

2 Einleitung

2.1 Pflanzliche Lipide

Lipide sind von zentraler Bedeutung für pflanzliche Zellen. Sie nehmen zahlreiche Funktionen wahr: Triacylglycerole (Glycerol mit drei veresterten Fettsäuren) sind besonders reichhaltig in Ölsaaten wie z.B. der Sojabohne (*Glycine max*), Erdnuß (*Arachis hypogaea*), Sonnenblume (*Helianthus annuus*) und Raps (*Brassica napus*), wo sie mit Trockenmassenanteilen von bis zu 60 % Energiespeicherstoffe zur späteren Samenkeimung darstellen (Gurr, 1980). Mit teilweise modifizierten Zuckermolekülen verbundenes Diacylglycerol wie z.B. Mono- und Digalactosyldiacylglycerol (MGDG, DGDG) sowie Phospholipide wie Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) sind die Hauptkomponenten in den Membranen pflanzlicher Zellen und ihrer Organellen. Die Lipidkomposition beeinflusst wichtige Eigenschaften und Fähigkeiten der Membranen wie z.B. aktive und passive Membrantransportsysteme (Bishop, 1983) und trägt zur Temperaturempfindlichkeit oder –resistenz der Pflanze bei (Nishida und Murata, 1996). Viele Pigmente zählen ebenfalls zu den Lipiden (z.B. Chlorophyll, Carotinoide, Xanthophylle) und sind damit maßgeblich an der Photosynthese und Lichtrezeption beteiligt. Epicuticulare Wachse und Cutin, ein aus oxidierten Fettsäuren bestehendes Polymer, sind weitere wichtige Lipidstoffwechselprodukte. Sie dienen nicht nur dem Schutz vor Wind, Sonne und Wasserverlust, sondern sind auch an der Abwehr von Freßfeinden beteiligt (Eigenbrode und Espelje, 1995; Eigenbrode, 1996). Dies macht sie insbesondere im Pflanzenschutz zu einem wichtigen Forschungszweig. Eine weitere Funktion nehmen Lipide in der zellulären Signaltransduktion wahr. Inositol-3-Phosphat und Diacylglycerol dienen als sogenannter „Second messenger“ in der Signalkaskade der Zelle und das aus α -Linolensäure gebildete Jasmonat nimmt als Phytohormon eine wichtige Stellung bei Reifung, Wachstum und der Abwehr von Pathogenen ein.

Wirtschaftlich spielen besonders die durch Desaturasen gebildeten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (z.B. Linol- und α -Linolensäure) eine wichtige Rolle, die als essentielle Fettsäuren für die menschliche Ernährung bedeutsam sind. Pflanzliche Samenöle enthalten je nach Sorte zwischen 75 bis über 90 % einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (<http://www.margarine-institut.de>) und finden damit vielfältige Verwendung in der technischen Industrie und Lebensmittelproduktion. Als Lebensmittelzusatz (Emulgator) spielt das vor allem aus Soja gewonnene PC („Lecithin“) eine besondere Rolle. Rund 150000 Tonnen Lecithin finden pro Jahr Abnehmer aus den Bereichen Lebensmittelproduktion, Diätprodukte, Pharmazie, Kosmetik, Tierfutterproduktion und Technische Industrie (http://www.asa-europe.org/soyup_old/soup_6d.htm). Weitere Anwendung finden Phospholipide in der Kosmetik und in der biomedizinischen Forschung als mögliche Wirkstoffschleusen (Wang *et al.*, 1993).

2.2 Synthese und Funktion von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin

Phospholipide sind verseifbare Lipide, bei denen die *sn*3-Hydroxygruppe des Glycerols mit Phosphorsäure oder Phosphorsäuremonoestern verestert ist, während die anderen beiden Hydroxygruppen mit Fettsäuren verestert sind. Die Phospholipide werden in Pflanzen hauptsächlich am Endoplasmatischen Retikulum gebildet, wobei die plastidär gebildeten Fettsäuren mit den vornehmlich im Cytosol gebildeten Kopfgruppen verbunden werden (Moore, 1982). Anschließend erfolgt der Transport in die einzelnen Zellkompartimente (Moreau *et al.*, 1998).

Phospholipide sind im wesentlichen an der Bildung von Membranen beteiligt. Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin (PS), die beide einen Phosphoaminoalkohol mit primärer Aminogruppe als polare Kopfgruppe tragen, wurden historisch unter der Bezeichnung „Kephalin“ geführt. Erst 1941 wurde erkannt, daß es sich dabei um ein Stoffgemisch handelte (Folch, 1941). Bis dahin war das in nur geringen Mengen vertretene Phosphatidylserin unbekannt.

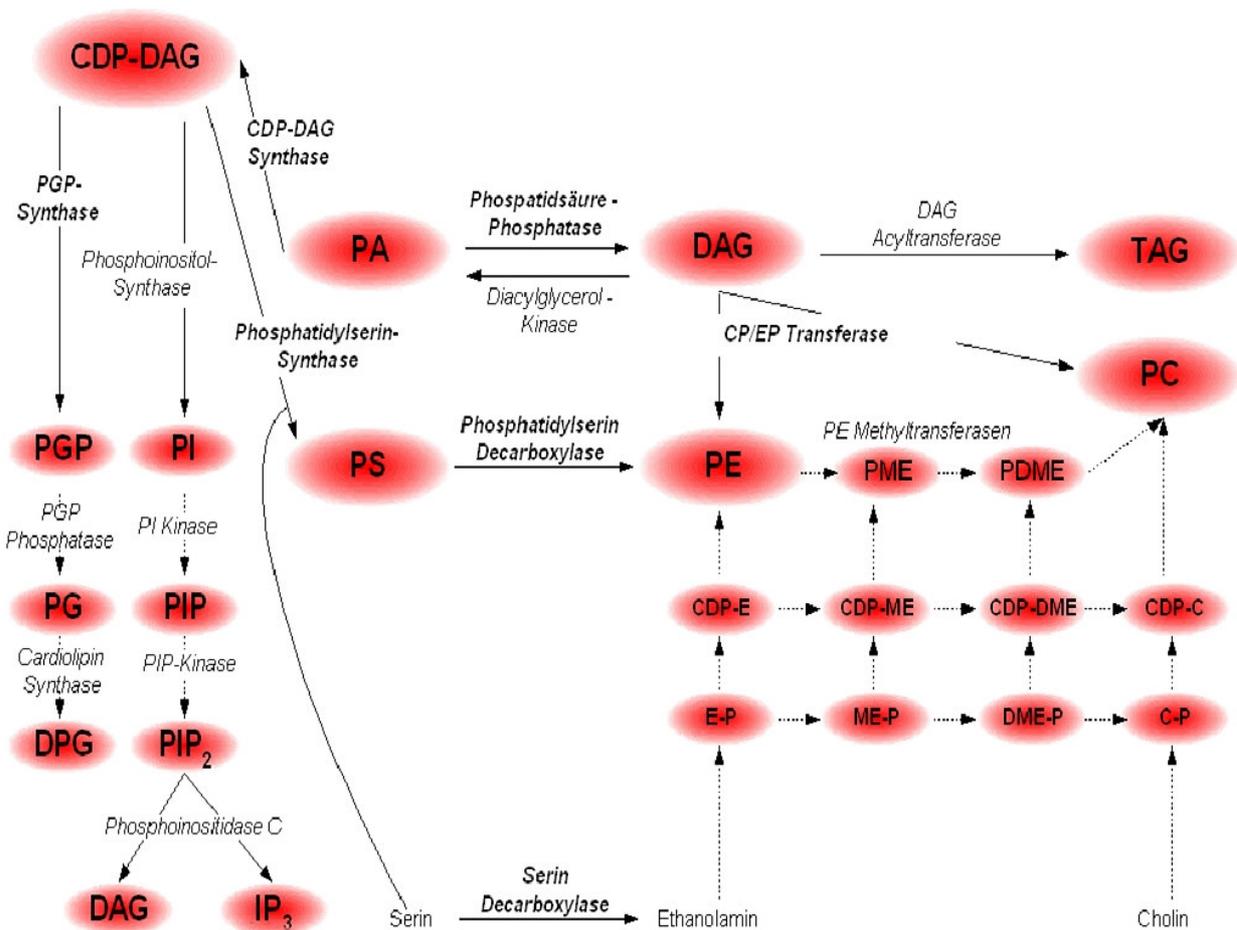


Abb. 1: Der Phospholipidstoffwechsel in Pflanzen. Schematische Darstellung der wichtigsten Stoffwechselwege.

Das anionische Phosphatidylserin stellt trotz seiner ubiquitären Verbreitung mit weniger als 1 % der Gesamtphospholipide einen nur sehr kleinen Anteil an den pflanzlichen Phospholipiden (Galliard, 1968a, 1968b; Harwood, 1975). Es wird in *Escherichia coli* durch die CDP-DAG:Serin-O-Phosphatidyl-Transferase (Phosphatidylserin Synthase) aus CDP-Diacylglycerol und L-Serin hergestellt (Raetz und Kennedy, 1974). Dieser Stoffwechselweg ist auch in Pflanzen vorhanden (Delhaize *et al.*, 1999). In einigen Pflanzen wie Rizinus (*Ricinus communis*; Moore, 1975) und Lauch (*Allium porrum*; Vincent *et al.*, 1999) konnte in Anwesenheit von Ca^{2+} ein Kopfgruppentausch nachgewiesen werden, durch den PE in PS umgewandelt wird. Dieser Kopfgruppentausch wurde auch mit PC in Karottenzellen nachgewiesen (Manoharan *et al.*, 2000). Dieser Kopfgruppentausch war jedoch in Spinat nicht detektierbar (Marshall und Kates, 1974). In Tieren spielt Phosphatidylserin eine Rolle bei der Blutgerinnung und bei der Aktivierung der Proteinkinase C. Die biologische Funktion und die zelluläre Lokalisation in Pflanzen sind dagegen weitgehend unbekannt. Es konnte gezeigt werden, daß Phosphatidylserin in diversen Pflanzenarten ungewöhnlich reich an besonders langen (C_{20} bis C_{26}), gesättigten

Fettsäuren ist (Murata *et al.*, 1984). Einige der getesteten Arten zeigten zudem hohe Gehalte an einfach ungesättigten Fettsäuren (C₂₂, C₂₃, C₂₄) im Phosphatidylserin. Derartige Fettsäuren konnten bei keinem anderen Phospholipid oder bei Lipiden anderer Lipidklassen gefunden werden. Diese langen Fettsäuren des Phosphatidylserins weisen große Ähnlichkeiten zu den Fettsäuren und Alkoholen der epicuticularen Wachse auf und es wird vermutet, daß PS hier als Transporter der Vorstufen dieser Wachse dient (Murata *et al.*, 1984). Andere Studien, die den hohen Anteil der besonders langen Fettsäuren in PS bestätigten, betonen die Wichtigkeit dieser Fettsäuren für die Eigenschaften der Plasmamembran (Bohn *et al.*, 2001). Die dramatischen Veränderungen im Phänotyp, die durch Steigerung des Anteils an besonders langen Fettsäuren auf über 30 % mittels Überexpression eines Fettsäure-Elongase-Genes in *Arabidopsis thaliana* beobachtet wurden, stützen diese Einschätzung (Millar *et al.*, 1998). Unter Kohlenstofflimitation konnte an Karottenzellen gezeigt werden, daß die Phosphatidylserin-Produktion stieg, während die Menge an anderen Phospholipiden reduziert wurde (Manoharan *et al.*, 2000).

Phosphatidylethanolamin (PE) ist ein zwitterionisches Phospholipid und kann daher einschichtige Membranen bilden (Birner *et al.*, 2001). Die kleine Kopfgruppe und die Möglichkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, machen es zu einem wichtigen Bestandteil von Membranen und es gibt Hinweise, daß bestimmte Membrantransportprozesse PE benötigen. Dementsprechend häufig ist dieses Lipid. Es ist in den Plasmamembranen und anderen, extraplastidären Membranen (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, u.a.) von höheren Pflanzen neben Phosphatidylcholin das häufigste Phospholipid (Whitman und Travis, 1985). In *Escherichia coli* stellt es den größten Mengenanteil von allen Phospholipiden. Typische Fettsäuren des pflanzlichen PEs umfassen Palmitin- (16:0), Linol- (18:2) und α -Linolensäure (18:3) wohingegen Stearin- (18:0) und Ölsäure (18:1) nur geringe Mengenanteile haben (Rivera und Penner, 1978). Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren nehmen überwiegend die *sn2*-Position ein, während die einfach-ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren nahezu vollständig in *sn1*-Position vorliegen (Browse *et al.*, 1986). PE kann in Eukaryonten auf verschiedenen Wegen synthetisiert werden, wobei jedoch nur der von Kennedy und Weiss erstmalig beschriebene „Kennedy-Weg“ über CDP-Ethanolamin (Kennedy und Weiss, 1956) eine *de novo*-Synthese darstellt. Alle anderen Synthesewege führen über die Modifikation bereits existierender Phospholipide wie die Decarboxylierung von PS oder über den bei Säugetieren (Vance, 2002) und einigen Pflanzenarten (Moore, 1975; Vincent *et al.*, 1999) gezeigte Kopfgruppentausch zwischen PS und PE. Ein weiterer, in Eukaryonten nachgewiesener Weg führt über die Re-Acylierung von Lysophosphatidylethanolamin (LPE). Das in pflanzlichen und tierischen Geweben nachgewiesene LPE verzögert die Seneszenz pflanzlicher Gewebe und beschleunigt die Fruchtreife (Ryu *et al.*, 1997). Bei *psd*-Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß PE essentiell ist und nicht vollständig durch Lipide mit ähnlichen membranformenden Eigenschaften ersetzt werden kann (Storey *et al.*, 2001). PE muß mindestens 1 % des Gesamtphospholipidgehaltes stellen, damit die *psd*-Mutanten der Hefe lebensfähig sind. Werden beide *PSD*-Gene der Hefe inaktiviert, so sind diese *psd*-Doppelmutanten in der Lage, diesen Mindestgehalt durch den Abbau von Sphingolipiden mittels der Sphingosin-1-phosphat Lyase (Saba *et al.*, 1997) aufrecht zu erhalten.

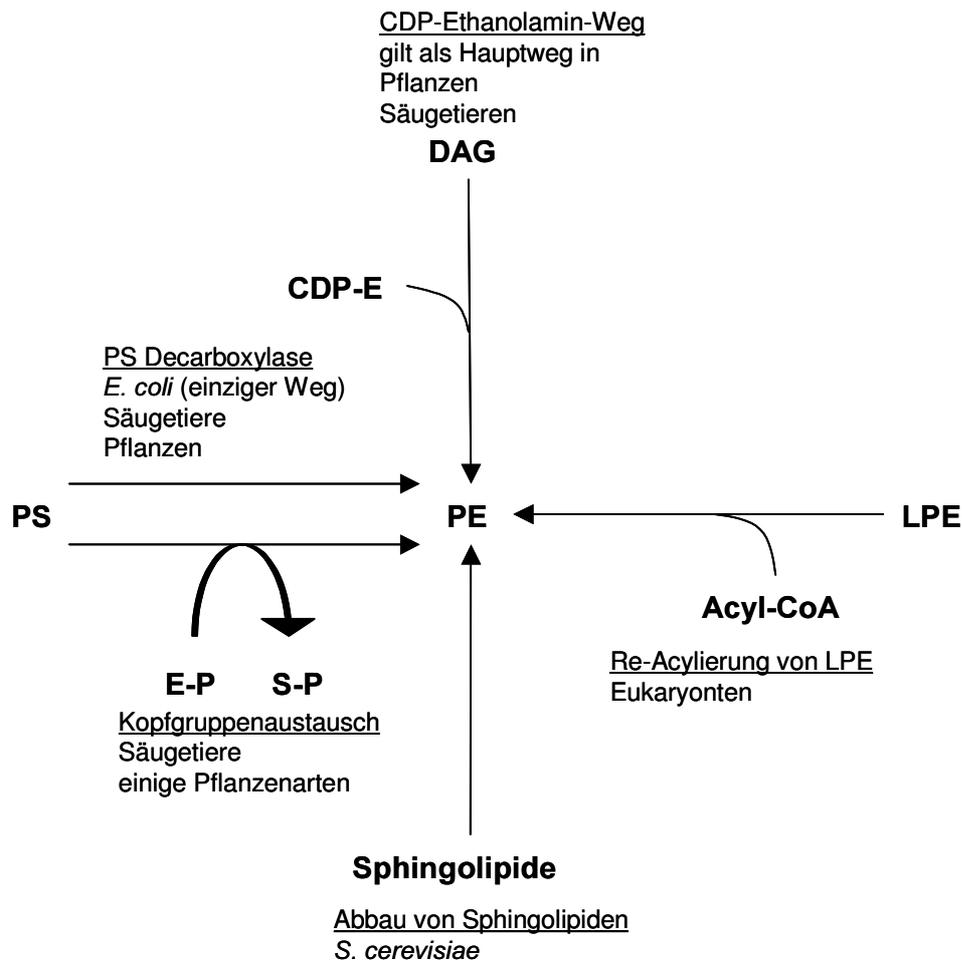


Abb. 2: Bisher bekannte Synthesewege von PE und ihre Bedeutung.

2.3 Pyruvoyl-abhängige Decarboxylasen

Die Aminosäuren-Decarboxylasen bilden eine große und weit verbreitete Gruppe von Enzymen, deren Produkte viele physiologisch wichtige Funktionen erfüllen. Neurologisch bedeutsame Substanzen wie Dopamin und Serotonin und das bei der Immunantwort wichtige Histamin werden durch Enzyme aus dieser Gruppe gebildet (Van Poelje und Snell, 1990a). Die meisten Enzyme, die Amine aus Aminosäuren durch Decarboxylierung bilden, gehören zu der Gruppe der Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzyme. Diese benötigen das aus dem Vitamin B6 (Pyridoxin) gebildete Pyridoxal 5'-Phosphat als Cofaktor.

Anfang der siebziger Jahre gab es jedoch erste Hinweise aus Arbeiten an der Histidin Decarboxylase, daß diese einen anderen Cofaktor verwendet (Riley und Snell, 1968). In den nächsten Jahrzehnten wurden weitere Mitglieder dieser Gruppe aus Decarboxylasen und Reduktasen gefunden, die statt Pyridoxal 5'-Phosphat Pyruvat als Cofaktor verwenden. Diese sogenannten Pyruvoyl-abhängigen Enzyme wurden inzwischen in zahlreichen Prokaryonten und Eukaryonten gefunden. Die α -Aspartat-Decarboxylase, die für die Synthese des an der Bildung von Coenzym A und Pantothersäure beteiligten β -Alanin verantwortlich ist, ist ein Beispiel für ein Pyruvoyl-abhängiges Enzym (Jones *et al.*, 1993). Ein weiteres Beispiel ist die Bildung von S-Adenosylmethionin über eine Pyruvoyl-abhängige Decarboxylase. S-Adenosylmethionin stellt eine essentielle Zwischenstufe bei der Bildung der für Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung wichtigen Polyamine dar (Pegg *et al.*, 1986). Die Zugehörigkeit der Phosphatidylserin Decarboxylasen zu den

Pyruvoyl-abhängigen Enzymen wurde erstmals an der PSD von *Escherichia coli* nachgewiesen (Satre und Kennedy, 1977). Tiefergehende Studien an der PSD aus *Escherichia coli* zeigten weitere Gemeinsamkeiten mit der Pyruvoyl-abhängigen Histidin-Decarboxylase wie die ähnliche Prozessierung des Proenzym (Li und Dowhan, 1988). Die Gründe für die Verwendung von Pyruvat anstelle von Pyridoxal 5'-Phosphat sind nicht vollständig geklärt. Während bei den S-Adenosylmethionin Decarboxylasen offenbar spezieübergreifend nur Pyruvat als Cofaktor verwendet wird, sind bei den Histaminproduzierenden L-Histidin Decarboxylasen sowohl Pyruvoyl- als auch Pyridoxal 5'-Phosphat-abhängige Enzyme bekannt, die innerhalb derselben Organismengruppe (z.B. Säugetiere oder Bakterien) vorkommen können. Beide Cofaktoren besitzen unterschiedliche Vor- und Nachteile für die Katalyse. Für Pyruvat als Cofaktor spricht, daß es während der Katalyse kovalent gebunden ist und das Enzym daher nicht mit anderen Proteinen um den Cofaktor konkurrieren muß (Hackert und Pegg, 1998). Diese Bindung kann jedoch auch zum Nachteil gereichen: Die Substrat-vermittelte Transaminierung, die als Nebenreaktion sowohl bei der Pyruvoyl- als auch bei der Pyridoxal 5'-Phosphat-abhängigen Katalyse stattfinden kann (siehe Abb. 3), führt zu einer irreversiblen Schädigung des Pyruvoyl-abhängigen Enzyms. Da der fehlerhaft gebildete und kovalent gebundene Alaninrest nicht entfernt werden kann, muß das gesamte Protein abgebaut und durch ein neues ersetzt werden (Hackert und Pegg, 1998). Bei Pyridoxal 5'-Phosphat-abhängigen Enzymen kann dahingegen das durch die Nebenreaktion gebildete Pyridoxamin 5'-Phosphat einfach durch ein neues Pyridoxal 5'-Phosphat-Molekül ersetzt werden. Es ist nicht erforderlich, das gesamte Protein zu ersetzen. Womöglich ist dieser Umstand die Ursache für die kurze „Lebensdauer“ der Pyruvoyl-abhängigen Enzyme. Bei der S-Adenosylmethionin Decarboxylase in Säugetieren wurde eine Halbwertszeit von nur 1 Stunde beobachtet (Stanley, 1995). Eine von 6000 bis 7000 Umsätzen resultiert bei der S-Adenosylmethionin Decarboxylase in der Transaminierung (Anton und Kutney, 1987). Der genaue Reaktionsmechanismus während der Katalyse wurde besonders gut an der Histidin Decarboxylase aus *Lactobacillus 30a* untersucht (Van Poelje und Snell, 1990a; Gallagher *et al.*, 1989). Demnach findet die Katalyse in vier Schritten statt. Zunächst wird ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet. Im zweiten Schritt wird eine Schiff'sche Base zwischen dem Pyruvoyl-Rest des Enzyms und dem Amin des Substrates gebildet. Damit wird die Voraussetzung für die Abspaltung des Kohlendioxidmoleküls im dritten Schritt geschaffen. Im vierten Schritt erfolgt Protonierung mit anschließender Hydrolyse, die das fertige Produkt abspaltet und den Pyruvoyl-Rest des Enzyms wieder herstellt (siehe Abb. 3).

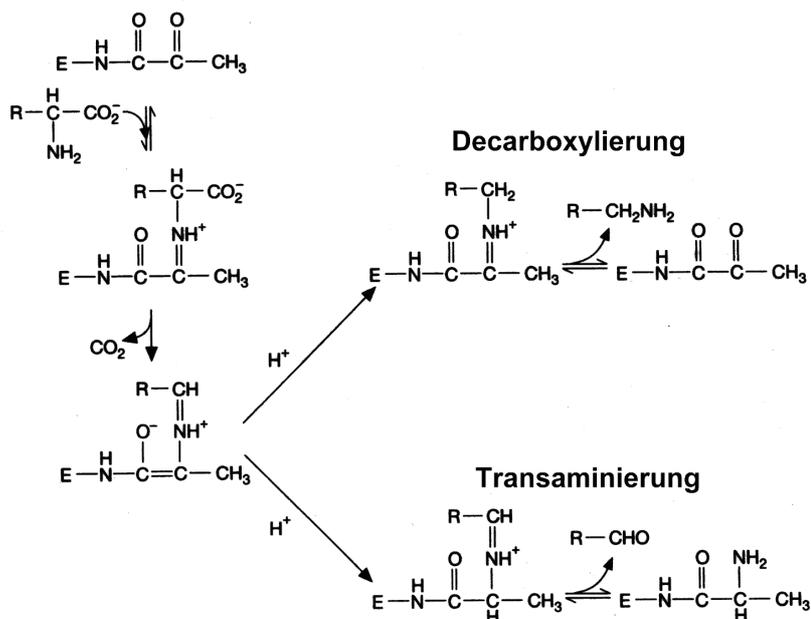


Abb. 3: **Decarboxylierung durch Pyruvoyl-abhängige Decarboxylasen und Transaminierung als Nebenreaktion** (nach Hackert und Pegg, 1998). Bei der Decarboxylierung erfolgt zunächst die Bindung des Substrates zwischen dem Pyruvoylrest und dem Amin der Aminosäure mittels einer Schiff'schen Base. Durch Elektronenverschiebung wird CO_2 abgespalten. Die anschließende Protonierung und Hydrolyse setzt das Produkt frei und stellt die Pyruvoylgruppe wieder her. Bei der ebenfalls möglichen und in geringem Umfang ablaufenden Transaminierung wird dahingegen ein Alaninrest gebildet und das Protein dauerhaft inaktiviert.

2.3.1 Struktur der Pyruvoyl-abhängigen Decarboxylasen

Typisch für die Pyruvoyl-abhängigen Decarboxylasen ist die Struktur, die sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt. Die beiden Untereinheiten (α - bzw. β -Untereinheit) lagern sich für die Katalyse zu Dimeren, Tetrameren oder sogar Hexameren zusammen.

Tabelle 1: **Struktur und Größe der Untereinheiten verschiedener Pyruvoyl-abhängiger Decarboxylasen** (nach Hackert und Pegg, 1998).

Enzym	Quelle	Untereinheiten	Molekulare Masse (kDa)	
			α -Untereinheit	β -Untereinheit
L-Histidin Decarboxylase	<i>Lactobacillus 30a</i>	$(\alpha\beta)_6$	25	9
S-Adenosylmethion Decarboxylase	<i>Escherichia coli</i>	$(\alpha\beta)_4$	18	12,4
	Mammalia, Hefe	$(\alpha\beta)_2$	10-36	7,7-10
	Pflanzen, Protozoen			
Phosphatidylserin Decarboxylase	<i>Escherichia coli</i>	$(\alpha\beta)_x$	3,7-7,3	26-29
	<i>Bacillus subtilis</i>			
	<i>Haemophilus influenzae</i>			
	Mammalia	$(\alpha\beta)_x$	3,5	32
	<i>S. cerevisiae</i> PSD1	$(\alpha\beta)_x$	4,2	52
<i>S. cerevisiae</i> PSD2	$(\alpha\beta)_x$	10	122	
<i>C. pasteurianum</i>	$(\alpha\beta)_x$	15	30	
L-Aspartat 1-Decarboxylase	<i>Escherichia coli</i>	$(\alpha\beta)_4$	11	2,8
	<i>Bacillus subtilis</i>			

Die α -Untereinheit besitzt in der Regel eine größere Masse als die β -Untereinheit. Nur bei den Phosphatidylserin Decarboxylasen ist dies genau umgekehrt.

Thermodynamisch betrachtet ist die Decarboxylierung eine favorisierte Reaktion. Die wichtigste Aufgabe der zu den Ketosäuren zählenden Pyruvoyl-Gruppe ist damit die Stabilisierung der nach der CO₂-Abspaltung verbleibenden negativen Ladung des Substrates. Die Pyruvoyl-Gruppe ist an der α-Untereinheit lokalisiert, die damit die eigentliche katalytische Funktion beherbergt. Die Histidin Decarboxylase aus *Lactobacillus 30a* ist in Bezug auf Funktion und Struktur die am besten untersuchte Pyruvoyl-abhängige Decarboxylase (Van Poelje und Snell, 1990a). 1993 wurde die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,5 Å publiziert (Gallagher *et al.*, 1993). Diese zeigte, daß die Histidin Decarboxylase durch sechs αβ-Dimere gebildet wird. Das Makromolekül besitzt drei katalytischen Zentren, die jeweils aus einer αβ- und einer β-Untereinheit des gegenüberliegenden αβ-Dimers gebildet werden. Die aktiven Zentren besitzen substratspezifische Bindungsstellen und sorgen damit für die korrekte Lage des Substrates. Eine spezielle Tasche mit negativer Oberflächenladung nimmt den Imidazol-Rest des Histidins auf, wobei einzelnen Aminosäuren eine besondere Rolle bei der Substratidentifizierung und -bindung zukommt, wie gezielt eingeführte Punktmutationen dieser Aminosäuren zeigten (Pishko und Robertus, 1993). Derartige Studien stehen für die Phosphatidylserin Decarboxylasen noch aus, wobei die Existenz von α- und β-Untereinheiten der PSD aus *Escherichia coli* belegt werden konnte (Li und Dowhan, 1988).

2.3.2 Vom Proenzym zum Enzym

Der kovalent gebundene Pyruvoyl-Rest kann nicht genetisch codiert werden, so daß posttranslationale Modifikationen erforderlich sind, um das inaktive Proenzym in die enzymatisch aktive Form zu überführen. Dieser Prozeß wurde erstmals an der Histidin Decarboxylase aus *Lactobacillus 30a* untersucht (Recsei und Snell, 1973, Recsei *et al.*, 1983). Inzwischen konnten die Existenz dieser Proenzyme auch an anderen Pyruvoyl-abhängigen Enzymen wie die Phosphatidylserin Decarboxylase aus *Escherichia coli* (Li und Dowhan, 1988) und Chinesischer Hamster (*Critecelus longicaudatus*; Kuge *et al.*, 1996) nachgewiesen werden. Das Proenzym wird innerhalb eines speziellen Motivs vor einem Serinrest gespalten. Während das aminoternale Ende des Proenzym die β-Untereinheit bildet, stellt das carboxyterminale Ende die α-Untereinheit dar. Letztere trägt an ihrem aminoternalen Ende den aus dem Serinrest gebildeten Cofaktor. Der Sequenzbereich um diese proenzymatische Schnittstelle ist innerhalb der verschiedenen Gruppen bei den Pyruvoyl-abhängigen Enzymen zum Teil sehr stark konserviert (siehe Tabelle 2). Übergreifend für alle Gruppen gilt jedoch, daß die Spaltung vor einem Serinrest stattfindet.

Tabelle 2: **Proteinsequenz an der Spaltungsstelle der Proenzyme verschiedener Pyruvoyl-abhängiger Enzyme** (nach Van Poelje und Snell, 1990a). Die Spaltung erfolgt zwischen den rot eingerahmten Aminosäuren. Identische Aminosäuren innerhalb einer Gruppe sind grau hinterlegt.

Proenzym	Motiv der Spaltungsstelle												Referenz
<i>pro</i> L-Histidin Decarboxylase													
<i>Lactobacillus 30a</i>	Asn	Met	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Phe	Thr	Gly	Val	Gln	Huynh <i>et al.</i> (1984)
<i>L. buchneri</i>	Asn	Met	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Phe	Ser	Gly	Val	Gly	Huynh u. Snell (1985)
<i>C. perfringens</i>	Asn	Met	Leu	Thr	Ala	Ser	Ser	Phe	Cys	Gly	Val	Ala	Van Poelje u. Snell (1990b)
<i>pro</i> S-Adenosylmethion Decarboxylase													
Mensch	Ala	Tyr	Val	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Met	Phe	Val	Ser	Pajunen <i>et al.</i> (1988)
Ratte	Ala	Tyr	Val	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Met	Phe	Val	Ser	Pajunen <i>et al.</i> (1988)
Hefe	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Leu	Phe	Val	Phe	Van Poelje u. Snell (1990a)
<i>Escherichia coli</i>	Val	Ala	His	Leu	Asp	Lys	Ser	His	Ile	Cys	Val	His	Tabor u. Tabor (1987)
<i>pro</i> L-Aspartat 1-Decarboxylase													
<i>Escherichia coli</i>	Asp	Leu	His	Tyr	Glu	Gly	Ser	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Smith (1988)
<i>pro</i> Phosphatidylserin Decarboxylase													
<i>Escherichia coli</i>	Gly	Arg	Phe	Lys	Leu	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Asn	Leu	Li u. Dowhan (1988)

Die Spaltung der Histidin Decarboxylase aus *Lactobacillus 30a* erfolgt am schnellsten in Gegenwart monovalenter Kationen wie K^+ oder NH_4^+ bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8. Spaltungsexperimente in Gegenwart von ^{18}O markiertem Wasser ($H_2^{18}O$) zeigten, daß die Spaltung des Proenzym nicht durch Hydrolyse erfolgt, sondern durch Umlagerung eines Sauerstoffatoms aus der Carboxylgruppe des C-terminalen Serins (Recsei *et al.*, 1983).

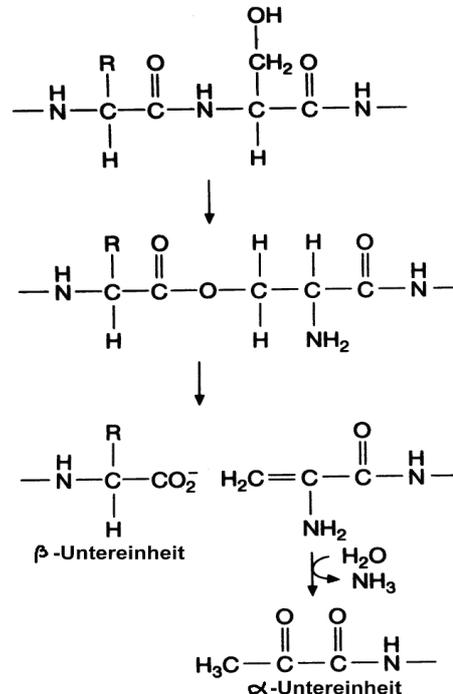


Abb. 4: **Spaltung des Proenzym und Bildung der Pyruvoylgruppe bei der Histidin-Decarboxylase aus *Lactobacillus 30a*** (nach Hackert und Pegg, 1988). Nach dem nucleophilen Angriff des Sauerstoffatoms der OH-Gruppe des Serins wird eine Esterbindung als Zwischenstufe gebildet und das Proenzym wird durch eine β -Eliminierungsreaktion gespalten. Die Pyruvoylgruppe bildet sich durch die Abspaltung von Ammonium über eine Imin- und Carbinolamin-Zwischenstufe.

Gezielt eingeführte Punktmutationen in dem Spaltungsmotiv belegten die Notwendigkeit des C-terminalen Serins, wohingegen die N-terminal benachbarte Aminosäure gegen andere ausgetauscht werden konnte, ohne daß das Proenzym die Spaltungsfähigkeit verlor. Allerdings wurden drastische Effekte auf die Spaltungsgeschwindigkeit beobachtet (Hackert und Pegg, 1998). Die Existenz weiterer Aminosäuren, die die für die Spaltung wichtige Faltung des Proenzym herbeiführen, kann vermutet werden, da das auch in anderen Proteinen vorhandene Serin-Serin- oder Glycin-Serin-Motiv allein noch keine Spaltung bedingt. Offenbar wird dies erst durch eine spezifische Faltung des Proenzym ermöglicht. Es gibt keinen Hinweis darauf, daß für die Spaltung die Anwesenheit weiterer Proteine benötigt wird. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß Chaperone oder andere Faktoren für die Einnahme der notwendigen Proteinkonformation erforderlich sind (Hackert und Pegg, 1998). So zeigten Expressionsversuche von Histidin Decarboxylase aus *Lactobacillus 30a* in *Escherichia coli*, daß es zwar zu einer Akkumulation des Proenzym kam; dieses jedoch nur sehr langsam in die aktive Form überführt wurde (Copeland *et al.*, 1987). Experimente mit der Phosphatidylserin Decarboxylase aus *Escherichia coli* zeigten ebenfalls, daß die Prozessierung des Proenzym *in vitro* wesentlich langsamer als *in vivo* abläuft. Bisher wird dies hauptsächlich auf die fehlerhafte Faltung des Proenzym zurückgeführt, wobei die Notwendigkeit eines unterstützenden Faktors weiterhin nicht ausgeschlossen werden konnte (Van Poelje, 1988).

2.4 Phosphatidylserin Decarboxylase

Die Phosphatidylserin Decarboxylase katalysiert die Umsetzung von Phosphatidylserin zu Phosphatidylethanolamin und wurde 1964 zum ersten Mal bei *Escherichia coli* beschrieben (Kanfer und Kennedy, 1964). In *Escherichia coli* stellt dieser Stoffwechselweg den einzigen Syntheseweg des für den Aufbau von Zellmembranen wichtigen Phosphatidylethanolamins dar. Hefe und Säugetierzellen verfügen über weitere, von der PSD unabhängige Synthesewege wie über CDP-Ethanolamin und Diacylglycerol (Kennedy und Weiss, 1956). Kürzlich konnte ein weiterer Syntheseweg identifiziert werden, der Pflanzen die Synthese von Ethanolamin über die direkte Decarboxylierung des Serins erlaubt. Dies erfolgt mittels einer löslichen, Pyridoxal 5-Phosphat-abhängigen Serin Decarboxylase (Rontein *et al.*, 2001) und verknüpft damit den Serin-Pool mit dem PE-Pool der Zelle unter Umgehung der PSD. Die Existenz einer pflanzlichen PSD wurde bereits 1968 vorgeschlagen (Vandor und Richardson, 1968) und experimentell demonstriert (Marshall und Kates, 1973). Über Sequenzhomologie wurde die erste pflanzliche PSD-cDNA im Jahr 2000 aus dem Moos *Physcomitrella patens* kloniert (Von Orlow, 2000).

Die PSD ist ein membrangebundenes Enzym (Dowhan, 1997). Die PSD von *Escherichia coli* ist wie bei verschiedenen anderen Gram-negativen Bakterien an der inneren Cytoplasma-Membran lokalisiert (Dutt und Dowhan, 1977). Bei *Escherichia coli* liegt nur ein PSD-Gen vor, wohingegen bei Hefe zwei PSD-Gene bekannt sind - womöglich ist dies bei allen Eukaryonten die Regel (Dowhan, 1997). Die Proteine dieser beiden PSD-Gene sind zudem unterschiedlich lokalisiert: PSD1 von *S. cerevisiae* wurde an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Clancey *et al.*, 1993; Trotter *et al.*, 1993) und PSD2 in einer Golgi/Vakuolen-Fraktion gefunden (Trotter und Voelker, 1995). Die PSD des Chinesischen Hamsters *Cricetulus longicaudatus* konnte an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert werden (Zborowski, 1983), was durch Untersuchungen an Mitochondrien aus den Leberzellen von Ratten erneut bestätigt wurde (Hovius *et al.*, 1992). Auffallend sind die geringen Sequenzähnlichkeiten und die stark unterschiedlichen Sequenzlängen der beiden PSDs aus *S. cerevisiae*. Die mitochondriale PSD1 der Hefe (1138 Aminosäuren) zeigt eine höhere Identität mit der Säugetier-PSD aus *Cricetulus longicaudatus* als mit der nur 500 Aminosäuren langen PSD2 aus Hefe.

Die PSD in *Escherichia coli* ist unter normalen Wachstumsbedingungen ein essentielles, offenbar konstitutiv exprimiertes Gen (Voelker, 1997), für das inzwischen eine Reihe von Mutantenallelen vorliegt, bei denen der Defekt unter entsprechenden Bedingungen letal ist (Hawrot und Kennedy 1975, 1978). Diese Mutantenallele, von denen hauptsächlich die temperaturabhängige Linie EH150 für Komplementationsversuche verwendet wurde, zeigen neben dem Verlust der PSD-Aktivität die Akkumulation großer Mengen an PS (bei Anwesenheit von Mg^{2+} im Medium bis zu 70 % des gesamten zellulären Phospholipids) und die Zellen werden filamentös. Die Linie EH150 zeigt eine reduzierte, bzw. bei höheren Temperaturen ausbleibende Beweglichkeit, die mit einer reduzierten Transkriptionsrate der für die Flagellen-Bildung notwendigen Gene korrespondiert (Shi *et al.*, 1993). Die bis zu 50fache Überexpression der PSD, die eigentlich weniger als 0,1 % der zellulären Gesamtproteinmenge darstellt, verändert dahingegen das Lipidmuster der Zellen nicht (Tyhach *et al.*, 1979). Auch für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* liegen inzwischen *psd*-Mutanten vor. *psd1*-Mutanten verlieren die Fähigkeit, auf Medien mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen was auf eine Funktionsstörung der Mitochondrien hinweist (Trotter *et al.*, 1993). Bei Wachstum auf Lactat werden nur sehr geringe Mengen mitochondrialen PEs gebildet. Selbst die Zufuhr von PE über das Kulturmedium oder das über die PSD2, bzw. über den Kennedy-Weg gebildete PE kann diesen geringen mitochondrialen PE-Gehalt nicht steigern und demonstriert damit die Bedeutung der Kompartimentierung bei der Phospholipidbiosynthese. Auch in Säugetierzellen war es nicht möglich, die PE-Synthese der Mitochondrien ausschließlich durch die Aktivität der

Ethanolamin Phosphotransferase (Kennedy-Weg) zu ersetzen (Shiao *et al.*, 1995). Tatsächlich wird in der Regel PE aus den Mitochondrien zu anderen Organellen wie der Plasmamembran (Vance *et al.*, 1991) und dem ER (Voelker, 1985) exportiert.

Die Regulation der PSD ist am besten bei *Saccharomyces cerevisiae* untersucht worden. Dort wurde gezeigt, daß die Kombination aus Inositol und Cholin als Repressor für die Synthese von Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin dienen (Paltauf *et al.*, 1992). Auch *PSD1* der Hefe zeigt in Anwesenheit dieser Kombination im Wachstumsmedium eine um 50 bis 70 % reduzierte Expression (Overmeyer und Waechter, 1991; Lamping *et al.* 1991). Für *PSD2* stehen solche Untersuchungen noch aus. Untersuchungen zur Substraterkennung und Substratbindung wurden erfolgreich an der PSD von *Cricetulus longicaudatus* durchgeführt. Mit Hilfe eines für die Phosphatidylserin-Bindungsstelle der Proteinkinase C spezifischen monoklonalen Antikörpers konnte eine homologe Bindungsstelle bei der PSD von *Cricetulus longicaudatus* zwischen den Aminosäuren 351 bis 364 identifiziert werden (Igarashi *et al.*, 1995). Dieser Consensus in der Form FFXFLKXXXKXR konnte auch bei der PSD aus *Homo sapiens* gefunden werden; jedoch nicht bei den anderen pro- und eukaryontischen PSDs.

Die Reifung der PSD über die Spaltung des Proenzym konnte durch Li und Dowhan in aufgereinigten Präparationen der PSD aus *Escherichia coli* gezeigt werden (Li und Dowhan, 1988). Es konnten gelelektrophoretisch zwei Banden im molaren Verhältnis von 1:1 nachgewiesen werden, deren Massen denen der zu erwartenden Spaltungsprodukte des Proenzym bei Spaltung zwischen Gly-253 und Ser-254 entsprachen. Enzymtests mit radioaktivem Phosphatidylserin in Anwesenheit von NaCNBH₃ führten zur radioaktiven Markierung der kleineren α -Untereinheit durch die irreversible Konvertierung der Pyruvoyl-Gruppe zu einem Alaninrest. Die Sequenzierung der Peptiduntereinheiten bestätigte die Spaltungsstelle. Die gezielte Mutagenese des Ser-254 zeigte, daß ein Alaninrest an dieser Stelle die Akkumulation eines inaktiven Proenzym zur Folge hat. Ein Ersetzen durch Threonin oder Cystein führt zu einer auf 10 bis 20 % reduzierten Prozessierungszeit des Proenzym. Im Wildtyp erfolgt diese Prozessierung mit einer Halbwertszeit von 2 Minuten. Von den Mutanten war jedoch nur die Cys-254-Mutante in der Lage, PSD-defiziente Linien zu komplementieren da nur diese den für die Funktion essentiellen Pyruvoylrest bilden konnte. Die Thr-254-Mutante bildet bei der Spaltung eine α -Keto-Butyratgruppe anstelle des Pyruvoylrestes und erzeugt damit eine katalytisch inaktive α -Untereinheit. Die Spaltung des Proenzym und die Bildung der Untereinheiten der *Escherichia coli* PSD ist nach bisherigen Erkenntnissen ein autokatalytischer Prozeß der keine weitere Cofaktoren oder Enzyme benötigt (Li und Dowhan, 1990). Die Spaltung des Proenzym in die Untereinheiten und die Bildung des Cofaktors läuft demnach offenbar analog zu dem bereits an der Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus 30a* beschriebenen Mechanismus ab (siehe Abb. 4).

Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern an der mitochondrial lokalisierten PSD aus Chinesischem Hamster (*Cricetulus longicaudatus*) zeigten, daß die Reifung dort in drei proteolytischen Schritten erfolgt (Kuge *et al.*, 1996). Im ersten Schritt wird das rund 4 kDa-lange Mitochondrien-Signalpeptid entfernt. Im zweiten Schritt erfolgt vermutlich die Anlagerung an die innere Mitochondrienmembran, bei der weitere 4 kDa entfernt werden. Die dritte, rund 34 kDa lange Form entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit der reifen β -Untereinheit, da diese Form nicht auftritt, wenn durch eine gezielt in die LGST-Schnittstelle eingeführte Punktmutation die Bildung von Untereinheiten blockiert wird. Die nur rund 3,6 kDa-große α -Untereinheit konnte mit dem Antikörper nicht detektiert werden. Über die Zusammenlagerung der Untereinheiten zu der aktiven Form ist wenig bekannt. Hydrophobieitäts-Analysen zeigen für die PSD aus *Escherichia coli*, daß nur die β -Untereinheit Bereiche mit deutlicher Hydrophobieität aufweist, die in zwei unterschiedlich großen Domänen konzentriert sind (Li und Dowhan, 1988). Daher wird die β -Untereinheit

als die für die Membranassoziation verantwortliche Untereinheit betrachtet, an die sich die kleinere α -Untereinheit anlagert. Untersuchungen zu der Anzahl an $\alpha\beta$ -Untereinheiten, die sich zu einem PSD-Enzymkomplex zusammenlagern, fehlen bisher weitestgehend. Nach Untersuchungen von Rizzolo ist die PSD von *Escherichia coli* als Oligomer, vermutlich als Trimer, aktiv (Rizzolo, 1981).

Der Reaktionsmechanismus über eine Schiff'sche Base wurde anhand des von Van Poelje und Snell entwickelten Modells (Van Poelje und Snell, 1990a) für die Histidin Decarboxylase abgeleitet. Die vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen stehen in Einklang mit den bisher gewonnenen experimentellen Daten aus den Arbeiten an der Phosphatidylserin Decarboxylase aus *Escherichia coli* (Voelker, 1997; siehe Abb. 5). Nach Bindung des Substrates über eine Schiff'sche Base erfolgen Elektronenumlagerungen, die die Decarboxylierung und die Azomethin-Zwischenstufe favorisieren. Anschließende Protonierung erzeugt das Produkt Phosphatidylethanolamin, das durch Hydrolyse freigesetzt wird. Dabei wird die Pyruvoylgruppe regeneriert.

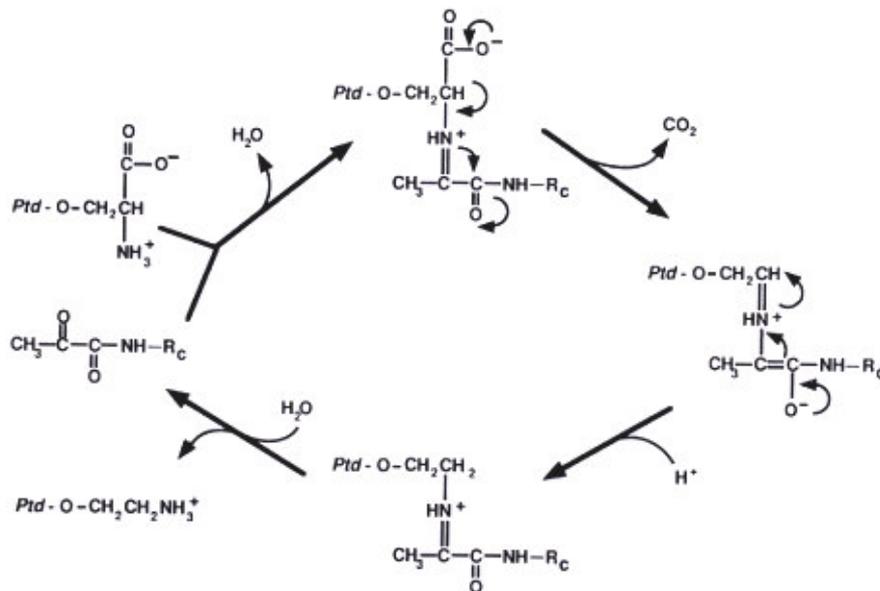


Abb. 5: Nach Van Poelje und Snell (1990a) durch Voelker (1997) vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Phosphatidylserin Decarboxylase von *Escherichia coli*.

Die PSD decarboxyliert nur lipidgebundenes Serin. Enzymtests mit PSD aus *Escherichia coli* mit Derivaten des Phosphatidylserins wie Serin, Phosphoserin und Glycerophosphoserin waren nicht erfolgreich (Dowhan *et al.*, 1974). Dagegen scheinen die Fettsäuren des Substrates keinen Einfluß auf die Substratspezifität zu besitzen: Phosphatidylserin mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäureresten wird gleichermaßen gut umgesetzt (Li und Dowhan, 1992). Es werden selbst ungewöhnliche Substrate wie Dimyristoyl-phosphatidylserin oder 1-Acyl,2(ω -pyren)-acyl-phosphatidylserin erkannt und decarboxyliert (Voelker und Baker, 1992; Jasinska *et al.*, 1993). Allerdings konnte bei *in-vitro*-Experimenten mit mitochondrialer PSD aus Säugetieren eine gewebeabhängige Präferenz für Substrate mit bestimmten Fettsäuren beobachtet werden (Kevala und Kim, 2001).

Von den bisher bekannten pyruvoyl-abhängigen Phosphatidylserin Decarboxylasen ist die PSD von *Escherichia coli* das am besten untersuchte Enzym. Studien zur Enzymkinetik der PSD unter verschiedenen Substratverdünnungen wurden bisher nur mit aufgereinigtem Protein aus *Escherichia coli* durchgeführt (Li und Dowhan, 1992; Warner und Dennis, 1975). Die aufgereinigte PSD aus *Escherichia coli* hatte eine Aktivität von 69 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Als membrangebundenes Enzym mit ebenfalls membrangebundenem Substrat folgt die PSD in Bezug auf das Substrat nicht der klassischen Michaelis-Menten

Kinetik, da nicht alle Freiheitsgrade verfügbar sind. Im klassischen PSD-Enzymtest wird das Enzym durch Detergenzien wie Triton X-100 in Micellen dispergiert, so daß die Kinetik vor allem durch die Substrat-Konzentration pro Micelle und die in dem Testansatz verfügbare Micellen-Oberfläche bestimmt wird.

2.5 Verwendete Modellorganismen und ihre Mutanten:

Die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*, die „botanische Drosophila“ (Kribben, 1964), bietet eine Reihe von Eigenschaften, die die Pflanze als Modellorganismus für die Erforschung höherer Pflanzen prädestiniert (Meinke *et al.*, 1998). Sie gehört zu der Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae* = *Cruciferae*) und ist damit eine nahe Verwandte zahlreicher Nutz- und Kulturpflanzen wie Blumenkohl (*Brassica oleracea*), Senf (*Brassica nigra*) und Raps (*Brassica napus*). Die Pflanze wurde im 16. Jahrhundert durch Johannes Thal erstmals beschrieben. Bereits 1907 wurde durch F. Laibach die korrekte Chromosomenzahl bestimmt und das kleine Genom von 120 Mb auf 5 Chromosomen sicherte der Pflanze bis heute einen besonderen Stellenwert in der Forschung (Meyerowitz, 1994). Die vollständige Sequenzierung des Genoms folgte im Jahr 2000 (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Die in der Pflege anspruchslose Pflanze hat eine geringe Wuchshöhe und kurze Generationsdauer von im Schnitt 48 Tagen von der Aussaat bis zur Samenreife (Boyes *et al.*, 2001). Durch die intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten wurden Protokolle zur Mutagenese in Zellkultur oder *in planta* entwickelt. Das Spektrum reicht inzwischen über T-DNA-Insertion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder Verwendung von Transposons, γ -Strahlen und Partikelbeschuß bis zur chemischen Mutagenese. Mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms im Jahr 2000 durch die *Arabidopsis* Genome Initiative wurde der Weg für die weitere Forschung geebnet. Inzwischen sind zahlreiche Mutanten für *Arabidopsis* isoliert und beschrieben worden; darunter zahlreiche mit Defekten in der Fettsäurebiosynthese (Ohlrogge und Browse, 1995). Als erste pflanzliche Mutante mit einem Defekt in der Biosynthese der Kopfgruppe eines Thylakoidlipids wurde 1995 eine DGD-defiziente *Arabidopsis*-Mutante beschrieben (Dörmann *et al.*, 1995). In den letzten Jahren sind mehrere, große Projekte zur Erzeugung von T-DNA-Insertionsmutanten gestartet worden, die die schnelle, gezielte Isolation von knockout-Mutanten von *Arabidopsis* aus einer zufällig erzeugten Mutantenkollektion mittels PCR ermöglichen. Neben der über 60000 Linien umfassenden Kollektion der *Arabidopsis* knockout facility (Madison, USA) existieren weitere Populationen wie die von INRA (Versailles, Frankreich), Syngenta (Torrey Mesa Research Institute, San Diego, USA), GABI-KAT (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, Deutschland) oder vom Salk Institute for Biological studies (Kalifornien, USA). Für das gezielte, post-transkriptionale Inaktivieren von Genen steht inzwischen auch für *Arabidopsis* die RNAi-Technik zur Verfügung (Chuang und Meyerowitz, 2000). Erste Projekte wie AGRİKOLA (<http://www.agrikola.org/index.html>) nutzen diesen Ansatz zur systematischen, genomweiten Inaktivierung von Genen, um die Funktion und Bedeutung der noch verbleibenden, unbekanntenen Gene in *Arabidopsis thaliana* zu klären.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger Pilz (*Ascomycota*) der in der Kulturgeschichte des Menschen als Backhilfe und bei der Fermentierung bereits eine wichtige Rolle spielte. Erst in den letzten Jahrzehnten kam eine weitere Rolle als Modellorganismus für die Forschung an Eukaryonten hinzu. Durch die Möglichkeit, sowohl an haploiden als auch mit diploiden Linien zu arbeiten, die einfache Kultur und der inzwischen große Fundus an Protokollen zur Transformation und Mutagenese, ermöglichen ein breites Anwendungsspektrum für diesen Modellorganismus. Das aus 16 Chromosomen bestehende Genom wurde 1996 vollständig durchsequenziert (Goffeau *et al.*, 1996). *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 2 PSD-Gene. Sowohl von der mitochondrial

lokalisierte *PSD1* (Clancey *et al.*, 1993) als auch von der Golgi/Tonoplasten-lokalisierten *PSD2* (Trotter und Voelker, 1995) existieren Mutanten.

Die in dieser Arbeit verwendete *psd1*-Mutante YNL169C wurde im Rahmen einer genomweiten Deletionsstudie angefertigt (Giaever *et al.*, 2002). Die Mutante zeigt eine um ca. 90 % reduzierte PSD-Aktivität bei einem nur geringfügig veränderten, aber dünnschichtchromatographisch detektierbaren Lipidphänotyp. Das Wachstum von *psd1* ist auf Vollmedien bei normalen Kulturbedingungen unverändert. Unter besonderen Kulturbedingungen wie erhöhter Temperatur oder Milchsäure als einziger Kohlenstoffquelle zeigt die *psd1*-Mutante einen deutlichen Wachstumsphänotyp (Storey *et al.*, 2001). Die *psd2*-Mutante zeigt nur eine geringfügig reduzierte PSD-Aktivität und ist im Lipidphänotyp unauffällig so daß sie für Komplementationsversuche ungeeignet war und nicht verwendet wurde. Die *psd1/psd2*-Doppelmutante (Trotter *et al.*, 1995) zeigt dahingegen einen ausgeprägten Phänotyp. Weniger als 5 % des zellulären Phosphatidylserins wird in Phosphatidylethanolamin umgesetzt und selbst unter exogener Zugabe von PE ist eine Reduktion des PE-Gehaltes um 70 % zu verzeichnen. *psd1/psd2* ist in Bezug auf Ethanolamin und Cholin auxotroph.

Seit 1973 mit dem Darmbakterium *Escherichia coli* der erste rekombinante Organismus geschaffen wurde (Cohen *et al.*, 1973), ist es ein fester und unverzichtbarer Bestandteil gentechnischer Methoden geworden. Inzwischen wurden zahlreiche Techniken zur Kultur, Lagerung, Transformation und Mutagenese entwickelt und es steht eine große Zahl an Mutanten zur Verfügung. Im Rahmen eines Mutagenese-Experimentes mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin wurde eine Reihe von temperatursensitiven Membranlipidmutanten erzeugt (Hawrot und Kennedy, 1975). Von diesen wurde EH150 als *psd*-Mutante identifiziert. Diese Linie zeigt eine deutliche Akkumulation von Phosphatidylserin. Bei Wachstum unter erhöhter Temperatur (42° C) steigt der Anteil von Phosphatidylserin an den Phospholipiden auf bis zu 25 % (Hawrot und Kennedy, 1978). Bei einer Wachstumstemperatur von 30° C beträgt dieser Anteil nur 1 %. Bei erhöhter Temperatur ist das Wachstum im Gegensatz zum Wildtyp deutlich reduziert und die Zellen zeigen eine filamentöse Struktur. Der Lipidphänotyp dieser Linie konnte mittels verschiedener Expressionskonstrukte von pro- und eukaryontischer PSD erfolgreich komplementiert werden (Matsumoto *et al.*, 1998; Clancey *et al.*, 1993).

2.6 Fragestellung

Die PSD stellt einen Vertreter aus der wichtigen Gruppe der Pyruvat-abhängigen Decarboxylasen dar. Die bisherigen Forschungen an diesem Enzym beschränkten sich hauptsächlich auf Mikroorganismen wie *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. Dort führt der vollständige Ausfall dieses Enzyms zu schweren bis letalen Effekten, die zum Teil nur durch spezielle Wachstumsbedingungen kompensiert werden können. Während die PSD in diesen Modellsystemen den Hauptsyntheseweg für Phosphatidylethanolamin darstellt, ist dieser Stoffwechselweg bei Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* Teil eines ungleich größeren und komplexeren Systems der Phospholipidbiosynthese. Bisher ist unbekannt, welche Bedeutung dieser Syntheseweg in Pflanzen hat und welchen Beitrag er zum Phosphatidylethanolaminpool der Zelle liefert. Bisherige Forschungen an der PE-Synthese beschränken sich auf den von Kennedy und Weiss bereits 1956 beschriebenen Stoffwechselweg über CDP-Ethanolamin. Durch die vollständige Sequenzierung von *Arabidopsis thaliana* ist die Identifizierung möglicher *PSD*-Gene durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten *PSD*-Sequenzen wie z.B. aus dem Moos *Physcomitrella patens* (Von Orlow, 2000) oder *Sacharomyces cerevisiae* (Clancey *et al.*, 1993; Trotter und Voelker, 1995) möglich. Bereits vorhandene T-DNA-Insertionsmutanten-Populationen bieten die Möglichkeit, *PSD*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* zu isolieren, bei denen die Auswirkungen des Ausfalls dieses Stoffwechselweges

unmittelbar untersucht werden können. Über die physiologische Charakterisierung (z.B. Lipidmuster, Wachstumsverlauf, Blühzeitpunkt) und molekulargenetische Untersuchungen (Expression der *PSD*-Gene) ist die Phänotypisierung dieser Mutanten möglich. Neben Versuchen zur Expression pflanzlicher PSDs in verschiedenen pro- und eukaryontischen Modellsystemen ist die Lokalisation der PSD ein weiteres Anliegen dieser Arbeit. Bisher liegen nur für die PSDs aus dem Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* Daten vor, die auf eine Tonoplasten/Golgi-lokalisierte und eine mitochondrial lokalisierte PSD schließen lassen (Clancey *et al.*, 1993; Trotter und Voelker, 1995). In diesem Projekt wurde dahingegen mit GFP-PSD-Fusionsproteinen gearbeitet, die die Lokalisierung in intakten, vitalen Zellen auf mikroskopischer Ebene gestatten.

Mit dieser Arbeit sollen die Grundlagen gelegt werden, um die PE-Synthese durch die Decarboxylierung von Phosphatidylserin besser zu verstehen und ihn in den Gesamtkontext der Phospholipidbiosynthese einordnen zu können. Angesichts der besonderen wirtschaftlichen Bedeutung des aus dem PE hervorgehenden Lipids Phosphatidylcholin, das als Lecithin eine breite Anwendung als Emulgator erfährt, erschließt sich die besondere Bedeutung im Verständnis der Biosynthese von PE