

Identifizierung und erste Charakterisierung einer neuen Triacylglyceridlipase-Familie aus *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Martina Körner

geb.: 31.08.1975 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. C. Wasternack
2. Prof. Dr. U. Bornscheuer

Halle (Saale), den 09. 11.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009530

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009530>]

Die Natur ist unerbittlich und unveränderlich und es ist ihr gleichgültig, ob die verborgenen Gründe und Arten ihres Handelns dem Menschen verständlich sind oder nicht

Galileo Galilei, (1564-1642)

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arabidopsis</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C-Terminus	Carboxy-Terminus
°C	Grad (Celsius)
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HPLC	Hochleistungs- Flüssigchromatographie
13-H(P)ODE	(13S,9Z,11E)-13-Hydro(pero)xy-9,11-oktadecadiensäure
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mRNA	<i>messenger</i> - Ribonukleinsäure
N ₂	Stickstoff
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte bezogen auf 1 cm Küvettenbreite
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Picomol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	interference-Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglycerin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität [µmol/min]
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
EINLEITUNG	6
1 Triacylglyceridlipasen	7
2 Isolierung und Charakterisierung von TGLs	7
3 Substratspezifität von TGLs.....	9
4 Physiologische Bedeutung der TGL beim TAG-Katabolismus	10
5 Physiologische Bedeutung der TGL bei der TAG-Synthese.....	12
6 Aufgabenstellung dieser Arbeit.....	14
MATERIAL UND METHODEN	15
1 Chemikalien	15
2 Molekularbiologische Reagenzien	15
3 Pflanzen.....	15
3.1 Pflanzenmedien	16
3.2 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
3.3 Kultivierung von <i>Cucumis sativus</i>	18
3.4 Pflanzentransformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
3.5 Transiente Pflanzentransformation.....	18
4 Bakterien.....	19
4.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	19
4.2 Hefen	21
4.3 Klonierungsvektoren	22
4.4 Oligonukleotide	23
4.5 Nukleinsäureanalysen	23
4.6 Proteinanalysen	29
4.7 Analyse der enzymatischen Aktivität der Lipase	31
4.8 Fettsäureanalyse in Samen und Keimlingen	34
ERGEBNISSE	35
1 Identifizierung von putativen TGL aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
1.1 Analyse der Expressionsmuster von 33 TGL-Kandidaten	36
2 Identifizierung einer neuen putativen TGL-Familie	38
2.1 Die spezifische Expression der AtTGL–Familie.....	43
3 Enzymatische Aktivität der TGL-Kandidaten	47
3.1 Expression von <i>AtTGL 1</i> und <i>2</i> in <i>E. coli</i>	47
3.2 Expression von <i>AtTGL 1</i> und <i>2</i> in <i>S. cerevisiae</i>	51
3.3 Analyse der intrazellulären Lokalisation von <i>AtTGL 1</i>	52
4 Charakterisierung der <i>AtTGL 1 antisense</i> Pflanzen	54

4.1	Expressionsstärke der <i>AtTGL 1</i> und 2 in den <i>AtTGL 1 antisense</i> Pflanzen	54
4.2	Expressionsstärke von <i>AtTGL 3 - 9</i> in den <i>AtTGL 1 antisense</i> -Pflanzen	55
4.3	Keimung der <i>AtTGL 1 antisense</i> -Pflanzen	57
4.4	Saatgut und Schotenbildung der <i>AtTGL 1 antisense</i> -Pflanzen	65
4.5	Einfluss der <i>AtTGL 1</i> und 2 auf die Fettsäurezusammensetzung in den Samen	67
4.6	Partielle Charakterisierung von <i>AtTGL 1</i> – Deletionsmutanten	69
DISKUSSION		72
ZUSAMMENFASSUNG.....		83
LITERATURVERZEICHNIS		84
ANHANG		89

Einleitung

Triacylglycerine (TAGs) stellen mengenmäßig die größte Gruppe innerhalb der Lipide dar und sind die Hauptkomponente des Depot- oder Speicherfettes in pflanzlichen bzw. tierischen Zellen (Gunstone, Harwood et al. 1994). Darüber hinaus unterscheiden TAGs sich nach Art und Position der drei am Glyceringerüst veresterten Fettsäuren (vergl. Abb. 1A). Eine zentrale Rolle bei der Hydrolyse von Speicherfetten kommt hierbei der Enzymfamilie der Lipasen zu. Sie werden grundsätzlich in drei Gruppen unterteilt:

1. Die Triacylglycerin-Lipasen (TGL) oder „echte“ Lipasen (E.C. 3.1.1.3) katalysieren die Hydrolyse der Esterbindungen von TAGs. Bei Pflanzen kommen diese Enzyme insbesondere im Samen von Ölsaaten und in Getreidekörnern vor (Huang 1987).

2. Die unspezifischen Lipidacylhydrolasen oder Hydrolasen. Zu ihnen zählen die Phospholipase A1 (EC 3.1.1.32), A2 (EC 3.1.1.4) und B (EC 3.1.1.5) (Abb. 1B) sowie Glycolipasen, Sulfolipasen und Monoacylglyceridlipasen, die in den verschiedensten pflanzlichen Geweben nachgewiesen wurden (Wang 1993).

3. Zur Gruppe der Phosphorylasen gehören die Phospholipase C (EC 3.1.4.3) und die Phospholipase D (EC 3.1.4.4) (Abb. 1B), die in Pflanzen ebenfalls allgemein verbreitet sind (Wang 1993).

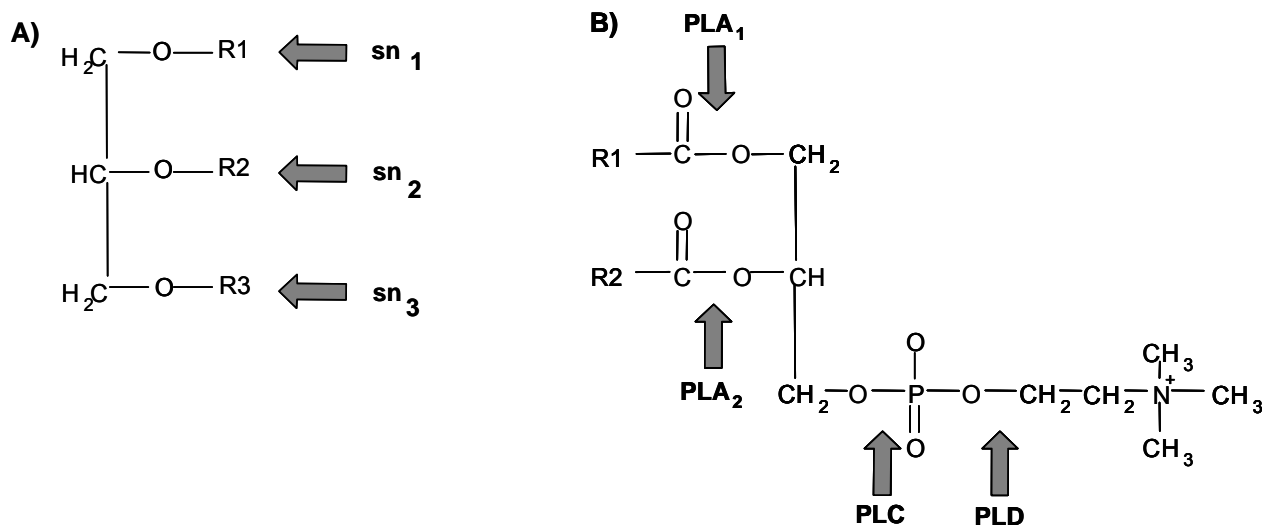


Abb. 1. A: Die verschiedenen Positionen von Fettsäureresten am Glyceringerüst. B: Positionsspezifität von Phospholipasen.

1 Triacylglyceridlipasen

TGLs katalysieren die Hydrolyse von TAGs zu Glycerin und freien Fettsäuren unter dem Verbrauch von stöchiometrischen Mengen an Wasser. In Pflanzen findet man diese Enzyme insbesondere in den fettspeichernden Organen, wie Samen, Pollen und in einigen Fällen auch in den Wurzeln oder den Blättern. Bisher wurden überwiegend die TGLs der Samen näher untersucht, da nur sie in ausreichenden Mengen für eine biochemische Analyse zugänglich sind (Huang 1993).

Während der Keimung initiieren TGLs die Spaltung und damit die Mobilisierung der in den Lipidkörpern fettreicher Samen gespeicherten TAGs. Je nach Pflanzenspezies kann die entsprechende TGL direkt am Lipidkörper, dem Speicherorganell der TAGs (Huang), oder in anderen Kompartimenten, wie den Glyoxysomen oder dem Cytosol, lokalisiert sein (Huang 1993).

Bis auf die saure TGL aus Ricinussamen (Ory, Yatsu et al. 1968; Altaf, Ankers et al. 1997; Eastmond) ist allen TGLs gemeinsam, dass sie ihre Aktivität in ruhenden Samen noch nicht nachweisbar ist, sondern erst während der Keimung. Unterschiede findet man jedoch in ihrem Molekulargewicht, der Substratspezifität, dem pH-Optimum, der Hydrophobizität des Moleküls, der Reaktivität gegenüber Sulfhydrylgruppen und in der subzellulären Verteilung der Enzyme (Huang 1993).

2 Isolierung und Charakterisierung von TGLs

Die meisten TGLs, die in Samen verschiedener Ölsaaten nachgewiesen werden konnten, waren an der Membran des Lipidkörpers lokalisiert. Hierbei kann 50 bis 80 % der gesamten Lipaseaktivität eines Samenextraktes mit dem Lipidkörper assoziiert sein (Huang 1993). Trotzdem ist die Proteinmenge der Lipasen an diesem Organell vergleichsweise gering, da an seiner Membran Strukturproteine, die so genannten Oleosine, dominieren (Huang).

Hingegen bei Samen aus Raps hat man in den Kotyledonen den größten Teil der Lipaseaktivität assoziiert mit den leichten Membranen oder an Lipidvesikeln gefunden (Theimer and Rosnitschek; Hills and Beevers). Nur ein geringer Teil der Lipaseaktivität ist am Lipidkörper nachweisbar und beide Membranen enthalten außerdem unterschiedliche Lipaseaktivitäten (Hills and Beevers; Hoppe and Theimer). Die TGL aus Rapssamen ist bereits durch verschiedene Gruppen auf verschiedene Wegen gereinigt und charakterisiert worden (Hills and Mukherjee 1990); (Weselake and Taylor 1999); (Hoppe and Theimer 1997); (Hoppe and Theimer 1997); (Hoppe and Theimer 1997). In allen Arbeiten wird ein Molekulargewicht von 250 bzw. 300 kDa und ein pH-Optimum von pH 7,5 genannt. Außerdem zeigte sich, dass sie zwar alle Fettsäuren des Glyceringerüsts hydrolysiert, aber die Fettsäuren in *sn-1* oder *sn-3* Position

zuerst abspaltet (Hills and Mukherjee 1990). Die Hydrolyseaktivität der Rapslipase gegenüber den beiden häufigsten Fettsäuren des Rapsöls, Palmitinsäure bzw. Ölsäure, in TAGs ist identisch und nicht von der Position der Fettsäuren am Glyceringerüst abhängig. Fettsäuren mit *cis-6* oder *cis-4* Doppelbindung als erster Doppelbindung nach der Carboxylgruppe werden jedoch eindeutig bevorzugt (Hills, Kiewitt et al. 1990).

In den Samen von *Ricinus communis* sind drei TGLs nachweisbar (Huang 1987). Zwei dieser Lipasen sind am Lipidkörper assoziiert und haben ein saures bzw. ein neutrales pH-Optimum. Die dritte TGL ist glyoxysomal und weist ein basisches pH-Optimum auf (Huang 1987). Die saure Lipase besitzt ein pH-Optimum von pH 4,5 und lässt sich schon im ruhenden Samen nachweisen [(Ory, Yatsu et al. 1968); (Altaf, Ankers et al. 1997); (Eastmond 2004)]. Sie hat ein Molekulargewicht von 60 kDa und hydrolysiert die verschiedensten Mono- als auch Di- und Triacylglycerine gleichermaßen gut, während sie keine Aktivität gegenüber Phospholipiden zeigt (Eastmond 2004). Die Zugabe von Fettsäureisopropylestern zeigte dabei, dass die saure TGL ebenfalls Fettsäuren von der *sn-2*-Position des Glyceringerüsts abspaltet (Ory 1969). Bereits im frühen Stadium der Keimung nimmt die Aktivität dieser Lipase ab, und die neutrale durch Kalziumionen stimulierbare Lipase wird nachweisbar (Hills and Beevers 1987). Es wird angenommen, dass diese TGL für die Hydrolyse der Speicherlipide verantwortlich ist (Hills and Beevers 1987; Hills, Murphy et al. 1989). Von der alkalischen, glyoxysomalen Lipase ist neben einer hohen Substratspezifität gegenüber Rizinolsäure eine bevorzugte Hydrolyseaktivität gegenüber Monoacylglyceriden bekannt. Darüber hinaus besitzt diese TGL ein Molekulargewicht von 62 kDa (Maeshima, Takeuchi et al. 1987).

Auch im Scutellum des Keimlings von *Zea mays* wurde eine an den Lipidkörper gebundene TGL nachgewiesen (Lin and Huang 1984). Bei diesem Enzym handelt es sich um ein sehr hydrophobes Protein, das fest mit der Membran der Lipidkörper assoziiert ist. Hier ist ein Polypeptid einer Größe von 62 kDa isoliert worden, obgleich das native Protein in Detergenz gelöst als ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von 270 kDa vorliegt. Diese TGL hat ein neutrales pH-Optimum und spaltet am Glyceringerüst sowohl in *sn-1* als auch in *sn-2* Position (Lin, Yu et al. 1986). In ungekeimten Samen lässt sich dieses Enzym nicht nachweisen. Während der Keimung wird es darum vermutlich neu gebildet und initiiert so den Abbau der Speicherlipide (Huang 1993).

Eine Besonderheit stellen zwei aus *Oryza sativa* isolierte TGLs dar (Funatsu, Aizono et al. 1971; Aizono, Funatsu et al. 1976). Bei ihnen handelt es sich um lösliche Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht. Die Reislipase I hat eine Größe von 40 kDa und ein pH-Optimum von pH 7,5 (Funatsu, Aizono et al. 1971). Sie wird durch Kalziumionen aktiviert und spaltet Fettsäuren bevorzugt von *sn-1* bzw. *sn-3* aus dem TAG. Reislipase II hat ein Molekulargewicht von 32 kDa und ebenfalls ein pH-Optimum von pH 7,5. Der isoelektrische Punkt dieses Enzyms liegt bei 9,1 (Aizono, Funatsu et al. 1976).

Samen von *Vernonia galamensis* enthalten eine TGL mit maximaler Aktivität bei pH 8,0 - 9,0, wobei der Hauptanteil der Lipaseaktivität in der löslichen Fraktion lokalisiert ist (Ncube,

Gitlesen et al. 1995). Diese Lipase besitzt ebenfalls ein ungewöhnliches Molekulargewicht von 116 kDa (Adlercreutz, Gitlesen et al. 1997). Aus Erdnüssen schließlich wurde eine lösliche, 55 kDa große TGL isoliert, die in reifenden Samen häufiger vorkommt als in keimenden Samen (Sanders and Pattee 1975). Außerdem wurden lipidkörper-assoziierte Lipasen in *Elaeis guineensis* (Oo and Stumpf 1983), in Kiefersamen (Hammer and Murphy 1993; Hammer and Murphy 1994) sowie in Buchweizensamen (Suzuki, Honda et al. 2004) nachgewiesen.

Die Charakterisierungen der hier vorgestellten pflanzlichen TGLs basieren fast ausschließlich auf Experimenten mit dem gereinigten Enzym. Trotz vielfältiger Versuche cDNAs für keimungsspezifische TGLs aus den unterschiedlichsten Samen zu isolieren, gelang dies bisher nur aus einem gereinigten Protein. Dabei handelte es sich um die saure TGL aus Ricinus, von der mittels Immunodetektion festgestellt werden konnte, dass sie sich im Endosperm befindet, wo sie an den Lipidkörpern sitzt (Eastmond, 2004). Obwohl die saure Lipase am pH-Optimum von 4,5 eine ungewöhnlich hohe Aktivität zeigt, ist sie in physiologischen (neutralen) pH-Bereich nahezu inaktiv. Auch die Tatsache, dass ihre mRNA zu Beginn der Keimung bereit stark herunterreguliert wird, indiziert, dass sie nicht für den keimungsspezifischen Speicherlipidmetabolismus verantwortlich ist.

Eine weitere pflanzliche TGL konnte aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) isoliert und charakterisiert werden (Matsui, Fukutomi et al. 2004). Sie wurde auf Basis ihrer Genhomologie zu AtDAD 1, einer Phospholipase A1 aus Arabidopsis, isoliert und zeigt hydrolytische Aktivität gegenüber TAGs in frühen Stadien der Keimlingsentwicklung. Da es sich hier aber um ein lösliches Enzym handelte, dass nicht am Lipidkörper lokalisiert war, konnte auch in diesem Fall nicht eindeutig gezeigt werden, dass es sich hier um die TGL handelte, die für den keimungsspezifischen TAG-Abbau von Bedeutung ist.

3 Substratspezifität von TGLs

Für TGLs aus pflanzlichen Samen ist bekannt, dass sie eine hohe Selektivität für bestimmte Fettsäuren besitzen. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um die in den eigenen TAGs dominierende Fettsäure (Adlercreutz, Gitlesen et al. 1997). Neben TAGs können TGLs aber auch verschieden Diacylglycerine (DAG) und Monoacylglycerine (MAG) hydrolysieren (Adlercreutz, Gitlesen et al. 1997). Zum Beispiel hydrolysiert die Lipase aus *Zea mays* bevorzugt TAGs, die Linolsäure und Ölsäure enthalten, da diese den Hauptbestandteil des Maisöls ausmachen (Lin and Huang 1983). Raps- und Senfsamen, die zur Familie der Cruciferen gehören, besitzen in den Speicherfetten ihrer Wildformen einen hohen Gehalt an Erucasäure (Gunstone, Harwood et al. 1994). Daher weisen ihre TGLs eine hohe Spezifität für Trierucin auf (Lin, Yu et al. 1986). Auch von der aus *Vernonia galamensis* isolierten TGL ist eine solche Substratspezifität bekannt. Sie hydrolysiert vorrangig Trivernoelin, das TAG der

Vernolsäure ((9Z)-12,13-Epoxy-9-octadecaensäure). Es macht etwa 60 % aller Fettsäurereste der TAGs in den Samen von *Vernonia* aus (Ncube, Gitlesen et al. 1995). Samen der Ulme (Lin, Yu et al. 1986) und Palme (Oo and Stumpf 1983) besitzen große Mengen an Caprylsäure in ihren Speicherlipiden. Die in diesen Samen nachweisbaren TGLs zeigen eine hohe Aktivität gegenüber Tricaprin im Vergleich zu Trilaurin, Tripalmitin oder Trilinolein. Diese Fettsäurespezifität konnte auch mit DAGs und MAGs bestätigt werden, obgleich parallel die Spezifität abnimmt (Lin, Yu et al. 1986). Die Abnahme der Substratspezifität im Falle der TGL von TAGs über DAGs bis hin zu MAGs könnte insofern physiologische Bedeutung haben, als dass die TAGs einer Spezies meist nicht nur die pflanzenspezifische „Hauptfettsäure“ sondern vielmehr verschiedene Fettsäuren in einem Molekül enthalten (Mukherjee 1995). Dies bedeutet, dass erst nach der vollständigen Hydrolyse der pflanzenspezifischen „Hauptfettsäure“ die TGL auch die anderen Fettsäuren abzuspalten vermag. Die lipidkörper-assoziierte TGL aus *Cucumis sativus* schließlich ist hoch spezifisch für veresterte (13S,9Z,11E)-13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure (13-HODE) und konnte erst durch Zugabe dieses Substrates nachgewiesen werden (Balkenhohl, Kühn et al. 1998).

4 Physiologische Bedeutung der TGL beim TAG-Katabolismus

TAGs dienen in fettreichen Samen als Speicherlipide, die in den Lipidkörpern gelagert werden. Diese Lipidkörper, die auch als Oleosomen bezeichnet werden, entstehen während der Samenreifung am endoplasmatischen Retikulum (Wanner, Formanek et al. 1981); (Huang 1992); (Murphy 2001). Sie sind sphärische Organellen von 1 - 2 μm Durchmesser (Huang 1994) und bestehen aus einer TAG-Matrix, die von einem Phospholipidmonolayer umgeben ist. In dieser Membran sind verschiedene charakteristische Proteine nachweisbar, die sowohl strukturelle als auch enzymatische Funktion haben können (Kindl 1987). Die dominierenden Proteine dieses Organells sind Strukturproteine, die Oleosine (Huang 1997). Diese hydrophoben, alkalischen Proteine ($\text{pI} > 6,2$) mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 26 kDa bedecken die gesamte Oberfläche des Lipidkörpers und besitzen hauptsächlich strukturelle Funktion. Sie können bis zu 8 % (w/w) des Gesamtproteins im Samen ausmachen (Huang 1994); (Murphy, Hernández-Pinzón et al. 2001). Darüber hinaus sind andere Proteine nur transient an diesem Organell zu finden, etwa im Stadium der Samenreifung oder im Verlauf der Keimung (Kindl 1987).

Bei der Keimung fettreicher Samen ist die Mobilisierung der Speicherlipide von zentraler Bedeutung, da sie im Anfangsstadium der Keimung meist die alleinige Kohlenstoffquelle darstellen (Kindl 1987). Für den Abbau der Speicherlipide ist eine TGL verantwortlich, die an der Membran der Lipidkörper lokalisiert ist und zu Beginn der Keimung *de novo* synthetisiert wird. Sie initiiert durch die Hydrolyse der TAGs und die damit einher gehende Freisetzung der

Fettsäuren den Abbau der Reservelipide (Huang 1993). Die freien Fettsäuren werden von der CoA-Synthetase aktiviert und werden anschließend in der β -Oxidation zur Generierung von Acetyl-CoA verwendet (Abb. 2, linke Seite), welches im Keimling über den Glyoxylatzyklus für die Guconeogenese benötigt (Kindl 1984). Molekulare Analysen von Mutanten der Ölsaart und Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zeigten diesbezüglich, dass eine intakte β -Oxidation essentiell für den Keimling ist (Hayashi, Toriyama et al. 1998), der Ausfall des Glyoxylatzyklus vom Keimling kann jedoch kompensiert werden (Eastmond, Germain et al. 2000).

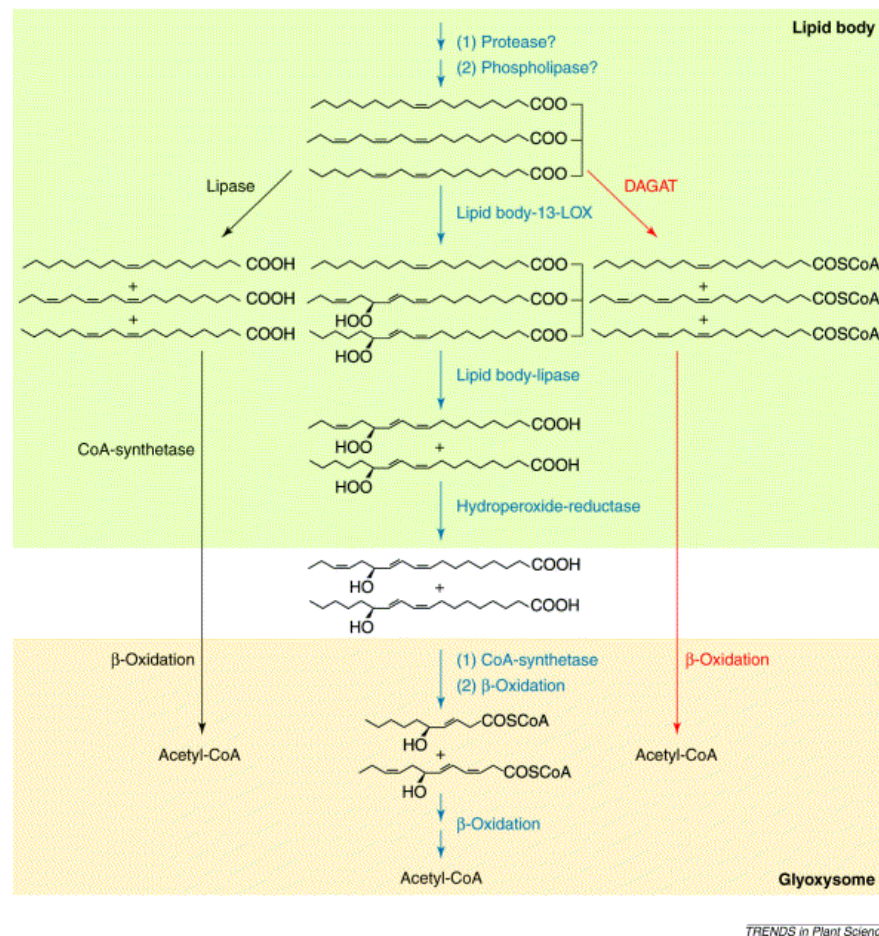


Abb. 2: Schematischer Vergleich der alternativen Wege des Abbaus von Reservelipiden in Pflanzen (Feussner, Kühn et al. 2001)

Parallel dazu existiert eine alternative Theorie der Speicherlipidmobilisierung, die auf der Tatsache fußt, dass während der Keimung in Gurken-, Anis-, Sonnenblumen- und Sojakeimlingen das Vorkommen einer spezifischen membranständigen Lipoxygenase (LOX) nachgewiesen wurde (Feussner, Kühn et al. 1997). Sie besitzt ein ungewöhnlich basisches pH-Optimum und außerdem ist sie in der Lage veresterte Linol(en)säurereste direkt zu oxidieren (Feussner, Wasternack et al. 1995). Basierend auf dem Vorhandensein dieser lipidkörper-assoziierten LOX sowie der Tatsache, dass während der Keimung große Mengen an LOX-

Produkten in den Lipidkörpern gebildet werden und isolierte Lipidkörper auch nur lipoxygenierte Fettsäuren in das Medium abgeben (Feussner, Wasternack et al. 1995), wurde ein neues Modell für die Mobilisierung der Speicherlipide in Pflanzen vorgeschlagen (Kindl 1987; Feussner, Kühn et al. 1997; Feussner, Kühn et al. 2001). Es geht davon aus, dass der Abbau der Reservelipide von einer LOX initiiert wird und nicht von einer TGL (Abb. 2, Mitte). So oxidiert diese LOX die veresterten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren zunächst spezifisch zu TAGs, die 13-HPODE enthalten (Feussner, Balkenhohl et al. 1997). Im weiteren Verlauf werden nur diese veresterten Hydroperoxyfettsäuren durch eine für diese Modifikation hoch spezifische TGL vom Glyceringerüst abgespalten. Anschließend werden die toxischen Hydroperoxyfettsäuren durch eine noch unbekannte Reduktase zu Hydroxyfettsäuren reduziert (Feussner, Blée et al. 1998). Die freie 13-HODE stellt dann das eigentliche endogene Substrat des Keimlings für die β -Oxidation dar und wird wie oben beschrieben zu Acetyl-CoA abgebaut. Von zentraler Bedeutung für dieses Modell ist die beschriebene für oxygenierte Fettsäuren hoch spezifische TGL. Ihr Vorkommen konnte inzwischen neben Gurke in weiteren Pflanzenkeimlingen, wie Kürbis, Flachs, Raps, Ringelblume, Ricinus und Sonnenblume nachgewiesen werden (Balkenhohl, Kühn et al. 1998). Dieser Abbauweg konnte aber nicht in Brassicaceen nachgewiesen werden.

5 Physiologische Bedeutung der TGL bei der TAG-Synthese

Speicherlipide speziell TAGs werden in Ölsaaten während der Entwicklung des Embryos synthetisiert und während der Keimung und frühen Keimlingsentwicklung abgebaut, um über verschiedene Prozesse wie die β -Oxidation, den Glyoxylatzyklus, den Tricarbonsäurezyklus sowie die Gluconeogenese als Kohlenstoffquelle zu dienen (Eastmond and Graham, 2001). Während die Zusammenhänge zwischen diesen metabolischen Prozessen, der Embryonen- und der Keimlingsentwicklung verstanden werden, zeigen die Daten verschiedener Studien, dass der Lipidgehalt auch während der Samenreifung verschiedener Ölsaaten wie *B. napus*, *A. thaliana*, *C. abyssinica* und *N. tabacum* abnimmt (McKillikan, 1966); (Gurr et al., 1972); (Norton and Harris, 1975); (Murphy and Cumminis, 1989); (Baud et al. 2002); (Tomlinson et al., 2004).

Die Abnahme des Ölgehaltes im Samen war ebenfalls während der Samenreifung in Leinsamen (*Linum usitatissimum*) zu beobachten [Troufflard, Portais and Rawsthorne, unveröffentlicht] Passend zu den Beobachtungen, des Lipidabbaus während der Samenreifung, zeigen verschiedene Daten, dass der Embryo genauso zum TAG-Abbau befähigt ist, wie der Samen während der Keimung bzw. der Keimlingsentwicklung. Zum einen konnte die Aktivität verschiedener in β -Oxidation und Glyoxylatzyklus involvierter Enzyme in reifenden Samen von Baumwolle (Miernyk and Trelease 1981b), Ricinus [Hutton und Stumpf, 1980] und Kürbis

[(Koeller, Frevert et al. 1979) (Frevert, Koeller et al. 1980) detektiert werden. In späten Stadien der embryonalen Entwicklung in *B.napus* (L.) konnten sowohl mRNA, Protein als auch die Aktivität von Malatsynthetase und Isocitratlyase detektiert werden, obwohl die Aktivität des Glyoxylatzyklus nicht nachgewiesen werden konnte (Comai, Dietrich et al. 1989); (Ettinger and Harada 1990). Zum anderen wurde in reifenden Arabidopsissamen β -Oxidations-Prozesse nachgewiesen (Poirier, Ventre et al. 1999); (Moire, Rezzonico et al. 2004). Auch TGL-Aktivität konnte in der Lipidkörperfraktion reifender Samen nachgewiesen werden (Balkenhohl 2000). Verfolgt man die Akkumulation der Reservestoffe im Verlauf der Samenentwicklung bei Arabidopsis (Abb. 3), stellt man fest, dass gegen Ende der Samenreifung der Gehalt an TAGs bereits abnimmt (Hills 2004). Hier nimmt man an, dass bereits in diesem Stadium eine Mobilisierung der TAGs stattfindet.

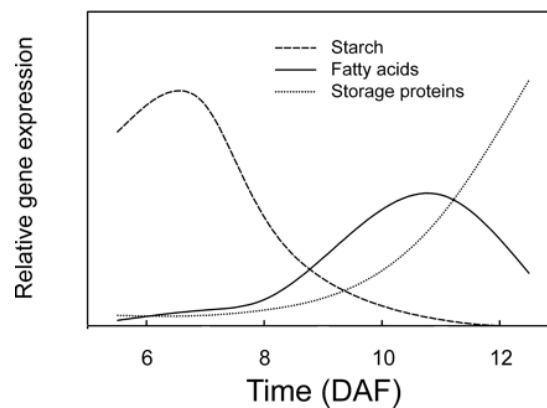


Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Akkumulation von Reservestoffen während der Samenentwicklung bei Arabidopsis (Ruuska, Girke et al. 2002).

6 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit diene der Isolierung und Charakterisierung keimungsspezifischer TGLs aus *Arabidopsis thaliana*. Da die meisten Sequenzierungsversuche von gereinigten pflanzlichen TGLs bisher erfolglos waren, sollte die Isolierung der TGLs aus *A. thaliana* nicht über eine klassische Proteinreinigung erfolgen. Stattdessen sollte die Isolierung der Sequenzen möglicher keimungsspezifischer TGLs aus *Arabidopsis thaliana* auf dem Wege erfolgen, dass unter Zuhilfenahme von bereits charakterisierten Lipasesequenzen anderer Spezies, *A. thaliana*-Genom- bzw. EST-Banken nach Proteinsequenzen mit Ähnlichkeit zu diesen Lipasen durchsucht werden sollten. Die auf diesem Wege isolierten Sequenzen sollten anschließend hinsichtlich ihrer Gewebespezifität analysiert werden, um TGL-Sequenzen mit einer möglichen Keimungsspezifität zu ermitteln. Eine weitere Aufgabe bestand in der Klonierung und der Expression der Proteine der isolierten TGL-Sequenzen. Die exprimierten Proteine sollten zunächst auf Enzymaktivität getestet werden und wenn sie sich als lipolytisch aktiv erweisen, eingehend charakterisiert werden. Von zentraler Bedeutung für die weitere Charakterisierung dieser putativen keimungsspezifischen TGLs war der Nachweis ihrer physiologischen Funktion. Zu diesem Zwecke sollten transgene *A. thaliana*-Pflanzen generiert werden, in denen die TGLs überexprimiert, deletiert bzw. mittels antisense-Konstrukten herunterreguliert worden waren. Eingehende Untersuchungen dieser Pflanzen sollten Aufschluss geben, in wieweit die isolierten TGL tatsächlich in die Prozesse der Speicherlipidmobilisierung während der Keimung involviert sind. Eine weitergehende Fragestellung unter dem Aspekt, dass eine keimungsspezifische TGL gefunden wird, war ebenfalls, in wieweit eine speicherlipidmobilisierende TGL auch während des Speicherlipidaufbaus in den reifenden Samen aktiv ist und eventuell seinen TAG-Gehalt bzw. die TAG-Zusammensetzung beeinflusst.

Material und Methoden

1 Chemikalien

[Carboxyl-]- ¹⁴ C-Triolein	Sigma (Deisenhofen)
GELCODE Blue Stain Reagent	Pierce (Rockford, IL, USA)
Gummi arabicum	Sigma (Deisenhofen)
N-Ethyl-N'-[3-(Dimethylamin)-propyl]-carbodiimid	Sigma (Deisenhofen)
Talon Metal Affinity Resin	Clontech (Palo Alto, CA, USA)
Trilinolein	Sigma (Deisenhofen)
Triolein	Sigma (Deisenhofen)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Alle verwendeten HPLC-Laufmittel wurden in HPLC-Qualität von J. T. Baker (Phillipsburg, N. J., USA) verwendet.

2 Molekularbiologische Reagenzien

Expand™ High Fidelity-PCR-System	Roche Diagnostics (Grenzach)
pGEM-T Easy Vector System II Kit	Promega (Madison, WI, USA)
NucleoSpin™ Plasmid	Macherey&Nagel (Düren)
NucleoBond™ AX	Macherey&Nagel (Düren)
NucleoSpin™ Extract	Macherey&Nagel (Düren)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Superscript II™	Stratagene (Karlsruhe)
Tfl-Polymerase™	Biozym (Hess. Oldendorf)
SmartLadder™	Eurogentec (Seraing, Belgien)
GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinstandardmischung VI	Sigma (Deisenhofen)

3 Pflanzen

Die Samen folgender Pflanzen wurden verwendet:

Arabidopsis thaliana L., var. Columbia Col-0 (Ackerschmalwand) Die Samen von *A. thaliana* stammen aus eigener Nachzucht am IPK Gatersleben.

Cucumis sativus L., var. chinesische Schlange Erfurter Samenzucht GmbH (Walluf)

Glycine max L., Feldsaaten Freudenberger (Krefeld)

3.1 Pflanzenmedien

3.1.1 Nährlösung nach (Hoagland and Arnon 1941) modifiziert für *A. thaliana*

Stammlösung I (200x):	0,5 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
Stammlösung II (200x):	0,1 M $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
Stammlösung III (200x):	0,5 M KNO_3
	0,1 M KH_2PO_4
Spurenelemente- Stammlösung (2000x):	$5,0 \times 10^{-2}$ M H_3BO_3 $4,5 \times 10^{-3}$ M $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ $3,8 \times 10^{-3}$ M $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ $3,0 \times 10^{-4}$ M $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-4}$ M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$
Fe-EDTA-Stammlösung (250x):	$1,0 \times 10^{-2}$ M Na-EDTA $1,0 \times 10^{-2}$ M $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
Mischung:	
Stammlösungen I	12,5 ml
Stammlösungen II	12,5 ml
Stammlösungen III	12,5 ml
Spurenelemente-Stammlösung	1,25 ml
Fe-EDTA-Stammlösung	10 ml
	ad tridest. H_2O auf 2,5 l

3.1.2 MS – Medium (Murashige und Skoog, 1962)

2,2 g/l MS-Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

0,5 g/l MES, pH 5,8

8,0 g/l Micro agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

Platten zum Nachweis des Wachstums auf Saccharose enthalten zusätzlich:

1,0 g/l Saccharose

Zur bar -Gen (BASTA) Selektion: 10µg/ml Phosphinotricin (Merck, Darmstadt)

3.1.3 Erdkulturen

Als Substrat wurde Terreau Professionell GePAC Einheitserde Typ MiniTray (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa) verwendet.

Zum Düngen wurde WUXAL® Super (Bayer, Leverkusen) benutzt, ein Volldünger mit folgenden Komponenten: 8% Stickstoff, 8% Phosphat, 6% Kalium und die Spurenelemente Eisen, Mangan, Bor, Kupfer, Zink, Nickel, Kobalt und Molybdän. Der Dünger wurde 0,2% (v/v) in Wasser verdünnt und einmal pro Woche gegossen.

3.2 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

3.2.1 Kultivierung zur Ernte etiolierter Keimlinge

Je 30 mg gewaschenes Saatgut von *A. thaliana* var. Columbia wurde in Plastikboxen (95 x 95 x 100 mm) ausgelegt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für verschiedene Zeiten inkubiert. Die Plastikboxen enthielten 3 Lagen Filterpapier, die mit Nährlösung (s. 3.1.1) getränkt waren.

Waschen der Samen (steril):

5 min	70 % Ethanol
3 min	5 % NaOCl
3 x 10 min	steril. H ₂ O

3.2.2 Kultivierung zum Wachstum auf Agarplatte

Zur sterilen Anzucht wurden 5 – 8 mg Saatgut gewaschen (s. 3.2.1) und in 0,1% (w/v) Agar in H₂O suspendiert. Die Samen wurden auf MS-Medium (s. 3.1.2) ausgelegt und in der Phytokammer bei 23 °C mit einem Licht/Dunkel-Wechsel von 8 und 16 h und einer Lichtmenge von 100 µE angezogen.

3.2.3 Kultivierung auf Erde

Das für die Erdkulturen verwendet Substrat (s.3.1.3.) wurde vor Verwendung zur Schädlingsbekämpfung für 4h bei 180°C erhitzt. Die Kulturen wurden alle 2 Tage gegossen, einmal pro Woche gedüngt und wuchsen zunächst für 6 Wochen unter Kurztagsbedingungen und anschließend im Langtag. Bedingungen wie folgt:

Kurztagsbedingungen:

Licht: 8 h, 23 °C

Dunkel: 16 h, 18 °C

Langtagsbedingungen:

Licht: 16 h, 23 °C

Dunkel: 8 h, 18 °C

3.2.4 Kultivierung in Hydrokultur

Speziell zur Ernte von Wurzeln von *A.thaliana* var.Col-0 wurden die Pflanzen zunächst für 10 Tage in Erdkultur (s. 3.2.3) angezogen und anschließend auf Hydrokultur transferiert.

3.3 Kultivierung von *Cucumis sativus*

60 g Gurkensamen wurden pro Keimungsschale für 1 h in 100 ml Wasser vorgequollen und auf feuchtes Filterpapier ausgelegt. Die Keimung erfolgte bei 27 °C unter 100 % Luftfeuchtigkeit im Dunkeln.

3.4 Pflanzentransformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *A. thaliana* var. Col-0 mit den verschiedenen pCambia-Konstrukten erfolgte mit Hilfe der Flower-Dip-Transformationsmethode (Horsch, Fry et al. 1985) durch den *A. tumefaciens*-vermittelten T-DNA-Transfer.

3.5 Transiente Pflanzentransformation

Für die Analyse der intrazellulären Genexpression wurden reife Samen von *Glycine max* transient transformiert. Dafür wurden zunächst Plasmide hergestellt, bei deren Expression Fusionsproteine bestehend aus dem analysierten Gen bzw. einer zellorganellspezifischen Kontrolle und einem N-terminalen bzw. C-terminalen YFP bzw. CFP-Konstrukt entstehen. Diese Plasmide wurden mittels Midi – Präparation (s. 4.5.1.4) bis zu einer Konzentration von mindestens 1 µg/µl vervielfältigt und an Goldpartikel gebunden. Die Goldpartikel (Durchmesser: 1,0 µm) wurden zuvor in Ethanol gewaschen, zu Einheiten von je 50 µl (50 mg/ml) aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zu einem Goldpartikelaliquot wurden 5 µl – 7 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl), 50 µl CaCl₂ (2,5 M) und 20 µl Spermidin (0,1 M) zugegeben, wobei der Ansatz nach jeder Zugabe gemischt wurde. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g für 10 s wurde der Überstand abgenommen, die pelletierten Partikel zweimal mit je 250 µl Ethanol gewaschen und für den Beschuß in 60 µl Ethanol resuspendiert.

Für die Transformation wurden die reifenden Samen längs halbiert, in der Biolistic[®]-Particle Gun (Biorad) bei 1100 bar im Abstand von 6 cm beschossen und zur Expression der Gene 18 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.5.1 Fluoreszenz-mikroskopische Analyse

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation der Fusionsproteine erfolgten Fluoreszenzmessungen in den zuvor transient transformierten Soja-Samen am konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena). Das verwendete LSM 510 besitzt vier simultane konfokale Detektionskanäle, die über separate Pinholes (kleine Blende auf der das vom Präparat emittierte Licht fokussiert wird) verfügen, deren Durchmesser und XY-Ausrichtung für jede Emissionswellenlänge individuell einstellbar sind. Das ermöglicht eine streulichtfreie

Darstellung der Emission einer selbstgewählten Ebene innerhalb des Präparates. Des Weiteren wurden mit Hilfe des „Multitrack System“ des LSM 510, welches eine selektive Anregung und Detektion einzelner Farbstoffe ermöglicht, der Wellenlängenbereich so weit eingeschränkt, dass ein „Übersprechen“ der Signale der einzelnen Farben unterbunden wurde.

Parameter der konfokalen LSM:

Scan mode	8b	
Stack size	1024 x 1024 , 46,1 µm x 46,1 µm	
Scaling	0,04 µm x 0,04 µm	
Pixel time	4,48 µs	
Objektive	Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil	
Beam splitters	T1 MBS: HFT UV/543	T2 MBS: HFT 458
	DBS1: None	DBS1: Mirror
	DBS2:	DBS2:
	DBS3: None	DBS3: Mirror
Wave length	T1: 514 nm , 20 %	T2: 458 nm , 78 %
Filter	Ch1-1: BP 560 - 615	
	Ch2-2: BP 470 - 500	
	ChD-1: -	
Pinhole:	Ch1-1: 285 µm	
	Ch2-2: 724 µm	
	ChD-1: 0µm	

4 Bakterien

4.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der Bakterienstamm *E. coli* XL-1 Blue [(Hanahan 1983)] diente als Wirtsbakterienstamm für alle Transformationsexperimente.

Die Kultivierung erfolgte in Luria–Bertain (LB)-Medium bzw. auf LB-Festmedium [LB-Medium mit 0,8 % (w/v) Mikro Agar, Duchefa] bei 37 °C unter Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin, wobei für die Anzucht in 2 ml Flüssigkulturen außerdem mit 180 rpm geschüttelt wurde.

LB-Medium:

1 % (w/v)
0,5 % (w/v)
0,5 % (w/v)

Trypton
Hefeextrakt
Natriumchlorid

LB-Festmedium

LB-Medium + 0,8 % (w/v) Mikro Agar

4.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurden 250 ml LB–Medium mit 10 – 12 Kolonien *E.coli* XL1–Blue von einer frisch bewachsenen LB–Agarplatte angeimpft. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 200 – 250 rpm bei 18 °C – 25 °C.

Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,45 – 0,75 wurde die Kulturflüssigkeit in sterile Zentrifugenbecher überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1000 g, nach der das Medium mit einer Pasteurpipette vollständig abgenommen wurde. Der Zellniederschlag wurde in 80 ml TFB – Puffer suspendiert und für 10

min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (wie oben beschrieben) und der vollständigen Abnahme des TFB-Puffers wurden die Zellen in 20 ml TFB-Puffer + 1,5 ml DMSO suspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und für maximal 3 Monate bei -80 °C gelagert.

TFB-Puffer:

10 mM	PIPES
115 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
250 mM	KCl
55 mM	MnCl ₂
	pH 6,7

4.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

100 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 30 min mit Plasmid-DNA auf Eis inkubiert, zum Hitzeschock für 30 sec auf 42 °C erhitzt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugegeben, 60 min bei 37 °C geschüttelt, und der Transformationsansatz auf LB-Platten mit für die Selektion geeignetem Antibiotikum ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

4.1.3 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Pflanzentransformation wurde der *A. tumefaciens*-Stamm EHA 105 ((Hood *et al.* 1993)) verwendet.

Die Kultivierung erfolgte in YEB-Medium bzw. auf YEB-Festmedium bei 28 °C unter Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin, wobei für die Anzucht in Flüssigkultur zusätzlich mit 160 rpm geschüttelt wurde.

YEB-Medium:

0,5 % (w/v)	Rinderextrakt
0,1 % (w/v)	Hefeextrakt
0,5 % (w/v)	Pepton
0,5 % (w/v)	Saccharose
nach Autoklavieren: 2 mM Mg ₂ SO ₄ (sterilfiltriert)	

YEB-Festmedium:

YEB-Medium + 0,8 % (w/v) Mikro agar

4.1.3.1 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* - Zellen

Eine Einzelkolonie wurde nach der Methode von (An, (1987)) in 2 ml YEB-Medium über Nacht bei 28 °C vermehrt. Von dieser Übernachtskultur wurden 2 ml in 50 ml YEB-Medium bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 28 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 2.700 x g, 4 °C) wurden die Zellen in 10 ml 0,15 M NaCl-Lösung suspendiert. Die Zellen wurden erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und das Sediment in 1 ml eiskalter 75 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Aliquots von 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C 2 – 3 Wochen gelagert.

4.1.3.2 Transformation kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

200 µl kompetente Zellen wurden nach der Methode von [An, (1987)] zur Vermeidung von Eiskristallbildung in der Hand aufgetaut und nach Zugabe von ca. 3 µg Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 2 min bei -80°C eingefroren und gleich darauf bei 37 °C aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Bakterien 4 h bei 28 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dies diente vor allem der Expression des zur Selektion notwendigen Antibiotika-Resistenzgens. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf YEB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und 2 d bei 28 °C inkubiert.

4.2 Hefen

4.2.1 Stämme und Stockkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Hefe-Mutante mit defekter Lipidmobilisierung [(*tgl3*, Athenstaedt, 2003)] sowie der dazu gehörige Wildtyp-Stamm FY1679 (Winston, Dollard et al. 1995) auf YPD-Festmedium nach der Methode von (Ausubel, Brent et al. 1993) kultiviert.

4.2.2 Herstellung kompetenter Hefe-Zellen

Von einer 20 ml Übernachtskultur wurden 2 ml 1:10 mit frischem YPD-Medium verdünnt und 3 – 4 h bei 30 °C und 140 rpm (bis zu einer OD_{600} von 1,0 -1,3) inkubiert. Die Hefezellen wurden pelletiert (5 min bei 1000 g) und in 4 ml 1 M Lithium-Acetat, pH 7,5, suspendiert und aliquotiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min bei 1000 g) wurden die Hefezellen in x µl 1M Lithium-Acetat, pH 7,5, resuspendiert, wobei das Zielvolumen x von der Zelldichte der Kultur abhing. Dabei entspricht bei einer OD_{600} von 0,5 : $x = 60$ µl. Die Hefezellen wurden bei 4°C aufbewahrt und waren 3 - 4 Tage kompetent.

YPD-Medium:

1 % (w/v)	Hefeextrakt
2 % (w/v)	Pepton
2 % (w/v)	Glukose

YPD-Festmedium:

YPD-Medium + 1 % (w/v) Mikro agar

4.2.3 Transformation kompetenter Hefe-Zellen

Die Hefe -Transformation erfolgte nach der Methode von (Ausubel et al., 1989). 100 µl kompetenter Hefezellen wurden mit 5 µl Heringsperma-DNA (10 µg/µL), 2 µl Plasmid, 700 µl PEG-Mix (1 ml 1 M Lithium-Acetat + 1 ml 10 x TE + 8 ml 50% PEG) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C. Die Hefezellen wurden

pelletiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde anschließend in H₂O suspendiert und auf Selektionsmedium (SC-URA) ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren.

4.2.4 Komplementation der *tgl3*-Deletionmutante

Um zu testen, ob sich die *tgl3*-Deletionsmutante durch Expression der im Rahmen dieser Arbeit behandelten *A. thaliana*-Gene komplementieren lässt, wurden *tgl3*-Kulturen mit den verschiedenen individuellen Plasmiden transformiert (s.12.3.4). 100-ml-Kulturen wurden in Minimalmedium (-URA) mit 2 % (w/v) Galactose bei 30° C unter Schütteln inkubiert. Die Zellernte erfolgte ab einer OD₆₀₀ = 0,6 durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g. Die Hefezellen wurden aufgeschlossen nach der Methode von (Folch, Lees et al. 1957), bevor Gesamtlipide extrahiert (Bligh and Dyer 1959) und Triacylglycerine analysiert wurden (Athenstaedt and Daum 1999).

4.3 Klonierungsvektoren

Folgende Plasmidvektoren wurden für diese Arbeit eingesetzt:

Tab. B-1: verwendete Plasmide

Plasmid-Vektor	Verwendungszweck	Referenz
pGEM - T	Standardklonierung und Sequenzierung	Promega, Mannheim
pQE 30	Expression in <i>E. coli</i> mit N-term. His-Tag	Qiagen, Hilden
pQE 70	Expression in <i>E. coli</i> mit C-term. His-Tag	Qiagen, Hilden
pDest 14	Expression in <i>E. coli</i> ohne Tag	CAMBIA, Canberra, Australien
pDest 17	Expression in <i>E. coli</i> mit N-term. His-Tag	CAMBIA, Canberra, Australien
pET20b	Expression in <i>E. coli</i> mit C-term. His-Tag	Novagen, Madison, WI, USA
pET22b	Expression in <i>E. coli</i> mit C-term. His-Tag	Novagen, Madison, WI, USA
pYES2	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	Mod. für GATEWAY® System
pYES2/CT	Expression in <i>S. cerevisiae</i> mit C-term. His-Tag	Invitrogen, Karlsruhe
pYES2/NTA	Expression in <i>S. cerevisiae</i> mit N-term. His-Tag	Invitrogen, Karlsruhe
pCAT-YFP	Expression eines Fusionsproteins in Pflanzen	Dr. M. Fulda, Abt. Biochemie. der Pflanze, Georg – August – Universität., Göttingen
pUC18-ENTR1a	GATEWAY® System für pDest 14, pDest 17, pYES 2 und pCambia 3300.1	Dr. E.Hornung, Abt. Biochemie. der Pflanze, Georg-August-Universität, Göttingen
pCambia 3300.1	Pflanzentransformation	CAMBIA, Canberra, Australien (modifiziert von Dr. Hornung)

4.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von den Firmen MWG-BIOTECH (Ebersberg), Biomers (Ulm) oder Roth (Karlsruhe) synthetisiert. Oligonukleotide: (siehe Anhang)

4.5 Nukleinsäureanalysen

4.5.1 Präparation von RNA

Lösungen für die Isolierung von und den Umgang mit RNA wurden vor Gebrauch zur Inaktivierung von RNA-degradierenden Enzymen mit 0,1 % (v/v) DEPC behandelt und anschließend autoklaviert. Tris-haltige Puffer wurden mit DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser angesetzt.

4.5.1.1 Isolierung von RNA aus Wurzeln, Blätter, Stielen, Blüten und Keimlingen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial nach der Methode von (Logemann, Schell et al. 1987) wurden 300 mg gefrorenes Material in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 1 ml RNA-Extraktionspuffer aufgenommen und mit 0,7 Volumina PCI-Gemisch versetzt. Nach Zentrifugation (20 min, 12.000 x g, 4 °C) wurde die RNA aus der oberen, wässrigen Phase unter Zugabe von 0,05 Vol. 1 M Essigsäure mit 0,7 Vol. Ethanol für mindest. 1 h bei -20 °C gefällt und anschließend pelletiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde in Folge mit 1 ml 70 % Ethanol, 1 ml 3 M Natriumacetat, pH 4,8 und 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen.

RNA – Extraktionspuffer:

8 M	Guanidiniumchlorid
20 mM	MES, pH 7,0
20 mM	EDTA

PCI:

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
(25:24:1, v/v/v)

Gesamt-RNA aus etwa 100 mg Blattmaterial wurde mit der Methode nach (Chomczynski and Sacchi 1987) isoliert. Das gefrorene und gemörserte Blattmaterial wurde mit 1 ml „TRIZOL® Reagent“ (Life Technologies, Eggenstein) homogenisiert und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Nach der Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4 °C) wurde die RNA aus der oberen, wässrigen Phase mit 0,25 ml Isopropanol + 0,25 ml High Salt – Puffer für 10 min bei RT gefällt und anschließend pelletiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

High Salt Puffer:

1,2 M	NaCl
0,8 M	Natriumcitrat

4.5.1.2 Isolierung von RNA aus Schoten und Samen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Schoten und Samen (Naito et al., 1994, modifiziert für *A. thaliana*) wurden 10 – 12 Schoten oder 100 mg Samen in flüssigem Stickstoff gemörsert, anschließend in Reaktionsgefäße mit 300 µl Extraktionspuffer und 300 µl PCI-Gemisch überführt und gemischt. Nach Zentrifugation (1 min, 12000 g, 4°C) wurde die wässrige, obere Phase erneut mit gleichem Volumen an PCI reextrahiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt, und die RNA mit 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat und 3 Volumina Ethanol (100%) für 10 min bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation (5 min, 12000 g, 4°C) und Abnahme des Überstandes, wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl Wasser gelöst. Zur Abtrennung wasserunlöslicher Verunreinigungen wurde erneut zentrifugiert (s.o.), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 4 M Lithiumchlorid für 1 h bei -80°C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4°C) wurde das Pellet in 1 ml 2 M Lithiumchlorid solubilisiert und erneut zentrifugiert (2 min, 12000 g, 4°C). Das gereinigte RNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Extraktionspuffer:

1 M Tris/HCl, pH 9,0
1 % SDS

4.5.1.3 Präparation genomischer DNA

Etwa 500 mg gefrorenes Blattmaterial wurden homogenisiert, mit 0,2 ml CTAB-Extraktionspuffer versetzt und 15 min bei 65 °C inkubiert. Nach Vermischen mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) und einer Zentrifugation (3 min, 7500 x g, RT) wurde die obere, wässrige Phase mit 0,1 Vol. CTAB/NaCl – Lösung, die zuvor auf 65 °C erwärmt worden war, versetzt und 3 min inkubiert. Anschließend wurde 1 Volumina Isopropanol zugegeben, 2 min inkubiert und zentrifugiert (10 min, 20.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

CTAB –Extraktionpuffer:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
20 mM EDTA, pH 8,0
1,4 M NaCl
2 % (w/v) CTAB
2 % (w/v) β-Mercaptoethanol (frisch dazugeben)

CTAB /NaCl - Lösung:

10 % CTAB
0,7 % NaCl

4.5.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen (Birnboim and Doly 1979).

Mini-Präparation (1 – bis 5 ml-Kulturen)

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der Kit „NucleoSpin™ Plasmid“ von Macherey & Nagel (Düren) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Midi-Präparation (50 – bis 250 ml-Kulturen)

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Übernachtskulturen von *E. coli* XL-1 Blue in 50 ml LB-Medium mit geeigneten Antibiotika angezogen, und der Kit „NucleoBond™ AX“ von Macherey & Nagel (Düren) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

4.5.1.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht (312 nm) wurde zunächst das DNA-Fragment enthaltende Agarosegelstück mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelfragmenten erfolgte mit dem Kit „NucleoExtract™“ von Macherey & Nagel (Düren) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

4.5.2 Agarosegel-Elektrophorese

4.5.2.1 Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese

Jeweils 20 µg Gesamt-RNA wurden mit 1,5 Volumina RNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 65 °C und für 5 min auf Eis inkubiert. Die RNA wurde auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und über 1,5 h bei 6 V/cm mit 1xMOPS-Puffer als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Dokumentation wurden die Agarosegele unter Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) fotografiert.

RNA-Probenpuffer:

50	% (v/v)	Formamid;
6	% (v/v)	Formaldehyd;
6	% (v/v)	Glycerin;
10	% (v/v)	10xMOPS;
0,04	% (w/v)	Bromphenolblau

10xMOPS-Puffer:

200	mM	Morpholinopropansulfon-
		säure;
50	mM	Natriumacetat;
5	mM	EDTA;
		pH 7,0

Denaturierendes Agarosegel:

1	% (w/v)	Agarose;
6	% (v/v)	Formaldehyd;
10	% (v/v)	10xMOPS-Puffer

4.5.2.2 Nichtdenaturierende Agarosegel-Elektrophorese

Die DNA wurde mit 0,2 Volumina DNA-Probenpuffer versetzt und auf das nichtdenaturierende Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker wurde SmartLadder™ (Eurogentec, Seraing) oder GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 1,5 bis 6 V/cm mit 1xTAE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Agarosegel 10 bis 15 min in der Ethidiumbromid-Färbelösung inkubiert. Unter Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) konnte die Auftrennung der DNA dokumentiert werden.

DNA – Probenpuffer (5 x):

10	mM	Tris/HCL
20 %	(v/v)	Glycerin
0,1 %	(w/v)	Bromphenolblau
		pH 7,5

Nichtdenaturierendes Agarosegel:

1,5%	(w/v)	Agarose in 1 x TAE
------	-------	--------------------

50xTAE:

2	M	Tris/HCL
1	M	Natriumacetat
100	mM	EDTA
		pH 8,0

Ethidiumbromid-Färbelösung:

0,5 µg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
-----------	------------------------------------

4.5.3 Klonierungstechniken

4.5.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Sambrook, Fritsch et al. 1989)

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch durch Hydrolyse kovalenter Bindungen. Dabei werden 4 - 6 bp lange palindromische Sequenzen erkannt und geschnitten.

Zur Konstruktion von Plasmiden, zur Überprüfung von Insert Größen und zum Einfügen oder Ausschneiden von Inserts wurden Restriktionsendonukleasen der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Standardmethoden erfolgten nach (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

Die Restriktionsansätze enthielten 3 µg DNA, 5 µl Reaktionspuffer und 1 µl der Restriktionsenzyme in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Als Reaktionspuffer wurde der jeweils optimale Puffer nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde 12 h bei 37 °C inkubiert.

4.5.3.2 Dephosphorylierung

Um die Selbstligation von Vektoren nach der Restriktion zu minimieren, wurden diese direkt nach der Restriktionsspaltung mit calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben behandelt.

4.5.3.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten bzw. überhängenden Enden erfolgte mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (ROCHE, Mannheim) bzw. mit der „T4 DNA Ligase“ (ROCHE, Mannheim), nach Herstellerprotokoll. PCR-Produkte wurden mit dem pGEM-T Vector System II Kit (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben in den Vektor pGEM-T kloniert.

Ligationen wurden in einem Volumen von 50 µl (davon 5 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl)) durchgeführt. Um die intramolekulare bzw. intermolekulare Ligation des Vektors zu vermeiden, wurde die Donor-DNA in etwa 3-fachem Überschuss eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 14 °C für 12 h.

4.5.4 Amplifikation von DNA – Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.5.4.1 Expand™-PCR

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten, die kloniert und exprimiert werden sollten, wurde die DNA - Amplifizierung mit dem Expand™ High Fidelity-PCR-System nach der Vorschrift des Herstellers (Roche Diagnostics) durchgeführt. Dieses System enthält ein Gemisch aus der thermostabilen *Taq*-Polymerase und der ebenfalls thermostabilen *Pwo*-DNA Polymerase, die eine 3' - 5' Exonuklease-Aktivität besitzt. Außerdem wurden nur 25 Zyklen durchlaufen. Beides diente dazu, die Lesefehlerrate niedrig zu halten, um möglichst wenige als Amplifikationsartefakte entstandene Mutationen in der zu klonierenden DNA zu erzeugen.

Als Templates wurde cDNA aus verschiedenen Organen von *A. thaliana* verwendet.

Oligonukleotide: (siehe. 4.4)

Programm:

- | | |
|---|--|
| 1. Denaturierung | 2 min bei 94 °C |
| 2. Denaturierung | 30 s bei 94 °C |
| 3. Annealing | 30 s bei 65 °C |
| 4. Elongation | 2 min bei 72 °C |
| Die Schritte 2. - 4. wurden 10x wiederholt. | |
| 5. Denaturierung | 30 s bei 94 °C |
| 6. Annealing | 30 s bei 65 °C |
| 7. Elongation | 2 min bei 72 °C und ein Zeitinkrement von 5 s pro Zyklus |
| Die Schritte 5. - 7. wurden 15x wiederholt | |
| 8. Elongation | 2 min bei 72 °C |

4.5.4.2 Kolonie-PCR

DNA-Amplifizierungen, die während der Klonierung zur Kontrolle der Klone dienen (Kolonie-PCR), wurden mit der *Tfi*-Polymerase (Biozym, Oldendorf) durchgeführt, da hierbei die Fehlerfrequenz des Nukleotideinbaus nicht von Bedeutung ist. Die Primer und das PCR-Programm wurden beibehalten, lediglich die Elongationszeit bei 72 °C wurde auf 90 s verkürzt.

Als DNA-Matrize dienen Plasmid-DNA bzw. Bakterienkolonien bei der Selektion positiver Klone nach Klonierungsexperimenten. In je 50 µl PCR-Ansätzen wurde 1 µl DNA-Lösung eingesetzt bzw. Zellmaterial einer *E. coli*-Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher abgestreift. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide (siehe 4.4) wurden folgendermaßen berechnet:

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + (0,41 \times \text{Prozent des G/C-Gehalts}) - 650 / \text{Länge des Primers}$$

PCR-Ansatz (50 µl):

1 µl	Template-DNA (50 - 200 ng/µl) oder Bakterienkolonie;
1 µl	5'-Primer (10 pmol);
1 µl	3'-Primer (10 pmol);
1 µl	dNTP-Mix (10 mM);
5 µl	10xTFL-Reaktionspuffer;
5 µl	25 mM Magnesiumchlorid
2-5 U	<i>Tfi</i> - DNA-Polymerase (Biozym, hess. Oldendorf)

4.5.5 Semiquantitative Reverse Transkriptase – PCR (RT-PCR)

Zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen in RNA-Lösungen wurden je 10 µg Gesamt-RNA mit 10 U RNase-freier DNase I (ROCHE, Mannheim) in Gegenwart von 10 U RNase-Inhibitor (ROCHE, Mannheim) für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend durch Zugabe von Phenol/Chloroform (1:1, v/v) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v / v) - Extraktion gereinigt, nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt und zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 10 µl Wasser aufgenommen (ca. 1 µg/µl).

Für die RT-PCR wurde die „SuperScript™II RNase H⁻ Reverse Transcriptase“ (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Je 5 µg DNase-behandelte RNA-Lösung und 200 pmol Oligo-dT wurde nach Herstellerangaben verwendet.

Die anschließende Amplifikation erfolgte wie unter 4.5.4.1. Für den Nachweis der Transkriptniveaus in den verschiedenen Pflanzenorganen wurde im verwendeten Amplifikationsprogramm die Zyklenzahl auf 35 erhöht.

4.5.6 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

4.5.6.1 Automatisierte Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des automatischen Sequenzierers ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Für die Sequenzierreaktionen kam der „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach Herstellerprotokoll zum Einsatz.

4.5.6.2 Computergestützte Sequenzanalyse

Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche erfolgten mit Hilfe von Programmen, die von HUSAR: (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/index.shtml>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) sowie vom National Centre for Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) angeboten werden.

4.6 Proteinanalysen

4.6.1 Expression rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in dem *E. coli*-Stamm SG 13009. Die Expressionsklone wurden zunächst bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 in LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin) bei 37 °C inkubiert. Nach der Induktion mit 1mM Isopropyl/ β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) wurden die Bakterien für 4 d bei 10 °C bzw. für 1 d bei 37 °C kultiviert.

4.6.2 Reinigung der rekombinanten Proteine

Zur Reinigung der Proteine wurden die *E. coli*-Zellen pelletiert und in 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0, mit Ultraschall (Sonoplus GM 70, Bandelin, Berlin) 5 x 1 min bei 50 % Leistung und 50 % Impuls aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei 4000 x g pelletiert und der Überstand für Aktivitätstest verwendet.

4.6.3 Isolierung der rekombinanten Proteine aus dem Periplasma

E.coli-Zellen, die mit den Plasmiden pET20b und pET22b transformiert wurden, exportieren die rekombinanten Proteine nach der Expression direkt in den periplasmatischen Raum. Zur Reinigung dieser Proteine wurden die *E. coli*-Zellen pelletiert, in 30 ml 30 mM Tris/HCl, pH 8,0, 20% Saccharose resuspendiert und anschließend 60 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 zugegeben. Es folgte eine Inkubation unter

ständigem, langsamem Rühren für 10 min bei RT. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10.000 x g wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 30 ml eiskalter 5 mM MgSO₄-Lösung für 10 min unter langsamen Rühren resuspendiert. Dabei wurden die rekombinanten Proteine aus dem periplasmatischen Raum in den Puffer freigesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 10.000 x g pelletiert und der Überstand für Aktivitätstest verwendet. Das Zellpellet wurde nach einer Behandlung wie unter 4.6.3 beschrieben weiter aufgeschlossen und ebenfalls einem Aktivitätstest unterzogen.

4.6.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in 10 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgelen mit aufgelagerten Startgelen nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Es wurde die „Mini-PROTEAN® 3 Cell“-Apparatur (BIO-RAD, München) verwendet.

Jeweils 40 µg Protein wurden mit 0,2 Volumina Protein-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 8 µl „prestained protein marker“ (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt/Main) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in Elektrophoresepuffer für 15 min bei 15 mA, 30 min bei 30 mA und bis zum Erreichen des unteren Gelendes durch die Bromphenolblau-Bande bei 30 mA.

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

Protein-Probenpuffer:

100	mM	Tris-HCl, pH 6,8
2,5	% (w/v)	SDS
20	% (v/v)	Glycerin
0,25	% (w/v)	Bromphenolblau

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:

25	mM	Tris
200	mM	Glycin
0,1	% (w/v)	SDS
		pH 8,3

4.6.5 Western-Transfer und Immunodetektion

4.6.5.1 Western-Transfer

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden aus dem SDS – PAGE Gel nach dem Naßblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (MACHEREY-NAGEL, Düren) transferiert. Dazu wurde eine „Mini Trans-Blot® Cell“-Apparatur (BIO-RAD, München) verwendet. Der Transfer wurde bei 60 V für 1 h mit Transferpuffer durchgeführt.

Transferpuffer:

25 mM	Tris-HCl, pH 8,3;
250 mM	Glycin;

20 % (v/v) Methanol
0,1 % (w/v) SDS

4.6.5.2 Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembranen wurden diese zweimal für jeweils 10 min in TBS-Puffer gewaschen und dann für 3 h in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für 2 min mit TBST-Puffer gewaschen und in einer 1:1000-Verdünnung des Tetra-His Antikörpers (Quiagen, Hilden) für 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 min in TBST-Puffer wurde der sekundäre Antikörper, „Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate“ (Sigma – Aldrich, München), in einer 1:1000-Verdünnung in TBST-Puffer für 1 h mit den Nitrocellulosemembranen geschwenkt. Die Membranen wurden konsekutiv dreimal für jeweils 10 min in TBST-Puffer, 1x 10 min in TBS-Puffer und 1 x 10 min mit AP-Puffer gewaschen. Die Farbentwicklung mittels alkalischer Phosphatase (Promega; Mannheim) erfolgte durch Zugabe von 33µl BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) und 66µl NBT (Nitro blue tetrazolium) nach Angaben des Herstellers.

TBS-Puffer:

10 mM Tris/HCL
150 mM NaCl
pH 8,0

TBST-Puffer:

TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20

Blockierungslösung:

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

AP-Puffer:

100 mM Tris/HCL
100 mM NaCl
5 mM MgCl_2
pH 9,5

4.7 Analyse der enzymatischen Aktivität der Lipase

4.7.1 Aktivitätsnachweis mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate (Huang 1987)

Die zutestende Enzymlösung (Volumen 80 µl) wurden mit 10 µl Pufferkonzentrat versetzt und mit 10 µl Substrat für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde mit 10 µl Eisessig der pH-Wert auf 3,0 gesenkt. Die Lipide wurden mit 200 µl Chloroform extrahiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 1000 x g). Die Chloroformphase wurde im Stickstoffstrom verdampft und die Rückstände in 20 µl Chloroform aufgenommen. Die Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Dünnschichtplatte

(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt) wurde anschließend an einem Phosphor-Storage-Screen (Amersham Pharmacia, Freiburg) exponiert und an einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Pharmacia, Freiburg) ausgewertet.

Pufferkonzentrat (10 x):

1	M	Tris/HCL
0,5	M	NaCl
0,05	M	CaCl ₂
		pH 8,5

Substrat:

[Carboxyl-]-¹⁴C-Triolein in 5 % Gummi arabicum

Laufmittel:

Hexan : Diethylether : Essigsäure (50 : 50 : 0,1, v/v/v)

4.7.2 Aktivitätsnachweis durch Produktanalyse mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.7.2.1 Substratherstellung

200 µl Lipidextrakt (s. 4.7.2.1.2.) in Chloroform wurden im Stickstoffstrom eingeeengt und in 300 µl 5 % (w/v) Gummi arabicum-Lösung gelöst. Zur Herstellung einer gleichmäßigen Emulsion wurde das Substrat für 15 s mit Ultraschall behandelt.

4.7.2.1.1 Isolierung von Lipidkörpern aus Kotyledonen von *C. sativus*

Die Isolierung von Lipidkörpern mittels Saccharosegradienten erfolgte nach einer Methode modifiziert von (Sturm, Schwennesen et al. 1985). Dazu wurden 10 g Kotyledonen in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das gefrorene Zellmaterial wurde in 30 ml Aufschlußpuffer aufgenommen und anschließend bei 10.000 x g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Die lipidkörperenthaltende, obere Phase wurde abgenommen, mit 10 ml Gradientenpuffer im Glashomogenisator homogenisiert und erneut bei 10.000 x g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Die erhaltenen angereicherten Lipidkörperfraktionen waren bei -20 °C ca. 2 Monate haltbar.

Aufschlußpuffer:

50	mM	Natriumphosphat, pH 7,5
10	mM	NaCl
1,5	mM	EDTA
0,1	mM	MgCl ₂
15	% (w/v)	Saccharose

Gradientenpuffer:

50	mM	Natriumphosphat, pH 7,5
10	mM	NaCl
1,5	mM	EDTA
0,1	mM	MgCl ₂
10	% (w/v)	Saccharose

.4.7.2.1.2 Lipidextraktion (Bligh and Dyer 1959)

Es wurden 40 mg Lipidkörper in 900 µl 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4, suspendiert, mit einem Gemisch aus 250 µl 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4, 2,5 ml Methanol und 1,25 ml Chloroform versetzt und gemischt.

Nach Zugabe von 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4, wurde erneut gemischt und die Phasentrennung durch eine Zentrifugation, 10 min bei 5000 g, 4 °C unterstützt. Die Chloroformphase wurde abgenommen und im Stickstoffstrom verdampft. Die Rückstände wurden in 1 ml Chloroform aufgenommen.

4.7.2.2 Aktivitätstest

Es wurden 80 µl der zutestenden Enzymlösung mit 10 µl Pufferkonzentrat versetzt und mit 10 µl Substrat für 45 min bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 10 µl Eisessig angesäuert und mit 200 µl Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde im N₂-Strom eingeeengt und die Rückstände in 20 µl HPLC-Laufmittel (Methanol/H₂O/Essigsäure (75:25:0,1, v/v/v)) aufgenommen.

Die HPLC-Analysen erfolgten mit Geräten der „Agilent Series 1100“, (Agilent, Waldbronn), die mit einem Dioden-Array-Detektor betrieben wurden. Alle Analysen wurden bei einer Säulentemperatur von 20 °C durchgeführt. Die zur eindeutigen Identifizierung der Produkte verwendeten Standards wurden von CAYMAN CHEMICALS (AnnArbor, MI, USA) bezogen bzw. von Dr. C. Göbel zur Verfügung gestellt. Das spezifische Absorptionsmaximum der Hydroperoxide wurde bei 234 nm detektiert

Pufferkonzentrat:

1	M	Tris/HCl, pH 8,5
0,5	M	NaCl
50	mM	CaCl ₂
50	mM	DTT

HPLC:

Säule:	EC 250/2 Nucleosil 120 – 5 C18 (Macherey & Nagel, Düren)		
Laufmittel:	A	Methanol/H ₂ O/Essigsäure (75:25:0,1, v/v/v)	
	B	Methanol/Essigsäure (100:0,1, v/v)	
Laufschema:	Zeit (min)	% Laufmittel B	Fluß (ml/min)
	0	20	0,18
	10	20	0,18
	15	100	0,36
	22	100	0,36
	24	20	0,36
	27	20	0,18
Post-Run	5	20	0,18
Retentionszeit:	13/9-HOD →	12,2	min

4.8 Fettsäureanalyse in Samen und Keimlingen

Die Analyse der freien und veresterten Fettsäuren in Samen und Keimlingen erfolgte nach der Methode der sauren Methylierung von (Miquel and Browse 1992). Dazu wurden 10 Samen bzw. Keimlinge in 1 ml 2,5% H₂SO₄ (in Methanol + 2% Dimethoxypropan) für 90 min bei 80°C inkubiert und durch Zugabe von 1 ml 0,9% NaCl-Lösung und 1 ml Hexan die Fettsäuren extrahiert. Die Hexanphase wurde abgenommen, im Stickstoffstrom verdampft und in 50 µl Acetonitril aufgenommen.

Die Trennung der Fettsäuremethylester erfolgte mittels Gaschromatographie.

Säule	122-2332 DB-23, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm (Agilent, Waldheim)		
Trägergas	Helium (konst. Fluß, 1ml/min)		
Injektion	Split-Modus, 220 °C		
Temp.-Gradient	°C/min	Next °C	Hold min
		150	1
	8	200	0
	25	250	6
Gesamtzeit	15,25 min		
Injektionsvolumen	1 µl		

Ergebnisse

1 Identifizierung von putativen TGL aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Isolierung und Charakterisierung von TGL aus *A. thaliana* wurde die Strategie der „*in silico*“ Klonierung angewendet, d. h. es wurden zunächst mit Hilfe von Sequenzvergleichen potentielle TGL-Sequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken gesucht und anschließend auf ihre Funktion hin charakterisiert. Abb. 1 zeigt diese Strategie schematisch.

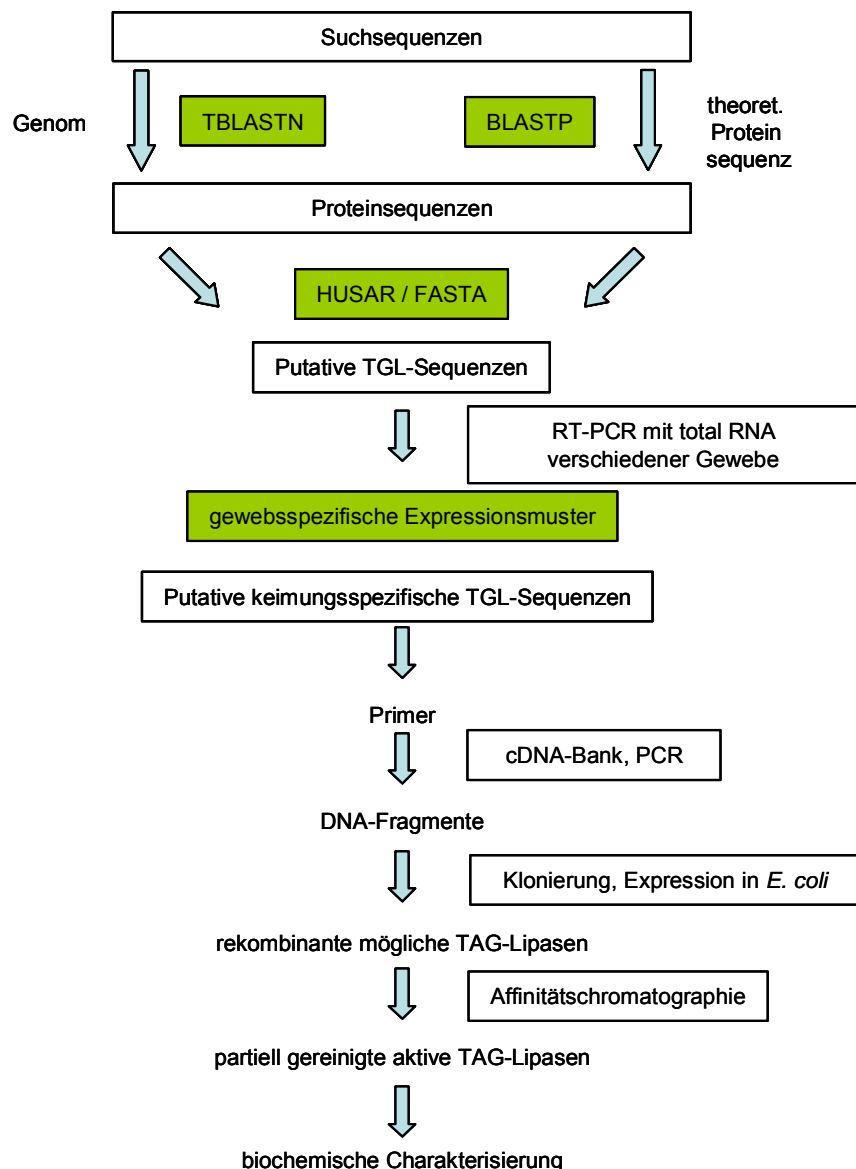


Abb.1: Flussdiagramm der „in silico“-Klonierung.

Aus öffentlich zugänglichen Datenbanken von *A. thaliana* wurden insgesamt 44 verschiedene putative Gensequenzen ausgewählt, die Ähnlichkeit zu bekannten TGL anderer Organismenreiche besitzen. Sieben dieser Sequenzen wurden nicht weiterverfolgt,

da sie durch Arbeiten anderer Gruppen als Proteine mit anderen Enzymaktivitäten als die einer TGL charakterisiert worden waren. Um die Anzahl der potentiellen TGL - Sequenzen weiter einzugrenzen, wurden die restlichen 33 Kandidaten zunächst auf ihre organspezifische Expression hin untersucht.

1.1 Analyse der Expressionsmuster von 33 TGL-Kandidaten

Northern Blots erbrachten in mehreren Fällen keine oder nur schwache Signale, was auf die geringe Ausbeute an RNA (z. B. aus etiolierten Keimlingen) sowie auf schwache Expression der TGL-Kandidaten zurückzuführen sein könnte. Als alternative Methode wurde daher die sensitivere RT-PCR (siehe 4.5.5) durchgeführt, bei deren Anwendung nur geringe Mengen RNA benötigt werden. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen, auf deren Basis 11 Sequenzen zur weiteren Charakterisierung ausgewählt wurden: Auf Grund ihrer spezifischen Expression in Schoten und Keimlingen wurden die TGL-Kandidaten 6b, 9, 20, 24 und 25 weiter charakterisiert. Die TGL-Kandidaten 2 und 2-H (96 % Identität zu TGL 2) werden in mehreren Geweben exprimiert und zeigen die stärkste Expression in etiolierten Keimlingen. Ausgewählt wurden außerdem die Kandidaten 4a, 4b, 5, 6a, 6b, 7a und 7b aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit zu Lip 2 und 2-H. Die TGL-Kandidaten 31 und 32 waren ebenfalls interessant, auf Grund ihrer großen Ähnlichkeit zu *TGL3*, einer kürzlich aus Hefe identifizierten TGL (Athenstaedt and Daum 2003). Die TGL-Kandidaten 3 und 3-H schließlich zeigten eine Sequenzübereinstimmung von 70 % zu Atlip 1, einer TGL, die kürzlich identifiziert wurde (Arondel 2003).

In der vorliegenden Arbeit wird im Weiteren nur die Charakterisierung der TGL-Kandidaten Lip 2 und Lip 2-H dargestellt, da ausschließlich diese in weiteren Experimenten eindeutig als TGL identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse, die zu dieser Eingrenzung führten werden aber aus Gründen der Chronologie erst in einem späteren Kapitel dargestellt (s. Expression in *E. coli*). Auf die Daten zu anderen TGL wird in der Diskussion eingegangen.

Name	Genloкус	Wurzel	Stiel	Blatt	Blüte	Schote	etiolierte Keimlinge	hellgekeimte Keimlinge
Lipase 1	At3g02410	/	/	/	/	/	/	/
Lipase 2	At1g28670							
Lipase 2-H	At1g28660							
Lipase 3	At1g18460							
Lipase 3-H	At1g73920							
Lipase 4a	At1g28650							
Lipase 4b	At1g28640	/	/	/	/	/	/	/
Lipase 5	At1g28610							
Lipase 5-H1	At1g31550							
Lipase 5-H2	At2g27360							
Lipase 6a	At1g28600							
Lipase 6b	At1g28590							
Lipase 7a	At1g28570							
Lipase 7b	At1g28580							
Lipase 8	At2g13410							
Lipase 9	At3g62590							
Lipase 10	At3g52430							
Lipase 11	At2g30550	/	/	/	/	/	/	/
Lipase 12	At4g16820	/	/	/	/	/	/	/
Lipase 14	At5g03980							
Lipase 15	At3g48460							
Lipase 17	At4g13550							
Lipase 20	At5g22810							
Lipase 21	At5g55050							
Lipase 22	At3g55190							
Lipase 23	At1g30370	/	/	/	/	/	/	/
Lipase 24	At5g40990							
Lipase 24-H1	At1g53940							
Lipase 24-H2	At1g53990							
Lipase 24-H3	At3g14225	/	/	/	/	/	/	/
Lipase 25	At3g14820							
Lipase 27	At1g52760							
Lipase 28	At1g09390							
Lipase 30	At5g33370							
Lipase 31	At5g04040							
Lipase 32	At3g57140							

Abb. 2: Übersicht der Gewebespezifität aller ausgewählten putativen TGL auf Basis der semiquantitativen RT-PCR. Ein höheres Expressionniveau ist durch intensivere Farbgebung dargestellt.

2 Identifizierung einer neuen putativen TGL-Familie

Bei Vergleichen (BLASTP in HUSAR) der Aminosäuresequenzen der TGL-Kandidaten Lip 2 und Lip 2-H zeigte sich, dass die Sequenzen der putativen TGL 4a, 4b, 5, 6a, 6b, 7a und 7b eine große Ähnlichkeit zu den TGL-Kandidaten Lip 2 und 2-H besaßen. Eingehendere Analysen zeigten dabei, dass die Aminosäuresequenzen in bestimmte Regionen besonders konserviert sind. Sequenzanalysen zeigten, dass es sich bei den Mitgliedern der TGL-Familie wahrscheinlich um G-D-S-L-Lipasen handelt. Die dafür charakteristischen Konsensus-Blöcke (Abb. 3, schwarze Rahmen) sind in allen Mitgliedern der Gen-Familie konserviert. Die in ihnen enthaltenen Aminosäuren bilden sowohl Teile des aktiven Zentrums (↓) wie auch des Oxyanion-Lochs(●). Ebenfalls enthalten ist das Motiv: F-P-x-G, das einen Teil der katalytischen Domäne in Acyltransferasen darstellt (Abb. 3, schwarze Balken). Der zweite Teil dieser katalytischen Domäne, das Motiv N-H(x)₄-G ist nicht vorhanden. Die Suche nach Sekundärstrukturen auf Basis der Proteinsequenzen sowie die Suche nach konservierten Domänen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) identifizierte keine weiteren charakteristischen Domänen.

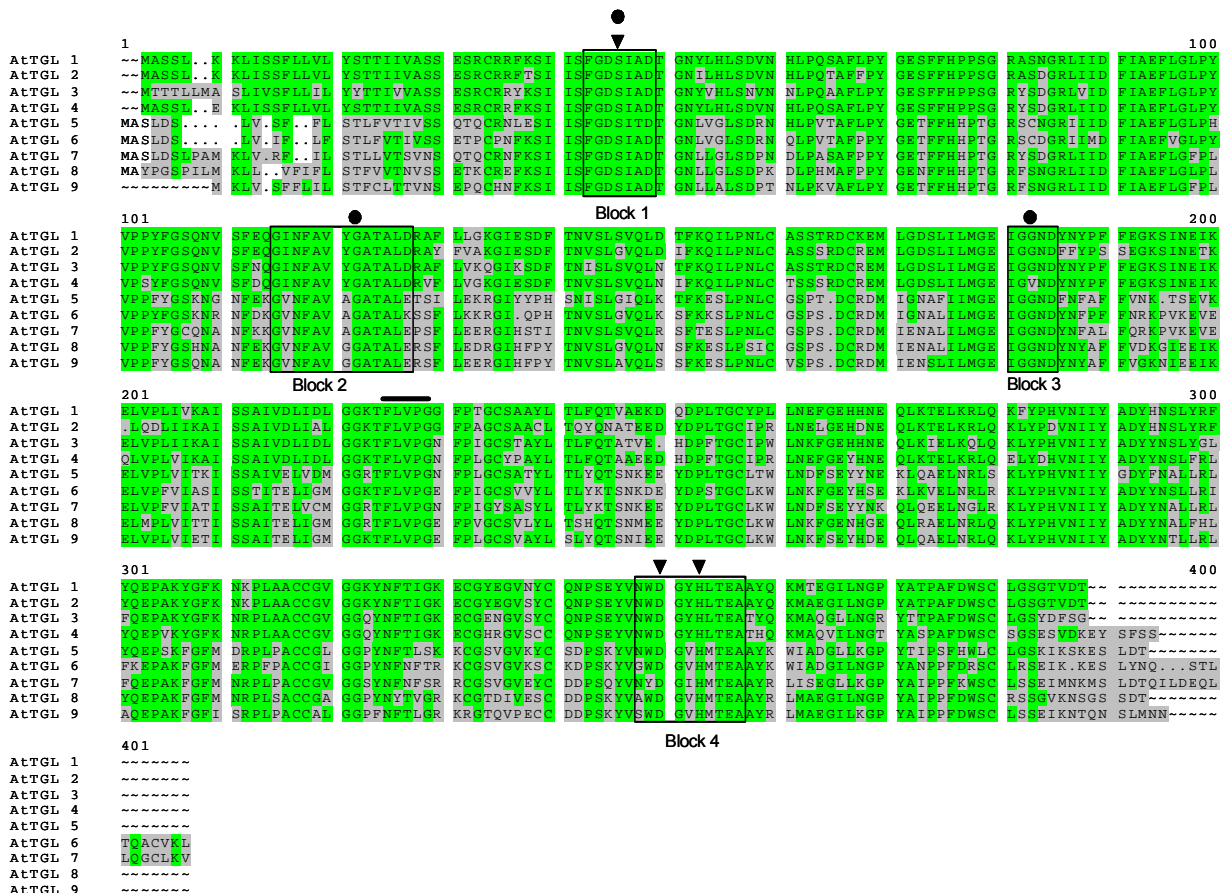


Abb.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen der putativen TGL mit Hilfe von CLUSTAW in HUSAR. Die Sequenzen wurden auf Homologie verglichen. Identische Aminosäuren: grün. Die Änderung der Namensgebung wird im Text erläutert. Die Blöcke des GDSL-Motivs sind umrahmt. Aminosäuren des aktiven Zentrums: ▼, Aminosäuren des Oxyanion-Lochs: ●.

Die starke Sequenzähnlichkeit der TGL-Kandidaten führte zu der Annahme, dass es sich möglicherweise auch bei den anderen Sequenzen um TGL handeln könnte. Daher wurden auch diese Gene in der weiteren Charakterisierung der putativen TGL 2 und 2-H berücksichtigt. Auf Grund der Ergebnisse dieses Sequenzvergleiches (Abb. 3) erfolgte eine einheitliche Benennung der TGL-Kandidaten dieser Gen-Familie, welche in Tabelle 1 zusammengefasst ist.

Tab. 1: Umbenennung der putativen TGL, die zu der neuen Gen-Familie gehören

Neuer Name	Genlokus	Alter Name
<i>AtTGL 1</i>	<i>At1g28670</i>	<i>Lipase 2</i>
<i>AtTGL 2</i>	<i>At1g28660</i>	<i>Lipase 2-H</i>
<i>AtTGL 3</i>	<i>At1g28650</i>	<i>Lipase 4a</i>
<i>AtTGL 4</i>	<i>At1g28640</i>	<i>Lipase 4b</i>
<i>AtTGL 5</i>	<i>At1g28610</i>	<i>Lipase 5</i>
<i>AtTGL 6</i>	<i>At1g28600</i>	<i>Lipase 6a</i>
<i>AtTGL 7</i>	<i>At1g28590</i>	<i>Lipase 6b</i>
<i>AtTGL 8</i>	<i>At1g28580</i>	<i>Lipase 7b</i>
<i>AtTGL 9</i>	<i>At1g28570</i>	<i>Lipase 7a</i>

Während sich die Aminosäuresequenzen aller Proteine innerhalb der Familie stark ähneln, ist die Ähnlichkeit auf Ebene der Nukleotide nicht so stark ausgeprägt (Abb. 4). In beiden Sequenzvergleichen ist jedoch deutlich sichtbar, dass die *AtTGL 3* und *4* eine deutlich stärkere Ähnlichkeit zu *AtTGL 1* und *2* aufweisen, als die *AtTGL 5, 6, 7, 8* und *9*.

1

At:TGL 1	-----ATGG	CTTCTTCAC	GAAGAAGCTT	ATCTCAAGCT	TCTACTTGT	CTTATACTCC	ACCACCAATCA	TTGTGCTTC	ATCAGAATCT	CGATGTAGCC
At:TGL 2	-----ATGG	CTTCTTCAC	GAAGAAGCTT	ATCTCAAGCT	TCTACTTGT	CTTATACTCC	ACCACCAATCA	TTGTGCTTC	ATCAGAATCT	CGATGTAGCC
At:TGL 3	ATGACGACGA	CTCTCTC	GGCTTCGCTC	ATGTAAGCT	TCTACTTGT	CTTATACTAC	ACCACCAATAG	TCGTGCTTC	ATCAGAATCT	CGGTGTAGCC
At:TGL 4	-----ATGG	CTTCTTCAC	GAAGAAGCTT	ATCTCAAGCT	TCTACTTGT	CTTATACTCC	ACCACCAATCA	TTGTGCTTC	ATCAGAATCT	CGATGTAGCC
At:TGL 5	-----A	GGCTCTCTA	GATTCCTAG	TGAGCTTCT	TTTATCTAC	CTTTTGTCA	CAATCGTGA	CTCAAAAG	CAGTGGCGA	CGTGGCGGA
At:TGL 6	-----A	GGCTCTCTA	GATTCCTAG	TGAGCTTCT	TTTATCTAC	CTTTTGTCA	CAATCGTGA	CTCAAAAG	CAGTGGCGA	CGTGGCGGA
At:TGL 7	---ATGGCAT	CTTAAAGATC	TCTTCCGGC	ATGAAGCTG	TGAGATCTA	ATTATCTAC	CTTTTGTCA	CTCTGTGA	CTCGAAAG	CAATGGCGA
At:TGL 8	ATGGCGATC	CCGGTTCGCC	TATCTGAG	AGCTTCCTG	TCTTCTTCA	TTTATCACT	TTTGTGATC	CTAAGCTAC	AACTGGCGG	CGTGGCGGA
At:TGL 9	-----AT GAAG	CTGGTAGCT	CTTCTTAA	TCTATCTACT	TTTGTCTCA	CTACTGTGA	CTCGAGCA	CAGTGCATA		

10 0

101

At:TGL 1	GTTTAAATC	GATCATCAGC	TTTGGTATT	CCATCGGAGA	CACCGGAAA	TATCTCCATC	TCTCTGATGT	CAATCACCTT	CCTCAATCCG	CCTTCTTCC
At:TGL 2	CTTTATAGTAA	AGCTTCTTCC	ATCTCCCTC	TGGTGTGCT	GCCTCAATC	ATCTCCATC	TCTCCGAGT	CAATCATCTT	CCTCAATCCG	CCTTCTTCC
At:TGL 3	GTAAATC	AATCATCAGC	TTGGTATT	CCATCGGAGA	CACCGGAAA	TATCTCCATC	TCTCCGAGT	CAATCATCTT	CCTCAATCCG	CCTTCTTCC
At:TGL 4	GTTTAAATC	GATCATCAGC	TTTGGTATT	CCATCGGAGA	CACCGGAAA	TATCTCCATC	TCTCTGATGT	TAACCACCTT	CCTCAATCCG	CCTTCTTCC
At:TGL 5	ATTCAGATC	GATTATCAGT	TTGGTATT	CGATTACCGA	CACGAGAAA	TTGGTGTGTC	TCTGGATG	TAACCACCTT	CCTGTGACCG	CGTTTCAGC
At:TGL 6	ATTCAGATC	GATCATCAGT	TTGGGATC	CGATTACCGA	CACGAGAAA	TTGGTGTGTC	TCTGTGATG	TAACCACCTT	CCTGTGACCG	CGTTTCAGC
At:TGL 7	ATTTCAATC	AATCATTAGT	TTGGGATC	CAATTGCTGA	CACGAGAAA	TTGGTGTGTC	TCTGTGATG	TAACCACCTT	CCTGTGACCG	CGTTTCAGC
At:TGL 8	ATTTCAATC	GATCATCAGT	TTGGGATC	CAATTGCTGA	CACGAGAAA	TTGGTGTGTC	TCTGTGATG	TAACCACCTT	CCTGTGACCG	CGTTTCAGC
At:TGL 9	ATTTCAATC	GATCATTAGT	TTGGGATC	CAATTGCTGA	CACGAGAAA	TTGGTGTGTC	TCTGTGATG	TAACCACCTT	CCTGTGACCG	CGTTTCAGC

20 0

201

At:TGL 1	TTATGGCGAA	AGCTTCTTCC	ATCTCCCTC	CGGTCGTGC	TCTAATGGCC	GTCTCATCAT	CGACTTCAT	GCCGAATCT	TGGGACTACC	ATACGTAGCC
At:TGL 2	TTATGGCGAA	AGCTTCTTCC	ATCTCCCTC	TGGTGTGCT	GCCTCAATC	ATCTCCATC	TCTCCGAGT	CAATCATCTT	CCTCAATCCG	CCTTCTTCC
At:TGL 3	TTATGGCGAA	AGCTTCTTCC	ATCTCCCTC	CGGTCGTGC	TCTAATGGCC	GTCTCATCAT	CGACTTCAT	GCCGAATCT	TGGGACTACC	ATACGTAGCC
At:TGL 4	TTATGGCGAA	AGCTTCTTCC	ATCTCCCTC	TGGTGTGCT	GCCTCAATC	ATCTCCATC	TCTCCGAGT	CAATCATCTT	CCTCAATCCG	CCTTCTTCC
At:TGL 5	GTATGGAGAA	ACCTTCTTCC	ACCAACCAAC	TGGCGGTTC	TGCAACGGCC	GTATCATCAT	CGACTTCAT	GCCGAATCT	TGGGACTACC	ATACGTAGCC
At:TGL 6	GTATGGAGAA	ACCTTCTTCC	ACCAACCAAC	TGGCGGTTC	TGCAACGGCC	GTATCATCAT	CGACTTCAT	GCCGAATCT	TGGGACTACC	ATACGTAGCC
At:TGL 7	GTATGGAGAA	ACCTTCTTCC	ACCAACCAAC	TGGCGGTTC	TGCAACGGCC	GTATCATCAT	CGACTTCAT	GCCGAATCT	TGGGACTACC	ATACGTAGCC
At:TGL 8	GTATGGAGAA	ACCTTCTTCC	ACCAACCAAC	TGGCGGTTC	TGCAACGGCC	GTATCATCAT	CGACTTCAT	GCCGAATCT	TGGGACTACC	ATACGTAGCC
At:TGL 9	GTATGGAGAA	ACCTTCTTCC	ACCAACCAAC	TGGCGGTTC	TGCAACGGCC	GTATCATCAT	CGACTTCAT	GCCGAATCT	TGGGACTACC	ATACGTAGCC

300

301

At:TGL 1	CCTTACTTTG	GATCCAAAA	CGTTAGCTTC	GAACAAGGGA	TCAATTTGGC	GGTGTATGGA	GCAACGSCAT	TGGACCGAGC	GTTTCTTTG	GGAAAGGAA
At:TGL 2	CCTTACTTTG	GATCCAAAA	CGTTAGCTTC	GAACAAGGGA	TCAATTTGGC	GGTGTATGGA	GCAACGSCAT	TGGACCGAGC	GTTTCTTTG	GGAAAGGAA
At:TGL 3	CCTTACTTTG	GATCCAAAA	CGTTAGCTTC	GAACAAGGGA	TCAATTTGGC	GGTGTATGGA	GCAACGSCAT	TGGACCGAGC	GTTTCTTTG	GGAAAGGAA
At:TGL 4	CTTATTTATG	GATCTAAAAA	TGGAACATTT	GAGAAAGGAT	TTAATTTCCG	TGTTGCGGGA	GCAACGGCAC	TAGAAACTTC	CATTCTTTAG	AAGAGAGGAA
At:TGL 5	CTTATTTATG	GATCTAAAAA	TGGAACATTT	GAGAAAGGAT	TTAATTTCCG	TGTTGCGGGA	GCAACGGCAC	TAGAAACTTC	CATTCTTTAG	AAGAGAGGAA
At:TGL 6	CCGCTTTATG	GATCTAAAAA	TGGAACATTT	GAGAAAGGAT	TTAATTTCCG	TGTTGCGGGA	GCAACGGCAC	TAGAAACTTC	CATTCTTTAG	AAGAGAGGAA
At:TGL 7	CCGCTTTATG	GATCTAAAAA	TGGAACATTT	GAGAAAGGAT	TTAATTTCCG	TGTTGCGGGA	GCAACGGCAC	TAGAAACTTC	CATTCTTTAG	AAGAGAGGAA
At:TGL 8	CCATTTCTATG	GATCTAAAAA	TGGAACATTT	GAGAAAGGAT	TTAATTTCCG	TGTTGCGGGA	GCAACGGCAC	TAGAAACTTC	CATTCTTTAG	AAGAGAGGAA
At:TGL 9	CCATTTCTATG	GATCTAAAAA	TGGAACATTT	GAGAAAGGAT	TTAATTTCCG	TGTTGCGGGA	GCAACGGCAC	TAGAAACTTC	CATTCTTTAG	AAGAGAGGAA

40 0

401

At:TGL 1	TTGAACTGTA	TTTACCAAT	GTTAGTTTAA	GTGTTACAGT	TGACRCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 2	TTGAACTGTA	TTTACCAAT	GTTAGTTTAA	GTGTTACAGT	TGACRCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 3	TTGAACTGTA	TTTACCAAT	GTTAGTTTAA	GTGTTACAGT	TGACRCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 4	TTTATTTATC	TCACAGCAAC	ATCAGTTTGG	GAATTCAGCT	TAGACCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 5	TTTATTTATC	TCACAGCAAC	ATCAGTTTGG	GAATTCAGCT	TAGACCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 6	TTCT...ACC	ACACCAAC	GTTAGTTTAA	GTGTTACAGT	TGACRCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 7	TTCT...ACC	ACACCAAC	GTTAGTTTAA	GTGTTACAGT	TGACRCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 8	TTCT...ACC	ACACCAAC	GTTAGTTTAA	GTGTTACAGT	TGACRCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA
At:TGL 9	TTCT...ACC	ACACCAAC	GTTAGTTTAA	GTGTTACAGT	TGACRCTTCC	AAGCAGATT	TGCCTAAGCT	ATCGGCTCG	TCTACTCGT	ATTGCAAGA

50 0

501

At:TGL 1	GATGCTTGG	GACTGGCTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 2	GATGCTTGG	GACTGGCTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 3	GATGCTTGG	GACTGGCTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 4	GATGCTTGG	GACTGGCTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 5	TATGATTGAA	AATGCTTTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 6	TATGATTGAA	AATGCTTTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 7	TATGATTGAA	AATGCTTTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 8	TATGATTGAA	AATGCTTTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT
At:TGL 9	TATGATTGAA	AATGCTTTGA	TACTCATGGG	AGAGATTGGA	GGAAACGACT	ATAATTACCC	ATTTTGTGA	GGAAAAAGTA	TCAATGAAAT	CAAAGAGCT

60 0

601

At:TGL 1	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 2	CAGGATTGTA	TCATCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 3	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 4	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 5	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 6	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 7	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 8	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT
At:TGL 9	GTTTCTTAA	TCGTCAAAG	TATTCTTCT	GCTATTGTGG	ATTTGATGTA	TTTAGGGGG	AAAACATTTT	TGGTACC	AGGCTTCCCA	ACAGGATGT

70 0

701

At:TGL 1	CTGGCGGTA	TCCTACTCTA	TTTCAGACCG	TGGCAGAAA	AGACCAAGC	CCTTTACAG	GTGTTTACC	ATTGCTCAAC	GAATTTGGC	AGCACCAAA
At:TGL 2	CCGCGGCGTA	TCCTACTCTA	TTTCAGACCG	TGGCAGAAA	AGACCAAGC	CCTTTACAG	GTGTTTACC	ATTGCTCAAC	GAATTTGGC	AGCACCAAA
At:TGL 3	CCGCGGCGTA	TCCTACTCTA	TTTCAGACCG	TGGCAGAAA	AGACCAAGC	CCTTTACAG	GTGTTTACC	ATTGCTCAAC	GAATTTGGC	AGCACCAAA
At:TGL 4	ATCCCGGTA	TCCTACTCTA	TTTCAGACCG	TGGCAGAAA	AGACCAAGC	CCTTTACAG	GTGTTTACC	ATTGCTCAAC	GAATTTGGC	AGCACCAAA
At:TGL 5	ATCCCGGTA	TCCTACTCTA	TTTCAGACCG	TGGCAGAAA	AGACCAAGC	CCTTTACAG	GTGTTTACC	ATTGCTCAAC	GAATTTGGC	AGCACCAAA
At:TGL 6	CAGTAGCTA	TTTGACATTA	TACAAACAT	CAAAACAGGA	CGAATACGAT	CCTTCAACG	GATGTTTAA	ATGGTTGAA	AAGTTTTCG	AATACCATG
At:TGL 7	CAGTAGCTA	TTTGACATTA	TACAAACAT	CAAAACAGGA	CGAATACGAT	CCTTCAACG	GATGTTTAA	ATGGTTGAA	AAGTTTTCG	AATACCATG
At:TGL 8	CAGTAGCTA	TTTGACATTA	TACAAACAT	CAAAACAGGA	CGAATACGAT	CCTTCAACG	GATGTTTAA	ATGGTTGAA	AAGTTTTCG	AATACCATG
At:TGL 9	CAGTAGCTA	TTTGACATTA	TACAAACAT	CAAAACAGGA	CGAATACGAT	CCTTCAACG	GATGTTTAA	ATGGTTGAA	AAGTTTTCG	AATACCATG

80 0

801

At:TGL 1	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 2	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 3	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 4	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 5	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 6	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 7	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 8	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA
At:TGL 9	CGAACAGCTA	AAGACAGAAC	TCAAGCGACT	CCAAAATTC	TATCTCATG	TCAACATCAT	TTACGCTGAC	TACCACAAC	CCTTATACC	GTTTTATCAA

90 0

Abb. 4: Sequenzvergleich auf Ebene der Nukleotide der Lipasen mit Hilfe von CLUSTAW in HUSAR. Deutsche Nukleotide: blau.

Auffällig war die direkte nachbarschaftliche Lage der genomischen Sequenzen aller neuen TGL-Kandidaten auf Chromosom I (Abb. 5). Die eng benachbarten Gene werden nur durch die Gene *At1g28620* und *At1g28630* voneinander getrennt. *At1g28620* besitzt zwar große Ähnlichkeit zur TGL-Gen-Familie, ist aber als Pseudogen annotiert. *At1g28630* hat keine Ähnlichkeit zu der neuen Gen-Familie und kann aufgrund der Sequenzvergleiche lediglich als exprimiertes Protein eingeordnet werden, jedoch ohne Hinweis auf eine mögliche Funktion.

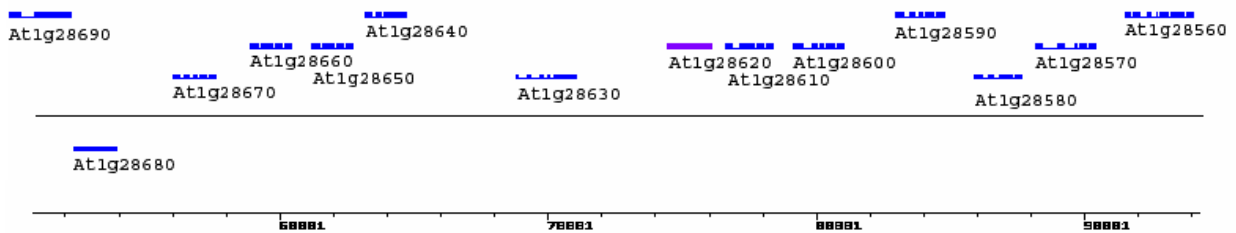


Abb. 5: Schematische Darstellung der Gene der TGL-Familie auf Arabidopsis Chromosom I. Dargestellt ist der Abschnitt (F1K23) auf Chromosom I mit den Genen der TGL-Familie. Blau: Exons; Weiß: Introns.

Im phylogenetischen Überblick mit bekannten Hydrolasen aus *A. thaliana* bildet die neue Gen-Familie einen eigenen phylogenetischen Zweig, der sich zwar neben die Gruppe der sekretorischen PLA₂ in das Gesamtbild fügt, sich aber deutlich von allen anderen Hydrolasen absetzt (Abb.6).

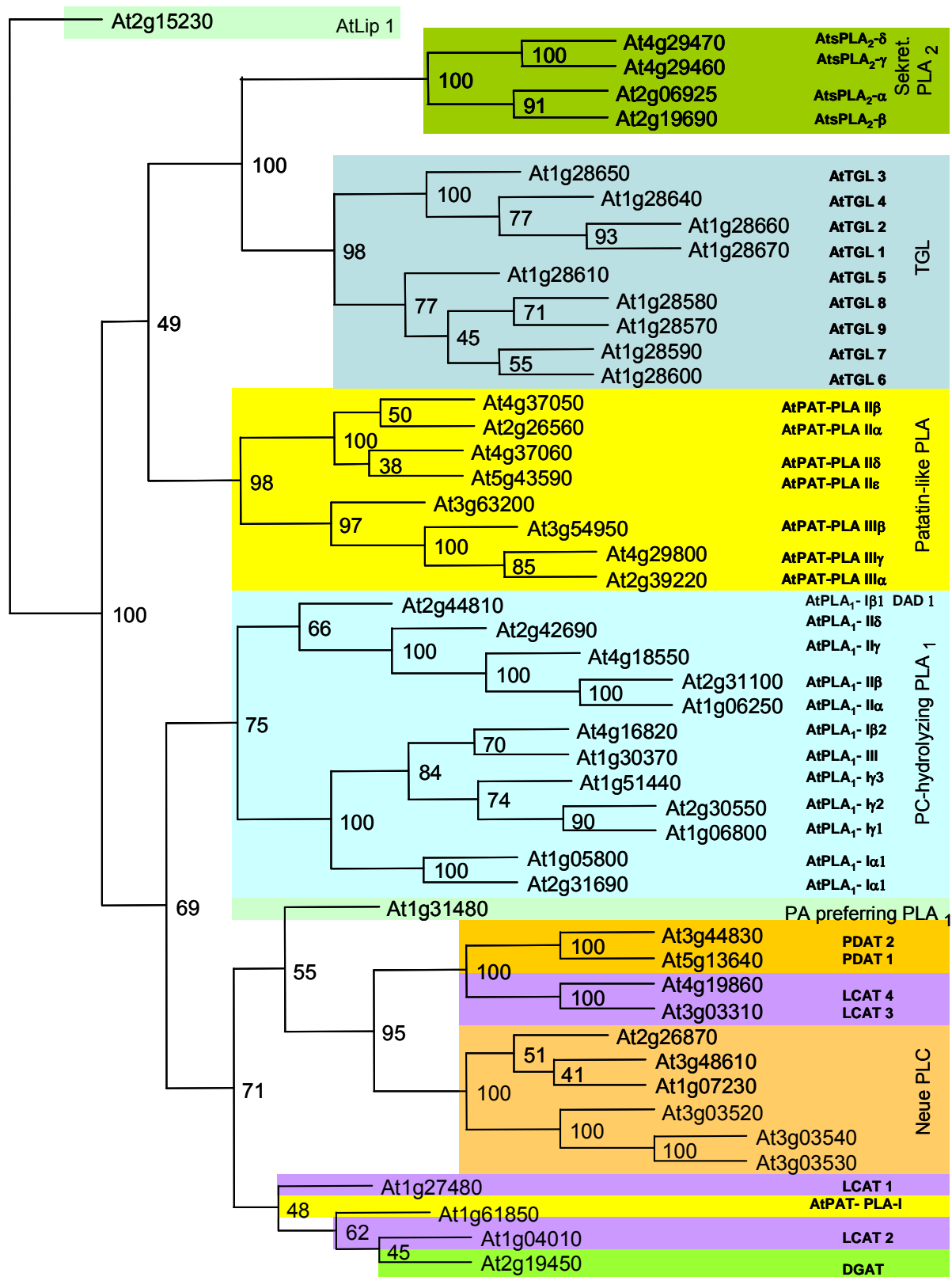


Abb. 6: Phylogenetische Eingruppierung der TGL-Familie zu Gruppen bereits bekannter Hydrolasen in *A. thaliana*. Die Vertreter der *A. thaliana* PLAs (Ryu 2004), die AtLCATs (Noiriel, Benveniste et al. 2004), die neuen PLCs (Nakamura and Nara 2004), die AtPDAT1 und 2 (Stahl, Carlsson et al. 2004), (Stahl, Carlsson et al. 2004) sowie die AtDGAT (Zou, Wei et al. 1999) wurden gemeinsam mit den neuen TGL anhand ihrer Proteinsequenzen mit Hilfe von PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) phylogenetisch klassifiziert.

2.1 Die spezifische Expression der AtTGL-Familie

Wegen der ausgeprägten Ähnlichkeit der *AtTGL*-Sequenzen stellte sich die Frage, ob es sich bei der Gen-Familie um Genduplikationen jüngeren Datums handelt oder ob alle Gene der TGL-Familie exprimierte Proteine mit Enzymaktivität sind, die sich eventuell nur durch Expressionsort und -zeit unterscheiden. Da in den vorangegangenen Experimenten die Sensitivität von Northern Blots nicht ausreichte, wurde auf die Erstellung so genannter „Digitaler Northern Blots“ zurückgegriffen, um die gewebespezifischen Expressionsmuster der TGLs zu beschreiben. Bei dieser Methode handelt es sich um die computergestützte Darstellung der Expressionsstärke eines Genes in einem ausgewählten Set von Mikroarrays (Affymetrix GeneChips®). Die gewählten Arrays stammen aus verschiedenen Quellen, Annotierungsgruppen und Typen (8k and 25k Chips). Dargestellt wird die Expressionsstärke als Anzahl für das Gen positiver Chips, wobei zu beachten ist, dass die Aussagekraft dieser Auswertungen stark von der Spezifität der auf den Arrays verwendeten cDNAs abhängt. Für *AtTGL 2* konnte kein „digitaler Northern Blot“ ermittelt werden, da dieses Gen in der verwendeten Datenbank (<http://genevestigator.eth.ch.>) zum Zeitpunkt der Analyse nicht präsent war.

Für jedes Gen der *AtTGL*-Familie (außer *AtTGL 2*) wurde ein gewebsspezifischer und ein entwicklungspezifischer „Digitaler Northern Blot“ erstellt Abb. 7 und 8. Aus den gewebespezifischen „Digitalen Northern Blots“ geht hervor, dass *AtTGL 1*, *6* und *8* deutlich stärker exprimiert werden als die anderen Vertreter der TGL-Familie. *AtTGL 1* ist besonders stark in Keimlingen exprimiert, kommt aber auch in verschiedenen anderen Geweben z. B. Samen und Blättern, vor allem während der Seneszenz vor. *AtTGL 6* zeigt eine besonders hohe Expressionsstärke in Sepalen und in seneszenten Blättern, während *AtTGL 8* nahezu ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird. Bei den Vertretern der TGL-Familie, die sehr schwach exprimiert werden, fallen die „Digitalen Northern Blots“ von *AtTGL 3* und *4* auf, da sie nahezu identisch aussehen. Da die Aussagekraft der Daten, wie bereits erwähnt, sehr von den verwendeten Sonden abhängt, und *AtTGL 3* und *4* sehr hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, (vgl. Abb.4) ist eine Überschneidung der Expressionsmuster von *AtTGL 3* und *4* wahrscheinlich. *AtTGL 3*, *4*, *5*, *6*, *7*, *8* und *9* zeigen eine gleich bleibende Expressionsstärke der Gene über den gesamten Zeitraum der verschiedenen Entwicklungsphasen der Pflanze. *AtTGL 1* dagegen zeigt im Zuge der Keimung und Keimlingsentwicklung während der ersten 6 Tage starke Expression, die anschließend jedoch bis zum 14. Tag auf etwa ein Viertel reduziert wird und im Verlauf der weiteren Entwicklung weiter abnimmt.

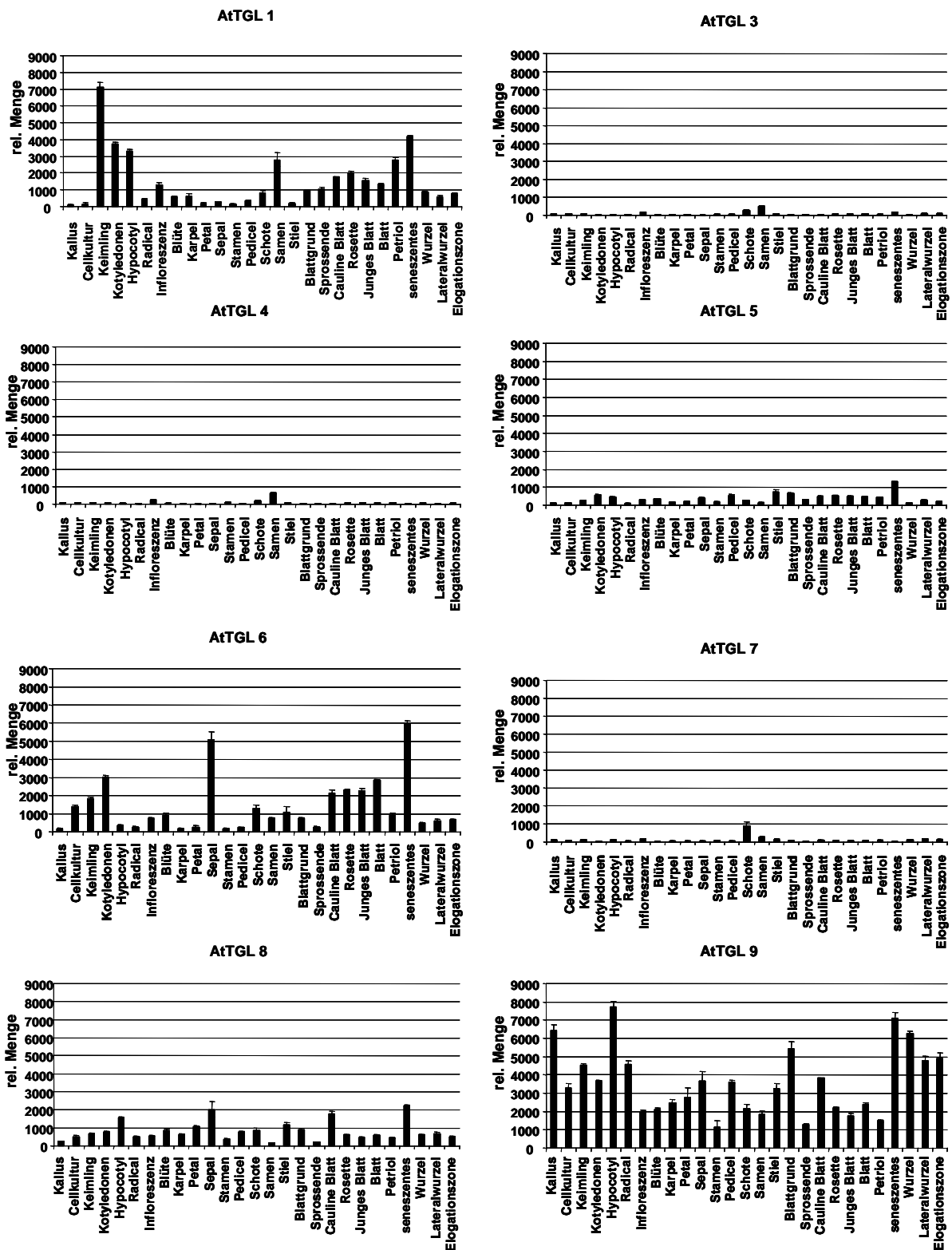


Abb. 7: Darstellung der gewebsspezifischen Expression der einzelnen TGL-Vertreter. Die Analyse erfolgte auf Basis einer Datenbank durchgeführter Experimente, die 22000 Chips entsprechen (<http://genevestigator.eth.ch>). AtTGL 2 war im Datenset nicht enthalten.

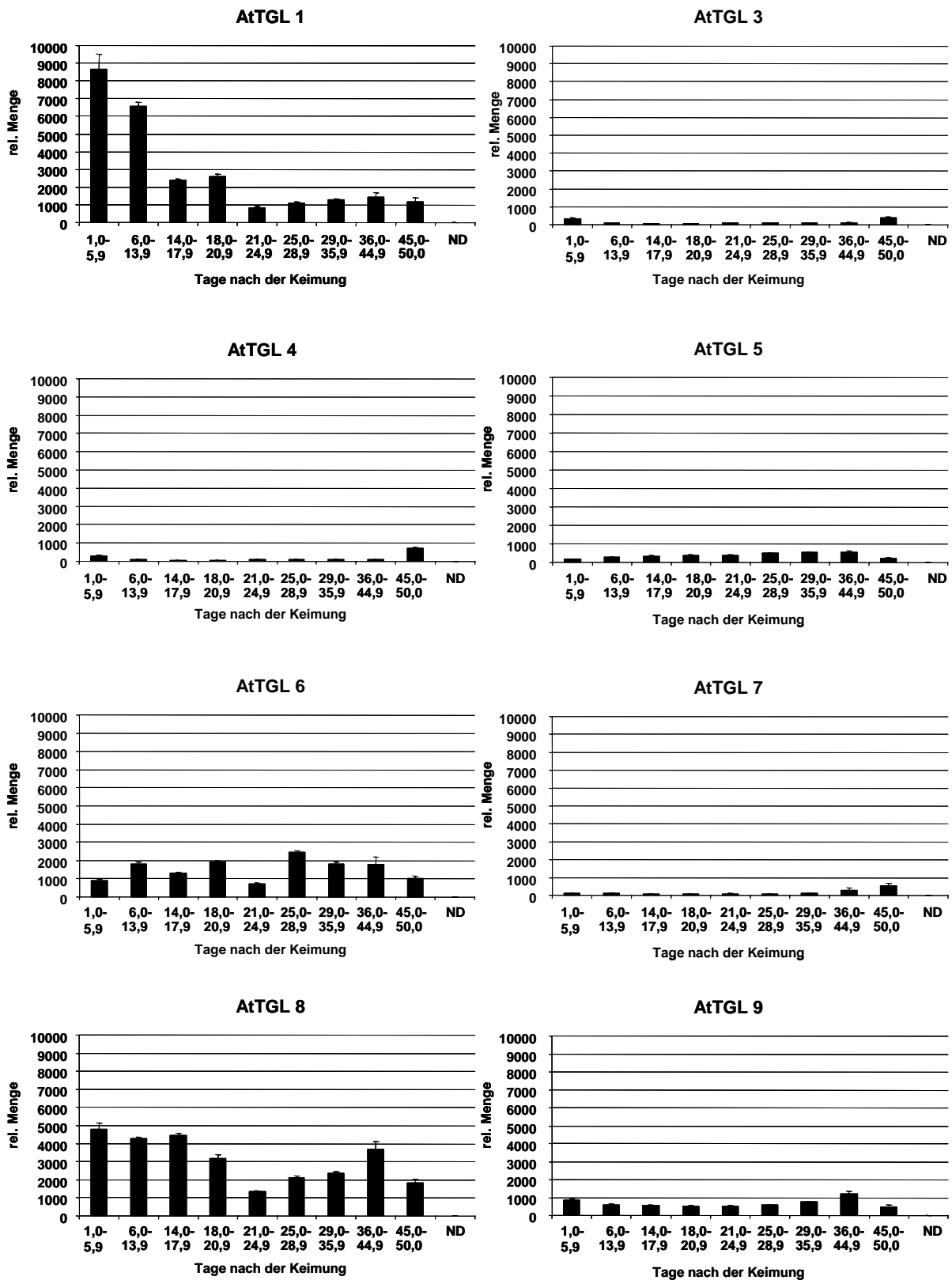


Abb. 8: Expressionsstärke der einzelnen Vertreter der TGL-Familie während verschiedener Entwicklungsstadien von *A. thaliana*. Die gezeigten Daten repräsentieren die Auswertung einer Datenbank ausgeführter Experimente. die 22 000 Chips entsprechen (<http://genevestigator.eth.ch>).

Da die „Digitalen Northern Blots“ nur einen ersten Hinweis auf die Expressionsspezifität der Gene sind, wurde die gewebsspezifische Expression von *AtTGL 1* und *2* über semiquantitative RT-PCR zusätzlich experimentell bestimmt. Dazu wurden 5 µg Gesamt-RNA verschiedener Gewebe in cDNA umgeschrieben, aus welcher dann mit spezifischen Primern die gesuchten DNA-Fragmente amplifiziert wurden. In Abb. 9a ist die gewebespezifische Expression von *AtTGL 1* und *2* in *A. thaliana* nach semiquantitativer RT-PCR dargestellt. Die verwendeten Primer stammen aus den 3'- bzw. 5'-codierenden Bereichen der Gene, die bei *AtTGL 1* und *2* nahezu identisch sind. Daher ist eine Unterscheidung von *AtTGL 1* und *2* nicht möglich. Ein Problem der RT-PCR bestand in der Differenzierung von *AtTGL 1* und *2*, da diese beiden Gene auf Nukleotidebene zu 96 % identisch sind (s. Abb. 4). Zur Amplifikation mussten Primer in Sequenzbereichen von *AtTGL 1* und *2* gewählt werden, die nur wenig Ähnlichkeit zueinander besitzen. Derartige Bereiche waren innerhalb der kodierenden Regionen der beiden Gene nicht vorhanden und daher wurden Sequenzen im 3'-untranslatierten und im 5'-untranslatierten Bereich gewählt. Primerkombinationen, deren Sequenzen ausschließlich aus den 3'- bzw. 5'-untranslatierten Bereichen stammten, brachten leider keine Ergebnisse. Daher wurde eine Primerkombination gewählt, bei der ein Primer innerhalb des 5'-Bereiches des Genes liegt, und daher nicht zwischen *AtTGL 1* und *2* differenziert, während der andere aus der 3'-untranslatierten Region stammt und genspezifisch ist.

Da die hier verwendete Methode nur semiquantitativer Natur ist, lassen sich nur grobe Aussagen über die Expressionsstärke treffen. Sichtbar ist eine Expression von *AtTGL 1* und/oder *2* in nahezu allen getesteten Geweben, wenngleich auch von sehr unterschiedlicher Stärke. Ein Intensitätsvergleich der unteren Kontroll-Bande (Aktin: 648 bp) mit der *AtTGL*-Bande (1150 bp) lässt einen Schluss über die Expressionsstärke der beiden *AtTGL* zu, demzufolge die Expression in grünen Keimlingen deutlich stärker ist als in den anderen Geweben. Ein Vergleich dieses Experimentes mit dem „Digitalen Northern Blots“ von *AtTGL 1* zeigt, dass die Expressionsstärken in den getesteten Geweben nach beiden Analysen übereinstimmen, wobei hier die digitalen Daten von *AtTGL 2* fehlen, um eindeutige Aussage zu machen. Um die gewebespezifische Expression der *AtTGL 2* zu analysieren wurde eine semiquantitative RT-PCR mit einer für *AtTGL 2*-spezifischen Primerkombination durchgeführt. Dieses Ergebnis ist in Abb. 9b dargestellt. Deutlich sichtbar ist die Expression von *AtTGL 2* (1151 bp) in Blättern (schwach) und Stielen (stark), während die in cDNA von Wurzeln - und Blüten nicht nachgewiesen werden konnte. Da in den Reaktionsansätzen mit cDNA von Schoten, hell gekeimten oder etiolierten Keimlingen weder die Bande der *AtTGL 2* noch die Kontrollbande erschien, muss von einem technischen Problem der cDNA - Synthese oder der RT-PCR ausgegangen werden, sodass keine Aussagen über die Expression der *AtTGL 2* in diesen Geweben getroffen werden kann.

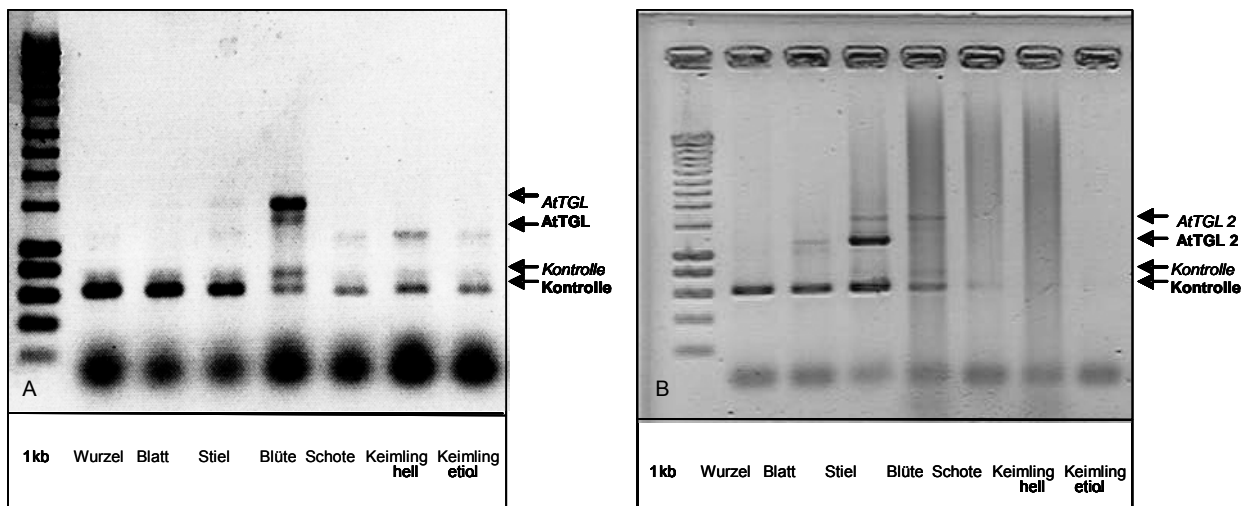


Abb. 9a, b: Analyse der gewebespezifischen Expression der AtTGL 1 und 2 mittels semiquantitativer RT-PCR. Je 2 μ l cDNA (ausgehend von 5 μ g Gesamt-RNA der einzelnen Gewebe) wurden in PCR-Reaktionen eingesetzt. Verwendet wurden Primer, die nicht spezifisch für AtTGL 1 oder AtTGL 2 (a) bzw. spezifisch für AtTGL 2 (b) waren. Ebenfalls im Ansatz enthalten war eine interne Kontrolle, die auch zwischen Banden differenziert, die aus genomischer DNA (Kursiv) oder cDNA (Fett) amplifiziert wurden.

3 Enzymatische Aktivität der TGL-Kandidaten

3.1 Expression von *AtTGL 1* und 2 in *E. coli*

3.1.1 Expression der *AtTGL1* in pQE 30

Die TGL-Kandidaten wurden zunächst aus den entsprechenden Erststrang-cDNA-Gemischen isoliert und in den bakteriellen Expressionsvektor pQE 30 kloniert. Die Primer für die Amplifikation wurden so gewählt, dass das im Vektor enthaltene N-terminale His-tag mitexprimiert wurde, um die Expression mittels anti His-tag Antiserum im Immunoblot prüfen zu können. Nach Induktion mit IPTG erfolgte die Proteingewinnung für 4 d bei 14 °C im *E. coli*-Stamm SG 13009. Die Expression der *AtTGL 1* wurde zunächst im Immunoblot mittels eines Antiserums gegen das His-Epitop bestätigt (Abb. 10). Weiterhin wurde das Bakterienlysat zum Test auf lipolytische Aktivität mit verschiedenen TAGs, die mit 5 % gummi arabicum emulgiert wurden, für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend freie Fettsäuren extrahiert. Es wurden sowohl TAGs mit oxygenierten (z. B. Lipidkörperextrakt aus Gurkenkeimlingen) als auch solche mit nicht oxygenierten Fettsäureestern (z. B. Trioleat) getestet. Dabei konnte mit *AtTGL1* Aktivität gegenüber oxygenierten und nicht oxygenierten TAGs detektiert werden. Abb. 11 zeigt den Nachweis der lipolytischen Aktivität von *AtTGL 1* mit [Carboxy]-¹⁴C –Triolein. Die freigesetzten Fettsäuren wurden extrahiert und mittels TLC aufgetrennt. Deutlich erkennbar sind die Banden der freigesetzten Ölsäure in den Proben des *AtTGL 1-E.coli*-Lysates sowie in den Kontrollen mit Lipase aus Pankreas (Sigma). Die gefundene lipolytische Aktivität war aber nicht über mehrere bakterielle Wachstumszyklen

stabil und die Lipaseaktivität war nur bei neu transformierten Zellen detektierbar. Daher wurden weitere Expressionssysteme untersucht.

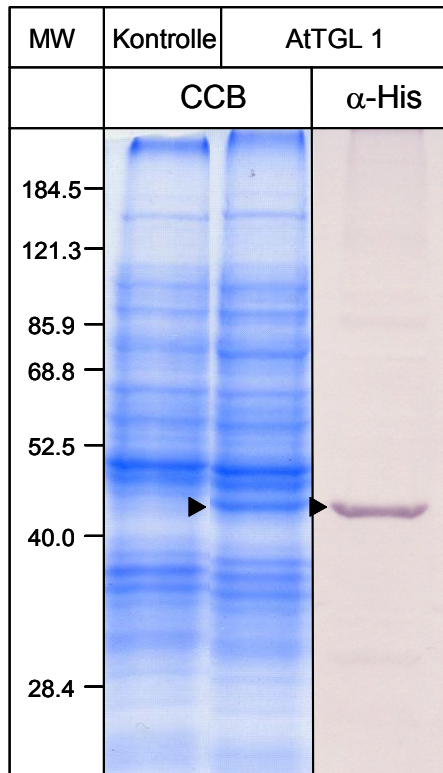


Abb.10: Gelelektrophoretische Analyse der in *E. coli* rekombinant exprimierten AtTGL 1. In den hier gezeigten Spuren wurde der Zellaufschluss von den AtTGL 1 exprimierenden *E. coli*-Zellen und den Kontrollen (nur mit Vektor transformiert) aufgetrennt. Die Immunodetektion im Western Blot erfolgte mit α -His-tag Antiserum. Der Pfeil markiert das Polypeptid mit der erwarteten Molmasse der AtTGL 1. CBB: Coomassie-Färbung.

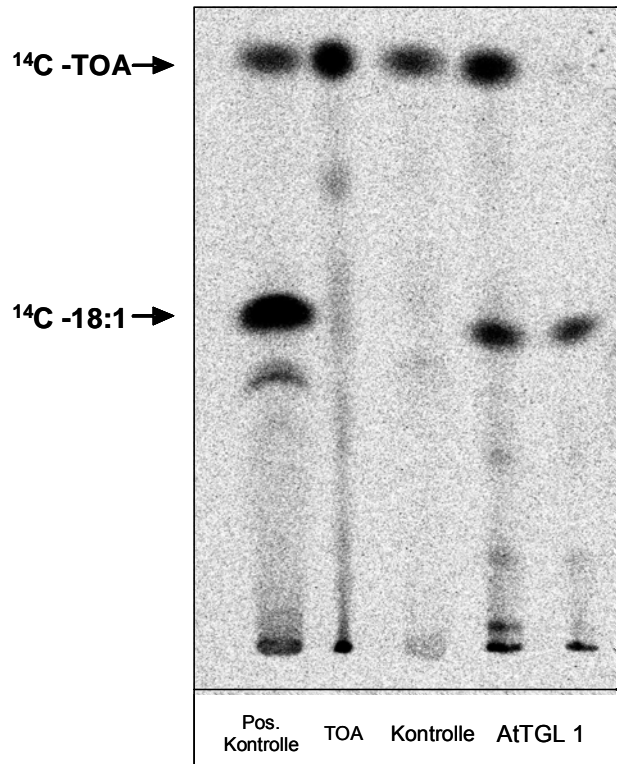


Abb. 11: Nachweis der lipolytischen Aktivität von AtTGL 1. [Carboxy]- ^{14}C -Triolein wurde mit einem Lysat der AtTGL 1 exprimierenden *E. coli*-Zellen für 40 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wurden die Lipide extrahiert und über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Kontrollen wurde mit Pankreas-Lipase umgesetztes Triolein (pos. Kontrolle), [Carboxy]- ^{14}C -Triolein (TOA) sowie eine nur den Expressionsvektor (Kontrolle) enthaltende Probe eingesetzt. Der Pfeil markiert die Migration der freigesetzten Ölsäure.

3.1.2 Expression von *AtTGL 1* in pQE 70

Dieser Vektor enthält im Gegensatz zu pQE30 ein C-terminales His-tag. Er wurde gewählt, um die Aktivität des rekombinanten Enzymes auch mit C-terminalem His-tag zu testen. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm SG 13009. Hier waren die anschließenden Aktivitätstests ohne Erfolg.

3.1.3 Expression von *AtTGL 1* und *2* in pDest14 und pDest17

Für weitere Expressionsversuche wurde nun das GATEWAY®-System (Invitrogen) verwendet, da hier die einmalige Klonierung der PCR Fragmente in einen Donor-Vektor genügt, um ein und denselben Klon in unterschiedliche Expressionsvektoren verschiedener Expressionssysteme zu testen. Die TGL-Kandidaten wurden in den Donor-Vektor pENTRY 1a bzw. 3a kloniert und mittels CLONASE®-Reaktion in die *E. coli*-Expressionsvektoren pDest14 und pDest17 übertragen. pDest14 enthält im Gegensatz zu pDest17 keine His-tag Sequenz. Die Expression erfolgte mit beiden Vektoren im *E. coli*-Stamm Rosetta. Dieser Stamm umgeht Probleme mit der „codon-usage“ von Eukaryoten, da er zusätzlich auch für *E. coli* eher seltene t-RNAs enthält. Auch hier konnte nur eine schwache Proteinexpression nachgewiesen werden. Lipolytische Aktivität konnte nicht detektiert werden.

3.1.4 Expression von *AtTGL 1* und *2* in pET20 und pET22

AtTGL 2 wurde schließlich in die Vektoren pET20 und pET22 kloniert, welche eine Signalsequenz zur Sekretion in den periplasmatischen Raum an den N-Terminus der exprimierten Proteine anhängen. Die Möglichkeit der Sekretion des exprimierten Proteins aus den lebenden Zellen während der Expression senkt die Konzentration des Proteins in der Zelle und damit das Risiko der Bildung von Einschlußkörpern. Die Vektoren wurden wiederum in den *E. coli*-Stamm Rosetta transformiert. Zur Isolierung der im Periplasma enthaltenen Proteine wurden die Zellen nach der Expression einem osmotischen Schock unterzogen (siehe 4.6.3), bei dem die Zellen die Proteine aus dem periplasmatischen Raum freisetzen sollten. Die periplasmatische Fraktion (Überstand) und der Zellrückstand wurden mit Lipidkörperextrakt aus Gurkenkeimlingen, der Tri-13 HPODE enthält, für 45 min bei 40 °C inkubiert. Aus dem Ansatz wurden die freigesetzten Fettsäuren extrahiert und mit HPLC analysiert (siehe 4.7.2.2). Deutlich erkennbar war ein starkes Signal bei einer Retentionszeit von 9,4 min, dessen UV-Spektrum ein Maximum bei 234 nm aufwies. Diese Analyse zeigte für *AtTGL 2* Lipaseaktivität gegenüber oxygenierten Fettsäuren. Abb. 12 zeigt die HPLC-Quantifizierung der Produkte dieses Aktivitätsnachweises (Daten von *AtTGL 1* nicht dargestellt). Der Reaktionsansatz, der mit der Periplasmatische Fraktion inkubiert worden war, zeigte einen deutlich höheren Gehalt an 13-HPODE als der des Zellrückstandes, was lipolytische Aktivität und einen höheren Gehalt an aktivem Protein nachweist. Die lipolytische Aktivität von *AtTGL 2* exprimierenden *E. coli*-Zellen konnte ebenfalls durch die Umsetzung

von [Carboxy]-¹⁴C–Triolein nachgewiesen werden. Die dabei freigesetzte [Carboxy]-¹⁴C–Fettsäuren wurden extrahiert und mittels TLC aufgetrennt. In Abb. 13 sind die Banden der freigesetzten [Carboxy]-¹⁴C–Ölsäure in den Proben des *AtTGL 2*-*E.coli*-Lysates sowie in den Kontrollen mit Lipase aus Pankreas (Sigma) deutlich erkennbar. Weitere Versuche zeigten jedoch, dass die Expression auch in diesem System nicht stabil war.

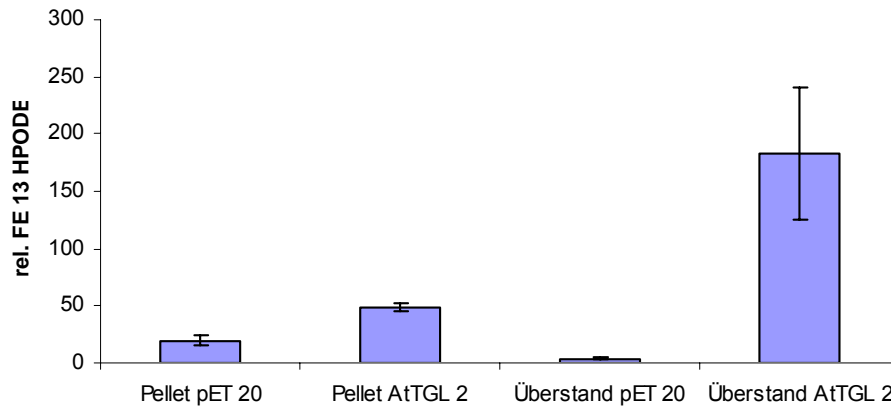


Abb.12: Produktanalyse der Inkubation der rekombinanten *AtTGL 2* mit Lipidextrakt aus keimenden Gurkensamen. Detektiert wurde das aus der TAG-Fraktion freigesetzte 13-HODE bei 234 nm. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Analysen dargestellt.

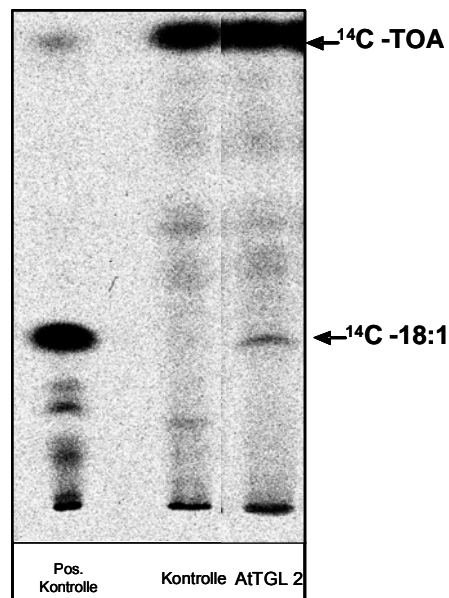


Abb.13: Nachweis der lipolytischen Aktivität von *AtTGL 2*. [Carboxy]-¹⁴C-Triolein wurde mit einem Lysat der *AtTGL 2* exprimierenden *E. coli*-Zellen für 40 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wurden die Lipide extrahiert und über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Kontrollen wurde mit Pankreas-Lipase umgesetztes Triolein (pos. Kontrolle), [Carboxy]-¹⁴C-Triolein (TOA) sowie eine nur den Expressionsvektor (Kontrolle) enthaltende Probe eingesetzt. Der Pfeil markiert die Migration der freigesetzten Ölsäure.

3.2 Expression von *AtTGL 1* und *2* in *S. cerevisiae*

Parallel zur Expression der TGL-Kandidaten in *E. coli* wurden die Enzyme in Hefe exprimiert, da Hefen als Eukaryoten in der Lage sind, posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen, durchzuführen, die bei *E. coli* möglicherweise fehlen. In eukariotischen Zellen werden Proteine oft posttranslational modifiziert, was für die enzymatische Aktivität oft notwendig ist.

3.2.1 Expression von *AtTGL 1* und *2* mittels der Vektoren pYES2-CT und pYES2-NTA

AtTGL 1 und *2* wurden zunächst in die Vektoren pYES2-CT und pYES2-NTA kloniert, welche einen N-terminalen bzw. C-terminalen His-tag besitzen. Zur Expression diente ein Protease-defizienter Hefestamm, da dieser das überexprimierte Protein nicht so stark degradiert. Die Überexpression von *AtTGL 1* führte zum Absterben der Zellen nach Induktion der Expression (Daten nicht gezeigt). Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.2.2 Komplementation der TGL-defizienten Hefe - Mutante *tgl3*

Um die Expression von TGL-Enzymen in Hefe zu demonstrieren, sollte die Hefemutante *tgl3* funktionell komplementiert werden (Athenstaedt and Daum 2003). Der Mutante *tgl3* fehlt die endogene TGL. Sie kann daher kein endogenes TAG mobilisieren. Mit diesem Ansatz konnte für *AtTGL 1* und *2* in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Daum, Graz, ein methodisch - unabhängiger Hinweis auf lipolytische Aktivität der *AtTGL* - Enzyme erbracht werden (Abb.14). Der in Abb. 14 dargestellte Vergleich der endogenen TAG-Gehalte der *tgl3* -Hefezellen mit und ohne Expression der *AtTGL* - Kandidaten zeigt einen um ~ 30 % verringerten TAG - Gehalt in den komplementierten Hefezellen (Abb. 16, *tgl3*+pYES2/C vs. *tgl3*+*AtTGL 1*/C, *tgl3*+*AtTGL 1*/N bzw. *tgl3*+*AtTGL 2*). Zum Vergleich wurden eine Kontrolle (FY1679) sowie *tgl3* mit dem Leervektor transformiert und parallel analysiert worden. Ebenfalls als Kontrolle diente die Komplementation von *tgl3* mit *TGL 3*. Dabei wurde deutlich, dass der TAG – Gehalt in der Kontrolle um ~ 60 % und in der mit *TGL 3* komplementierten Mutante um ~ 50 % gegenüber der reinen *tgl3* - Mutante verringert ist.

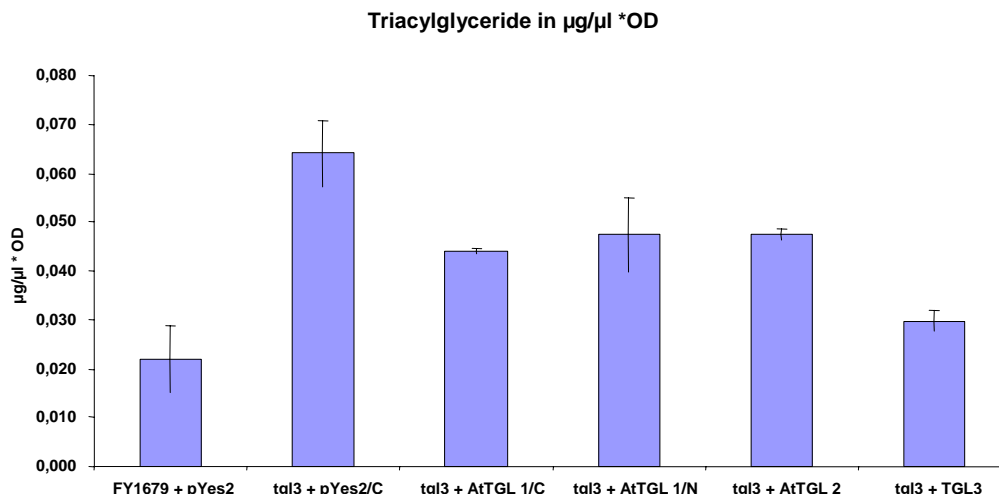


Abb. 14: Komplementation der *tgl3*-Deletionsmutante mit verschiedenen Expressionskonstrukten von *AtTGL 1* und *2*. Kulturen der Deletionsmutante *tgl3* wurden mit Expressionsvektoren, die *AtTGL 1* oder *2* enthielten, transformiert, kultiviert und der endogene Gehalt an Triacylglycerine in den Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei verschiedenen unabhängigen Experimenten. (FY1679: Wildtyp)

3.3 Analyse der intrazellulären Lokalisation von *AtTGL 1*

Neben der Gewebespezifität ist auch die intrazelluläre Lokalisation von Bedeutung für die Charakterisierung der analysierten Enzyme. Für Enzyme, die an der Lipidmobilisierung beteiligt sind, muss eine Lokalisation am ER oder an den Lipidkörpern angenommen werden. Für die experimentelle Analyse der intrazellulären Lokalisation wurden für die Expression von Fusionsproteinen hergestellt. *AtTGL 1* und *2* wurden jeweils N-terminal und C-terminal mit YFP fusioniert und in den Vektor pCAT (Novagen) kloniert. Die Plasmide wurden mittels „Partikel Gun“ (Biorad) in Epidemizellen von reifenden Samen der Sojabohne (*Glycine max*) transformiert und für 48 h exprimiert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Fusionsproteine mit N-terminalen YFP im Cytosol lokalisiert waren. Während die Fusionsproteine mit C-terminalen YFP an Zellorganellen nachweisbar waren, die nicht mit dem Zellkern oder den Chloroplasten identisch sind. Oleosin ist ein Marker für Lipidkörper. Die Transformation mit Oleosin-CFP ergab blaue Fluoreszenz an ca. 2 μm großen Zellorganellen. Die Co-Transformation mit Oleosin-CFP weist auf Co-Lokalisation von *AtTGL 1* und Oleosin an Lipidkörpern hin (Abb. 15).

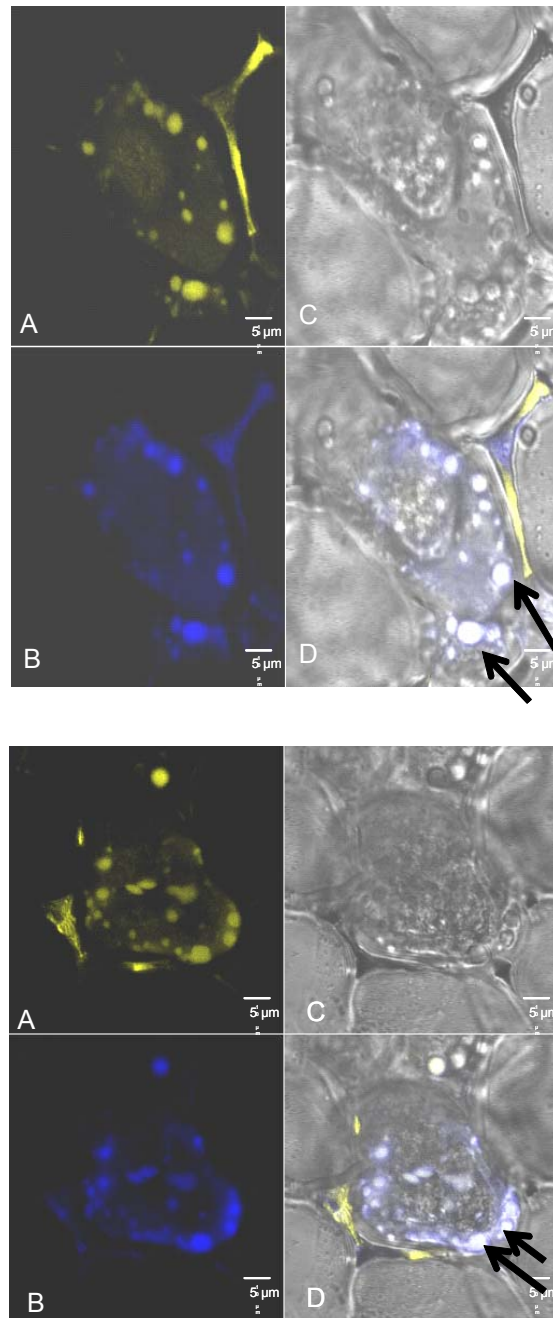


Abb. 15: Co-Lokalisierung von AtTGL1 und Oleosin. Große, reife Sojasamen wurden mit den Fusionproteinen AtTGL1-YFP und Oleosin-CFP transient transformiert und für 18 h inkubiert. Zur Analyse der Fluoreszenz wurden Schnitte von 35 µm Stärke hergestellt und am Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Dabei wurden die Zellen im Auflicht (Abb. C) und bei den Emissionswellenlängen von 470 - 500 nm (CFP-Fluoreszenz, Abb. B) und 540 - 580 nm (YFP-Fluoreszenz, Abb. A) betrachtet. Abb. D zeigt eine Überlagerung der drei vorhergehenden Bilder, wobei Positionen gemeinsamer YFP und CFP-Fluoreszenz weiß erscheinen. Gezeigt sind im oberen und unteren Teil der Abbildung jeweils transformierte Zellen von verschiedenen Samen.

4 Charakterisierung der *AtTGL 1 antisense* Pflanzen

Für die Charakterisierung der physiologischen Funktion der *AtTGL 1* und *2* in *A. thaliana* wurden Pflanzen (var: Col-0) mit binären Vektoren transformiert, die einen 35S-Promoter, das *bar* – Gen für eine BASTA-Selektion und *AtTGL 1* in *sense* oder *antisense* Orientierung enthielten. Da die erhaltenen transgenen Linien mit *sense*-Orientierung keine Unterschiede zum Wildtyp zeigten, wurden diese Pflanzen nicht näher analysiert und hier nicht weiter berücksichtigt. Ausgehend vom Saatgut der Pflanzen mit „*antisense*-Konstrukten“ wurden 63 unabhängige transgene Linien erzeugt, deren Nachkommen (T2 – Generation) auf das Auftreten eines Spaltungsmusters bei Basta - Selektion hin überprüft wurden. Je 6 Pflanzen der Folgegeneration dieser T2-Linien, die entweder ein Spaltungsmuster von 1:3 zeigten oder nicht segregierten, wurden weiter kultiviert. Bei diesen Linien kann von einer Einzelsinsertion ausgegangen werden. Für die Suche nach homozygoten Linien wurden die Spaltungsmuster der T4 – Generation überprüft und die T3 - Linien isoliert, die keine Aufspaltung mehr zeigten. Auf diesem Wege konnten 6 homozygote *AtTGL 1 antisense* Linien generiert werden, von denen 2 x 2 Linien weiter verfolgt wurden (35a1, 35a2, 43a1 und 43a3).

4.1 Expressionsstärke der *AtTGL 1* und *2* in den *AtTGL 1 antisense* Pflanzen

Grundlegend für die Charakterisierung der *AtTGL 1 antisense*-Linien war die Überprüfung der Funktion des antisense-Konstruktes. Dazu wurde zunächst aus den transgenen Pflanzen genomische DNA isoliert und mittels PCR die Vollständigkeit des Konstruktes, bestehend aus 35S – Promoter, *AtTGL 1 antisense*-Fragment und *bar*-Gen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR die Menge der vorhandenen *AtTGL 1*-mRNA in den *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen analysiert. Abbildung 16a zeigt die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse. Deutlich erkennbar ist die Reduktion der *AtTGL 1* PCR - Amplifikate in den *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen im Vergleich zu denen in den Kontrollen. Ebenfalls erkennbar sind Unterschiede in der Repression von *AtTGL 1* zwischen den einzelnen transgenen Linien. So sind die *AtTGL 1*-Transkripte in den Linien 35a1 und 43a1 stärker reduziert (dargestellt: --)als in 35a2 und 43a3 (dargestellt: -). Ebenfalls aufgetragen wurde eine RT-PCR Kontrolle bei der genomische DNA als Template genutzt worden war. Sie dient als Kontrolle der Fragmentgrößen der Amplifikate.

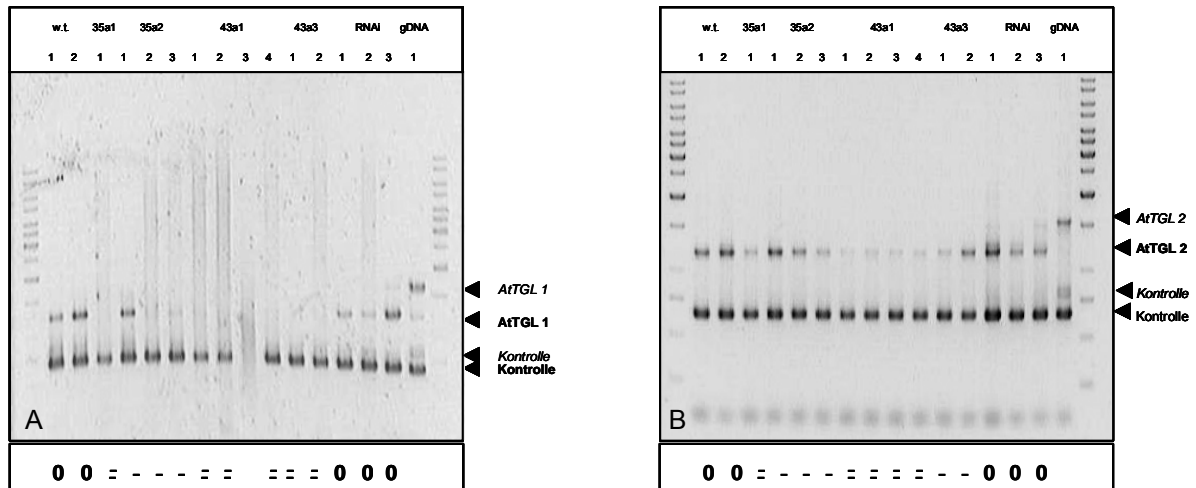


Abb. 16a, b: Analyse der Expressionsniveaus der *AtTGL 1* (A) und *2* (B) in verschiedenen Linien der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen mit Hilfe der RT-PCR ausgehend von jeweils gleichen Mengen an cDNA. Auf das 1,5 %ige Agarosegel wurden je 5 μ l des Reaktionsansatzes aufgetragen. Ebenfalls im Ansatz enthalten war eine interne Kontrolle (Actin), die auch zwischen Banden resultierend aus genomischer DNA (Kursiv) und cDNA (Fett) differenziert.

Aufgrund der starken Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen von *AtTGL 1* und *2* besteht die Möglichkeit, dass auch *AtTGL 2* in den *AtTGL 1 antisense* Pflanzen reprimiert wird. Deshalb wurde die Expressionsstärke von *AtTGL 2* mittels semiquantitativer RT-PCR in den *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 16b dargestellt und zeigt deutlich, dass ebenfalls *AtTGL 2* in den transgenen Pflanzen herunter reguliert wird. Die Methode der semiquantitativen RT-PCR lässt einen Vergleich der Stärke der Repression von *AtTGL 1* und *2* jedoch nicht zu. Parallel zu den *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen waren auch *AtTGL 1* RNAi-Pflanzen erzeugt worden. Die dafür verwendeten RNAi-Konstrukte enthielten neben einem 35S-Promoter ein 350-bp-Fragment der *AtTGL 1* in *sense* und *antisense* Richtung verbunden mit einem 1000-bp-Fragment der GUS-Kassette zur Bildung der Haarnadelstruktur. Dieses Konstrukt sollte aufgrund der räumlichen Nähe von *sense*- und *antisense*-Sequenz eine stärkere Repression der *AtTGL 1*-Expression bewirken. Die auch in diesen Pflanzen getestete Expressionsstärke von *AtTGL 1* zeigte aber keinen Unterschied zu den Kontrollpflanzen.

4.2 Expressionsstärke von *AtTGL 3 - 9* in den *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen

Der Effekt der Repression eines Gens durch antisense-Konstrukte basiert auf der Entstehung von doppelsträngiger mRNA (dsRNA), welche erkannt und abgebaut wird. Komplementäre Nukleotidsequenzen von 21 bp können dabei bereits zur Bildung von dsRNA führen und den Abbau forcieren. Daher war es ebenso wichtig die Expressionsstärken der anderen Mitglieder der TGL-Gen-Familie in den *AtTGL 1 antisense* Pflanzen zu überprüfen, auch wenn deren Nukleotidsequenzen nur in Teilbereichen mit der von *AtTGL1* identisch sind. Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR-

Reaktionen für *AtTGL 3, 4, 5, 6, 7, 8* und *9*. Obwohl die aus der Menge der Amplifikate resultierenden Gelbanden in einigen Fällen sehr schwach sind, ist deutlich erkennbar, dass die *AtTGL 4, 5, 6, 7, 8* und *9* durch die *AtTGL1 antisense*-mRNA nicht herunter reguliert werden. Für *AtTGL 3* lässt sich über eine mögliche Repression keine Aussage treffen, da ihre Expression ohnehin sehr schwach ist (vgl. Abb. 7 und 8).

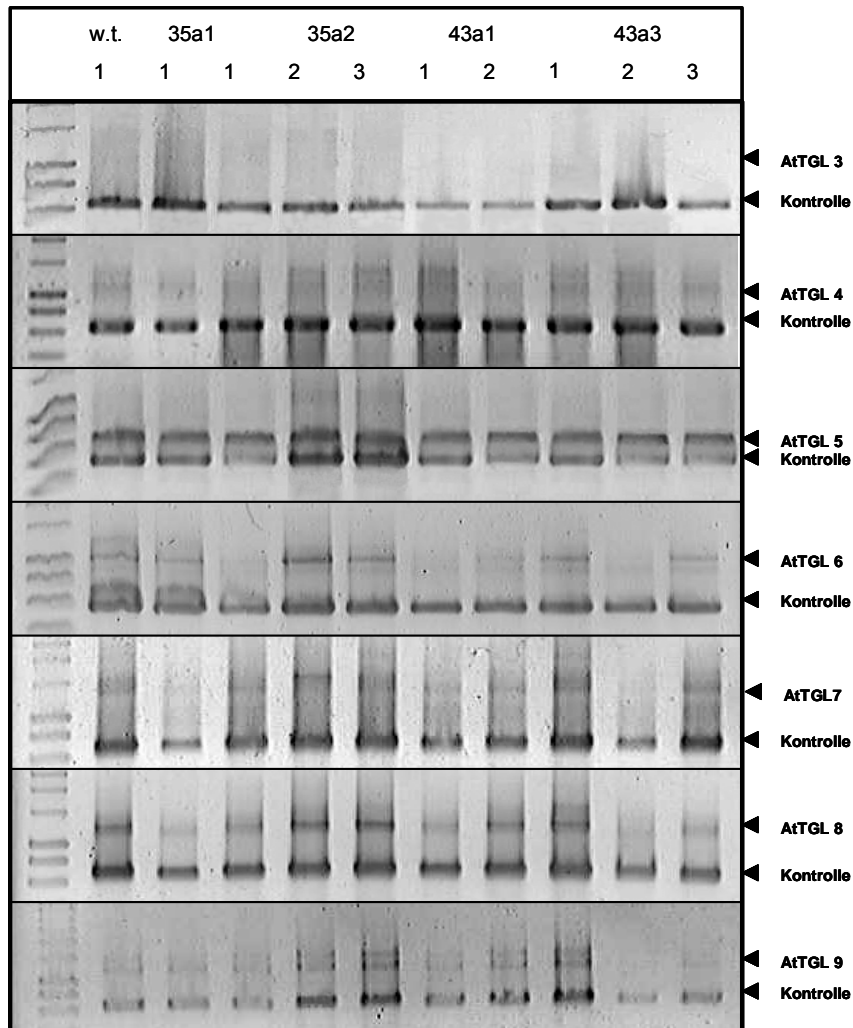


Abb.17: Analyse der Expressionsniveaus von *AtTGL 3* (A), *AtTGL 4* (B), *AtTGL 5* (C), *AtTGL 6* (D), *AtTGL 7* (E), *AtTGL 8* (F) und *AtTGL 9* (G), in verschiedenen Linien der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen sowie im Wildtyp (Wt.) mit Hilfe der RT-PCR ausgehend von jeweils gleichen Mengen an cDNA. Auf das 1,5 %ige Agarosegel wurden je 5 μ l des Reaktionsansatzes aufgetragen. Ebenfalls im Ansatz enthalten war eine interne Kontrolle (Actin).

4.3 Keimung der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen

4.3.1 Charakterisierung der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen bei etioliertem Wachstum

In den Linien der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen war gezeigt worden, dass Gene, die für TGLs kodieren, in ihrer Expression verringert waren. Da die TGL-Gene in Keimlingen stark exprimiert werden, wurde bei der Charakterisierung möglicher Phänotypen der Pflanzen von einer Beeinflussung des Lipidmetabolismus während der Keimung durch die Repression der *AtTGLs* ausgegangen. Zunächst wurde das Keimungsverhalten unter Lichtausschluss analysiert, da unter diesen Bedingungen der gesamte Stoff- und Energiestoffwechsel des Keimlings von der Mobilisierung der Speicherlipide und vom Lipidmetabolismus abhängen sollte. Samen wurden zunächst oberflächensterilisiert, anschließend zusammen mit dem Saatgut von Kontrollpflanzen auf MS-Festagar ausgelegt und für 7 d im Dunklen inkubiert. Um eventuelle phänotypische Unterschiede auf Einschränkungen im Lipidmetabolismus zurückführen zu können, wurden die Samen parallel auf MS-Festagar mit 1 % Saccharose inkubiert. Bei Verfügbarkeit von Saccharose als Energie- und C-Quelle sollten die Samen vergleichbar mit den nicht-transgenen Kontrollpflanzen keimen. Die T2-Linie 35 (Parentalgeneration der Linien 35a1 und 35a2) wurde untersucht, um eventuelle phänotypische Unterschiede zwischen den Generationen zu finden. Abb. 18 zeigt die MS-Festagarplatten ohne Saccharose mit 7 d alten etiolierten Keimlingen der *AtTGL 1 antisense*-Linien 35a1, 35a2, 43a1 und 43a3 sowie der T2-Linie 35. Ebenfalls angegeben sind die jeweiligen Keimungsraten der transgenen Linien und der Kontrollen. Die Keimungsraten der *AtTGL 1 antisense*-Linien 35, 35a1 und 43a1 sind deutlich geringer als die der Kontrollen, während die *AtTGL 1 antisense*-Linien 35a2 und 43a3 keinen Unterschied zu den Kontrollen zeigen. Auf dem parallel inkubierten Saccharose-haltigen MS-Festagar wurden keine Unterschiede in der Keimungsfähigkeit der Samen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Sieben Tage alte etiolierte Keimlinge aller getesteten transgenen Linien unterscheiden sich phänotypisch nicht von den Kontrollen. Neben ungekeimten Samen finden sich keine in ihrer Entwicklung retardierten Keimlinge.

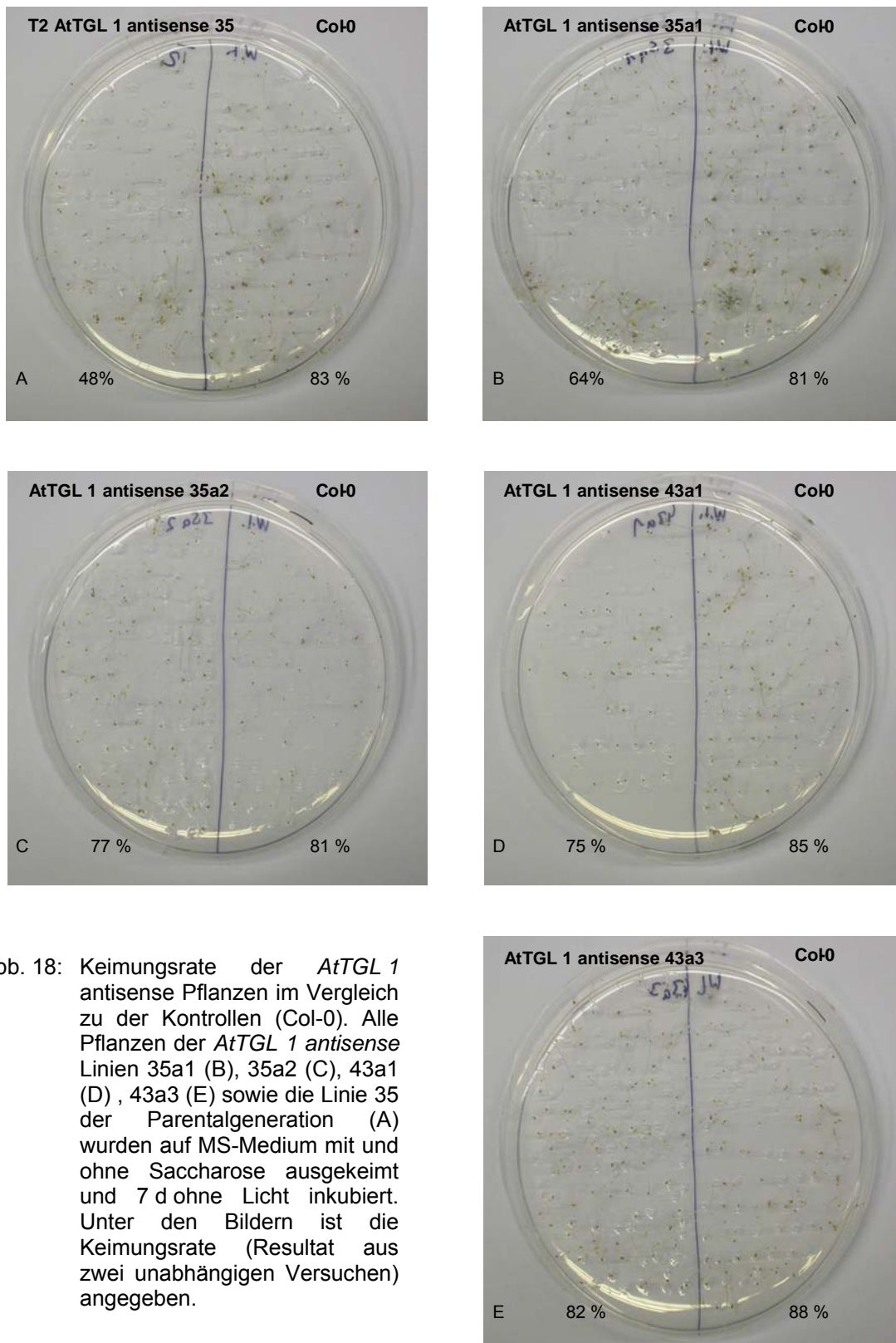


Abb. 18: Keimungsrate der *AtTGL 1* antisense Pflanzen im Vergleich zu der Kontrollen (Col-0). Alle Pflanzen der *AtTGL 1 antisense* Linien 35a1 (B), 35a2 (C), 43a1 (D), 43a3 (E) sowie die Linie 35 der Parentalgeneration (A) wurden auf MS-Medium mit und ohne Saccharose ausgekeimt und 7 d ohne Licht inkubiert. Unter den Bildern ist die Keimungsrate (Resultat aus zwei unabhängigen Versuchen) angegeben.

Im Anschluss an die Inkubation im Dunklen wurden die Saccharose - freien MS - Festagarplatten mit den 7 d alten etioliierten Keimlingen aller Linien für 5 d bei einem Tag (8 h) /Nacht (16 h) –Rhythmus kultiviert. Dabei konnte eine Keimung der bis dahin ungekeimten Samen der transgenen Linien beobachtet werden. Abb. 19a zeigt die MS – Festagarplatten der AtTGL 1 antisense Linien T2-Linie 35 und 43a1 vor (A und C) bzw. nach (B und D) der Inkubation mit einem Tag-Nacht-Rhythmus. Die neuen Keimlinge (Detailansicht: Abb. 19b) sind erst mit dem Beginn des Tag-Nacht-Rhythmus gekeimt und haben sich im weiteren Verlauf normal entwickelt.

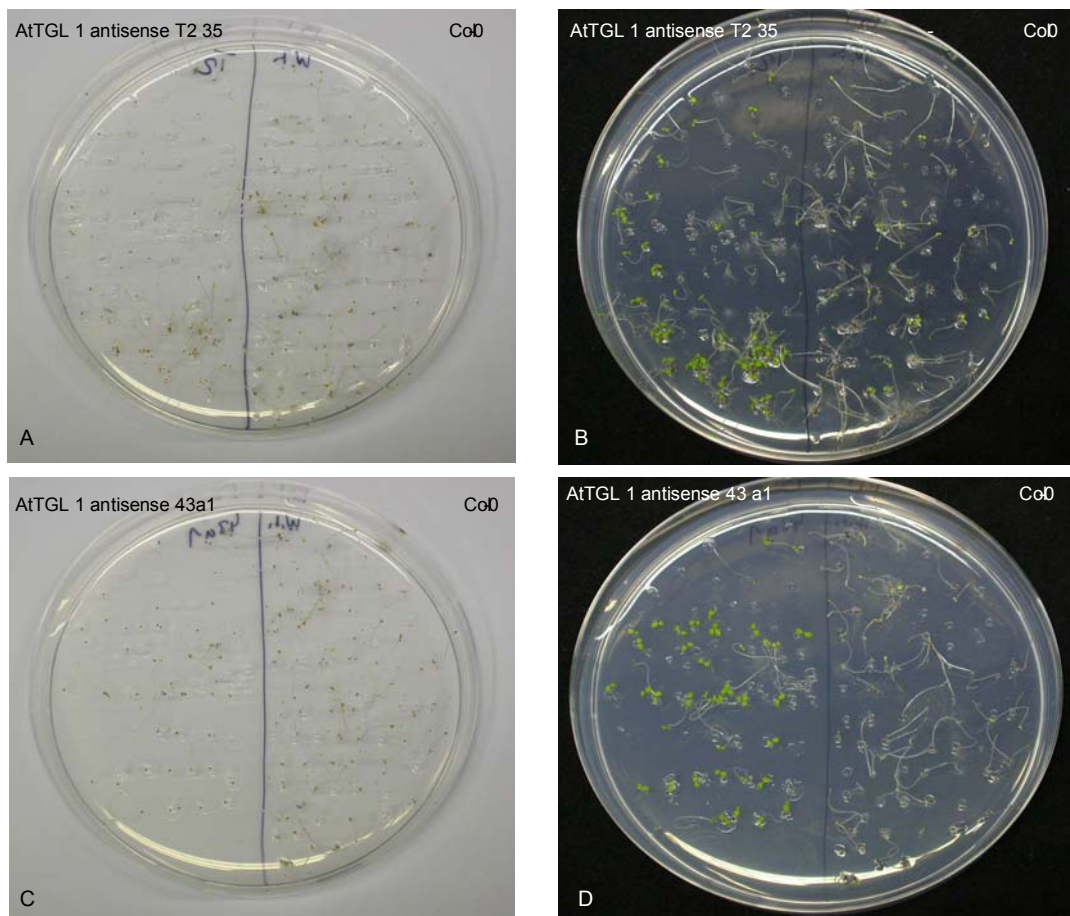


Abb.19a: Keimung der AtTGL 1 antisense-Pflanzen auf MS-Medium nach 7d ohne Licht und anschließenden 5d unter Kurztagsbedingungen (8h Licht) im Vergleich zu Kontrollen (Col-0). Gezeigt sind die Linien T2 35 (A und B) sowie 43a1 (C und D) jeweils nach 7d ohne Licht (A und C) und nach dem gesamten Versuchszeitraum.

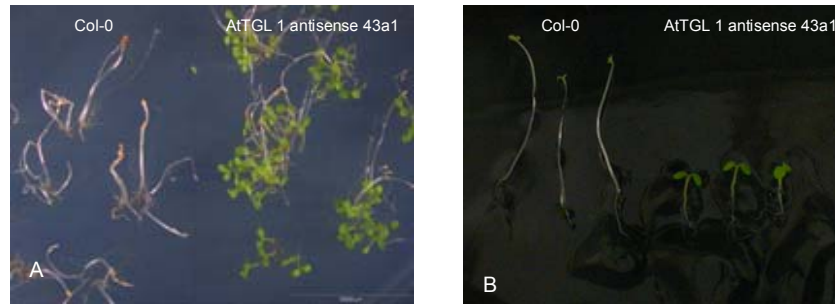


Abb.19b: Detailansicht der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen nach Keimung auf MS-Medium im Vergleich zu Kontrollen (Col-0) als Überblick (A) und Einzelpflanzen (B) nach 7d ohne Licht und anschließenden Kurztagsbedingungen (8h Licht).

Basierend auf den Daten der entwicklungspezifischen Expression der *AtTGL 1*, die eine maximale Expression in den ersten 5 Tagen nach der Keimung aufzeigen, wurden die Entwicklung der Keimlinge der *AtTGL 1 antisense*-Linien unter Ausschluss von Licht innerhalb dieses Zeitraumes beobachtet. In Abb. 20 sind die Keimlinge der *AtTGL 1 antisense*-Linie 43a1 im Vergleich zu Kontrollpflanzen am 2., 3. und 5. Tag nach der Keimung dargestellt. Dabei wird eine verzögerte Entwicklung der transgenen Pflanzen gegenüber den Kontrollen in den ersten Tagen sichtbar, die sich aber im weiteren Verlauf der Entwicklung ausgleicht.

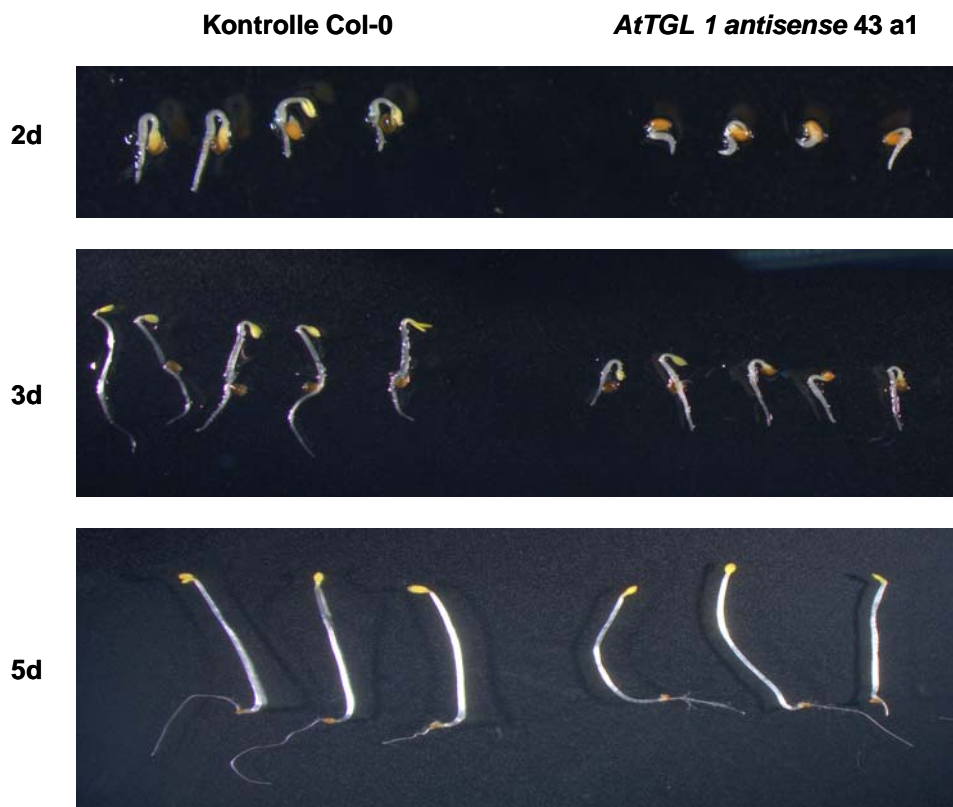


Abb. 20: Wachstum der keimenden etiolierten Keimlinge der *AtTGL 1 antisense*-Linie 43a1 im Vergleich zu den Pflanzen der Kontrollen. Das Saatgut wurde parallel auf MS-Festagar mit 1 % Saccharose ausgelegt und im Dunklen bei 24 °C inkubiert

Von zentraler Bedeutung für die physiologischen Funktionen von *AtTGL 1* und *2* war die Analyse des TAG-Gehaltes in den etiolierten Keimlingen der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen während der ersten 6 Tage nach der Keimung. Etiolierte Keimlinge, die parallel zu Kontrollpflanzen kultiviert worden waren, wurden geerntet und alle enthaltenen freien und veresterten Fettsäuren durch saure Methylierung (siehe 4.8) derivatisiert und mittels Gaschromatographien analysiert. Der TAG-Gehalt der Keimlinge wurde anhand der Menge an 20:1- Säuremethylester bestimmt, da diese Fettsäure in den Keimlingen nur im TAG vorkommt. In Abb. 21 ist der Anteil an 20:1 am gesamt Fettsäuregehalt der *AtTGL 1 antisense* Linien 35a1, 35a2, 43a1 und 43a3 sowie der Kontrollpflanzen für den Zeitraum der ersten 6 Tage nach der Keimung dargestellt. Auffällig ist die retardierte Abnahme der 20:1 in den transgenen Linien besonders in stärker herunterregulierten *AtTGL 1 antisense* Linien 35a1 und 43a1, welche am 6. Tag noch ~ 2 x mehr TAG im Vergleich zu den Kontrollpflanzen besitzen.

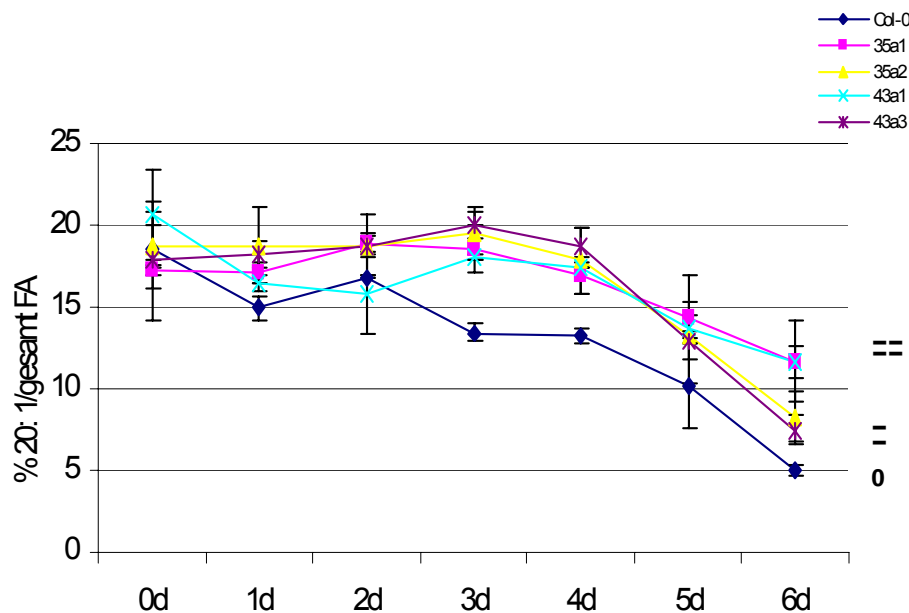


Abb.21: Abnahme des TAG-Gehaltes innerhalb der ersten 6 d in den etioliert keimenden Samen der *AtTGL 1 antisense*-Linien 35a1, 35a2, 43a1 und 43a3 im Vergleich zu den Kontrollen Col-0. Die Abnahme des TAG wurde anhand der Menge an 20:1 bestimmt. Die Samen wurden auf MS-Festmedium mit 1 % Saccharose ohne Licht inkubiert. Der TAG-Gehalt wurde ausschließlich in den keimenden Samen analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. Relative Stärke der Herunterregulierung der *AtTGL* in den transgenen Linien: -- : stärker; - : schwächer; 0 : nicht.

4.3.2 Wachstum und Entwicklung der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen im Dauerlicht

Neben der Kultivierung in Dunkelheit wurde nun auch die Entwicklung der Keimlinge im Dauerlicht überprüft. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden die Samen auch hier auf MS-Festagar mit und ohne 1% Saccharose kultiviert. Dabei wurde festgestellt, dass die Keimungsraten des transgenen Saatgutes im Dauerlicht nicht beeinträchtigt waren.

Weiterhin war zu beobachten, dass ein Teil der Keimlinge auf MS-Festagar ohne Saccharose in ihrer Entwicklung arretierte, während sich die Keimlinge auf dem Saccharosehaltigen MS-Festagar wie Kontrollpflanzen entwickelten. Abb. 22 zeigt die auf Saccharosefreiem (A) und Saccharosehaltigem (B) Festagar inkubierte *AtTGL 1 antisense*-Linie 43a1. Im Bildausschnitt (A) ist eine im Wachstum gehemmte Pflanze vergrößert dargestellt. Besonders auffällig ist das stark beeinträchtigte Wurzelwachstum. Die arretierten Pflanzen bilden keine Primärblätter, sind aber über mehrere Wochen lebensfähig, wobei eine geringe Vergrößerung der Kotyledonen zu beobachten ist. Zwei Wochen alte arretierte Pflanzen wurden auf Saccharosehaltigen MS-Festagar umgesetzt und im Dauerlicht weiter kultiviert, um zu prüfen ob der Entwicklungsarrest überwunden wird. Tatsächlich waren die Pflanzen in der Lage den Phänotyp zu überwinden, weitere Blätter zu entwickeln (Abb. 22c) und später auch zu blühen und Samen zu bilden. In der nachfolgenden Generation konnte der Arretierungsphänotyp nicht mehr beobachtet werden. Um einen Überblick zu erhalten, bei wie vielen Pflanzen einer Linie die Arretierung auftritt, wurden alle Linien der T2-Generation daraufhin getestet. Tabelle 2 gibt einen Überblick über alle Linien der T2 Generation, deren Spaltungsmuster (Wachstum auf 1% Saccharose), sowie die Verhältnisse arretierter zu normalwüchsiger Pflanzen (Wachstum ohne Saccharose) im Dauerlicht.

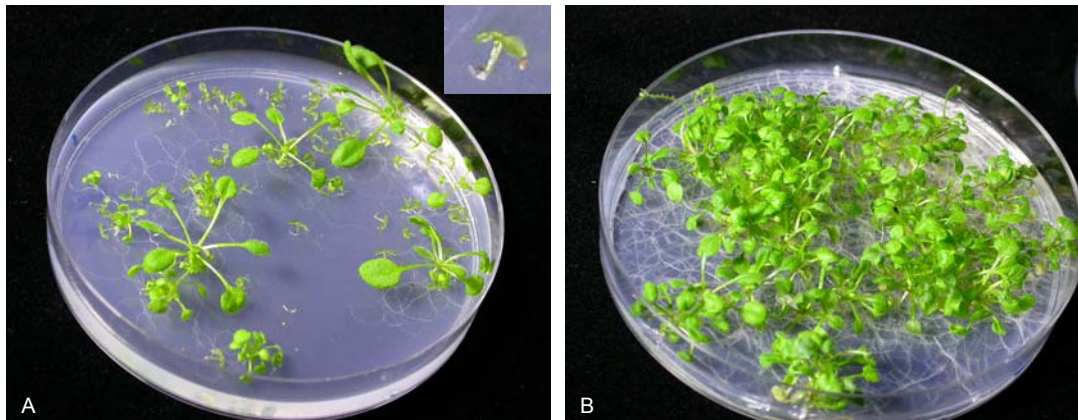


Abb.22: Wachstum 14 Tage alter *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen auf MS-Medium ohne (A) und mit Saccharose (B). Die Kulturen enthielten ebenfalls Phosphinotricin zur BASTA-Selektion und wurden im Dauerlicht bei 22 °C inkubiert. Im Bildausschnitt (A) ist eine im Wachstum gehemmte Pflanze vergrößert dargestellt.



Abb.22c: 14 d alte im Wachstum arretierte *AtTGL 1 antisense* Pflanzen wurden auf Medium mit 1% Saccharose umgesetzt und für weitere 14 d kultiviert.

Tab. 2: Übersicht über die Spaltungsverhältnisse der T2-Generation der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen. Jede Linie wurde parallel auf Medium mit und ohne 1 % Saccharose im Dauerlicht gekeimt.

Linie Nr.	Wachstum mit Saccharose Ratio wt/transgen	Wachstum ohne Saccharose	
		Verteilung wt/transgen	Verteilung arret. Pfl./ norm.Pfl.
1	1:3	1:6	3:2
2	-	-	-
3	1:3	-	-
4	1:6	1:6	3:1
5	-	2:1	1:3
6	1:4	1:2	1:11
7	1:3	1:9	4:3
8	1:15	1:3	1:2
9	1:2	1:10	1:9
10	1:9	1:4	1:1
11	0	1:23	1:6
13	1:7	1:7	1:2
14	1:9	1:2	0
15	1:9	1:6	1:2
16	1:9	1:2	0
18	1:5	1:1	1:3
19	1:6	1:9	1:1
20	1:23	1:6	1:1
21	1:1	1:1	1:9
22	1:54	1:16	1:2
23	1:8	1:3	1:4
24	1:12	1:6	1:2
25	1:53	1:18	1:1
26	1:3	3:1	1:12
27	1:7	1:3	1:1
28	0	1:7	1:1
29	1:5	1:2	1:1
30	1:7	1:2	1:2
31	1:3	1:2	1:1
32	1:10	1:7	1:1
33	0	0	1:13
34	1:54	1:8	1:37
35	0	0	5:1
37	1:9	1:8	4:1
38	1:2	1:4	1:4
39	1:15	1:2	0
40	1:6	1:3	1:3
41	1:20	1:17	7:1
42	1:11	0	0
43	1:3	1:9	1:5
44	1:3	1:2	5:1
46	1:16	1:15	8:1
47	1:3	1:4	3:2
48	1:20	1:4	3:1
49	1:7	1:4	1:4
50	1:24	1:4	1:5
51	1:7	1:5	1:1
52	1:41	1:3	1:1
53	1:9	1:5	1:2
54	1:11	1:8	0
56	1:7	1:3	4:1
57	1:2	1:1	0
58	1:4	1:3	1:1
60	1:4	1:1	1:1
61	1:5	1:3	2:3
62	0	0	1:1
63	1:4	1:5	3:2

4.3.3 Wachstum und Entwicklung der *AtTGL 1 antisense* Pflanzen im Tag-Nacht-Rhythmus

Die „Digitalen Northern Blots“ zeigten auch in Organen späterer Entwicklungsstadien eine gleich bleibende Expressionstärke der *AtTGL 1* und 2, wenngleich auch auf deutlich geringerem Niveau ist als in Keimlingen. Um die physiologische Bedeutung der *AtTGL 1* und 2 im weiteren Verlauf der Entwicklung von *A. thaliana* zu untersuchen, wurden die Samen der *AtTGL 1 antisense* Linien gemeinsam mit denen der Kontrollpflanzen zunächst auf MS-Festagar mit 1 % Saccharose kultiviert und anschließend auf Erdkultur umgesetzt. Die Pflanzen wuchsen und entwickelten sich zunächst wie die Kontrollpflanzen. Einen deutlichen Unterschied gab es aber bei der Blühinduktion. Der Zeitpunkt der Blühinduktion, der anhand der Anzahl der vorhandenen Rosettenblätter bei einer Sprosshöhe von 1 cm ermittelt wurde, war in den transgenen Linien 35a2, 43a1 und 43a3 deutlich verzögert (Abb. 23 A und B). Die Verzögerung der Blühinduktion ist statistisch signifikant (Ergebnis im Student's T-Test) für die Linien 35a2 (0,0000023514), 43a1 (0,00007761) und 43a3 (0,000002117). Dabei gilt die statistische Signifikanz als sicher, wenn das Resultat des T-Test kleiner als 0,05 ist. Bei der am schwächsten inhibierten *AtTGL 1 antisense*-Linie 35a1 ist der Unterschied in der Blühinduktion verglichen mit den Kontrollpflanzen nicht signifikant (0,2674). Die Ergebnisse des Vergleiches des Blühinduktionszeitpunktes sind in Abb. 23 (C, D, E, F) dargestellt.

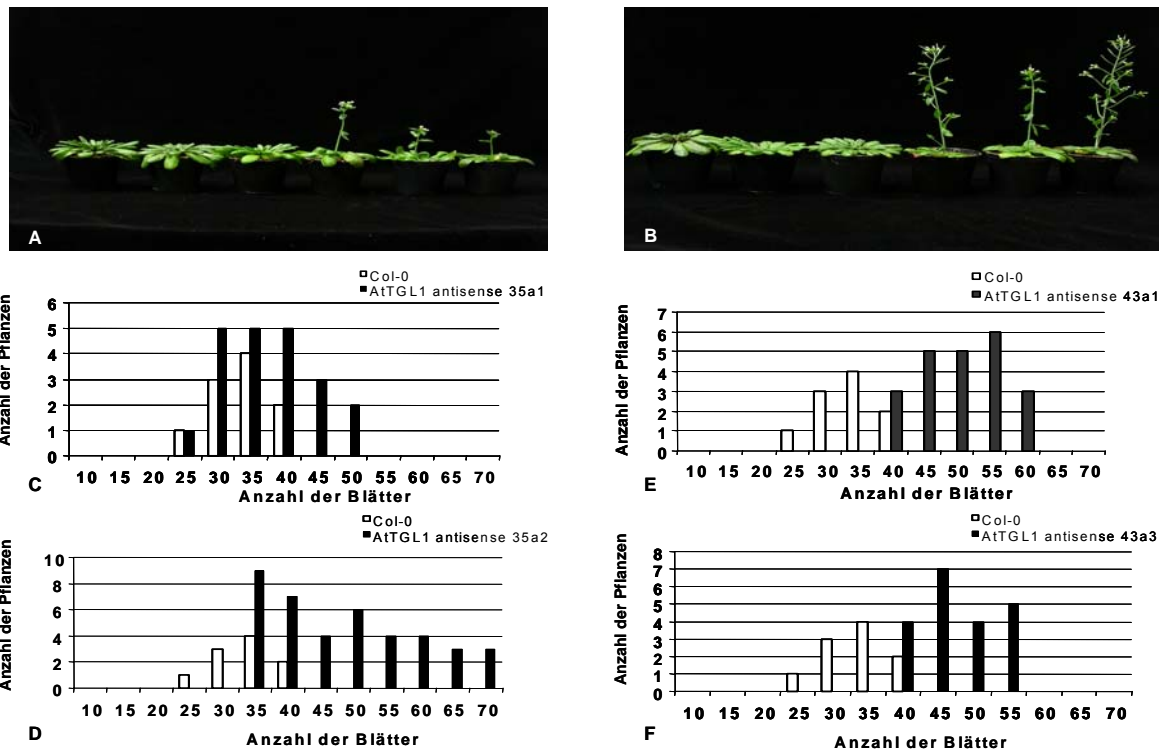


Abb.23: Zeitpunkt der Blühinduktion der *AtTGL 1 antisense*-Linien 35a1(A, C), 35a2(D), 43a1(B, E) und 43a3 (F) im Vergleich zu den Kontrollen Col-0. Als Vergleichsbasis diente die Anzahl der Rosettenblätter bei Sprosslänge von 1 cm. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Untersuchungen.

4.4 Saatgut und Schotenbildung der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen

Die in Erdkultur im Tag (8 h)–Nacht (16 h)–Rhythmus kultivierten *AtTGL 1 antisense* Pflanzen wurden nach der Abreife des Saatgutes auf Schotenanzahl und Samenanzahl (gesamt und pro Schote) hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abb. 24 zusammengefasst. Die Saatgutmenge pro Pflanze ist in den *AtTGL 1 antisense*-Linien 35a2, 43a1 und 43a3 signifikant gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht. Die Anzahl der Schoten pro Pflanze ist in allen *AtTGL 1 antisense*-Linien deutlich erhöht, während der Samengehalt pro Schote im Vergleich zur Kontrolle unverändert ist. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz dieser Daten wurde ein Student's T-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse für die einzelnen *AtTGL 1 antisense*-Linien in Tab. 3 dargestellt sind. Der Unterschied zwischen zwei Datenreihen gilt als signifikant, wenn sich die aus den Daten resultierenden Mittelwerte um min. 5 % unterscheiden, d.h. das Ergebnis im T-Test ist kleiner als 0,05 ist.

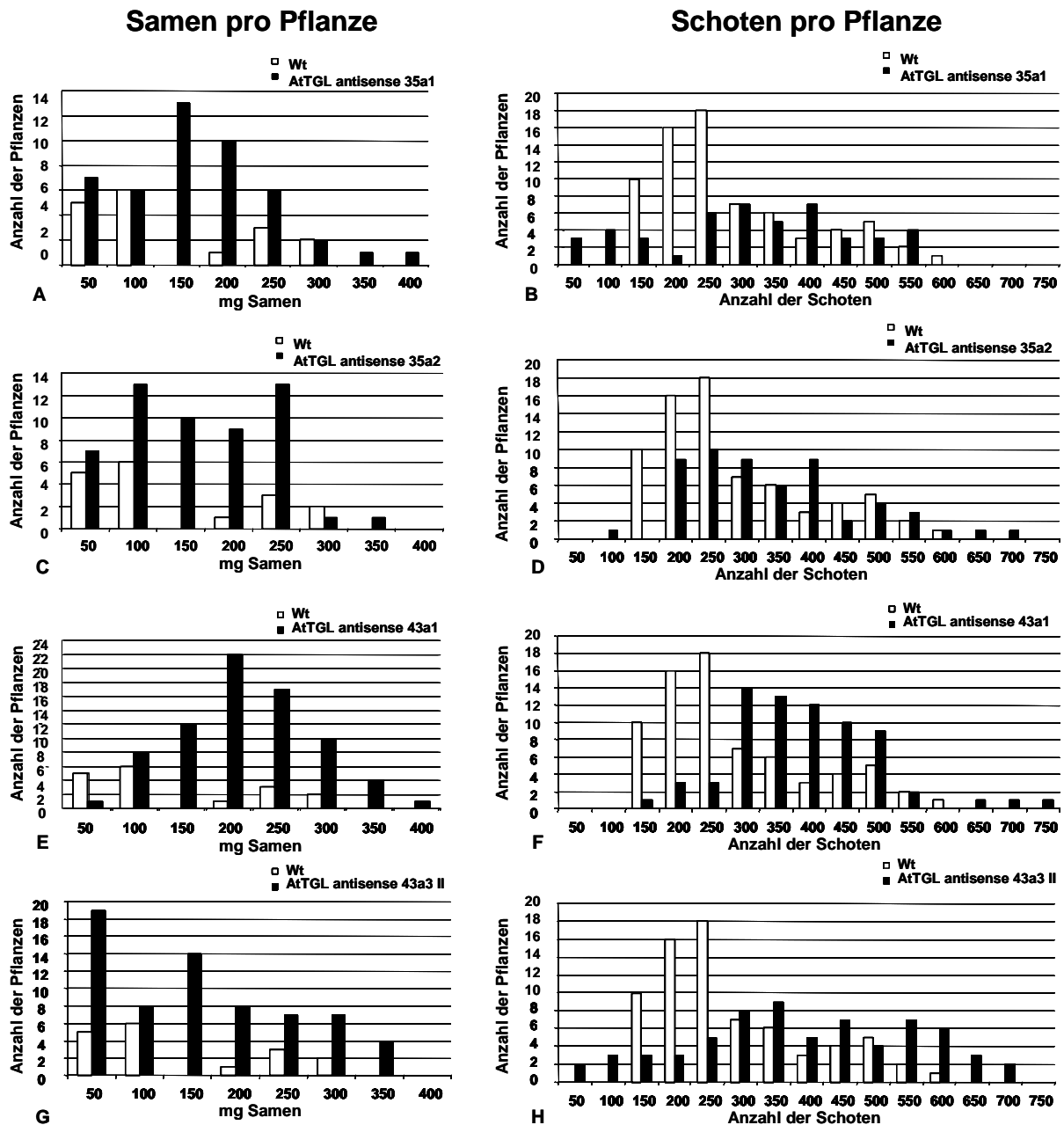


Abb.24: Studie der erhaltenen Saatgutmengen der *AtTGL1 antisense*-Linien 35a1 (A-C), 35a2 (D-F), 43a1 (G-I) und 43a3 (K-M) im Vergleich zu den Kontrollen Col-0. Verglichen wurden die Saatgutmengen pro Pflanze (A; D; G; K), die Anzahl der Schoten pro Pflanze (B; E; H; L) sowie die Anzahl der Samen pro Schote (C; F; I; M). Dargestellt sind die Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Untersuchungen.

Tab.: 3: Ergebnisse der Student's T-Tests für die Blühinduktionsbestimmungen

	<i>AtTGL 1 antisense 35a1</i>	<i>AtTGL 1antisense 35a2</i>	<i>AtTGL 1 antisense 43a1</i>	<i>AtTGL 1 antisense 43a3 II</i>
Saatgut/Pflanze	0,062332356	0,052410916	0,030389859	0,019852532
Schote/Pflanze	0,031438048	0,029980918	0,014257916	8,64502E05
Samen/Schote	0,80591817	0,93632725	0,463147167	0,714335273

Zwei Datenreihen unterscheiden sich signifikant (blau) um 5 % von einander, wenn das Resultat des T-Test < 0,05 ist.

4.5 Einfluss der *AtTGL 1* und *2* auf die Fettsäurezusammensetzung in den Samen

Von den Samen der in Erdkultur in Tag-Nacht-Rhythmus kultivierten *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen der vier Linien 35a1, 35a2, 43a1 und 43a3 wurden Fettsäureprofile erstellt. Dazu wurden von je 10 Samen freie und veresterte Fettsäuren durch saure Methylierung (MM) zu Methylestern umgesetzt, die anschließend mit dem Gaschromatographen analysiert wurden. In Abb. 25 sind die Ergebnisse dieser Analyse für 18:1 Δ 9 Z (Ölsäure), 20:1, sowie der Gesamtfettsäuregehalt grafisch dargestellt. Deutlich sichtbar ist die Erhöhung des Gehaltes an 18:1 Δ 9 Z, 20:1 und Gesamtfettsäuren in den Samen der *AtTGL 1 antisense*-Linien 35a1, 35a2 und 43a1. Die Resultate des Student's T-Test (Tab. 4) zeigen jedoch, dass diese Erhöhungen nur im Falle der *AtTGL 1 antisense*-Linie 35a1 auch signifikant sind. Die analysierten Fettsäuregehalte der Samen der *AtTGL 1 antisense*-Linie 43a3 sind geringer (im Falle des 20:1-Gehaltes sogar signifikant weniger) als die der Kontrollen.

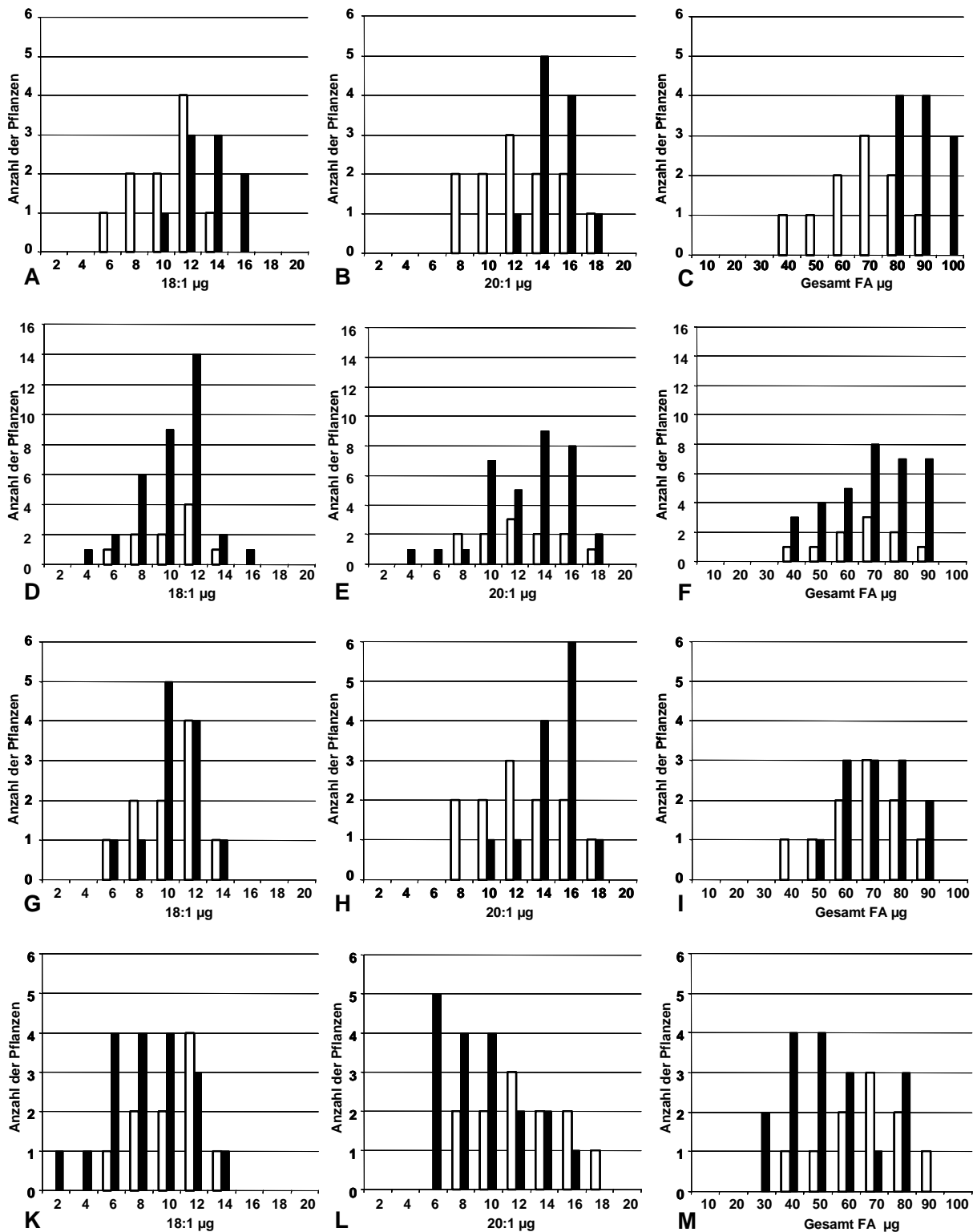


Abb.25: Resultate der Fettsäureanalysen in den reifen Samen der *AtTGL 1 antisense*-Linien 35a1 (Abb. A,B,C), 35a2 (Abb. D,E,F), 43a1 (Abb. G,H,I) und 43a3 (Abb. K,L,M) im Vergleich zu den Kontrollen Col-0. In den Diagrammen dargestellt sind die Gehalte an Ölsäure (18:1 9z) (Abb. A, D, G, K), 20:1 (Abb. B, E, H, L) sowie der Fettsäuregesamtgehalt (Abb. C, F, I, M). Dargestellt sind die Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Untersuchungen.

Tab. 4: Tabelle der Ergebnisse der Student's T-Tests der Fettsäuregehalte in den Samen. Zwei Datenreihen unterscheiden sich signifikant (blau) um 5 % von einander, wenn das Resultat des T-Test kleiner als 0,05 ist.

	18:1 (9z)	20:1	Gesamt
<i>AtTGL 1 antisense 35a1</i>	0,019399	0,003862	0,000905
<i>AtTGL 1 antisense 35a2</i>	0,843247	0,793291	0,5343
<i>AtTGL 1 antisense 43a1</i>	0,851282	0,159933	0,35362
<i>AtTGL 1 antisense 43a3</i>	0,062973	0,018629	0,094661

4.6 Partielle Charakterisierung von *AtTGL 1* – Deletionsmutanten

Parallel zu den *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen wurde die Linie SALK_020548 charakterisiert, bei der das *AtTGL 1*-Gen (*At1g28670*) durch eine T-DNA Insertion deletiert worden war. Die Samen dieser Linie stammten aus der Kollektion der Arabidopsis thaliana T-DNA Insertionsmutanten des Salk Institute (erhalten vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC) und wurden zunächst auf Saccharose-haltigem MS-Medium kultiviert, um in der Folgegeneration Homozygote zuzusuchen. Neben einer eingehenden Überprüfung der Lokalisierung und Orientierung der T-DNA-Insertion konnte eine Linie (Nachkommenschaft der Pflanze 4) identifiziert werden, in deren genomischer DNA das Gen *At1g28670* mittels PCR nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 26a). Saatgut dieser Linie wurde ebenfalls gemeinsam mit Kontrollen auf Saccharose-freiem Medium unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert, um eventuelle phänotypische Änderungen zu identifizieren. Dabei wurde festgestellt, dass die Samen ohne externe C-Quelle im Dunklen nicht keimen (Abb. 27). Erst die Verfügbarkeit von Saccharose sorgt für die Keimlingsentwicklung. Vergleichbar mit den Ergebnissen der *AtTGL 1 antisense*-Linien konnte die Keimung der Samen auch durch eine weitere Lichtzufuhr, die intensiver ist als die bei der Aussaat verwendeten 3h Licht, induziert werden. Wobei festgestellt wurde, dass bereits 10 min intensives Licht für die Induktion der Keimung ausreichten (Daten nicht gezeigt). Beim Wachstum im Dauerlicht ist bei den Pflanzen der Salk-Linie, der für die *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen beschriebene Arretierungsphänotyp allerdings nicht zu finden.

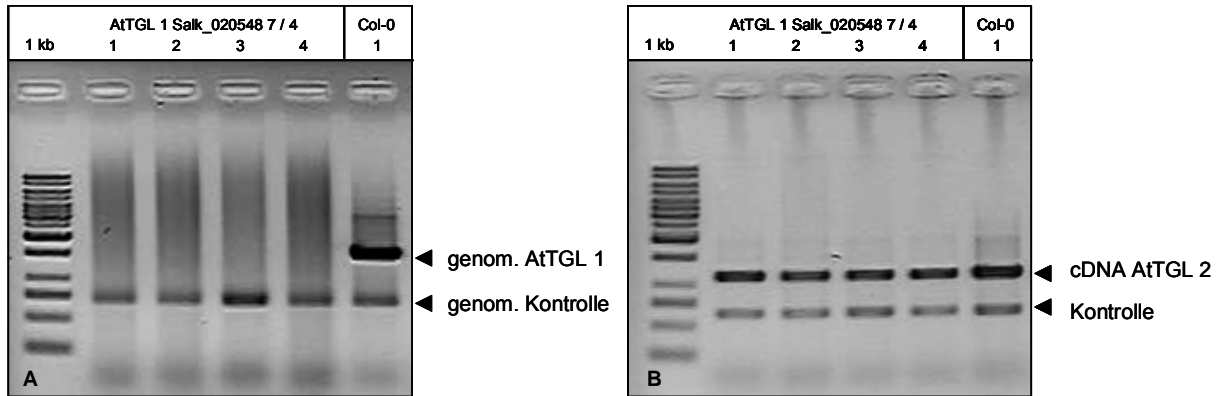


Abb. 26a, b: Nachweis der Homozygotie der *AtTGL 1*-Linie 020548 /4 mittels PCR basierend auf der genomischer DNA der Pflanzen(A). Als Vergleich diente genomische DNA des Wildtypes var. Col-0. Ebenfalls analysiert wurde das Expressionsniveaus der *AtTGL 2* (B) mit Hilfe der RT-PCR ausgehend von jeweils gleichen Mengen an cDNA. Auf das 1,5 %ige Agarosegel wurden je 5 μ l des Reaktionsansatzes aufgetragen. Ebenfalls im Ansatz enthalten war eine interne Kontrolle (Actin), die auch zwischen Banden resultierend aus genomischer DNA und cDNA differenziert.

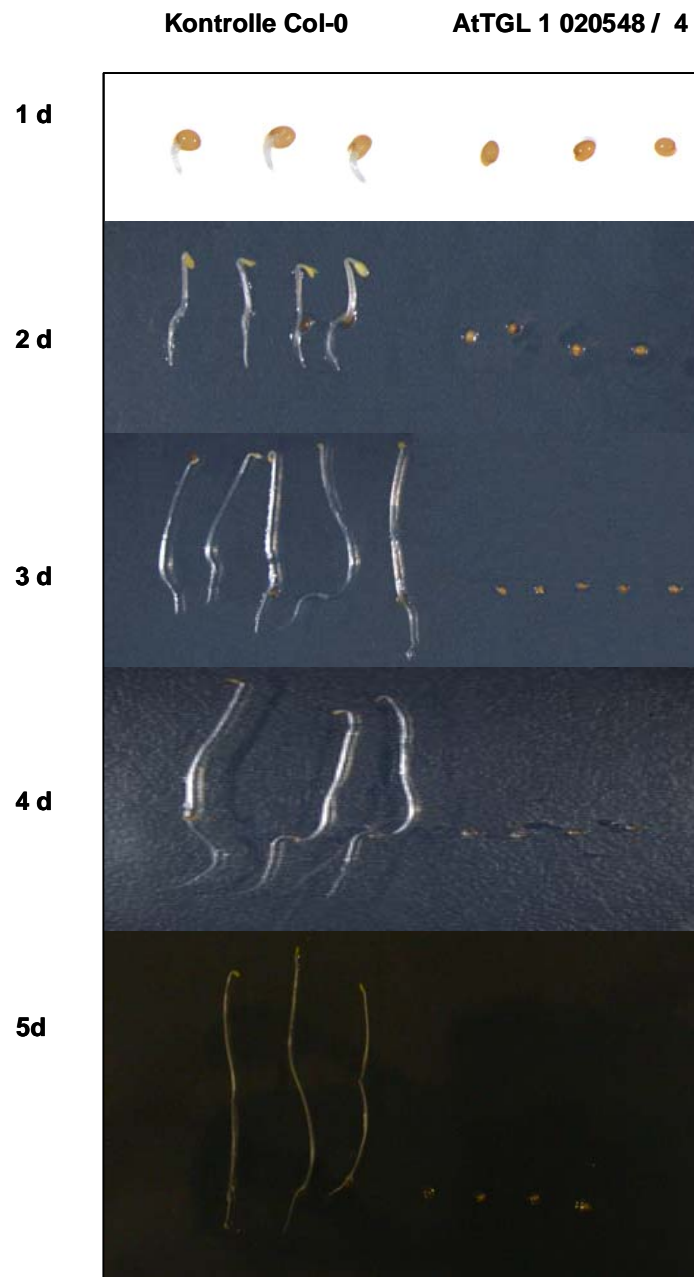


Abb. 27: Wachstum etiolierter Keimlinge der *AtTGL 1* Salk-Linie 020548/4 im Vergleich zu den Pflanzen der Kontrolle Col-0. Das Saatgut wurde parallel auf MS-Festagar ohne Saccharose ausgelegt und im Dunklen bei 24 °C inkubiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen und *AtTGL 1* Deletions-Pflanzen zeigen deutlich, dass die Herunterregulierung bzw. der Verlust von *AtTGL 1* die Keimung der Samen deutlich verzögert bzw. inhibiert. Gleichzeitig ist aber auch zu deutlich erkennen, dass die beobachteten Prozesse von den Lichtbedingungen stärker beeinflusst werden, als es für den Aufbau der photosynthetischen Systeme bzw. die Aufhebung der Dormanz („Lichtkeimung“) bei Arabidopsis bekannt ist. Ebenfalls zu erkennen ist die Involvierung von *AtTGL 1* bei der Einlagerung der Speicherlipide in die reifenden Samen.

Diskussion

Eine Reihe von Pflanzen lagert als Speicherstoffe in ihren Samen hauptsächlich Öle ein. Diese Pflanzen werden als Ölsaaten bezeichnet und haben große landwirtschaftliche Bedeutung. Charakteristisch für Ölsaaten ist, dass diese Reservelipide die einzige Kohlenstoffquelle während der Keimung darstellen. Den TGLs kommt in diesem Entwicklungsstadium eine besondere Bedeutung zu, da sie die in den Lipidkörpern gespeicherten Reservelipide (vornehmlich TAGs) hydrolysieren und damit den Ölabbau einleiten. Die freigesetzten Fettsäuren werden zu Acyl-CoAs aktiviert und gelangen dann in die β -Oxidation und die anschließenden Reaktionswege zum Aufbau von Kohlenhydraten und Aminosäuren (Kindl 1984). Verschiedene TGLs waren in vorausgehenden Arbeiten aus den Keimlingen unterschiedlicher Ölsaaten isoliert und charakterisiert worden (Sanders and Pattee 1975; Aizono, Funatsu et al. 1976; Lin and Huang 1984; Hills and Mukherjee 1990; Ncube, Gitlesen et al. 1995; Hoppe and Theimer 1997). Dabei hatte sich gezeigt, dass sich die TGLs verschiedener Pflanzenspezies stark in ihren molekularen Massen, Substratspezifitäten, pH-Optima und der Hydrophobizität ihrer Polypeptidketten unterscheiden. Außerdem variierte die subzelluläre Lokalisation. Die Enzyme wurden sowohl an Lipidkörpern, Glyoxysomen als auch im Cytosol nachgewiesen (Huang 1983; Huang 1987; Huang 1993). Insgesamt ist die TAG Hydrolyse durch TGLs essentiell für die Fettmobilisierung. Die Kenntnis dieser Enzymreaktion ist daher zum Verständnis dieses zentralen Stoffwechselweges von zentraler Bedeutung.

Obwohl verschiedene Proteine mit TGL-Enzymaktivität aus Pflanzen isoliert und charakterisiert worden waren, lag zu Beginn dieser Arbeit keine Sequenzinformation über TGL vor. Zu dem ließen sich die gereinigten Proteine aus verschiedenen Gründen nicht sequenzieren: Sie waren am N-Terminus blockiert oder ließen sich kaum durch Proteasen verdauen wie im Falle der TGL aus Gurkenkotyledonen gezeigt wurde (Balkenhohl 2000). Der wichtigste Grund ist aber sicherlich die geringe Ausbeute an gereinigtem Enzym (Lin and Huang 1984; Fuchs, Vine et al. 1996). Bei der Reinigung der TGL aus Gurke gelang es trotz großer Mengen an Ausgangsmaterial nicht, mehr als wenige Nanogramm an reiner TGL zu isolieren (Balkenhohl 2000). Ein klassischer Ansatz zur Isolierung pflanzlicher TGLs stellte sich also als problematisch dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein reverser genetischer Ansatz verfolgt werden: Anhand bekannter TGL-Sequenzen verschiedener Organismen sollten alle cDNA-Sequenzen im Genom von *A. thaliana* identifiziert werden, die für eine pflanzliche TGL codierten („*in silico*“-Klonierung). Die so gewonnenen Sequenzen sollten dann biochemisch charakterisiert werden. Die Modellpflanze *A. thaliana* wurde gewählt, da die vollständige Sequenz des Genomes bekannt war. Da zunächst keine spezifischen Sequenzmotive pflanzlicher TGLs bekannt waren, wurden für die Suche vier unterschiedliche TGL-Sequenzen verschiedenster Organismen für einen Homologievergleich

verwendet (vgl. Körner, 2000). Unbekannt war zunächst ebenfalls, wie stark die Sequenzen pflanzlicher TGLs und die von TGLs anderer Spezies einander ähneln. Daher wurden auch Proteinsequenzen mit geringer Ähnlichkeit zu TGLs anderer Spezies berücksichtigt. Nach diesen Auswahlkriterien wurden 44 putative TGL-Sequenzen im *Arabidopsis* Genom gefunden, die nun auf Expression in keimenden Samen hin geprüft wurden (Abb.2). Wegen der großen Menge an benötigter RNA wurde die Quantifizierung der spezifischen TGL-Transkripte nicht mittels Northern Blot Analyse durchgeführt, sondern über semiquantitative RT-PCR, deren Aussagekraft zur ersten Einschätzung der Expression in Keimlingen und Schoten ausreichte. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden dann 11 putative TGL-Sequenzen ausgewählt, die spezifisch in Schoten und Keimlingen exprimiert wurden. In Aktivitätstests mit rekombinanten Proteinen der Kandidaten konnte später lipolytische Aktivität für die putativen TGLs *Lip 2*, *Lip2-H*, *Lip24* und *Lip 25* nachgewiesen werden (Abb. 11, 12 und 13, Daten für *Lip 24* und *25* nicht gezeigt). Da die Proteine von *Lip 24* und *25* in *E. coli* nicht stabil exprimiert werden konnten, wurde ihre Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt (s.u.).

Im Genom von *Arabidopsis* wurden sieben weitere Sequenzen gefunden, die sowohl auf Proteinebene als auch auf Nukleotidebene eine so große Ähnlichkeit zu den TGL-Kandidaten *Lip 2* und *2-H* aufwiesen, dass von einem gemeinsamen Ursprung der Genen ausgegangen werden kann. Die Mitglieder dieser neuen Genfamilie wurden zunächst einheitlich benannt, wobei *Lip 2* zu *AtTGL 1* und *Lip 2-H* zu *AtTGL 2* wurde, und die Sequenzen wurden auf konservierte katalytische Regionen hin untersucht. Das katalytische Zentrum von TGLs besteht aus einer katalytischen Triade gebildet aus je einem Serin, Histidin und Aspartat (Lo, Lin et al. 2003); (Akoh, Lee et al. 2004), die in der Proteinsequenz weit auseinander liegen. Daher können nur Raumstrukturanalysen zur dreidimensionalen Struktur der TGLs die Aminosäuren eindeutig identifizieren, die das katalytische Zentrum bilden. *AtTGL1* und *AtTGL 2* weisen die für GDSL-Lipasen /Esterasen charakteristischen Konsensus-Blöcke auf. Block1: F-G-D-S-I-A-D beinhaltet das aktive Zentrum Serin₄₂. Dieses Motiv ist auch Teil des Oxyanion-Lochs. Das Oxyanion-Loch wird durch 2 Helices gebildet und hat eine tetraedrische Struktur. Es dient der Stabilisierung des tetrahedralen Zwischenproduktes bei der Hydrolyse. Block 2: G-I-N-F-A-V-Y-G-A-T-A-L-D enthält Gly₁₁₈, das ebenfalls ein Teil des Oxyanion Lochs ist. Block 3: I-G-G-N-D enthält Asn₁₇₉, ein weiterer Teil des Oxyanion Lochs. Block 4: D-G-Y-H-L enthält die restlichen Aminosäuren der katalytischen Triade Asp₃₄₄ und His₃₄₇ (Lo et al., 2003; Akoh et al., 2004). Aufgrund ihrer Lage in konservierten Regionen innerhalb der Peptidsequenz sowie ihrer Nachbarschaft zu anderen Aminosäuren, sind die Aminosäuren S₄₂ (im Motiv S-F-G-D-S), Histidin H₃₄₇ und Aspartat D₃₄₄ wahrscheinlich an der Bildung der katalytischen Triade beteiligt. In verschiedenen mikrobiellen Lipasen ist das während der Reaktion als Nukleophil wirkende Serin in der hochkonservierten Pentapeptidsequenz G-X-S-X-G am carboxyterminalen Ende einer β -Faltblattstruktur lokalisiert (Jaeger and Reetz 1998). Dieses

β -Faltblatt ist Bestandteil eines charakteristischen β -turn- α -Motivs, das als „nukleophiler Ellenbogen“ bezeichnet wird (Jaeger und Reetz, 1998). Das Pentapeptid G-X-S-X-G ist in der Form von S-F-G-D-S in den neuen pflanzlichen TGL-Sequenzen vorhanden. Das Lipase-spezifische GDS(42)I-Motiv, das in vielen mikrobiellen und pflanzlichen Lipasen als Signatur gilt (Lo et al., 2003; Akoh et al., 2004), ist in allen Sequenzen der AtTGL-Familie zu finden. Die AtTGL-Sequenzen beinhalten zusätzlich das Motiv F-P-x-G, das gemeinsam mit dem NH(x)₄D-Motiv die katalytische Einheit in Acyltransferasen bildet (Hilton and Buckley 1991). Das zweite Motiv ist jedoch nicht vorhanden, was eine Transacylaseaktivität ausschließen sollte.

Vergleiche der Nukleotidsequenzen der Genfamilie zeigen eine sehr große Ähnlichkeit der codierenden Bereiche (Exons) während Anzahl, Größe und Sequenz der nicht-codierenden Bereiche (Introns) stark variieren (Abb.5). Alle Gene der neuen AtTGL-Familie liegen auf Chromosom I in gleicher Orientierung direkt hintereinander. Eine solche Struktur von aufeinander folgenden Genen, mit Ähnlichkeiten von über 70 %, entsteht am wahrscheinlichsten durch mehrfache Genduplikation. Dagegen spricht jedoch, sowohl die unterschiedliche Anzahl und Größe der enthaltenen Introns wie auch die Tatsache, dass flankierende Sequenzen, wie z. B. Promotoren keine Ähnlichkeiten aufweisen (Coissac, Maillier et al. 1997)

In der phylogenetischen Einordnung mit anderen bekannten Hydrolasen von Arabidopsis gruppieren sich die Mitglieder der Genfamilie in einem eigenständigen Ast, der sich phylogenetisch nah an die Gruppe der sekretorischen PLA2 gliedert. Beide Gruppen trennen sich jedoch deutlich von allen anderen Hydrolasen (Abb.6).

Um zu prüfen, ob organspezifische Expressionsmuster einen Hinweis auf die potentiellen Funktionen der AtTGL-Gene geben könnten, wurden zunächst „digitale Northern Blots“ (dargestellt in den Abb. 7 und 8) erstellt und für AtTGL 1 und 2 anschließend experimentell verifiziert. Die digitalen Daten der AtTGL 1 zeigten eine starke Expression innerhalb der ersten 6 Tage nach der Samenkeimung an, was über semiquantitative RT-PCR experimentell bestätigt werden konnte (Abb. 9a). Für AtTGL 2 waren keine digitalen Daten verfügbar, sodass die experimentellen Daten der einzige Hinweis auf die Spezifität der Expression sind. Deutliche Unterschiede in der organspezifischen Expression zeigten sich bei AtTGL 1 und 2 besonders in Stängeln.

Auffällig ist die Übereinstimmung der Expressionen von AtTGL 3 und 4, die auf einer Kreuzreaktion beruhen könnte. Die Herstellungs- und Analyseverfahren der Mikroassays bei Affimetrix® minimiert die Zahl der Kreuzhybridisierungen zwar, schaltet sie aber nicht gänzlich ab. Daher ist nicht klar, ob die Daten der AtTGL 3 und 4 relevant ähnlich sind oder auf einer Kreuzhybridisierung basieren. Sollten die beiden TGL-Kandidaten tatsächlich zur

gleichen Zeit in gleicher Stärke exprimiert werden, könnte dies mit einer unterschiedlichen gewebespezifischen oder intrazellulären Lokalisation einhergehen.

Die Expression von *AtTGL 8* wird ebenfalls in Keimlingen induziert, nimmt innerhalb der ersten 20 Tage nach der Keimung ab, nach dem 25. Tag jedoch wieder zu. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Blütenentwicklung (Koornneef, Alonso-Blanco et al. 1998). Eine experimentelle Verifizierung der Korrelation dieser beiden Ereignisse, sowie eine Beteiligung der *AtTGL 8* an diesen Prozessen stehen noch aus. *AtTGL 6*, die während der Keimung nur schwach exprimiert wird, ist besonders stark während der Seneszenz in Blättern vertreten. Im Zug der Seneszenz von Blättern konnte die Induktion der Transkription von *AtTGL 6* auch in einer anderen Arbeit beobachtet werden. (GUO, CAI et al. 2004).

Zur funktionellen Charakterisierung wurden die Proteine zunächst heterolog exprimiert. Dabei zeigte sich, dass die neue *AtTGL*-Genfamilie aufgrund ihres Molekulargewichtes den Lipasen aus Reis am Ähnlichsten sind. Die bisher in der Literatur beschriebenen pflanzlichen TGLs unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten. Während die, aus *Oryza sativa* isolierten, TGLs nur 40 bzw. 32 kDa groß sind (Funatsu, Aizono et al. 1971; Aizono, Funatsu et al. 1976), haben die aus Raps isolierten Enzyme ein natives Molekulargewicht von 250-300 kDa (Hills and Mukherjee 1990). Für TGLs aus Ricinus und Mais wurde ein Molekulargewicht von 60 kDa beschrieben (Fuchs, Vine et al. 1996), während die aus der Gurke und *V. galamensis* isolierten TGLs ein Molekulargewicht von 115 kDa hatten (Balkenhohl, 2000; Adlercreutz et al., 1997). Für die in dieser Arbeit isolierten *AtTGL 1* und *2* wurden die Größen zunächst aus den annotierten Proteinsequenzen errechnet. Danach sollte *AtTGL 1* eine Größe von 42,409 kDa und *AtTGL 2* eine Größe von 42,016 kDa besitzen. Das in *E. coli* überexprimierte Protein von *AtTGL 1* zeigt im SDS-PAGE eine Größe von ca. 45 kDa (Abb.10). Da es jedoch N-terminal 3 Aminosäuren und einen His-tag, bestehend aus 5 x His zusätzlich besitzt, kann von einer Übereinstimmung der berechneten und der natürlichen Größe ausgegangen werden. Für *AtTGL 2* konnte keine starke Bande in der SDS-PAGE sichtbar gemacht werden. Die Durchmusterung der HUSAR-Datenbank mit der Proteinsequenz von *AtTGL 1* über eine BLASTP (Altschul, Gish et al. 1990) Suche zeigte ein zu der *AtTGL* alternatives, kleineres Protein. Es handelte sich dabei um das *Arab-1*-Protein für das bereits lipolytische Aktivität gegen Tween 80 gezeigt werden konnte (Brick, Brumlik et al. 1995). Die Sequenz dieses Proteins war eine der vier Sequenzen verschiedener Spezies, die zu Beginn der Arbeit zur Suche nach möglichen pflanzlichen TGL in der *A. thaliana*-Genombank verwendet wurden (Körner 2000). Für das *Arab-1*-Protein ist ein Molekulargewicht von 37 kDa beschrieben worden (Brick, Brumlik et al. 1995), obwohl die Proteinsequenz mit der von *AtTGL 1* identisch ist. Insgesamt ist eine Zuordnung des Enzyms über sein Molekulargewicht schwierig. Gerade bei älteren Arbeiten wurden native Methoden verwendet, sodass eine Oligomerisierung der Proteine nicht ausgeschlossen werden kann.

Von TGLs aus pflanzlichen Keimlingen ist eine hohe Selektivität für die pflanzenspezifische Hauptfettsäure des jeweiligen Samenöls bekannt (Adlercreutz, Gitlesen et al. 1997). Daher wurden bei der Charakterisierung der Substratspezifität zunächst die im TAG von *Arabidopsis* häufigen Fettsäuren Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3) als Substrat getestet. In Tests mit radioaktivem Triolein, dem TAG der 18:1 (Ölsäure) konnte, lipolytische Aktivität von AtTGL 1 und 2 eindeutig nachgewiesen werden (Abb.11 und 13). Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten AtTGLs 1 und 2 zeigten in weniger sensitiven, nicht radioaktiven Enzymtests mit einem Lipidextrakt aus Gurkenkotyledonen zwar hohe Lipaseaktivität gegenüber 13-HPODE, der peroxidierten Form der 18:2 (Abb. 12), eine direkte Freisetzung von 18:2 und 18:3 aus dem TAG konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zur Analyse der Selektivität der isolierten AtTGLs wurde zusätzlich nicht radioaktives Trilinolein als Substrat getestet. Hintergrund dieses Experimentes war die Tatsache, dass der verwendete Lipidextrakt aus Gurke stammte, einer Pflanze in der neben weiteren Pflanzen wie Kürbis, Flachs, Ringelblume, Rizinus und Sonnenblume eine TGL mit hoher Selektivität für oxidierte Fettsäuren nachgewiesen werden konnte (Balkenhohl, Kühn et al. 1998) und bei der auch weitere Daten dafür sprechen, dass der TAG-Abbau in den Samen durch Oxygenierung initiiert wird (Feussner and Wasternack 1998). Dieser Abbauweg konnte in Brassicaceen bislang nicht nachgewiesen werden. Weder für AtTGL 1 noch für AtTGL 2 konnte lipolytische Aktivität gegenüber Trilinolein demonstriert werden. Die Substratspezifität für andere oxidierte Fettsäuren wie z.B. die in Tricinolin veresterte Ricinolsäure ((9Z)-12-Hydroxy-9-octadecensäure) wurde ebenfalls getestet, aber auch hier konnte keine Aktivität gezeigt werden. Von dem *arab-1*-Protein, das mit AtTGL 1 identisch zu sein scheint, wurde die lipolytische Aktivität mit Tween 80, einem Oleatester des Polyoxyethylensorbitans, nachgewiesen (Brick, Brumlik et al. 1995). Eine lipolytische Aktivität gegenüber TAGs wurde von Brick et al., 1995 jedoch nicht beschrieben.

Ein unabhängiger Nachweis der lipolytischen Aktivität von AtTGL 1 und 2 wurde durch die Komplementation der Hefe *tgl3*-Mutante erbracht (Abb.14). In dieser Hefe-Mutante, in der durch die Deletion der endogenen TGL kein Abbau endogener TAGs mehr stattfindet (Athenstaedt and Daum 2003), konnte durch die Expression von AtTGL 1 bzw. 2 der TAG-Gehalt um mindestens 35 % reduziert werden. Ursache dafür, dass der TAG-Abbau durch die Expression von AtTGL 1 bzw. 2 nicht deutlich stärker war, könnten Unterschiede in der Substratspezifität oder eine andere Lokalisation bzw. Regulation der deletierten endogenen TGL und AtTGL 1 bzw. 2 verantwortlich sein.

Eine weitere große Gruppe an möglichen Substraten für Lipasen sind die Galaktolipide bzw. Phospholipide. Bisher durchgeführte Aktivitätstests zeigten keine Aktivität gegenüber diesen Substraten. Da aber im Rahmen dieser Arbeit nur wenige Substrate getestet wurden und die Mengen an exprimiertem Protein sehr klein waren, können zu diesem Zeitpunkt keine eindeutigen Aussagen zu dieser Frage getroffen werden.

Ein weiterer Schritt zur Charakterisierung der physiologischen Bedeutung von AtTGL 1 und 2 war ihre intrazelluläre Lokalisierung. Pflanzliche TGLs können je nach Pflanzenspezies direkt am Lipidkörper, in den Glyoxysomen oder im Cytosol lokalisiert sein (Huang 1993). Dabei müssen die TGLs nicht zwangsläufig auch in diesem Kompartiment synthetisiert werden. Für den Transport von Proteinen zum Lipidkörper werden zwei mögliche Wege angenommen. Eine Möglichkeit ist der Transport über das endoplasmatische Retikulum (ER), wie er für das Oleosin diskutiert wird (Abell, Holbrook et al. 1997). Dabei wird das Protein an ER-gebundenen Polysomen gebildet und dann zum Lipidkörper transportiert. Details dieses Transportes sind noch ungeklärt. Ein anderer Weg wird für die Lipidkörper-LOX aus Gurkenkeimlingen angenommen. Dieses Enzym wird im Cytosol synthetisiert und gelangt von dort direkt an den Lipidkörper (May, Höhne et al. 2000). In diesem Zusammenhang wurde für die Lipidkörper-LOX an ihrem N-Terminus eine β -Barrel-Domäne nachgewiesen, die für den Transport des Enzyms an die Lipidkörpermembran von essentieller Bedeutung ist (May, Höhne et al. 2000). Eine solche Domäne wurde auch bereits in Phospholipasen des Patatintyps und in der Pankreas-Lipase nachgewiesen (May, Preisig-Müller et al. 1998).

Um Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisation der AtTGL 1 und 2 zu bekommen, wurden deren Proteinsequenzen mit dem CBS Signal P V1.1-Programm auf Signalsequenzen für den gerichteten Transport in bestimmten Organellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Proteinsequenzen Signalpeptide einer Länge von jeweils 27 Aminosäuren besitzen, die die Biosynthese am ER vermitteln könnten. Mit Hilfe des CBS TMHMM 1.0-Programmes wurde gefunden, dass die Signalsequenzen in membranständigen Domänen der Proteine vorliegen. Beides lässt die Vermutung zu, daß die AtTGL 1 und 2 mit Hilfe der membranständigen Signal-Helix in das ER gelangen könnten, um von dort mit Hilfe des Membranankers zu den Lipidkörpern transportiert zu werden. Die Lokalisierungsvorhersagen dieser Programme müssen natürlich experimentell verifiziert werden. Um diesen experimentellen Nachweis zu erbringen, wurde YFP wahlweise N-terminal als auch C-terminal an AtTGL 1 fusioniert, um die postulierte Signalsequenz zu testen bzw. mögliche C-terminale Signalmotive nicht zu blockieren. Die Colokalisierung mit dem in der Lipidkörpermembran verankerten Oleosin, zeigte deutlich, dass das C-terminal-fusionierte AtTGL 1 mit Lipidkörpern assoziiert ist (Abb.15). Da AtTGL 1, das N-terminal mit YFP fusioniert ist, im Cytosol bleibt, lässt sich schlussfolgern, dass die Signalsequenz wichtig für die Lokalisierung ist. Für AtTGL 2 wurde diese Experiment nicht durchgeführt, da aber die Proteinsequenzen der beiden AtTGL über die Gesamtsequenz sehr ähnlich sind und die postulierten Signalsequenzen sogar identisch sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß, das AtTGL 2 ähnlich wie AtTGL 1 am Lipidkörper lokalisiert ist.

Die physiologische Bedeutung von AtTGL 1 und 2 lässt sich am besten an Mutanten charakterisieren, in denen die Expression von AtTGL 1 und 2 entweder verstärkt oder reduziert bzw. deletiert ist. Die Keimung der Samen sowie die Mobilisierung der

Speicherstoffe sind Prozesse, die durch verschiedene Einflüsse wie Temperatur, Licht aber auch das Entwicklungsstadium stark reguliert werden (Bewley 1994). Nach dem Trocknen der Samen folgt die Samenruhe (Dormanz) innerhalb derer eine Keimung auch nach eventueller Quellung der Samen nicht möglich ist. Erst durch günstige, äußere Bedingungen sorgt die Änderung endogener Faktoren für ein „Erwachen“ des Samens aus der Dormanz (Bewley 1997). Damit kann die Keimung einsetzen, die mit der Quellung des Samens beginnt und mit dem Durchbrechen der Keimwurzel durch die Samenschale endet (Bewley, 1997). Direkt mit der Keimung beginnt die Mobilisierung der Lipidreserven aus den Speicherorganen der Samen. Die dabei freigesetzten Fettsäuren dienen der Generierung von Acetyl-CoA und bilden damit die wichtigste Kohlenstoffquelle des Keimlings bis zur vollständigen Ausbildung der Photoautotrophie (Kindl 1984). Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Lipidmobilisierung in diesem Stadium würde eine Verknappung der freigesetzten Fettsäuren eine Limitierung von Wachstum und Entwicklung des Keimlings bedeuten. Da eine solche Einschränkung einen erheblichen Nachteil für den Keimling bedeutet, kann angenommen werden, dass die Prozesse mit maximal möglicher Kapazität durchlaufen werden, sodass auch die Überexpression der keimlingspezifischen TGL zu keiner Geschwindigkeitserhöhung bei der Keimlingsentwicklung führen sollte. Tatsächlich konnte dieser Zusammenhang an den AtTGL 1-Überexpressionspflanzen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Umkehrschluss bedeutet das natürlich auch, dass eine Reduktion dieser TGL-Aktivität eine deutliche Verlangsamung in der Keimlingsentwicklung bewirken sollte. Ein kompletter Ausfall der TGL sollte Keimung und Entwicklung nachhaltig beeinflussen. In Abwesenheit von Licht ist die Ausbildung der Photoautotrophie verzögert und der Keimling länger von seinen Speicherfetten abhängig. Daher war es von Vorteil die AtTGL 1 antisense-Pflanzen sowie die AtTGL 1 Deletions-Pflanzen zunächst unter etiolierten Bedingungen ohne externe C-Quelle zu charakterisieren. Die vier getesteten Linien der AtTGL 1 antisense-Pflanzen, in welchen eine unterschiedlich starke Reduktion der AtTGL 1 bzw. 2-mRNA nachgewiesen wurde (Abb. 16a,b), zeigten eine deutliche Verlangsamung der Keimlingsentwicklung innerhalb der ersten fünf Tage nach der Keimung. Dabei war zu beobachten, dass sich die Keimlinge der Linien mit der stärksten AtTGL 1-mRNA-Reduktion (Linien 35a1 und 43a1) am langsamsten entwickelten (Abb. 20). Nach fünf Tagen war aber kein Entwicklungsunterschied zwischen den AtTGL 1 antisense-Pflanzen und den Kontrollpflanzen mehr zu sehen. Offensichtlich beeinflussen AtTGL 1 und 2 den Lipidmetabolismus innerhalb der ersten fünf Tage besonders stark, da dieser Zeitraum mit den Daten des entwicklungspezifischen „digitalen Northern“ korreliert, welcher zeigt, dass die maximale Expression von AtTGL 1 in den ersten fünf Tagen nach der Samenquellung liegt und anschließend stark abnimmt. Möglicherweise setzen während dieser Zeit weitere Prozesse der Kohlenstoff- und Energiegewinnung ein, die die verlangsamte Lipidmobilisierung kompensieren und die Entwicklung vorantreiben. Weiterhin zeigte sich bei den stark herunterregulierten AtTGL 1 antisense-Pflanzen der Linien 35 und 43a1, dass ein

großer Teil der Samen überhaupt nicht keimte (Abb. 18). Dieser Phänotyp wird von der homozygoten AtTGL 1-Deletionslinie 020548/4 eindeutig bestätigt, da auch die Samen dieser Linie nicht keimten (Keimungsrate < 8%) (Abb. 26). Die homozygote AtTGL 1 Deletionslinie 020548/4 bewies ebenfalls, dass der keimungsrelevante Phänotyp der antisense-Linien eindeutig auf AtTGL 1 zurückzuführen ist, da in den antisense-Pflanzen selbst eine Herunterregulierung weiterer Mitglieder der AtTGL-Genfamilie nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die Keimungsspezifität von AtTGL 1 wird ebenfalls durch die Analyse des TAG-Abbaus während der ersten sechs Tage in den AtTGL 1 antisense-Pflanzen bestätigt. In den Kontrollen fällt der TAG-Gehalt bis zum fünften Tag nach der Samenquellung unter 5 % (Eastmond et al., 2000). Die Keimlinge der AtTGL 1 antisense-Pflanzen enthielten hingegen zu diesem Zeitpunkt noch mehr als doppelt soviel TAG. Die Abnahme des TAG-Gehaltes in den AtTGL 1 antisense-Linien korrelierte ebenfalls mit der Reduktion der AtTGL 1-mRNA. Auch dieser Aspekt bestätigt die Beteiligung der keimungsspezifischen AtTGL 1 am Entwicklungsprozess des Keimlings bei *A. thaliana*.

Sowohl die Prozesse als auch die Lokalisierung des Fettsäureabbaus unterscheiden sich in pflanzlichen und tierischen Zellen erheblich. Während sich in den tierischen Zellen die β -Oxidationsprozesse zwischen den Peroxisomen und den Mitochondrien aufteilen, finden sie in pflanzlichen Zellen ausschließlich in Glyoxysomen bzw. Peroxisomen statt (Kleiter and Gerhardt 1998);(Hayashi, Debellis et al. 1999). Aus dem dabei entstehenden Acetyl-CoA wird im Glyoxylatzyklus Succinat, welches anschließend in die Mitochondrien transportiert wird, um der respiratorischen ATP Produktion zu dienen oder in Malat umgewandelt ins Cytosol gelangen um in die Gluconeogenese eingespeist zu werden.

Verschiedene Mutanten, die Deletionen bei Enzymen dieser weiterführenden Stoffwechselprozesse besaßen, waren dahingehend charakterisiert worden, dass sie u.a. durch den Faktor Licht in der Ausprägung ihres Entwicklungsphänotypes beeinflusst wurden (bou, (Lawand, Dorne et al. 2002); icl-1 und icl-2, Eastmond et al., 2000). Aufgrund dessen wurden die AtTGL 1 antisense-Linien wie auch die AtTGL 1-Deletionslinie 020548/4 unter verschiedenen Lichtbedingungen getestet. Im Dauerlicht zeigten die AtTGL 1 antisense-Pflanzen nach erfolgreicher Keimung und Keimlingsentwicklung einen Arretierungsphänotyp, der u.a. mit dem vollständigen Fehlen des Wurzelwachstums einher ging (Abb. 22a). Dieser Phänotyp, der in nahezu allen transgenen AtTGL 1 antisense-Linien auftrat (vgl. Tab.2) konnte durch die Verfügbarkeit einer externen Kohlenstoffquelle überwunden werden (Abb. 22 b,c), sodass sich die Pflanzen weiter entwickelten und Blüten bzw. Samen produzierten. Ein sehr ähnlicher Phänotyp, der ebenfalls mit der Arretierung des Wachstums und dem Aussetzen des Wurzelwachstums einhergeht, ist auch für die Mutante bou beschrieben (Lawand et al., 2002). Bei dieser Mutante ist das Gen eine Enzymes deletiert, das starke Ähnlichkeit mit einem Carnitin-Acyl-Transporter aus Säugerzellen hat und wahrscheinlich für den Transport von Acylresten in die Mitochondrien verantwortlich ist

(Lawand et al., 2002). Da es für diesen Transport in dem oben genannten Modell keine Verwendung gibt, wurde das Enzym als ein Teil des von Eastmond et al., 2000 postulierten alternativen Stoffwechselweges diskutiert, welcher unter Lichtbedingungen den Glyoxylatzyklus umgeht (Eastmond et al., 2000). Der Phänotyp der Mutante *bou* kann ebenfalls durch Zugabe einer externen Kohlenstoff- und Energiequelle bzw. der Einführung einer längeren Dunkelperiode überwunden werden (Lawand et al., 2002). Da dieser Phänotyp der AtTGL 1 antisense-Pflanzen im Dauerlicht nicht bei der AtTGL 1 Deletionslinie 020548/4 gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass AtTGL 1 nicht in diese Prozesse involviert ist. Die Deletion eines Gens durch die Lokalisierung des Transgens kann aufgrund der vielen unabhängigen, getesteten AtTGL 1 antisense-Linien (vgl. Tab.2), die den Phänotyp zeigen ausgeschlossen werden, nicht aber die Herunterregulierung eines weiteren Gens (vgl. Abb. 17), sodass eventuell ein anderer Vertreter dieser AtTGL-Familie für diesen Phänotyp verantwortlich ist.

Ein weiterer Einfluss des Lichtes auf die AtTGL 1 antisense- bzw. Deletionslinien wurde nach der kurzzeitigen Belichtung nicht gekeimter Samen beobachtet. Diese Samen, welche zuvor gemeinsam mit Kontrollen nach der Quellung neben eine Kälteperiode noch 3 Stunden Licht zur Brechung der Dormanz erhielten (Koorneef 1994), waren mehrere Tage im Dunklen inkubiert worden und im Gegensatz zu den Kontrollen nicht gekeimt (Vgl. Abb. 19a,b). Nach Verlängerung auf eine 8 stündige Lichtperiode keimten und entwickelten sich diese Samen phänotypisch unauffällig, was ebenfalls an den Samen der AtTGL 1 Deletionslinie 020548/4 verifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das Eintreten der Keimung und Keimlingsentwicklung nach Lichtinkubation könnte auf die Brechung einer, durch die Reduktion von AtTGL 1-mRNA verursachten, verstärkten Dormanz zurückzuführen sein.

Neben dem Abbau der Speicherlipide während der Keimung und frühen Keimlingsentwicklung ist auch deren Synthese während der Entwicklung des Embryos als Charakterisierungspunkt der keimungsspezifischen AtTGL 1 interessant, da die Daten verschiedener Studien zeigen, dass der Lipidgehalt auch während der Samenreifung verschiedener Ölsaaten wie *B. napus*, *A. thaliana*, *C. abyssinica* und *N. tabacum* abnimmt (McKillikan 1966; McKillican and Larose 1974); (Gurr, Blades et al. 1972); (Norton 1975); (Murphy 1989); (Baud 2002); (Tomlinson 2004).

Verschiedene Arbeiten zeigen ebenfalls, dass der Embryo genauso zum TAG-Abbau befähigt ist, wie der Samen während der Keimung bzw. der Keimlingsentwicklung. So konnte die Aktivität verschiedener Enzyme in reifenden Samen von Baumwolle (Miernyk and Trelease 1981a; Miernyk and Trelease 1981b), Ricinus (Hutton and Stumpf 1969), Kürbis (Köller et al, 1979; Frevert et al., 1980) und Raps (Eccleston and Ohlrogge 1998) detektiert werden, die in β -Oxidation oder Glyoxylatzyklus involviert sind. In späten Stadien der Embryonal Entwicklung in *B. napus* konnten die Aktivität von Malatsynthetase und Isocitratlyase nachgewiesen werden, die Aktivität des Glyoxylatzyklus jedoch nicht (Comai, Dietrich et al. 1989); (Ettinger and Harada 1990). Des Weiteren konnten in reifenden

Arabidopsissamen β -Oxidationsprozesse nachgewiesen werden (Poirier 1999); (Moire, Rezzonico et al. 2004).

Bei dem Versuch den TAG-Gehalt reifer Samen von *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen zu bestimmen, wurde zunächst beobachtet, dass die *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen trotz gleicher Wachstumsbedingungen später zu Blühen begannen als die Kontrollen (Abb.23). Während die Kontrollpflanzen zum Zeitpunkt der Blühinduktion durchschnittlich 30 - 35 Rosettenblätter hatten, begannen die *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen erst bei einer Anzahl von 45 - 50 Rosettenblättern, wobei auch hier eine Korrelation zwischen der Stärke der Regulation durch das antisense-Konstrukt und der Verzögerung der Blühinduktion zu beobachten war (Abb. 24). Eine direkte Beteiligung von *AtTGL 1* an der verspäteten Blühinduktion konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso könnte dieser Phänotyp auch von anderen durch das *antisense*-Konstrukt herunterregulierten Genen verursacht werden.

Weiterhin konnte beobachtet werden dass, die *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen signifikant mehr Schoten und mehr Saatgut bildeten (Abb.24). Dabei war die Anzahl der Samen pro Schote mit etwa 40 Stück vergleichbar mit der in den Kontrollen. Eine Korrelation dieser Ertragserhöhung mit der Stärke der antisense-Regulation konnte in diesem Fall nicht nachgewiesen werden. Daher könnten die höheren Saatguterträge durchaus darauf zurückgeführt werden, dass die Pflanzen durch die spätere Blühinduktion mehr Zeit für Wachstum und Entwicklung und damit zur Bildung von Biomasse hatten.

Zum Ende der Samenreife nimmt der TAG-Gehalt in den Samen ab (Hills 2004). Verglichen mit den Kontrollen konnte in den reifen Samen der *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen ein höherer TAG-Gehalt nachgewiesen werden, der vor allem auf der Erhöhung von 18:1 und 20:1 beruhte (Abb. 25). Die Tatsache, dass der TAG-Gehalt nur in einer der beiden stark herunterregulierten Linie, nämlich Linie 35a1, signifikant erhöht ist und dass in der sehr schwach herunterregulierten Linie 43a3 (vgl. Abb. 16) sogar eine signifikante Erniedrigung des TAG-Gehaltes zu sehen ist, zeigt keine direkte Korrelation zwischen der Reduktion der *AtTGL 1* und 2 und der Erhöhung des TAG-Gehaltes in den Samen. Um zu dieser Fragestellung eine konkrete Aussage zu treffen, müssten zunächst die TAG-Gehalte der Samen der *AtTGL 1* Deletionslinie analysiert werden, da durch die Deletion des Gens keine Expression von *AtTGL 1* mehr vorhanden ist und alle phänotypischen Differenzen zu den Wildtyp-Pflanzen maximal sein sollten.

Für *AtTGL 1* und 2 konnte lipolytische Aktivität gegenüber Triolein und 13-HPODE gezeigt werden (Abb.11, 12 und 13). Für die vollständige Darstellung der Substratspezifität müssen aber noch weitere Lipide getestet werden, wobei nicht nur TAG mit verschiedenen gesättigten, ungesättigten oder aber oxygenierten Fettsäuren eine Rolle spielen, sondern auch DAGs, MAGs bzw. physiologisch relevante Phospho- und Galaktolipide. Eine weitere offene Frage liefert die Tatsache, dass in den *AtTGL 1 antisense*-Pflanzen sowohl *AtTGL 1* als auch *AtTGL 2* herunterreguliert sind und von einigen anderen Mitgliedern der TGL-Familie nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, in wie weit sie ebenfalls reduziert

werden (Abb.19). Für eine letztendliche Unterscheidung der physiologischen Funktion der Mitglieder der AtTGL -Familie müssten für jedes der Gene Arabidopsis-Deletionsmutanten isoliert und eingehend charakterisiert werden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals eine keimungsspezifische TGL durch einen reversen genetischen Ansatz aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und charakterisiert werden. Die für die Klonierung benötigten Sequenzen wurden zunächst unter Zuhilfenahme bekannter TGL-Sequenzen aus der Genomdatenbank von *A. thaliana* isoliert und anschließend mittels RT-PCR hinsichtlich einer keimungsspezifischen Expression charakterisiert. Auf diesem Wege konnten 11 mögliche Proteine identifiziert werden von denen die Proteine *AtTGL 1* und *AtTGL 2* nach heterologer Expression in *E. coli* tatsächlich lipolytische Aktivität gegenüber Triacylglycerinen zeigten. Unabhängig davon konnte die TGL-Aktivität von *AtTGL 1* und *AtTGL 2* auch durch die Komplementation der TGL-defizienten Hefemutante *tgl3* gezeigt werden. Basierend auf vielfältigen Homologievergleichen wurde weiterhin festgestellt, dass die beiden *AtTGL* Mitglieder einer Genfamilie sind, die neun Mitglieder umfasst. Durch die Kolo-kalisierung eines *AtTGL 1*-YFP-Fusionsproteins mit einem lipidkörperspezifischen Marker konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass *AtTGL 1* an den Lipidkörpermembranen lokalisiert ist. Für eine umfassende Studie der physiologischen Bedeutung von *AtTGL 1* wurden *AtTGL 1*-Überexpressions- und antisense-Pflanzen generiert, sowie eine homozygote *AtTGL 1*-Deletionsmutante isoliert. Während die *AtTGL 1*-Überexpressionspflanzen keine Unterschiede zu den Kontrollen zeigten, konnte unter etiolierten Bedingungen sowohl für die *AtTGL 1*-antisense-Pflanzen wie auch *AtTGL 1*-Deletionsmutanten gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der Reduktionsstärke der *AtTGL 1*-Expression die Keimlingsentwicklung im Dunkeln in Abwesenheit einer anderen C-Quelle verlangsamt ist bzw. ganz ausbleibt. Im Dauerlicht dagegen keimen die *AtTGL 1* antisense-Pflanzen normal, zeigen aber eine Arretierung im Wachstum der Wurzel und damit auch in der Gesamtentwicklung. Dieser Arretierungsphänotyp kann jedoch durch die Gabe externer C-Quellen (z.B. Saccharose) überwunden werden. In weitem Verlauf ihrer Entwicklung zeigten die *AtTGL 1* antisense-Pflanzen zunächst eine verzögerten Blühinduktion, hatten dann aber eine größere Menge an Schoten und Samen im Vergleich zu den Kontrollen. In den reifen Samen der *AtTGL 1* antisense-Pflanzen konnte ein signifikant erhöhter TAG-Gehalt festgestellt werden, der auf einer deutlichen Erhöhung von 18:1 und 20:1 beruht.

Literaturverzeichnis

- Abell, B. M., L. A. Holbrook, et al. (1997). "Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting." Plant Cell **9**(8): 1481-1493.
- Adlercreutz, P., T. Gitlesen, et al. (1997). *Vernonia* lipase: A plant lipase with strong fatty acid selectivity. Methods in Enzymology. Lipases, Part A. B. Rubin and E. A. Dennis. 525 B Street/Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495, Academic Press Inc. **284**: 220-232.
- Aizono, Y., M. Funatsu, et al. (1976). "Biochemical studies on rice bran lipase II." Agr. Biol. Chem. **40**(2): 317-324.
- Akoh, C. C., G. C. Lee, et al. (2004). "GDSL family of serine esterases/lipases." Prog Lipid Res **43**(6): 534-52.
- Altaf, A., T. V. Ankers, et al. (1997). "Acid lipase of castor bean lipid bodies: Isolation and characterisation." Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology **6**(1): 13-18.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Arondel, V. (2003). New recombinant triacylglycerol lipase from *Arabidopsis thaliana*, useful e.g. for treating lipase deficiency, also nucleic acid for preparation of transgenic plants. PCT. FR.
- Athenstaedt, K. and G. Daum (1999). "Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism." European Journal of Biochemistry **266**(1): 1-16.
- Athenstaedt, K. and G. Daum (2003). "YMR313c/TGL3 Encodes a Novel Triacylglycerol Lipase Located in Lipid Particles of *Saccharomyces cerevisiae*." J. Biol. Chem. **278**(26): 23317-23323.
- Ausubel, F. M., R. E. Brent, et al. (1993). Current Protocols in Molecular Biology. New York, Green Publishing Associates and John Wiley and Sons Inc.
- Balkenhohl, T. (2000). Abbau von Speichertriacylglyceriden in keimenden Samen der Gurke (*Cucumis sativus*). Marburg, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Balkenhohl, T., H. Kühn, et al. (1998). A lipase specific for esterified oxygenated polyenoic fatty acids in lipid bodies of cucumber cotyledons. Advances in Plant Lipid Research. J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo and E. Martínez-Force. Sevilla, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla: 320-322.
- Baud, S. B., J-P; Miquel, M; Lepiniec, L; Rochat, C. (2002). "An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS." Plant Physiology and Biochemistry **40**(151-160).
- Bewley, J. D. (1997). "Seed Germination and Dormancy." Plant Cell **9**(7): 1055-1066.
- Bewley, J. D. B., M. (1994). Seeds: Physiology of Development and Germination. New York, NY:Plenum.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Canadian Journal of Biochemistry and Physiology **37**: 911-917.
- Brick, D. J., M. J. Brumlik, et al. (1995). "A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize." FEBS Letters **377**(3): 475-480.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Coissac, E., E. Maillier, et al. (1997). "A comparative study of duplications in bacteria and eukaryotes: the importance of telomeres." Mol Biol Evol **14**(10): 1062-74.
- Comai, L., R. A. Dietrich, et al. (1989). "Coordinate expression of transcriptionally regulated isocitrate lyase and malate synthase genes in *Brassica napus* L." Plant Cell **1**: 293-300.
- Eastmond, P. J. (2004). "Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans." J. Biol. Chem. **279**(44): 45540-45545.
- Eastmond, P. J., V. Germain, et al. (2000). "Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5669-74.

- Eccleston, V. S. and J. B. Ohlogge (1998). "Expression of lauroyl-acyl carrier protein thioesterase in *Brassica napus* seeds induces pathways for both fatty acid oxidation and biosynthesis and implies a set point for triacylglycerol accumulation." Plant Cell **10**(4): 613-621.
- Ettinger, W. F. and J. J. Harada (1990). "Translational or post-translational processes affect differentially the accumulation of isocitrate lyase and malate synthase proteins and enzyme activities in embryos and seedlings of *Brassica napus*." Arch Biochem Biophys **218**: 139-143.
- Feussner, I., T. J. Balkenhohl, et al. (1997). "Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons - Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination." Journal of Biological Chemistry **272**(34): 21635-21641.
- Feussner, I., E. Blée, et al. (1998). Fatty acid catabolism at the lipid body membrane of germinating cucumber cotyledons. Advances in Plant Lipid Research. J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo and E. Martínez-Force. Sevilla, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla: 311-313.
- Feussner, I., H. Kühn, et al. (1997). "Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate β -oxidation?" FEBS Letters **406**(1-2): 1-5.
- Feussner, I., H. Kühn, et al. (2001). "The lipoxygenase dependent degradation of storage lipids." Trends in Plant Science **6**(6): 268-273.
- Feussner, I. and C. Wasternack (1998). "Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids." Fett/Lipid **100**(4-5): 146-152.
- Feussner, I., C. Wasternack, et al. (1995). "Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **92**(25): 11849-11853.
- Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.
- Frevort, J., W. Koeller, et al. (1980). "Occurrence and biosynthesis of glyoxysomal enzymes in ripening cucumber seeds." Hoppe-Seyley's Z Physiol Chem **361**: 1557-1565.
- Fuchs, C., N. Vine, et al. (1996). "Purification and characterization of the acid lipase from the endosperm of castor oil seeds." Journal of Plant Physiology **149**(1-2): 23-29.
- Funatsu, M., Y. Aizono, et al. (1971). "Biochemical studies on rice bran lipase." Agr. Biol. Chem. **35**(5): 734-742.
- Gunstone, F. D., J. L. Harwood, et al. (1994). The Lipid Handbook. London, Chapman & Hall.
- GUO, Y., Z. CAI, et al. (2004). "Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence." Plant Cell Environ **27**(5): 521-549.
- Gurr, M. I., J. Blades, et al. (1972). "Studies on seed-oil triglycerides. The composition of *Crambe abyssinica* triglycerides during seed maturation." Eur J Biochem **29**(2): 362-8.
- Hammer, M. F. and J. B. Murphy (1993). "Properties of the lipid body lipase of *pinus edulis* and electrophoretic purification of its 64 kDa subunit." Physiol. Plant. **87**: 39-44.
- Hammer, M. F. and J. B. Murphy (1994). "Lipase activity and *in vivo* triacylglycerol utilization during *pinus edulis* seed germination." Plant Physiol Biochem **32**(6): 861-867.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hayashi, H., L. Debellis, et al. (1999). "A novel acyl-CoA oxidase that can oxidize short-chain acyl-CoA in plant peroxisomes." Journal of Biological Chemistry **274**(18): 12715-12721.
- Hayashi, M., K. Toriyama, et al. (1998). "2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid β -oxidation." Plant Cell **10**(2): 183-95.
- Hills, M. J. (2004). "Control of storage-product synthesis in seeds." Curr Opin Plant Biol **7**(3): 302-8.
- Hills, M. J. and H. Beevers (1987). "An antibody to the castor bean glyoxysomal lipase (62 kD) also binds to a 62 kD protein in extracts from many young oilseed plants." Plant Physiol. **85**(4): 1084-8.

- Hills, M. J. and H. Beevers (1987). "Ca²⁺ stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies." Plant Physiol. **84**: 272-276.
- Hills, M. J., I. Kiewitt, et al. (1990). "Lipase from Brassica napus L. discriminates against cis-4 and cis-6 unsaturated fatty acids and secondary and tertiary alcohols." Biochim Biophys Acta **1042**(2): 237-40.
- Hills, M. J. and K. D. Mukherjee (1990). "Triacylglycerol lipase from rape (Brassica napus L.) suitable for biotechnological purposes." Appl Biochem Biotechnol **26**(1): 1-10.
- Hills, M. J., D. J. Murphy, et al. (1989). "Inhibition of neutral lipase from castor bean lipid bodies by coenzyme A (CoA) and oleoyl-CoA." Plant Physiol. **89**: 1006-1010.
- Hilton, S. and J. T. Buckley (1991). "Studies on the reaction mechanism of a microbial lipase/acyltransferase using chemical modification and site-directed mutagenesis." J Biol Chem **266**(2): 997-1000.
- Hoagland, D. R. and D. I. Arnon (1941). "The water culture method for growing plants without soil." Miscellaneous Publications **354**(347): 461.
- Hoppe, A. and R. R. Theimer (1997). "Degradation of oil bodies isolated from cotyledons during germination of rapeseed seedlings." Journal of Plant Physiology **151**(4): 471-478.
- Hoppe, A. and R. R. Theimer (1997). "Enzymes for lipolysis and fatty acid metabolism in different organelle fractions from rape seed cotyledons." Planta **202**(2): 227-234.
- Hoppe, A. and R. R. Theimer (1997). "Rapeseed lipase-pH dependent specificity for native lipid body autolysis and lipolysis of artificial oil droplets." Journal of Plant Physiology **151**(4): 390-398.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, et al. (1985). "A simple and general method for transferring genes into plants." Science **227**: 1229-1231.
- Huang, A. H. C. (1983). Plant lipases. Lipolytic Enzymes. B. Borgstrom and H. Brockman. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press: in press.
- Huang, A. H. C. (1987). Lipases. The biochemistry of plants. P. K. Stumpf. Orlando, Academic Press. **9**: 91-119.
- Huang, A. H. C. (1992). "Oil Bodies and Oleosins in Seeds." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **43**: 177-200.
- Huang, A. H. C. (1993). Lipases. Lipid Metabolism in Plants. J. Moore, T.S. London, CRC Press: 473-503.
- Huang, A. H. C. (1994). "Structure of plant seed oil bodies." Curr Opin Struc Biol **4**(4): 493-498.
- Huang, A. H. C. (1997). Evolution of oleosins. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids. J. P. Williams, M. U. Khan and N. W. Lem. PO Box 17/3300 AA Dordrecht/Netherlands, Kluwer Academic Publ: 292-294.
- Hutton, D. and P. K. Stumpf (1969). "Characterization of the β -oxidation systems from maturing and germinating castor bean seeds." Plant Physiol **44**: 508-516.
- Jaeger, K. E. and M. T. Reetz (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." Trends Biotechnol **16**(9): 396-403.
- Kindl, H. (1984). Lipid degradation in higher plants. Fatty Acid Metabolism and Its Regulation. S. Numa. Amsterdam, Elsevier: 181-204.
- Kindl, H. (1987). β -Oxidation of fatty acids by specific organelles. The biochemistry of plants. P. K. Stumpf and E. E. Conn. London, Academic Press. **9**: 31-52.
- Kleiter, A. E. and B. Gerhardt (1998). "Glyoxysomal β -oxidation of long-chain fatty acids: completeness of degradation." Planta **206**(1): 125-130.
- Koeller, W., J. Frevert, et al. (1979). "Incomplete glyoxysomes appearing at a late stage of maturation of cucumber seeds." Z. Naturforsch. **34 c**: 1232-1236.
- Koorneef, M. (1994). Seed dormancy and germination of Arabidopsis seeds. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Press.
- Koorneef, M., C. Alonso-Blanco, et al. (1998). "Genetic Control of Flowering Time in Arabidopsis." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 345-370.
- Körner, M. (2000). "Isolierung und Charakterisierung von Triacylglyceridlipasen aus Arabidopsis thaliana." Diplomarbeit.

- Lawand, S., A.-J. Dorne, et al. (2002). "Arabidopsis A BOUT DE SOUFFLE, Which Is Homologous with Mammalian Carnitine Acyl Carrier, Is Required for Postembryonic Growth in the Light." Plant Cell **14**(9): 2161-2173.
- Lin, Y. H. and A. Huang, H. C. (1983). "Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings." Archives of Biochemistry and Biophysics **225**(1): 360-369.
- Lin, Y. H. and A. H. C. Huang (1984). "Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings." Plant Physiol. **76**: 719-722.
- Lin, Y. H., C. Yu, et al. (1986). "Substrate specificities of lipases from corn and other seeds." Archives of Biochemistry and Biophysics **244**(1): 346-356.
- Lo, Y. C., S. C. Lin, et al. (2003). "Crystal structure of Escherichia coli thioesterase I/protease I/lysophospholipase L1: consensus sequence blocks constitute the catalytic center of SGNH-hydrolases through a conserved hydrogen bond network." J Mol Biol **330**(3): 539-51.
- Logemann, J., J. Schell, et al. (1987). "Improved method for the isolation of RNA from plant tissues." Anal Biochem **163**(1): 16-20.
- Maeshima, M., A. Takeuchi, et al. (1987). "Cell-free synthesis of alkaline lipase, a glyoxysomal membrane protein, from castor bean endosperm." FEBS Lett **220**: 23-26.
- Matsui, K., S. Fukutomi, et al. (2004). "A tomato lipase homologous to DAD1 (LeLID1) is induced in post-germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase." FEBS Letters **569**(1-3): 195-200.
- May, C., M. Höhne, et al. (2000). "The N-terminal β -barrel structure of lipid body lipoyxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies." European Journal of Biochemistry **267**(4): 1100-1109.
- May, C., R. Preisig-Müller, et al. (1998). "A phospholipase A₂ is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies." Biochimica et Biophysica Acta **1393**(2-3): 267-276.
- McKillican, M. E. and J. A. Larose (1974). "Study of free and bound lipids of Brassica campestris, var yellow sarson." Lipids **9**(7): 455-60.
- McKillican, M. (1966). "Lipid changes in maturing oil-bearing plants. IV. Changes in lipid classes in rape and *Crambe* oils." Journal of the American Oil Chemists Society **43**(416-465).
- Miernyk, J. A. and R. N. Trelease (1981a). "Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. IV. β -Oxidation." Plant Physiol **67**: 341-346.
- Miernyk, J. A. and R. N. Trelease (1981b). "Role of malate synthase and citric acid synthesis of maturing cotton embryos - a proposal." Plant Physiol **67**: 875-881.
- Miquel, M. and J. Browse (1992). "Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis." Journal of Biological Chemistry **267**(3): 1502-1509.
- Moire, L., E. Rezzonico, et al. (2004). "Impact of unusual fatty acid synthesis on futile cycling through beta-oxidation and on gene expression in transgenic plants." Plant Physiol **134**(1): 432-42.
- Mukherjee, K. D. (1995). "Fractionation of fatty acids and other lipids via lipase-catalyzed reactions." OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides **2**(5): 365-368.
- Murphy, D. J. (2001). "The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms." Prog Lipid Res **40**(5): 325-438.
- Murphy, D. J., I. Hernández-Pinzón, et al. (2001). "Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues." J. Plant Physiol. **158**(4): 471-478.
- Murphy, D. J. C., I. (1989). "Biosynthesis of seed storage products during embryogenesis in rapeseed, Brassica napus." Plant Physiology **135**: 63-69.
- Nakamura, M. T. and T. Y. Nara (2004). "STRUCTURE, FUNCTION, AND DIETARY REGULATION OF $\Delta 6$, $\Delta 5$, AND $\Delta 9$ DESATURASES." Annu Rev Nutr **24**: 345-76.
- Ncube, I., T. Gitlesen, et al. (1995). "Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed." Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism **1257**(2): 149-156.
- Noiriel, A., P. Benveniste, et al. (2004). "Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from *Arabidopsis thaliana*." Eur J Biochem **271**(18): 3752-3764.

- Norton, G. H., JF. (1975). "Compositional changes in developing rape seed (Brassica napus L.)." Planta **123**: 163-174.
- Oo, K. C. and P. K. Stumpf (1983). "Some enzymic activities in the germinating oil palm (elaeis guineensis) seedling." Plant Physiol. **73**: 1028-1032.
- Ory, R. L. (1969). "Acid lipase of castor bean." Lipids **4**: 177-185.
- Ory, R. L., L. Y. Yatsu, et al. (1968). "Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*." Arch Biochem Biophys **264**: 255-264.
- Poirier, Y., G. Ventre, et al. (1999). "Increased flow of fatty acids toward β -oxidation in developing seeds of Arabidopsis deficient in diacylglycerol acyltransferase activity or synthesizing medium-chain-length fatty acids." Plant Physiology **121**(4): 1359-1366.
- Ruuska, S. A., T. Girke, et al. (2002). "Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling." Plant Cell **14**(6): 1191-206.
- Ryu, S. B. (2004). "Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants." Trends in Plant Science **9**(5): 229-235.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanders, T. H. and H. E. Pattee (1975). "Peanut alkaline lipase." Lipids **10**(1): 50-4.
- Stahl, U., A. S. Carlsson, et al. (2004). "Cloning and Functional Characterization of a Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase from Arabidopsis." Plant Physiol.: pp.104.044354.
- Sturm, A., K. Schwennesen, et al. (1985). "Isolation of proteins assembled in lipid body membranes during fat mobilization in cucumber cotyledons." Eur. J. Biochem. **150**: 461-468.
- Suzuki, T., Y. Honda, et al. (2004). "Purification and characterization of lipase in buckwheat seed." J Agric Food Chem **52**(24): 7407-11.
- Theimer, R. R. and I. Rosnitschek (1978). "Development and intracellular localization of lipase activity in rapeseed (*Brassica napus* L.) cotyledons." Planta **139**: 249-256.
- Tomlinson, K. M., S; Labbe,H; Grainger, JL; James, LE; Pomeroy, Km; Mullin, JW; Miller, SS; Dennis, DT; Miki,Bla (2004). "Evidence that the hexose-to-sucrose ration does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplatic invertase." Journal of Experimental Botany **55**: 2291-2303.
- Wang, X. (1993). Phospholipases. London, CRC Press.
- Wanner, G., H. Formanek, et al. (1981). "The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells." Planta **151**: 109-123.
- Weselake, R. J. and D. C. Taylor (1999). "The study of storage lipid biosynthesis using microspore-derived cultures of oilseed rape." Progress in Lipid Research **38**(5-6): 401-460.
- Winston, F., C. Dollard, et al. (1995). "Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C." Yeast **11**(1): 53-5.
- Zou, J., Y. Wei, et al. (1999). "The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene." Plant Journal **19**(6): 645-653.

Anhang

Anhang 1: Oligonukleotide

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Funktion
Lip2Sal_a	GTCGACATGGCATCTTCACTGAAGAAGC	Amplifizierung des AtTGL 1 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Lip2Xhol_b	CTCGAGTATGTATCCACTGTACCAG	
AtLip2Sph1_a	CCCCGCATGCATGACGACGACTCTCCTCAT	Klonierung von AtTGL 1 in pQE 30
AtLip2Pst1_b	CCCCTGCAGTTAACTGCTGAAAGAATACTCTTTATCCA	
AtLip2Sph1_a	CCCCGCATGCATGACGACGACTCTCCTCAT	Klonierung von AtTGL 1 in pQE 70
pLip2BgIII_b	AGATCTTGTATCCACTGTACCAGAGCCAAGGCAGGA	
Lip2Sal_a	GTCGACATGGCATCTTCACTGAAGAAGC	Klonierung von AtTGL 1 in pUC18-Entry 1a
Lip2Not_b	GCGGCCGCCTATGTATCCACTGTACCAGA	
Lip2Sal_a	GTCGACATGGCATCTTCACTGAAGAAGC	Klonierung von AtTGL 1 in pET 20b und pET 22b
Lip2Xholl_b	CTCGAGAATGTATCCACTGTACCA	
HENTpLip2BstXI_a	ATCCAGTGTGGTGGAAATGGCTTCTTCACTGAAGAA	Klonierung von AtTGL 1 in pYES2/NTA
HENTpLip2NotI_b	AGCGGCCGCTTATGTATCCACTGTACCAGAGCCAA G	
HECTpLip2BstXI_a	CCAGTGTGCTGGGGATGGCTTCTTCACTGAAGAA	Klonierung von AtTGL 1 in pYES2/CT
HECTpLip2NotI_b	GAGCGGCCGCCATGTATCCACTGTACCAGAGCCAA G	
Lip2NotI_a	GCGGCCGCAATGGCTTCTTCACTGAAGAAGCTTATC TC	Klonierung von AtTGL 1 in pCAT-YFP (N-terminale. Fusion)
Lip2NotoS_b	GCGGCCGCTGTATCCACTGTACCAGA	
Lip2Ncol_a	CCATGGCTTCTTCACTGAAGAAGCTTATCTC	Klonierung von AtTGL 1 in pCAT-YFP (C-terminale. Fusion)
Lip2NcoloS_b	CCATGGATGTATCCACTGTACCAGA	
OLip2-o5UTR_a	CCAAAAAGACTTTAAAAATTGAGTGACAAA	Primer im UTR der AtTGL 1
OLip2-o3UTR_b	GAATGAATTCTTACTGCTGAAAGAATACCC	
Lip2-H5UTR_a	GAGTGACAAA GACGAACGAA GACC	
Lip2-H3UTR_b	TAC AAC AAA TGA ATT CTA ACT GCT CCT T	Primer im UTR der AtTGL 2
Lip2-HSal_a	GTCGACATGGCATCTTCACTGAAGAAGC	
Lip2-HXholl_b	CTCGAGAATGTATCCACTGTACCA	Klonierung von AtTGL 2 in pET 20b und pET 22b, pYES2
Lip4Sal1_a	GTCGACATGACGACGACTCTCCTCAT	
Lip4-650b	TCCACTGAAATCATAAGAGCC	Amplifizierung des AtTGL 3 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Lip4-640a	ATGGCTTCTTCACTGGAGAAGC	
Lip4Not1_b	GCGGCCGCTTAACTGCTGAAAGAATACTCTTTATCCA	Amplifizierung des AtTGL 4 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Lip5Sal1_a	GTCGACATGTCGCCTTCAAAGTTTCATTT	
Lip5Not1_b	GCGGCCGCTCACGTGTCTAATGACTCCTTGCTC	Amplifizierung des AtTGL 5 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Lip6Sal1_a	GTCGACATGGCGTCTCTAGACTCTCTAG	
Lip6-600b	TCAAAGTTTCACACAAGCTT	Amplifizierung des AtTGL 6 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Lip6-590a	ATGGCATCTTTAGATTCTCTTCCGG	
Lip6Not1_b	GCGGCCGCTCAAACCTTTCAGACAACCTTGAGT	Amplifizierung des AtTGL 7 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Lip7Sal1_a	GTCGACATGGCGTATCCCGTTCGCCTATCT	
Lip7-580b	TGTGTCAGATGACCCACTGTTCTT	Amplifizierung des AtTGL 8 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Lip7-570a	ATGGTACTCTGTTTCATGAAGC	
Lip7Not1_b	GCGGCCGCTCAGTTGTTTCATCAAAGAATTCTGTGTG T	Amplifizierung des AtTGL 9 cDNA-Fragmentes in der RT-PCR
Actin85-sense	GCTGGATTGCTGGAGATGA	
Actin83-anti	AGGTCTCCATCTCTTGCTCG	Kontrolle der RT-PCR

Anhang 2: Sequenzen**AtTGL 1 (At1g28670)**

MASSLKKLISSFLLVLYSTTIIVASSESRCRRFKSIIISFGDSIADTGNYLHLSDEVNHLPL
 QSAFLPYGESFFHPPSPGRASNGRLIIDFIAEFLGLPYVPPYFGSQNVSFQGINFAVYG
 ATALDRAFLLGKGIESDFTNVSLSVQLDTFKQILPNLCASSTRDCKEMLGDSLILMGEI
 GGNDYNYPPFEGKSINEIKELVPLIVKAISSAIVDLIDLGGKTFLVPGGFPTGCSAAYL
 TLFQTVAEKDQDPLTGCYPLLNEFGEHHNEQLKTELKRLQKFYPHVNI IYADYHNSLYR
 FYQEPAKYGFKNKPLAACCGVGGKYNFTIGKECGYEGVNYCQNPSEYVNWGDYHLTEAA
 YQKMTEGILNGPYATPAFDWSCLGSGTVDT

cDNA

1 ATGGCTTCTT CACTGAAGAA GCTTATCTCA AGCTTTCTAC TTGTCTTATA
 51 CTCCACCACC ATCATTGTTG CTTTCATCAGA ATCTCGATGT AGGCGTTTTA
 101 AATCGATCAT CAGCTTTGGT GATTCCATCG CAGACACCGG AAATTATCTC
 151 CATCTCTCTG ATGTCAATCA CCTTCCTCAA TCCGCCTTTC TTCCTTATGG
 201 CGAAAGCTTC TTCCATCCTC CCTCCGGTCG TGCCTCTAAT GGCCGTCTCA
 251 TCATCGACTT CATTGCCGAA TTCTTGGGAC TACCATACGT ACCGCCTTAC
 301 TTTGGATCCC AAAACGTTAG CTTCGAACAA GGGATCAATT TTGCGGTGTA
 351 TGGAGCAACC GCATTGGACC GAGCGTTTCT TTTGGGAAAA GGAATTGAAT
 401 CTGATTTTAC CAATGTTAGT TTAAGTGTTT AGCTTGACAC CTTCAAGCAG
 451 ATTTTGCCTA ACTTATGCGC CTCGTCTACT CGTGATTGCA AAGAGATGCT
 501 TGGAGACTCG CTGATACTCA TGGGAGAGAT TGGAGGAAAC GACTATAAAT
 551 ACCCATTTTT TGAAGGAAAA AGTATCAATG AAATCAAAGA GCTTGTTCTT
 601 CTAATCGTCA AAGCTATTTT TTCTGCTATT GTGGATTTGA TTGATTTAGG
 651 GGGCAAACA TTTTTGGTAC CCGGAGGCTT CCCAACAGGA TGTTCTGCGG
 701 CGTATCTTAC TCTATTTT CAG ACCGTGGCAG AAAAAGACCA GGACCCTTTA
 751 ACAGGTTGTT ACCCATTTGCT CAACGAATTT GGCGAGCACC ACAACGAACA
 801 GCTAAAGACA GAACTCAAGC GACTCCAAAA ATTCTATCCT CATGTCAACA
 851 TCATTTACGC TGACTACCAC AACTCCTTAT ACCGGTTTTA TCAAGAACCA
 901 GCTAAATACG GGTTTAAGAA CAAACCTTTA GCTGCTTGCT GTGGAGTCGG
 951 AGGTAAATAC AACTTCACTA TTGGTAAGGA GTGTGGATAC GAAGGAGTTA
 1001 ACTATTGTCA AAATCCTTCT GAGTATGTGA ACTGGGATGG TTATCATTTA
 1051 ACCGAAGCCG CCTACCAGAA GATGACTGAG GGTATACTCA ACGGTCCCTA
 1101 TGCAACTCCT GCTTTCGACT GGTCCTGCCT TGGCTCTGGT ACAGTGGATA
 1151 CATAA

AtTGL 2 (At1g28660)

MASSLKKLISSFLLVLYSTTIIIVASSESRCCRFTSIIISFGDSIADTGNILHLSVDNHLPL
 QTAFFPYGESFFHPPSGRASDGRLIIDFIAEFLGLPYVPPYFGSQNVSFQGINFAVYG
 ATALDRAYFVAKGIESDFTNVSLGVQLDIFKQILPNLCASSSRDCREMLGDSLILMGEI
 GGNDFFYPSSEGKSI NETKLQDLIIKAISSAIVDLIALGGKTF LVPGGFPAGCSAACT
 QYQONATEEDYDPLTGCI PRLNELGEHDNEQLKTELKRLQKLYPDVNI IYADYHNSLYRF
 YQEPAKYGFKNKPLAACCGVGGKYNFTIGKECGYEGVSYCQNPSEYVNWGDYHLTEAAY
 QKMAEGILNGPYATPAFDWSCLGSGTVDT

cDNA

1 ATGGCTTCTT CACTGAAGAA GCTTATCTCA AGCTTTCTAC TTGTCTTATA
 51 CTCTACCACC ATCATTGTTG CTTTCATCAGA ATCTCGATGT CGGCGCTTTA
 101 CATCTATCAT CAGCTTTGGT GATTCCATCG CAGACACCGG AAATATTCTC
 151 CATCTCTCCG ACGTCAATCA TCTTCCTCAA ACCGCCTTTT TTCCTTATGG
 201 TGAAAGCTTC TTCCATCCTC CCTCTGGTCG TGCCTCTGAT GGCCGTCTCA
 251 TCATCGACTT CATCGCTGAA TTCTTGGGAC TACCGTATGT TCCACCTTAC
 301 TTTGGATCCC AAAACGTTAG CTTTGAACAA GGGATCAATT TCGCGGTGTA
 351 TGGAGCAACC GCATTGGACC GAGCGTATTT TGTGGCAAAA GGAATTGAAT
 401 CTGATTTTAC CAACGTTAGT TTAGGTGTTT AGCTTGACAT CTTCAAGCAG
 451 ATTTTGCCTA ACCTTTGTGC CTCATCTTCT CGTGATTGCA GAGAGATGCT
 501 TGGAGACTCG CTGATACTCA TGGGAGAGAT TGGAGGTAAC GACTTTTTTTT
 551 ACCCATCCTC CGAAGGCAAA AGTATCAATG AAACCAAAC ACAGGATTTG
 601 ATCATCAAAG CTATTTCTTC TGCAATTGTG GATTTGATCG CTTTAGGGGG
 651 CAAAACATTT TTGGTACCCG GAGGCTTCCC AGCAGGATGT TCCGCAGCGT
 701 GTCTTACTCA ATATCAGAAC GCGACAGAAG AAGACTACGA CCCCTTGACA
 751 GGTGTATCC CACGGCTCAA TGAACCTGGA GAGCACGACA ACGAACAAC
 801 TAAGACAGAA CTCAAACGAC TCCAAAAACT CTATCCTGAT GTCAACATCA
 851 TTTACGCTGA CTACCATAAC TCCTTATACC GGTTTTATCA AGAACCAGCT
 901 AAATATGGGT TTAAGAACAA ACCTTTAGCT GCTTGCTGTG GAGTCGGAGG
 951 TAAATACAAC TTCACTATTG GTAAGGAGTG TGGATACGAA GGAGTTAGCT
 1001 ATTGTCAAAA TCCTTCCGAG TATGTGAATT GGGATGGTTA TCATTTAACC
 1051 GAAGCCGCCT ACCAGAAGAT GGCTGAGGGT AACTCAACG GTCCCTATGC
 1101 AACTCCTGCT TTCGACTGGT CCTGCCTTGG CTCTGGTACA GTGGATACAT
 1151 AA

AtTGL 3 (At1g28650)

MTTTLMLMASLIVSFLILLYTTIVVASSESRCCRYSKSIISFGDSIADTGNYVHLSNVNN
 LPQAAFLPYGESFFHPPSGRYS DGR LVIDFIAEFLGLPYVPPYFGSQNVSNQGINFAV
 YGATALDRAFLVKQGIKSDFTNISLSVQLNTFKQILPNLCASSTRDCREMLGDSLILMG
 EIGGNDYNYPFFEGKSINEIKELVPLIIKAISSAIVDLIDLGGKTFLVPGNFPICSTA
 YLTLFQTATVEHDPFTGCIPWLNKFGHEHNEQLKIELKQLQKLYPHVNI IYADYNSLY
 GLFQEPAKYGFKNRPLAACCGVGGQYNFTIGKECGENGVSYCQNPSEYVNWGDYHLTEA
 TYQKMAQGLLNTRYTTPAFDWSCLGSYDFSG

cDNA

1 ATGACGACGA CTCTCCTCAT GGCTTCGCTC ATCGTAAGCT TTCTACTTAT
 51 CTTATACTAC ACCACAATAG TCGTTGCCTC ATCAGAATCT CGGTGTCGGC
 101 GTTACAAATC AATCATCAGC TTCGGTGATT CCATTGCGGA CACCGGAAAT
 151 TATGTTTCATC TCTCCAACGT CAATAATCTT CCTCAAGCCG CATTTCTTCC
 201 TTACGGCGAA AGCTTCTTCC ATCCTCCCTC CGGCCGTTAC TCGGACGGCC
 251 GTCTCGTTAT AGATTTTCATC GCCGAATTCT TGGGACTACC GTACGTTCCG
 301 CTTACTTCG GATCCCAAAA CGTGAGCTTC AATCAAGGGA TAAATTTTGC
 351 TGTGTATGGA GCAACCGCCT TGGATCGTGC CTTTCTTGTA AAACAAGGAA
 401 TTAAATCTGA CTTACCAAT ATTAGTCTAA GTGTTCAAGCT TAACACCTTC
 451 AAGCAGATTT TACCTAACCT TTGTGCCTCA TCTACTCGTG ATTGCAGAGA
 501 GATGCTTGGA GACTCGCTGA TACTCATGGG AGAGATTGGT GGAAACGACT
 551 ATAATTACCC ATTTTTTTGAA GGAAAAAGTA TCAATGAAAT CAAAGAGCTT
 601 GTTCCTCTAA TCATCAAAGC TATTTCTTCT GCTATTGTGG ATTTGATTGA
 651 TTTGGGAGGA AAAACATTCC TGGTACCCGG AACTTCCCA ATAGGATGTT
 701 CCACGGCATA TCTTACTCTA TTTCAGACCG CGACAGTAGA ACACGACCCT
 751 TTTACAGGTT GTATCCCATG GCTTAACAAA TTCGGAGAGC ACCATAACGA
 801 ACAACTTAAG ATAGAACTCA AACAACTCCA AAAACTCTAC CCTCATGTCA
 851 ACATCATTTA CGCCGACTAC TACAACCTTT TGTACGGACT TTTTCAAGAA
 901 CCAGCCAAAT ATGGTTTTAA GAACAGACCT TTGGCTGCTT GTTGTGGAGT
 951 CGGAGGTCAA TACAACCTCA CTATTGGTAA AGAGTGTGGA GAAAACGGAG
 1001 TTAGCTATTG TCAAAATCCT TCTGAGTATG TGAATTGGGA TGGTTATCAT
 1051 TTAACCGAAG CCACGTACCA GAAGATGGCT CAGGGTTTAC TCAATGGTCC
 1101 CTATACAACT CCTGCTTTCG ACTGGTCCTG CCTTGGCTCT TATGATTTCA
 1151 GTGGATAA

AtTGL 4 (At1g28640)

MASSLEKLISSFLLVLYSTTIIIVASSESRCCRFRKSIISFGDSIADTGNYLHLSVDVNHLP
 QSAFLPYGESFFHPPSGRYS DGRLIIDFIAEFLGLPYVPSYFGSQNVSFQGINFAVYG
 ATALDRVFLVGKGI ESDFTNVSLSVQLNIFKQILPNLCTSSSRDCREMLGDSLILMGEI
 GVNDYNYPPFFEGKSI NEIKQLVPLVIKAISSAIVDLIDLGGKTF LVPGNFPLGCYPAYL
 TLFQTAEEEDHDPFTGCI PRLNEFGEYHNEQLKTELKRLQELYDHVNI IYADYNSLFR
 LYQEPVKYGFKNRPLAACCGVGGQYNFTIGKECGHRGVSCCQNPSEYVNWGDYHLTEAT
 HQKMAQVILNGTYASPAFDWSCSGSESVDKEYSFSS

cDNA

1 ATGGCTTCTT CACTGGAGAA GCTTATTTCA AGCTTTCTAC TTGTCTTGTA
 51 CTCCACCACC ATCATTGTTG CTTTCATCAGA ATCTCGATGT AGGCGTTTTTA
 101 AATCGATCAT CAGCTTTGGT GATTCCATCG CCGACACCGG AAATTATCTC
 151 CATCTCTCTG ATGTTAACCA CCTTCCTCAA TCCGCCTTTC TTCCTTATGG
 201 CGAAAGCTTC TTCCATCCTC CCTCCGGCCG TTACTCGGAC GGCCGTCTCA
 251 TCATCGACTT TATAGCTGAA TTCTTGGGAC TACCGTACGT ACCATCTTAT
 301 TTTGGATCCC AAAACGTGAG CTTTGATCAA GGTATCAATT TCGCGGTGTA
 351 TGGTGCAACT GCATTGGATC GTGTGTTTCT TGTGGGAAAA GGAATTGAAT
 401 CTGATTTTAC CAATGTTAGT TTAAGTGTTT AGCTTAACAT CTTCAAACAG
 451 ATTTTACCTA ATCTTTGCAC CTCGTCTTCT CGTGATTGCA GAGAGATGCT
 501 TGGAGACTCG CTGATACTTA TGGGTGAGAT TGGAGTAAAT GACTATAAATT
 551 ACCCTTTCTT TGAAGGCAAA AGTATCAATG AAATCAAACA GCTTGTTCTT
 601 CTAGTCATCA AAGCTATTTT TTCTGCTATT GTGGATTTGA TTGATTTAGG
 651 GGGCAAAACG TTTCTGGTCC CTGGAACTT CCCATTAGGA TGCTATCCCG
 701 CGTATCTCAC TCTATTTT CAG ACCGCGGCAG AAGAAGACCA CGACCCTTTC
 751 ACAGGTTGTA TCCCACGGCT CAATGAATTC GGAGAGTACC ACAACGAACA
 801 GCTCAAGACA GAACTCAAAA GACTCCAAGA ACTATACGAT CATGTCAATA
 851 TCATTTACGC CGACTACTAC AACTCTTTGT TCCGGTTATA TCAAGAACCA
 901 GTCAAATATG GGTTTAAGAA CAGACCTTTG GCTGCTTGTT GCGGAGTCGG
 951 AGGTCAATAC AACTTCACTA TTGGTAAAGA GTGTGGACAC AGAGGAGTTA
 1001 GCTGTTGTCA AAATCCTTCT GAATATGTGA ATTGGGACGG TTATCATTTA
 1051 ACCGAGGCCA CACACCAGAA GATGGCTCAA GTTATACTCA ACGGTACCTA
 1101 TGCATCACCT GCTTTCGACT GGTCTGCTC TGGCTCTGAA TCAGTGGATA
 1151 AAGAGTATTC TTTCAGCAGT TAA

AtTGL 5 (At1g28610)

MASLDSLVSFFLSTLFVTIVSSQTQCRNLESIISFGDSITDTGNLVGLSDRNHLPVTAF
 LPYGETFFHHPTGRSCNGRIIIDFIAEFLGLPHVPPFYGSKNGNFEEKGVNFAVAGATAL
 ETSILEKRGIIYPHSNISLGIQLKTFKESLPNLCGSPTDCRDMIGNAFIIMGEIGGNDF
 NFAFFVNKTSEVKELVPLVITKISSAIVELVDMGGRTFLVPGNFPLGCSATYLTLYQTS
 NKEEYDPLTGCLTWLNDSEYYNEKLQAELNRLSKLYPHVNI IYGDFNALLRLYQEPS
 KFGFMDRPLPACCGLGGPYNFTLSKKCGSVGVKYCSDPSKYVNWDGVHMTEAAYKWIAD
 GLLKGPYTIPSFHWLCLGSKI KSKESLDT

cDNA

1 ATGGCGTCAC TAGATTCTCT AGTGAGCTTC TTTTATCTA CCCTTTTTGT
 51 CACAATCGTG AGCTCACAAA CGCAGTGCCG GAATCTCGAG TCGATTATCA
 101 GTTTCGGTGA TTCGATTACC GACACAGGAA ACTTGGTTGG TCTCTCGGAT
 151 CGTAACCATC TTCCTGTGAC CGCGTTTCTG CCGTATGGAG AAACCTTCTT
 201 CCACCACCCA ACTGGCCGTT CCTGCAACGG CCGTATCATC ATCGACTTTA
 251 TCGCTGAATT CTTAGGGTTA CCGCATGTGC CTCCTTTTTA TGGATCTAAA
 301 AATGGAAACT TTGAGAAAGG AGTTAATTTT GCTGTTGCGG GAGCAACGGC
 351 ACTAGAAACT TCCATTCTTG AGAAGAGAGG AATTTATTAT CCTCACAGCA
 401 ACATCAGTTT GGAATTCAG CTTAAGACCT TCAAGGAGAG CTTACCAAAT
 451 CTATGTGGTT CACCTACAGA TTGTAGAGAT ATGATTGGAA ATGCTTTTTAT
 501 TATCATGGGA GAGATTGGAG GGAATGATTT TAATTTGCA TTCTTTGTGA
 551 ACAAACCAG TGAGGTCAA GAGTTGGTTC CGTTGGTGAT CACTAAAATT
 601 TCTTCTGCAA TTGTGGTAAA CATTCTTGAT CAGCGAGTCC CTAGAACGAG
 651 TAATTTTTTC AAAAACTGT TATGTTTTTT GTTTTGT TGTGTTTTGG
 701 TACTGAATGT TGAATCTAGG AGTTGGTCGA TATGGGAGGA AGAACATTCC
 751 TAG

AtTGL 6 (At1g28600)

MASLDSLVI FLFSTL FVTIVSSETPCPNFKSII SFGDSIADTGNLVGLSDRNQLPVTA
 FPYGETFFHHPTGRSCDGRIIMDFIAEFVGLPYVPPYFGSKNRNFDKGVNFAVAGATAL
 KSSFLKKRGIQPHNTVSLGVQLKSFKKSLPNLCGSPSDCRDMIGNALILMGEIGGNDYN
 FFFFNRKPVKEVEELVPFVIASISSTITELIGMGGKTF LVPGEFPIGCSVVYLTLTKTS
 NKDEYDPSTGCLKWLNKFGGEYHSEK LKVELNRLRKLYPHVNI IYADYYNSLLRIFKEPA
 KFGFMERPFPAACCGIGGPYNFNFTRKCGSVGVKSKCKDPSKYVGWDGVHMTEAAYKWIAD
 GILNGPYANPPFDRSCLRSEIKKESLYNQSTLTQACVKL

cDNA

1 ATGGCGTCTC TAGACTCTCT AGTCATCTTT CTTTTTTCTA CTCTTTTTTGT
 51 CACTATCGTG AGCTCGGAAA CGCCGTGCCC GAATTTCAAG TCGATCATCA
 101 GTTTCGGCGA TTCGATTGCG GACACGGGAA ACTTG GTTGG TCTCTCTGAT
 151 CGTAACCAGC TTCCTGTGAC TCGGTTTCCA CCGTACGGAG AAACCTTCTT
 201 CCACCACCCA ACCGGTCGTT CCTGCGATGG CCGCATCATC ATGGACTTTA
 251 TCGCTGAATT TGTGGGGCTT CTTTATGTGC CTCCGTACTT TGGATCTAAA
 301 AATAGAAACT TTGATAAGGG TGTTAATTTT GCGGTAGCCG GAGCAACGGC
 351 ACTGAAAAGT TCCTTTCTTA AGAAGAGAGG AATTCAACCA CACACCAACG
 401 TTAGTTTAGG AGTTCAGCTA AAGAGCTTCA AAAAGAGTTT ACCAAATTTA
 451 TCGCGCTCAC CATCAGACTG TAGAGATATG ATTGGAAATG CTTTGATTCT
 501 CATGGGAGAG ATTGGAGGGA ATGATTATAA TTTCCCATTC TTCAACCGCA
 551 AACCCGTAA GGAAGTTGAA GAGCTGGTTC CATTTGTAAT CGCTTCTATT
 601 TCTTCTACAA TAACGGAGTT GATTGGTATG GGGGGTAAAA CCTTTCTAGT
 651 GCCCGGAGAG TTCCCTATCG GATGCTCAGT AGTCTATTTG ACATTATACA
 701 AAACATCAAA CAAGGACGAA TACGATCCTT CAACAGGATG TTTGAAATGG
 751 TTGAACAAGT TTGGCGAATA CCATAGCGAG AAAC TTAAGG TGGA ACTCAA
 801 CAGACTTAGG AAGCTCTACC CTCATGTCAA CATCATATAC GCTGACTACT
 851 ACAACTCTCT CTTGCGCATT TTTAAAGAAC CAGCCAAATT CGGGTTCATG
 901 GAAAGACCCT TCCCTGCTTG TTGCGGTATA GGAGGACCGT ACAACTTCAA
 951 CTTCACTAGG AAATGTGGGA GTGTAGGAGT GAAATCTTGT AAGGATCCTT
 1001 CAAAGTATGT GGGCTGGGAT GCGGTTTATA TGACTGAGGC TGCATACAAA
 1051 TGGATAGCTG ATGGAATACT CAATGGACCA TATGCGAATC CTCCTTTTGA
 1101 TCGGTCCTGC CTCAGATCTG AGATTAAGAA GGAGTCATTG TACAATCAAA
 1151 G TACTCTGAC ACAAGCTTGT GTGAAACTTT GA

AtTGL 7 (At1g28590)

MASLDSL PAMKLVRFILSTLLVTSVNSQTQCRNFKSIIISFGDSIADTGNLLGLSDPNDL
 PASAFPPYGETFFHHPTGRYSDGRLLIDFIAEFLGFPLVPPFYGCQANANFKKGVNFAVA
 GATALEPSFLEERGIHSTITNVSLSVQLRSFTESLPNLCGSPSDCRDMIENALILMGEI
 GGNDYNFALFQRKPVKEVEELVPFVIATISSAITELVCMGGRTFLVPGNFPIGYSASYL
 TLYKTSNKEEYDPLTGCLKWLNDFSEYYNKQLQEELNGLRKLYPHVNI IYADYYNALLR
 LFQEPAKFGFMNRPLPACCGVGGSYNFNFSRRCGSVGVEYCDPSQYVNYDGIHMTEAA
 YRLISEGLLKGPYAI PPFKWSCLSSSEIMNKMSLDTQILDEQLLQGLKV

cDNA

1 ATGGCATCTT TAGATTCTCT TCCGGCGATG AAGCTCGTGA GATTCATATT
 51 ATCTACCCTT TTGGTCACTT CTGTGAACTC GCAAACGCAA TGCCGGAATT
 101 TCAAATCAAT CATTAGTTTC GGAGATTCAA TTGCTGACAC TGAAACTTG
 151 CTTGGTCTCT CGGATCCTAA CGATCTTCCT GCTTCCGCGT TTCCGCCATA
 201 CGGAGAAACC TTCTTCCACC ACCCAACCGG TCGTTACTCC GACGGCCGCC
 251 TCATCATTGA TTTCAATTGCT GAATTCTTGG GGTTCGCGT TGTGCCTCCT
 301 TTTTATGGAT GTCAAAATGC AAAC TTAAA AAGGGAGTTA ATTTGCGGGT
 351 CGCGGGAGCA ACTGCATTAG AACCTTCCTT TCTAGAGGAG AGAGGAATTC
 401 ATTCTACTAT CACCAACGTC AGTCTAAGCG TTCAGCTTAG GAGCTTCACG
 451 GAAAGTTTAC CTAAC TTATG TGGCTCACCT TCAGATTGTA GAGATATGAT
 501 TGAAAATGCT TTGATACTCA TGGGAGAGAT CGGAGGAAAT GATTATAATT
 551 TTGCACTCTT CCAACGCAAA CCCGTTAAGG AAGTTGAAGA GCTGGTACCG
 601 TTTGTGATCG C TACTATTTT TTCTGCAATC ACGGAATTGG TTTGCATGGG
 651 AGGAAGAACA TTCCTAGTTC CTGGAAATTT CCCGATCGGA TACTCAGCAT
 701 CCTATTTGAC ATTATACAAA ACATCAAACA AGGAAGAGTA TGATCCTCTA
 751 ACAGGATGTT TGAAATGGCT TAACGATTTT TCAGAATACT ACAATAAGCA
 801 GCTTCAGGAA GAACTCAACG GACTCAGGAA GTTGTACCCT CATGTCAACA
 851 TCATATATGC TGATTACTAC AACGCTTTGT TGCGCCTTTT CCAAGAACCA
 901 GCCAAATTCG GGTTTATGAA CAGACCCTTG CCCGCTTGTT GCGGTGTAGG
 951 AGGATCTTAC AACTTCAACT TTAGTAGAAG ATGTGGGAGT GTAGGAGTTG
 1001 AATACTGCGA TGATCCTTCA CAGTATGTGA ATTATGATGG CATTCATATG
 1051 ACGGAGGCGG CATA CAGATT GATATCTGAG GGCTTACTCA AGGGACCGTA
 1101 TGCTATTCCT CCTTTCAAGT GGTCTTGCCT CAGCTCCGAG ATTATGAATA
 1151 AGATGTCATT AGATACTCAG ATTCTTGATG AACAGCTACT ACAAGTTTGT
 1201 CTGAAAGTTT GA

AtTGL 8 (At1g28580)

MAYPGSPILMKLLVFI FLSTFVVTVNSSETKCREFKSIIISFGDSIADTGNLLGLSDPKDL
 PHMAFPPYGENFFHHPTGRFSNGRLIIDFIAEFLGLPLVPPFFYGSHNANFEKGVNFAVGG
 ATALERSFLEDRGIHFPYTNVSLGVQLNSFKESLPSICGSPSDCRDMIENALILMGEIGG
 NDYNYAFFVDKGIIEIKELMPLVITTISSAITELIGMGGRTFLVPGEFPVGC SVLYLTSH
 QTSNMEEYDPLTGCLKWLKFGENHGEQLRAELNRLQKLYPHVNI IYADYYNALFHLYQE
 PAKFGFMNRPLSACCGAGGPYNYTVGRKCGTDIVESCDDPSKYVAWDGVHMTEAAYRLMA
 EGILNGPYAIPFDWSCRSSGVKNSGSSDT

cDNA

1 ATGGCGTATC CCGGTTGCGC TATCTTGATG AAGCTCCTCG TCTTCATCTT
 51 TTTATCAACT TTTGTAGTCA CTAACGTGAG CTCGGAAACT AAGTGCCGGG
 101 AGTTCAAATC GATCATCAGT TTCGGAGATT CCATTGCCGA CACTGGAAAC
 151 TTGCTTGGCC TCTCAGATCC TAAAGATCTT CCTCACATGG CGTTTCCACC
 201 GTATGGAGAG AACTTCTTCC ACCACCCAAC TGGTCGTTTC TCCAACGGCC
 251 GCCTCATCAT TGATTTTCATC GCTGAATTCT TGGGTTTACC GCTTGTGCCT
 301 CCATTCTATG GATCTCATAA TGCAAAC TTT GAAAAGGGAG TTAATTTTCGC
 351 GGTAGGGGGA GCAACCGCTT TGGAACGTTT CTTTCTTGAA GACAGAGGAA
 401 TTCATTTTCC TTACTACTAAT GTGAGTTTAG GCGTTCAGCT TAATAGCTTC
 451 AAGGAGAGTT TACCTAGCAT ATGTGGCTCT CCTTCAGACT GTAGAGATAT
 501 GATAGAAAAT GCTTTGATTC TCATGGGGGA AATTGGAGGG AATGACTATA
 551 ACTACGCGTT CTTCGTGGAC AAAGGCATTG AAGAGATCAA GGAGCTGATG
 601 CCCCTGGTGA TCACTACTAT TTCTTCTGCA ATCACGGAGT TGATCGGTAT
 651 GGGGGGAAGA ACATTTTGGG TGCCCGGAGA GTTCCCAGTC GGATGCTCAG
 701 TATTGTATTT GACATCACAT CAAACATCAA ACATGGAAGA ATACGATCCT
 751 TTAACAGGAT GTTTGAAATG GCTGAACAAG TTTGGTGAAA ACCATGGTGA
 801 GCAGCTTAGA GCAGAACTCA ACAGACTCCA GAAGTTGTAC CCTCATGTTA
 851 ACATCATATA CGCTGACTAC TACAACGCGC TGTTTCACCT TTATCAAGAA
 901 CCAGCCAAAT TCGGATTCAT GAACAGACCT TTGTCCGCTT GTTGCGGCGC
 951 AGGAGGACCG TACAAC TATA CCGTAGGTAG GAAATGTGGG ACTGATATAG
 1001 TTGAAAGTTG TGATGATCCT TCAAAGTATG TGGCTTGGGA CGGTGTTTAT
 1051 ATGACTGAGG CTGCGTACAG ATTGATGGCT GAGGGTATAC TAAATGGACC
 1101 GTATGCGATT CCTCCTTTTG ATTGGTCTTG CCGTAGCTCT GGAGTTAAGA
 1151 ACAGTGGGTC ATCTGACACA TAG

AtTGL 9 (At1g28570)

MKLVSFFLILSTFCLTTVNSEPOCHNFKSIISFGDSIADTGNLLALS DPTNLPKVAFLP
 YGETFFHHPTGRFSNGRLIIDFIAEFLGFPLVPPFYGSQNANFEKGVNFAVGGATALER
 SFLEERGIHFYPYTNVSLAVQLSSFKESLPNLCVSPSDCRDMIENSLILMGEIGGNDYNY
 AFFVGNIEEIKELVPLVIETISSAITELIGMGKTFLLVPGEFPLGCSVAYLSLYQTSN
 IEEYDPLTGCLKWLNKFSEYHDEQLQAELNRLQKLYPHVNI IYADYYNTLLRLAQEPAK
 FGFISRPLPACCALGGPFNFTLGRKRGTQVPECCDDPSKYVSWDGVHMTEAAAYRLMAEG
 ILKGPYAIPPFDWSCLSSEIKNTQNSLMNN

cDNA

1 ATGAAGCTGG TGAGCTTCTT TCTAATTCTA TCTACTTTTT GTCTCACTAC
 51 TGTGAACTCG GAGCCACAGT GCCATAATTT CAAATCGATC ATTAGTTTTCG
 101 GCGATTCTAT TGCCGACACT GGAAACTTGC TCGCCCTCTC CGATCCTACC
 151 AATCTCCCTA AGGTCGCGTT TCTACCGTAC GGAGAAACCT TCTTCCACCA
 201 TCCGACCGGC CGTTTCTCAA ACGGCCGCCT CATCATCGAT TTCATTGCTG
 251 AATTTTTGGG TTTTCCGCTT GTGCCTCCTT TTTACGGATC TCAAATGCA
 301 AATTTTGAGA AAGGAGTTAA TTTTGCGGTT GGAGGAGCAA CGGCACTGGA
 351 ACGTTCCTTT CTTGAAGAGA GAGGCATTCA TTTTCCTTAC ACCAACGTTA
 401 GTTTAGCCGT ACAGCTTAGT AGCTTCAAGG AGAGTTTGCC TAACTTATGT
 451 GTCTCTCCTT CAGACTGCAG AGATATGATA GAAAATTCTT TGATTCTCAT
 501 GGGAGAAATT GGAGGGAATG ACTATAACTA CGCATTCTTT GTGGGCAAAA
 551 ACATTGAAGA GATCAAAGAG CTGGTTCCGC TTGTTATTGA AACTATCTCT
 601 TCTGCAATCA CGGAGTTGAT TGGTATGGGG GGGAAAACAT TTCTGGTGCC
 651 CGGAGAGTTC CCGCTCGGAT GCTCAGTAGC CTATTTGAGT TTATATCAAA
 701 CATCAAACAT AGAAGAATAT GATCCTCTAA CAGGATGTTT GAAATGGCTG
 751 AACAAGTTTT CAGAATACCA CGACGAGCAG CTTCAAGCAG AACTCAACAG
 801 ACTTCAGAAG TTGTACCCTC ATGTCAACAT CATATACGCT GACTACTACA
 851 ACACACTGTT GCGTCTTGCC CAAGAACCAG CCAAATTCGG GTTCATAAGC
 901 AGACCCTTGC CGGCTTGCTG CGCTTTAGGA GGACCGTTTA ACTTCACATT
 951 AGGTAGGAAA CGTGGGACTC AAGTACCTGA ATGTTGTGAC GATCCTTCAA
 1001 AGTATGTGAG TTGGGATGGT GTTCATATGA CTGAAGCTGC ATATAGATTG
 1051 ATGGCTGAGG GTATACTTAA GGGACCTTAT GCGATTCTCT CTTTCGATTG
 1101 GTCTTGCCCTC AGCTCTGAAA TTAAGAACAC ACAGAATTCT TTGATGAACA
 1151 ACTGA

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner für die Ermöglichung dieser Arbeit und die unendlichen Mengen an neuen Ideen, sowie die maximale Motivationskraft gepaart mit der Fähigkeit, das Projekt immer in einem sinnvollen Licht erscheinen zu lassen, danken.

Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack möchte ich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Uwe Bornscheuer für die interessanten Ideen der Lipaseaktivitätstests, sowie die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

Vielen lieben Dank an Frau Dr. Ellen Hornung für die geduldigen Antworten auf die vielen Fragen, das Schwimmen, die Muffins, die Spätzle, die Socken, den Pullover.....und jede Menge Spaß

Genaus viel Lieben Dank an Frau Dr. Cornelia Göbel für die Unterstützung bei allen theoretischen, praktischen und organisatorischen Problemen, die die Analysen in unsere Abteilung so mit sich bringen, aber auch für jede Menge Spontanes, Leckers und Schönes.

Ich danke Dr. Xuan Wang für die Mitarbeit in diesem Projekt, die Etablierung der Insektenzellkulturen, der RT-PCR sowie die vielen interessanten Gespräche, die Motivation und die vielen guten Tips.

Ganz herzlich Danken möchte ich an dieser Stelle Monika Wiesner für ihre viele Geduld bei den Proteinexpressionen, den Gelen und den PCR's und vorallem für ihre vielen unersetzlich guten Ideen, die den Laboralltag einfacher gemacht haben.

Ganz großer Dank geht auch an Dr. Ingo Heilmann für die Beantwortung aller Fragen, die Ellen nicht beantworten konnte.

Ich danke Dr. Martin Fulda für die Beantwortung aller Fragen rund um Arabidopsis-Mutanten.

Großer Dank geht auch an Dr. Amine Abbadi für die Beantwortung aller Proteinstrukturfragen.

Ich danke Susan Kunze und Michael Stumpe für das gemeinsame Wohnungen suchen, Doktorarbeiten bearbeiten, nach Gatersleben fahren, schwimmen gehen und PCR-Aliquots verborgen und all die kleinen und die großen Hilfen.

Ich danke Imke Lang, Mareike Hoffmann und Sabine König für die schöne gemeinsame Zeit sowie die kleine und die großen Gespräche, für die ich mich gern in der ersten Etage verlaufen habe.

Ich danke Maïke Rudolph, Annett Struß, Silke Pienkny und Danuta für die ruhige und auch lustige aber immer wirklich angenehme Arbeitsatmosphäre in der "zweite Etage".

Ganz, ganz lieben Dank auch an Susanne Mester für die liebevolle und sorgfältige Betreuung meiner Pflanzen.

Nochmehr Dank an Gert Mader, weil er alles kann.

An dieser Stelle sei der BASF Plant Science besonders Herrn Martijn Gipmans für die Finanzierung und die Koordination des Projektes gedankt.

Besonderer Dank gilt auch meinem lieben Mann Danilo für seine unendliche Geduld, und das leckere Essen am Wochenende gedankt.

so wie meinen Eltern.

Lebenslauf

31. 08. 1975 geboren in Berlin, Staatsangehörigkeit: deutsch
- 1982 – 1990 31. polytechnische Oberschule in Berlin - Prenzlauer Berg
1982 – 1991 13. Oberschule in Berlin - Prenzlauer Berg
1991 – 1995 Camille–Claudel-Gymnasium in Berlin - Prenzlauer Berg
Abitur im Juni 1995
- Oktober 1995 Beginn des Studiums der Biochemie an der Martin–
Luther–Universität in Halle/Saale
- Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Lipidstoffwechsel von
Herrn PD Dr. Feußner mit dem Thema:“ Isolierung und
Charakterisierung von Triacylglycerin-Lipasen in
Arabidopsis thaliana“ begonnen am Institut für
Pflanzenbiochemie in Halle; beendet am Institut für
Pflanzen-genetik und Kulturpflanzenforschung in
Gatersleben
- Juli 2000 Abschluss: Diplom-Biochemikerin
- 08/2000 Beginn der Doktorarbeit

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Göttingen, Juni 2005

Martina Körner