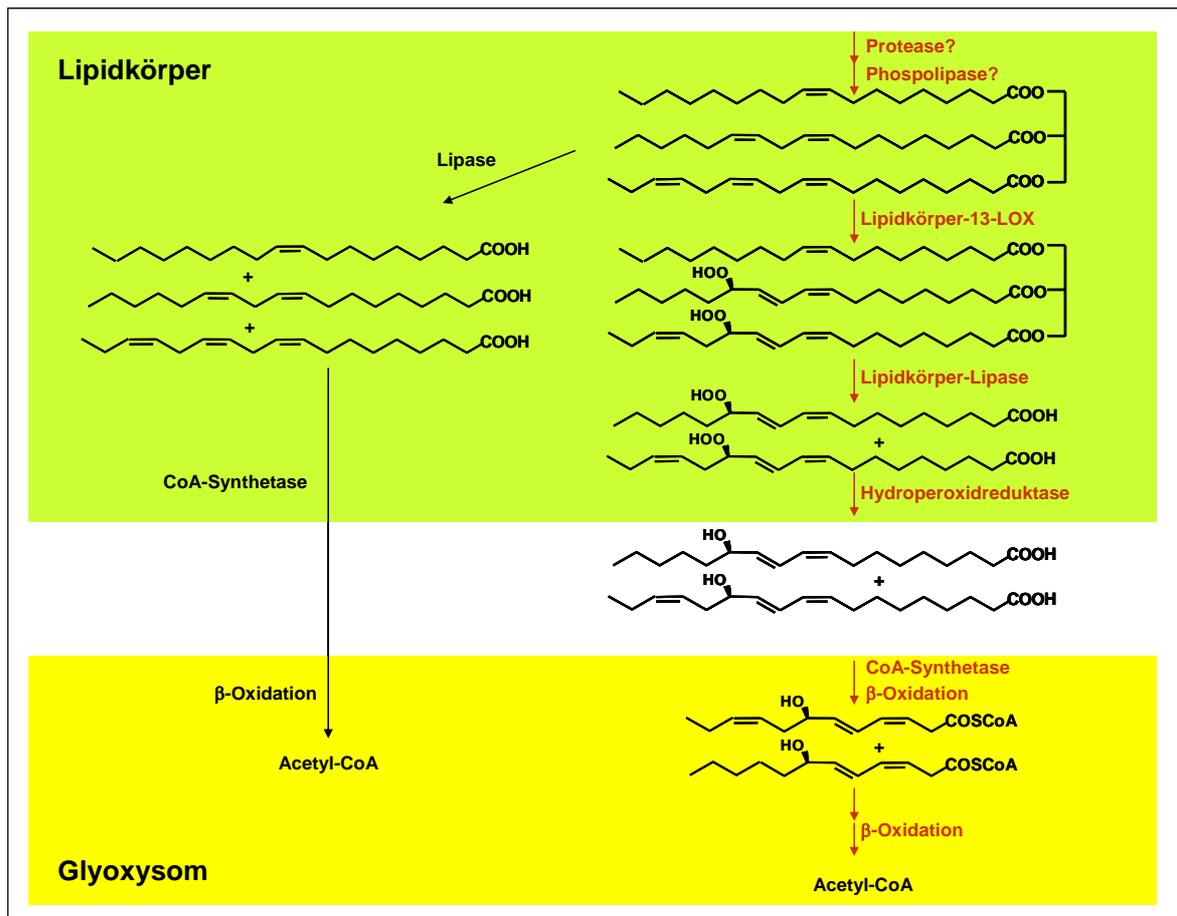
Die klassische Mobilisierung der Speicherlipide erfolgt über TGLs, die an der Membran der Lipidkörper lokalisiert sind und mit hoher Selektivität TAGs zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysieren (Abb. 3; Adlercreutz *et al.*, 1997). Die freigesetzten Fettsäuren werden anschließend in spezialisierte Peroxisomen, sogenannte Glyoxysomen, transportiert und dort als aktivierte CoA-Thioester mittels  $\beta$ -Oxidation in Acetyl-CoA-Moleküle abgebaut. Letztere werden im Keimling über den Glyoxylatzyklus für die Gluconeogenese verwendet (Kindl, 1984).

Parallel dazu wurde eine alternative Möglichkeit der Speicherlipidmobilisierung beschrieben, die auf dem Nachweis einer spezifischen, an der Lipidkörpermembran lokalisierten Lipoxygenase (LOX) in Gurken-, Anis- (*Pimpinella anisum*), Sonnenblumen- (*Helianthus annuus*), und Sojakeimlingen (*Glycine max*) basiert (Abb. 2; Feussner *et al.*, 1997b). LOXen (E.C. 1.13.11.12) bilden eine umfangreiche Familie von Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen, welche den Einbau von Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die ein oder mehrere (1Z, 4Z)-Pentadiensysteme enthalten, katalysieren, welches zu den entsprechenden ungesättigten, konjugierten Hydroperoxy-Säuren führt (Brash, 1999; Feussner und Kühn, 2000).

In frühen Stadien der Keimung wird in Gurkenkeimlingen eine LOX *de novo* synthetisiert und zum Lipidkörper transportiert (Feussner und Kindl, 1992). Anhand immunzytologischer Studien konnte dieses Enzym schon am ersten Tag der Keimung an der Lipidkörpermembran nachgewiesen werden (Feussner *et al.*, 1996). Im weiteren Verlauf der Keimung erfolgt eine kontinuierliche Zunahme in der Proteinmenge der LOX, welche am dritten Tag ein Maximum erreicht und anschließend wieder zurückgeht. Zum Zeitpunkt der maximalen Proteinmenge ist dieses Enzym eines der dominierenden Proteine am Lipidkörper und weist unter den Proteinen des Keimlings eine der höchsten Neusyntheseraten auf (Sturm *et al.*, 1985). Die in Gurkenkeimlingen nachgewiesene LOX zeichnet sich durch ein alkalisches pH-Optimum zwischen 7,2 und 8,5 (Feussner und Kindl, 1994; Feussner *et al.*, 1998) sowie durch eine ungewöhnliche Produktspezifität aus. Das Enzym oxygeniert Linol- bzw. Linolensäure zu (13S,9Z,11E)-13-Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure (13-HPOD) bzw. zu (13S,9Z,11E,15Z)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure (13-HPOT). Desweiteren ist diese LOX in der Lage *in vitro* Trilinolein direkt zu Mono-, Di- und Tri-13-HPOD-Derivaten zu oxygenieren (Feussner *et al.*, 1995; Feussner *et al.*, 1997a; Feussner *et al.*, 1998).

Aufgrund von Fraktionierungsstudien von Speicherlipiden und Analysen von Lipidkörpern verschiedener Keimungsstadien wurde ein alternatives Modell für die Mobilisierung der Speicherlipide in Pflanzen vorgeschlagen (Abb. 3; Feussner *et al.*, 1997b; Kindl, 1997; Feussner *et al.*, 2001). Als erster Schritt muß dabei die Integrität der Lipidkörpermembran zerstört werden, welches durch zwei nacheinander oder gleichzeitig ablaufende Reaktionen ermöglicht werden könnte: zum einen könnte ein proteolytischer Abbau der strukturellen Proteine des Lipidkörpers, der Oleosine, stattfinden (Matsui *et al.*, 1999; Vandana und Bhatla, 2006) und zum anderen könnte die Phospholipideinfachmembran partiell durch eine Phospholipase abgebaut werden (Noll *et al.*, 2000). Nach der teilweisen Zerstörung der Einfachmembran erhält die am Lipidkörper assoziierte LOX Zugang zu ihrem Substrat, den in der Matrix lokalisierten TAGs, so dass dieses Enzym die Linolsäurereste der Lipide zu den entsprechenden 13-HPOD-Derivaten oxygenieren kann. Letzteres konnte durch die Akkumulation großer Mengen an LOX-Produkten in der TAG-Fraktion von Lipidkörpern nachgewiesen werden (Feussner *et al.*, 1997a). Im weiteren Verlauf des Abbaus der Speicherlipide werden die veresterten Hydroperoxyfettsäuren durch eine für diese Modifikation hoch spezifische TGL freigesetzt. Für Lipidkörper aus Gurkenkeimlingen konnte diese spezifische TGL genauer beschrieben werden (Balkenhohl *et al.*, 1998; Balkenhohl, 2000) und auch in anderen Ölsaaten wie Ricinus, Kürbis (*Cucurbita* spp.), Ringelblume (*Calendula officinalis*), Sonnenblume, *Vernonia* und Lein (*Linum usitatissimum*) wurden nur oxygenierte Fettsäuren durch die jeweilige TGL hydrolysiert (Adlercreutz *et al.*, 1997; Balkenhohl *et al.*, 1998). Die freien Hydroperoxyfettsäuren werden anschließend durch eine Reduktase zu den entsprechenden freien Hydroxyfettsäuren reduziert (Feussner *et al.*, 1995). In Gurkenkeimlingen wurde dieses Enzym jedoch bisher nicht identifiziert. In neuesten Arbeiten konnten für Caleosine aus *A. thalina* und Reis (*Oryza sativa*) eine hydroperoxidabhängige Monooxygenase-Aktivität gezeigt werden (Hanano *et al.*, 2006), so dass sich vermuten lässt, dass Caleosine generell für die Reduktion der freien Hydroperoxyfettsäuren während der Keimung verantwortlich sind. Die freien Hydroxyfettsäuren stellen dann das eigentliche endogene Substrat für die  $\beta$ -Oxidation dar und werden wie bereits beschrieben zu Acetyl-CoA abgebaut (Gerhardt *et al.*, 2005).

Die Studien zum Abbau von Speicherlipiden in Keimlingen von Ölsaaten zeigen, dass sowohl der klassische LOX-unabhängige als auch der LOX-abhängige Abbauweg existieren, wobei noch unklar ist, ob einer der beiden Stoffwechselwege bevorzugt während der Keimung verwendet wird (Feussner *et al.*, 2001). Es hat jedoch den



**Abb. 3 Schematische Darstellung der Stoffwechselwege zum Abbau von Speicherpolyenylipiden während der Keimung von Pflanzen (nach Feussner *et al.*, 2001).** Schwarze Pfeile geben den klassischen glyoxysomalen oder peroxysomalen Abbau freier Fettsäuren wieder. Rote Pfeile zeigen den alternativen 13-LOX-abhängigen Abbauweg von Polyensäuren.

Anschein, dass verschiedene Pflanzenarten jeweils einen der beiden Abbauwege favorisieren. Der klassische LOX-unabhängige Abbauweg scheint z.B. von Mais- und Raps-Keimlingen bevorzugt verwendet zu werden (Huang, 1993; Fuchs *et al.*, 1996), wohingegen der LOX-abhängige Weg in Gurken-, Sonnenblumen- und Leinkeimlingen vorzufinden ist (Feussner *et al.*, 2001).

## 1.5 Zugänglichkeit des Lipidkörpers für lipidmobilisierende Enzyme

Zur Mobilisierung der in den Lipidkörpern gespeicherten TAGs muß zunächst die Integrität der Lipidkörpermembran zerstört werden, damit die lipidmobilisierenden Enzyme, wie die LOX oder die TGL, Zugang zu ihren Substraten erhalten. Bisher konnten wie schon erwähnt Hinweise gefunden werden, dass einerseits ein proteolytischer Abbau der strukturellen Lipidkörperproteine, der Oleosine, stattfindet (Matsui *et al.*, 1999; Vandana und Bhatla, 2006) und andererseits die Phospholipideinfachmembran partiell durch eine Patatin-ähnliche Phospholipase abgebaut wird (Noll *et al.*, 2000).

In Gurkenkeimlingen konnte ein Patatin-ähnliches Protein mit PLA<sub>2</sub>-Aktivität identifiziert werden, welches zu frühen Stadien der Lipidkörpermobilisierung *de novo* synthetisiert und zum Lipidkörper transportiert wird (May *et al.*, 1998). Es handelt sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 44,8 kDa, das eine Homologie zu Patatin, dem vakuolären Speicherprotein der Kartoffel, aufweist und in dieser Arbeit mit CsPAT bezeichnet wird. Eine Immunodetektion in subzellulären Fraktionen von Gurkenkeimlingen ergab, dass das Patatin-ähnliche Protein CsPAT ausschließlich in der Lipidkörperfraktion zu finden war. Desweiteren konnte CsPAT zu frühen Stadien der Keimung zwischen 38 und 72 h Keimungszeit nachgewiesen werden. Dieses definierte zeitliche Auftreten entspricht dem der am Lipidkörper lokalisierten LOX während der Keimung (Höhne *et al.*, 1996; May *et al.*, 1998). Bezogen auf die gesamten Lipidkörper-assoziierten Proteine ist der Anteil an CsPAT eher gering. Die für CsPAT nachgewiesene hydrolytische Aktivität gegenüber Phospholipiden ist jedoch so hoch, dass eine Funktion dieses Enzyms beim partiellen Abbau der Lipidkörpermembran liegen könnte. Die gemessene PLA<sub>2</sub>-Aktivität ist dabei gegenüber Phosphatidylcholin (PC) mit Palmitinsäure-, Linolsäure- bzw. hydroperoxygenierten Linolsäureresten in der *sn2*-Position als Substrat gleich hoch (May *et al.*, 1998).

Ein weiteres Indiz für den partiellen Abbau der Phospholipideinfachmembran des Lipidkörpers während der Keimung konnte durch die Untersuchung der Lipidkörperoberfläche von Gurkenkeimlingen mittels Rasterkraftmikroskopie gefunden werden: in dem Stadium der maximalen CsPAT-Expression, nach 60 h Keimungszeit, weist die Lipidkörpermembran Öffnungen mit einer durchschnittlichen Breite von 80 nm und einer durchschnittlichen Tiefe von 2,45 nm auf. Die gemessene Tiefe der Öffnungen stimmt mit der Stärke von Phospholipideinfachmembranen überein und die Breite ist ausreichend, um

einem Enzym von 100 kDa, wie der LOX oder TGL, den Zugang zu ihren Substraten im Inneren der Lipidkörper zu ermöglichen (Noll *et al.*, 2000).

In Sonnenblumenkeimlingen konnte der Abbau von PC als ein Bestandteil der Lipidkörpermembran bei gleichzeitiger Akkumulation des Abbauproduktes Lysophosphatidylcholin (LPC) während der Keimung demonstriert werden. Zusätzlich wurde *in vivo* PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Keimblattprotoplasten ab 48 h Keimungszeit nachgewiesen, welche zur Zeit der maximalen Lipolyse, nach 96 h Keimungszeit, noch verstärkt war (Gupta und Bhatla, 2007). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass auch in Sonnenblumenkeimlingen eine PLA<sub>2</sub> an Veränderungen der Lipidkörpermembran beteiligt ist und dadurch die Membran zugänglich für lipidmobilisierende Enzyme wird. Das entsprechende Gen bzw. Protein, das für den Abbau der Phospholipide verantwortlich ist, konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden.

Basierend auf dem Abbau der Oleosine, der die Mobilisierung der Speicherlipide begleitet, wurde eine mögliche proteolytische Aktivität vorgeschlagen (Huang, 1992). Untersuchungen von Lipidkörpern aus Gurkenkeimlingen haben ergeben, dass Lipidkörper-assoziierte Proteine wie Oleosine ab 48 h nach Beginn der Keimung abgebaut werden und nach 120 h fast ganz verschwunden sind (Matsui *et al.*, 1999). Der partielle Verdau der Lipidkörperproteine von Gurkenkeimlingen mit Trypsin führte zu der Initiierung der Hydroperoxygenierung der Speicherlipide durch die Lipidkörper-assoziierte LOX. Dabei war die LOX-Aktivität umso höher, je höher die eingesetzte Trypsinkonzentration war (Matsui *et al.*, 1999). Dieses weist darauf hin, dass durch das Entfernen von Proteinen, die die Oberfläche der Lipidkörper bedecken, der LOX der Zugang zu den TAGs gewährt wird. In Rapskeimlingen konnte der teilweise Abbau von Oleosin-Isoformen von 19 kDa- zu 16 kDa-Fragmenten kurz vor dem kompletten Abbau der Lipidkörper beobachtet werden, welches nicht zwangsläufig zu einer Störung der Integrität der Lipidkörpermembran führen muß, jedoch die Zugänglichkeit des Lipidkörpers für lipidmobilisierende Enzyme erhöhen könnte (Murphy, 2001). Kürzlich konnte in Sonnenblumenkeimblättern die Aktivität einer 65 kDa-großen, zytosolischen Thiolprotease nachgewiesen werden, die möglicherweise für den graduellen Abbau der Oleosine während der Keimung verantwortlich ist. Dieses Enzym tritt zeitgleich mit dem Abbau der Oleosine auf und zeigt maximale Proteaseaktivität in 96 h-alten Keimblättern, also zur Zeit der maximalen Lipolyse (Vandana und Bhatla, 2006).

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die Vorgänge, die die Zugänglichkeit der Lipidkörper für lipidmobilisierende Enzyme ermöglichen und damit den Abbau der Speicherlipide in den Lipidkörpern von Ölsaaten initiieren, bisher nicht im Detail bekannt sind. Die gefundenen Hinweise über den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran durch Phospholipasen und den proteolytischen Abbau der Lipidkörperproteine geben keinen Aufschluss darüber, ob diese beiden Prozesse parallel oder nacheinander ablaufen bzw. ob in Abhängigkeit von der Pflanzenart nur ein Prozess stattfindet.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand vorwiegend darin, den LOX-abhängigen Abbauweg der Speicherlipide in den Lipidkörpern von Gurkenkeimlingen im Detail näher zu charakterisieren. Ein besonderer Fokus lag bei den frühen Prozessen der Keimung, die die Zugänglichkeit der Lipidkörper für die lipidmobilisierenden Enzyme ermöglichen. Es wurde die Arbeitshypothese formuliert, dass die Aktivität der Patatin-ähnlichen PLA<sub>2</sub>, CsPAT (May *et al.*, 1998) zum partiellen Abbau der Phospholipideinfachmembran des Lipidkörpers führt und damit die Speicherlipide als Substrat für die Lipoxygenierungsreaktion zur Verfügung stehen. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten das Vorkommen von CsPAT und der Nachweis von PLA<sub>2</sub>-Aktivität an isolierten Lipidkörpern in einen zeitlichen Rahmen mit dem Auftreten der am Lipidkörper lokalisierten LOX und der entsprechenden Aktivität während der Keimung eingeordnet werden. Untersuchungen der Zusammensetzung der Membranphospholipide des Lipidkörpers und der Hydroperoxygenierung von Speicherlipiden sollten weiteren Aufschluss über den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran und den Abbau der TAGs liefern. In einem *in vitro* Ansatz sollte darüber hinaus die Fragestellung behandelt werden, ob die Aktivität der am Lipidkörper lokalisierten LOX direkt von der Aktivität des Patatin-ähnlichen Proteins CsPAT abhängig ist. Mit Hilfe der transgenen Expression von CsPAT und der Lipidkörper-LOX in Tabakpflanzen sollte überprüft werden, ob durch das Einbringen von CsPAT allein oder in Kombination mit der Lipidkörper-LOX ein vorzeitiger Abbau der Speicherlipide und/oder die Akkumulation von Lipidhydroperoxiden im Samen erreicht werden kann.

Anschließende Experimente konzentrierten sich auf die Identifizierung der Aminosäuresequenz der in Gurkenkeimlingen beschriebenen spezifischen TGL, die für die

Hydrolyse der oxygenierten TAGs verantwortlich ist (Balkenhohl *et al.*, 1998; Balkenhohl, 2000), und auf die Charakterisierung der mutmaßlichen keimungsspezifischen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 in *A. thaliana* (Körner, 2005).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Fermentas (St.Leon-Rot), Acros Organics (Geel, Belgien), Baker (Griesheim) und Macherey-Nagel (Düren) bezogen.

### 2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

#### 2.2.1 Anzucht von *Cucumis sativus*-Keimlingen

Samen von *C. sativus* L., var. chinesische Schlangengurke, wurden für 1 h in Wasser eingeweicht und anschließend auf feuchtem Filterpapier ausgelegt. Die Keimung der Samen erfolgte bei 28 °C unter 100 % Luftfeuchtigkeit im Dunkeln. Die Keimblätter wurden nach unterschiedlichen Keimungszeiten geerntet und sofort zur Isolierung der Lipidkörper verwendet (2.9). Das Saatgut wurde von der Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH (Christensen) bezogen.

#### 2.2.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen

Für die Anzucht von *A. thaliana* L., var. Columbia (Col-0) wurden oberflächensterilisierte Samen verwendet. Zur Oberflächensterilisation wurden 2 g Samen mit 30 ml 70 %-igem Ethanol (v/v) versetzt und für 3 min langsam geschüttelt. Nach dem Absinken der Samen wurde das Ethanol abgenommen und die Samen zweimal in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Saatgut in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen und auf sterilem Filterpapier ausgelegt. Die Samen wurden bei 23 °C im Dunkeln inkubiert. Die gesamten Keimlinge wurden nach unterschiedlichen Keimungszeiten geerntet und sofort zur Isolierung der Lipidkörper verwendet (2.9).

### 2.2.3 Anzucht von *Nicotiana tabacum*-Pflanzen

Für die Anzucht von *N. tabacum* L. var. Samsun NN (SNN) im Gewächshaus wurde Saatgut direkt auf Erde (EP Nr. 340 Fruhstorfer Erde, Firma Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach-Wallenrad) ausgelegt. Vor Gebrauch wurde die Erde durch 6-stündiges Erhitzen auf 80 °C keimarm gemacht. Die Pflanzen wurden unter Langtagsbedingungen (16 h 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Licht, 22 °C) angezogen.

Für die Anzucht von *N. tabacum* auf MS-Festmedium wurden 2,2 g/l (1/2x MS) MS-Mischung (Duchefa, Haarlem, Niederlande; Murashige und Skoog, 1962) und 7 g/l Mikroagar mit destilliertem Wasser versetzt. Dem Medium wurde 1 % Saccharose (w/v) hinzugefügt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 5,7 eingestellt. Für die Selektion transgener Pflanzen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ca. 60 °C zusätzlich Kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) bzw. Phosphinotricin (Basta, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) zugefügt.

### 2.2.4 Verwundung von *N. tabacum*

Zur Verwundung von *N. tabacum* wurden drei Blätter im oberen Bereich der Pflanze mit einem Korkbohrer behandelt. Die erhaltenen Blattscheiben wurden so aufgeteilt, dass für jeden zu untersuchenden Verwundungszeitraum gleich viele Blattscheiben eines Blattbereiches eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Blattscheiben zur Stressinduktion für 0, 0,5, 18 bzw. 24 h in H<sub>2</sub>O bei 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Licht inkubiert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 2.3 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämme sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium, welches bei 220 rpm geschüttelt wurde. Festmedien enthielten 15 g Agar pro Liter Medium.

Tab. 1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm/Referenz	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i> XL1-Blue/ Stratagene, Heidelberg	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F<sup>c</sup> proAB, lacq, lacZΔM15, Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]</i>	Klonierung
<i>E. coli</i> TOP10F'/ Invitrogen, Karlsruhe	<i>F'[proAB, lacIq, lacZΔM15, Tn10 (Tet<sup>R</sup>)] mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, λ<sup>-</sup> araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(Str<sup>R</sup>), endA1, nupG</i>	Klonierung
<i>E. coli</i> SG13009[REP4]/ Qiagen, Hilden	<i>nal<sup>S</sup> str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup>, lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>-</sup> uvr<sup>-</sup></i>	Expression von Proteinen

**LB-Medium**(Sambrook *et al.*, 1989)

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Wenn Antibiotika erforderlich waren, wurden diese dem Medium wie in Tab. 2 beschrieben zugesetzt.

Tab. 2 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	25 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol	10 µg/ml
Zeocin <sup>TM</sup>	100 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe	30 µg/ml

Für β-Galaktosidase-Selektion (Blau-Weiß-Selektion) wurden den Festmedien Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid (IPTG) als Induktor und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal) zugesetzt.

**IPTG-Lösung**Stammlösung: 100 mM IPTG in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, bei -20 °C gelagert

Endkonzentration: 200 µM

**X-Gal-Lösung** Stammlösung: 2 % (w/v) X-Gal in Dimethylformamid, bei  
-20 °C gelagert  
Endkonzentration: 80 µg/ml

## 2.4 *Pichia pastoris*

Die in dieser Arbeit verwendeten *P. pastoris*-Stämme sind in Tab. 3 aufgeführt.

**Tab. 3** Verwendete *P. pastoris*-Stämme

Stamm	Genotyp	Phänotyp	Referenz
X-33	Wildtyp	Mut+	Invitrogen, Karlsruhe
GS115/Albumin	<i>HIS4</i>	MutS	Invitrogen, Karlsruhe
GS115/pPICZ/ <i>lacZ</i>	<i>his4</i>	His-, Mut+	Invitrogen, Karlsruhe
X-33/AtTGL1- $\alpha$	AtTGL1	Mut+	diese Arbeit
X-33/AtTGL1+ $\alpha$	AtTGL1	Mut+	diese Arbeit
X-33/AtTGL2- $\alpha$	AtTGL2	Mut+	diese Arbeit
X-33/AtTGL2+ $\alpha$	AtTGL2	Mut+	diese Arbeit

Die Expression von rekombinanten Proteinen in *P. pastoris* erfolgte mit Hilfe des „EasySelect™ *Pichia* Expression Kits“ (Invitrogen, Karlsruhe). *P. pastoris*-Zellen wurden nach Angaben des Herstellers angezogen.

## 2.5 Insektenzellen

Für die sekretorische Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen wurde die High Five™-Zelllinie (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Kultivierung der High Five™-Zellen erfolgte sowohl in adhärenter Zellkultur als auch in bis zu 1-l-Suspensionskultur in Express Five® SFM-Medium (Gibco®; Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. Um eine Aggregation der Zellen zu verhindern, wurde Suspensionskulturen 0,1 % (v/v) Pluronic F-68 (Sigma, München) zugesetzt. Zur Selektion wurde das Antibiotikum Blastidicin S (Invitrogen, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugefügt. Die High Five™-Zellkulturen wurden bei 27 °C inkubiert.

## 2.6 Molekularbiologische Techniken

Alle molekularbiologischen Methoden wurden nach Standardprotokollen in Anlehnung an Ausubel *et al.* (1993) durchgeführt. Abweichungen von den Standardprotokollen werden im Weiteren erläutert.

### 2.6.1 Klonierung von AtTGL1 und AtTGL2 zur Expression in Insektenzellen

Die mutmaßlichen TGL-Gene AtTGL1 (At1g28670) und AtTGL2 (At1g28660) wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1985) mit *A. thaliana* cDNA als Template und den folgenden Primern amplifiziert:

AtTGLSphIa: 5'-GCATGCGCATGGCTTCTTCACTGAAGAAGCTT-3'

AtTGLXbaIb: 5'-TCTAGATGTATCCACTGTACCAGAGCCAAGG-3'.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt, DNA-Banden der entsprechenden Größe ausgeschnitten und mit Hilfe des „DNA und Gel Band Purification Kit“ (GE Healthcare, München) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die AtTGL1- und AtTGL2-Fragmente wurden zunächst in den pGEM-T Vektor des „Vektor System II Kits“ (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben ligiert. Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation in *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die DNA der erhaltenen Klone wurde mit dem „NucleoSpin™ Plasmid-Kit“ (Macherey & Nagel, Düren) isoliert und mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein der Fragmente überprüft. 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. Anschließend wurden AtTGL1 und AtTGL2 als gereinigte *SphI/XbaI*-Fragmente in den Expressionsvektor pMIB/V5-His A des „Insect select“-Systems (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert. Dieser Vektor ermöglicht sowohl eine sekretorische Expression in Insektenzellen als auch den Nachweis und die Reinigung der Proteine über ein V5-Epitop und ein His-tag.

### 2.6.2 Klonierung von AtTGL1 und AtTGL2 zur Expression in *P. pastoris*

Die mutmaßlichen TGL-Gene AtTGL1 (At1g28670) und AtTGL2 (At1g28660) wurden mittels PCR mit *A. thaliana* cDNA als Template und den folgenden Primern amplifiziert:

AtTGLPmlIa: 5'-CACGTGATGGCTTCTTCACTGAAGAAGCTTATC-3'

AtTGLXhoIa: 5'-CTCGAGATGGCTTCTTCACTGAAGAAGCTTATC-3'

AtTGLXbalb: 5'-TCTAGATTTGTATCCACTGTACCAGAGCCAAG-3'.

Zur Klonierung der Gene in den *Pichia*-Expressionsvektor pPICZ $\alpha$ B (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Leserahmen mit dem N-terminalen  $\alpha$ -Faktor zur sekretorischen Expression wurde für die Amplifikation der „forward“-Primer AtTGLPmlIa verwendet. Für die Klonierung der Gene in den *Pichia*-Expressionsvektor pPICZ $\alpha$ B ohne den N-terminalen  $\alpha$ -Faktor wurde der „forward“-Primer AtTGLXhoIa eingesetzt. Der jeweils verwendete „reverse“-Primer AtTGLXbalb ermöglichte die Klonierung der Gene in einem Leserahmen mit dem C-terminalen His-tag des Vektors pPICZ $\alpha$ B. Nach der Amplifikation wurden die erhaltenen AtTGL1- und AtTGL2-Fragmente zunächst wie in 2.6.1 beschrieben in den Vektor pGEM-T kloniert und anschließend sequenziert. Dann wurden die Gene AtTGL1 und AtTGL2 als gereinigte *PmlI/XbaI*- bzw. *XhoI/XbaI*-Fragmente in den Expressionsvektor pPICZ $\alpha$ B des „EasySelect™ *Pichia* Expression Kits“ (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert. Die DNA der Ligrationsreaktion wurde ohne weitere Reinigung zur Transformation in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Die Transformation der Expressionskonstrukte in den *P. pastoris*-Wildtypstamm X-33 erfolgte mit Hilfe des „*Pichia* EasyComp™ Kits“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben.

### 2.6.3 Klonierung von CsPAT zur Expression in *E. coli*

Das partielle CsPAT-Gen (Y12793) wurde mittels PCR mit dem Expressionskonstrukt pQE11-CS291 (May *et al.*, 1998) als Template und den folgenden Primern amplifiziert:

CsPATsphIa: 5'-GCATGCATGGGATCCGTCGAGACC-3'

CsPATBgIIIb: 5'-AGATCTAGGACTCAAACGTAGTTTTCTCTC-3'.

Das erhaltene CsPAT-Fragment wurde zuerst wie in 2.6.1 beschrieben in den Vektor pGEM-T kloniert und sequenziert. Dann wurde das CsPAT-Gen als gereinigtes *SphI/BgIII*-Fragment in den Expressionsvektor pQE70 (Qiagen, Hilden) mit C-terminalem His-tag

ligiert. Zur Expression (2.11.1) wurde das erhaltene pQE70-CsPAT-Konstrukt in den *E. coli*-Stamm SG13009[pREP4] transformiert.

#### 2.6.4 Klonierung von CsPAT und CsLbLOX zur Expression in *N. tabacum*

Das partielle CsPAT-Gen (Y12793) wurde aus dem Expressionskonstrukt pQE11-CS291 (May *et al.*, 1998) mit Hilfe der „Gateway cloning“ Technologie (Invitrogen, Karlsruhe) in Anlehnung an Hornung *et al.* (2005) in den binären Pflanzentransformationsvektor pCambia3300 (CAMBIA, Canberra, Australien), der sich durch das *bar*-Gen zur Selektion auf Basta-Resistenz auszeichnet, unter Kontrolle des USP-Promotors kloniert. In gleicher Weise wurde das CsLbLOX-Gen (X92890) aus dem LOXpQE30-Expressionskonstrukt (Feussner *et al.*, 1998) in den binären Pflanzentransformationsvektor pBinAR (Bevan, 1984), der eine Kanamycin-Resistenz aufweist, unter Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) kloniert.

#### 2.6.5 Transformation von *N. tabacum*

Die Transformation von *N. tabacum* wurde unter der Leitung von Dr. I. Saalbach am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt und erfolgte durch Infektion von Blattscheiben über den *Agrobacterium*-Stamm EHA105 wie bei Horsch *et al.* (1985) beschrieben. Transformanten wurden mit 10 mg/ml Phosphinothricin (Basta) bzw. 50 µg/ml Kanamycin selektioniert und die Transformation mittels PCR mit genomischer DNA (2.6.6) und genspezifischen Primern verifiziert. Zum Nachweis der CsLbLOX in transformierten Tabakpflanzen wurde die folgende Primerkombination gewählt:

LOXSaIIa: 5'-AGTCGACACCATGTTTGGGAATTGGGAAGAACATCATT-3'

LOXBarrel1NotIb: 5'-AGCGGCCGCATTGGCAAAGAAAATGCGATCTTTCTTG-3'.

Der Nachweis von CsPAT in transformierten Tabakpflanzen erfolgte mit den unter 2.6.3 beschriebenen Primern.

### 2.6.6 Isolierung genomischer DNA aus *N. tabacum*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *N. tabacum* wurde ein sehr junges Blatt geerntet, sofort in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C verwahrt. Das Blattmaterial wurde für 30 s mit einem Potter (Heidolph RZR 2020, Schwabach) in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Nach Zugabe von 1 ml Aufschlusspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM NaCl, 2,1 % SDS (w/v)) mit anschließendem kräftigen Schütteln und nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (25 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) wurde die Probe über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Probe auf RT abgekühlt, mit 333 µl 6 M NaCl-Lösung versetzt und 20 s geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1.500 x g wurde der Überstand in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben und durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol die DNA bei RT für 30 min präzipitiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 1.500 x g. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen.

## 2.7 Phylogenetische Untersuchungen

Die Aminosäuresequenzen von Patatin-ähnlichen PLA aus *A. thaliana* (Holk *et al.*, 2002), DAD1 (Ishiguro *et al.*, 2001) und CsPAT wurden mit Hilfe von PHYLIP 3.5 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) phylogenetisch klassifiziert.

## 2.8 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Die geernteten *C. sativus* Keimblätter wurden bei 4 °C durch Zerhacken mit einer Rasierklinge homogenisiert und anschließend mit einer dem Pflanzenmaterial entsprechenden Menge Aufschlussmedium versetzt. Geerntete *A. thaliana* Keimlinge sowie *N. tabacum* Samen wurden mit der gleichen Menge Aufschlussmedium versetzt und bei 4 °C in einem Mörser homogenisiert.

---

<b>Aufschlussmedium:</b>	150 mM Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM KCl
	1,5 mM EDTA
	0,1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	15 % (w/v) Saccharose
	5 mM DTT

### 2.9 Isolierung von Lipidkörpern (Sturm *et al.*, 1985; modifiziert)

Die Isolierung von Lipidkörpern aus dem homogenisierten Pflanzenmaterial (2.8) erfolgte durch Zentrifugation in dem Ausschwingrotor SW 55 Ti (Beckman, Krefeld) bei 4 °C. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt bei 100.000 x g für 45 min wurde die obere Lipidschicht mit einem Spatel abgehoben und mit einem Glashomogenisator in Dichtegradientenpuffer rehomogenisiert. Eine erneute Zentrifugation unter den selben Bedingungen lieferte die gereinigten Lipidkörper in der refluorierten Lipidschicht. Die Lipidkörper wurden wieder abgenommen und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

<b>Dichtegradientenpuffer:</b>	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM KCl
	1.5 mM EDTA
	0,1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	10 % (w/v) Saccharose

Zur Gewährleistung einer konstanten Ionenstärke wurde die für ein bestimmtes Endvolumen erforderliche Saccharosemenge eingewogen und ein halbes Endvolumen doppelt konzentrierter Dichtegradientenpuffer (ohne Saccharose) zugegeben. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt.

## 2.10 Isolierung von Lipidkörperproteinen

Die Isolierung der Lipidkörperproteine erfolgte durch Extraktion der Lipide mit organischen Lösungsmitteln.

### 2.10.1 Aceton/Ethanol-Extraktion

Von den gereinigten Lipidkörpern (2.9) wurde mit 0,2 M Boratpuffer (pH 8,25 mit NaOH eingestellt) durch Rehomogenisation eine Lipidkörperlösung mit einer Endkonzentration von 50 mg/ml hergestellt. Ein Volumen von 20 µl der Lipidkörperlösung wurde mit 500 µl eines eiskalten Aceton/Ethanol-Gemisches (80:20, v/v) versetzt. Anschließend wurden die Proteine bei -20 °C für 20 min gefällt und der Proteinniederschlag durch Zentrifugation für 15 min bei 15.000 x g und 4 °C von der Lipidlösung getrennt. Das erhaltene Proteinpellet wurde mit 1 ml 80 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen, unter den angegebenen Bedingungen erneut zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Nach Aufnahme des Pellets in 100 µl SDS-Probenpuffer und Inkubation für 10 min bei 80 °C zur Denaturierung der Proteine wurden die Proteine über Nacht bei RT gelöst und konnten dann für SDS-PAGE- oder Western-Blot-Analysen (2.16 und 2.18) verwendet werden.

<b>SDS-Probenpuffer:</b>	100	mM Tris/HCl, pH 6,8
	2	% (w/v) SDS
	20	% (v/v) Glycerin
	0,25	% (w/v) Bromphenolblau

### 2.10.2 Trichloressigsäure (TCA)-Extraktion (Wang *et al.*, 2004)

Die gereinigten Lipidkörper (5 mg, 2.9) wurden direkt mit 50 µl eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1, v/v) und mit 50 µl 10 %-iger TCA in Aceton rehomogenisiert. Die Fällung der Lipidkörperproteine erfolgte für 5 min auf Eis. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g und 4 °C wurde die untere organische Phase und die Interphase zweimal mit 1 Volumen 10 %-iger, wässriger TCA, einmal mit 1 Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und einmal mit 5 Volumen eiskaltem Aceton gründlich

gemischt und wie angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem letzten Zentrifugationsschritt verworfen und das erhaltene Proteinpellet mit 1 ml 80 %-igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets an der Luft wurde es in 15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 3 min bei 94 °C zur Denaturierung der Proteine inkubiert und über Nacht bei RT gelöst. Die vorbereiteten Proteinproben wurden für SDS-PAGE- oder Western-Blot-Analysen (2.16 und 2.18) eingesetzt.

## 2.11 Expression rekombinanter Proteine

### 2.11.1 Expression in *E. coli*

Die Expression der CsLbLOX mit N-terminalem His-tag erfolgte mit dem LOXpQE30-Expressionskonstrukt (Feussner *et al.*, 1998). CsPAT wurde sowohl mit N-terminalem His-tag mit Hilfe des pQE11-CS291-Konstruktes (May *et al.*, 1998) als auch mit C-terminalem His-tag über das unter 2.6.3 beschriebene pQE70-CsPAT-Konstrukt exprimiert. Nach Transformation der Expressionskonstrukte in den *E. coli*-Stamm SG13009[pREP4] wurde von den *E. coli*-Zellen eine 5-ml-Übernachtskultur (mit entsprechendem Antibiotikazusatz) angezogen, die zum Animpfen einer 200-ml-Kultur verwendet wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 angezogen und anschließend die Expression mit 1 mM Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 10 °C für 10 d. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.200 x g, 20 min) sedimentiert. Das Pellet wurde in 20 ml Lysispuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 % Glycerin (v/v), 0,1 % Tween 20 (v/v), 500 mM NaCl) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch eine viermalige Ultraschallbehandlung für jeweils 20 s. Die Proteine wurden über Affinitätschromatographie (2.13) gereinigt und Aliquots der Eluate zur Untersuchung der Enzymaktivität verwendet (2.21).

### 2.11.2 Expression in Insektenzellen

Die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen erfolgte mit Hilfe des „Insect select“-Systems (Invitrogen, Karlsruhe). Die pMIB/V5-His A-Expressionskonstrukte (2.6.1) wurden durch Lipid-vermittelte Transfektion in High Five<sup>TM</sup>-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben transfiziert und die Expression der Proteine im

Western-Blot (2.18) überprüft. Stabile Zelllinien, die sich durch eine multiple Integration des Gens auszeichnen, wurden durch Verwendung des Antibiotikum Blastocidin S in adhärenen Zellkulturen selektioniert. Die Expression der Proteine erfolgte sowohl in adhärenter Zellkultur als auch in bis zu 1-l-Suspensionskultur in Express Five<sup>®</sup> SFM-Medium (Gibco<sup>®</sup>; Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

### 2.11.3 Expression in *P. pastoris*

Das „EasySelect<sup>™</sup> *Pichia* Expression Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) wurde zur Expression von Proteinen in *P. pastoris* benutzt. Das zu untersuchende Gen steht dabei unter der Kontrolle des mit Methanol induzierbaren *AOX1*-Promotors. Eine transformierte *P. pastoris*-Kolonie wurde in 25 ml BMGY-Vollmedium in einem Schikanekolben angeimpft und für 16-18 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 2 - 6 erreicht wurde. Die Zelldichte wurde dann auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 1 in BMMY-Minimalmedium, welches 0,5 % Methanol (v/v) zur Induktion der Expression enthält, eingestellt. Zur Erhaltung der Induktion wurde alle 24 h 100 %-iges Methanol in einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) zu der Expressionskultur gegeben. Nach einer 3-tägigen Proteinexpression bei 16 °C wurde 1 ml der Kultur für 5 min bei 16.100 x g zentrifugiert und das Zellpellet sowie der Überstand getrennt im Western-Blot (2.18) auf Expression des Proteins überprüft. Die Probenvorbereitung für die Überprüfung im Western-Blot und die Herstellung der verwendeten Medien erfolgte nach Herstellerangaben.

## 2.12 Ammoniumsulfat-Fällung und Dialyse von Proteinen

Eine 1-l-High Five<sup>™</sup>-Suspensionskultur (2.11.2), die rekombinantes Protein sekretorisch exprimiert, wurde bis zu einer Zelldichte von 2.0 - 2.5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert. Anschließend wurde das Medium mit dem rekombinanten Protein durch Zentrifugation für 10 min bei 15.100 x g und 4 °C geerntet. Zur Fällung des rekombinanten Proteins wurde das Medium unter Rühren bei 4 °C langsam mit Ammoniumsulfat bis zu einem protein-abhängigen Sättigungsgrad versetzt: AtTGL1: 50 % Sättigung, AtTGL2: 70 % Sättigung. Eine gesättigte Lösung enthält dabei 3,9 Mol/l Ammoniumsulfat bei 4 °C. Anschließend wurde die Lösung für 4 h bei 4 °C weitergerührt und das gefällte Protein durch Zentrifugation für 10 min bei 15.100 x g und 4 °C erhalten. Das Proteinpellet wurde in

2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert und gegen 2 l Equilibrierungspuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert, wobei der Equilibrierungspuffer dreimal ausgewechselt wurde. Die dialysierte Proteinprobe wurde zur Proteinreinigung über Talon-Säulen (2.13) verwendet.

**Equilibrierungspuffer:** 50 mM Na-Phosphat, pH 7,0  
300 mM NaCl

### 2.13 Proteinreinigung über Talon-Säulen

Eine Proteinreinigung über Talon-Säulen (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) ist möglich, wenn die Proteine eine Sequenz von 6 - 10 Histidinen an C- oder N-Terminus enthalten (His-tag). Über diese Histidine binden die Proteine in einer Affinitätschromatographie an das Trägermaterial der Säule, einem immobilisierten zweiwertigen Metall (Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>). Die dialysierte Proteinprobe (2.12) wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln mit 1 ml Talon-Säulenmaterial inkubiert, das zuvor mit Equilibrierungspuffer (2.12) gewaschen wurde. Um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen, schloss sich eine Zentrifugation für 5 min bei 8 x g und 4 °C an. Das Talon-Säulenmaterial wurde mit 20 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und erneut für 5 min bei 8 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Talon-Säulenmaterial in 2 ml Equilibrierungspuffer resuspendiert und in eine Leersäule überführt. Das Säulenmaterial wurde nochmals mit 5 ml Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mittels Imidazol, welches die Histidine verdrängt und selbst an die Säulenmatrix bindet. Durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer wurden die Proteine mit His-tag von der Säule eluiert und als 500 µl-Fraktionen gesammelt. Aliquots der Eluate wurden sofort auf Enzymaktivität (2.21) analysiert bzw. bei -20 °C aufbewahrt und im Western-Blot (2.18) überprüft.

**Elutionspuffer:** 50 mM Na-Phosphat, pH 7,0  
300 mM NaCl  
150 mM Imidazol

### 2.14 Proteinreinigung mit Anionenaustauschchromatographie

Bei dieser Methode werden Proteine aufgrund unterschiedlicher elektrostatischer Wechselwirkungen mit einer geladenen Matrix, die kovalent geladene Gruppen enthält, aufgetrennt. Hierbei sind vor allem der isoelektrische Punkt und die Oberflächenladung des Proteins entscheidend, aber auch das Ionenaustauscher-Material, der pH-Wert und die Ionenstärke der verwendeten Puffer spielen eine Rolle. Bei einem Anionenaustauscher werden Proteine im pH-Bereich oberhalb ihres isoelektrischen Punktes reversibel gebunden. Eine Erhöhung der Ionenstärke bzw. der Salzkonzentration verstärkt die Konkurrenz um die Bindungsstellen des Ionenaustauscher-Materials und vermindert gleichzeitig die Bindungskräfte der absorbierten Proteine. Dieser Effekt dient daher zur Elution gebundener Moleküle. Die Durchführung erfolgte mit dem „ÄKTA prime plus“-System (GE Healthcare, München). Vor dem Lauf wurden sämtliche Puffer durch Nitrocellulose (Sartorius, Göttingen) filtriert. Die in 2.13 erhaltenen Proteinfraktionen wurden vereinigt, zur Entsalzung auf ein zehnfaches Volumen mit Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 10 % Glycerin (v/v)) aufgefüllt und auf eine SourceQ-Sepharosesäule (GE Healthcare, München), die zuvor mit 30 ml Puffer A equilibriert wurde, geladen. Dieser und die nachfolgenden Schritte wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem Maximaldruck von 0,6 MPa durchgeführt. Nach dem Probenauftrag wurden ungebundene Proteine mit 20 ml Puffer A von der Säule gewaschen. Daran schloss sich die Elution gebundener Proteine durch einen Salzgradienten von 0 bis 100 % Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 1 M NaCl, 10 % Glycerin (v/v)) an. Der Verlauf der Reinigung wurde graphisch mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet und die eluierten Proteine nach dem Probenauftrag mit einem Fraktionssammler fraktioniert. Aliquots der Fraktionen wurden sofort im Anschluss auf ihren Proteingehalt (2.15) und auf Enzymaktivität (2.21) untersucht bzw. bei -20 °C aufbewahrt und im Western-Blot (2.18) überprüft.

### 2.15 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Methode beruht auf einem colorimetrischen Test von hoher Empfindlichkeit. Die Bindung des Farbstoffes „Serva Blau D“ an Proteine lässt sich durch die Zunahme der Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmen. Der Protein-Farbkomplex wird innerhalb von 2 min gebildet und ist etwa eine Stunde stabil.

Der Proteingehalt der Proben wurde anhand einer Eichgerade ermittelt. Diese Eichreihe wurde im Bereich von 0-20 µg BSA erstellt. Zu 2 ml Farbreagenz wurden 1-100 µl Probe hinzugefügt und die Extinktion bei 595 nm gemessen.

**Farbreagenz:** 14 mg Serva Blau G  
10 ml 96 %-iges (v/v) Ethanol  
20 ml 85 %-ige (v/v) Phosphorsäure  
auf 200 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auffüllen

### 2.16 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen und wurde in Anlehnung an Laemmli (1970) durchgeführt. Bei der Probenvorbereitung wurde mit Hilfe des anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) im SDS-Probenpuffer die Eigenladung der Proteine überdeckt. Zusätzlich wurden die Proteine durch Erhitzen denaturiert (2.10.1 und 2.10.2). Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proben auf ein Polyacrylamid-Gel geladen. Das Gel bestand aus einem Trenngel, über das eine Schicht Sammelgel gelagert war. Es wurde die „Mini-PROTEAN® 3 Cell“-Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet. Das Anlegen einer Stromstärke für 15 min bei 15 mA und anschließend 45 min bei 25 mA bewirkte eine Wanderung der negativ geladenen Proteine durch das Gel. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben 5 µl Größenmarker („Unstained Protein Molecular Weight Marker“ bzw. „Prestained Protein Marker“, Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Gel geladen. Zur Sichtbarmachung der Proteine nach der Elektrophorese schloss sich eine Coomassie-Färbung (2.17) oder ein Western-Blot (2.18) an.

**10 %-ige Trenngel-Lösung:**

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

**3,75 %-ige Sammelgel-Lösung:**

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

**Elektrophoresepuffer (pH 8,3):**

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

**2.17 Coomassie-Färbung**

Die Färbung mit Coomassie ist die Standard-Methode, um Proteine im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Die Coomassie-Färbelösung enthält Methanol, um den Coomassie-Farbstoff in Lösung zu bringen, und Essigsäure, um die Proteine im Gel zu fixieren. Der blaue Farbstoff lagert sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an und färbt so alle Proteine unspezifisch an. Die Gele wurden ca. 0,5 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend so lange in Entfärbelösung geschüttelt, bis die Proteine deutlich zu erkennen waren und der Hintergrund nahezu farblos war.

**Färbelösung:**

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

<b>Entfärbelösung:</b>	50	% (v/v) Methanol
	10	% (v/v) Essigsäure

## 2.18 Western-Blot

### 2.18.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (2.16) erfolgte der Transfer der Proteine durch das Naßblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel). Es wurde dazu eine „Mini Trans-Blot® Cell“-Apparatur (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und ein elektrisches Feld angelegt, so dass die Proteine für 1 h bei 60 V und ca. 8 °C transferiert wurden. Die Proteine blieben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membran haften. Bei diesem Vorgang wurde das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Markierung der Markerproteine („Prestained Protein Marker“, Fermentas, St. Leon-Rot) auf der Nitrocellulosemembran.

<b>Transferpuffer (pH 8,4):</b>	25	mM Tris
	250	mM Glycin
	0,1	% (w/v) SDS
	20	% (v/v) Methanol

### 2.18.2 Immunodetektion der Proteine

Die Nitrocellulosemembran (2.18.1) wurde kurz in TBS-Puffer gewaschen und zur Absättigung überschüssiger Bindungsstellen für mindestens 2 h in Blockierungslösung bei 4 °C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Nachdem die Membran für 2 min in TBST-Puffer gewaschen wurde, erfolgte eine 1-stündige Inkubation in 10 ml der Lösung des primären Antikörpers (Tab. 4) in TBST. Durch dreimaliges Waschen für 10 min in TBST-Puffer wurden schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Die Lösung des

sekundären Antikörpers (Tab. 4) wurde für 1 h mit der Membran geschwenkt. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in TBST-Puffer, einmal 10 min in TBS-Puffer und einmal 10 min in AP-Puffer gewaschen. Zur Visualisierung wurden sekundäre Antikörper verwendet, die ein Konjugat mit der alkalischen Phosphatase (AP) bildeten. Die Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde durch Zugabe von 66 µl NBT (Nitroblau-Tetrazolium) und 32 µl BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) in 10 ml AP-Puffer nach Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim) gestartet.

<b>TBS-Puffer:</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl
<b>TBST-Puffer:</b>	TBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween20
<b>Blockierungslösungen:</b>	1 % (w/v) BSA in TBST-Puffer bzw. 3 % (w/v) Milchpulver in TBS-Puffer
<b>AP-Puffer:</b>	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>

**Tab. 4** Verwendete Antikörper

<b>Primärer Antikörper (Verdünnung/Referenz)</b>	<b>Sekundärer Antikörper (Verdünnung/Referenz)</b>
Anti-CsPAT (1:2.000/May <i>et al.</i> , 1998)	Anti-Kaninchen-IgG-AP (1:2.000/KPL, Gaithersburg, USA)
Anti-CsLbLOX (1:1.000/Hause <i>et al.</i> , 2000)	Anti-Kaninchen-IgG-AP (1:2.000/KPL, Gaithersburg, USA)
Anti-Caleosin (1:1.000/Naested <i>et al.</i> , 2000)	Anti-Kaninchen-IgG-AP (1:2.000/KPL, Gaithersburg, USA)
Anti-Oleosin (1:1.000/Tzen <i>et al.</i> , 1990)	Anti-Huhn-IgG-AP (1:500/Sigma, München)
Anti-His (1:5.000/Invitrogen, Karlsruhe)	Anti-Maus-IgG-AP (1:10.000/Sigma, München)
Anti-V5 (1:2.000/Invitrogen, Karlsruhe)	Anti-Maus-IgG-AP (1:10.000/Sigma, München)

## 2.19 Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie

Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie zur intrazellulären Lokalisierung von CsPAT und CsLbLOX im *C. sativus*-Keimling wurde von Dr. M. Melzer am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt. Die für die Immunogoldmarkierung verwendeten Antikörper Anti-CsPAT und Anti-CsLbLOX sind in Tab. 4 beschrieben.

## 2.20 Proteinsequenzierung

Proteinsequenzierungen erfolgten am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen unter der Leitung von Dr. O. Valerius.

## 2.21 Enzymaktivitätsbestimmungen

### 2.21.1 Lipoxygenase-Aktivität

#### 2.21.1.1 Polarographische Messung der Lipoxygenase-Aktivität

Für die polarographische Bestimmung der LOX-Aktivität an isolierten Lipidkörpern wurden 950 µl 200 mM Boratpuffer (pH 8,25) mit 50 µl Lipidkörperlösung (2.10.1) versetzt und die LOX-Aktivität anhand des Linolsäure-abhängigen Sauerstoff-Verbrauchs mit einer Sauerstoff-Elektrode (Rank Borthor, Bottisham, UK) gemessen. Als Substrat wurde in Ethanol gelöste Linolsäure mit einer Endkonzentration von 0,9 mM verwendet. Die Reaktion erfolgte in einer auf 20 °C temperierten Messkammer und wurde durch die Zugabe der Substratlösung gestartet. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte über die Abschätzung der Proteinkonzentration in einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel (2.16 und 2.17).

#### 2.21.1.2 Messung der Lipoxygenase-Aktivität mittels Produktanalyse

Die Untersuchungen zur *in vitro* Interaktion zwischen der CsPAT- und der CsLbLOX-Aktivität wurden von Dr. A. Schlereth am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt. Es wurden 4 mg gereinigte Lipidkörper (2.9) aus 2 h in Leitungswasser eingeweichten *C. sativus*-Samen in 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 8,0) mit 25 mM CaCl<sub>2</sub> rehomogenisiert und anschließend mit 400 µl gereinigter CsPAT- sowie 200 µl gereinigter CsLbLOX-Proteinlösung (2.11.1) für 120 min bei 30 °C inkubiert (900 µl Endvolumen). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl konzentrierter Essigsäure gestoppt. Die Lipide wurde nach Bligh und Dyer (1959; 2.22.1) extrahiert und wie unter 2.24 beschrieben transesterifiziert. Die erhaltenen Methylester der Hydroxyfettsäuren und Fettsäuren wurden mittels „reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysiert. Zur Bestimmung der LOX-Aktivität wurde das Verhältnis von veresterter 13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure (13-HOD) als Produkt zu veresterter Linolsäure (LA) als Substrat berechnet.

Eine Vorinkubation der rehomogenisierten Lipidkörper mit immobilisierter Proteinase K erfolgt für 60 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln. Erst nach dem Entfernen der Proteinase K durch kurzes Zentrifugieren wurde die CsLbLOX-Proteinlösung wie oben beschrieben dazugegeben.

## 2.21.2 Phospholipase-Aktivitätsnachweis mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate (Huang, 1987)

### 2.21.2.1 Aktivität an isolierten Lipidkörpern

Zur Bestimmung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität an isolierten Lipidkörpern wurden 10 mg gereinigte Lipidkörper (2.9) in 300 µl 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,25) rehomogenisiert und anschließend mit 3 mM CaCl<sub>2</sub> sowie 1,76 nmol <sup>14</sup>C-markiertem Phosphatidylcholin (<sup>14</sup>C-PC, L-α-1-Palmitoyl-2-linoleoyl-[linoleoyl-1-<sup>14</sup>C]-phosphatidylcholin; NEN, Boston, USA) als Substrat gründlich gemischt. Die Reaktion verlief für 90 min bei RT unter leichtem Schütteln. Als Kontrolle wurde ein zusätzlicher Testansatz mit 3 µl PLA<sub>2</sub> (15 U; Sigma, München) angefertigt. Die Lipidkörper wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 x g flotiert und die wässrige Phase abgenommen. Zur Protonierung freier Fettsäuren wurde der pH-Wert mit 100 µl konzentrierter Essigsäure gesenkt. Die Lipide wurden zweimal mit 500 µl Chloroform extrahiert und die vereinigten Chloroformphasen daraufhin im Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 10 µl Chloroform aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Die Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt) wurde in dem DC-Laufmittel entwickelt und anschließend durch Exposition eines „Phosphor-Storage-Screens“ an einem „Fluorescent Image Analyzer“ (FujiFilm, Japan) ausgewertet. Eine Quantifizierung der Lipide erfolgte anhand der Bestimmung des Schwärzungsgrades mit Hilfe der AIDA/2D-Densitometrie Software (Raytest, Straubenhardt)

#### DC-Laufmittel:

Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (65:25:4, v/v/v)

### 2.21.2.2 Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 nach Expression in Insektenzellen

Ein Volumen von 80 µl der zu testenden Enzymlösung wurde mit 10 µl Pufferkonzentrat (10x), 8 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 2 µl Substrat gründlich gemischt und wie unter 2.21.2.1 beschrieben weiterbehandelt. Als Substrate dienten 1,76 nmol <sup>14</sup>C-PC, 0,70 nmol <sup>14</sup>C-markierte Phosphatidsäure (<sup>14</sup>C-PA, L-α-Dipalmitoyl [glycerol-<sup>14</sup>C(U)] NEN, Boston, USA) und 3,08 pmol <sup>3</sup>H-markiertes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (<sup>3</sup>H-PIP<sub>2</sub>, Inositol-2-<sup>3</sup>H [N]; NEN, Boston, USA). Als Kontrollen wurden zusätzliche Testansätze mit

3  $\mu\text{l}$  PLA<sub>2</sub> (15 U; Sigma, München) und 3  $\mu\text{l}$  Phospholipase C (PLC; 3 U; Sigma, München) angefertigt. Die Auftrennung mittels DC erfolgte bei der Umsetzung der Enzymlösung mit <sup>14</sup>C-PC und <sup>14</sup>C-PA als Substrat in dem DC-Laufmittel 1 und mit <sup>3</sup>H-PIP2 als Substrat in dem DC-Laufmittel 2.

**DC-Laufmittel 1:**

Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (65:25:4, v/v/v)

**DC-Laufmittel 2:**

Chloroform/Methanol/Ammoniumhydroxid/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (57:50:4:11, v/v/v/v)

**Pufferkonzentrat (10 x):**

1 M Tris/HCl, pH 7,5

50 mM CaCl<sub>2</sub>

**2.21.3 Phospholipase-Aktivitätsnachweis mittels Produktanalyse**

Die Bestimmung des pH-Optimums des rekombinanten CsPAT wurde von Dr. A. Schlereth am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt. Gereinigtes Protein (C-terminales His-Tag, 2.11.1) wurde mit PC (2-Linoleoyl-phosphatidylcholin; Sigma, München) für 70 min bei 30 °C inkubiert. Als Puffer diente 50 mM Na-Phosphatpuffer mit 25 mM CaCl<sub>2</sub>, wobei unterschiedliche pH-Werte zwischen pH 5,0 und pH 9,0 getestet wurden. Nach der Ansäuerung mit konzentrierter Essigsäure wurden die Lipide nach Bligh und Dyer (1959, 2.22.1) extrahiert. Freie Linolsäure wurde mittels RP-HPLC separiert und quantifiziert.

**2.21.4 Lipase-Aktivitätsnachweis mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate (Huang, 1987)**

Es wurden 7 mg gereinigte Lipidkörper (2.9) in 100  $\mu\text{l}$  Lipasepuffer rehomogenisiert und mit 0,1 nmol <sup>14</sup>C-Triolein ([Carboxyl-<sup>14</sup>C]-triolen; NEN, Boston, USA) gründlich gemischt. Zur Untersuchung der Lipase-Aktivität von Enzymlösungen wurden 80  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Enzymlösung mit 10  $\mu\text{l}$  zehnfach konzentriertem Lipasepuffer, 10  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

und 0,1 nmol  $^{14}\text{C}$ -Triolein versetzt und kräftig geschüttelt. Als Kontrolle wurde ein zusätzlicher Testansatz mit 80  $\mu\text{l}$  pankreatischer Lipase (1 mg/ml, w/v; aus Schweinepankreas; Sigma, München) und 10  $\mu\text{l}$  zehnfach konzentriertem Lipasepuffer angefertigt. Die Reaktion erfolgte für 120 min bei 37 °C in einem Wasserbad und wurde im Anschluss durch die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  konzentrierter Essigsäure gestoppt. Die Lipide wurden mit 200  $\mu\text{l}$  n-Hexan extrahiert und zur Unterstützung der Phasentrennung für 5 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Die Hexanphase wurde im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 10  $\mu\text{l}$  Chloroform aufgenommen. Die Auftrennung der Lipide über DC wurde wie in 2.21.2.1 beschrieben durchgeführt.

**DC-Laufmittel:**

Chloroform/Aceton (96:4, v/v)

**Lipasepuffer:**

100 mM Tris/HCl, pH 8,5

50 mM NaCl

5 mM  $\text{CaCl}_2$

**2.21.5 DAG-DAG-Acyltransferase-Aktivitätsnachweis****2.21.5.1 Herstellung von radioaktiv markiertem Substrat**

Zur Herstellung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Diacylglycerin (DAG) wurde  $^{14}\text{C}$ -markiertes PC mit PLC umgesetzt. Es wurden 4,40 nmol  $^{14}\text{C}$ -PC (L- $\alpha$ -1-Palmitoyl-2-linoleoyl-[linoleoyl-1- $^{14}\text{C}$ ]-phosphatidylcholin; NEN, Boston, USA) mit 10  $\mu\text{l}$  PLC (10 U; Sigma, München) in 1 ml Inkubationspuffer über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipide nach Hajra (1974) extrahiert. Dazu wurde der Ansatz mit 1 ml Hajra-Lösung kräftig geschüttelt und nach Zugabe von 2 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) erneut geschüttelt. Zur Unterstützung der Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2.300 x g. Die Chloroformphase wurden entnommen und die in der wässrigen Phase verbliebenen Lipide mit 2 ml Chloroform reextrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten Chloroformphasen im Stickstoffstrom wurde der Rückstand in 20  $\mu\text{l}$  Chloroform aufgenommen und die Lipide mittels DC wie in 2.21.2.1 beschrieben

aufgetrennt. Das Autoradiogramm der entwickelten Dünnschichtplatte diente als Schablone, um die  $^{14}\text{C}$ -markierten 1,2-DAG- und 1,3-DAG-Kieselgelbanden mit einem Spatel von der Dünnschichtplatte auszukratzen. Anschließend wurden die Lipide mit 1 ml 400 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  angesäuert und mit 4 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) und kräftigem Schütteln aus dem Kieselgel extrahiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1.500 x g, wurde die Chloroformphase entnommen und im Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 20  $\mu\text{l}$  Chloroform aufgenommen und bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Da 1,2-DAG- und 1,3-DAG spontan ineinander isomerisieren wurden beide Extrakte vereinigt und gemeinsam als Substrat für die DAG-DAG-Acyltransferase-Aktivitätsbestimmung (2.21.5.2) eingesetzt.

**Inkubationspuffer:**                    100 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
    5 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
    0,1 % (v/v) Triton X-100  
  
    pH 7,3

**Hajra-Lösung:**                        200 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
  
    1 M KCl

**DC-Laufmittel:**

Chloroform/Aceton (96:4, v/v)

**2.21.5.2 DAG-DAG-Acyltransferase-Aktivitätsnachweis**

Ein Volumen von 80  $\mu\text{l}$  der zu testenden Enzymlösung wurde mit 10  $\mu\text{l}$  Pufferkonzentrat (2.21.2.2) gemischt, auf 0,88 nmol  $^{14}\text{C}$ -markiertes DAG (2.21.5.1) gegeben und anschließend gründlich geschüttelt. Es wurden drei Ansätze bei  $30\text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad für 10, 15 bzw. 20 min inkubiert. Nach Ansäuerung mit 10  $\mu\text{l}$  konzentrierter Essigsäure wurden die Lipide mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform extrahiert und die Phasentrennung durch eine Zentrifugation für 5 min bei 1.500 x g unterstützt. Die Chloroformphase wurde im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 10  $\mu\text{l}$  Chloroform aufgenommen. Die

Auftrennung der Lipide mittels DC wurde mit dem in 2.21.5.1 angegebenen Laufmittel wie in 2.21.2.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.21.6 Steroidester-Hydrolaseaktivitätsnachweis

Zur Bestimmung einer Steroidester-Hydrolaseaktivität wurden 80 µl der zu testenden Enzymlösung mit 10 µl zehnfach konzentriertem Lipasepuffer (2.21.4), 9 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 0,19 nmol <sup>14</sup>C-markiertem Cholesteryloleat ([Oleat-1-<sup>14</sup>C]-cholesteryloleat; NEN, Boston, USA) kräftig gemischt und wie in 2.21.4 beschrieben weiterbehandelt.

## 2.22 Lipidextraktion

### 2.22.1 Extraktion der Lipide nach Bligh und Dyer (1959)

Zur Extraktion der Lipide aus isolierten Lipidkörpern (2.9) wurden diese in 900 µl 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) rehomogenisiert. Anschließend wurden 250 µl 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4), 2,5 ml Methanol und 1,25 ml Chloroform zugesetzt und gründlich gemischt. Nach weiterer Zugabe von 1,25 ml 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) und 1,25 ml Chloroform wurde erneut gemischt und die Phasentrennung durch eine Zentrifugation für 10 min bei 5.000 x g und 4 °C unterstützt. Die Chloroformphase wurde entnommen, im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 1 ml Chloroform aufgenommen.

### 2.22.2 Extraktion der Lipide mit n-Hexan/Isopropanol

Gefrorenes Pflanzenmaterial wurde abgewogen und auf Eis gekühlt mit 10 ml HIP-Lösung und einem Standardgemisch versetzt. Um eine Autoxidation zu verhindern, wurde die Probe mit Argon überschichtet. Zur Analyse von freien Oxylipinen und freien Fettsäuren wurde ein Standardgemisch aus 100 ng D<sub>6</sub>-Jasmonsäure (D<sub>6</sub>-JA, Dr. O. Miersch, IPB Halle), 100 ng D<sub>5</sub>-12-Oxophytodiensäure (D<sub>5</sub>-oPDA, Dr. O. Miersch, IPB Halle), 200 µg Heptadecansäure (Sigma, München) und 13γ-Hydroxyoctadecatriensäure (13γ-HOT, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) verwendet. Die Probe wurde für 45 s mit einem Ultra-Turrax (13.000 min<sup>-1</sup>; IKA<sup>®</sup> Werke, Staufen) unter einem Argonstrom

homogenisiert. Der Ultra-Turrax wurde in weiteren 10 ml HIP-Lösung gereinigt und diese HIP-Lösung mit der Probelösung vereinigt. Nach 10-minütigem Schütteln bei 8 °C und einer 10-minütigen Zentrifugation bei 3.200 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und mit wässriger K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung auf 32,5 ml aufgefüllt. Die Probe wurde erneut für 10 min bei 8 °C geschüttelt und 10 min bei 3.200 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Hexanphase entnommen, im Stickstoffstrom getrocknet und mit dreimal 400 µl n-Hexan/Isopropanol (100:5, v/v) in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurde der Rückstand in 200 µl Methanol aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

**HIP-Lösung:** n-Hexan/Isopropanol (3:2, v/v) mit 0,0025 % (w/v) BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol)

**K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung:** 6,66 % (w/v) K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 2.23 Methylierung von freien Fettsäuren

Für die Methylierung von freien Fettsäuren wurden 20 µl des Lipidextraktes (2.22.2) im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend in 400 µl Methanol aufgenommen. Es wurde 1 mg 1-Ethyl-3-(3-Dimethyl-aminopropyl)carbodiimid in 10 µl Methanol gelöst zur Probe gegeben und für 2 h bei RT geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl gesättigter NaCl-Lösung gestoppt. Zur Extraktion der entstandenen Fettsäuremethylester (FAME) wurde zweimal 1 ml n-Hexan zugesetzt und das Gemisch kräftig geschüttelt. Durch Zentrifugation für jeweils 5 min bei 12.000 x g wurde die Phasentrennung beschleunigt. Die Hexanphasen wurden vereinigt und im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 10 µl Acetonitril aufgenommen und stand damit für die Analyse mittels Gaschromatographie (GC) bereit (2.26).

## 2.24 Transesterifizierung von veresterten Fettsäuren und Oxylipinen

Die Transesterifizierung beinhaltet die Umwandlung von lipidgebundenen Fettsäuren und Oxylipinen in ihre entsprechenden Methylester unter alkalischen Bedingungen. Für die Transesterifizierung wurden 10 µl des Lipidextraktes (2.22.1) mit Triricinolein sowie 20 µg Triheptadecanoat als interne Standards in einem 2-ml-Reaktionsgefäß versetzt und in einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Ein Aliquot Triricinolein wurde zur Quantifizierung mittels „straight phase“ (SP-)HPLC (2.25.3) parallel zu der Probe transesterifiziert. Anschließend wurde die Probe in 330 µl Methanol/Toluol (2:1, v/v) und 170 µl 0,5 M Natriummethoxid (in Methanol; Sigma, München) aufgenommen. Sollten Lipide aus Tabaksamen transesterifiziert werden, wurden diese direkt in 330 µl Methanol/Toluol (2:1, v/v) mit einem Potter (Heidolph RZR 2020, Schwabach) homogenisiert und dann mit 170 µl 0,5 M Natriummethoxid versetzt. Das Gemisch wurde bei RT für 20 min geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M NaCl und 50 µl HCl (32 %, v/v) gestoppt. Zur Extraktion der methylierten Lipide wurde zweimal 1 ml n-Hexan zugegeben und das Gemisch kräftig geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte jeweils durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 5 min. Die oberen Hexanphasen wurden vereinigt und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Probe wurde in 200 µl Methanol aufgenommen und stand für die GC-Analyse (2.26) der FAME sowie für die Auftrennung der methylierten Oxylipine über RP-HPLC (2.25.1) und anschließende Trennung und Quantifizierung mittels SP-HPLC (2.25.3) bereit.

## 2.25 „High performance liquid chromatography“(HPLC-) Analysen

HPLC-Analysen wurden mit einem Agilent 1100 HPLC-System (Agilent, Waldbronn) durchgeführt, an das ein Diodenarray-Detektor gekoppelt war. Die Signalflächen wurden mit der ChemStation-Software (Rev. A. 10.02; Agilent, Waldbronn) integriert und quantifiziert.

### 2.25.1 Trennung von Oxylipinen und Fettsäuren mittels RP-HPLC

Die RP-HPLC-Analyse der Oxylipine erfolgte an einer EC250/2 Nucleosil 120-5 C18 Säule (250 x 2,1 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey&Nagel, Düren). Zur Detektion von

Hydro(pero)xyfettsäuren wurde die Absorption bei 234 nm (konjugiertes Diensystem) und zur Detektion von oPDA wurde die Absorption bei 224 nm dokumentiert. Für die Trennung der einzelnen Oxylipinklassen wurden die folgenden Laufmittel verwendet: Laufmittel A: Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>/Essigsäure (75:25:0,1, v/v/v) und Laufmittel B: Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>/Essigsäure (100:0:0,1, v/v/v). Die Elution der freien Oxylipine und Fettsäuren erfolgte mit dem folgenden Gradienten: 0 - 10 min 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B bei einer Flussrate von 0,18 ml/min, 10 - 15 min von 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B auf 100 % Laufmittel B, 15 - 17 min Erhöhung der Flussrate auf 0,36 ml/min, 17 - 25 min 100 % Laufmittel B, 25 - 27 min von 100 % Laufmittel B auf 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B, 25 - 30 min 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B. Zur Bestimmung der Retentionszeiten der verschiedenen freien Oxylipinklassen wurden JA, oPDA, 13-Hydrox-9,11,15-octadecatriensäure (13-HOT) und 13-HOD als Standards verwendet. Zur weiteren Trennung der Oxylipine wurden entsprechende Fraktionen gesammelt. Die Elution der methylierten Oxylipine erfolgte nach einem modifizierten Gradienten: 0 - 5 min 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B bei einer Flussrate von 0,18 ml/min, 5 - 10 min von 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B auf 100 % Laufmittel B und Erhöhung der Flussrate auf 0,36 ml/min, 10 - 20 min 100 % Laufmittel B, 20 - 25 min von 100 % Laufmittel B auf 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B, 25 - 30 min 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B. Als Standards für die methylierten Oxylipine wurden methyliertes 13-HOT, methyliertes 13-HOD sowie methylierte Ricinolsäure eingesetzt.

### 2.25.2 Trennung von oxygenierten Triacylglyceriden mittels RP-HPLC (Feussner *et al.*, 1997a)

Zur Identifizierung von Signalen bei der DC-Analyse von Neutrallipiden (2.31) wurde Trilinolein mit rekombinant exprimierter CsLbLOX (2.11.1) zu einfach, zweifach und dreifach oxygeniertem Trilinolein umgesetzt. Dazu wurde das Zellysat einer 10-ml-*E. coli*-Kultur, die die CsLbLOX exprimierte, mit 1,2 mg Trilinolein für 30 min bei RT inkubiert. Das Substrat Trilinolein wurde zuvor in 50 µl 5 % (w/v) Gummi arabicum durch eine Ultraschallbehandlung gelöst. Die Reaktionsprodukte wurden nach der Methode von Bligh und Dyer (1959; 2.22.1) extrahiert. Die Trennung der oxygenierten Produkte erfolgte über RP-HPLC an einer EC250/4 Nucleosil 120-5 C18 Säule (250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey&Nagel, Düren) bei einer Flussrate von 1 ml/min mit folgenden Laufmitteln:

Laufmittel A: Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>/Essigsäure (90:10:0.1, v/v/v) und Laufmittel B: Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>/Essigsäure (100:0:0.1, v/v/v). Die Elution verlief nach folgendem Gradienten: 0 - 10 min 100 % Laufmittel A, 10 - 30 min von 100 % Laufmittel A auf 100 % Laufmittel B und 30 - 80 min 100 % Laufmittel B. Zur Detektion wurde die Absorption bei 234 nm gemessen. Die entsprechenden Fraktionen der oxygenierten Produkte wurden gesammelt, nach dem Trocknen im Stickstoffstrom in 200 µl Methanol aufgenommen und konnten dann mittels DC (2.31) analysiert werden.

### 2.25.3 Trennung und Quantifizierung von Oxylipinen mittels SP-HPLC

Die Trennung der einzelnen Isomere der Hydro(pero)xyfettsäuren mittels der SP-HPLC wurde mit einer Zorbax SIL Säule (150 x 2.1 mm, 5 µm Partikelgröße, Agilent, Waldbronn) durchgeführt. Als Laufmittel wurde n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure (100:1:0.1, v/v/v) verwendet. Für die Trennung von freien Oxylipinen wurde eine Flussrate von 0,2 ml/min gewählt, und als Standards zur Bestimmung der Retentionszeiten wurden ein Brennesselblattextrakt sowie 13-γ-HOT verwendet. Methylierte Oxylipine wurden bei einer Flussrate von 0,1 ml/min getrennt und methylierte Isomere der Hydroxyfettsäuren dienten als Standards. Die Detektion der Hydro(pero)xyfettsäuren erfolgte durch die Absorptionsmessung bei 234 nm.

## 2.26 Analyse von Fettsäuremethylestern durch 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) ausgenutzt. Die Trennung der FAME wurde an einer DB-23-Säule (30 m x 0.25 mm, 0,25 µm Filmdicke; J&W, Scientific, Agilent, Waldbronn) mit Helium als Trägergas und einer konstanten Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Das Injektionsvolumen war von der Konzentration der FAME in der Probe abhängig. Der Temperaturgradient verlief für 1 min bei 150 °C, gefolgt von einer Erhöhung um 8 °C/min auf 200 °C und einer Erhöhung um 25 °C/min auf 250 °C. Die Temperatur von 250 °C wurde für 6 min konstant gehalten. Die Detektion erfolgte über einen Flammenionisations-Detektor (FID). Zur Bestimmung der Retentionszeiten der FAME diente ein FAME-Standardgemisch (F.A.M.E. Mix, C4-C24, Sigma, München).

### 2.27 Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid

Für die GC/MS-Analyse (2.28) von JA, dinor-oPDA und oPDA wurden die Carboxylgruppen dieser Oxylipine mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert. Dazu wurden die vereinigten JA-, dinor-oPDA- und oPDA-Fractionen nach der RP-HPLC (2.25.1) in einem Stickstoffstrom getrocknet und in 200 µl Chloroform/N,N-Diisopropylethylamin (1:1, v/v) aufgenommen. Nach der Zugabe von 10 µl auf 37 °C erwärmten Pentafluorbenzylbromid (Sigma, München) wurde die Probe über Nacht bei RT derivatisiert. Anschließend wurden die Proben in einem Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 5 ml n-Hexan gelöst über eine Kieselgelsäule (Bakerbond spe<sup>TM</sup> Silica Gel, Baker, Griesheim) gegeben. Diese wurde zuvor mit 5 ml n-Hexan konditioniert. Die Pentafluorbenzylester wurden mit 7 ml n-Hexan/Diethylether (2:1, v/v) in ein 10-ml-Schliffglas eluiert und erneut in einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Probe wurde in 10 µl Acetonitril resuspendiert und stand für die GC/MS-Analyse (2.28) bereit.

### 2.28 GC/MS-Analyse von Pentafluorbenzylestern

Die wie unter 2.27 beschrieben mit Pentafluorbenzylbromid derivatisierten Oxylipine JA, dinor-oPDA und oPDA wurden anschließend gaschromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch quantifiziert. Die GC/MS-Analyse (Stumpe *et al.*, 2005) wurde mit einem Finnigan GCQ Gaschromatographie/Massenspektrometrie-System (Austin, Texas, USA) durchgeführt, das mit einer RTX-5MS-Säule mit integrierter Vorsäule (15 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke; Restek, Bad Homburg) ausgestattet war. Helium wurde mit einer konstanten Flussrate von 0,8 ml/min als Trägergas eingesetzt. Es wurde eine Elektronenenergie von 100 eV, eine Quelltemperatur von 200 °C und eine „Transferline“-Temperatur von 300 °C verwendet. Die Proben wurden durch negative chemische Ionisierung mit Ammoniak als Reagenzgas gemessen. Die Injektionstemperatur betrug 220 °C und der Temperaturgradient verlief wie folgt: 60 - 180 °C mit einer Erhöhung von 25 °C/min, 180 - 270 °C mit einer Erhöhung von 5 °C/min, 270 °C für 1 min, 270 - 300 °C mit einer Erhöhung von 10 °C/min und 300 °C für 25 min.

### 2.29 Isolierung von Membranphospholipiden aus Lipidkörpern (Tzen *et al.*, 1992)

Für die Isolierung von Membranphospholipiden wurden 30 mg gereinigte Lipidkörper in 500 µl Dichtegradientenpuffer (2.9) rehomogenisiert. Um zunächst die Neutrallipide zu entfernen, wurde die Lipidkörperpräparation mit 1 ml Diethylether durch kräftiges Schütteln, eine 15-minütige Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation für 4 min bei 13.600 x g extrahiert. Die obere Etherphase wurde entfernt, die untere wässrige Phase und die Interphase wurden weitere dreimal in der gleichen Weise mit 1 ml Diethylether extrahiert. Zur Verdampfung restlicher Spuren des Diethylethers wurden die untere wässrige Phase und die Interphase für 1 h einem Stickstoffstrom ausgesetzt. Nach Zugabe von 750 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) und vorsichtigem Schütteln wurde die Probe für 4 min bei 13.600 x g zentrifugiert. Die Chloroformphase, welche die Phospholipide enthält, wurde dreimal mit Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (1:1, v/v) gewaschen, jeweils gefolgt von einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13.600 x g. Der Rückstand der unter einem Stickstoffstrom getrockneten Chloroformphase wurde in 80 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen und stand für die Analyse in der DC (2.31) bereit.

### 2.30 Isolierung von Neutrallipiden und Glykolipiden aus Lipidkörpern

Zur Fraktionierung von Neutrallipiden und Glykolipiden wurde ein Lipidextrakt (2.22.1) aus 30 mg gereinigten Lipidkörpern (2.9) auf eine Kieselgelsäule (Strata SI-1 Silica, 55µm, 70A, 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. Anschließend wurden die Glykolipide mit 10 ml Aceton/Isopropanol (9:1, v/v) eluiert. Die beiden Eluate wurden in einem Stickstoffstrom getrocknet und die Rückstände in 200 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen. Die weitere Analyse erfolgte über DC (2.31).

### 2.31 Dünnschichtchromatographie von Lipidkörperlipiden

Die isolierten Lipidklassen (Phospholipide, Neutrallipide, Glykolipide; 2.29 und 2.30) sowie oxygeniertes Trilinolein (2.25.2) wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) weiter aufgetrennt. Die Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, 20 x 20 cm; Merck, Darmstadt) wurde über einen DC-Probenautomaten (Camag, Muttenz, Schweiz) mit einem Aliquot der isolierten Lipide, entsprechend der Lipidkonzentration, beladen. Phospholipide wurden in Methylacetat/Isopropanol/Chloroform/Methanol/0,25 % wässrigem Kaliumchlorid (25:25: 25:10:9, v/v/v/v/v), Neutrallipide in Petrolether/Diethylether/Essigsäure (70:30:0,5, v/v/v) und Glykolipide in Chloroform/Methanol (85:15, v/v) als Laufmittel entwickelt. Für die Identifizierung der verschiedenen Lipide wurde die Co-Migration von Standardlipiden genutzt. Die Visualisierung der Lipide erfolgte durch Inkubation in einer  $\text{CuSO}_4$ -Lösung (10 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 92 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 8 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) und anschließender Erhitzung der Dünnschichtplatte auf 170 °C. Die Quantifizierung der Phospholipide und oxygenierter Neutrallipide erfolgte anhand der Bestimmung des Schwärzungsgrades mit Hilfe der AIDA/2D-Densitometrie Software. Mit Standardlösungen von Phospholipiden bzw. Trilinolein wurden dazu Eichgeraden für den Schwärzungsgrad erstellt.

### 2.32 Analyse von Neutrallipiden mittels LC/MS (TOF)

Die Identifizierung unbekannter DC-Signale erfolgte durch Analyse mittels Ultra Performance LC™ (ACQUITY UPLC™ System, Waters Corporation, Milford, USA) gekoppelt mit Flugzeitanalysator-MS (TOF-MS, LCT Premier™, Waters Corporation, Milford, USA), welche von Dr. K. Feußner durchgeführt wurde. Die chromatographische Auftrennung der Proben erfolgte an einer ACQUITY UPLC™ BEH SHIELD RP18 Säule (1 x 100 mm, 1,7 µm Partikelgröße, Waters Corporation, Milford, USA) bei einer Temperatur von 40 °C und einer Flussrate von 0,2 ml/min mit folgenden Laufmitteln: Laufmittel A:  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ /Methanol/Acetonitril/ Ameisensäure (90:5:5:0.1, v/v/v/v) und Laufmittel B: Acetonitril/Ameisensäure (100:0.1, v/v). Die Elution erfolgte entsprechend des Gradientes: 0 - 0,5 min 40 % Laufmittel B, 0,5 - 5,5 min von 40 % Laufmittel B auf 100 % Laufmittel B, 5,5 - 10 min 100 % Laufmittel B und 10 - 12 min 40 % Laufmittel B.

Die Detektion der eluierten Lipide erfolgte durch Elektrosprayionisations-MS (ESI-MS) im positiven W-Modus mit einer Massenauflösung größer als 10000. Vor jeder Probenreihe wurde das LCT Premier™ durch Injektion von 0,01 % (v/v) Phosphorsäure in Acetonitril/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (50:50, v/v) kalibriert. Kapillar- und Conespannung, Desolvationstemperatur und Gasfluss wurden optimiert, um Cluster einer Intensität zwischen 200 und 20 Counts/Scan in einem Massenbereich ( $m/z$ ) von 500 - 1000 Da zu erhalten. Die Analyse der Proben erfolgte bei einer Kapillar- und Conespannung von 2700 V bzw. 30 V, einer Desolvations- und Sourcetemperatur von 250 °C bzw. 80 °C und einem Cone- und Desolvationsgasfluss von 30 bzw. 600 l/h. Daten wurden im Centroid-Modus mit einer Scanzeit von 0,5 sec und einem Inter-scan-Delay von 0,1 sec unter Nutzung des DRE (Dynamic Range Enhancement) aufgezeichnet.

Zur Gewährleistung einer Massengenauigkeit unter 5 ppm wurde der LockSpray™-Modus zur Analyten-unabhängigen Messung einer internen Kalibrierungsmasse genutzt. Hierbei diente 1 µg/ml Leucin-Enkephaline ( $[M+H]^+ = 556,2771$ ,  $[M+H]^+$  des doppelten C<sup>13</sup> Isotopomers = 558,2828, Sigma-Aldrich, Deisenheim) in Acetonitril/H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (50:50, v/v) als Kalibrierungsmasse. Die kontinuierliche Injektion des Locksprays mit einer Flussrate von 20 µl/min erfolgte über eine externe Pumpe (515 HPLC Pump, Waters Corporation, Milford, USA). Dabei wurde für die Lockmasse eine durchschnittliche Intensität von 500 Counts/Scan im Centroid-Modus erreicht.

### 3. Ergebnisse

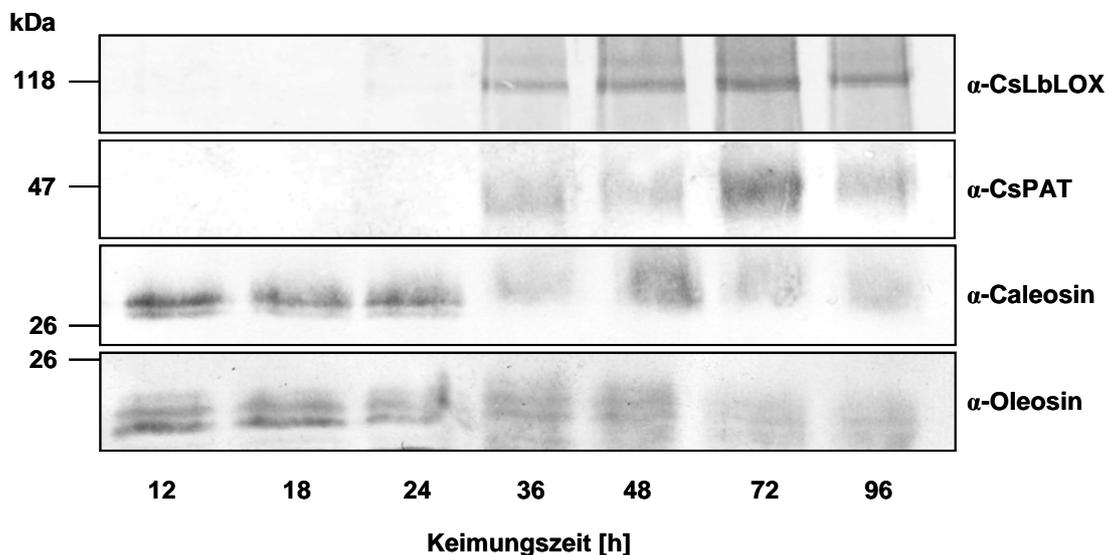
In Ölsaaten dienen Speicherlipide in den Anfangsstadien der Keimung als alleinige Kohlenstoffquelle für das embryonale Wachstum. Diese Speicherlipide werden in den Lipidkörpern in Form von TAGs gelagert. Neben dem klassischen Abbau der Speicherlipide über am Lipidkörper lokalisierte TGLs, die TAGs zu freien Fettsäuren und Glycerin hydrolysieren, wurde in einigen Pflanzenarten ein alternativer Abbauweg beschrieben, der durch die spezifische Aktivität einer 13-LOX initiiert wird (Feussner *et al.*, 1997b; Kindl, 1997; Feussner *et al.*, 2001). Bisher blieb jedoch ungeklärt, wie diese lipidmobilisierenden Enzyme Zugang zu ihrem hydrophoben Substrat im Inneren des Lipidkörpers erhalten. In Gurkenkeimlingen konnte die am Lipidkörper lokalisierte PLA<sub>2</sub> CsPAT identifiziert werden, die möglicherweise durch den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran an der Mobilisierung der Speicherlipide beteiligt ist (May *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte der LOX-abhängige Abbauweg der Speicherlipide in Lipidkörpern von Gurkenkeimlingen unter besonderer Berücksichtigung der initialen Schritte, die die Zugänglichkeit des Lipidkörpers ermöglichen, genauer untersucht werden. Weitere Analysen sollten sich auf die Mobilisierung der Speicherlipide über TGLs in Arabidopsis-Keimlingen ausweiten.

#### 3.1 Die Zusammensetzung des Lipidkörpers im Gurkenkeimling

##### 3.1.1 Lipidkörper-assoziierte Proteine während der Keimlingsentwicklung

Bisherige Untersuchungen an Gurkenkeimlingen haben ergeben, dass bereits 24 h nach Beginn der Keimung eine spezifische LOX, die CsLbLOX, über Aktivität und Proteinvorkommen an der Membran des Lipidkörpers nachzuweisen war (Feussner und Kindl, 1992). Im weiteren Verlauf der Keimung wird dieses Enzym dann zu einem der dominierenden Proteine dieses Organells (Feussner, 1993; Feussner *et al.*, 1996). Für das Patatin-ähnliche Protein CsPAT konnte über Subfraktionierungsexperimente mit Gurkenkeimlingen gezeigt werden, dass es ebenfalls ausschließlich am Lipidkörper vorkommt (May *et al.*, 1998). Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen der CsLbLOX und dem CsPAT während der Keimung, insbesondere bei der Mobilisierung der Speicherlipide, aufzudecken, sollte zunächst eine zeitliche Korrelation

zwischen der Expression des CsPAT, der CsLbLOX und weiterer Lipidkörper-assoziiierter Proteine während der Keimung untersucht werden. Abb. 4 zeigt die zeitabhängige Akkumulation der untersuchten Proteine während der Keimung. CsPAT war ab 36 h nach Beginn der Keimung und dann fortlaufend in dem analysierten Zeitraum bis 96 h detektierbar. Nach einer Keimungszeit von 72 h konnte im Vergleich zu den anderen Keimungszeitpunkten die höchste Akkumulation an CsPAT-Protein gefunden werden. Im Gegensatz zum Auftreten des CsPAT konnte die CsLbLOX schon nach 24 h Keimung in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. In weiteren Keimungsversuchen wurde CsLbLOX-Protein bereits nach 18 h nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigte die CsLbLOX eine transiente Akkumulation in dem untersuchten Keimungszeitraum mit einem Maximum des Proteingehaltes nach 72 h. Im Gegensatz zu der nach 24 h bzw. 36 h beginnenden Akkumulation der CsLbLOX- und CsPAT-Proteine, wurde für die beiden Strukturproteine des Lipidkörpers Caleosin und Oleosin eine deutliche Abnahme ihres Proteingehaltes in der Western-Blot-Analyse offensichtlich. Während die beiden Strukturproteine zwischen 12 und 24 h Keimung jeweils als zwei distinkte Signale im Western-Blot erkennbar waren, nahm zwischen 36 und 96 h der Proteingehalt einerseits ab



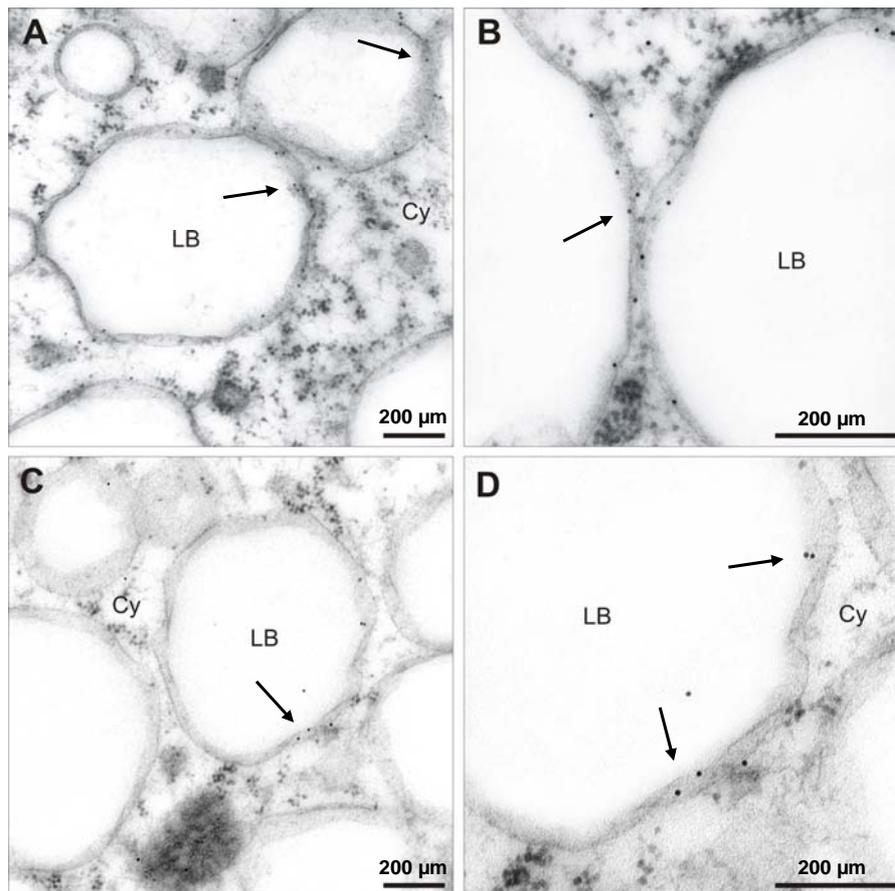
**Abb. 4 Zeitliches Vorkommen von Lipidkörper-assoziierten Proteinen während der Keimung.** Nach der Isolierung von Lipidkörpern aus Keimblättern, die nach der entsprechenden Keimungszeit geerntet wurden, erfolgte die Extraktion der Proteine aus den Lipidkörpern (2.10.1). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit den angegebenen primären Antikörpern (Tab. 4) analysiert. Von fünf ( $\alpha$ -CsLbLOX,  $\alpha$ -CsPAT) bzw. zwei ( $\alpha$ -Caleosin,  $\alpha$ -Oleosin) Keimungsversuchen stellt die Abbildung ein repräsentatives Ergebnis dar.

und andererseits lösten sich die beiden distinkten Signale eventueller Isoformen zunehmend auf. Dieser Effekt war beim Caleosin stärker ausgeprägt als beim Oleosin und lässt auf einen proteolytischen Abbau dieser beiden Lipidkörper-assoziierten Proteine während der Keimung schließen.

### 3.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung von CsPAT und CsLbLOX

In einer früheren Arbeit konnte durch immunzytochemische Färbung von Keimblättern die Lokalisierung der CsLbLOX am Lipidkörper beschrieben werden (Feussner *et al.*, 1996). Generell erfolgte der Nachweis der Lokalisierung der CsLbLOX und auch des CsPAT an der Membran des Lipidkörpers bisher indirekt über Aktivitätsmessungen und Proteinanalysen (Feussner und Kindl, 1992; May *et al.*, 1998). Daher sollte die genaue intrazelluläre Lokalisierung der CsLbLOX im Vergleich zu der des CsPAT mit Hilfe der Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie (2.19) untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden von Dr. M. Melzer am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt.

Von 72 h alten, etiolierten Keimblättern wurden Ultradünnschnitte angefertigt und diese mit den Antikörpern, die gegen CsLbLOX bzw. CsPAT gerichtet waren, inkubiert. Anschließend erfolgte die Immunogold-Markierung der Gewebeschnitte, von denen repräsentative Transmissionselektronenmikroskopaufnahmen in Abb. 5 dargestellt sind. Die CsLbLOX wurde an der Membran der Lipidkörper detektiert. Vereinzelt war auch eine Immunogold-Markierung im Zytosol in der Nähe des rauen endoplasmatischen Retikulums zu erkennen (Abb. 5B). Bei den meisten globulären Strukturen handelt es sich hier um Ribosomen, die eine ähnliche Größe wie die verwendeten Goldpartikel besitzen. Im Falle des CsPAT konnte ebenfalls eine Lokalisierung an der Membran der Lipidkörper festgestellt werden (Abb. 5C, D).



**Abb. 5 Intrazelluläre Lokalisierung von CsPAT und CsLbLOX über Immunogold-Markierung.** Ultradünnschnitte von Gurkenkeimblättern wurden mit Antisera gegen CsLbLOX (A und B) bzw. CsPAT (C und D) inkubiert, anschließend immunogoldmarkiert und im Transmissionselektronenmikroskop analysiert (2.19). Die Keimblätter stammten von 72 h alten etiolierten Keimlingen. Die Pfeile verweisen auf die Immunogold-Markierung an der Lipidkörpermembran. LB: Lipidkörper; Cy: Zytosol.

### 3.1.3 Untersuchung der Phospholipaseaktivität am Lipidkörper

Für das rekombinant exprimierte CsPAT wurde PLA<sub>2</sub>-Aktivität gegenüber PC als Substrat *in vitro* nachgewiesen (May *et al.*, 1998). Zunächst sollte das pH-Optimum des rekombinanten Proteins bestimmt werden, und anschließend die Phospholipase-Aktivität am isolierten Lipidkörper während der Keimung analysiert werden, um eine mögliche Korrelation zu der bestimmten Proteinakkumulation festzustellen. Für die Mobilisierung der Speicherlipide in Gurkenkeimlingen konnte gezeigt werden, dass die durch die CsLbLOX-Reaktion oxidativ modifizierten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Speicherlipiden durch eine für diese Derivate hoch spezifische TGL vom Lipidkörper freigesetzt werden (Balkenhohl *et al.*, 1998). Um die untersuchte PLA<sub>2</sub>-Aktivität während

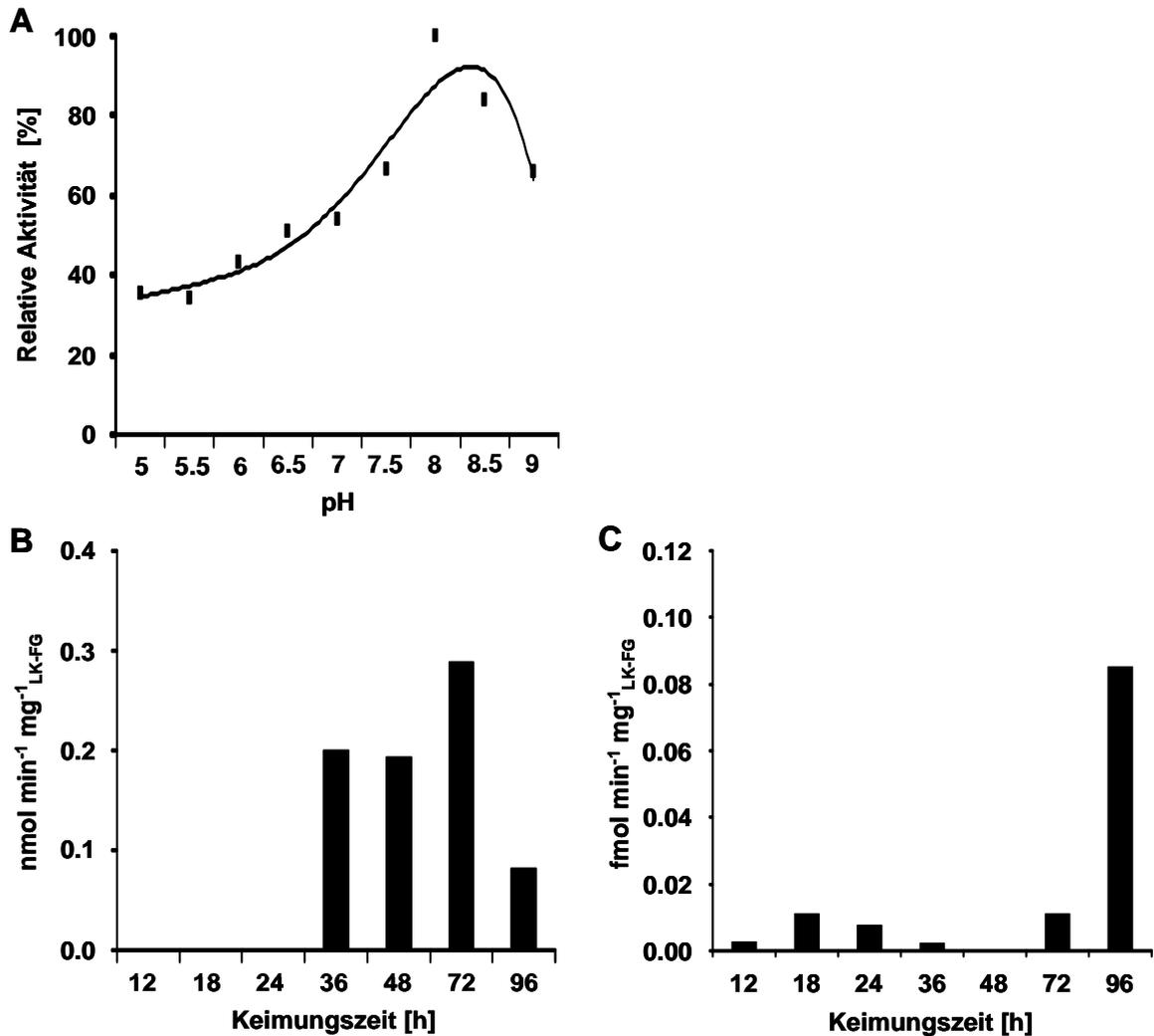
der Keimung und damit den vermuteten partiellen Abbau der Lipidkörpermembran in einen zeitlichen Kontext mit dem generellen Abbau der Speicherlipide stellen zu können, sollte die TGL-Aktivität an isolierten Lipidkörpern während der Keimung untersucht werden. Der hypothetische partielle Abbau der Lipidkörpermembran zur Initialisierung der Speicherlipidmobilisierung sollte sich in Änderungen der Zusammensetzung der Membranphospholipide während der Keimung widerspiegeln. Daher sollten über die Analyse der Zusammensetzung der Membranphospholipide des Lipidkörpers Hinweise über das Vorkommen von Substraten und Produkten des CsPAT *in vivo* gefunden werden.

### 3.1.3.1 Ermittlung des pH-Optimums von CsPAT

Die Bestimmung des pH-Optimums des rekombinant exprimierten CsPAT wurde von Dr. Armin Schlereth am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt. Das rekombinante CsPAT zeigte höchste PLA<sub>2</sub>-Aktivität in einem pH-Bereich zwischen pH 8 und 8,5 (Abb. 6A), wie bereits auch für die rekombinant exprimierte CsLbLOX gefunden worden war (Feussner und Kindl, 1994; Feussner *et al.*, 1998).

### 3.1.3.2 Enzymaktivitäten am isolierten Lipidkörper

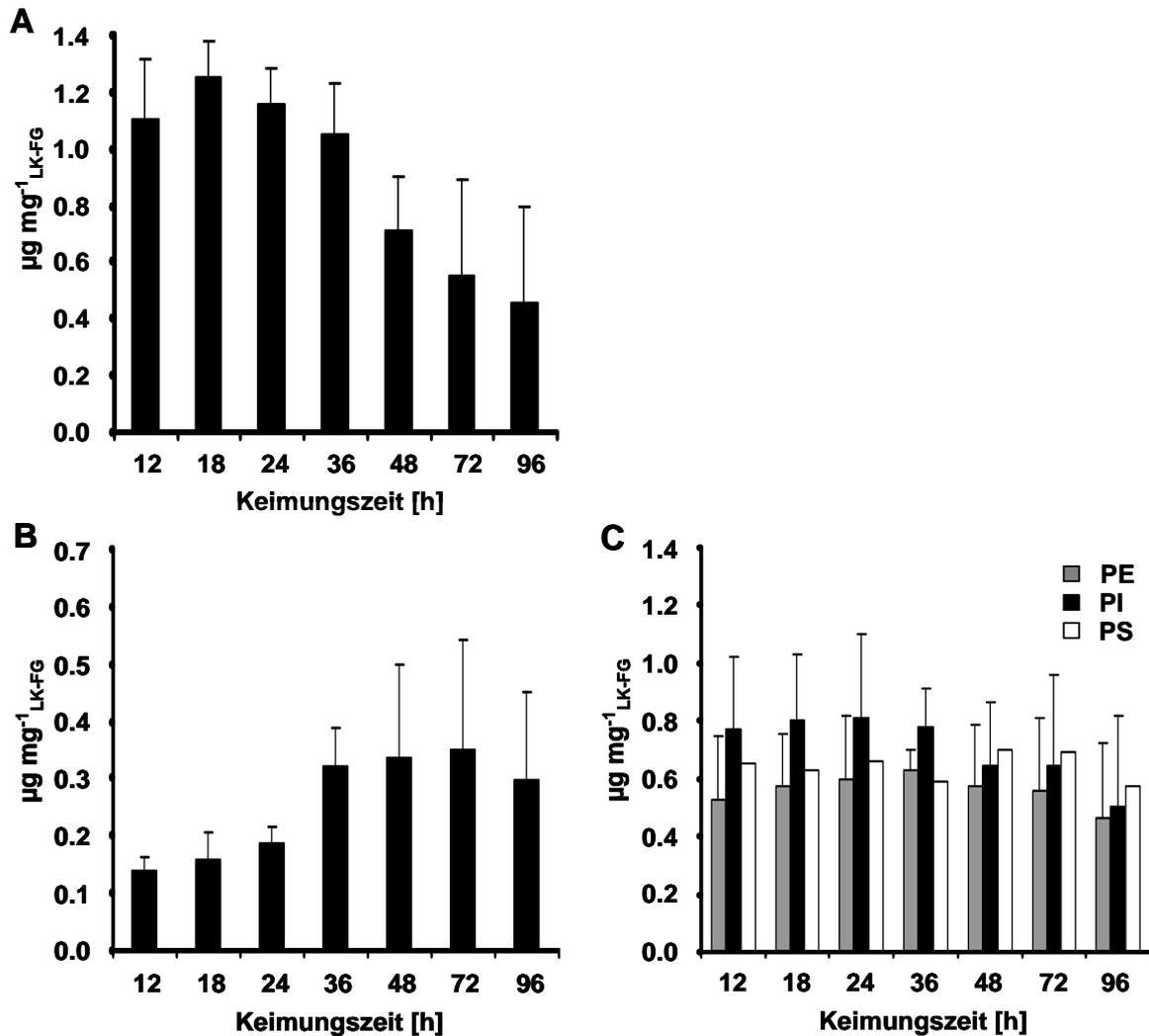
Um die Beteiligung einer Phospholipase am partiellen Abbau der Lipidkörpermembran während der Mobilisierung der Speicherlipide zu untersuchen, wurden isolierte Lipidkörper auf PLA<sub>2</sub>-Aktivität während der Keimung untersucht. Da CsPAT vermutlich die verantwortliche PLA<sub>2</sub> darstellt, wurde für den PLA<sub>2</sub>-Aktivitätstestansatz der optimale pH-Wert der CsPAT-Aktivität von 8,25 eingestellt (3.1.3.1). Die ermittelte spezifische PLA<sub>2</sub>-Aktivität an isolierten Lipidkörpern während der Keimung ist in Abb. 6B gezeigt. PLA<sub>2</sub>-Aktivität war transient ab 36 h nach Beginn der Keimung am Lipidkörper nachweisbar und erreichte nach 72 h Keimungszeit ein Maximum. Eine deutliche TGL-Aktivität war am Lipidkörper erst nach 96 h Keimungszeit detektierbar (Abb. 6C). Im Gegensatz zu der ermittelten TGL-Aktivität ab 96 h nach Beginn der Keimung war die spezifische PLA<sub>2</sub>-Aktivität zu diesem Zeitpunkt schon wieder erheblich zurückgegangen (Abb. 6B).



**Abb. 6 Untersuchungen der PLA<sub>2</sub>- und TGL-Aktivität.** (A) Bestimmung des pH-Optimums des rekombinant exprimierten CsPAT. Nach Inkubation des mittels Affinitätschromatographie gereinigten Proteins mit 2-Linoleoyl-PC bei den entsprechenden pH-Werten wurde die freigesetzte Linolsäure über RP-HPLC bestimmt (2.21.3). Die relative Aktivität wurde auf den höchsten Wert bei pH 8 bezogen. (B) PLA<sub>2</sub>-Aktivität an isolierten Lipidkörpern, die mit <sup>14</sup>C-markiertem PC inkubiert wurden (2.21.2.1). (C) TGL-Aktivität an isolierten Lipidkörpern, die mit <sup>14</sup>C-markiertem Triolein inkubiert wurden (2.21.4). PLA<sub>2</sub>- und TGL-Aktivitäten wurden anhand der freigesetzten radioaktiven Linolsäure über DC detektiert und mit Hilfe der 2D-Densitometrie quantifiziert (B und C). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Messungen.

### 3.1.3.3 Zusammensetzung der Membranphospholipide

Zur Untersuchung der Membranphospholipide wurden diese aus Lipidkörpern extrahiert und über DC aufgetrennt (2.29). Für die Identifizierung der verschiedenen Phospholipide wurde die Co-Migration von Standardlösungen der Phospholipide genutzt.



**Abb. 7 Untersuchung der Membranphospholipide isolierter Lipidkörper während der Keimung.** Die Phospholipide wurden aus isolierten Lipidkörpern extrahiert und über DC aufgetrennt (2.29). Die Quantifizierung der jeweiligen Phospholipide erfolgte über die 2D-Densitometrie nach Färbung mit einer  $\text{CuSO}_4$ -Lösung und Erhitzen auf  $170\text{ }^\circ\text{C}$ . **(A)** zeigt den Gehalt von Phosphatidylcholin (PC), **(B)** den Gehalt von Lysophosphatidylcholin (LPC) und **(C)** den Gehalt an Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) während der Keimung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen, wobei für PS nur die Daten von zwei Messungen verwendet wurden. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) konnten als Bestandteile der Lipidkörpermembran identifiziert werden (Abb. 7). Der Gehalt an PC nahm kontinuierlich während der Keimung ab (Abb. 7A), während gleichzeitig der Gehalt an LPC, dem Abbauprodukt von PC, zunahm (Abb. 7B). Der verstärkte Abbau von PC und die deutliche

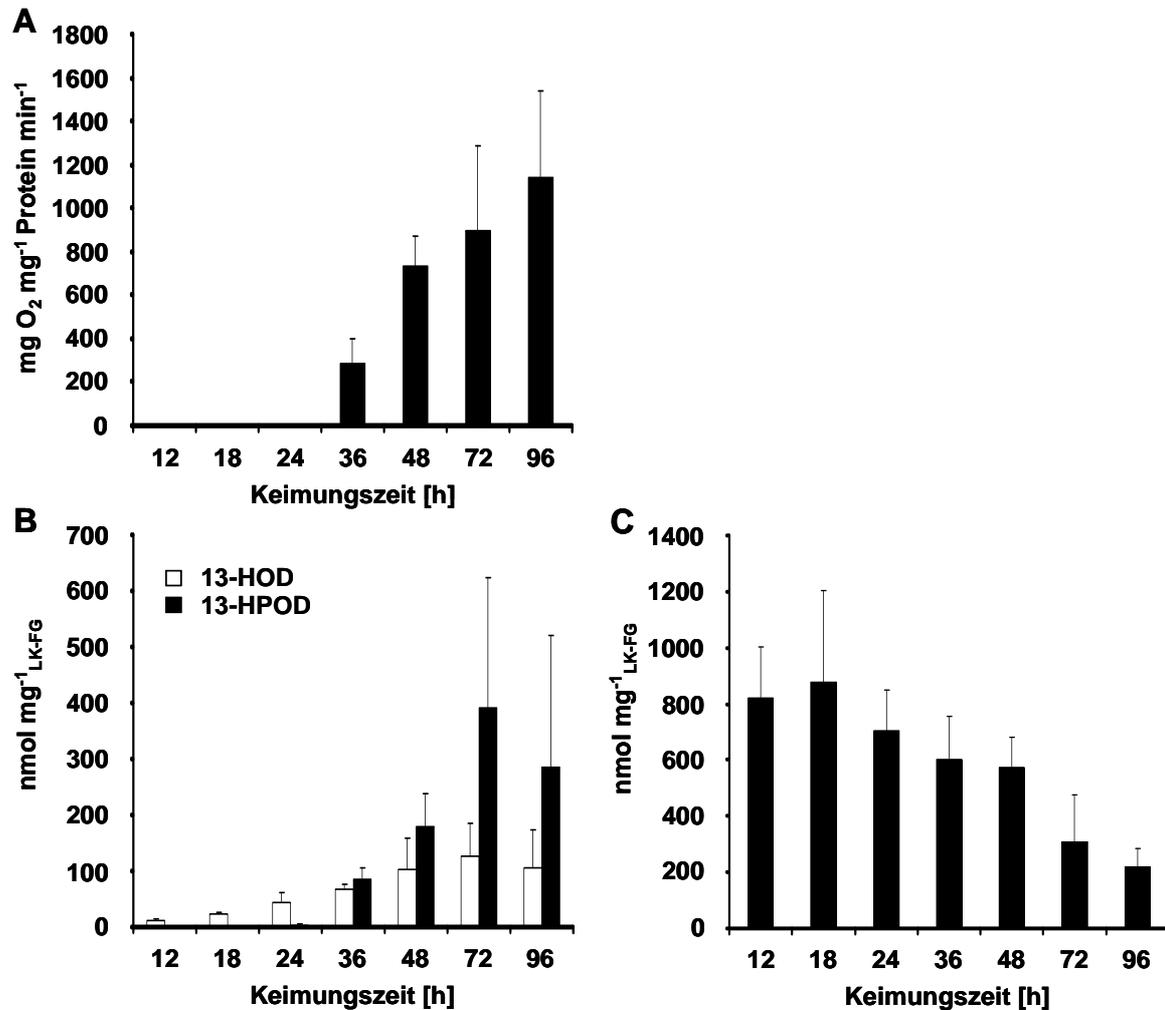
Akkumulation von LPC nach 36 h Keimungszeit korrelierte zeitlich mit dem Nachweis der ersten PLA<sub>2</sub>-Aktivität (Abb. 6B) und dem ersten Auftreten des CsPAT (Abb. 4) während der Keimung. Neben PC wurden außerdem PE, PI und PS als wesentliche Bestandteile der Lipidkörpermembran identifiziert (Abb. 7C). Diese drei Phospholipide traten annähernd in gleicher Menge auf, und in frühen Stadien der Keimung (12 bis 24 h) repräsentierte jedes einzelne Phospholipid ungefähr 50 % der Menge an PC (Abb. 7A und C). Der Gehalt an PE und PS änderte sich nicht signifikant während der untersuchten Keimungszeit, während für den Gehalt an PI eine leichte Abnahme von 36 h bis 96 h um 35 % festgestellt werden konnte.

#### 3.1.4 Untersuchung der Lipoxygenaseaktivität am Lipidkörper

Im Gurkenkeimling wurde ein alternativer Stoffwechselweg für den Abbau der Speicherlipide gefunden (Feussner *et al.*, 2001). Hierbei ist die CsLbLOX in der Lage, spezifisch lipidgebundene Fettsäuren zu oxygenieren, wodurch hauptsächlich lipidgebundenes 13-H(P)OD gebildet wird. Da die Speicherlipide von einer einschichtigen Phospholipidmembran umgeben sind, muß zur Initiation der CsLbLOX-Reaktion möglicherweise zunächst die Integrität dieser Lipidkörpermembran gestört werden. Sollte eine Phospholipase für einen partiellen Abbau der Lipidkörpermembran verantwortlich sein und damit den Zugang zu dem Substrat der CsLbLOX ermöglichen, müsste dieses Enzym vor und/oder zur gleichen Zeit wie die CsLbLOX aktiv sein. Um folglich die schon ermittelte PLA<sub>2</sub>-Aktivität am Lipidkörper (3.1.3.2) in einen zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten der CsLbLOX-Aktivität stellen zu können, wurden sowohl die LOX-Aktivität als auch das Auftreten ihrer Metabolite im isolierten Lipidkörper während der Keimung untersucht. Aus Abb. 8A geht hervor, dass erste LOX-Aktivität 36 h nach Beginn der Keimung messbar war. Von diesem Zeitpunkt an nahm die Aktivität kontinuierlich zu. Nach 96 h Keimungszeit war die gemessene Aktivität um das Vierfache höher als nach 36 h.

In Abb. 8B ist die Produktakkumulation der CsLbLOX-Reaktion in den Speicherlipiden während der Keimung dargestellt. Zwischen 36 und 72 h Keimungszeit stieg der Gehalt des primären CsLbLOX-Produktes 13-HPOD parallel zur Zunahme der *in vitro* LOX-Aktivität am Lipidkörper an. Dabei trat ein Maximum nach 72 h auf, das gegenüber 48 h 54 % mehr 13-HPOD aufwies (Abb. 8B). Obwohl nach 96 h Keimung noch eine Erhöhung der LOX-Aktivität *in vitro* bestimmt werden konnte, nahm der Gehalt an lipidgebundenem

13-HPOD zu diesem Zeitpunkt bereits wieder um 27 % ab. Parallel zur Akkumulation von 13-HPOD wurden auch ansteigende Mengen an 13-HOD mit fortlaufender Keimungsdauer detektiert. Der Anstieg an 13-HOD beginnt bereits nach 12 h Keimung (Abb. 8B). Untersuchungen des Verhältnisses von *S*- und *R*-Enantiomeren haben für 13-HOD



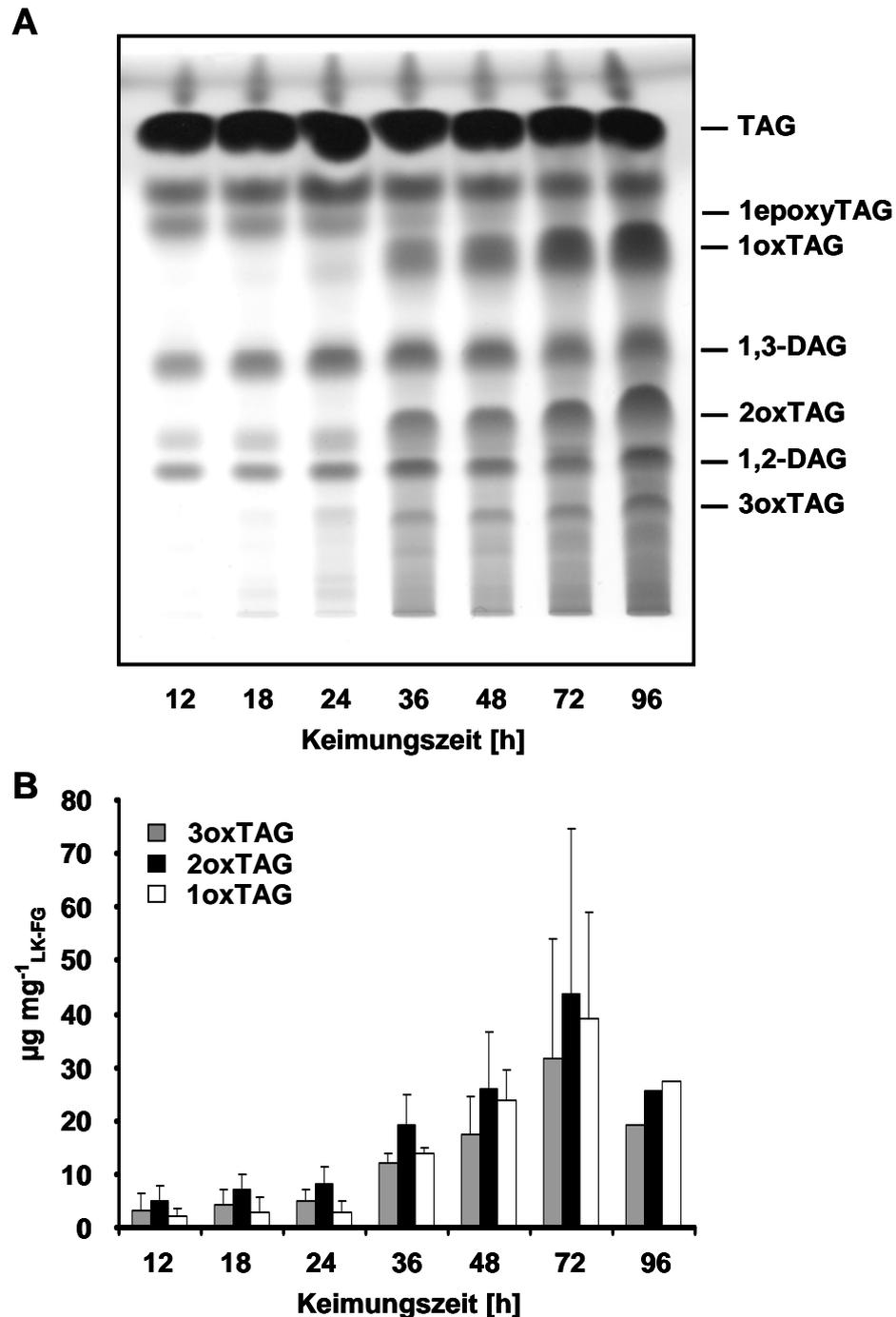
**Abb. 8 Untersuchungen der LOX-Aktivität, der Produktakkumulation und des Substratverbrauches während der Keimung.** (A) Polarographische Bestimmung der LOX-Aktivität an isolierten Lipidkörpern über eine Sauerstoff-Elektrode mit Linolsäure als Substrat (2.21.1.1). (B) Bestimmung von veresteter (13*S*,9*Z*,11*E*)-13-Hydro(pero)xy-9,11-octadecadiensäure (13-H(P)OD) in isolierten Lipidkörpern. Lipidextrakt von Lipidkörpern wurde transesterifiziert (2.24) und methyliertes 13-H(P)OD nach Reinigung über RP-HPLC durch SP-HPLC aufgetrennt und quantifiziert. (C) Messung des LOX-Substrates veresterte Linolsäure in isolierten Lipidkörpern. Lipidextrakt von Lipidkörpern wurde transesterifiziert (2.24) und methylierte Linolsäure mittels GC quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei (A und B) bzw. vier (C) unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

zwischen 18 und 96 h der Keimung eine überwiegende *S*-Konfiguration ergeben und lassen daher auf einen enzymatischen Ursprung dieser Verbindung schließen (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren wurde zur Untersuchung der LOX-Aktivität der Gehalt an lipidgebundener Linolsäure, dem CsLbLOX-Substrat, während der Keimung bestimmt. Die transesterifizierten Lipidextrakte aus Lipidkörpern wurden mittels GC (2.26) analysiert und die methylierte Linolsäure quantifiziert. Der Gehalt der lipidgebundenen Linolsäure zeigte eine starke Abnahme von  $875 \text{ nmol mg}^{-1}$  nach 18 h auf  $220 \text{ nmol mg}^{-1}$  nach 96 h (Abb. 8C), welches eine Abnahme des CsLbLOX-Substrates um 75 % während der untersuchten Keimungsperiode darstellt. Nach 72 h Keimung, dem Zeitpunkt der stärksten Akkumulation von gebundenem 13-HPOD und 13-HOD, lagen 63 % der gebundenen Linolsäure in oxygenierter Form vor.

### 3.1.5 Zusammensetzung der Neutrallipide

Die CsLbLOX ist in der Lage *in vitro* Di- und Trilinolein zu den entsprechenden Mono-, Di- und Trihydroperoxy-Derivaten zu oxygenieren (Feussner *et al.*, 1997a). Zur weiteren Untersuchung der LOX-Aktivität und des Abbaus der Speicherlipide sollte die Zusammensetzung der Neutrallipide im Lipidkörper im Verlauf der Keimung im Detail analysiert werden. Lipidextrakte aus isolierten Lipidkörpern von sieben unterschiedlichen Keimungszeitpunkten wurden über Kieselgelsäulen fraktioniert und die erhaltenen Neutrallipide mittels DC aufgetrennt (2.30, 2.31). Es konnten keine offensichtlichen Veränderungen im TAG-, 1,3-DAG- und 1,2-DAG-Gehalt über den untersuchten Keimungszeitraum festgestellt werden (Abb. 9A). Es wurden aber Neutrallipide aufgetrennt, die mit den herkömmlichen Standardsubstanzen nicht identifiziert werden konnten und im Verlauf der Keimung in ihrem Gehalt zunahmen. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um unterschiedlich stark oxidierte Neutrallipidspezies handelt, wurden zur Identifizierung geeignete Standardsubstanzen durch Umsetzung von Trilinolein mit der rekombinanten CsLbLOX hergestellt (2.25.2). Die dabei entstandenen einfach, zweifach und dreifach oxygenierten Trilinolein-Spezies wurden über RP-HPLC aufgereinigt. Aufgrund der identischen  $R_f$ -Werte dieser oxygenierten Trilinolein-Spezies mit denen der unbekanntenen Neutrallipide konnten diese Signale als monohydro(pero)xygenierte, dihydro(pero)xygenierte bzw. trihydro(pero)xygenierte TAG-Spezies identifiziert werden (Abb. 9A). Die Akkumulation der oxygenierten TAG-Spezies während der Keimung



**Abb. 9 Untersuchung der Neutrallipide isolierter Lipidkörper während der Keimung.** Lipidextrakt aus isolierten Lipidkörpern wurde über eine Kieselgelsäule fraktioniert und die Neutrallipide mittels DC aufgetrennt (2.30, 2.31). (A) Neutrallipide in Lipidkörpern. (B) Gehalt oxygenierter TAG-Spezies in Lipidkörpern. Die oxygenierten TAG-Spezies wurden mit Hilfe von mit CsLbLOX umgesetztem Trilinolein (2.25.2) identifiziert und über die 2D-Densitometrie quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen, wobei für den Zeitpunkt 96 h nur die Daten von einer Messung verwendet wurden. Die Standardabweichungen sind angegeben. TAG, Triacylglycerin; DAG, Diacylglycerin; 3oxTAG, Trihydro(pero)xy-TAG; 2oxTAG, Dihydro(pero)xy-TAG; 1oxTAG, Monohydro(pero)xy-TAG; 1epoxyTAG, Monoepoxy-TAG.

wurde mit Hilfe der 2D-Densitometrie-Software quantifiziert, wobei Trilinolein zur Erstellung einer Eichgeraden für den Schwärzungsgrad verwendet wurde (Abb. 9B). Die mono-, di- und trihydro(pero)xygenierten TAG-Spezies waren ungefähr zu gleichen Anteilen in den Lipidkörpern zu den verschiedenen Keimungszeitpunkten zu finden. Ein deutlicher Anstieg des Gehaltes an oxygenierten TAG-Spezies war ab 36 h Keimungszeit festzustellen. Die Zunahme verlief kontinuierlich und zeigte nach 72 h Keimungszeit ihr Maximum. Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von oxygenierten TAG-Spezies glich sehr stark dem Verlauf der Akkumulation von 13-HPOD in der TAG-Fraktion (Abb. 8B).

**Tab. 5 Charakterisierung der nicht identifizierten DC-Signale durch Analyse der darin enthaltenen molekularen TAG-Spezies mittels LC/MS (TOF) und Berechnung des relativen Anteils dieser Spezies**

Signal	Experimentelle <i>m/z</i>	Theoretische <i>m/z</i>	RMS-Fehler [ppm]	Summen- formel	Interpretation (TAG mit)	Anteil [%]
<b>1 x Epoxy-</b>						
<b>1epoxyTAG</b>	910,7487	910,7500	3,11	C57H100NO7	54:6; 3 x 18:2	19
	912,7658	912,7656	1,02	C57H102NO7	54:5; 2 x 18:2, 1 x 18:1	22
	886,7504	886,7500	1,74	C55H100NO7	52:4; 1 x 18:2, 1 x 18:1, 1 x 16:1	26
	888,7649	888,7656	1,77	C55H102NO7	52:3; 1 x 18:2, 1 x 18:1, 1 x 16:0	5
	888,7626	888,7656	3,60	C55H102NO7	52:3; 1 x 18:2, 1 x 18:1, 1 x 16:0	4
	914,7810	914,7813	2,45	C57H104NO7	54:3; 3 x 18:1	25
<b>1 x HPOD</b>						
<b>1oxTAG</b>	928,7597	928,7605	2,60	C57H102NO8	54:6; 3 x 18:2	13
	930,7753	930,7762	2,42	C57H104NO8	54:5; 2 x 18:2, 1 x 18:1	11
	904,7603	904,7605	1,89	C55H102NO8	52:4; 2 x 18:2, 1 x 16:0	14
	906,7751	906,7762	2,56	C55H104NO8	52:3; 2 x 18:1, 1 x 16:1	13
	932,7913	932,7918	2,70	C57H106NO8	54:4; 2 x 18:1, 1 x 18:2	19
	880,7585	880,7605	3,50	C53H102NO8	50:2; 2 x 16:0, 1 x 18:2	6
	934,8076	934,8075	0,88	C57H108NO8	54:3; 1 x 18:2, 1 x 18:1, 1 x 18:0	15
	908,7909	908,7918	1,95	C55H106NO8	52:2; 1 x 18:2, 1 x 18:0, 1 x 16:0	9
<b>2 x HPOD</b>						
<b>2oxTAG</b>	960,7508	960,7504	0,97	C57H102NO10	54:6; 3 x 18:2	10
	936,7532	936,7504	0,73	C55H102NO10	52:4; 2 x 18:2, 1 x 16:0	28
	962,7684	962,7660	0,54	C57H104NO10	54:5; 2 x 18:2, 1 x 18:1	25
	964,7834	964,7817	2,60	C57H106NO10	54:4; 2 x 18:2, 1 x 18:0	18
<b>1 x HPOD, 1 x HOD</b>						
	944,7529	944,7555	6,10	C57H102NO9	54:6; 3 x 18:2	6
	918,7410	918,7398	0,74	C55H100NO9	52:5; 2 x 18:2, 1 x 16:1	7
	946,7717	946,7711	0,91	C57H104NO9	54:5; 2 x 18:2, 1 x 18:1	6
	/					
<b>TAG</b>	902,8182	902,8177	1,32	C57H108NO6	54:3; 3 x 18:1	10
	894,7523	894,7551	3,51	C57H100NO6	54:7; 2 x 18:2, 1 x 18:3	4
	876,8016	876,8020	0,88	C55H106NO6	52:2; 2 x 18:1, 1 x 16:0	11
	896,7701	896,7707	1,55	C57H102NO6	54:6; 3 x 18:2	29
	898,7840	898,7864	3,54	C57H104NO6	54:5; 2 x 18:2, 1 x 18:1	21
	872,7686	872,7707	4,80	C55H102NO6	52:4; 2 x 18:2, 1 x 16:0	26

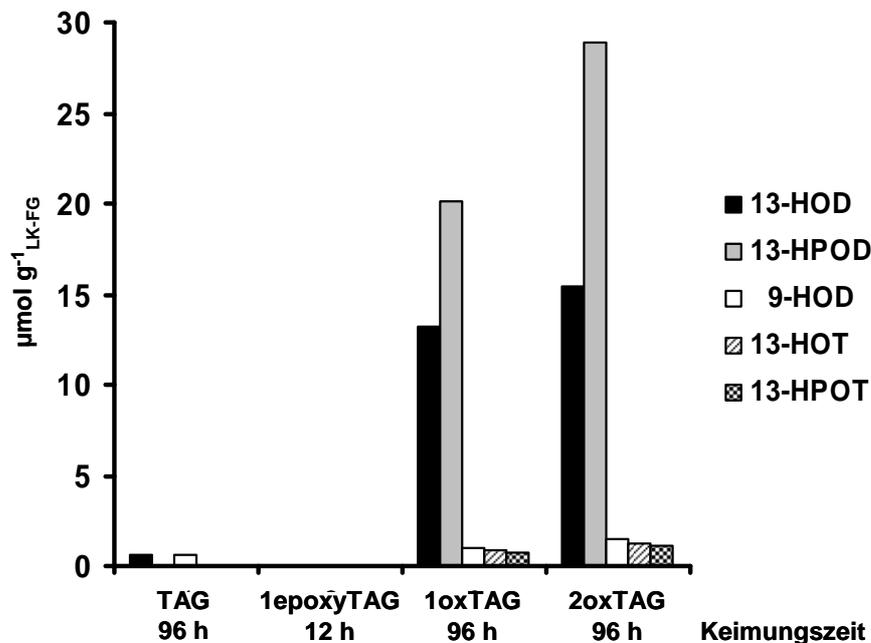
*m/z*, Masse/Ladungs-Quotient des Ammoniumaddukts;

RMS-Fehler, die Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers berechnet sich nach folgender Formel:  $\sqrt{\frac{\sum(\text{mass error})^2}{n}}$ ;

Anzahl der Messungen  $n = 3$ .

Zusätzlich wurde die Identifizierung der monohydro(pero)xygenierten und dihydro(pero)xygenierten TAG-Spezies mit Hilfe von LC/MS-Analysen bestätigt (2.32). Die

LC/MS-Analysen wurden von Dr. K. Feußner durchgeführt. In Tab. 5 sind die in der LC/MS-Analyse erhaltenen Massen, die entsprechenden Summenformeln und die daraus abgeleiteten möglichen TAG-Spezies der jeweiligen DC-Signale (Abb. 9A) zusammengefasst. Für die einfach oxygenierten TAG-Spezies (1oxTAG) wurden nur Hydroperoxide identifiziert, während für die zweifach oxygenierten TAG-Spezies (2oxTAG) sowohl TAGs mit zwei Hydroperoxiden als auch solche mit einem Hydroperoxid und einem Hydroxid gefunden wurden. In der abgeleiteten Fettsäurezusammensetzung der oxygenierten TAG-Spezies und auch der nicht oxygenierten TAGs war ein hoher Anteil an Linolsäure (18:2) zu erkennen. Desweiteren wurde ein in der DC-Analyse nicht identifiziertes Signal, dessen Intensität während der



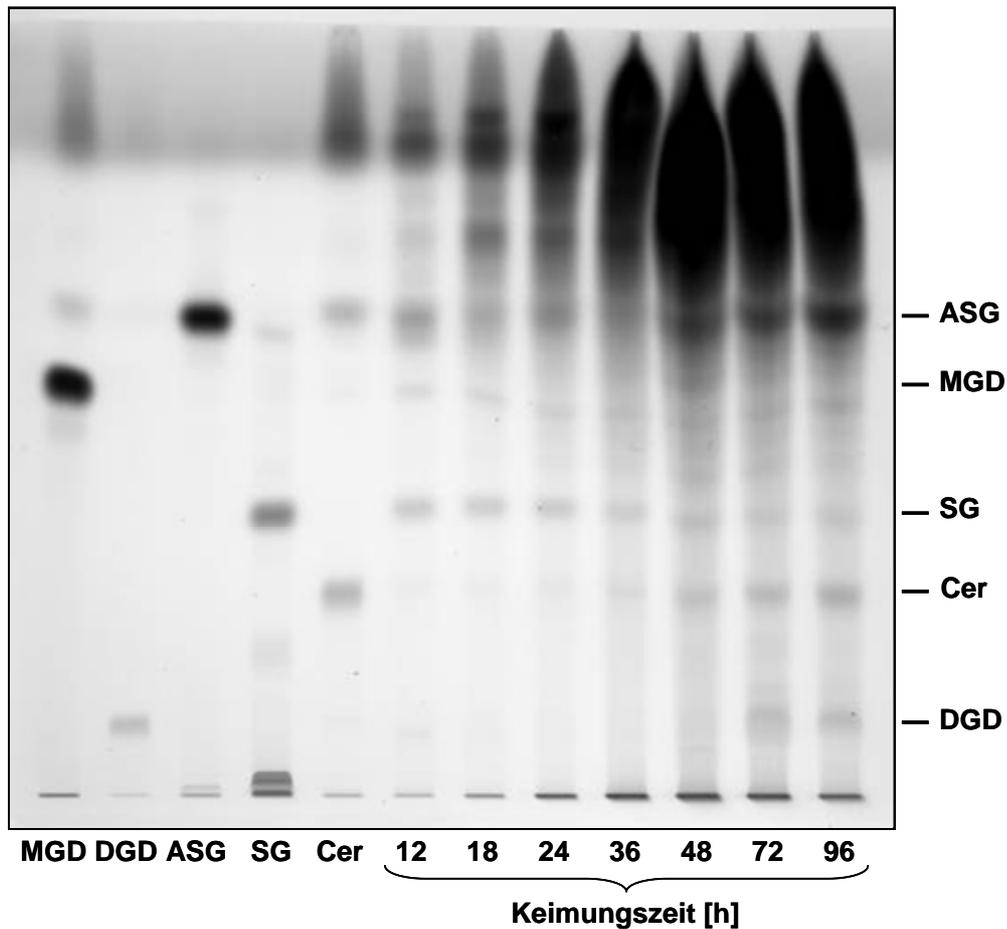
**Abb. 10 Untersuchung der oxygenierten TAGs mittels HPLC.** Fraktionierte Neutrallipide von isolierten Lipidkörpern der angegebenen Keimungszeiten (2.30) wurden über DC aufgetrennt und entsprechende Signale aus der DC-Platte ausgekratzt. Nach Extraktion der Lipide in dem Laufmittel und Reinigung über Watte-Säulchen wurde ein Aliquot transesterifiziert (2.24). Methylierte Hydro(pero)xide wurden anschließend über RP-HPLC gereinigt sowie durch SP-HPLC aufgetrennt und quantifiziert. TAG, Triacylglycerin-Signal; 1epoxyTAG, Monoepoxy-TAG-Signal; 1oxTAG, Monohydro(pero)xy-TAG-Signal; 2oxTAG, Dihydro(pero)xy-TAG-Signal. 13-H(P)OD, (13*S*,9*Z*,11*E*)-13-Hydro(pero)xy-9,11-octadecadiensäure; 9-HOD, (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-Hydroxy-10,12-octadecadiensäure; 13-H(P)OT, (13*S*,9*Z*,11*E*,15*Z*)-13-Hydro(pero)xy-9,11,15-octadecatriensäure.

Keimung deutlich abnahm, mittels der LC/MS-Analyse als TAG mit einem Epoxid als funktionelle Gruppe identifiziert (1epoxyTAG; Abb. 9A, Tab. 5). Dabei kamen TAGs mit einem Vernolsäurerest als Standardsubstanz zum Nachweis der Epoxygruppe zum Einsatz (Daten nicht gezeigt). Um aufzuklären welche Hydroperoxide bzw. Hydroxide in den oxygenierten TAG-Spezies vorkommen, wurden die entsprechenden DC-Signale (Abb. 9A) isoliert, die extrahierten Lipide transesterifiziert und mittels HPLC analysiert (Abb. 10). Für die monohydro(pero)xygenierten und dihydro(pero)xygenierten TAG-Spezies wurden 13-HPOD und 13-HOD als vorwiegende oxygenierte Fettsäuren identifiziert, wobei 13-HOD durch Reduktion von 13-HPOD während der Aufarbeitung entstanden sein dürfte. Die weiteren detektierten Hydro(pero)xide 9-HOD, 13-HOT und 13-HPOT kamen nur in vernachlässigbaren Anteilen in den einfach und zweifach oxygenierten TAG-Spezies vor. Das nicht oxygenierte TAG-Signal wies 13-HOD und 9-HOD in äußerst geringen Mengen auf, während in dem Signal der monoepoxygenierten TAGs keine Hydro(pero)xide nachgewiesen werden konnten.

### 3.1.6 Zusammensetzung der Glykolipide des Lipidkörpers

Für eine komplexe Analyse der Zusammensetzung des Lipidkörpers von Gurkenkeimlingen wurde die Zusammensetzung der Glykolipide während der Keimung untersucht. In Abb. 11 ist eine repräsentative Trennung der Glykolipide nach ihrer Entwicklung und Detektion in der DC dargestellt. Durch Vergleich der  $R_f$ -Werte von bekannten Standardglykolipiden mit den nachgewiesenen Signalen konnten in den Lipidkörpern verschiedene Glykolipidspezies identifiziert werden. Während des gesamten untersuchten Keimungszeitraumes wurden acetylierte Sterolglycoside (ASG) detektiert, deren Gehalt zwischen 48 und 96 h Keimung deutlich zunahm. Desweiteren wurden über den gesamten Keimungszeitraum geringe Mengen an Sterolglycosiden (SG) identifiziert, deren Menge 24 h nach Beginn der Keimung abnahm. Eine weitere Glykolipidspezies comigrierte mit dem Cerebrosid-Standard (Cer). Dieses Glykolipid begann nach 48 h Keimung bis zum Ende des analysierten Zeitraumes zu akkumulieren. Parallel zu dieser Lipidspezies akkumuliert eine unbekannte Glykolipidspezies, die geringfügig unpolarer ist als Digalactosyldiacylglycerin (DGD). Aufgrund des gegenüber DGD unterschiedlichen  $R_f$ -Wertes kann eine mögliche plastidäre Verunreinigung der Lipidkörperpräparation ausgeschlossen werden. Im stark unpolaren Bereich des Trennbereichs, oberhalb der ASGs, wurden weitere Glykolipide detektiert, die mit den Standardlipiden nicht zu

identifizieren waren. Diese Glykolipide akkumulierten ab 36 h Keimung so stark, dass sie nicht mehr als distinkte Signale aufgetrennt wurden und sogar den größten Anteil der Glykolipidfraktion darstellten. Die Annahme, dass es sich bei diesen Lipiden um eine Verunreinigung der Glykolipidfraktion mit Neutrallipiden bei der Fraktionierung der Lipidklassen handeln könnte, konnte mit einer weiteren DC-Analyse, bei der die Glykolipide in dem Laufmittel der Neutrallipide aufgetrennt wurden, widerlegt werden, da auf Höhe der TAGs keine Signale gefunden wurden (Daten nicht gezeigt).

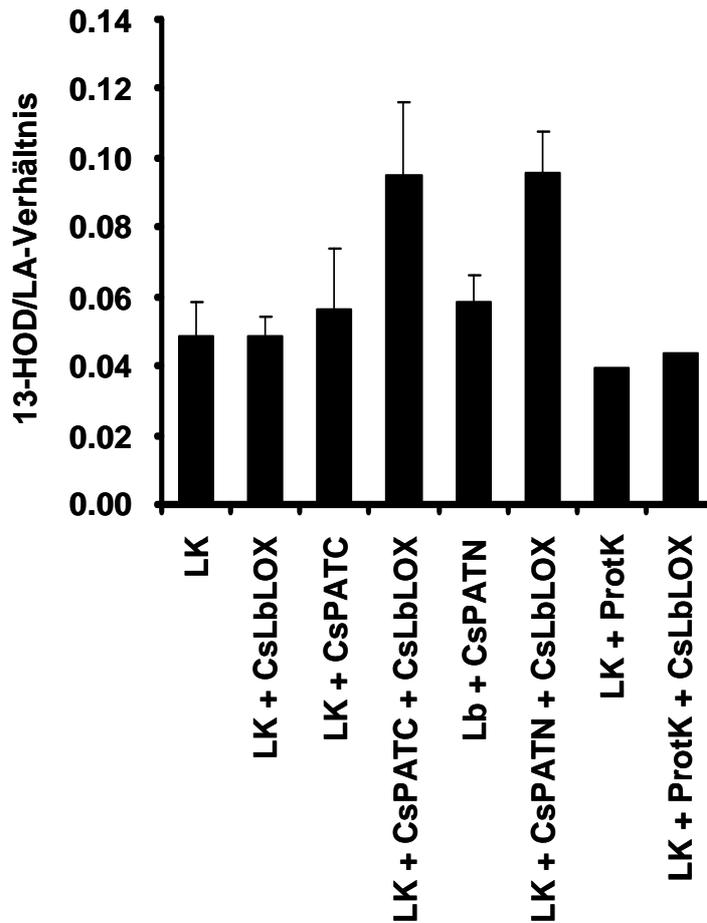


**Abb. 11 Untersuchung der Glykolipide isolierter Lipidkörper während der Keimung.** Lipidextrakt aus isolierten Lipidkörpern wurde über eine Kieselgelsäule fraktioniert und die Glykolipide mittels DC aufgetrennt (2.30, 2.31). MGD, Monogalactosyldiacylglycerin; DGD, Digalactosyldiacylglycerin; ASG, acetyliertes Sterolglycosid; SG, Sterolglycosid; Cer, Cerebrosid. Von den Glykolipidisolierungen drei verschiedener Keimungsversuche stellt die Abbildung ein repräsentatives Ergebnis dar.

### 3.1.7 *In vitro* Untersuchungen der CsPAT-abhängigen CsLbLOX-Aktivität

Für die Analyse einer direkten Interaktion der CsLbLOX- und der CsPAT-Aktivität während der Mobilisierung der Speicherlipide wurden Lipidkörper von reifen Samen, in denen CsLbLOX bzw. CsPAT noch nicht aktiv sind, mit rekombinant exprimierter CsLbLOX bei gleichzeitiger Anwesenheit oder Abwesenheit von rekombinant exprimierter CsPAT inkubiert. Diese Untersuchungen wurden von Dr. A. Schlereth durchgeführt. Die 13-LOX-Aktivität wurde indirekt über das Produkt-Substrat-Verhältnis von verestertem 13-HOD/Linolsäure bestimmt. Abb. 12 zeigt, dass die 13-LOX-Aktivität von Lipidkörpern, die entweder mit rekombinanter CsLbLOX oder mit rekombinanter CsPAT inkubiert wurden, im Vergleich zu reinen Lipidkörpern nicht erhöht war. Im Gegensatz dazu besaßen Inkubationsansätze, die sowohl rekombinante CsLbLOX als auch rekombinante CsPAT enthielten, eine 1,6-fach erhöhte 13-LOX-Aktivität im Vergleich zu dem reinen Lipidkörper. Diese Aktivität wurde sowohl für rekombinant exprimiertes CsPAT mit einem C-terminalen als auch mit einem N-terminalen His-tag detektiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die zusätzlichen Histidine unabhängig davon, an welchem Terminus sie sich befinden, die CsPAT-Aktivität nicht beeinträchtigten. Dieses Ergebnis deutet damit auf eine direkte Interaktion zwischen der LOX-Aktivität der CsLbLOX und der Aktivität der CsPAT.

Zur Untersuchung des möglichen proteolytischen Abbaus der integralen Membranproteine der Lipidkörpermembran, Oleosine und Caleosine, und der damit einhergehenden Zugänglichkeit des LOX-Substrates wurden die Lipidkörper von reifen Samen mit Proteinase K vorbehandelt und nach Entfernung der Protease mit der rekombinanten CsLbLOX inkubiert (2.21.1.2). Die 13-LOX-Aktivität wurde wie oben beschrieben ermittelt und ist ebenfalls in Abb. 12 dargestellt. Lipide der mit Proteinase K vorbehandelten Lipidkörper zeigten nach Inkubation mit der CsLbLOX keine Erhöhung der 13-LOX-Aktivität gegenüber den reinen Lipidkörpern, die nur mit Proteinase K vorbehandelt wurden. Mit diesem Versuchsansatz konnte folglich die Mitwirkung einer Protease am Abbau der Lipidkörpermembran und bei der Initiierung der LOX-Reaktion nicht nachgewiesen werden, kann jedoch prinzipiell nicht völlig ausgeschlossen werden.



**Abb. 12 Untersuchungen der Interaktion von CsPAT- und CsLbLOX-Aktivität *in vitro*.** Lipidkörper (LK) aus ungekeimten Samen wurden mit rekombinanter CsLbLOX, mit CsPAT mit C-terminalem His-tag (CsPATC), mit CsPAT mit N-terminalem His-tag (CsPATN) bzw. mit Proteinase K (ProtK) inkubiert. Die anschließend extrahierten Lipide wurden transesterifiziert und das Verhältnis von 13-HOD zu Linolsäure (LA) durch die Auftrennung und Quantifizierung in der RP-HPLC bestimmt (2.21.1.2). Die Daten repräsentieren drei unabhängige Messungen, wobei für die Vorinkubationen mit Proteinase K nur die Daten von einer Messung verwendet wurden. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.1.8 Überexpression von CsPAT und CsLbLOX in Tabakpflanzen

Eine funktionelle Analyse der Patatin-ähnlichen Phospholipase CsPAT des Gurkenlipidkörpers sollte in transgenen Tabakpflanzen erfolgen, die CsPAT alleine oder in Kombination mit der CsLbLOX exprimierten. Zusätzlich sollten Blätter von transgenen Tabakpflanzen, die das CsPAT alleine sowie in Kombination mit der CsLbLOX exprimierten, im Verlauf der Wundreaktion auf Veränderungen in der Oxylinbildung untersucht werden.

Zur Erzeugung der transgenen Tabaklinien wurde zunächst das CsPAT-Gen in den binären Pflanzentransformationsvektor pCambia3300 unter Kontrolle des USP-Promotors und das CsLbLOX-Gen in den Vektor pBinAR unter Kontrolle des 35S-Promotors kloniert (2.6.4). Anschließend erfolgte die Transformation der Konstrukte in *N. tabacum*-Pflanzen (SNN) über Agrobakterien-vermittelten T-DNA-Transfer in Blattscheiben (2.6.5). Der Vektor pCambia 3300 vermittelt über das *bar*-Gen eine Resistenz gegenüber dem Herbizid Basta, während der Vektor pBinAR über das Resistenzgen *nptII* die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin vermittelt. Transformanten wurden dementsprechend über die jeweiligen Resistenzen selektioniert und die genomische DNA der transformierten Pflanzen zusätzlich mittels PCR und genspezifischen Primern überprüft (2.6.5). Die Erstellung der transgenen Pflanzen erfolgte durch Dr. I. Saalbach.

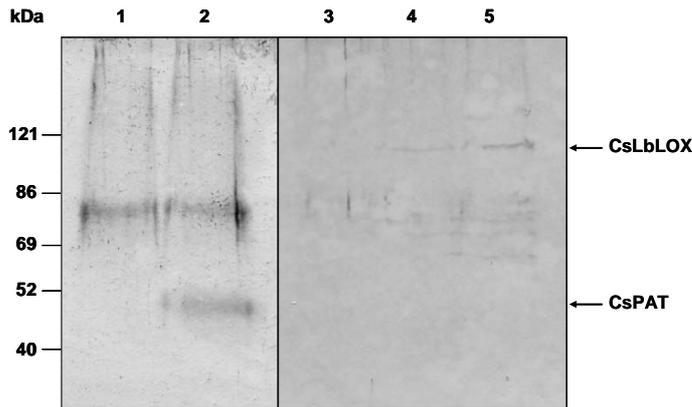
Es wurden insgesamt 94 Doppeltransformanten (A92+A93/1 bis 94) erzeugt, die sowohl CsPAT als auch die CsLbLOX aufweisen sollten. Unter den T0-Pflanzen konnten 46 Doppeltransformanten positiv auf Basta-Resistenz getestet werden, so dass vom Vorhandensein des CsPAT-Gens ausgegangen werden konnte. Die genomische DNA dieser 46 Pflanzen wurde mittels PCR auf das Vorhandensein des CsLbLOX-Gens überprüft, wobei 38 A92+A93-Linien als positiv identifiziert wurden (siehe Anhang, Tab. 7). Je 40 Samen (T1-Samen) dieser 38 A92+A93-Linien wurden auf kanamycinhaltigem MS-Medium auf ihre Kanamycinresistenz untersucht und das Spaltungsverhältnis bestimmt (siehe Anhang, Tab. 7). Bei einem Spaltungsverhältnis von 4 kann davon ausgegangen werden, dass die Transformanten nur eine Insertion des untersuchten Gens aufweisen. Es konnten 12 A92+A93-Linien gefunden werden, die ein Spaltungsverhältnis zwischen 3,3 und 6,5 zeigten und daher Kandidaten darstellten, die möglicherweise nur eine Insertion des CsLbLOX-Gens besaßen (siehe Anhang, Tab. 7). Von 15 A92+A93-Linien, einschließlich der 12 Linien, die annähernd das gesuchte Spaltungsverhältnis zeigten, wurden je 20 T1-Pflanzen auf Erde angezogen und auf Basta-Resistenz

selektioniert, um die Insertion des CsPAT-Gens zu überprüfen. Für 6 Linien konnte ein Spaltungsverhältnis zwischen 3,3 und 10 festgestellt werden, wobei nur die Linie A92+A93/26 sowohl nach Kanamycin-Selektion als auch nach Basta-Selektion Spaltungsverhältnisse zeigte, die auf nur eine Insertion des CsLbLOX- und des CsPAT-Gens schließen ließen (siehe Anhang, Tab. 7).

Desweiteren wurden 37 T0-Pflanzen erzeugt, die nur mit dem CsPAT-Gen transformiert und mit A93/1 bis 37 bezeichnet wurden (siehe Anhang, Tab. 8). Nach Selektion auf das Herbizid Basta konnten 27 Basta-resistente Linien identifiziert werden. Bei der Überprüfung der genomischen DNA von 10 Basta-resistenten A93-Linien mittels PCR wurde für 9 Linien das CsPAT-Gen gefunden. Von 26 A93-Linien der 27 Linien, die in der T0-Generation als Basta-resistent identifiziert wurden, wurden je 40 Pflanzen der T1-Generation erneut auf Basta-Resistenz selektioniert und das Spaltungsverhältnis bestimmt. Dabei zeigten 9 Linien ein Spaltungsverhältnis zwischen 3,6 und 5, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit auf nur eine Insertion des CsPAT-Gens schließen ließ (siehe Anhang, Tab. 8).

#### 3.1.8.1 Immunochemischer Nachweis der CsPAT- und CsLbLOX-Expression

Um die Expression von CsPAT und CsLbLOX in den erzeugten transgenen Tabaklinien mittels Western-Blot-Analyse zu untersuchen, wurden Lipidkörper aus T1-Tabaksamen isoliert (2.9) und die Lipidkörperproteine durch eine Aceton/Ethanol-Extraktion (2.10.1) gewonnen. Da das CsPAT und die CsLbLOX im Gurkenkeimling an der Lipidkörpermembran lokalisiert sind, wurde hier davon ausgegangen, dass diese Lokalisierung auch nach Expression im Tabaksamen zutrifft. Für die CsLbLOX konnte diese Lokalisierung bereits in transgenen Tabaksamen gezeigt werden (Hause *et al.*, 2000). Abb. 13 zeigt den Nachweis von CsPAT und CsLbLOX in T1-Samen ausgewählter Tabaklinien. Für die Doppeltransformante A92+A93/26 konnte sowohl die Expression des CsPAT als auch der CsLbLOX gezeigt werden, während in der Doppeltransformante A92+A93/72 nur die CsLbLOX nicht aber das CsPAT nachweisbar waren. Im Gegensatz zu der Linie A93/9, für die CsPAT nicht detektiert werden konnte, konnte eine A93-Linie identifiziert werden, bei der die Expression des CsPAT gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da die Doppeltransformante A92+A93/26 als positiv für die Expression von CsPAT und CsLbLOX getestet wurde und nach Untersuchung der Spaltungsverhältnisse



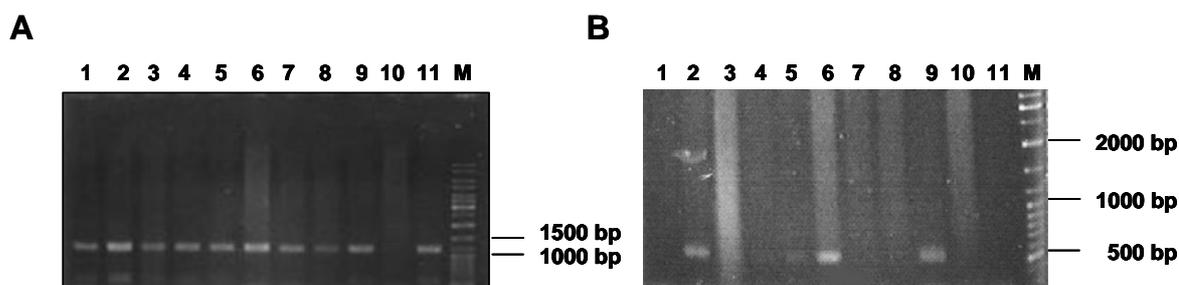
**Abb. 13 Expression von CsPAT und CsLbLOX in Tabaksamen.** Nach Isolierung von Lipidkörpern transgener T1-Samen und Fällung der Lipidkörperproteine (2.10.1) wurden die Proteine durch Elektrophorese im 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit dem Antiserum gegen CsPAT (Spur 1 und 2) bzw. CsLbLOX (Spur 3 - 5) detektiert (2.18). Spur 1: Linie A93/9, Spur 2: Linie A92+A93/26, Spur 3: A93/9, Spur 4: Linie A92+A93/26, Spur 5: Linie A92+A93/72.

für die Markerresistenzen die einzige Linie darstellte, die vermutlich nur jeweils eine Insertion der beiden Gene besaß (3.1.8), wurden T2-Samen von 9 Pflanzen dieser Linie erneut auf das Vorhandensein der exprimierten Proteine immunochemisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur in Samen einer der 9 A92+A93/26-Pflanzen das CsPAT nachweisbar war und in Samen keiner A92+A93/26-Pflanze die CsLbLOX zu finden war (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die ins Tabakgenom inserierten CsPAT- und CsLbLOX-Gene in der Folgegeneration nicht stabil exprimiert werden. Anhand der immunochemischen Untersuchungen war es nicht möglich, ausreichend transgene Linien für weiterführende Untersuchungen zu identifizieren, so dass im Folgenden zunächst der Nachweis des CsPAT- und CsLbLOX-Gens auf genomischer Ebene erbracht werden sollte (3.1.8.2).

### 3.1.8.2 Nachweis von CsPAT und CsLbLOX auf genomischer Ebene in transgenen Tabakpflanzen

Zur Identifizierung von transgenen Tabaklinien, die das CsPAT- und/oder das CsLbLOX-Gen exprimieren, sollte die genomische DNA von T1-Pflanzen der A92+A93/26-Linie mittels PCR und genspezifischen Primern analysiert werden. Das Ergebnis der PCR-Analysen von 53 A92+A93/26-Pflanzen ist in Tab. 9 im Anhang zusammengefasst und in

Abb. 14 exemplarisch für 11 A92+A93-Pflanzen dargestellt. Es konnten 20 A92+A93/26-Pflanzen identifiziert werden, in denen das CsPAT-Gen nachweisbar war. Außerdem wurde eine A92+A93/26-Pflanze generiert, deren Genom das CsLbLOX-Gen aufwies. Als Doppeltransformanten konnten 21 der 53 untersuchten A92+A93/26-Pflanzen verifiziert werden. In weiteren 11 Pflanzen wurden die untersuchten Gene nicht gefunden. Deshalb wurden diese Pflanzen als Kontrollpflanzen in den folgenden Experimenten verwendet. Eine Zusammenfassung der genotypischen Aufgliederung der untersuchten A92+A93/26-Pflanzen ist im Anhang in Tab. 10 zu finden. Von den generierten Pflanzen wurden zehn Pflanzen, in denen nur das CsPAT-Gen nachgewiesen werden konnte, zehn Doppeltransformanten und zehn Kontrollpflanzen als Wildtyp sowie die eine Pflanze, die nur das CsLbLOX-Gen aufwies, bis zum T2-Samen angezogen und für die weiteren Untersuchungen verwendet (siehe Anhang, Tab. 10).

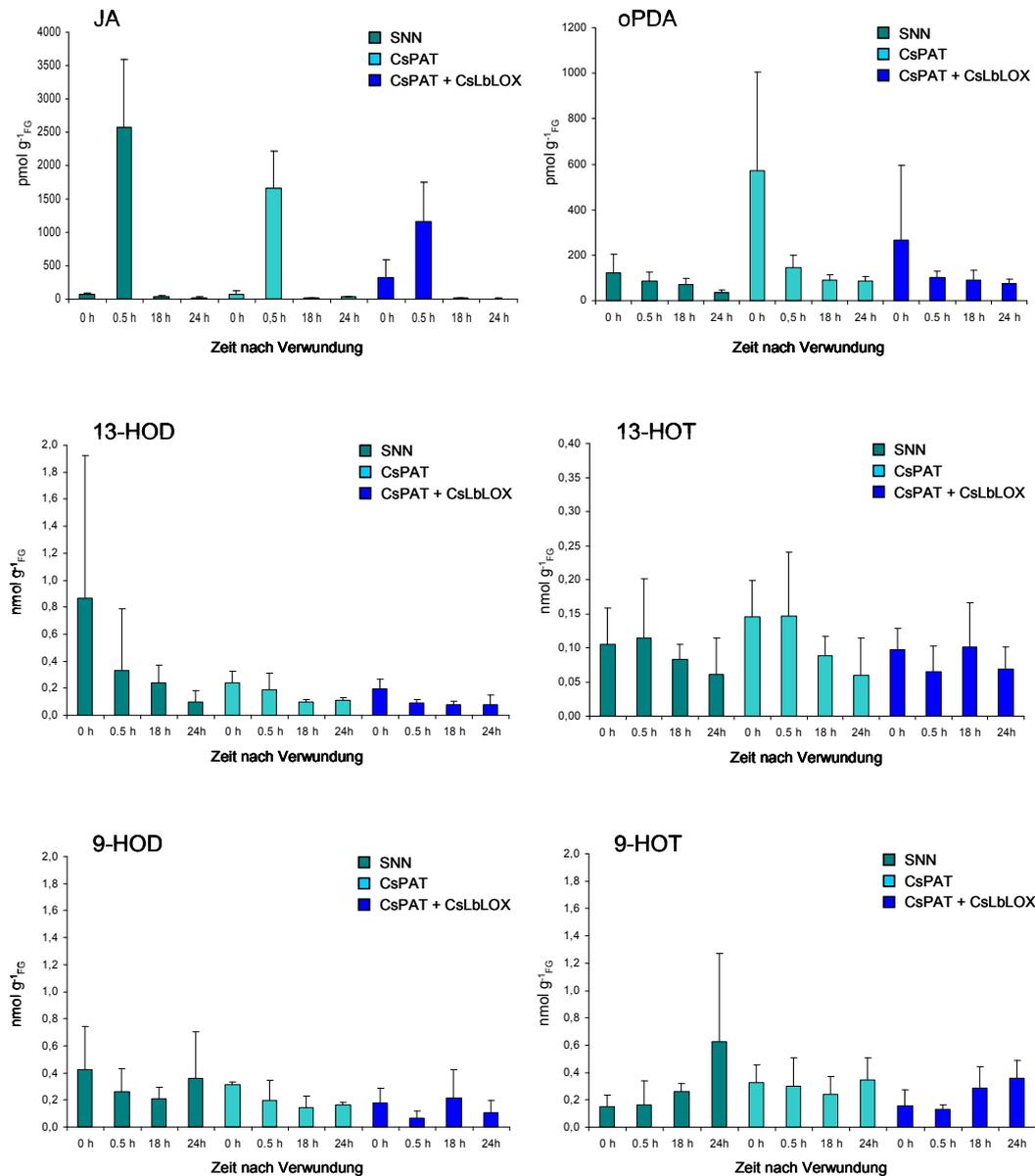


**Abb. 14 Überprüfung von A92+A93/26-Tabakpflanzen mittels PCR.** Isolierte genomische DNA (2.6.6) von A92+A93/26-Pflanzen wurde für eine PCR-Reaktion (A) mit den Primern CsPATsphiA und CsPATBglIIb (2.6.3) zum Nachweis des CsPAT-Gens (1290 bp) bzw. (B) mit den Primern LOXSalla und LOXBarrel1NotIb (2.6.5) zum Nachweis der  $\beta$ -Barreldomäne der CsLbLOX (540 bp) eingesetzt. Spur 1: A92+A93/26/10, Spur 2 - 11: A92+A93/26/12 - 22, M; Marker.

### 3.1.8.3 Oxylinprofil in Blättern nach Verwundung von CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten

Zur Untersuchung einer möglichen veränderten Oxylinbildung im Verlauf der Wundreaktion wurden Blätter transgener Tabakpflanzen, die das CsPAT alleine sowie in Kombination mit der CsLbLOX exprimierten, verwundet und die erhaltenen Blattscheiben zur Induktion der Stressreaktion für 0, 0,5, 18 bzw. 24 h in Wasser inkubiert (2.2.4). Aufgrund der genotypischen Charakterisierung in 3.1.8.2 kamen hierbei als CsPAT-

exprimierende Pflanzen die A92+A93/26 T1-Pflanzen 10, 18, 19 und 22 zum Einsatz, als CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformaten wurden die A92+A93/26 T1-Pflanzen 12, 16, 20 und 24 und als Wildtyp SNN die A92+A93/26 T1-Pflanzen 21, 25 und 32 verwendet



**Abb. 15 Profil freier Oxylipine in Blättern der CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformaten nach Verwundung.** Blattscheiben der Transformaten wurden zur Stressinduktion für die angegebenen Zeiten in  $\text{H}_2\text{O}$  inkubiert und die Lipide anschließend extrahiert (2.2.4, 2.22.2). Nach der Auftrennung der freien Oxylipine mittels RP-HPLC (2.25.1) wurden die freien Hydroxyfettsäuren mit Hilfe der SP-HPLC (2.25.3) und Jasmonsäure (JA) sowie oPDA über GC/MS (2.28) quantifiziert. Die Daten repräsentieren den gemittelten Gehalt von jeweils vier CsPAT-Einzel- (CsPAT) und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformaten (CsPAT + CsLbLOX) der T1-Generation sowie von drei Wildtyp-Pflanzen (SNN). Die Standardabweichungen sind angegeben.

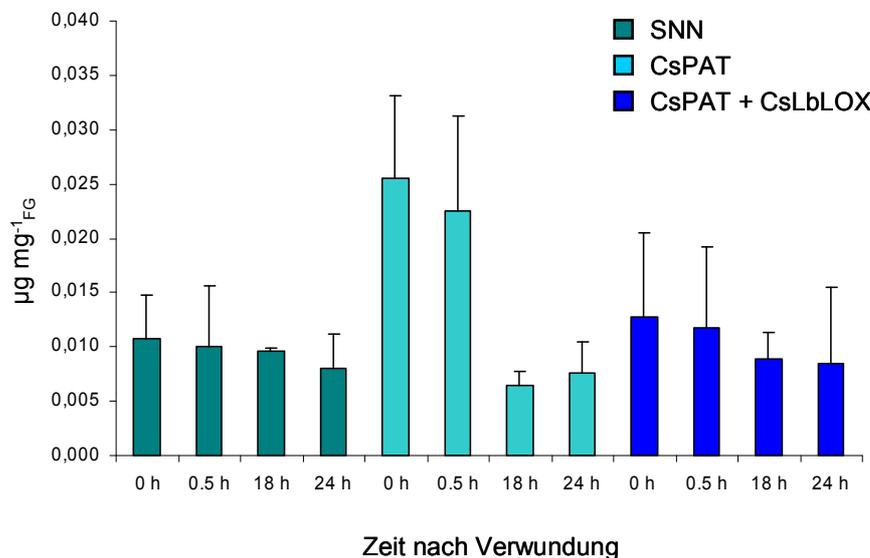
(siehe Anhang, Tab. 10). Das Ergebnis der Untersuchung freier Oxylipine ist in Abb. 15 dargestellt. Die Wundantwort spiegelt sich in der Bildung des Phytohormons Jasmonat (JA) wieder (Conconi *et al.*, 1996). Nach 0 h Stressinduktion wurde in den Wildtyppflanzen und CsPAT-exprimierenden Pflanzen noch kein JA nachgewiesen, wohingegen der JA-Gehalt in den Doppeltransformanten erhöht war. Die Wundantwort trat sowohl im Wildtyp als auch in den transgenen Tabakpflanzen nach 0,5 h Stressinduktion auf. In CsPAT-exprimierenden Pflanzen konnten nach 0,5 h Stressinduktion nur 61 % und in CsPAT- und CsLbLOX-exprimierenden Pflanzen konnten sogar nur 46 % des JA-Gehaltes des Wildtyps gefunden werden. Die weiteren untersuchten Zeitpunkte der Stressinduktion nach der Verwundung zeigten keine Akkumulation von JA.

Der 12-Oxophytodiensäure- (oPDA-) Gehalt direkt nach der Verwundung (0 h-Wert) in CsPAT-exprimierenden Pflanzen war um 79 % höher als im Wildtyp, während er in der CsPAT-/CsLbLOX-Doppeltransformante um 54 % gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Der oPDA-Gehalt nahm mit zunehmender Zeit der Stressinduktion im Wildtyp und auch in den transgenen Pflanzen ab. Da oPDA eine Vorstufe in der Biosynthese von JA ist, sollte eine Erhöhung des oPDA-Gehaltes in den transgenen Pflanzen auch zu einer erhöhten Bildung an JA während der Wundreaktion führen. Dieses konnte jedoch nicht bestätigt werden, da die JA-Gehalte in den transgenen Pflanzen deutlich geringer waren als im Wildtyp.

Die Bestimmung der CsLbLOX-Produkte ergab für den 13-HOD-Gehalt einen deutlich geringeren Gehalt direkt nach der Verwundung (0 h) in den transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp, wobei in CsPAT-Einzeltransformanten nur 29 % und in CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten nur 26 % des 13-HOD-Gehaltes des Wildtyps gemessen werden konnten. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Stressinduktion unterschied sich der 13-HOD-Gehalt der transgenen Pflanzen nicht signifikant von dem des Wildtyps. Für den Gehalt an 13-HOT, einer frühen Vorstufe in der Biosynthese von JA, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den transgenen Pflanzen gefunden werden. Der Gehalt an 9-HOD, dem endogenen LOX-Produkt in Tabakpflanzen, zeigte während der untersuchten Zeiträume der Stressinduktion sowohl für den Wildtyp als auch für die transgenen Pflanzen keine Änderungen, die Rückschlüsse auf eine Beteiligung von 9-HOD an der Wundreaktion zuließen. Im Gegensatz dazu konnte im Wildtyp eine Erhöhung des 9-HOT-Gehaltes bei fortschreitender Stressinduktion festgestellt werden, welches einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von 9-HOT an der späten Wundantwort liefert. In den transgenen Pflanzen erfolgte keine Erhöhung des 9-HOT-

Gehaltes nach 24 h Stressinduktion, so dass die Überexpression des CsPAT und der CsLbLOX die Akkumulation von 9-HOT nach Verwundung unterbindet. Zusammenfassend war festzustellen, dass die Überexpression von CsPAT und CsLbLOX in Tabakpflanzen nicht zu gravierenden Veränderungen im Gehalt freier Oxylipine während der Wundreaktion führte. Tendenziell wiesen die transgenen Pflanzen einen etwas niedrigeren Gehalt an den untersuchten Oxylipinen auf, wobei oPDA hier als Ausnahme anzusehen war.

Zusätzlich wurde der Gehalt an freier Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure im Verlauf der Wundreaktion bestimmt (Abb. 16). Beide Fettsäuren sind Vorstufen in der Biosynthese von Oxylipinen, wobei  $\alpha$ -Linolensäure das Substrat für die Biosynthese von JA darstellt.



**Abb. 16 Gehalt freier Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure nach Verwundung von Tabakblättern der CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten.** Blattscheiben der Transformanten wurden zur Stressinduktion für die angegebenen Zeiten in  $H_2O$  inkubiert und die Lipide extrahiert (2.2.4, 2.22.2). Nach der Methylierung des Lipidextraktes wurden die Fettsäuremethylester mittels GC-Analyse quantifiziert (2.26). Die Daten repräsentieren den gemittelten Gehalt von jeweils vier CsPAT-Einzel- (CsPAT) und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten (CsPAT + CsLbLOX) der T1-Generation sowie von drei Wildtyp-Pflanzen (SNN). Die Standardabweichungen sind angegeben.

Während des gesamten Zeitraumes nach der Verwundung wurde zwischen dem Wildtyp und CsPAT-/CsLbLOX-Doppeltransformante kein Unterschied in dem Gehalt an freier Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure festgestellt. Es trat eine leichte Abnahme der Summe der beiden

Fettsäuren mit fortschreitender Stressinduktion auf. Die CsPAT-Einzeltransformante zeigte nach 0 und 0,5 h Stressinduktion einen doppelt so hohen Gehalt an freier Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure wie der Wildtyp.

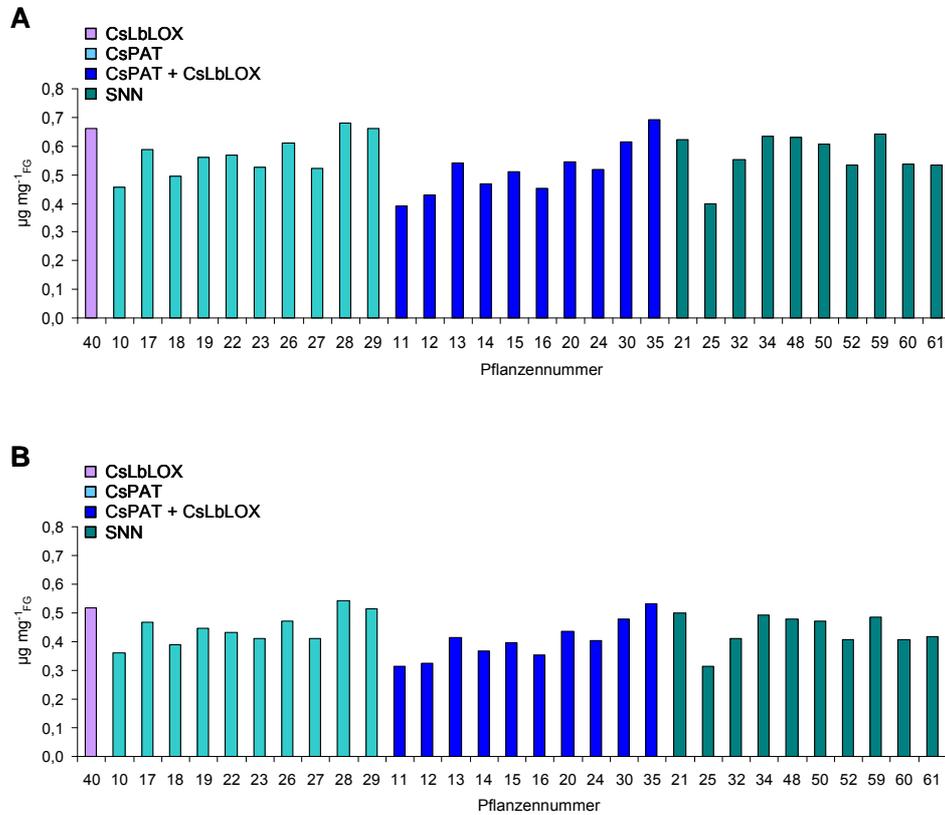
#### **3.1.8.4 Oxylinprofil von T2-Samen der CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten**

Im Zusammenhang mit der Hypothese, dass CsPAT als PLA<sub>2</sub> an dem partiellen Abbau der Lipidkörpermembran während der Mobilisierung der Speicherlipide beteiligt ist, sollte überprüft werden, ob durch die Expression von CsPAT alleine oder in Kombination mit einer Expression der CsLbLOX in Tabaksamen Änderungen im Fettsäuregehalt und eine erhöhte Akkumulation von Oxylinen bewirkt werden können. Für die Erstellung des Oxylinprofils wurden entsprechend der genotypischen Charakterisierung in 3.1.8.2 die T2-Samen von jeweils zehn CsPAT-Einzeltransformanten, zehn CsPAT-/CsLbLOX-Doppeltransformanten und zehn Kontrollpflanzen sowie T2-Samen einer CsLbLOX-Einzeltransformante verwendet (siehe Anhang, Tab. 10).

##### **3.1.8.4.1 Freie und veresterte Fettsäuren**

Das Ergebnis der Untersuchung der freien Fettsäuren in T2-Samen transgener Tabakpflanzen ist in Abb. 17 dargestellt. Bei Bildung der Mittelwerte der jeweils zehn untersuchten Pflanzen stellte sich heraus, dass die T2-Samen der Doppeltransformanten mit 0,52  $\mu\text{g}/\text{mg}$  gegenüber 0,57  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Samen der CsPAT-Einzeltransformanten und 0,57  $\mu\text{g}/\text{mg}$  in Samen des Wildtyps einen um 9 % geringeren Gehalt an freien Fettsäuren aufwiesen (Abb. 17A). Der Gehalt an freier Linolsäure in den T2-Samen der einzelnen transgenen Pflanzen zeigte ein entsprechendes Bild wie der Gehalt der gesamten freien Fettsäuren (Abb. 17B), dabei setzen sich die gesamten freien Fettsäuren zu 75 - 80 % aus freier Linolsäure zusammen. Der geringfügig erniedrigte Gehalt an freien Fettsäuren in Samen der Doppeltransformanten könnte in der Umsetzung der freien Linolsäure durch die exprimierte CsLbLOX begründet sein. Da nur die T2-Samen einer Pflanzenlinie analysiert wurden, die nur die CsLbLOX exprimierten, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob CsPAT an dieser Linolsäureumsetzung beteiligt ist. Für den Gehalt an veresterten Fettsäuren in den T2-Samen konnten keine Unterschiede zwischen den CsPAT-

Einzeltransformanten, den CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten und dem Wildtyp gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

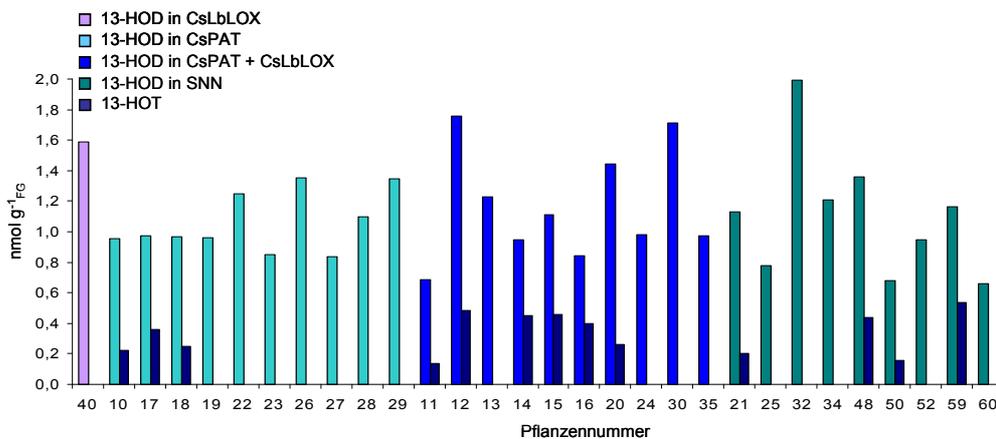


**Abb. 17 Gehalt freier Fettsäuren in T2-Tabaksamen von CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten. (A) Gesamtgehalt freier Fettsäuren, (B) Gehalt freier Linolsäure in CsLbLOX-exprimierenden (CsLbLOX), CsPAT-exprimierenden (CsPAT), CsPAT- und CsLbLOX-exprimierenden (CsPAT + CsLbLOX) sowie Wildtyp-T2-Samen (SNN) einzelner Pflanzen. Nach der Methylierung des Lipidextraktes (2.22.2, 2.23) wurden die Fettsäuremethylester mittels GC-Analyse quantifiziert (2.26).**

#### 3.1.8.4.2 Freie und veresterte Oxylipine

Bei der Bestimmung der freien Oxylipine in den T2-Tabaksamen konnten keine deutlichen Unterschiede in dem Gehalt an freiem 13-HOD, dem Produkt der CsLbLOX, zwischen den CsPAT-Einzeltransformanten, den CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten und dem Wildtyp festgestellt werden (Abb. 18). Samen der CsPAT-/CsLbLOX-Doppeltransformanten zeigten mit  $1,17 \text{ nmol g}^{-1}_{\text{FG}}$  einen um 6 % erhöhten Gehalt an freiem 13-HOD gegenüber dem Wildtyp ( $1,10 \text{ nmol g}^{-1}_{\text{FG}}$ ), während Samen der CsPAT-Einzeltransformanten mit  $1,06 \text{ nmol g}^{-1}_{\text{FG}}$  einen um 4 % geringeren 13-HOD-Gehalt aufwiesen als der

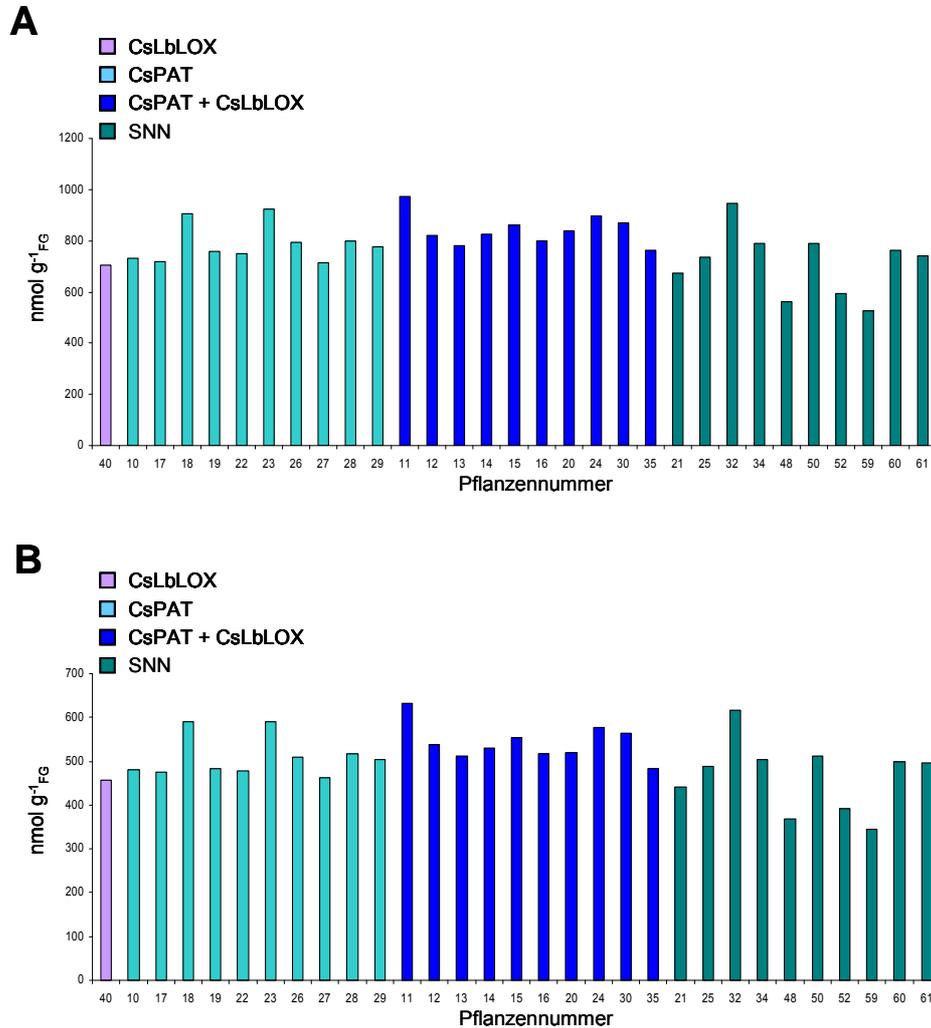
Wildtyp. Das Hydroxid der Linolensäure 13-HOT konnte nur in Samen einzelner Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 18). Der Gehalt an freiem 13-HOT war in der CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformante allerdings nicht deutlich erhöht gegenüber dem Wildtyp. Desweiteren konnten in Samen einzelner Pflanzen freies 9-HOD und freies 9-HOT in einem ähnlichen Gehalt wie freies 13-HOD nachgewiesen werden, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Samen und den Wildtyp-Samen analysiert wurden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 18 Gehalt freier Oxylipine in T2-Tabaksamen von CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten.** Die freien Oxylipine der extrahierten Lipide (2.22.2) aus CsLbLOX-exprimierenden (CsLbLOX), CsPAT-exprimierenden (CsPAT), CsPAT- und CsLbLOX-exprimierenden (CsPAT + CsLbLOX) sowie Wildtyp-T2-Samen (SNN) einzelner Pflanzen wurden mittels RP-HPLC aufgereinigt (2.25.1) und über die SP-HPLC aufgetrennt und quantifiziert (2.25.3).

Bei der Bestimmung der veresterten Oxylipine konnten folgende Verbindungen nachgewiesen werden: 13-HOD, 13-all-trans-HOD, 13-HPOD, 13-HOT, 9-HOD, 9-all-trans-HOD und 9-HOT (Daten nicht gezeigt). Die veresterten Oxylipine 13-HOD und 9-HOD stellten in den untersuchten Tabaksamen die Hauptoxylipine dar, wobei der 13-HOD-Gehalt etwa doppelt so hoch war wie der 9-HOD-Gehalt (Daten nicht gezeigt). In Abb. 19A ist zu erkennen, dass der Gesamtgehalt der veresterten Oxylipine sich zwischen den CsPAT-exprimierenden Samen und den CsPAT- und CsLbLOX-exprimierenden Samen nicht signifikant unterschied, während Samen von mehreren Wildtyp-Pflanzen einen deutlich niedrigeren Gehalt an veresterten Oxylipinen aufwiesen als die Samen der transgenen Pflanzen. Im Durchschnitt zeigten die Samen der CsPAT/CsLbLOX-

Doppeltransformatanten mit  $843 \text{ nmol g}^{-1}_{\text{FG}}$  einen um 16 % höheren Gehalt an veresterten Oxylipinen als Samen des Wildtyps mit  $712 \text{ nmol g}^{-1}_{\text{FG}}$  und einen um 7 % höheren Gehalt als Samen der CsPAT-Einzeltransformatanten mit  $788 \text{ nmol g}^{-1}_{\text{FG}}$ . Stellte man nur den



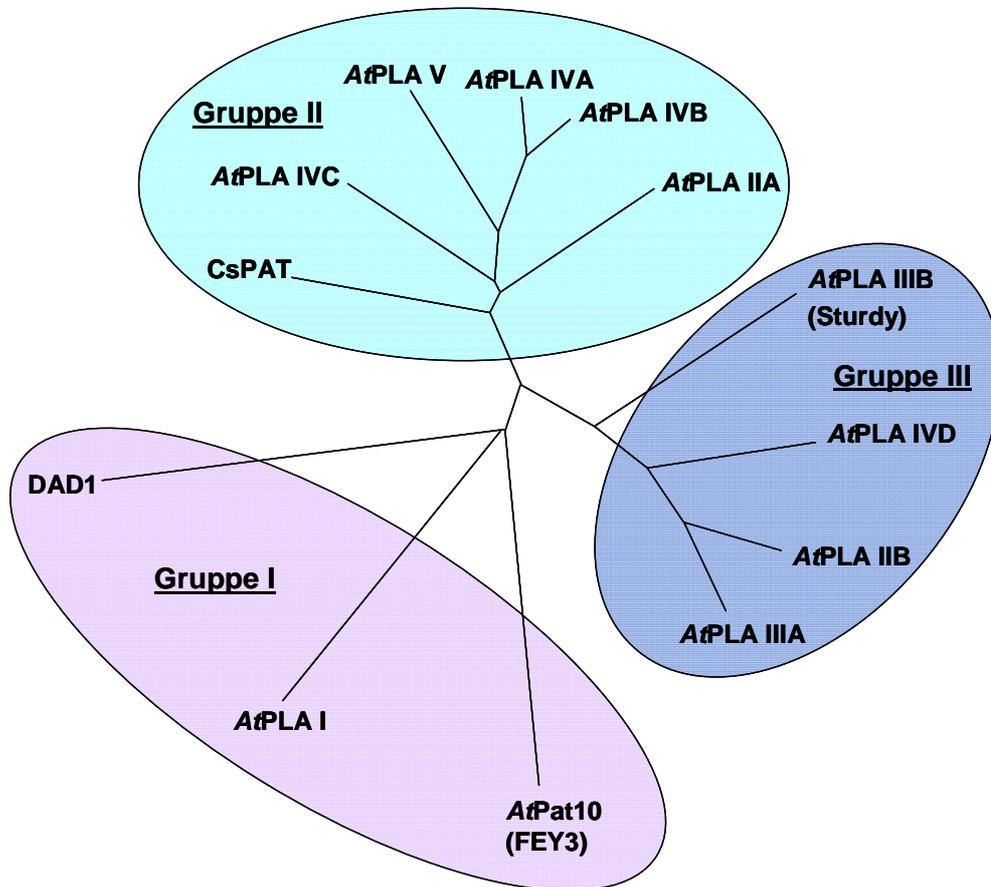
**Abb. 19 Gehalt veresteter Oxylipine in T2-Tabaksamen von CsPAT-Einzel- und CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformatanten.** (A) Gesamtgehalt veresteter Oxylipine, (B) Gehalt an verestertem 13-H(P)OD und verestertem 13-HOT in CsLbLOX-exprimierenden (CsLbLOX), CsPAT-exprimierenden (CsPAT), CsPAT- und CsLbLOX-exprimierenden (CsPAT + CsLbLOX) sowie in Wildtyp-T2-Samen (SNN) einzelner Pflanzen. Extrahierte Lipide (2.22.2) wurden transesterifiziert (2.24) und mittels RP-HPLC aufgereinigt (2.25.1). Die Auftrennung und Quantifizierung der methylierten Oxylipine erfolgte über die SP-HPLC (2.25.3).

Gehalt an 13-H(P)OD und 13-HOT in den T2-Samen der untersuchten Pflanzen graphisch dar, konnte ein entsprechendes Bild wie für die gesamten detektierten veresterten Oxylipine festgestellt werden (Abb. 19B). Der Anteil der Summe des Gehaltes an 13-

H(P)OD und 13-HOD an den gesamten veresterten Oxylipinen lag in den Samen der einzelnen untersuchten Pflanzen zwischen 65 und 70 %, wobei der höchste Anteil bei 13-HOD lag.

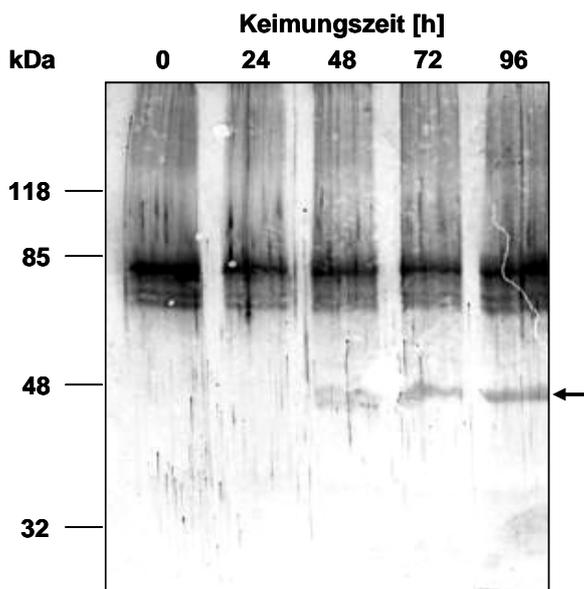
### 3.1.9 Phylogenetische Analyse des CsPAT

Da eine weitere molekulare Analyse von CsPAT in Gurke nicht möglich war, sollte analysiert werden, ob es ein homologes Gen in *A. thaliana* gibt. Zur phylogenetischen Analyse der PLA<sub>2</sub> CsPAT wurden die Aminosäuresequenzen der zehn verschiedenen



**Abb. 20 Phylogenetische Eingruppierung der PLA<sub>2</sub> CsPAT mit Patatin-ähnlichen Phospholipase-Sequenzen aus *A. thaliana*.** Die Aminosäuresequenzen von Patatin-ähnlichen PLA aus *A. thaliana* (Holk *et al.*, 2002), DAD1 (Ishiguro *et al.*, 2001), FEY3 (At4g27760) und CsPAT wurden mit Hilfe des Programms PHYLIP 3.5 (<http://evolution.genetics.washington.Edu/phylip.html>) phylogenetisch klassifiziert.

Isoformen Patatin-ähnlicher PLAs aus *A. thaliana* (Holk *et al.*, 2002) einer Phospholipase A<sub>1</sub>, DAD1, die den ersten Schritt der JA-Biosynthese katalysiert (Ishiguro *et al.*, 2001), eines weiteren Patatin-ähnlichen Proteins *AtPat10* aus *A. thaliana*, das als „Forever Young“-Oxidoreduktase (FEY3, At4g27760) annotiert wurde und des CsPAT verwendet (Abb. 20). In dem Arabidopsis-Genom konnten zehn Gene mit Patatin-ähnlichen PLA-Proteinsequenzen identifiziert werden. Aufgrund der genomischen Struktur und des Aminosäurevergleichs ließen sich diese Gene in drei Gruppen eingliedern: Gruppe 1 enthält nur *AtPLA I*, Gruppe 2 besteht aus *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA*, *AtPLA IVB*, *AtPLA IVC* und *AtPLA V* und Gruppe 3 setzt sich aus *AtPLA IIB*, *AtPLA IIIA*, *AtPLA IIIB* und *AtPLA IVD* zusammen (Abb. 20). Die CsPAT-Sequenz konnte phylogenetisch mit den Patatin-ähnlichen PLA aus *A. thaliana* eingruppiert werden und zeigte die höchste Homologie zu den *AtPLA* der Gruppe 2 (Abb. 20).



**Abb. 21 Zeitliches Vorkommen eines Patatin-ähnlichen, Lipidkörper-assoziierten Proteins in *A. thaliana* während der Keimung.** Nach der Isolierung von Lipidkörpern aus Keimlingen der angegebenen Keimungszeitpunkte erfolgte die Extraktion der Proteine aus den Lipidkörpern (2.10.2). Die Proteine wurden durch Elektrophorese im 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit dem Antiserum gegen CsPAT detektiert (2.18). Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis der Western-Blot-Analysen von drei Keimungsversuchen dar.

Ein Hinweis für eine hohe Homologie zwischen dem CsPAT aus Gurkenkeimlingen und einem mutmaßlichen Patatin-ähnlichen Protein an Lipidkörpern von Arabidopsis-Keimlingen konnte durch eine Western-Blot-Analyse von *A. thaliana*-Keimlingen gefunden werden (Abb. 21). In Lipidkörperproteinen aus Arabidopsis-Keimlingen konnte ein Patatin-ähnliches Protein nach 48, 72 und 96 h Keimung detektiert werden.

### 3.1.10 Sequenzierung von Lipidkörperproteinen aus Gurkenkeimlingen

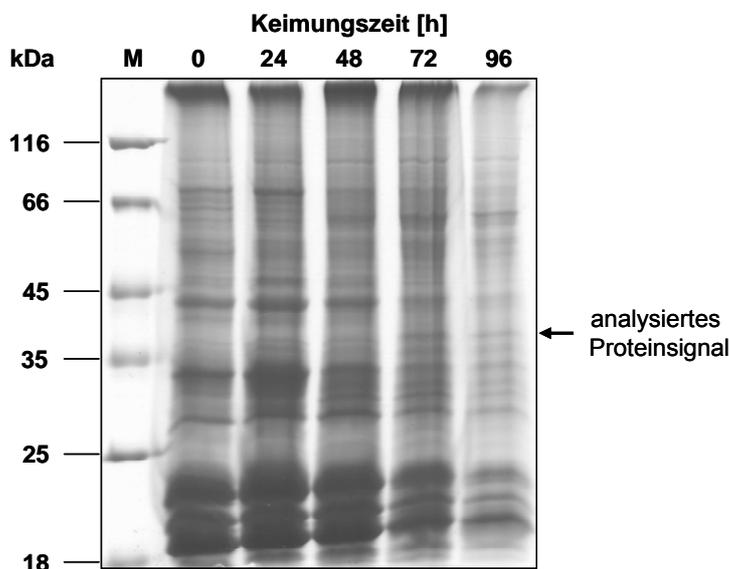
Zur weiteren Untersuchung der Mobilisierung der Speicherlipide in Gurkenkeimlingen sollte die Sequenz der spezifischen TGL identifiziert werden, die selektiv oxygenierte Fettsäuren aus den TAGs abspaltet (Balkenhohl, 2000). Diese TGL konnte bereits biochemisch charakterisiert werden. Versuche zur Identifizierung ihrer Aminosäuresequenz waren jedoch bisher erfolglos. Da nach der Reinigung der TGL ein Molekulargewicht von 110 kDa für dieses Protein in der SDS-PAGE bestimmt werden konnte (Balkenhohl, 2000), sollten im Rahmen dieser Arbeit jene Proteine, die am Lipidkörper lokalisiert sind und ein Molekulargewicht von 110 kDa besitzen, in Zusammenarbeit mit Dr. O. Valerius am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen sequenziert werden. Dazu wurden Lipidkörper aus für 96 h gekeimten, etiolierten Kotyledonen isoliert (2.9) und die Lipidkörperproteine extrahiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Coomassie-Färbung wurde der Bereich auf Höhe des 116 kDa-Molekulargewichtsmarkers ausgeschnitten und sequenziert. Die Identifizierung der Proteine erfolgte über LC-MS/MS (Ma *et al.*, 2003) und die erhaltenen MS2-Spektren wurden mit dem Programm Peaks Online (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Kanada) gegen die „non-redundant“ Datenbank (NCBI) abgeglichen. So konnte mit einem Protein-„Score“ von 94,87 % und einer Aminosäureabdeckung von 54,85 % die Lipoxygenase 1 (gi/3668063/gb/AAC61785.1) aus *C. sativus* identifiziert werden, welche der in dieser Arbeit untersuchten CsLbLOX (X92890) entspricht. Diesem Protein konnten 21 unabhängige Peptidsequenzen mit einem Peptid-„Score“ von 99 % zugeordnet werden, wobei zwei unabhängige Peptidsequenzen mit einem Peptid-„Score“ von 99 % bereits ausreichen, um ein Protein mit dem verwendeten Programm als identifiziert zu bewerten. In dem untersuchten Proteinsignal konnte kein weiteres Protein ermittelt werden, für das der Protein-„Score“ ausreichend hoch war und dem Peptidsequenzen mit einem Peptid-„Score“ von 99 % zugeordnet werden konnten.

### 3.2 Abbau von Speicherlipiden durch TGLs in Arabidopsis

Da die Identifizierung der Aminosäuresequenz der an der Mobilisierung von Speicherlipiden beteiligten spezifischen TGL in Gurkenkeimlingen erfolglos blieb, sollte die Suche nach einer am Abbau der Speicherlipide beteiligten TGL in Keimlingen des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ausgeweitet werden.

#### 3.2.1 Ungerichtete Proteomanalyse von Lipidkörpern aus Arabidopsis-Keimlingen

Anhand einer ungerichteten Proteomanalyse von Lipidkörperproteinen sollten Peptidsequenzen identifiziert werden, die im Datenbankvergleich Ähnlichkeiten zu Lipasesequenzen aufwiesen. Lipidkörperproteinpräparationen aus 0, 24, 48, 72 und 96 h alten, etiolierten Keimlingen wurden durch Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Auswahlkriterium für die Sequenzierung von Proteinsignalen in Zusammenarbeit mit Dr. O. Valerius am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen wurde eine transiente Akkumulation im Verlauf der Keimung festgelegt. Die



**Abb. 22 Lipidkörperproteine aus etiolierten Arabidopsis-Keimlingen im Verlauf der Keimung.** Nach der Isolierung von Lipidkörpern aus Keimlingen der angegebenen Keimungszeitpunkte, erfolgte die Extraktion der Proteine aus den Lipidkörpern (2.10.2). Die Proteine wurden durch Elektrophorese im 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt.

gelelektrophoretische Auftrennung der Lipidkörperproteine ist in Abb. 22 dargestellt. Es wurde im Molekulargewichtsbereich zwischen 35 und 45 kDa lediglich ein Proteinsignal identifiziert, das in einem Keimungszeitraum von 24 h bis 96 h akkumulierte. Dieses Proteinsignal wurde sequenziert (Valerius *et al.*, 2007) und die erhaltenen MS2-Spektren wurden mit Hilfe des Programms TurboSEQUENT (Thermo Electron Corp, San Jose, USA) gegen die Arabidopsis-Genom-Proteinsequenz-Datenbank (NCBI) abgeglichen. Auf diese Weise konnten die in diesem Signal erhaltenen Peptidsequenzen insgesamt 126 Proteinen zugeordnet werden. Für acht Proteine wurde mindestens eine Peptidsequenz mit einem X-Core-Wert  $>4$  bestimmt, wodurch diese Proteine mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in dem untersuchten Proteinsignal vorhanden sind. Diese acht Proteine sind mit ihrer Molekularmasse und den gefundenen Sequenzabdeckungen in Tab. 6 aufgelistet. Den ersten sechs aufgeführten Proteinen konnten vier bzw. mehr als vier Peptidsequenzen zugeordnet werden, während für die letzten beiden Proteine jeweils nur

**Tab. 6 Übersicht identifizierter Proteinfragmente**

Protein	Referenz	Masse [kDa]	Aminosäuren	Sequenzabdeckung bezogen auf Masse [%]	Sequenzabdeckung bezogen auf Aminosäuren [%]
Protochlorophyllid Reduktase B	At4g27440	43,36	401	10,98	10,47
Kurzketten-Dehydrogenase/Reduktase-Familie	At5g50600	39,09	349	44,49	45,27
Cruciferin 3 (CRU3)	At4g28520	58,24	524	23,48	23,66
Ribosomales Protein (ATL5)	At3g25520	34,36	301	18,77	19,60
Protochlorophyllid Reduktase A (PORA)	At5g54190	43,86	405	16,68	17,28
Cruciferin A (CRA1)	At5g44120	52,60	472	14,49	14,41
Glycinreiches Protein/Oleosin	At3g01570	19,76	183	14,39	13,66
60S saures ribosomales Protein P0 (RPP0B)	At3g09200	34,13	320	14,16	15,63

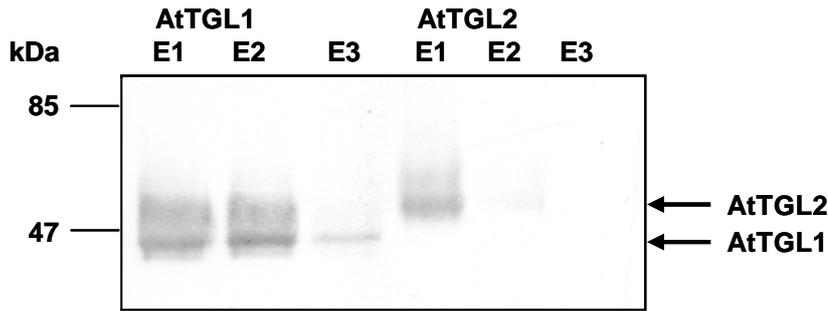
zwei Peptidsequenzen gefunden werden konnten. Da CRU3 (58,2 kDa) und CRA1 (52,6 kDa) größer und das glycinreiche Protein/Oleosin (19,8 kDa) kleiner sind als das Proteinsignal von 40 kDa, handelt es sich dabei wahrscheinlich um posttranslational modifizierte Formen bzw. Abbauprodukte der identifizierten Proteine. Sechs weiteren Proteinen, die in Tab. 6 nicht aufgelistet sind, konnten jeweils zwei Peptidsequenzen zugeordnet werden, darunter ein Protein der Esterase/Lipase/Thioesterase-Familie mit 39,1 kDa (At5g22460) und ein Protein der LOX-Familie. Das Protein der Esterase/Lipase/Thioesterase-Familie besaß jedoch für eine Peptidsequenz einen so niedrigen X-Core-Wert, dass es wahrscheinlich nicht in dem untersuchten Proteinsignal vorlag. Den verbleibenden 112 Proteinen konnte jeweils nur eine Peptidsequenz mit niedrigen X-Core-Werten unter 3,2 zugeordnet werden. Unter diesen Proteinen befand sich

eine mutmaßliche Lipase mit 43,6 kDa und ein Protein der Esterase/Lipase/Thioesterase-Familie mit 29,6 kDa.

Zusammenfassend konnte in diesem Ansatz keine mutmaßliche Lipase in dem analysierten Proteinsignal der Lipidkörperproteine gefunden werden, der mindestens zwei Peptidsequenzen mit jeweils einem X-Core-Wert über 4 zugeordnet werden konnte.

### 3.2.2 Expression der mutmaßlichen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 in Insektenzellen

Im Zuge eines reversen genetischen Ansatzes konnten in einer früheren Arbeit die vermutlich keimungsspezifischen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 in *A. thaliana* identifiziert werden (Körner, 2005). Da die Expression von AtTGL1 und AtTGL2 in *E. coli* in verschiedenen Expressionsvektoren und Expressionsstämmen nicht stabil genug für eine weitergehende biochemische Charakterisierung war und auch die Expression lipolytisch aktiver Enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) erfolglos blieb, sollte in dieser Arbeit die heterologe Expression der beiden mutmaßlichen TGLs in Insektenzellen zur Charakterisierung der Proteine verfolgt werden. Zu diesem Zweck wurden die cDNAs von AtTGL1 und AtTGL2 in den Expressionsvektor pMIB/V5-HisA des „Insect select“-Systems in einen Leserahmen mit dem Sekretionssignal des Vektors und einem C-terminalen His-tag kloniert (2.6.1) und die erhaltenen Expressionskonstrukte in High Five<sup>TM</sup>-Zellen transfiziert. Stabile Zelllinien dienten der Proteinexpression in Suspensionskulturen (2.11.2). Aufgrund des Sekretionssignals wurden die heterolog exprimierte Proteine direkt ins Kulturmedium sekretiert und aus diesem durch eine Proteinfällung gewonnen (2.12). Nach der Reinigung über Affinitätschromatographie (2.13) wurden die exprimierte Proteine in den Elutionsfraktionen mittels Western-Blot und V5-Antikörpern, die das C-terminale V5-Epitop detektieren, nachgewiesen (Abb. 23). AtTGL1 konnte überwiegend in den Elutionsfraktionen 1 und 2 gefunden werden und wies eine Größe von ungefähr 45 kDa auf, während AtTGL2 ausschließlich in der Elutionsfraktion 1 vorlag und mit ca. 49 kDa deutlich größer war als AtTGL1. Für beide Proteine wurde aufgrund ihrer Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 42 kDa postuliert. Aufgrund des C-terminalen V5-Epitops und His-tags ist das heterolog exprimierte Protein um ca. 3 kDa größer als das natürlich vorkommende Protein (Anleitung zum „pMIB/V5-HisA, B, and C Vector Kit“; Invitrogen, Karlsruhe). Das für



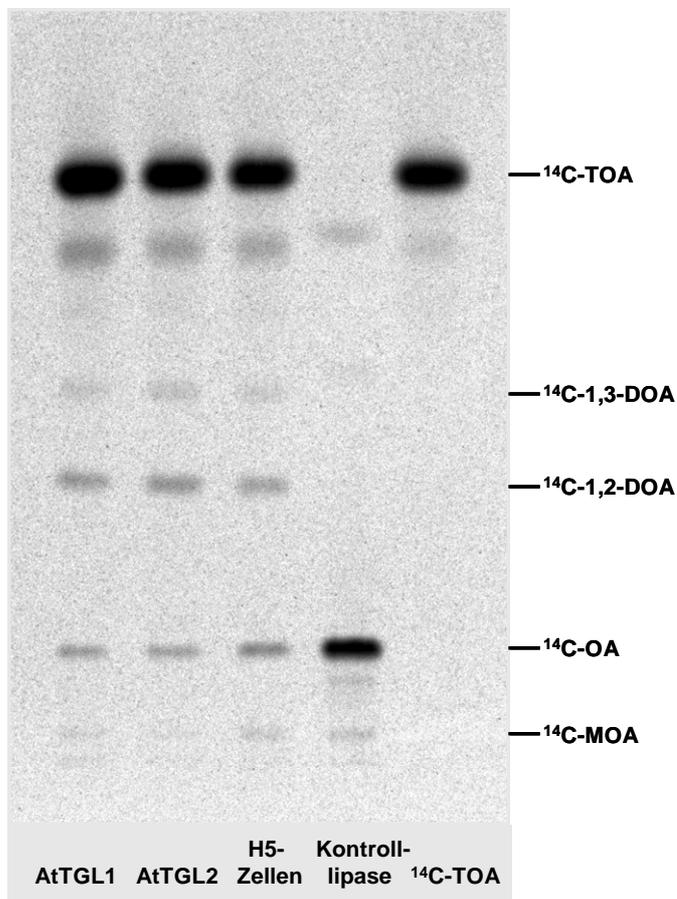
**Abb. 23 Heterologe Expression von AtTGL1 und AtTGL2 in High Five<sup>TM</sup>-Zellen.** Nach der sekretorischen Expression in Insektenzellen (2.11.2) wurden die Proteine gefällt und über Affinitätschromatographie gereinigt (2.12, 2.13). Der Nachweis der Expression erfolgte im Western-Blot mit Antiserum gegen das V5-Epitop (2.18). E1 - E3, Elutionsfraktion 1 bis 3 der Affinitätschromatographie. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis der Western-Blot-Analysen von 13 Expressionen dar.

AtTGL1 im Western-Blot detektierte Signal besitzt somit das vorhergesagte Molekulargewicht, wohingegen das Signal für AtTGL2 ca. 4 kDa größer ist als erwartet. Eine mögliche Erklärung wäre eine posttranslationale Glykosylierung des Proteins. Da im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel AtTGL1 und AtTGL2 nicht nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt) und die Signale der Western-Blot-Analyse erst nach sehr langer Färbung erhalten worden sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Expressionsrate der beiden Proteine in den Insektenzellen sehr gering ist.

### 3.2.3 Untersuchung der TGL-Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2

Zum Nachweis von TGL-Aktivität für AtTGL1 und AtTGL2 wurden die in Insektenzellen exprimierten Proteine (3.2.2, 2.11.2) zunächst mittels Affinitätschromatographie (2.13) gereinigt und anschließend Aliquots der Elutionsfraktionen, die nach Proteinbestimmung eine vergleichsweise hohe Proteinkonzentration aufwiesen (2.15), mit <sup>14</sup>C-Triolein inkubiert (2.21.4). Die Auftrennung der extrahierten Lipide über DC ist in Abb. 24 dargestellt. TGL-Aktivität ist an der Freisetzung von <sup>14</sup>C-markierter Ölsäure und den dadurch entstehenden Abbauprodukten des <sup>14</sup>C-Trioleins, <sup>14</sup>C-1,2- und <sup>14</sup>C-1,3-Diolein sowie <sup>14</sup>C-Monoolein, zu erkennen. In Proteinpräparationen des Kulturmediums von AtTGL1- und AtTGL2-produzierenden Zellen sowie in der Negativkontrolle, affinitäts-gereinigtes Protein von High Five<sup>TM</sup>-Zellen, die nicht transfiziert waren, konnte TGL-Aktivität detektiert werden. High Five<sup>TM</sup>-Zellen an sich wiesen folglich mindestens ein

Protein mit lipolytischer Aktivität auf, das über die Affinitätschromatographie ebenfalls gereinigt wurde. Als Positivkontrolle wurde  $^{14}\text{C}$ -Triolein von Pankreas-Lipase zu  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure umgesetzt. Aufgrund der hohen Aktivität dieses Enzyms wurde das Substrat vollständig abgebaut und als Abbauprodukt nur  $^{14}\text{C}$ -Monoolein gefunden. AtTGL1 und AtTGL2 zeigten nach Expression in Insektenzellen keine höhere TGL-Aktivität als die Negativkontrolle. Es kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass AtTGL1 und AtTGL2 TGL-Aktivität besitzen, da wie in 3.2.2 beschrieben die Expressionsrate beider Proteine möglicherweise so gering war, dass ihre TGL-Aktivität vor dem Hintergrund der endogenen TGL-Aktivität der Insektenzellproteine nicht nachweisbar ist.



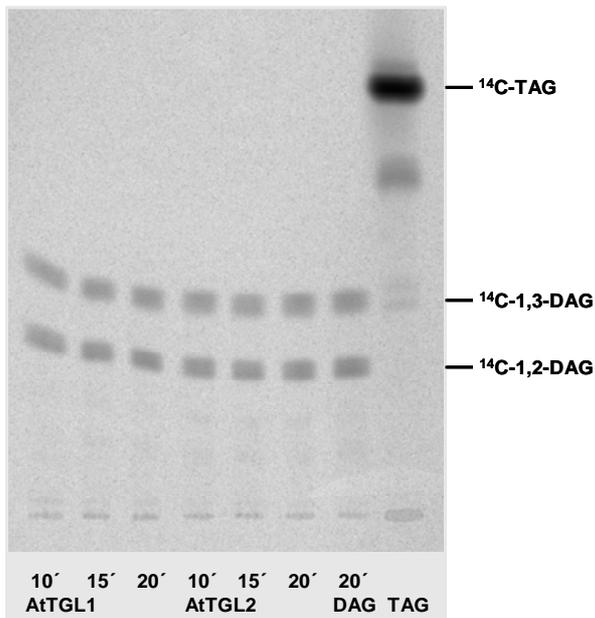
**Abb. 24 Untersuchung der TGL-Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 nach Expression in High Five<sup>TM</sup>-Zellen.** Die heterolog exprimierten Proteine (2.11.2) wurden über Affinitätschromatographie (2.13) aufgereinigt und ein Aliquot der AtTGL1- bzw. AtTGL2-enthaltenden Elutionsfraktionen mit  $^{14}\text{C}$ -Triolein ( $^{14}\text{C}$ -TOA) inkubiert. Anschließend wurden die Lipide extrahiert und über DC aufgetrennt (2.21.4). Als Kontrollen wurden Pankreas-Lipase (Kontrolllipase, Positivkontrolle) und affinitäts-gereinigtes Protein von High Five<sup>TM</sup>- (H5-) Zellen (Negativkontrolle) mit  $^{14}\text{C}$ -TOA umgesetzt.  $^{14}\text{C}$ -OA,  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure;  $^{14}\text{C}$ -MOA,  $^{14}\text{C}$ -Monoolein;  $^{14}\text{C}$ -DOA,  $^{14}\text{C}$ -Diolein.

### 3.2.4 Analyse von AtTGL1 und AtTGL2 auf weitere Enzymaktivitäten

Vor der Hintergrundaktivität der endogenen TGLs in Insektenzellen konnte bisher keine TGL-Aktivität für die mutmaßlichen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 aus *A. thaliana* nachgewiesen werden, welches möglicherweise auf eine zu geringe Expressionrate der beiden Proteine in den Insektenzellen zurückzuführen ist. Um weitere potentielle Aktivitäten dieser Enzyme auszuschließen oder gegebenenfalls zu identifizieren, sollten AtTGL1 und AtTGL2 nach Expression in Insektenzellen auf weitere lipolytische Enzymaktivitäten analysiert werden.

#### 3.2.4.1 DAG-DAG-Acyltransferaseaktivität

Homologievergleiche der AtTGL1- und AtTGL2-Sequenzen ergaben, dass die Proteine zwei Sequenzmotive am aktiven Zentrum aufweisen, welche eine mögliche Homologie zu DAG-DAG-Acyltransferasen zeigen (Dr. A. Abbadi, persönliche Mitteilung). DAG-DAG-

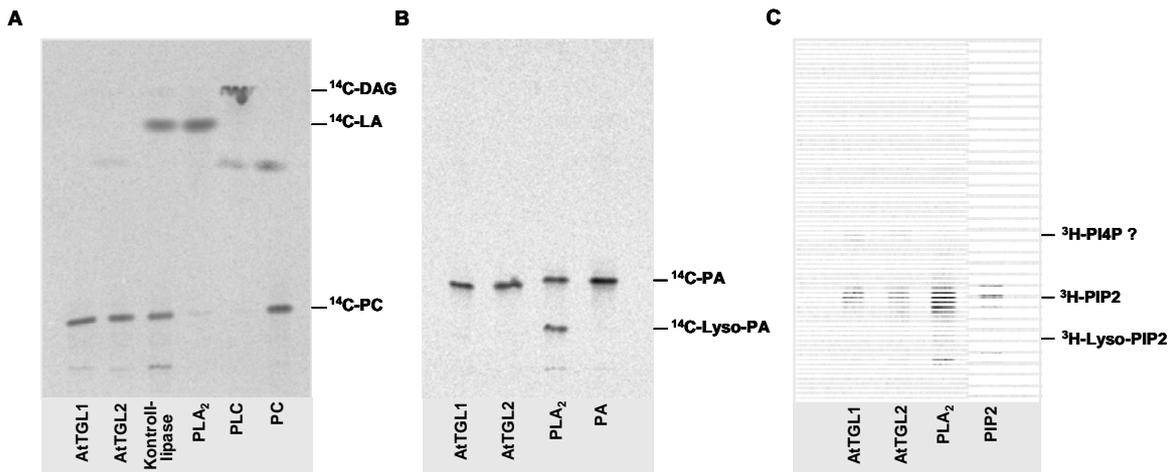


**Abb. 25** Untersuchung der in High Five<sup>TM</sup>-Zellen exprimierten Proteine AtTGL1 und AtTGL2 auf DAG-DAG-Acyltransferaseaktivität. Die heterolog exprimierten Proteine (2.11.2) wurden über Affinitätschromatographie (2.13) aufgereinigt und ein Aliquot der AtTGL1- bzw. AtTGL2-enthaltenden Elutionsfraktionen mit <sup>14</sup>C-Diacylglycerin (<sup>14</sup>C-DAG) für 10, 15 bzw. 20 min inkubiert (2.21.5.2). Anschließend wurden die Lipide extrahiert und über DC aufgetrennt. <sup>14</sup>C-TAG, <sup>14</sup>C-Triacylglycerin (Carboxyl-<sup>14</sup>C-triolein). Die Abbildung stellt das Ergebnis eines Experimentes dar.

Acyltransferasen übertragen einen Acylrest eines DAG-Moleküls auf ein zweites DAG-Molekül, wobei ein TAG- und ein Monoacylglycerin- (MAG-) Molekül entstehen. Zur Untersuchung einer möglichen DAG-DAG-Acyltransferaseaktivität wurden affinitäts-gereinigte AtTGL1 und AtTGL2 nach der heterologen Expression in Insektenzellen mit einem Gemisch aus den Isomeren  $^{14}\text{C}$ -1,2-DAG und  $^{14}\text{C}$ -1,3-DAG für 10, 15 bzw. 20 min inkubiert. Das Produkt einer DAG-DAG-Acyltransferaseaktivität,  $^{14}\text{C}$ -TAG, konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt der Inkubation von AtTGL1 bzw. AtTGL2 mit  $^{14}\text{C}$ -DAG nachgewiesen werden, wohingegen das eingesetzte Substrat in Form der beiden Isomere  $^{14}\text{C}$ -1,2-DAG und  $^{14}\text{C}$ -1,3-DAG detektiert werden konnte (Abb. 25). Somit wurde für AtTGL1 und AtTGL2 eine DAG-DAG-Acyltransferaseaktivität ausgeschlossen.

#### 3.2.4.2 Phospholipaseaktivität

Eine Phospholipaseaktivität von AtTGL1 und AtTGL2 wurde durch Inkubation der in Insektenzellen exprimierten und anschließend affinitätsgereinigten Proteine mit drei verschiedenen Phospholipiden als Substrat untersucht (2.21.2.2). Dabei wurden  $^{14}\text{C}$ -markiertes Phosphatidylcholin ( $^{14}\text{C}$ -PC),  $^{14}\text{C}$ -markierte Phosphatidsäure ( $^{14}\text{C}$ -PA) und  $^3\text{H}$ -markiertes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $^3\text{H}$ -PIP2) als Substrate verwendet. Nach Inkubation der beiden Proteine AtTGL1 und AtTGL2 mit  $^{14}\text{C}$ -PC konnte nur das eingesetzte Substrat in der Analyse detektiert werden (Abb. 26A). Die Positivkontrollen,  $\text{PLA}_2$  und Phospholipase C (PLC), wiesen jeweils die entsprechenden Signale für die zu erwartenden Spaltprodukte  $^{14}\text{C}$ -LA und  $^{14}\text{C}$ -DAG auf. Die als Kontrolle eingesetzte Pankreas-Lipase wies  $\text{PLA}_2$ -Aktivität auf. Nach Inkubation von AtTGL1 und AtTGL2 mit  $^{14}\text{C}$ -PA wurde ebenfalls nur das eingesetzte Substrat nachgewiesen (Abb. 26B), während für die Positivkontrolle,  $\text{PLA}_2$  inkubiert mit  $^{14}\text{C}$ -PA, das Reaktionsprodukt  $^{14}\text{C}$ -Lyso-PA gefunden wurde. Damit besitzen AtTGL1 und AtTGL2 bezogen auf die beiden untersuchten Substrate PC und PA keine Phospholipaseaktivität. Desweiteren wurden AtTGL1 und AtTGL2 auf Phospholipaseaktivität gegenüber  $^3\text{H}$ -PIP2 als Substrat untersucht (Abb. 26C). Für die beiden mutmaßlichen TGLs konnte nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -PIP2 jeweils oberhalb des Signals des Substrates ein Signal in der DC detektiert werden, das unpolarer als  $^3\text{H}$ -PIP2 war. Möglicherweise handelt es sich dabei um  $^3\text{H}$ -Phosphatidyl-inositol-4-phosphat ( $^3\text{H}$ -PI4P).  $^3\text{H}$ -PI4P ist aufgrund nur einer

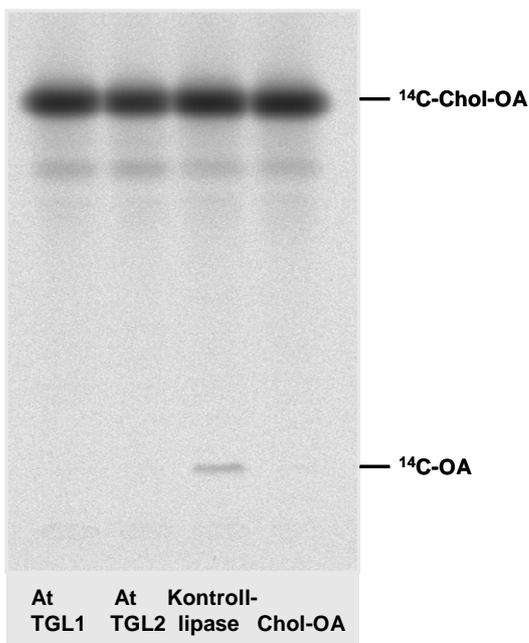


**Abb. 26 Untersuchung der in High Five<sup>TM</sup>-Zellen exprimierten Proteine AtTGL1 und AtTGL2 auf Phospholipaseaktivität.** Die heterolog exprimierte Proteine (2.11.2) wurden über Affinitätschromatographie (2.13) aufgereinigt und ein Aliquot der AtTGL1- bzw. AtTGL2-enthaltenden Elutionsfraktionen mit (A)  $^{14}\text{C}$ -PC (L- $\alpha$ -1-Palmitoyl-2-linoleoyl-[linoleoyl-1- $^{14}\text{C}$ ]-phosphatidylcholin), (B)  $^{14}\text{C}$ -PA (L- $\alpha$ -Dipalmitoyl [glycerol- $^{14}\text{C}$ (U)]-phosphatidsäure) und (C)  $^3\text{H}$ -markiertem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $^3\text{H}$ -PIP2, Inositol-2- $^3\text{H}$ [N]) inkubiert. Anschließend wurden die Lipide extrahiert und über DC aufgetrennt (2.21.2.2). Als Kontrollen wurden Pankreas-Lipase (Kontrolllipase), Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aus Bienengift und Phospholipase C (PLC) aus *Bacillus cereus* verwendet. DAG, Diacylglycerin; LA, Linolsäure; Lyso-PA, Lysophosphatidsäure; Lyso-PIP2, Lysophosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PI4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten (A) bzw. einem Experiment (B, C) dar.

Phosphatgruppe am Inositolring unpolarer als PIP2 und wandert daher in dem verwendeten unpolaren Laufmittel (2.21.2.2) auch weiter. Die Bildung von  $^3\text{H}$ -PI4P ließe auf eine Phosphataseaktivität schließen, die möglicherweise in den mitgereinigten Insektenzellproteinen vorlag. Während für die Positivkontrolle der PLA<sub>2</sub>-Aktivität das zu erwartende Spaltprodukt  $^3\text{H}$ -Lyso-PIP2 schwach nachzuweisen war, konnte für AtTGL1 und AtTGL2 keine PLA<sub>2</sub>-Aktivität gezeigt werden. PLC-Aktivität konnte mit diesem Ansatz nicht untersucht werden, da das dabei entstehende  $^3\text{H}$ -markierte Spaltprodukt 1,4,5-Inositoltrisphosphat als polare Substanz nicht in der unpolaren Chloroformphase extrahiert wird, die hier in der DC analysiert wurde.

### 3.2.4.3 Steroidester-Hydrolaseaktivität

Steroidester-Hydrolasen hydrolysieren die Esterbindung zwischen einem Steroid und z.B. einer Fettsäure. Um eine Steroidester-Hydrolaseaktivität für die mutmaßlichen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 zu untersuchen, wurden die in Insektenzellen exprimierten und affinitätsgereinigten Proteine mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Cholesteryloleat (Oleat-1- $^{14}\text{C}$ ) inkubiert. Bei Steroidester-Hydrolaseaktivität wäre die Abspaltung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Ölsäure zu erwarten. Für AtTGL1 und AtTGL2 konnte jedoch nur das eingesetzte Substrat  $^{14}\text{C}$ -Cholesteryloleat detektiert werden, d.h. beide Enzyme weisen keine Steroidester-Hydrolaseaktivität auf. Dahingegen zeigte die als Kontrolle verwendete Pankreas-Lipase diese für dieses Enzym unspezifische Aktivität bei der Umsetzung mit  $^{14}\text{C}$ -Cholesteryloleat (Abb. 27).

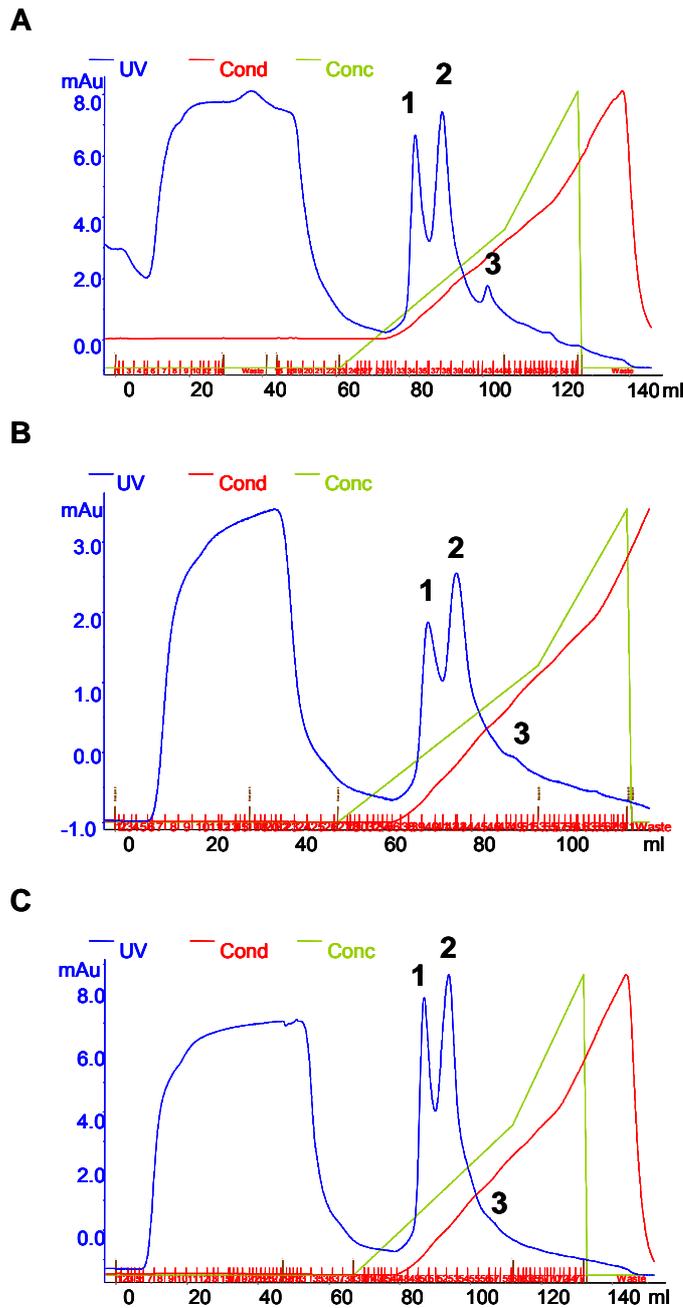


**Abb. 27 Untersuchung der in High Five<sup>TM</sup>-Zellen exprimierten Proteine AtTGL1 und AtTGL2 auf Steroidester-Hydrolaseaktivität.** Die heterolog exprimierten Proteine (2.11.2) wurden über Affinitätschromatographie (2.13) aufgereinigt und ein Aliquot der AtTGL1- bzw. AtTGL2-enthaltenden Elutionsfraktionen mit  $^{14}\text{C}$ -Cholesteryloleat ( $^{14}\text{C}$ -Chol-OA; Oleat-1- $^{14}\text{C}$ ) inkubiert. Anschließend wurden die Lipide extrahiert und über DC aufgetrennt (2.21.6). Als Kontrolle wurde Pankreas-Lipase (Kontrolllipase) eingesetzt.  $^{14}\text{C}$ -OA,  $^{14}\text{C}$ -markierte Ölsäure. Die Abbildung stellt das Ergebnis von einem Experiment dar.

### 3.2.5 Trennung der in Insektenzellen exprimierten AtTGL1 und AtTGL2 von Insektenzellprotein mit TGL-Aktivität

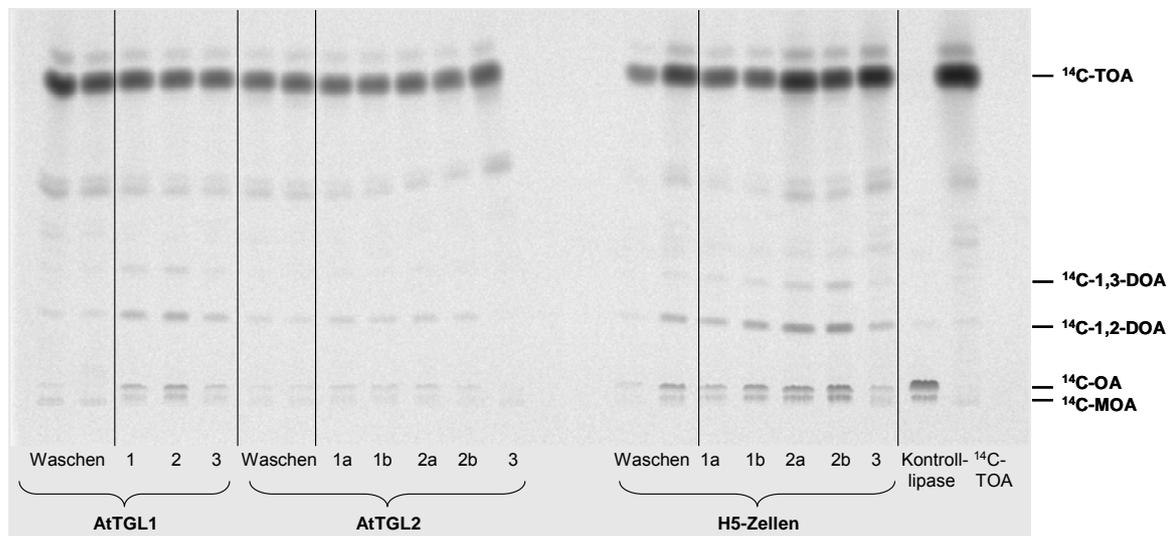
Zur Trennung des Insektenzellproteins mit lipolytischer Aktivität (3.2.3) von den in Insektenzellen exprimierten Proteinen AtTGL1 und AtTGL2 sollten die affinitätsgereinigten Proteine weiter mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie über eine SourceQ-Sepharosesäule (2.14) gereinigt werden. Der theoretische isoelektrische Punkt von AtTGL1 liegt bei pH 5,11 und der von AtTGL2 bei pH 4,67, d.h. beide Proteine sollten in Gegenwart eines Puffers mit einem pH von 7,6 an die Säulenmatrix binden und anschließend in einem Salzgradienten eluiert werden. In den Elutionsprofilen (Abb. 28) dieser Reinigung von AtTGL1, AtTGL2 und der Negativkontrolle, affinitätsgereinigtes Insektenzellprotein aus High Five<sup>TM</sup>-Zellen, die nicht mit einem Expressionskonstrukt transfiziert waren, sind jeweils vier Signale im Absorptionschromatogramm bei 280 nm detektiert worden. Das erste Signal trat im Durchfluss auf und stellt Proteine dar, die nicht an die Säulenmatrix gebunden haben. Die weiteren drei Signale bei 280 nm traten während der Elution bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen auf und wurden mit 1 bis 3 durchnummeriert. Das Signal 3 trat nur im Elutionsprofil der Reinigung von AtTGL1 (Abb. 28A) deutlich auf, während es in den Elutionsprofilen der Reinigung von AtTGL2 und der Negativkontrolle nur schwach zu erkennen ist (Abb. 28B, C). Für ausgewählte Fraktionen des Durchflusses und jene, die die Signale 1 bis 3 enthielten, wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.15). Fraktionen der Signale 1 bis 3 der Reinigung von AtTGL1 wiesen dabei sehr geringe Proteinkonzentrationen von 0,03 bis 0,11 mg/ml auf, wohingegen die Proteinkonzentrationen in den ausgewählten Fraktionen der Reinigung von AtTGL2 und von der Negativkontrolle unter der Detektionsgrenze lagen (Daten nicht gezeigt). In Western-Blot-Analysen konnten sehr schwache Signale für AtTGL1 in einer Fraktion des Elutionssignals 1 und für AtTGL2 in Fraktionen der Elutionssignale 1 und 2 immunodetektiert werden.

Zur Überprüfung der Auftrennung des Insektenzellproteins mit lipolytischer Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 nach der Anionenaustauschchromatographie wurden jeweils ausgewählte Fraktionen des Durchflusses und der Elutionssignale 1 bis 3 auf TGL-Aktivität untersucht (2.21.4). Dabei wurden Aliquots der Fraktionen mit <sup>14</sup>C-Triolein inkubiert und mögliche Produkte mit DC untersucht (Abb. 29). In allen untersuchten Fraktionen der Elutionssignale 1 bis 3 sowie in einer untersuchten Fraktion des



**Abb. 28** Elutionsprofil der Reinigung der in High Five<sup>TM</sup>-Zellen exprimierten Proteine AtTGL1 und AtTGL2 mit Hilfe einer SourceQ-Sepharosesäule. Die nach Affinitätschromatographie (2.13) erhaltenen, vereinigten Proteinfractionen wurden 1:10 mit 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, auf eine Salzkonzentration von 50 mM NaCl verdünnt. Bei einer Flussrate von 2 ml/min wurde die Proteinlösung auf die SourceQ-Sepharosesäule aufgetragen. Die Absorption der eluierten Moleküle wurde bei 280 nm verfolgt (UV in blau). Es wurde ein Gradient von 0,05 bis 1 M NaCl angelegt (Conc, Konzentration in grün). Die Leitfähigkeit (Cond) ist in rot dargestellt. Der Durchfluss sowie die Elution wurden in 3 ml-Fractionen gesammelt. Die detektierten Signale während der Elution wurden mit 1 bis 3 nummeriert. **(A)** Reinigung der AtTGL1, **(B)** der AtTGL2 und **(C)** der High Five<sup>TM</sup>-Insektenzellproteine als Negativkontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von fünf Experimenten.

Durchflusses der gereinigten Proteine aus High Five<sup>TM</sup>-Zellen konnte TGL-Aktivität in Form der freigesetzten <sup>14</sup>C-Ölsäure und des Abbauproduktes <sup>14</sup>C-1,2-Diolein gefunden werden. Nach der Reinigung von AtTGL1 und AtTGL2 konnte in den untersuchten Fraktionen der Elutionssignale 1 und 2 ebenfalls TGL-Aktivität detektiert werden, jedoch in geringerem Maße als in den entsprechenden Fraktionen der gereinigten Proteine aus High Five<sup>TM</sup>-Zellen. Eine Trennung von endogenem Insektenzellprotein mit lipolytischer Aktivität von den heterolog exprimierten Proteinen konnte folglich mit dieser zusätzlichen Reinigung nicht erreicht werden. Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet.

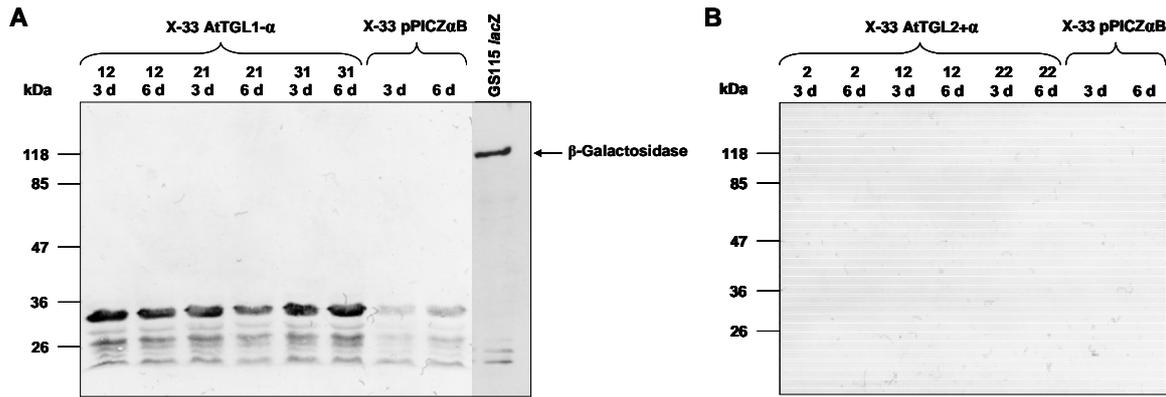


**Abb. 29 Untersuchung der TGL-Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 nach der Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie.** Die in High Five<sup>TM</sup>-Zellen exprimierten Proteine (2.11.2) wurden zunächst über Affinitätschromatographie (2.13) und anschließend mittels einer SourceQ-Sepharosesäule (2.14) aufgereinigt. Ein Aliquot der Fraktionen wurde mit <sup>14</sup>C-Triolein (<sup>14</sup>C-TOA) inkubiert (2.21.4). Nach Extraktion der Lipide wurden diese über DC aufgetrennt. Als Kontrollen wurden Pankreas-Lipase (Kontrolllipase, Positivkontrolle) und Protein von High Five<sup>TM</sup>- (H5-) Zellen nach Anionenaustauschchromatographie (Negativkontrolle) mit <sup>14</sup>C-TOA umgesetzt. <sup>14</sup>C-OA, <sup>14</sup>C-Ölsäure; <sup>14</sup>C-MOA, <sup>14</sup>C-Monoolein; <sup>14</sup>C-DOA, <sup>14</sup>C-Diolein. Waschen, Fraktionen des Durchflusses; 1 - 3, Fraktionen der Elutionssignale 1 - 3 (siehe Abb. 28); a und b bezeichnen verschiedene Fraktionen eines Elutionssignals.

### 3.2.6 Expression der mutmaßlichen TGL AtTGL1 und AtTGL2 in *Pichia pastoris*

Aufgrund der nicht abzutrennenden endogenen lipolytischen Aktivität von High Five<sup>TM</sup>-Insektenzellen, sollten die beiden Proteine AtTGL1 und AtTGL2 in der Hefe *P. pastoris* exprimiert werden. Als Eukaryont zeigt *P. pastoris* viele Vorteile höherer eukaryontischer Expressionssysteme, wie z.B. Proteinfaltung und posttranslationale Modifikationen, während die genetische Manipulierbarkeit genauso einfach wie bei *E. coli* oder *S. cerevisiae* ist. *P. pastoris* ist ein methylotropher Organismus, der in der Lage ist, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Das Enzym Alkohol-Oxidase oxidiert dabei Methanol zu Formaldehyd unter der Verwendung von molekularem Sauerstoff. Die geringe Affinität der Alkohol-Oxidase zu molekularem Sauerstoff wird durch die Synthese großer Mengen dieses Enzyms kompensiert. Der Promotor, der die Synthese der Alkohol-Oxidase reguliert, wird daher für die heterologe Expression von Proteinen in *P. pastoris* verwendet (Anleitung zum „EasySelect<sup>TM</sup> *Pichia* Expression Kit“; Invitrogen, Karlsruhe).

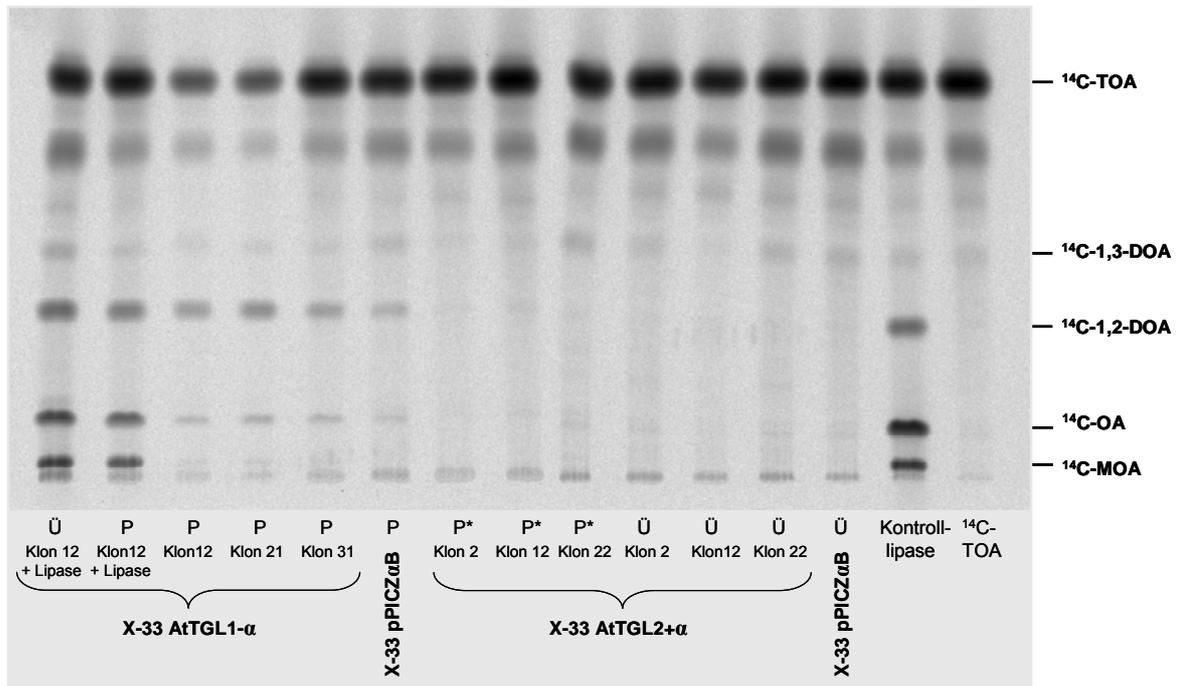
Die cDNAs von AtTGL1 und AtTGL2 wurden in den *Pichia*-Expressionsvektor pPICZαB mit einem C-terminalen His-tag kloniert (2.6.2). Dabei wurden Expressionkonstrukte sowohl mit N-terminalem α-Faktor als auch ohne α-Faktor zur sekretorischen bzw. intrazellulären Expression erzeugt. Da *P. pastoris* selbst native Proteine nur in geringem Maße sekretiert, ist die sekretorische Expression heterologer Proteine sehr vorteilhaft. Nach der Transformation der Expressionskonstrukte in den *P. pastoris*-Wildtypstamm X-33 wurden die Proteine in Minimalmedium mit Methanol zur Induktion der Expression exprimiert (2.11.3). Die Expression in ausgewählten *P. pastoris* X-33-Klonen, die AtTGL1 intrazellulär und AtTGL2 sekretorisch exprimieren sollten, wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abb. 30). Für beide Proteine wurde aufgrund ihrer Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 42 kDa postuliert. Aufgrund des C-terminalen myc-Epitops und His-tags vergrößert sich das Molekulargewicht der heterologen Proteine um 2,5 kDa auf ca. 44,5 kDa (Anleitung zum „EasySelect<sup>TM</sup> *Pichia* Expression Kit“; Invitrogen, Karlsruhe). Es konnte weder intrazellulär exprimierte AtTGL1 (Abb. 30A) noch sekretorisch exprimierte AtTGL2 (Abb. 30B) mit dem Antiserum gegen das C-terminale His-tag nachgewiesen werden. Die Kontrolle für die intrazelluläre Expression, der *P. pastoris*-Stamm GS115/pPICZ//lacZ, wies jedoch die Expression der 119 kDa großen β-Galaktosidase auf (Abb. 30A), und auch die Kontrolle der sekretorischen Expression, der *P. pastoris*-Stamm GS115/Albumin, zeigte nach Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel



**Abb. 30 Heterologe Expression von AtTGL1 und AtTGL2 in *P. pastoris* X-33.** (A) Proteine des Zellpellets (intrazelluläre Expression) der X-33-Klone 12, 21 und 31, die AtTGL1 ohne  $\alpha$ -Faktor exprimieren sollten (X-33 AtTGL1- $\alpha$ ) und (B) präzipitierte Proteine des Expressionsmediums (sekretorische Expression) der X-33-Klone 2, 12 und 22, die AtTGL2 mit  $\alpha$ -Faktor exprimieren sollten (X-33 AtTGL2+ $\alpha$ ), wurden im 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western-Blot mit Antiserum gegen das His-tag überprüft (2.18). Die verwendeten Expressionskulturen wurden jeweils für 3 und 6 d inkubiert (2.11.3). X-33 pPICZ $\alpha$ B, Negativkontrolle; GS115 lacZ, *P. pastoris*-Stamm GS115/pPICZ/lacZ, Positivkontrolle. Die Abbildung stellt für die ausgewählten Klone das Ergebnis eines Experimentes dar.

ein 67 kDa-Signal für das sekretorisch exprimierte Albumin (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden kann, dass ausreichend optimale Expressionsbedingungen verwendet worden sind. Insgesamt wurde die Expression von AtTGL1 und AtTGL2 jeweils mit und ohne  $\alpha$ -Faktor in je 2 bis 6 X-33-Klonen und in je 2 bis 3 Klonen eines zweiten *P. pastoris*-Stammes, KM71H, bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen überprüft, wobei in keinem Fall das jeweilige Protein im Western-Blot detektiert werden konnte.

Die Expression von AtTGL1 und AtTGL2 in *P. pastoris* wurde außerdem über TGL-Aktivitätsmessungen überprüft. Dazu wurden ausgewählte Expressionskulturen parallel zu den Western-Blot-Analysen im Aktivitätstest untersucht. Zellysat, resuspendiertes Zellpellet bzw. das Medium von Expressionskulturen, die AtTGL1 intrazellulär bzw. AtTGL2 sekretorisch exprimieren sollten, wurden mit  $^{14}\text{C}$ -Triolein inkubiert und die anschließend extrahierten Lipide über DC aufgetrennt (Abb. 31). In dem Zellysat von drei X-33-Klonen, die AtTGL1 intrazellulär exprimieren sollten, wurde TGL-Aktivität anhand freigesetzter  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure und dem Abbauprodukt  $^{14}\text{C}$ -Diolein nachgewiesen. Die gleiche Aktivität war jedoch auch für die Negativkontrolle, Zellysat eines X-33-Klons, der nur mit



**Abb. 31 Untersuchung der TGL-Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 nach Expression in *P. pastoris* X-33.** Zellysat (P), resuspendiertes Zellpellet (P\*) bzw. Medium (Ü) der Expressionskulturen der angegebenen X-33-Klone, die AtTGL1 ohne  $\alpha$ -Faktor (X-33 AtTGL1- $\alpha$ ) bzw. AtTGL2 mit  $\alpha$ -Faktor (X-33 AtTGL2+ $\alpha$ ) exprimieren sollten (2.11.3), wurden mit  $^{14}\text{C}$ -Triolein ( $^{14}\text{C}$ -TOA) inkubiert (2.21.4). Anschließend wurden die Lipide extrahiert und über DC aufgetrennt. X-33 pPICZ $\alpha$ B, Negativkontrolle; Kontrolllipase, Pankreas-Lipase (Positivkontrolle).  $^{14}\text{C}$ -OA,  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure;  $^{14}\text{C}$ -MOA,  $^{14}\text{C}$ -Monoolein;  $^{14}\text{C}$ -DOA,  $^{14}\text{C}$ -Diolein. Die Abbildung stellt für die ausgewählten Klone das Ergebnis von einem Experiment dar.

dem Leervektor pPICZ $\alpha$ B transformiert wurde, nachweisbar. Da sich die TGL-Aktivität der AtTGL1-exprimierenden Klone nicht deutlich von der der Negativkontrolle unterschied, musste in beiden Fällen von einer endogenen TGL-Aktivität der *P. pastoris* X-33-Zellen ausgegangen werden. In dem Medium der drei X-33-Klone, die AtTGL2 sekretorisch exprimieren sollten, wurde keine TGL-Aktivität gefunden. Um zu überprüfen, ob das sekretierte Protein möglicherweise an den Zellen adhäsierete und deshalb die Aktivität im Expressionsmedium nicht zu detektieren war, wurden die resuspendierten, nicht lysierten Zellen der entsprechenden Expressionskulturen im Aktivitätstest eingesetzt. In diesem Fall wurde jedoch ebenfalls keine TGL-Aktivität detektiert

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen und der TGL-Aktivitätstests von AtTGL1 und AtTGL2 nach Expression in *P. pastoris* darauf schließen, dass die beiden Proteine in den transformierten *P. pastoris*-Zellen nicht exprimiert wurden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Mobilisierung der Speicherlipide in Gurkenkeimlingen

Pflanzen, die als Speicherstoffe in ihren Samen hauptsächlich Öle einlagern, werden als Ölsaaten bezeichnet und haben eine große landwirtschaftliche Bedeutung. Während des Keimungsprozesses werden die im Lipidkörper lokalisierten Speicherlipide abgebaut, um den wachsenden Keimling mit Kohlenstoffbausteinen zu versorgen (Kindl, 1997). Diese Mobilisierung der Speicherlipide wird auf dem klassischen Wege durch die Aktivität der TGLs initiiert, die die Speicherlipide, hauptsächlich TAGs, zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysieren (Adlercreutz *et al.*, 1997). Die freigesetzten Fettsäuren werden in den Glyoxysomen als aktivierte CoA-Thioester über  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut, welches über den Glyoxylatzyklus zum Aufbau von Kohlenhydraten verwendet wird (Kindl, 1984). Aufgrund des Nachweises einer spezifischen, an der Lipidkörpermembran lokalisierten LOX in Gurkenkeimlingen und Keimlingen anderer Ölsaaten wurde eine weitere Möglichkeit der Speicherlipidmobilisierung beschrieben. Diese geht davon aus, dass der Abbau der Speicherlipide durch die LOX-vermittelte Hydroperoxygenierung von Linolsäureresten der TAGs initiiert wird (Feussner *et al.*, 1997b).

Das für die Keimung entscheidende Speicherorganell, der Lipidkörper, besteht aus einer TAG-Matrix, die von einer Phospholipideinfachmembran umgeben ist (Kindl, 1987). Da ihre Oberfläche von einer Schicht aus Strukturproteinen, den Oleosinen, geschützt wird, zeichnen sich Lipidkörper durch eine bemerkenswerte Stabilität aus (Huang, 1996). Diese Proteine interagieren mit den Phospholipiden aufgrund der Ladung und der Polarität innerhalb der Moleküle, so dass eine stabile amphipathische Schicht gebildet wird, welche die Integrität der Lipidkörper aufrecht erhält und verhindert, dass sie miteinander fusionieren (Vance und Huang, 1987; Qu und Huang, 1990; Huang, 1994). Die physiologische Signifikanz, die Lipidkörper als kleine Einheiten zu erhalten, liegt darin, eine ausreichend große Oberfläche für die Bindung von lipidmobilisierenden Enzymen, wie TGLs, an die Lipidkörper zur Verfügung zu stellen, um damit einen schnellen Abbau der TAGs während der Keimung zu ermöglichen (Tzen und Huang, 1992).

Bisher ist allerdings unklar, wie die lipidmobilisierenden Enzyme über die außerordentlich stabile Lipidkörpermembran Zugang zu ihren Substraten im Inneren der Lipidkörper

erhalten. Einzelne Arbeiten deuten an, dass die Zerstörung der Integrität der Lipidkörpermembran durch einen proteolytischen Abbau der Oleosine und durch den partiellen Abbau der Phospholipideinfachmembran über Patatin-ähnliche Phospholipasen stattfinden könnte (Matsui *et al.*, 1999; Noll *et al.*, 2000; Vandana und Bhatla, 2006; Gupta und Bhatla, 2007).

Der partielle proteolytische Verdau von Lipidkörperproteinen in Gurkenkeimlingen mittels Trypsin führte *in vitro* zur Hydroperoxygenierung der Speicherlipide durch die Lipidkörper-assoziierte LOX. Dies lässt erkennen, dass die Zugänglichkeit der LOX zu ihrem Substrat durch das Entfernen der Proteine, die die Oberfläche der Lipidkörper bedecken, ermöglicht werden könnte. Dabei geht man davon aus, dass die LOX nicht in der Lage ist, an intakten Lipidkörpern Bindungsstellen zu finden, da die gesamte Oberfläche mit Oleosinen bedeckt ist. Beim Abbau der Oleosine wird die ungeschützte Oberfläche der Lipidkörper dem Zytosol direkt exponiert, wobei neben den Phospholipiden möglicherweise ein Teil der Speicherlipide freiliegt, so dass die Bindung der LOX an die Lipidkörper erfolgen kann (Matsui *et al.*, 1999). Neben der Beobachtung des partiellen Abbaus von Oleosin-Isoformen kurz vor dem Abbau der Lipidkörper in Rapskeimlingen, konnte in Sonnenblumenkeimlingen die Aktivität einer Thiolprotease gefunden werden, die zeitgleich mit dem Abbau der Oleosine während der Keimung auftritt (Murphy, 2001; Vandana und Bhatla, 2006). In dieser Studie wurde jedoch weder nachgewiesen, dass Oleosine tatsächlich das Substrat der Thiolprotease sind, noch konnte das entsprechende Protein bzw. Gen identifiziert werden. Die Protease-Aktivität wurde lediglich zymographisch mit Gelatine als Substrat detektiert und mit einem Thiolprotease-Inhibitor gehemmt (Vandana und Bhatla, 2006). Isolierte Lipidkörper aus Maisembryonen fusionieren nach der proteolytischen Behandlung mit Trypsin und verlieren somit ihre Integrität, wohingegen sie nach der Behandlung mit PLA<sub>2</sub> oder PLC ihre Eigenständigkeit behalten. Erst nachdem ein Teil der Oleosine durch Trypsin von der Oberfläche der Lipidkörper entfernt wird, können PLA<sub>2</sub> und PLC ihre Aktivität am Lipidkörper ausüben. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Phospholipide der Lipidkörperoberfläche aufgrund des abschirmenden Effekts der Oleosine für PLA<sub>2</sub> und PLC nicht zugänglich sind (Tzen und Huang, 1992) bzw. dem partiellen Abbau der Lipidkörpermembran über Phospholipasen die Proteolyse der Oleosine vorangehen müsste. Da es neben den Oleosinen noch viele weitere Strukturproteine am Lipidkörper gibt (Sturm *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002), Proteasen, wie Trypsin, jedoch unspezifisch alle Proteine abbauen, wurde mit Hilfe der erwähnten Arbeiten nicht

eindeutig geklärt, ob nur die Oleosine abgebaut werden und ob allein durch den Abbau der Oleosine die Zugänglichkeit der Lipidkörpermembran für lipidmobilisierende Enzyme gewährleistet ist.

In 60 h alten Gurkenkeimlingen konnten zudem 80 nm breite und 2,45 nm tiefe Öffnungen in der Phospholipideinfachmembran der Lipidkörper gefunden werden, welche ausreichen, um 100 kDa-große Enzyme, wie der LOX oder TGLs, den Zugang zu der Speicherlipidmatrix zu erleichtern. Zeitgleich kann am Lipidkörper die maximale Expression der Patatin-ähnlichen PLA<sub>2</sub> CsPAT nachgewiesen werden, so dass angenommen wird, dass dieses Enzym am partiellen Abbau der Lipidkörpermembran beteiligt ist (Noll *et al.*, 2000). Desweiteren kann in Protoplasten von Sonnenblumenkeimblättern *in vivo* eine transient auftretende PLA<sub>2</sub>-Aktivität während der Keimung detektiert werden, die von dem Abbau von PC und gleichzeitiger Akkumulation von LPC in den Keimlingen begleitet wird (Gupta und Bhatla, 2007). Hier wird angenommen, dass das abgebaute PC primär von der Lipidkörpermembran stammt.

Neueste Untersuchungen von Arabidopsis-Insertions-Mutanten liefern Hinweise, dass das Lipidkörperprotein Caleosin ebenfalls eine Rolle beim Abbau der Lipidkörper sowie der Speicherlipide spielen könnte und möglicherweise auch den Zugang der TGL zu den TAGs erleichtert (Poxleitner *et al.*, 2006). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Lipidkörper und zentraler Vakuole in den Keimblättern 48 h nach Beginn der Keimung von dem Vorhandensein des Caleosins AtCLO1 abhängig ist. Während Zellen des Wildtyps in transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen eine große zentrale Vakuole besaßen, die vereinzelt internalisierte Lipidkörper aufwies, wurden in Zellen der Insertions-Mutante zahlreiche, deformierte Vakuolen ohne Lipidkörper im Lumen gefunden. Die Mutanten zeigten desweiteren einen verzögerten Abbau der Speicherlipide nach 48 und 60 h Keimung. Es wird vermutet, dass Caleosin an einer Interaktion beteiligt sein könnte, welche die Oleosinbarriere der Lipidkörpermembran zerstört, z.B. indem es die Interaktion der Phospholipideinfachmembran mit der Doppelschichtmembran eines anderen Organells begünstigt (Wang und Huang, 1987; Huang, 1996; Poxleitner *et al.*, 2006).

#### 4.1.1 Analyse der Zusammensetzung des Lipidkörpers

In der vorliegenden Arbeit wurde der LOX-abhängige Abbauweg der Speicherlipide in den Lipidkörpern von Gurkenkeimlingen untersucht. Dabei war die Funktion der Patatin-ähnlichen PLA<sub>2</sub> CsPAT bei dem partiellen Abbau der Phospholipideinfachmembran, der den Zugang der lipidmobilisierenden Enzyme zu ihren Substraten ermöglicht, von besonderem Interesse. Untersuchungen von Gurkenkeimblättern haben gezeigt, dass in frühen Stadien der Keimung die *de novo* Synthese der CsLbLOX erfolgt, deren Zielkompartiment die Einfachmembran der Lipidkörper ist, wo sie schnell zu einem der dominierenden Proteine wird (Sturm *et al.*, 1985; Feussner, 1993; Feussner *et al.*, 1996). Die Expression dieser Lipidkörper-assoziierten LOX ist auf den Prozess der Keimung beschränkt und ist im ruhenden Samen nicht nachweisbar (Feussner *et al.*, 1996; Höhne *et al.*, 1996; Kindl, 1997). Neben der CsLbLOX wird die Patatin-ähnliche PLA<sub>2</sub> CsPAT im jungen Keimling *de novo* synthetisiert, welche ebenfalls nur am Lipidkörper nachgewiesen wurde (May *et al.*, 1998). Um einen Zusammenhang zwischen der CsLbLOX und dem CsPAT bei der Mobilisierung der Speicherlipide aufzuzeigen, sollte in dieser Arbeit die zeitliche Korrelation der Akkumulation der beiden Proteine sowie der Lipidkörper-assoziierten Proteine, Oleosin und Caleosin, während der Keimung untersucht werden (Abb. 4). CsPAT konnte nach 36 h Keimung am Lipidkörper immunochemisch detektiert werden, wohingegen die CsLbLOX schon nach 24 h in geringen Mengen und in einem nicht gezeigten Keimungsexperiment bereits nach 18 h Keimung nachweisbar war. Beide Proteine waren ab dem ersten Auftreten fortlaufend in dem analysierten Zeitraum detektierbar und zeigten nach 72 h in ihrem Gehalt ein Maximum. Das Vorkommen des CsPAT während der Keimung bestätigte frühere Ergebnisse, nach denen CsPAT zuerst nach einer Keimungszeit von 38 h nachgewiesen wurde (May *et al.*, 1998). In einer weiteren Untersuchung konnte das CsPAT-Protein bereits nach 30 h Keimung detektiert werden (Noll *et al.*, 2000), welches jedoch nicht im Widerspruch zu dem Ergebnis dieser Arbeit steht, da hier der Keimungszeitpunkt von 30 h nicht untersucht wurde. Die ermittelte transiente Akkumulation der CsLbLOX am Lipidkörper während der Keimung entspricht den Ergebnissen früherer Arbeiten (Feussner *et al.*, 1996; Höhne *et al.*, 1996). Da das CsPAT etwas später am Lipidkörper nachgewiesen wurde als die CsLbLOX, muß man unter der Annahme, dass CsPAT als PLA<sub>2</sub> für den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran verantwortlich ist, davon ausgehen, dass die CsLbLOX zu sehr frühen Zeitpunkten der Keimung zwar schon am Lipidkörper vorliegt, jedoch ihre

lipidoxidierende Aktivität auf die Speicherlipide im Inneren der Lipidkörper noch nicht ausüben kann.

Besonders auffällig war die bereits nach 36 h beginnende Abnahme des Proteingehaltes der beiden Lipidkörper-assoziierten Proteine Oleosin und Caleosin, die parallel zur Akkumulation des CsPAT-Proteins erfolgte (Abb. 4). Einerseits liefert dieses Ergebnis einen Hinweis auf einen proteolytischen Abbau der beiden Strukturproteine in Gurkenkeimlingen und die damit verbundene Zugänglichkeit des Lipidkörpers für die CsLbLOX und weitere lipidmobilisierende Enzyme, wie es bereits für andere Arbeiten diskutiert wurde (Tzen und Huang, 1992; Matsui *et al.*, 1999; Vandana und Bhatla, 2006). Andererseits legt es die Vermutung nahe, dass der proteolytische Abbau der Oleosine und der partielle Abbau der Lipidkörpermembran durch das Patatin-ähnliche CsPAT während der Keimung zeitlich korreliert erfolgt. Da die gesamte Oberfläche der Lipidkörper durch die Oleosine oder andere Proteine der Lipidkörpermembran abgeschirmt wird, erscheint die letztere Variante äußerst effektiv, um 80 nm breite Öffnungen in der Phospholipideinfachmembran zu erzeugen, wie sie von Noll *et al.* (2000) beschrieben wurden. Generell nimmt der Gehalt der Oleosine parallel zu den Speicherlipiden ab (Fernandez *et al.*, 1988; Huang, 1992). Während bzw. nach der Lipolyse fusioniert die Lipidkörpermembran mit der Membran eines weiteren Lipidkörpers oder einer sich vergrößernden Vakuole, so dass sie letztendlich ein Bestandteil der Zentralvakuole wird (Wang und Huang, 1987; Huang, 1992). Möglicherweise sind die hydrophoben Oleosine in der Phospholipiddoppelmembran der Vakuole nicht mehr stabil und werden deshalb abgebaut (Huang, 1992).

Bei einer Beteiligung der Patatin-ähnlichen CsPAT an der Mobilisierung der Speicherlipide während der Keimung sollte man davon ausgehen, dass dieses Protein an der Phospholipideinfachmembran der Lipidkörper lokalisiert ist. Bisher konnte mit Hilfe von Immunodetektion in subzellulären Fraktionen von Gurkenkeimlingen die Lokalisierung des CsPAT bereits auf den Lipidkörper eingegrenzt werden (May *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu wurde für die an der Mobilisierung der Speicherlipide beteiligte CsLbLOX eine immunozytochemische Lokalisierung in Keimblättern an der Membran der Lipidkörper beschrieben (Feussner *et al.*, 1996). Um die exakte intrazelluläre Lokalisierung des CsPAT im Vergleich zu der der CsLbLOX zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen mit immunodekorierten Goldpartikeln an 72 h alten, etiolierten Keimblättern durchgeführt, da, wie bereits erwähnt, zu diesem Zeitpunkt der Keimung jeweils die maximalen Proteingehalte

an CsPAT und CsLbLOX im Western-Blot nachgewiesen wurden. Beide Proteine wurden über diese Immunogold-Markierung an der Lipidkörpermembran detektiert (Abb. 5). Vereinzelt konnte die CsLbLOX auch im Zytosol in Assoziation mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum gefunden werden, welches auf den Ort ihrer Biosynthese schließen lässt. Für den selektiven Transport der CsLbLOX vom Zytosol zum Lipidkörper und die Bindung an die Lipidkörpermembran scheint die N-terminale  $\beta$ -Barrelstruktur des Enzyms verantwortlich zu sein (May *et al.*, 2000). Bei einem Vergleich von 24 und 96 h alten Gurkenkeimblättern wurden in früheren Arbeiten offensichtliche Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von LOX-Isoformen festgestellt. Nach 24 h Keimung konnte ausschließlich die CsLbLOX an der Membran der Lipidkörper nachgewiesen werden, wohingegen zwischen 48 und 96 h Keimung eine Abnahme der Markierung an den Lipidkörpern beobachtet wurde, die gleichzeitig von einer Zunahme zytosolischer LOX-Isoformen begleitet war (Feussner *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen der maximale CsLbLOX-Gehalt am Lipidkörper nach 72 h Keimung detektiert (Abb. 4). Dies stellt jedoch nur scheinbar einen Widerspruch dar, weil mit der ersten Methode das Vorkommen von LOXen in der ganzen Zelle analysiert wurde, während im Ansatz dieser Arbeit nur die Situation am Lipidkörper betrachtet wurde.

Mit der hier angewandten Immunogold-Transmissionselektronenmikroskopie wurde erstmalig die direkte Lokalisierung von CsLbLOX und CsPAT auf intrazellulärer Ebene an der Lipidkörpermembran gezeigt. Neben der parallelen Akkumulation der CsLbLOX und des CsPAT am Lipidkörper während der Keimung liefert die intrazelluläre Lokalisierung ein weiteres Indiz für eine Beteiligung des CsPAT an der Mobilisierung der Speicherlipide.

Für das am Lipidkörper von Gurkenkeimlingen identifizierte Patatin-ähnliche Protein CsPAT wurde zwar nach heterologer Expression PLA<sub>2</sub>-Aktivität nachgewiesen, jedoch wurde das Vorkommen dieser Aktivität am Lipidkörper selbst bisher nicht untersucht (May *et al.*, 1998). Um folglich weitere Hinweise für die Beteiligung einer Phospholipase an dem partiellen Abbau der Phospholipideinfachmembran des Lipidkörpers zu erhalten, sollten in dieser Arbeit isolierte Lipidkörper auf PLA<sub>2</sub>-Aktivität während der Keimung untersucht werden. In früheren Untersuchungen war gezeigt worden, dass das rekombinante CsPAT-Protein in der Lage ist, PC mit Palmitinsäure-, Linolsäure- bzw. hydroperoxygenierten Linolsäureresten in der *sn*2-Position als Substrat in gleichem Maße umzusetzen (May *et al.*, 1998). Da angenommen wurde, dass CsPAT die verantwortliche PLA<sub>2</sub> am Lipidkörper darstellt, wurden die isolierten Organellen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit PC inkubiert, welches an der *sn*2-Fettsäure radioaktiv markiert war. Es

konnte in diesem Ansatz PLA<sub>2</sub>-Aktivität detektiert werden, wobei das Auftreten und die Intensität der PLA<sub>2</sub>-Aktivität während der Keimung mit dem Vorkommen des CsPAT-Proteins und der detektierten Proteinmenge korrelierte (Abb. 4, Abb. 6B). Nach 36 h Keimungszeit war sowohl CsPAT als auch PLA<sub>2</sub>-Aktivität am Lipidkörper erstmals während der Keimung zu finden und nach 72 h wies die PLA<sub>2</sub>-Aktivität sowie die Menge an CsPAT ein Maximum auf. Nach 96 h Keimung wurden nur noch ungefähr 30 % der maximalen PLA<sub>2</sub>-Aktivität festgestellt. An Keimblattprotoplasten von Sonnenblumenkeimlingen ließ sich ebenfalls PLA<sub>2</sub>-Aktivität nachweisen, die *in vivo* ab 48 h Keimung an der Oberfläche von Lipidkörpern zu finden war und nach 96 h noch verstärkt auftrat (Gupta und Bhatla, 2007). Somit stellt der partielle Abbau der Lipidkörpermembran über Phospholipasen möglicherweise einen generellen Mechanismus bei der Keimung von Ölsaaten dar.

Im Weiteren sollte die ermittelte PLA<sub>2</sub>-Aktivität und der damit verbundene, partielle Abbau der Lipidkörpermembran in einen zeitlichen Zusammenhang mit dem Abbau der Speicherlipide während der Keimung gestellt werden. Für Lipidkörper aus Gurkenkeimlingen konnte eine hoch spezifische TGL beschrieben werden, die in der Lage ist, die durch die CsLbLOX-Reaktion hydroperoxygenierten TAGs zu hydrolysieren. Nach Reinigung dieses Enzyms zeigten Untersuchungen der Substratspezifität, dass diese TGL nicht auf LOX-Produkte beschränkt war, sondern verschiedenste oxygenierte Fettsäurereste in den TAGs hydrolysierte. Dabei war die nachgewiesene Aktivität unabhängig davon, ob die Fettsäure eine Hydroxy-, Hydroperoxy- oder Epoxygruppe enthielt und an welcher Position der Fettsäurekette diese funktionelle Gruppe lokalisiert war (Balkenhohl *et al.*, 1998; Balkenhohl, 2000). Zum Nachweis der TGL-Aktivität an den Lipidkörpern von Gurkenkeimlingen wurden in der vorliegenden Arbeit isolierte Lipidkörper verschiedener Keimungszeitpunkte mit Triolein als Substrat inkubiert, das an allen drei Ölsäureresten radioaktiv markiert war. Eindeutige TGL-Aktivität konnte erst nach 96 h Keimung detektiert werden (Abb. 6C). Da spätere Keimungszeitpunkte hier nicht untersucht wurden, kann über den weiteren Verlauf der TGL-Aktivität keine Aussage getroffen werden. Die leichte Hintergrundaktivität, die zu Zeitpunkten vor 96 h gemessen wurde, lässt sich anhand der Quantifizierung der Aktivität über 2D-Densitometrie erklären. Optisch war zu diesen früheren Zeitpunkten nach Auftrennung der Lipide über DC keine Aktivität zu erkennen. In früheren Analysen der TGL-Aktivität, in denen aus isolierten Lipidkörpern von Gurkenkeimlingen verschiedener Keimungszeitpunkte die Proteine solubilisiert wurden und anschließend die TGL-Aktivität in den Solubilisaten gemessen

wurde, konnte das Maximum der Aktivität nach 72 h Keimung ermittelt und nach 96 h schon wieder eine deutliche Abnahme festgestellt werden (Balkenhohl, 2000). Dieses Ergebnis weicht deutlich von der hier bestimmten TGL-Aktivität am Lipidkörper von Gurkenkeimlingen ab, wobei aber in den beiden Untersuchungen verschiedene Substrate verwendet wurden. Das Substrat der hoch spezifischen TGL der Gurkenkeimlinge konnte im Rahmen der Analyse in dieser Arbeit nicht eingesetzt werden, da radioaktiv markierte TAGs mit hydro(pero)xygenierten Fettsäureresten kommerziell nicht erhältlich sind. In Untersuchungen an Sonnenblumenkeimlingen wird der Zeitpunkt der maximalen Lipolyse mit 96 h Keimungszeit angegeben (Vandana und Bhatla, 2006; Gupta und Bhatla, 2007).

Im zeitlichen Vergleich der hier ermittelten PLA<sub>2</sub>- und TGL-Aktivität am isolierten Lipidkörper ist festzustellen, dass während des Anstiegs der TGL-Aktivität bei 96 h die PLA<sub>2</sub>-Aktivität schon wieder deutlich zurückgegangen war. Zu diesem Zeitpunkt könnte folglich die Phospholipideinfachmembran des Lipidkörpers bereits soweit abgebaut sein, dass die TGL ausreichend Zugang zu ihrem Substrat, den oxygenierten TAGs im Inneren der Lipidkörper, erhält und somit ein weiterer Abbau der Membran bzw. weitere PLA<sub>2</sub>-Aktivität nicht notwendig sind. Die detektierten Umsetzungsraten der PLA<sub>2</sub> und der TGL am isolierten Lipidkörper unterscheiden sich sehr stark voneinander. Die spezifische PLA<sub>2</sub>-Aktivität ist um sechs Zehnerpotenzen höher als die der TGL. Da der Anteil an Phospholipiden in der Lipidkörpermembran sehr klein ist gegenüber dem Anteil an TAGs, erscheint eine hohe spezifische PLA<sub>2</sub>-Aktivität plausibel. Im Gegensatz dazu muß bei dem Überschuss an TAGs in den Lipidkörpern die spezifische TGL-Aktivität für eine effektive Umsetzung nicht so hoch sein. Bei der Ermittlung der spezifischen TGL-Aktivität wurde die freigesetzte Ölsäure ins Verhältnis zum eingesetzten Substrat gesetzt. Da das Substrat in einem deutlichen Überschuss vorlag, könnte die äußerst geringe ermittelte spezifische Aktivität in der Quantifizierung über 2D-Densitometrie begründet sein. Die dargestellte TGL-Aktivität gibt somit keine absoluten Umsatzraten wieder, sondern deutet die Tendenz des Speicherlipidabbaus während der Keimung an, welches auch der wesentliche Grund dieser Untersuchung war.

Bei einem partiellen Abbau der Phospholipideinfachmembran der Lipidkörper durch eine Phospholipase sollten eventuelle Änderungen in der Zusammensetzung der Membranphospholipide während der Keimung zu erkennen sein. Vor diesem Hintergrund wurden die Membranphospholipide aus isolierten Lipidkörpern von verschiedenen Keimungszeitpunkten analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Lipidkörpermembran von Gurkenkeimlingen im Wesentlichen aus PC, LPC, PE, PI und PS

zusammensetzt (Abb. 7). Frühere Bestimmungen der Phospholipidzusammensetzung von Lipidkörpern aus 2 Tage altem Rizinusendosperm (*Ricinus communis*) zeigten eine ähnliche Zusammensetzung wie die der Gurkenlipidkörper. Dabei konnten neben dem Hauptbestandteil PC (30,4 %) Lysophospholipide (9,0 %), PE (17,1 %), PI (13 %), PS (7 %) und Phosphatidylglyzerin oder PA (5,9 %) als Phospholipide der Lipidkörpermembran identifiziert werden (Donaldson, 1976). Da der Gehalt an PC im untersuchten Keimungszeitraum kontinuierlich und verstärkt ab 36 h Keimung abnahm (Abb. 7A), während gleichzeitig eine Akkumulation des Abbauproduktes LPC auftrat (Abb. 7B), lässt sich in dieser Arbeit eine zeitliche Korrelation mit der am isolierten Lipidkörper nachgewiesenen PLA<sub>2</sub>-Aktivität einerseits aber auch mit dem Vorkommen der Patatin-ähnlichen PLA<sub>2</sub> CsPAT am Lipidkörper andererseits erkennen (Abb. 4, Abb. 6B). Es lässt sich folglich ein weiterer Hinweis finden, dass CsPAT als PLA<sub>2</sub> an dem partiellen Abbau der Lipidkörpermembran beteiligt ist und PC als Substrat nutzt. Das heterolog exprimierte Protein CsPAT ist, wie bereits erwähnt, in der Lage, PC umzusetzen (May *et al.*, 1998). Es wurde hier erstmalig *in vivo* gezeigt, dass am Lipidkörper von Gurkenkeimlingen eine Phospholipase-Aktivität mit einer hoch spezifischen Präferenz für PC als Substrat vorliegt. In bisherigen Untersuchungen der PLA<sub>2</sub>-Aktivität von Patatin-ähnlichen Enzymen aus Tabak wurde PC als Substrat eingesetzt, da es das vorwiegende Phospholipid der Membranen ist (Dhondt *et al.*, 2000). Es wurden dabei jedoch keine weiteren Phospholipide als Substrate getestet. Ein Patatin-ähnliches Protein aus *Vigna unguiculata*, das homolog zu CsPAT ist, wurde als Galaktolipid-Acylhydrolase mit der höchsten Aktivität gegenüber MGD identifiziert und scheint an dem Galaktolipidabbau bei Trockenstress beteiligt zu sein. Phospholipide wurden von diesem Enzym nur sehr langsam hydrolysiert (Matos *et al.*, 2001). In der Lipidkörpermembran von Sonnenblumenkeimlingen konnte während der Keimung ebenfalls der Abbau von PC bei gleichzeitiger Akkumulation von LPC und dem Nachweis von PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Keimblattprotoplasten beobachtet werden (Gupta und Bhatla, 2007). Dabei wurde jedoch die Zusammensetzung der Lipidkörpermembran bezüglich weiterer Phospholipide nicht analysiert, so dass hier nicht auf eine Substratspezifität geschlossen werden konnte. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nahm der Gehalt an LPC zu späteren Zeitpunkten der Keimung in geringerem Maße zu als der Gehalt an PC abnahm. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass PC nicht nur durch Hydrolyse eines Fettsäurerestes zum LPC sondern noch weiter abgebaut wird. Ähnliche Hinweise lassen sich wiederum auch bei

Sonnenblumenkeimlingen finden; in denen der Gehalt an LPC der Lipidkörpermembran vom fünften Tag der Keimung an graduell verschwand (Gupta und Bhatla, 2007).

Zwischen 18 und 36 h der Keimung, als weder PLA<sub>2</sub>-Aktivität noch CsPAT-Protein nachgewiesen werden konnten, war ebenfalls eine signifikante Abnahme des PC-Gehaltes der Lipidkörpermembran zu verzeichnen. Dies kann ein Hinweis auf eine weitere, noch nicht identifizierte Phospholipase sein, die zusätzlich an der Initiation der Speicherlipidmobilisierung im Lipidkörper beteiligt sein könnte.

Die drei weiteren Phospholipide PE, PI und PS, die neben PC als wesentliche Bestandteile der Lipidkörpermembran von Gurkenkeimlingen identifiziert wurden, wiesen in frühen Stadien der Keimung jeweils einen Gehalt auf, der ungefähr 50 % der Menge an PC entsprach (Abb. 7A, C). Während des untersuchten Keimungszeitraums änderte sich der Gehalt an PE und PS nicht signifikant, so dass diese beiden Phospholipide kein Substrat für den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran darstellen können. Im Gegensatz dazu wurde für den Gehalt an PI eine leichte Abnahme ab 36 h Keimung ermittelt. Dieses bietet einen Hinweis darauf, dass PI neben PC ein Substrat für Phospholipasen darstellen kann. Untersuchungen, ob das rekombinante Protein CsPAT PI als Substrat verwendet, stehen noch aus.

Bei der Mobilisierung der Speicherlipide im Gurkenkeimling geht man davon aus, dass die an der Lipidkörpermembran lokalisierte CsLbLOX den Abbau der TAGs durch die Hydroperoxygenierung der lipidgebundenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren initiiert (Feussner *et al.*, 1997b; Kindl, 1997; Feussner *et al.*, 2001). Dieses Enzym oxygeniert Linol- bzw. Linolensäure zu 13-HPOD bzw. zu 13-HPOT und ist desweiteren in der Lage, Trilinolein direkt zu mono-, di- und trihydro(pero)xygenierten TAG-Spezies zu oxygenieren (Feussner *et al.*, 1995; Feussner *et al.*, 1997a; Feussner *et al.*, 1998). Damit die CsLbLOX ihre Aktivität am Lipidkörper ausüben kann, muß die Zugänglichkeit zu ihrem Substrat, der TAG-Matrix im Inneren des Lipidkörpers, gewährleistet sein. Unter der Annahme, dass CsPAT für den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran verantwortlich ist, sollte dieses Enzym folglich vor bzw. zur gleichen Zeit wie die CsLbLOX aktiv sein. Die Bestimmung der LOX-Aktivität an isolierten Lipidkörpern während der Keimung mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode ergab, dass die Aktivität ab 36 h Keimung kontinuierlich zunahm und nach 96 h um das Vierfache höher war als nach 36 h (Abb. 8A). Diese Zunahme der LOX-Aktivität lässt auf eine erhöhte Mobilisierungsrate der Speicherlipide mit fortschreitender Keimung schließen. Obwohl das CsLbLOX-Protein schon nach 24 h

am Lipidkörper zu finden war und in dem *in vivo* LOX-Reaktionsansatz Linolsäure als exogenes Substrat angeboten wurde, konnte zu diesem Zeitpunkt der Keimung noch keine LOX-Aktivität am isolierten Lipidkörper detektiert werden. Die Oxygenierung der Lipide findet über die Bindung der CsLbLOX an der Interphase zwischen Lipid und Wasser statt (Matsui und Kajiwara, 1995; Matsui *et al.*, 1999). Dies könnte bedeuten, dass solange ein partieller Abbau der Lipidkörpermembran nicht stattgefunden hat, kann die CsLbLOX keine geeigneten Bindungsstellen finden, um ihre Aktivität auszuüben.

Da die *in vivo* LOX-Aktivität zum gleichen Zeitpunkt der Keimung auftrat wie die am Lipidkörper detektierte PLA<sub>2</sub>-Aktivität und die Akkumulation des CsPAT-Proteins (Abb. 4, Abb. 6B, Abb. 8A), stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der Annahme, dass der partielle Abbau der Lipidkörpermembran durch CsPAT erfolgt.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit die LOX-Aktivität am Lipidkörper indirekt über die Akkumulation des Reaktionsproduktes 13-H(P)OD und den Verbrauch des Substrates Linolsäure während der Keimung untersucht werden. Dazu wurde ausschließlich der Gehalt an gebundenem 13-H(P)OD und gebundener Linolsäure der TAG-Fraktion isolierter Lipidkörper analysiert. Der Gehalt an 13-HPOD nahm nach 36 h Keimung in ähnlicher Weise zu wie die am Lipidkörper nachgewiesene LOX-Aktivität, wobei jedoch nach 72 h ein deutliches Maximum auftrat (Abb. 8A, B). Nach 96 h sank der Gehalt an gebundenem 13-HPOD in den Lipidkörpern bereits wieder deutlich, obwohl zu diesem Zeitpunkt der Keimung noch eine Erhöhung der LOX-Aktivität *in vitro* gemessen wurde. Dieses Ergebnis kann mit der nach 96 h Keimung aktiven TGL erklärt werden (Abb. 6C). Da bei der Bestimmung des 13-HPOD-Gehaltes ausschließlich gebundene Hydro(pero)xyfettsäuren erfasst wurden, waren die CsLbLOX-Produkte, die bereits durch die Aktivität der TGL von den TAGs abgespalten wurden, nicht berücksichtigt worden. Die Detektion des primären LOX-Produktes 13-HPOD nach 36 h Keimung korreliert mit der Messung der ersten LOX-Aktivität und auch mit dem ersten Nachweis von PLA<sub>2</sub>-Aktivität am isolierten Lipidkörper während der Keimung (Abb. 6B, Abb. 8A, B).

Das reduzierte LOX-Produkt 13-HOD wurde in wesentlich geringeren Mengen als das primäre Produkt 13-HPOD nachgewiesen (Abb. 8B). Es konnte aber bereits nach 12 h Keimung in signifikantem Maße nachgewiesen werden. Untersuchungen der Konfiguration dieses Produktes ließen zwischen 18 und 96 h Keimungszeit auf einen enzymatischen Ursprung schließen, obwohl die ermittelte LOX-Aktivität nach 18 und 24 h Keimung, unter der Detektionsgrenze lag.

In früheren Studien zur Quantifizierung von in TAGs gebundenem 13-H(P)OD in Lipidextrakten von Gurkenkeimblättern wurde das Maximum des Gehaltes nach 48 h Keimungszeit und nach 72 h eine leichte Abnahme ermittelt (Weichert *et al.*, 2002). In diesen Untersuchungen konnte auch in ungekeimten Samen verestertes 13-H(P)OD nachgewiesen werden, so dass man hier auf die Beteiligung einer weiteren LOX schließen kann, die möglicherweise schon zur Zeit der Samenreifung aktiv ist (Feussner *et al.*, 1995). Letzteres wäre folglich eine Erklärung für den in dieser Arbeit gemessenen Gehalt an gebundenem 13-HOD zwischen 12 und 24 h Keimungszeit.

Bezüglich des LOX-Substrates, der veresterten Linolsäure, wurde eine kontinuierliche Abnahme des Gehaltes ab 18 h Keimung bis auf 25 % nach 96 h festgestellt (Abb. 8C). In früheren Arbeiten konnten ähnliche Werte gefunden werden, wobei der Gehalt gebundener Linolsäure nach 120 h Keimung mit 20 % der Ausgangsmenge beziffert wurde (Weichert *et al.*, 2002). Diese Abnahme läßt den vorrangigen Katabolismus von Linolsäure aus den Speicherlipiden erkennen, welches plausibel wird, wenn man berücksichtigt, dass die Speicherlipide von Gurkenkeimlingen über 75 % Linolsäure als Fettsäurereste enthalten (Gunstone *et al.*, 1994; Weichert *et al.*, 2002). Die Abnahme des CsLbLOX-Substrates Linolsäure zwischen 18 und 36 h Keimung widerspricht der Hypothese, dass eine PLA<sub>2</sub> über den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran der CsLbLOX den Zugang zu ihrem Substrat ermöglicht, da PLA<sub>2</sub>-Aktivität dann auch schon zu diesen frühen Keimungszeitpunkten zu finden sein müsste.

In dieser Arbeit konnte desweiteren festgestellt werden, dass nach 72 h Keimung, also dem Zeitpunkt der stärksten Akkumulation von gebundenem 13-H(P)OD, 63 % der gebundenen Linolsäure in oxygenierter Form vorlag, während in den Untersuchungen von Weichert *et al.* (2002) dieser Wert mit 6 % um ein Zehntel niedriger war. Eine Erklärung für diese Differenz liegt in der Verwendung verschiedener Methoden. Bei Weichert *et al.* (2002) wurde der gesamte Lipidextrakt der Keimblätter verwendet und die Lipide nach einer alkalischen Hydrolyse quantifiziert. Letzteres hat den unerwünschten Nebeneffekt, dass ein Teil der Hydroperoxide zerstört wird. Dahingegen kam in den Analysen der vorliegenden Arbeit der Lipidextrakt aus isolierten Lipidkörpern zum Einsatz, der auf schonendere Weise mit Natriummethoxid transesterifiziert wurde. Hier wurde somit eine genauere Bestimmung des lipidgebundenen 13-H(P)OD-Gehaltes durchgeführt als in den vorangegangenen Untersuchungen (Feussner *et al.*, 1995; Weichert *et al.*, 2002). Da die Speicherlipide der Gurke während der Keimung hauptsächlich über den LOX-abhängigen

Stoffwechselweg abgebaut werden, kann von einer starken Akkumulation an 13-H(P)OD ausgegangen werden.

Zusätzlich wurden die LOX-Aktivität und der Abbau der Speicherlipide über die Zusammensetzung der Neutrallipide in isolierten Lipidkörpern verschiedener Keimungszeitpunkte untersucht. Dabei konnte mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und geeigneten Standardsubstanzen eine Zunahme von mono-, di- und trihydro(pero)xygenierten TAG-Spezies während der Keimung festgestellt werden (Abb. 9). Diese Zunahme war besonders deutlich ab 36 h Keimung und zeigte nach 72 h ein Maximum. Letzteres stimmt mit dem höchsten Gehalt an in TAGs gebundenem 13-H(P)OD überein (Abb. 8B). Weiterhin korrelierte diese Akkumulation an oxygenierten TAG-Spezies mit der nachgewiesenen LOX-Aktivität am Lipidkörper und der transienten Akkumulation der CsLbLOX während der Keimung (Abb. 4, Abb. 8A). Eine Abnahme des Gehaltes an mono-, di- und trihydro(pero)xygenierten TAG-Spezies nach 96 h Keimung ist im Zusammenhang mit der zu diesem Zeitpunkt detektierten TGL-Aktivität am Lipidkörper anzunehmen (Abb. 6C). Trotz der Zunahme der oxygenierten TAG-Spezies während der Keimung wurde im Rahmen der hier durchgeführten DC-Analyse keine eindeutige Abnahme der nicht-oxygenierten TAGs festgestellt, welches jedoch auf eine sehr starke Beladung der DC-Platte bei der Analyse zurückzuführen sein dürfte. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen früherer Arbeiten, in denen einerseits die Fähigkeit der rekombinanten CsLbLOX, *in vitro* Di- und Trilinolein zu den entsprechenden mono-, di- und trihydroperoxygenierten Derivaten zu oxygenieren nachgewiesen wurde. Andererseits wurden mittels HPLC-, GC/MS- und NMR-Analysen *in vivo* TAGs mit ein, zwei oder drei 13-HPOD-Resten als oxygeniertes Hauptprodukt in Lipidkörpern von Gurkenkeimlingen verschiedener Keimungsstadien gefunden (Feussner *et al.*, 1997a; Feussner *et al.*, 1998). In Sonnenblumenkeimlingen konnten ebenfalls TAGs mit ein, zwei oder drei 13-HPOD-Resten während der Keimung nachgewiesen werden (Gerhardt *et al.*, 2005). Bei diesen vorangegangenen Arbeiten handelt es sich jedoch um rein qualitative Analysen.

Um die Zusammensetzung des Lipidkörpers von Gurkenkeimlingen vollständig zu untersuchen, wurde außerdem die Zusammensetzung der Glykolipide bestimmt. Bisher konnten im Rahmen dieser Arbeit acetylierte Sterolglycoside, Sterolglycoside und Cerebroside als Bestandteile der Lipidkörper identifiziert werden (Abb. 11). Die physiologische Funktion dieser Glykolipide im Lipidkörper bzw. während der Keimung ist jedoch nicht bekannt. Von besonderem Interesse sind die detektierten Glykolipide, die unpolarer als acetylierte Sterolglycoside waren und während der Keimung sehr stark

akkumulierten. Diese Glykolipide stellten den größten Anteil dieser Lipidfraktion des Lipidkörpers dar, so dass möglicherweise von einer wichtigen Funktion während der Keimung ausgegangen werden kann. Sie sollten in weiterführenden Arbeiten z.B. über LC/MS-Analysen genauer untersucht werden.

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des CsPAT an der Mobilisierung der Speicherlipide in Gurkenkeimlingen wurde in einer *in vitro* Untersuchung gefunden. Bei der Inkubation isolierter Lipidkörpern aus reifen Gurkensamen mit rekombinanter CsLbLOX und rekombinantem CsPAT wurde eine erhöhte 13-LOX-Aktivität im Vergleich zu reinen Lipidkörpern und solchen, die nur mit einem der beiden Enzyme inkubiert wurden, nachgewiesen (Abb. 12). Da die 13-LOX-Aktivität in dieser Analyse indirekt über das Produkt/Substrat-Verhältnis bestimmt wurde, wurde hier in ungekeimten Samen ebenfalls 13-HOD detektiert, welches, wie bereits diskutiert, auf die Aktivität einer weiteren, schon während der Samenreifung aktiven LOX schließen ließe (Feussner *et al.*, 1995). Die hier gezeigte Interaktion der Aktivitäten lässt eine Abhängigkeit der CsLbLOX-Aktivität von der CsPAT-Aktivität erkennen, wobei jedoch nur vermutet werden kann, dass zur Initiierung der LOX-Aktivität am Lipidkörper die PLA<sub>2</sub>-Aktivität der CsPAT notwendig ist und über den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran der CsLbLOX der Zugang zu ihrem Substrat ermöglicht wird. Ein Hinweis auf die Beteiligung von Proteasen an der Mobilisierung der Speicherlipide durch den Abbau der Oleosine des Lipidkörpers konnte in dieser *in vitro* Untersuchung nicht erhalten werden. Lipidkörper reifer Gurkensamen, die mit Proteinase K vorbehandelt wurden, wiesen nach Inkubation mit der rekombinanten CsLbLOX keine erhöhte 13-LOX-Aktivität im Vergleich zu reinen Lipidkörpern auf (Abb. 12).

#### 4.1.2 Phylogenetische Eingruppierung des CsPAT

Phylogenetisch ließ sich das CsPAT aus Gurkenkeimlingen auf Basis der Aminosäuresequenz mit bekannten Patatin-ähnlichen PLAs aus *A. thaliana* einordnen, wobei CsPAT die höchste Homologie zur Gruppe 2 der *AtPLA* zeigte (Abb. 20). Vier Mitglieder dieser Gruppe, *AtPLA I*, *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVC*, konnten über ihre gewebespezifische Expression und ihre subzelluläre Lokalisierung näher charakterisiert werden, wobei *AtPLA I*-Transkripte vorzugsweise in Schoten, *AtPLA IIA*- und *AtPLA IVA*-Transkripte in Wurzeln und *AtPLA IVC*-Transkripte in Blüten nachgewiesen wurden (Holk *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu der beschriebenen Lokalisierung der CsPAT an der

Membran der Lipidkörper im Keimling (Abb. 5) deuteten GFP-Fusionsstudien darauf hin, dass *AtPLA IIA*, *AtPLA IVA* und *AtPLA IVC* im Zytoplasma lokalisiert sind, wobei eine Assoziation mit Membranen nicht ausgeschlossen werden kann. Für die rekombinant exprimierte *AtPLA IVA* wurde sowohl  $PLA_1$ - als auch  $PLA_2$ -Aktivität gezeigt (Holk *et al.*, 2002). In Untersuchungen der Genexpression mit Hilfe des Genevestigators (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) wurde für *AtPLA IIA* zwar eine Expression im Keimling gefunden, die höchste Expression lag jedoch in seneszenten Blättern vor (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Mitglieder der *AtPLA*-Genfamilie konnte keine vorwiegende Expression im Keimling detektiert werden. *AtPLA IIA*-Promotorstudien mittels des Reportergens  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) ergaben GUS-Aktivität in Blättern sowie in verschiedenen Wurzelgeweben und zeigten eine höhere Aktivität nach Behandlung mit Salicylsäure, nach Verwundung, nach Behandlung mit Ethylen und bei Eisen- und Phosphatmangel (Rietz *et al.*, 2004). Diese Daten lassen nicht auf eine Beteiligung der *AtPLA IIA* an der Keimung schließen.

In dieser Arbeit wurde mittels Western-Blot-Analyse eine hohe Homologie zwischen CsPAT und einem bisher nicht identifizierten Patatin-ähnlichen Protein an Lipidkörpern von *A. thaliana*-Keimlingen nachgewiesen (Abb. 21). Das zeitliche Auftreten dieses Patatin-ähnlichen Proteins in Arabidopsis-Keimlingen ist der Akkumulation des CsPAT am Lipidkörper des Gurkenkeimlings sehr ähnlich (Abb. 4, Abb. 21), so dass eine ähnliche physiologische Funktion dieser beiden Proteine während der Keimung postuliert werden kann. Die Hypothese des partiellen Abbaus der Lipidkörpermembran durch eine Phospholipase hätte damit eine allgemeingültige Bedeutung bei der Mobilisierung der Speicherlipide in Ölsaaten.

#### 4.1.3 Funktionelle Analyse der $PLA_2$ CsPAT in transgenen Tabakpflanzen

Nach heterologer Expression der CsLbLOX in Tabaksamen unter Kontrolle des 35S-Promotors wurde die korrekte Lokalisierung dieses Proteins an den Lipidkörpern und ein erhöhter Proteingehalt bereits nachgewiesen, jedoch konnte nur ein geringer Anstieg an Metaboliten gefunden werden, die sich auf die Aktivität einer 13-LOX zurückführen lassen (Hause *et al.*, 2000). Eine ähnlich geringe Zunahme an LOX-Produkten wurde nach Expression der LOX-2 aus Sojaembryonen in Tabakblättern beschrieben (Deng *et al.*, 1992). Eventuell wurde die Bildung der LOX-Produkte in den transgenen Pflanzen aber durch die Zugänglichkeit des Substrates limitiert (Hause *et al.*, 2000). Daher sollte in der

vorliegenden Arbeit die Expression des CsPAT in Kombination mit der Expression der CsLbLOX in Tabaksamen analysiert werden, um eventuell eine erhöhte Akkumulation an LOX-Produkten zu bewirken. Mit dieser funktionellen Analyse von transgenen Tabakpflanzen sollte weiter überprüft werden, ob die Aktivität von CsPAT in Gurkenkeimlingen zum partiellen Abbau der Phospholipideinfachmembran des Lipidkörpers führt und damit die CsLbLOX Zugang zu ihrem Substrat erhält.

Die Überprüfung der Expression des CsPAT bzw. der CsLbLOX in den erzeugten transgenen Tabaklinien erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Es konnte auf der Ebene der T1-Samen jedoch nur eine Linie identifiziert werden, in der beide Proteine nachweisbar waren (Abb. 13). T2-Samen dieser Linie ließen jedoch erkennen, dass die ins Tabakgenom inserierten CsPAT- und CsLbLOX-Gene in der Folgegeneration nicht stabil exprimiert wurden. Deshalb wurden T1-Pflanzen dieser Linie auf ihren Genotyp untersucht und die resultierenden T2-Samen direkt für die Untersuchung des Oxylinprofils verwendet (Anhang Tab. 9, Tab. 10). T2-Samen der CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten wiesen einen um 9 % geringeren Gehalt an freien Fettsäuren gegenüber T2-Samen des Wildtyps und der CsPAT-Einzeltransformanten auf (Abb. 17). Dies kann auf die Umsetzung freier Linolsäure durch die exprimierte CsLbLOX in den Doppeltransformanten zurückgeführt werden. Im Falle der Beteiligung des CsPAT an der Initiation dieser Umsetzung sollte in CsLbLOX-Einzeltransformanten kein geringerer Gehalt an freien Fettsäuren als im Wildtyp nachgewiesen werden. Da jedoch nur die T2-Samen einer Linie der CsLbLOX-Einzeltransformanten analysiert wurden, kann keine Aussage über die Beteiligung des CsPAT gemacht werden. Der Gehalt an veresterten Fettsäuren unterschied sich innerhalb der T2-Samen der CsPAT-Einzeltransformanten, der CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten und des Wildtyps nicht. Aufgrund der CsLbLOX-Aktivität in den Samen der Doppeltransformanten wäre aber eine Abnahme der veresterten Linolsäure zu erwarten gewesen, da die CsLbLOX neben der freien Linolsäure auch in TAGs veresterte Linolsäure als Substrat nutzt (Feussner *et al.*, 1997a; Feussner *et al.*, 1998).

Bei der Untersuchung der freien Oxyline in den T2-Samen wurden ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede in dem Gehalt an 13-HOD zwischen den CsPAT-Einzeltransformanten, den CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten und dem Wildtyp festgestellt (Abb. 18). Da in Samen das Substrat der CsLbLOX überwiegend in veresteter Form in den TAGs vorliegt und hier noch nicht von einer TGL-Aktivität ausgegangen werden kann, stimmt dieses Ergebnis mit den Erwartungen überein. Berücksichtigt man

jedoch den ermittelten geringeren Gehalt an freien Fettsäuren in den Samen der Doppeltransformanten (Abb. 17), die sich zu 75 - 80 % aus Linolsäure zusammensetzten, wäre in den Doppeltransformanten aufgrund der CsLbLOX-Aktivität ein erhöhter Gehalt an freiem 13-HOD zu erwarten gewesen. Bezüglich der veresterten Oxylipine wiesen die T2-Samen der Doppeltransformanten einen um 16 % höheren Gehalt als die Samen des Wildtyps und einem um 7 % höheren Gehalt als Samen der CsPAT-Einzeltransformanten auf (Abb. 19). Die Hauptoxylipine stellten in diesen Untersuchungen verestertes 13-HOD und verestertes 9-HOD dar, wobei der Gehalt an verestertem 13-HOD ungefähr doppelt so hoch war wie der an verestertem 9-HOD. Der erhöhte Gehalt an veresterten Oxylipinen bzw. Hydroxiden und Hydroperoxiden, insbesondere an 13-H(P)OD, in den Samen der CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten im Vergleich zum Wildtyp ist auf eine erhöhte 13-LOX-Aktivität der exprimierten CsLbLOX zurückzuführen. Da nur die Samen einer Pflanze, die die CsLbLOX alleine exprimiert, untersucht wurde, konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das CsPAT für die Zugänglichkeit des LOX-Substrates in den Lipidkörpern notwendig ist. Der Befund, dass der Gehalt an veresterten Oxylipinen in Samen der Doppeltransformanten erhöht war, wird deutlich abgeschwächt, wenn man betrachtet, dass in den Samen der CsPAT-Einzeltransformanten ebenfalls ein um 10 % erhöhter Gehalt an veresterten Oxylipinen gegenüber dem Wildtyp festgestellt worden war. Letzteres wäre nur mit einer endogenen LOX der Tabaksamen zu erklären, die durch die Aktivität des exprimierten CsPAT Zugang zu ihrem Substrat in den Lipidkörpern erhalten würde. Bisher gibt es jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung des LOX-abhängigen Abbauweges der Speicherlipide von Tabaksamen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gemeinsame Expression von CsPAT und CsLbLOX in transgenen Tabaksamen weder zu einer deutlich erhöhten Akkumulation von freien und veresterten LOX-Produkten noch zu einer signifikanten Änderung des Gehaltes an freien und veresterten Fettsäuren geführt hat. Aufgrund dieser Untersuchungen wurden keine neuen Erkenntnisse über die Beteiligung des CsPAT am LOX-abhängigen Abbau der Speicherlipide gewonnen.

Darüberhinaus wurden die Blätter transgener T1-Tabakpflanzen, die CsPAT alleine sowie in Kombination mit der CsLbLOX exprimierten, nach Verwundung auf eine veränderte Oxylipinbildung analysiert, um möglicherweise ein Mitwirken der beiden Enzyme bei der Wundreaktion aufzudecken. Die primäre Wundreaktion korreliert mit der Akkumulation des Signalmoleküls JA (Conconi *et al.*, 1996). Dabei beinhaltet der JA-Biosyntheseweg die regio- und stereospezifische Dioxygenierung von Linolensäure durch eine 13-LOX, die Bildung eines Allenoxids durch eine Allenoxidsynthase (AOS), die Reduktion durch eine

oPDA-Reduktase (OPR) und drei aufeinanderfolgende  $\beta$ -Oxidationsschritte zur Verkürzung der Seitenkette. Enzyme, die an der Biosynthese von JA beteiligt sind, wurden bereits in diversen Pflanzenarten charakterisiert (Schaller, 2001; Berger, 2002; Turner *et al.*, 2002; Halitschke und Baldwin, 2003). In Blättern von CsPAT-Einzeltransformanten war die Akkumulation von JA als primäre Wundantwort um 39 % und in Blättern von CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten sogar um 54 % geringer als im Wildtyp (Abb. 15). Im Gegensatz dazu war der Gehalt an oPDA, der direkten Vorstufe von JA während der Biosynthese, in den CsPAT-Einzeltransformanten direkt nach der Verwundung der Blätter um 79 % höher und in den CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten um 54 % höher als im Wildtyp. Desweiteren wurde eine signifikante Reduktion des 13-HOD-Gehaltes in den CsPAT-Einzeltransformanten und den CsPAT/CsLbLOX-Doppeltransformanten um 71 bzw. 74 % gegenüber dem Wildtyp direkt nach der Verwundung festgestellt (Abb. 15). Aufgrund der exprimierten CsLbLOX wurde jedoch in den Doppeltransformanten eine Erhöhung des 13-HOD-Gehaltes erwartet. Möglicherweise bewirkt die heterologe Expression von CsPAT und CsLbLOX eine Hemmung der Synthese von 13-HOD in den Tabakblättern.

In *N. tabacum* konnte bisher ein Elicitor- und Pathogen-induziertes Gen, *NtLOX1*, identifiziert werden, das für eine 9-LOX kodiert und essentiell für die Resistenz gegen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* ist (Rance *et al.*, 1998; Fammartino *et al.*, 2007). Für den Gehalt des endogenen LOX-Produktes 9-HOD konnte für die transgenen Tabakpflanzen und auch für den Wildtyp keine Änderung während der Wundreaktion gefunden werden (Abb. 15). Dahingegen zeigte der Wildtyp eine signifikante Zunahme des 9-HOT-Gehaltes bei fortschreitender Stressinduktion durch die Verwundung, welches auf die Beteiligung von 9-HOT und damit einer 9-LOX an der späten Wundantwort hinweist (Abb. 15). Da in den im Rahmen dieser Arbeit analysierten transgenen Pflanzen keine Erhöhung des 9-HOT-Gehaltes auftrat, wird durch die heterologe Expression von CsPAT und CsLbLOX die Aktivität der 9-LOX in den Tabakblättern nach Verwundung eventuell gehemmt.

Die CsPAT-Einzeltransformanten wiesen direkt nach der Verwundung und zu frühen Zeiten der Stressinduktion einen doppelt so hohen Linol- und Linolensäuregehalt in den Membranen wie der Wildtyp auf (Abb. 16). Im Gegensatz dazu war der Gehalt von freier Linol- und Linolensäure in den Doppeltransformanten nicht erhöht. Möglicherweise wurden die Linol- und Linolensäure durch die überexprimierte CsLbLOX in der Doppeltransformante direkt umgesetzt. Das dabei entstehende 13-HOD bzw. 13-HOT

wurde anschließend scheinbar sofort weiter metabolisiert, da ein erhöhter 13-HOD- bzw. 13-HOT-Gehalt in den verwundeten Blättern der Doppeltransformanten nicht festgestellt worden war (Abb. 15).

Insgesamt konnten keine gravierenden Unterschiede im Oxylipin- und Fettsäuregehalt in den transgenen Tabakpflanzen festgestellt werden, so dass auf eine Beteiligung des CsPAT und der CsLbLOX an der Wundantwort nicht geschlossen werden kann. Es scheint eher, dass die heterologe Expression der beiden Proteine eine hemmende Wirkung auf die Wundreaktion ausübte.

## 4.2 Abbau von Speicherlipiden durch TGLs

In keimenden Ölsaaten wird die Mobilisierung der Speicherlipide auf dem klassischen Wege durch TGLs initiiert, welche die TAGs an der Interphase von Lipiden und Wasser zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysieren. Über den Mechanismus und die Regulation dieser Lipolyse ist bisher wenig bekannt, außer der bedeutenden Rolle, die dieser Vorgang für das Wachstum des Keimlings spielt (Eastmond, 2006). TGL-Aktivitäten wurden auf biochemischer Ebene in verschiedenen Samen untersucht (Huang, 1993; Mukherjee, 1994). In den meisten Fällen sind die Aktivitäten nur während der Keimung detektierbar und zeigen eine Zunahme bei gleichzeitiger Abnahme des TAG-Gehaltes. Die TGL-Aktivitäten sind oft membranassoziiert und wurden je nach Pflanzenart in der Lipidkörper-, Glyoxysomen- oder mikrosomalen Fraktion von Samenextrakten gefunden (Huang, 1983; Mukherjee, 1994). TGLs wurden bereits aus Samen von Mais (Lin und Huang, 1984), Ricinus (Maeshima und Beevers, 1985; Fuchs *et al.*, 1996), Raps (Fuchs, 1994) und *Vernonia galamensis* (Ncube *et al.*, 1995) gereinigt. In der jüngsten Vergangenheit wurden die ersten Gene kloniert, die für Proteine mit TGL-Aktivität kodieren (Eastmond, 2004; Matsui *et al.*, 2004; El-Kouhen *et al.*, 2005; Padham *et al.*, 2007). In *A. thaliana* wurde desweiteren die Lipidkörper-assoziierte TGL SDP1 auf molekularer Ebene identifiziert, für die erstmalig eine physiologische Rolle in der Initiation der Speicherlipidmobilisierung während der Keimung nachgewiesen wurde (Eastmond, 2006). Die *sdp1*-Mutante ist in ihrer Fähigkeit des TAG-Abbaus sehr stark beeinträchtigt. Während der ersten 5 Tage nach Beginn der Keimung nimmt der TAG-Gehalt in dieser Mutante um weniger als 20 % ab, wohingegen in Wildtyp-Keimlingen der TAG-Gehalt in der gleichen Zeitspanne um 98 % sinkt. In der Aminosäuresequenz des SDP1-Proteins wurde eine Patatin-ähnliche

Acylhydrolasedomäne identifiziert, die in Patatin-ähnlichen Proteinen aus der Hefe *S. cerevisiae* und aus Tieren, welche TGL-Aktivität aufweisen, ebenfalls vorkommt (Eastmond, 2006). In Hefe sind die TGLs TGL3, TGL4 sowie TGL5 am Abbau der Speicherlipide beteiligt (Athenstaedt und Daum, 2003, 2005; Kurat *et al.*, 2006), während in *Drosophila melanogaster* die Brummer-Lipase und im Menschen ATGL (Desnutrin) für die Hydrolyse der Lipide notwendig sind (Zimmermann *et al.*, 2004; Gronke *et al.*, 2005). Neben der Homologie der Patatin-ähnlichen Domänen dieser TGLs besteht nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zwischen der TGL aus Hefe, der tierischen TGL und SDP1 aus Arabidopsis (Eastmond, 2006). Es scheint jedoch, dass aufgrund der Patatin-Domäne die TGLs, als zentrale Komponente des Mechanismus der Lipolyse, innerhalb der Eukaryonten evolutionär konserviert sind (Eastmond, 2006; Kurat *et al.*, 2006).

Für pflanzliche Lipasen ist charakteristisch, dass sie eine ausgeprägte Substratspezifität für bestimmte Fettsäuren aufweisen. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich dabei um die in den Speicherlipiden der Pflanzenspezies dominierende Fettsäure (Adlercreutz *et al.*, 1997). An Lipidkörpern aus Gurkenkeimlingen wurde die Aktivität einer hoch spezifischen TGL beschrieben, die selektiv oxygenierte Fettsäuren der TAGs hydrolysiert. Dieses Enzym konnte bereits gereinigt und biochemisch charakterisiert werden (Balkenhohl *et al.*, 1998; Balkenhohl, 2000). Die Aminosäuresequenz dieses Proteins ist jedoch nicht bekannt, da diese spezifische TGL nicht sequenziert werden konnte. Das in extrahierten Lipidkörperproteinen analysierte Proteinsignal mit einer Größe von 110 kDa, welches dem Molekulargewicht des gereinigten Enzyms entsprach (Balkenhohl *et al.*, 1998), konnte nur der CsLbLOX zugeordnet werden. Da die CsLbLOX mit 99,66 kDa in dem gleichen Molekulargewichtsbereich wie das untersuchte Proteinsignal liegt und auch in frühen Stadien der Keimung in großer Menge am Lipidkörper vorkommt (3.1.1; Feussner *et al.*, 1996; Höhne *et al.*, 1996), war davon auszugehen, dass die CsLbLOX in diesem Analyseansatz identifiziert wird. Die Möglichkeit, dass die spezifische TGL in dem Proteinsignal bei 110 kDa zusätzlich vorlag, wäre nach diesem Ergebnis nur dann zu erklären, wenn dieses Protein so gering konserviert ist, dass in der „non-redundant“-Datenbank kein homologes Protein gefunden werden kann. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass die spezifische TGL in dem analysierten Proteinsignal nicht erfasst wurde.

Da zu Beginn dieser Arbeit die in Arabidopsis für den Abbau der Speicherlipide während der Keimung verantwortliche TGL SDP1 noch nicht bekannt war, sollte anhand einer ungerichteten Proteomanalyse von Lipidkörperproteinen die Sequenz einer an der Mobilisierung der Speicherlipide beteiligten TGL in *A. thaliana* identifiziert werden. Das

untersuchte Proteinsignal, das mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa transient während der Keimung akkumulierte (Abb. 22), besaß nach der Sequenzierung und dem Abgleich gegen die Arabidopsis Genom-Proteinsequenz-Datenbank (NCBI) jedoch keine Peptidsequenzen, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Lipase geschlossen werden kann (Tab. 6).

Da in *sdp1*-Mutanten ein TAG-Abbau von < 20 % stattfindet, kann man annehmen, dass an dem vollständigen Abbau der Speicherlipide mindestens eine weitere TGL beteiligt ist, wie es in *S. cerevisiae* mit TGL4 und TGL5 gezeigt werden konnte (Athenstaedt und Daum, 2005; Eastmond, 2006; Kurat *et al.*, 2006). Letztere zeichnen sich durch eine unterschiedliche Substratspezifität im Vergleich zu TGL3 aus, die vorwiegend für den TAG-Abbau in Hefezellen verantwortlich ist (Athenstaedt und Daum, 2005). Vor diesem Hintergrund sollten die in *A. thaliana* mit Hilfe eines reversen genetischen Ansatzes identifizierten, mutmaßlich keimungsspezifischen TGLs AtTGL1 und AtTGL2 (Körner, 2005) auf eine Beteiligung an der Speicherlipidmobilisierung während der Keimung untersucht werden. Da die Expression von AtTGL1 und AtTGL2 in *E. coli* in verschiedenen Expressionsvektoren und Expressionsstämmen nicht stabil genug für eine weitergehende biochemische Charakterisierung war und auch die Expression in *S. cerevisiae* erfolglos blieb, wurden die beiden mutmaßlichen TGLs in dieser Arbeit in Insektenzellen exprimiert. Aus den annotierten Proteinsequenzen ergibt sich für AtTGL1 ein Molekulargewicht von 42,409 kDa und für AtTGL2 ein Molekulargewicht von 42,016 kDa. In Western-Blot-Analysen nach Expression und Reinigung der Proteine wurde AtTGL1 mit einer Größe von 45 kDa nachgewiesen, welches dem heterolog exprimierten Protein einschließlich des C-terminalen His-tags sowie V5-Epitops entsprach (Abb. 23). Dahingegen war das Signal für AtTGL2 im Western-Blot mit 49 kDa um 4 kDa größer als zu erwarten (Abb. 23). Möglicherweise liegt hier eine posttranslationale Modifizierung vor, wie z.B. eine Glykosylierung des Proteins.

Untersuchungen der TGL-Aktivität der in Insektenzellen exprimierten und affinitäts-gereinigten Proteine AtTGL1 und AtTGL2 mit radioaktiv markiertem Triolein als Substrat ergaben eine hohe Hintergrundaktivität der mitgereinigten Insektenzellproteine (Abb. 24). Viele Insektenzellproteine sind natürlicherweise reich an Histidinen, und einige weisen auch Abschnitte mit sechs Histidinen auf (Anleitung zum „pMIB/V5-HisA, B, and C Vector Kit“; Invitrogen, Karlsruhe), die für die Reinigung über Affinitätschromatographie notwendig sind. Derartige Insektenzellproteine, die zusätzlich noch bei der Kultivierung ins Medium sekretiert werden und eine lipolytische Aktivität besitzen, erklären diese hohe

Hintergrundaktivität. Für AtTGL1 und AtTGL2 konnte keine TGL-Aktivität detektiert werden, die über die Hintergrundaktivität hinausging (Abb. 24), welches auf die geringe Expressionsrate der beiden Proteine in den Insektenzellen zurückzuführen sein könnte.

Um die beiden Enzyme auf weitere lipolytische Aktivitäten zu analysieren, wurden verschiedene, radioaktiv markierte Phospholipide, DAG und Steroidester als Substrate eingesetzt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätstests zeigten jedoch weder Phospholipase- noch DAG-DAG-Acyltransferase- bzw. Steroidester-Hydrolaseaktivität (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27). Eine endgültige Aussage über die lipolytische Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 lässt sich an dieser Stelle nicht treffen, da die Expressionsrate der beiden Proteine zu gering war.

Eine Trennung des Insektenzellproteins mit lipolytischer Aktivität von den heterolog exprimierten Proteinen über Anionenaustauschchromatographie zur Detektion der mutmaßlichen TGL-Aktivität von AtTGL1 und AtTGL2 konnte nicht erreicht werden (Abb. 28, Abb. 29). Aus diesem Grund wurde auf die Hefe *Pichia pastoris* als Expressionssystem für AtTGL1 und AtTGL2 ausgewichen. Dabei konnte sowohl nach intrazellulärer als auch nach sekretorischer Expression der beiden Proteine in zwei verschiedenen *P. pastoris*-Stämmen und bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen weder das jeweilige Protein in Western-Blot-Analysen noch TGL-Aktivität detektiert werden (Abb. 30, Abb. 31). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass AtTGL1 und AtTGL2 in den *P. pastoris*-Zellen nicht exprimiert wurden und möglicherweise die heterologe Expression bzw. die Akkumulation größerer Mengen der beiden Proteine toxisch für die *P. pastoris*-Zellen ist.

Da bisher kein funktionales Expressionssystem für die beiden mutmaßlichen TGLs aus *A. thaliana* etabliert werden konnte, waren eine weiterführende biochemische Charakterisierung und die Analyse einer möglichen Beteiligung von AtTGL1 und AtTGL2 an der Speicherlipidmobilisierung während der Keimung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

## 5. Zusammenfassung

Die Keimung von Ölsaaten ist durch die Mobilisierung der in den Lipidkörpern gespeicherten TAGs als Kohlenstoffquelle charakterisiert. Neben dem klassischen Abbauweg dieser Speicherlipide, der direkt durch die Aktivität einer TGL initiiert wird, wurde in einigen Pflanzenarten ein alternativer Abbauweg gefunden, der von einer spezifischen, am Lipidkörper lokalisierten 13-LOX abhängig ist. In Gurkenkeimlingen führt die Aktivität der 13-LOX (CsLbLOX) zur Bildung von veresterten Hydroperoxiden (13-HPOD) in den Speicherlipiden, welche durch eine hochspezifische TGL hydrolysiert werden und das Substrat der glyoxysomalen  $\beta$ -Oxidation darstellen. Als Voraussetzung für die Mobilisierung der Speicherlipide scheint zudem ein teilweiser Abbau der Lipidkörpermembran notwendig zu sein. So bekommen die lipidmobilisierenden Enzyme Zugang zu ihren Substraten im Inneren des Lipidkörpers. Diesbezüglich wurden die Lipidkörper aus den Keimblättern der Gurke isoliert und die Lipidkörperproteine, Enzymaktivitäten sowie die Speicherlipide untersucht. Gleichzeitig mit dem Nachweis von LOX-Aktivität, der zugehörigen transienten Akkumulation des Proteins und der Bildung von lipidgebundenem 13-HPOD sowie mehrfach oxygenierten TAGs im Lipidkörper während der Keimung wurde die Expression der Patatin-ähnlichen PLA<sub>2</sub> CsPAT und eine transiente PLA<sub>2</sub>-Aktivität am Lipidkörper beobachtet. Desweiteren konnte CsPAT intrazellulär genauso wie die CsLbLOX an der Lipidkörpermembran lokalisiert werden. Untersuchungen der Membranphospholipide des Lipidkörpers zeigten parallel zu der detektierten PLA<sub>2</sub>-Aktivität eine Abnahme des PC-Gehaltes begleitet von der Akkumulation des Abbauproduktes LPC während der Keimung. Zusätzlich ergaben *in vitro* Analysen von isolierten Lipidkörpern reifer Samen, dass die Bildung von 13-HPOD durch die rekombinante CsLbLOX erst bei gleichzeitiger Inkubation mit rekombinantem CsPAT auftrat. Diese Experimente lassen vermuten, dass *in vivo* die Mobilisierung der Speicherlipide durch die Aktivität von CsPAT initiiert wird, welche den partiellen Abbau der Lipidkörpermembran und damit die Zugänglichkeit der LOX- bzw. TGL-Substrate ermöglicht.

Die transgene Expression von CsPAT und der CsLbLOX in Tabaksamen führte nicht zu einem frühzeitigen Abbau der Speicherlipide oder zu einer eindeutigen Akkumulation von Lipidhydroperoxiden. Eine Beteiligung an der Wundreaktion der transgenen Proteine in Tabakblättern konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Mittels Sequenzierung von Lipidkörperproteinen wurde weder für Gurken- noch für Arabidopsis-Keimlinge eine TGL-Sequenz identifiziert, welche als Kandidat für den Abbau der Speicherlipide in Frage kam. Eine ausreichende heterologe Expression der mutmaßlichen keimungsspezifischen TGL AtTGL1 und AtTGL2 aus *A. thaliana* in Insektenzellen und in *P. pastoris* sowie der Nachweis der TGL-Aktivität dieser Enzyme blieb bisher erfolglos, so dass keine Rückschlüsse auf ihre physiologische Funktion gezogen werden konnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adlercreutz P, Gitlesen T, Ncube I, Read JS** (1997) *Vernonia* lipase: A plant lipase with strong fatty acid selectivity. In B Rubin, EA Dennis, eds, Methods in Enzymology. Lipases, Part A, Vol 284. Academic Press Inc, 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495, pp 220-232
- Akiba S, Sato T** (2004) Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. Biol Pharm Bull **27**: 1174-1178
- Altaf A, Ankers TV, Kaderbhai N, Mercer EI, Kaderbhai MA** (1997) Acid lipase of castor bean lipid bodies: Isolation and characterisation. J Plant Biochem Biotechnol **6**: 13-18
- Assmann SM, Shimazaki K** (1999) The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. Plant Physiol **119**: 809-816
- Athenstaedt K, Daum G** (2003) YMR313c/TGL3 Encodes a Novel Triacylglycerol Lipase Located in Lipid Particles of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem **278**: 23317-23323
- Athenstaedt K, 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 FM, Brent RE, Kingston DD, Seidmann JR, Smith JA, Struhl K** (1993) Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates and John Wiley and Sons Inc., New York
- Balkenhohl T** (2000) Abbau von Speichertriacylglyceriden in keimenden Samen der Gurke (*Cucumis sativus*). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- Balkenhohl T, Kühn H, Wasternack C, Feussner I** (1998) A lipase specific for esterified oxygenated polyenoic fatty acids in lipid bodies of cucumber cotyledons. In J Sánchez, E Cerdá-Olmedo, E Martínez-Force, eds, Advances in Plant Lipid Research. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla, pp 320-322
- Berger S** (2002) Jasmonate-related mutants of Arabidopsis as tools for studying stress signaling. Planta **214**: 497-504

- Bevan M** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**: 8711-8721
- Bligh EG, Dyer WJ** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917
- Bradford M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brash AR** (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* **274**: 23679-23682
- Chen JCF, Tsai CCY, Tzen JTC** (1999) Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Phys* **40**: 1079-1086
- Conconi A, Miquel M, Browse JA, Ryan CA** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol* **111**: 797-803
- Deng WL, Grayburn WS, Hamilton-Kemp TR, Collins GB, Hildebrand DF** (1992) Expression of soybean-embryo lipoxygenase-2 in transgenic tobacco tissue. *Planta* **187**: 203-208
- Dhondt S, Geoffroy P, Stelmach BA, Legrand M, Heitz T** (2000) Soluble phospholipase A<sub>2</sub> activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J* **23**: 431-440
- Donaldson RP** (1976) Membrane Lipid Metabolism in Germinating Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* **57**: 510-515
- Eastmond PJ** (2004) Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. *J Biol Chem* **279**: 45540-45545
- Eastmond PJ** (2006) SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* **18**: 665-675
- El-Kouhen K, Blangy S, Ortiz E, Gardies A-M, Ferte N, Arondel V** (2005) Identification and characterization of a triacylglycerol lipase in *Arabidopsis* homologous to mammalian acid lipases. *FEBS Lett* **579**: 6067-6073

- Fammartino A, Cardinale F, Göbel C, Mene-Saffrane L, Fournier J, Feussner I, Esquerre-Tugaye M-T** (2007) Characterization of a Divinyl Ether Biosynthetic Pathway Specifically Associated with Pathogenesis in Tobacco. *Plant Physiol* **143**: 378-388
- Fernandez DE, Qu R, Huang AH, Staehelin LA** (1988) Immunogold Localization of the L3 Protein of Maize Lipid Bodies during Germination and Seedling Growth. *Plant Physiol* **86**: 270-274
- Feussner I** (1993) Vergleich pflanzlicher Lipoxygenasen unter besonderer Berücksichtigung der Biosynthese einer Lipoxygenase aus Lipidkörpern. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg
- Feussner I, Bachmann A, Höhne M, Kindl H** (1998) All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. *FEBS Lett* **431**: 433-436
- Feussner I, Balkenhohl TJ, Porzel A, Kühn H, Wasternack C** (1997a) Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons - Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J Biol Chem* **272**: 21635-21641
- Feussner I, Hause B, Nellen A, Wasternack C, Kindl H** (1996) Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. *Planta* **198**: 288-293
- Feussner I, Kindl H** (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. *FEBS Lett* **298**: 223-225
- Feussner I, Kindl H** (1994) Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes - comparison of molecular and enzymatic properties. *Planta* **194**: 22-28
- Feussner I, Kühn H** (2000) Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In UT Bornscheuer, ed, *Enzymes in Lipid Modification*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp 309-336
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C** (1997b) Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate  $\beta$ -oxidation? *FEBS Lett* **406**: 1-5
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C** (2001) The lipoxygenase dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**: 268-273

- Feussner I, Wasternack C, Kindl H, Kühn H** (1995) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11849-11853
- Fuchs C, and Hansen, G.** (1994) Partial purification and some properties of *Brassica napus* lipase. *Z Naturforsch [C]* **49**: 293-301
- Fuchs C, Vine N, Hills MJ** (1996) Purification and characterization of the acid lipase from the endosperm of castor oil seeds. *J Plant Physiol* **149**: 23-29
- Gerhardt B** (1993) Catabolism of fatty acids ( $\alpha$ - and  $\beta$ -oxidation). In J Moore, T.S., ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, London, pp 527-565
- Gerhardt B, Fischer K, Balkenhohl TJ, Pohnert G, Kühn H, Wasternack C, Feussner I** (2005) Lipoxygenase-mediated metabolism of storage lipids in germinating sunflower cotyledons and  $\beta$ -oxidation of (9Z,11E,13S)-13-hydroxy-octadeca-9,11-dienoic acid by the cotyledonary glyoxysomes. *Planta* **220**: 919-930
- Gronke S, Mildner A, Fellert S, Tennagels N, Petry S, Muller G, Jackle H, Kuhnlein RP** (2005) Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab* **1**: 323-330
- Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB** (1994) *The Lipid Handbook*, Ed 2nd edition. Chapman & Hall, London
- Gupta A, Bhatla SC** (2007) Preferential phospholipase A2 activity on the oil bodies in cotyledons during seed germination in *Helianthus annuus* L. cv. Morden. *Plant Science* **172**: 535-543
- Halitschke R, Baldwin IT** (2003) Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant J* **36**
- Hanano A, Burcklen M, Flenet M, Ivancich A, Louwagie M, Garin J, Blee E** (2006) Plant seed peroxygenase is an original heme-oxygenase with an EF-hand calcium binding motif. *J Biol Chem* **281**: 33140-33151
- Hause B, Weichert H, Höhne M, Kindl H, Feussner I** (2000) Expression of cucumber lipid body lipoxygenase in transgenic tobacco - Lipid body lipoxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies. *Planta* **210**: 708-714
- Hirschberg HJ, Simons JW, Dekker N, Egmond MR** (2001) Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur J Biochem* **268**: 5037-5044

- Höhne M, Nellen A, Schwennesen K, Kindl H** (1996) Lipid body lipoxygenase characterized by protein fragmentation, cDNA sequence and very early expression of the enzyme during germination of cucumber seeds. *Eur J Biochem* **241**: 6-11
- Holk A, Rietz S, Zahn M, Quader H, Scherer GF** (2002) Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol* **130**: 90-101
- Hornung E, Krueger C, Pernstich C, Gipmans M, Porzel A, Feussner I** (2005) Production of (10E,12Z)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lip* **1738**: 105-114
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231
- Huang AHC** (1983) Plant lipases. In B Borgstrom, H Brockman, eds, *Lipolytic Enzymes*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Huang AHC** (1987) Lipases. In PK Stumpf, ed, *The biochemistry of plants*, Vol 9. Academic Press, Orlando, pp 91-119
- Huang AHC** (1992) Oil Bodies and Oleosins in Seeds. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 177-200
- Huang AHC** (1993) Lipases. In J Moore, T.S., ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, London, pp 473-503
- Huang AHC** (1994) Structure of plant seed oil bodies. *Curr Opin Struct Biol* **4**: 493-498
- Huang AHC** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol* **110**: 1055-1061
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K** (2001) The DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A<sub>1</sub> catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2191-2209
- Kindl H** (1984) Lipid degradation in higher plants. In S Numa, ed, *Fatty Acid Metabolism and Its Regulation*. Elsevier, Amsterdam, pp 181-204
- Kindl H** (1987)  $\beta$ -Oxidation of fatty acids by specific organelles. In PK Stumpf, EE Conn, eds, *The biochemistry of plants*, Vol 9. Academic Press, London, pp 31-52
- Kindl H** (1997) The oxygen-dependent modification of triacylglycerols and phospholipids, the different way of initiating lipid body mobilization. *Z Naturforsch [C]* **52c**: 1-8

- Körner M** (2005) Isolierung und Charakterisierung von Triacylglycerid-Lipasen aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, Scholz H, Zimmermann R, Leber R, Zechner R, Kohlwein SD** (2006) Obese Yeast: Triglyceride Lipolysis Is Functionally Conserved from Mammals to Yeast. *J Biol Chem* **281**: 491-500
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-684
- Lin LJ, Tai SS, Peng CC, Tzen JT** (2002) Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies. *Plant Physiol* **128**: 1200-1211
- Lin YH, Huang AHC** (1984) Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings. *Plant Physiol* **76**: 719-722
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X** (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* **345 Pt 3**: 401-415
- Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, Lajoie G** (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**: 2337-2342
- Maeshima M, Beevers H** (1985) Purification and Properties of Glyoxysomal Lipase from Castor Bean. *Plant Physiol* **79**: 489-493
- Maggi LB, Jr., Moran JM, Scarim AL, Ford DA, Yoon JW, McHowat J, Buller RM, Corbett JA** (2002) Novel role for calcium-independent phospholipase A(2) in the macrophage antiviral response of inducible nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem* **277**: 38449-38455
- Matos AR, d'Arcy-Lameta A, Franca M, Petres S, Edelman L, Kader J, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT** (2001) A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett* **491**: 188-192.
- Matsui K, Fukutomi S, Ishii M, Kajiwara T** (2004) A tomato lipase homologous to DAD1 (LeLID1) is induced in post-germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase. *FEBS Lett* **569**: 195-200
- Matsui K, Hijiya K, Tabuchi Y, Kajiwara T** (1999) Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. *Plant Physiol* **119**: 1279-1287

- Matsui K, Kajiwara T** (1995) Cucumber cotyledon lipoxygenase oxygenizes trilinolein at the lipid/water interface. *Lipids* **30**: 733-738
- May C, Höhne M, Gnau P, Schwennesen K, Kindl H** (2000) The N-terminal  $\beta$ -barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies. *Eur J Biochem* **267**: 1100-1109
- May C, Preisig-Müller R, Höhne M, Gnau P, Kindl H** (1998) A phospholipase A<sub>2</sub> is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochim Biophys Acta* **1393**: 267-276
- Meijer HJ, Munnik T** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 265-306
- Mukherjee KD** (1994) Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Prog Lipid Res* **33**: 165-174
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Murphy DJ** (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* **40**: 325-438
- Murphy DJ, Hernández-Pinzón I, Patel K** (2001) Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. *J Plant Physiol* **158**: 471-478
- Ncube I, Gitlesen T, Adlercreutz P, Read JS, Mattiasson B** (1995) Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metabol* **1257**: 149-156
- Noll F, May C, Kindl H** (2000) Phospholipid monolayer of plant lipid bodies attacked by phospholipase A<sub>2</sub> shows 80 nm holes analyzed by atomic force microscopy. *Biophys Chem* **86**: 29-35
- Ory RL** (1969) Acid lipase of castor bean. *Lipids* **4**: 177-185
- Padham AK, Hopkins MT, Wang T-W, McNamara LM, Lo M, Richardson LGL, Smith MD, Taylor CA, Thompson JE** (2007) Characterization of a Plastid Triacylglycerol Lipase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**: 1372-1384
- Poxleitner M, Rogers SW, Lacey Samuels A, Browse J, Rogers JC** (2006) A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination. *Plant J* **47**: 917-933
- Qu R, Huang AHC** (1990) Oleosin KD 18 on the surface of oil bodies in maize. *J Biol Chem* **265**: 2238-2243

- Rance I, Fournier J, Esquerre-Tugaye MT** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6554-6559
- Rhee SG, Bae YS** (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* **272**: 15045-15048
- Rietz S, Holk A, Scherer GF** (2004) Expression of the patatin-related phospholipase A gene *AtPLA IIA* in *Arabidopsis thaliana* is up-regulated by salicylic acid, wounding, ethylene, and iron and phosphate deficiency. *Planta* **219**: 743-753
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Ed 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY
- Schaller F** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J Exp Bot* **52**: 11-23
- Shewry PR** (2003) Tuber storage proteins. *Ann Botany* **91**: 755-769
- Sowka S, Wagner S, Krebitz M, Arija-Mad-Arif S, Yusof F, Kinaciyan T, Brehler R, Scheiner O, Breiteneder H** (1998) cDNA cloning of the 43-kDa latex allergen Hev b 7 with sequence similarity to patatins and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* **255**: 213-219
- Stumpe M, Carsjens JG, Stenzel I, Gobel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B, Feussner I** (2005) Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **66**: 781-791
- Sturm A, Schwennesen K, Kindl H** (1985) Isolation of proteins assembled in lipid body membranes during fat mobilization in cucumber cotyledons. *Eur J Biochem* **150**: 461-468
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **14 Suppl**: S153-164
- Tzen JTC, Huang AHC** (1992) Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol* **117**: 327-335
- Tzen JTC, Lie GC, Huang AHC** (1992) Characterization of the charged components and their Topology on the surface of plant seed oil bodies. *J Biol Chem* **267**: 15626-15634

- Valerius O, Kleinschmidt M, Rachfall N, Schulze F, Lopez Marin S, Hoppert M, Streckfuss-Bomeke K, Fischer C, Braus GH** (2007) The Saccharomyces homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11 dependent adhesive growth and dimorphism. *Mol Cell Proteomics*
- Vance VB, Huang AHC** (1987) The major protein from lipid bodies of maize. *J Biol Chem* **262**: 11275-11279
- Vandana S, Bhatla SC** (2006) Evidence for the probable oil body association of a thiol-protease, leading to oleosin degradation in sunflower seedling cotyledons. *Plant Physiol Biochem* **44**: 714-723
- Wang S, Huang AHC** (1987) Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize kernel. *J Biol Chem* **262**: 2270-2274
- Wang W, Vignani R, Scali M, Sensi E, Tiberi P, Cresti M** (2004) Removal of lipid contaminants by organic solvents from oilseed protein extract prior to electrophoresis. *Anal Biochem* **329**: 139-141
- Wang X** (2001) Plant Phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 211-231
- Wanner G, Formanek H, Theimer RR** (1981) The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. *Planta* **151**: 109-123
- Weichert H, Kolbe A, Kraus A, Wasternack C, Feussner I** (2002) Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings - lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes. *Planta* **215**: 612-619
- Williams RL** (1999) Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim Biophys Acta* **1441**: 255-267
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R** (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**: 1383-1386

## 7. Anhang

Tab. 7 *N. tabacum*-Doppeltransformanten A92+A93

Pflanzennummer	CsLbLOX-PCR	Spaltungsverhältnis nach Kanamycinselektion von T1-Samen	Spaltungsverhältnis nach Bastaselektion von T1-Pflanzen
A92+A93/1	positiv	12,67	10
A92+A93/2	positiv	--	
A92+A93/5	positiv	--	3,3
A92+A93/7	positiv	6,5	--
A92+A93/9	positiv	--	
A92+A93/10	positiv	9,75	
A92+A93/11	positiv	7	
A92+A93/12	positiv	--	
A92+A93/13	positiv	9,5	
A92+A93/14	positiv	2,2	
A92+A93/15	positiv	20	--
A92+A93/19	positiv	3,64	--
A92+A93/20	positiv	38	
A92+A93/21	positiv	40	
A92+A93/22	positiv	9,5	
A92+A93/23	positiv	13	
A92+A93/26	positiv	4,75	4
A92+A93/27	positiv	38	
A92+A93/28	positiv	7,8	
A92+A93/29	positiv	6,5	6,67
A92+A93/30	positiv	9,5	
A92+A93/31	positiv	9,25	
A92+A93/32	positiv	10	
A92+A93/33	positiv	3,33	--
A92+A93/35	positiv	--	
A92+A93/40	positiv	40	
A92+A93/48	positiv	39	
A92+A93/54	positiv	--	
A92+A93/57	positiv	3,33	--
A92+A93/60	positiv	--	
A92+A93/64	positiv	5,6	--
A92+A93/72	positiv	6,33	5
A92+A93/73	positiv	4,75	--
A92+A93/75	positiv	--	
A92+A93/83	positiv	9,75	
A92+A93/86	positiv	3,6	6,67
A92+A93/93	positiv	4	--
A92+A93/94	positiv	4,44	--

--: keine Aufspaltung nach Selektion, entweder waren alle Samen/Pflanzen einer Linie resistent oder sie waren alle nicht resistent

Tab. 8 *N. tabacum*-Transformanten A93

Pflanzen- nummer	Bastaresistenz T0-Pflanzen	CsPAT- PCR	Spaltungsverhältnis nach Bastaselektion von T1-Pflanzen
A93/1	positiv	positiv	2,5
A93/2	negativ		
A93/3	negativ		
A93/4	positiv	positiv	3,6
A93/5	positiv	positiv	--
A93/6	positiv	positiv	4
A93/7	positiv	positiv	--
A93/8	negativ		
A93/9	positiv	positiv	4
A93/10	positiv	positiv	10
A93/11	positiv	positiv	5
A93/12	negativ		
A93/13	positiv	positiv	13,3
A93/14	negativ		
A93/15	positiv	negativ	
A93/16	negativ		
A93/17	positiv	ng	4
A93/18	positiv	ng	--
A93/19	negativ		
A93/20	negativ		
A93/21	negativ		
A93/22	positiv	ng	4,4
A93/23	positiv	ng	1,8
A93/24	positiv	ng	3,6
A93/25	positiv	ng	6,7
A93/26	positiv	ng	6,7
A93/27	positiv	ng	--
A93/28	positiv	ng	2,7
A93/29	positiv	ng	--
A93/30	positiv	ng	1,2
A93/31	positiv	ng	5
A93/32	positiv	ng	--
A93/33	negativ		
A93/34	positiv	ng	3,1
A93/35	positiv	ng	4,4
A93/36	positiv	ng	3,1
A93/37	positiv	ng	3,6

ng: nicht getestet

--: keine Aufspaltung nach Selektion, entweder waren alle Samen/Pflanzen einer Linie resistent oder sie waren alle nicht resistent

Tab. 9 PCR-Analyse genomischer DNA aus T1-Tabakpflanzen

Pflanzennummer	CsLbLOX-PCR	CsPAT-PCR
A92+A93/26/10	negativ	positiv
A92+A93/26/11	positiv	positiv
A92+A93/26/12	positiv	positiv
A92+A93/26/13	positiv	positiv
A92+A93/26/14	positiv	positiv
A92+A93/26/15	positiv	positiv
A92+A93/26/16	positiv	positiv
A92+A93/26/17	negativ	positiv
A92+A93/26/18	negativ	positiv
A92+A93/26/19	negativ	positiv
A92+A93/26/20	positiv	positiv
A92+A93/26/21	negativ	negativ
A92+A93/26/22	negativ	positiv
A92+A93/26/23	negativ	positiv
A92+A93/26/24	positiv	positiv
A92+A93/26/25	negativ	negativ
A92+A93/26/26	negativ	positiv
A92+A93/26/27	negativ	positiv
A92+A93/26/28	negativ	positiv
A92+A93/26/29	negativ	positiv
A92+A93/26/30	positiv	positiv
A92+A93/26/31	negativ	positiv
A92+A93/26/32	negativ	negativ
A92+A93/26/33	negativ	positiv
A92+A93/26/34	negativ	negativ
A92+A93/26/35	positiv	positiv
A92+A93/26/36	negativ	positiv
A92+A93/26/37	positiv	positiv
A92+A93/26/38	positiv	positiv
A92+A93/26/39	positiv	positiv
A92+A93/26/40	positiv	negativ
A92+A93/26/41	negativ	positiv
A92+A93/26/42	positiv	positiv
A92+A93/26/43	positiv	positiv
A92+A93/26/44	positiv	positiv
A92+A93/26/45	positiv	positiv
A92+A93/26/46	negativ	positiv
A92+A93/26/47	positiv	positiv
A92+A93/26/48	negativ	negativ
A92+A93/26/49	positiv	positiv
A92+A93/26/50	negativ	negativ
A92+A93/26/51	positiv	positiv
A92+A93/26/52	negativ	negativ
A92+A93/26/53	negativ	positiv
A92+A93/26/54	negativ	positiv
A92+A93/26/55	negativ	positiv
A92+A93/26/56	negativ	positiv
A92+A93/26/57	negativ	positiv
A92+A93/26/58	positiv	positiv
A92+A93/26/59	negativ	negativ
A92+A93/26/60	negativ	negativ
A92+A93/26/61	negativ	negativ
A92+A93/26/62	negativ	negativ

**Tab. 10 Genotyp der mittels PCR analysierten T1-Tabakpflanzen**

CsPAT	CsPAT+CsLbLOX	CsLbLOX	SNN
A92+A93/26/10	A92+A93/26/11	A92+A93/26/40	A92+A93/26/21
A92+A93/26/17	A92+A93/26/12		A92+A93/26/25
A92+A93/26/18	A92+A93/26/13		A92+A93/26/32
A92+A93/26/19	A92+A93/26/14		A92+A93/26/34
A92+A93/26/22	A92+A93/26/15		A92+A93/26/48
A92+A93/26/23	A92+A93/26/16		A92+A93/26/50
A92+A93/26/26	A92+A93/26/20		A92+A93/26/52
A92+A93/26/27	A92+A93/26/24		A92+A93/26/59
A92+A93/26/28	A92+A93/26/30		A92+A93/26/60
A92+A93/26/29	A92+A93/26/35		A92+A93/26/61
A92+A93/26/31	A92+A93/26/37		A92+A93/26/62
A92+A93/26/33	A92+A93/26/38		
A92+A93/26/36	A92+A93/26/39		
A92+A93/26/41	A92+A93/26/42		
A92+A93/26/46	A92+A93/26/43		
A92+A93/26/53	A92+A93/26/44		
A92+A93/26/54	A92+A93/26/45		
A92+A93/26/55	A92+A93/26/47		
A92+A93/26/56	A92+A93/26/49		
A92+A93/26/57	A92+A93/26/51		
	A92+A93/26/58		

Die markierten T1-Tabakpflanzen wurden bis zum T2-Samen angezogen und für weitere Untersuchungen verwendet.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner für die Überlassung und Betreuung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und Motivationskraft.

Bei Prof. Dr. Oliver Einsle möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Michael Melzer danke ich für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie Armin Schlereth für die Analysen der *in vitro* Proteininteraktion. Bei Oliver Valerius bedanke ich mich für die Sequenzierung der Lipidkörperproteine.

Cornelia Göbel möchte ich für ihre Hilfe bei allen GC- und HPLC-Fragen sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Mein Dank gilt Ellen Hornung für ihre Unterstützung in den molekularbiologischen Angelegenheiten und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Xuan Wang danke ich für die Etablierung der Insektenzellkulturen und Kirstin Feußner für ihren Einsatz bei den LC/MS-Analysen.

Ingo Heilmann und Martin Fulda möchte ich danken, dass sie jederzeit ansprechbar und diskussionsbereit waren.

Martin Wagner danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei allen Angelegenheiten rund um die DC und Computerfragen.

Bei der AG Fulda, insbesondere bei Annett, Danuta und Michael, möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag und die lustigen Zeiten bedanken. Eva danke ich für ihre Mitarbeit als Hiwi und die netten Gespräche.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Biochemie der Pflanze für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken, speziell danke ich Kristle, Imke und Mareike für die vielen aufheiternden und interessanten Gespräche.

Am meisten möchte ich mich bei meinen Eltern, Fritz und dem Rest meiner Familie bedanken, die mich immer wieder zu meinem Studium und dieser Arbeit ermutigt haben.

Tinki, Mathias und Birgit danke ich aus tiefstem Herzen, dass sie immer für mich da waren. Ganz besonders danke ich meinem Mann Alex für seine unendliche Geduld und Unterstützung.

## Lebenslauf

### Maike Rudolph

- 30.12.1971 geboren in Hamburg
- 1978 – 1982 Grundschule in Lauenburg/Elbe
- 1982 – 1994 Otto-Hahn-Gymnasium in Geesthacht
- 1994 – 2002 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
- 11/2000 Diplomprüfungen (Hauptfach: Mikrobiologie; Nebenfächer: Chemie, Zoologie)
- 2001 – 2002 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Analyse des Biotinbiosyntheseweges in *Sinorhizobium meliloti*“ am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. W. Liebl
- 2003 wissenschaftliche Hilfsmitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen
- 10/2003 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation mit dem Thema: „Mobilisierung von Speicherlipiden in *Cucumis sativus*- und *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen“ am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. I. Feußner