

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung der cDNAs von *PSD1* und *PSD2* aus *Arabidopsis thaliana*

Im Rahmen der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) wurden zwei Gene der Phosphatidylserin Decarboxylase (*PSD1*, *PSD2*) durch Sequenzvergleiche mit den bereits bekannten Genen der anderer Organismen (*Critecelus longicaudatus*, *Escherichia coli*) identifiziert. *PSD1* wurde auf Chromosom 4 (ORF At4g25970) und *PSD2* auf Chromosom 5 (ORF At5g57190) lokalisiert. Für die funktionelle Untersuchung und weitergehende Charakterisierung war es notwendig, die zugehörigen cDNAs zu isolieren. Dazu wurden zunächst die Datenbanken nach bereits verfügbaren ESTs durchsucht. Für *PSD1* konnten dabei insgesamt 12 ESTs gefunden werden. Ein EST (AV527283), dessen vorliegende Teilsequenz (Asamizu *et al.*, 2000) rund 100 bp vor dem Startcodon der genomischen *PSD1* beginnt, wurde vollständig durchsequenziert. Die vom Start- bis zum Stopcodon 1905 bp große cDNA ermöglichte durch Sequenzvergleich mit den genomischen Sequenzdaten die Ermittlung der Exon-Intron-Struktur der *PSD1*. Die nicht-translatierten Bereiche der cDNA konnte am 5'-Ende durch den Beginn des ESTs AV527283 ermittelt werden. Am 3'-Ende stand ein zusätzlicher EST (AV544284) zur Verfügung, der die Identifikation eines 248 bp-langen, nicht-translatierten Bereiches ermöglichte.

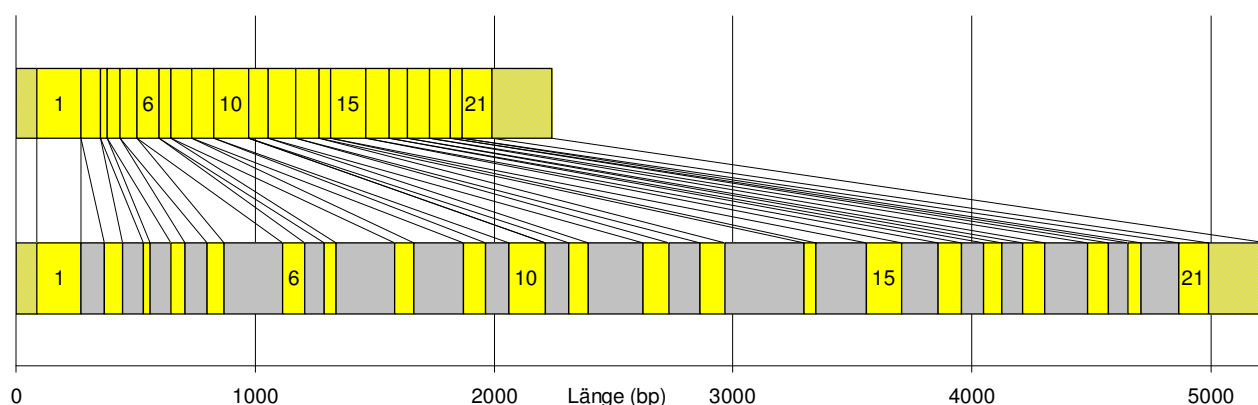


Abb. 8: **Exon-Intron-Struktur der PS Decarboxylase *atPSD1***. Schematische Darstellung der cDNA (oben) und der genomischen DNA (unten) mit den Exons (Gelb), Introns (Grau) und den nichttranslatierten Bereichen vor dem Startcodon, bzw. hinter dem Stopcodon (Gelb-Grau schraffiert).

Die Datenbankrecherche nach einem EST für *PSD2* war nicht erfolgreich. Daraufhin wurde die 1908 bp große cDNA aus Einzelstrang-cDNA von *Arabidopsis thaliana* mit den Oligonukleotiden PD97 und PD98 am Start- und Stopcodon isoliert. Die cDNA von *PSD2* wurde vollständig von beiden Seiten durchsequenziert und die Exon-Intron-Struktur anhand der genomischen Sequenz ermittelt. Aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten mit ESTs sind Angaben zu den 5'- und 3'- nichttranslatierten Bereichen nicht möglich.

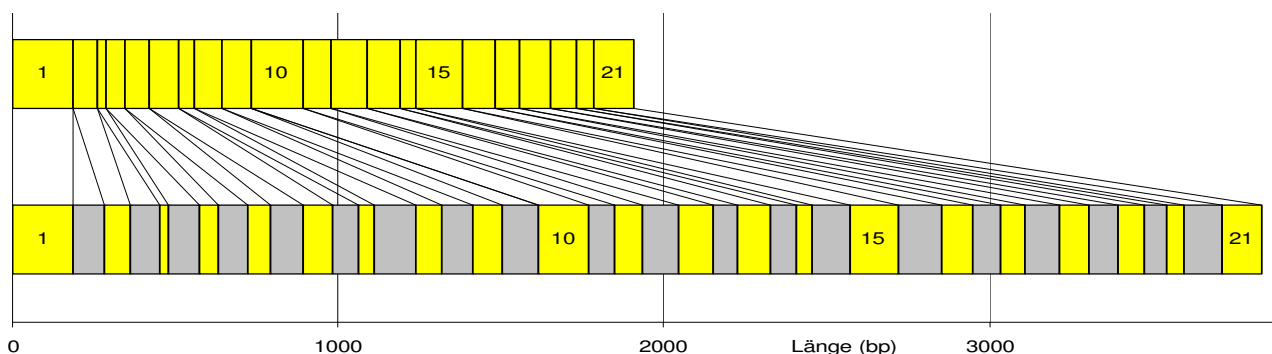


Abb. 9: **Exon-Intron-Struktur der PS Decarboxylase *atPSD2***. Schematische Darstellung der cDNA (oben) und der genomischen DNA (unten) mit den Exons (Gelb) und Introns (Grau).

Die Gene von *atPSD1* und *atPSD2* weisen jeweils 21 Exons auf. Die relative Lage und Länge der Exons und Introns sind bei beiden Genen trotz der verschiedenen Längen der genomischen DNAs untereinander sehr ähnlich. Es konnten keine auffälligen Abweichungen in den Exon-Intron-Strukturen von *atPSD1* und *atPSD2* ermittelt werden.

4.2 Isolierung der cDNA der PS Decarboxylase PSD3 aus *Arabidopsis thaliana*

Das Gen (Nr. At4g16700) wurde bei der Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) als mögliche PSD identifiziert (Bezeichnung: „similarity to phosphatidylserine decarboxylase“), wobei dort ein Teilstück der PSD-Sequenz des Chinesischen Hamsters *Cricetulus longicaudatus* für die Identifizierung verwendet wurde (Contig AL161544). Paralell dazu wurde es durch Sequenzvergleiche auf Proteinebene mit *atPSD1* und *atPSD2* im Labor von John Ohlrogge (Michigan State University, East Lansing, USA) als mögliche Phosphatidylserin Decarboxylase identifiziert. *atPSD3* wurde auf Chromosom 4 lokalisiert. Für die cDNA konnte kein EST in den öffentlich zugänglichen Datenbanken gefunden werden. Die in der NCBI-Datenbank notierte Exon-Intron-Vorhersage beinhaltete 10 Exons und 9 Introns (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=7268391&dopt=GenBank) und ein Protein mit 434 Aminosäuren. Diese Vorhersage wurde anhand von Sequenzvergleichen zwischen der abgeleiteten *atPSD3*-Proteinsequenz und den bereits bekannten PSD-Proteinsequenzen von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Cricetulus longicaudatus* (Chinesischer Hamster) nachvollzogen. Dazu wurde überprüft, ob für die vorhergesagten Exons homologe Bereiche bei den anderen PSDs existieren. Es konnten dabei keine Hinweise auf weitere Exons oder starke Abweichungen von der vorhergesagten Struktur gefunden werden so daß entsprechende Oligonukleotide (PD288, PD289) für die vermutlichen Start- und Stopcodons abgeleitet wurden.

Die Versuche, mittels PCR die cDNA aus *Arabidopsis*-Einzelstrang cDNA zu isolieren, waren nicht erfolgreich. Da die rund 2500 bp lange genomische DNA damit problemlos amplifiziert werden konnte, konnten Fehler in den Versuchsbedingungen der PCR weitgehend ausgeschlossen werden. Erst mittels zusätzlicher, weiter innenliegender Oligonukleotide (PD228, PD230, PD229) konnten Teile der *atPSD3* cDNA amplifiziert werden. Diese Versuche belegten, daß nur mit dem rückwärtsgerichteten Oligonukleotid PD289 keine Amplifikation aus Einzelstrang-cDNA möglich war. Daraufhin wurden 3'- und 5'- RACE durchgeführt, um die Exon-Intron-Prognose zu überprüfen. Es konnte mit PD235 ein etwa 400 bp langes 3'-Fragment und mit PD236 ein 500 bp langes 5'-Fragment amplifiziert werden. Zur Überprüfung dieser Fragmente wurde ein Southern Blot

durchgeführt, der anschließend einer Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde unterworfen wurde. Die unter stringenten Bedingungen durchgeführte Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter, genomischer *atPSD3*-DNA (PD176/ PD189), ergab starke Signale für die beiden Fragmente. Diese wurden nach der Zwischenklonierung in einen TA-Vektor in beide Richtungen sequenziert.

Das Ergebnis zeigte, daß die Vorhersage der Exon-Intron-Struktur teilweise erheblich korrigiert werden musste. Auf dem bisher in 10 Exons unterteilten Sequenzbereich wurden 11 Exons ermittelt. Die Lage des Startcodons wurde bestätigt; es wurde nur ein kurzer, 37 bp langer, nichttranslatierter Bereich am 5'-Ende identifiziert. Das Oligonukleotid PD289 war inmitten eines Introns lokalisiert, was dessen Versagen beim Amplifizieren der cDNA erklärte. Es konnte ein weiteres, 12. Exon identifiziert werden.

Die anhand dieser Daten erstellten Oligonukleotide am Stop-Codon (PD244, PD247, PD246, PD249, PD288) ermöglichten die Amplifikation des gesamten kodierenden Bereiches der cDNA (1362 bp inklusive Start- und Stopcodon).

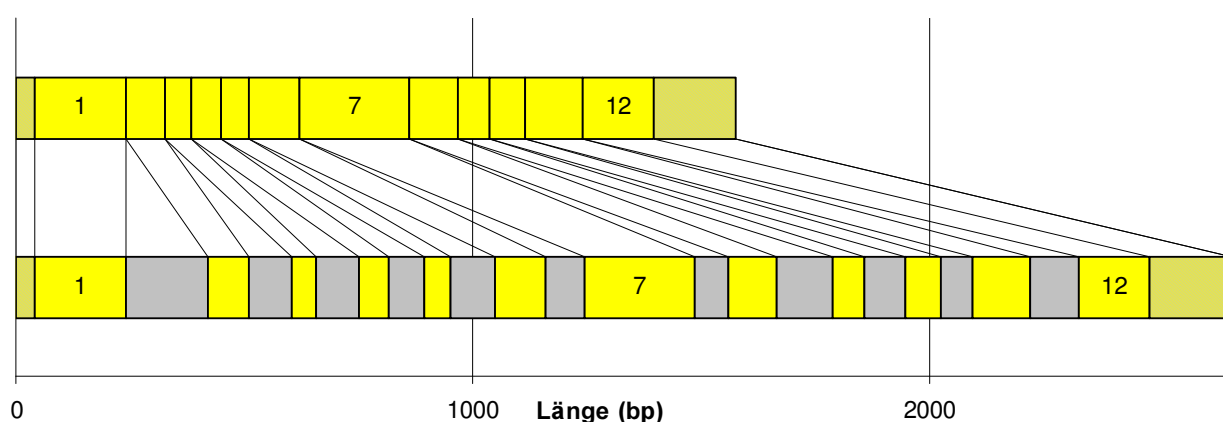


Abb. 10: **Exon-Intron-Struktur der PS Decarboxylase *atPSD3*.** Schematische Darstellung der cDNA (oben) und der genomischen DNA (unten) mit den Exons (Gelb), Introns (Grau) und den nichttranslatierten Bereichen vor dem Startcodon, bzw. hinter dem Stopcodon (Gelb-Grau schraffiert).

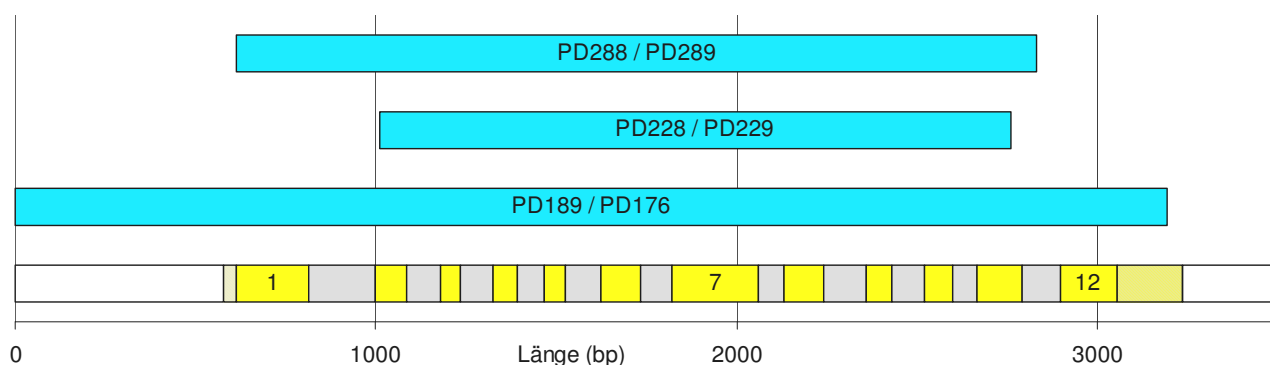


Abb. 11: **Lage verschiedener Oligonukleotide am *atPSD3*-Locus.** Schematische Darstellung der genomischen DNA mit den Exons (Gelb), Introns (Grau) und den nichttranslatierten Bereichen vor dem Startcodon, bzw. hinter dem Stopcodon (Gelb-Grau schraffiert), sowie die mit den verschiedenen Oligonukleotiden amplifizierbaren Sequenzbereiche (Blau).

4.3 Sequenzvergleiche der PS Decarboxylasen aus *Arabidopsis thaliana*

Die drei PSD-Gene aus *Arabidopsis thaliana* lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen. Die cDNA-Sequenzen von *atPSD1* und *atPSD2* sind zu 83,4 % identisch (Methode nach Pearson *et al.*, 1997; <http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi>) während zu *atPSD3* nur eine Identität von 55,5 % (*atPSD1*), bzw. 61,1 % (*atPSD2*) besteht. Die cDNA, bzw. die daraus abgeleitete Proteinsequenz fällt bei *atPSD3* deutlich kürzer aus, wohingegen *atPSD1* und *atPSD2* gleich lange cDNAs, bzw. Proteine ergeben. *atPSD3* besteht aus 453 Aminosäuren, während *atPSD1* 634 und *atPSD2* 635 Aminosäuren aufweisen.

In den Proteinsequenzen wird dieser Unterschied erneut deutlich. Für den Vergleich der PSDs von 12 verschiedenen Organismen auf Proteinebene (inklusive *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3*) wurden die Sequenzen auf gleiche Längen gekürzt. Als Maß diente die Sequenz von *Escherichia coli*, die eine der kürzesten PSDs darstellt. Die Kürzung wurde am N-Terminus vorgenommen, so daß der funktionell bedeutsame und weitgehend konservierte C-Terminus für den Vergleich herangezogen wurde. Das bei allen PSDs konservierte Motiv mit der Aminosäuresequenz GST stellt die Trennstelle dar, an der das Proenzym in die Untereinheiten geteilt wird. Die für den Sequenzvergleich erfolgte Kürzung erfolgte daher bei allen Sequenzen weit vor diesem Motiv, so daß der Sequenzbereich für die das katalytische Zentrum bildende α -Untereinheit vollständig erhalten blieb. Bei diesem Sequenzvergleich auf Proteinebene zeigen bis auf *atPSD3* alle pflanzlichen PSD-Sequenzen [*atPSD1*, *atPSD2* und die aus dem Moos *Physcomitrella patens* isolierte *ppPSD1* (Von Orlow, 2001)] eine Identität von mindestens 50 %.

atPSD3 zeigt nur beim Vergleich mit den PSDs aus *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens* und *Saccharomyces cerevisiae* (PSD1) eine Identität von über 20 %.

Percent Identity													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Divergence	1	54.3	53.0	13.0	33.7	14.7	13.7	16.0	14.0	27.0	21.0	17.1	1
	2	43.2	80.7	14.3	33.7	14.7	17.0	17.3	16.7	31.3	18.7	19.4	2
	3	47.5	16.0	14.7	33.0	15.7	17.0	17.7	17.3	31.0	18.7	20.5	3
	4	211.0	198.0	200.0	9.7	22.0	24.7	27.3	24.7	15.3	15.3	17.1	4
	5	109.6	89.9	91.5	231.0	15.3	16.3	15.3	15.7	24.3	20.3	18.3	5
	6	163.1	162.9	159.2	134.0	200.0	32.7	28.3	34.0	18.0	21.3	14.8	6
	7	188.3	172.4	180.2	119.1	189.0	90.3	36.0	93.7	20.3	23.7	22.4	7
	8	171.4	168.2	172.0	113.8	195.0	98.5	103.6	36.7	19.3	24.0	22.1	8
	9	177.4	172.4	180.2	114.3	193.1	87.8	6.6	101.1	20.0	22.7	22.4	9
	10	115.7	120.9	127.8	203.0	133.1	146.0	161.0	196.5	163.8	18.7	21.7	10
	11	164.5	153.3	151.7	164.1	165.4	132.3	141.6	152.9	145.8	158.9	21.7	11
	12	191.2	197.5	196.0	188.5	190.9	152.1	174.0	191.8	168.3	213.0	183.8	12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abb. 12: **Prozentuale Identität, bzw. Abweichung verschiedener PS Decarboxylasen.** Auf Basis der letzten 300 Aminosäuren des C-Terminus verschiedener PSD-Proteine ermittelte Identität; dabei bedeuten at = *Arabidopsis thaliana*, cl = *Cricetulus longicaudatus* (Chinesischer Hamster), hs = *Homo sapiens*, bs = *Bacillus subtilis*, ct = *Chlamydia trachomatis*, pp = *Physcomitrella patens*, ce = *Caenorhabditis elegans*, ec = *Escherichia coli*, sc = *Saccharomyces cerevisiae*

Das über alle PS Decarboxylasen konservierte GST-Motiv im C-Terminus, das die Schnittstelle für die Trennung der α - und β -Untereinheiten markiert, diente als Bezugspunkt für die Sequenzvergleiche und war ein wichtiges Bewertungskriterium, ob die

einzustellenden Parameter der Software korrekt gewählt wurden. Bei der Darstellung der Proteinsequenzen im Cladogramm (Methode nach Higgins *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) wird die Sonderstellung der atPSD3 als pflanzliche PSD noch einmal besonders deutlich. Die Sequenz wird in die unmittelbare Nähe der mitochondrial lokalisierten PSD1 (Clancey *et al.*, 1993) aus *Saccharomyces cerevisiae* eingereiht und weist damit größere Nähe zur PSD von *Caenorhabditis elegans* auf als zu der Gruppe der pflanzlichen PSDs. Die am Tonoplasten/Golgi lokalisierte PSD2 (Trotter und Voelker, 1995a) der Hefe wird dahingegen in die Nähe der anderen pflanzlichen PSDs angesiedelt.

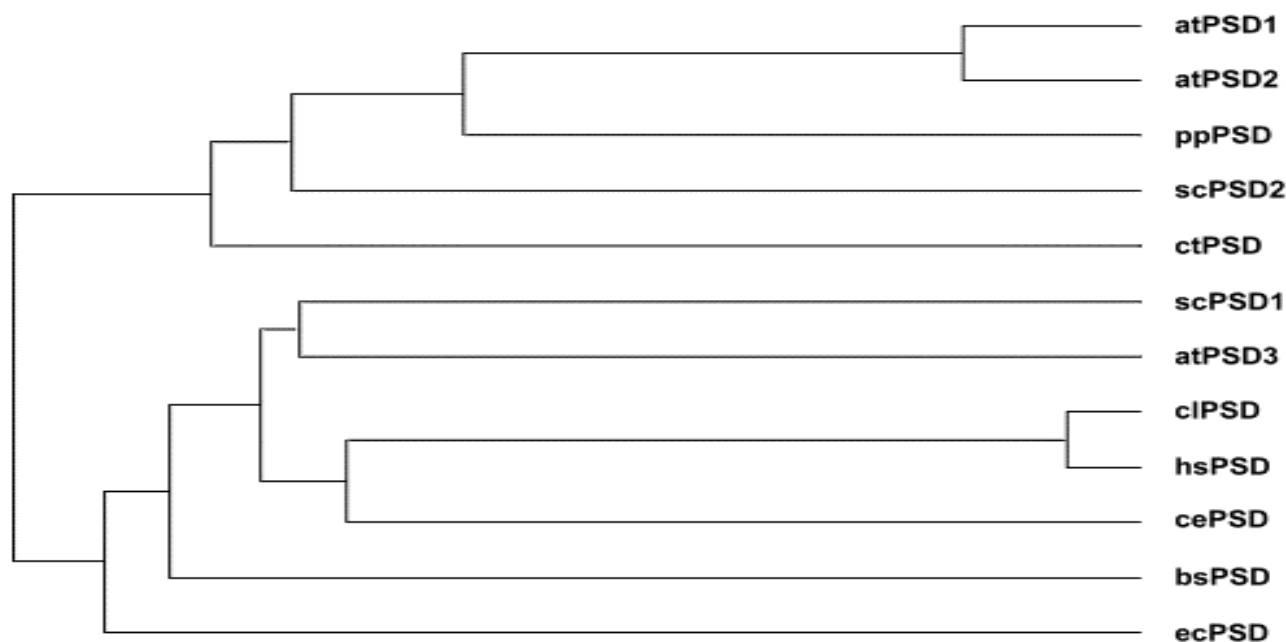


Abb. 13: **Cladogramm verschiedener PS Decarboxylasen.** Auf Basis der letzten 300 Aminosäuren des C-Terminus verschiedener PSD-Proteine erstelltes Cladogramm; dabei bedeuten at = *Arabidopsis thaliana*, cl = *Cricetulus longicaudatus* (Chinesischer Hamster), hs = *Homo sapiens*, bs = *Bacillus subtilis*, ct = *Chlamydia trachomatis*, pp = *Physcomitrella patens*, ce = *Caenorhabditis elegans*, ec = *Escherichia coli*, sc = *Saccharomyces cerevisiae*

Die meisten der bisher bekannten PSD-Proenzyme teilen sich in zwei Motiv-Gruppen auf: Die bisher bekannten pflanzlichen PSDs (bis auf atPSD3) und die PSD2 von Hefe weisen die Aminosäuresequenz GGST auf. Auch die PSD von *Clostridium pasteurianum*, einem anaerobem, stickstofffixierenden Bakterium, gehören dieser Gruppe an (Hackert und Pegg, 1998). Eine zweite Gruppe mit dem Motiv LGST wird unter anderem von bakteriellen PSDs und der PSD1 von Hefe gebildet. Auch die PSD von *Haemophilus influenzae*, einem Gram-negativen Bakterium aus der Familie der *Pasteurellaceae* ist dieser Gruppe zugehörig (Hackert und Pegg, 1998). Ausnahmen davon sind die PSD von *Bacillus subtilis* mit der Sequenz FGST und PSD3 aus *Arabidopsis thaliana* mit der Abfolge MGST (siehe Tabelle 9). Das MGST-Motiv findet sich auch in der Sequenz einer anderen pflanzlichen PSD aus Tomate, die erst kürzlich veröffentlicht wurde (siehe dazu 5).

Tabelle 9: **Motive an der Schnittstelle verschiedener PSD-Proenzyme**

Organismus	Motiv
<i>Bacillus subtilis</i>	GYFSFG- STVILVF
<i>Arabidopsis thaliana</i> PSD3	AVFNMG- STVVLIF
<i>Homo sapiens</i>	GEFNLG- STIVLIF
<i>Cricetulus longicaudatus</i>	GEFNLG- STIVLIF
<i>Caenorhabditis elegans</i>	GEFRLG- STIVLVF
<i>Haemophilus influenzae</i>	GWFQLG- STVINLF
<i>Escherichia coli</i>	GRFKLG- STVINLF
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PSD1	GGFELG- STVLCF
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PSD2	YFKFGG- STIIIP
<i>Clostridium pasteurianum</i>	YFKFGG- STIVLFL
<i>Physcomitrella patens</i>	YFSFGG- STVICV
<i>Arabidopsis thaliana</i> PSD1	YFSFGG- STVICV
<i>Arabidopsis thaliana</i> PSD2	YFSFGG- STVICV
<i>Chlamydia trachomatis</i>	FFAFGG- STVLL

Betrachtet man die Verteilung der weitgehend konservierten Bereiche innerhalb des 300 Aminosäure-langen C-Terminus, so ergibt sich für alle PSDs ein ähnliches Bild (Methode nach Higgins *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Das Verteilungsmuster von Bereichen mit einer Identität von über 50 % ist bei allen Sequenzen ähnlich. Zusätzlich gibt es neben dem GST-Motiv etwa 10 weitere, einzelne Aminosäurereste die offenbar streng konserviert sind. Diese konnten in allen Sequenzen an gleicher Stelle gefunden werden. Da sie alle im Bereich der β -Untereinheit liegen, kann man vermuten, daß sie eine bedeutende Rolle bei der Proteinfaltung und eventuell bei der Substraterkennung haben.

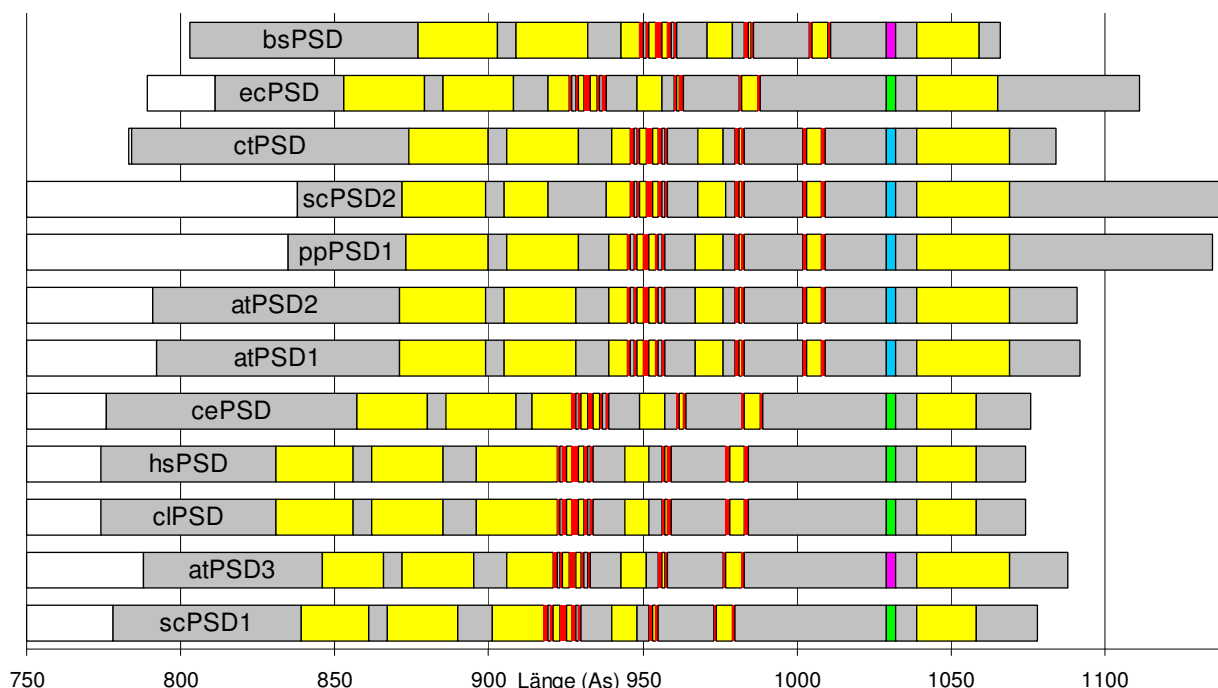


Abb. 14: **Identität im C-Terminus verschiedener PS Decarboxylasen.** Die homologen Bereiche (■) weisen über 50 % identische Aminosäuren auf. Einzelne Aminosäurereste sind in allen PSDs an gleicher Stelle zu finden (■). Das GST-Motiv liegt in den PSDs als LGST-Motiv (■), GGST-Motiv (■) oder aber bei *Bacillus subtilis* als FGST-, bzw. bei atPSD3 als MGST-Motiv (■) vor. Die nicht untersuchten N-Termini (□) wurden zur besseren Darstellung teilweise abgeschnitten. Die Bezeichnungen der PSDs entsprechen Abb. 13.

Die Gesamtlänge der bisher bekannten PSD-Proteine ist sehr variabel. Die längste bisher bekannte PSD wurde mit PSD2 aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Dahingegen ist die PSD1 aus Hefe eine der kürzesten eukaryontischen PS Decarboxylasen. Unter den pflanzlichen PSDs nimmt PSD3 aus *Arabidopsis thaliana* eine Sonderstellung ein, da sie deutlich kürzer als die anderen Pflanzen-PS Decarboxylasen ist.

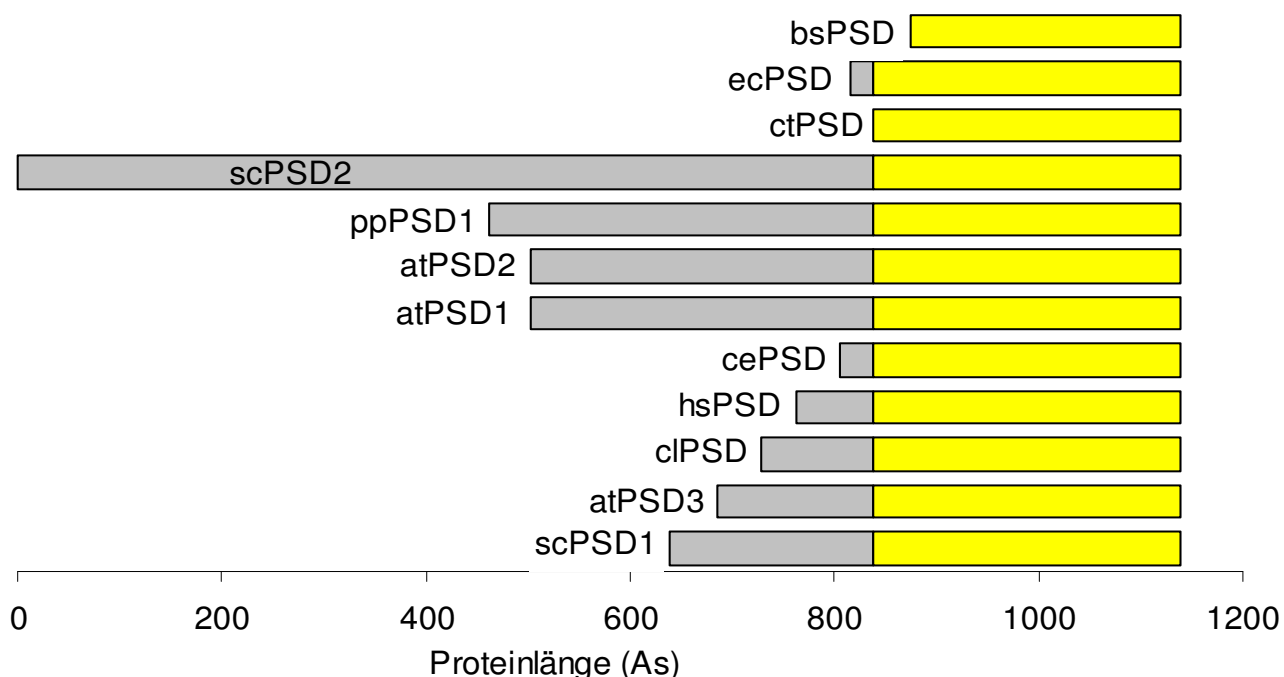


Abb. 15: **Gesamtlängen verschiedener PS Decarboxylase-Proteine.** Der gelb markierte Bereich kennzeichnet den bereits näher untersuchten C-terminalen Bereich (vergleiche Abb. 14). Die Bezeichnungen der PSDs entsprechen Abb. 13.

4.4 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Um die bisher nur anhand von Sequenzvergleichen zugeordnete Funktion der *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* als Phosphatidylserin Decarboxylase experimentell zu stützen, wurden Versuche zur Komplementation PSD-defizienter Mutanten unternommen. Die *Escherichia coli*-Linie EH150 zeigt eine temperaturabhängige PSD-Defizienz (Hawrot und Kennedy, 1975; 1976), die sich bei höheren Temperaturen in einem gegenüber dem Wildtyp verzögerten (bei 37° C), bzw. in einem fast vollständig eingestellten Wachstum (bei 42° C) äußert. Der in der Literatur beschriebene Wachstumsphänotyp von EH150, der bei höheren Temperaturen erkennbar schlechter als der Wildtyp wächst, konnte bei Verwendung von NBY-Medium oder 1:1 verdünntem LB-Medium bestätigt werden. Zur Komplementation wurde ein 996 bp langes, C-terminales Fragment der aus *Physcomitrella patens* isolierten PSD verwendet (*ppPSD1*, Klon 7c), das zu der PSD aus *Escherichia coli* ortholog ist (siehe Abb. 16). EH150 wurde nach der Transformation mit diesem Konstrukt unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Variation der Medien und der Temperatur) getestet. Es konnten jedoch keine Hinweise auf Komplementation ermittelt werden; der Wachstumsphänotyp blieb unverändert. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Phospholipide ließ keine Unterscheidung von EH150 und dem Wildtyp zu. Versuche, die Expression durch Zugabe von IPTG zu induzieren, hatten keine erkennbaren Auswirkungen auf den Wachstums- oder Lipidphänotyp. Ein weiterer Weg, die Funktion der Gene *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* zu untersuchen, wurde mit Versuchen zur Überexpression in *E. coli* unternommen. Für diese Versuche wurden Konstrukte mit N-terminal verkürzten Sequenzen der *atPSD1* und der *ppPSD1* aus

Physcomitrella patens verwendet. Die Expression erfolgte unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors in der *Escherichia coli* - Zelllinie M15pRep4. Über Proteingele aus Zellaufschlüssen sowie PSD-Enzymtests wurden die exprimierten Proteine überprüft und getestet.

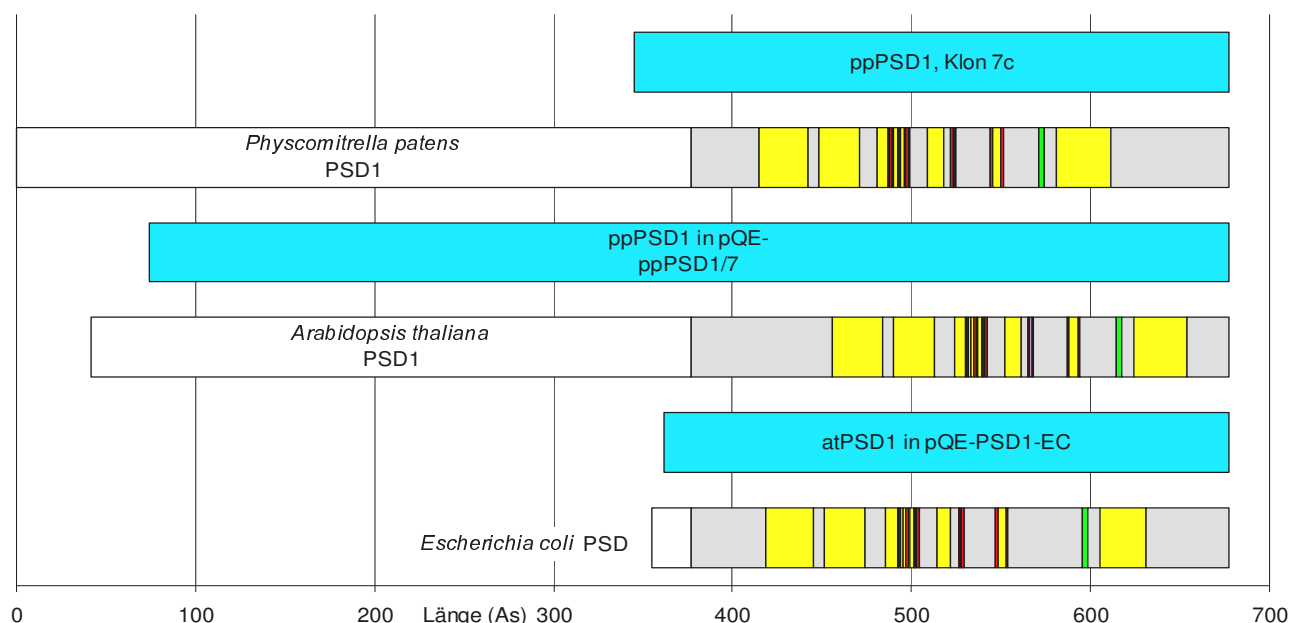


Abb. 16: **Schematische Darstellung der für die PSD-Proteinexpression verwendeten Sequenzbereiche.** Gezeigt sind die aus Abb. 14 übernommenen Gesamtproteinsequenzen der PSD von *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana* PSD1 und *Physcomitrella patens* PSD1. Die für die Proteinexpression benutzten Teilssequenzen (Blau) sind jeweils N-terminal verkürzt.

Die Expression eines N-terminal geringfügig verkürzten, 1803 bp langen Fragmentes der *ppPSD* aus *Physcomitrella patens* (Konstrukt pQE-*ppPSD1/7*) in M15pRep4-Zellen führte zur Akkumulation eines zusätzlichen Proteins mit einer Masse von rund 70 kDa. Dies entspricht der Masse des Histidin-markierten *ppPSD*-Proteins von 69040,3 Da.

Das akkumulierte Protein fand sich ausschließlich in der Pelletfraktion, was für ein membrangebundenes Protein zu erwarten ist. Für die Enzymtests wurde daher die im Anschluß an die Zellyse mittels Ultraschall erhaltene Pelletfraktion zusätzlich solubilisiert. Mit Detergenzien wurde die membrangebundene Enzymaktivität gelöst und durch erneute Zentrifugation von den unlöslichen Pelletbestandteilen abgetrennt. Mit dem Überstand der solubilisierten Pelletfraktion wurden die Enzymtests durchgeführt. Diese zeigten deutliche PSD-Aktivität. Da keine Unterschiede zwischen den PSD-Aktivitäten der beiden Linien (Kontrolle und pQE-*ppPSD1/7*) festgestellt werden konnten, ist die Aktivität offenbar hauptsächlich auf die endogene PSD von *E. coli* zurückzuführen. Um diese starke endogene PSD-Aktivität zu entfernen, wurde bei den folgenden Experimenten mit *atPSD1* versucht, eine Aufreinigung und Anreicherung der exprimierten PSD-Proteins mittels Nickel-Agarose-Chromatographie zu erreichen.

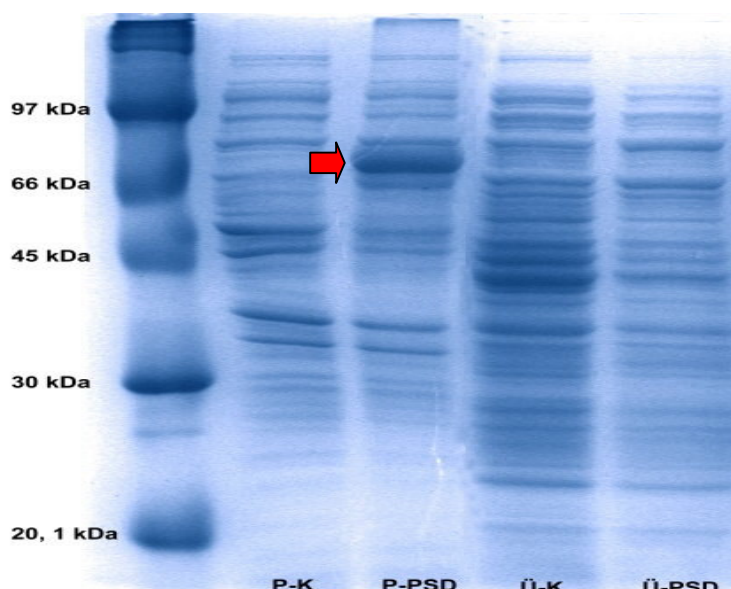


Abb. 17: **Überexpression der N-terminal verkürzten PSD aus *Physcomitrella patens* (ppPSD1/7).** Das stark gebildete Protein (Pfeil) ließ sich nach der Zellyse im Proteingel nur in der Pelletfraktion (P) der mit pQE-ppPSD1/7 transformierten Zellen (PSD) nachweisen. Im Überstand (Ü), sowie in den Fraktionen der Kontrolle (K) war diese Expression nicht sichtbar. Für den Enzymtest wurde dementsprechend die Pelletfraktion verwendet, deren membranständigen Proteine durch Triton X-100 solubilisiert wurden.

Zudem wurde hier der Proteinexpressionsvektor pQE-100 verwendet, der im Gegensatz zu pQE30 nicht nur für ein N-terminales, sondern auch für ein C-terminales Histidin-Oligopeptid kodiert. Dies sollte die Aufreinigung, bzw. den Nachweis des in die aktiven Untereinheiten geteilten PSD-Proenzym ermöglichen. Die Expression des 852 bp großen und zur *Escherichia coli* PSD orthologen, C-terminalen Bereiches von *PSD1* aus *Arabidopsis thaliana* (pQE-PSD1-EC, siehe Abb. 16) zeigte sich in der Akkumulation eines rund 35 kDa großen Proteins in der Pelletfraktion, was sich mit der Größe der Histidin-markierten PSD von 35028 deckt.

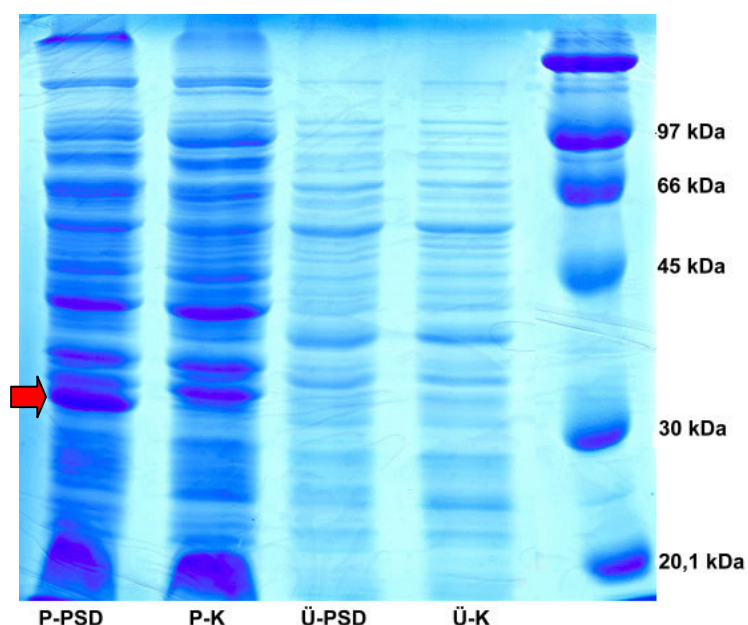


Abb. 18: **Überexpression der N-terminal verkürzten PSD1 aus *Arabidopsis thaliana* (PSD1-EC).** Die Pelletfraktion aus der mit pQE-PSD1-EC transformierten Linie (P-PSD) zeigte im Gegensatz zu der Kontrolle (P-K) ein zusätzliches, stark exprimiertes Protein (Pfeil). Im Überstand (Ü-PSD, Ü-K) war dieses nicht erkennbar.

Nach der Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Säulen wurden mit dem Überstand, der Pelletfraktion, sowie mit Eluat aus den Waschschritten und der Elution, PSD-Enzymtests durchgeführt. Alle Fraktionen zeigten die Fähigkeit, das markierte Substrat (PS) in PE umzusetzen, wobei jedoch keine Unterschiede zwischen Kontrolle und pQE-PSD1-EC ermittelt werden konnten. Durch fünfminütiges Erhitzen des Proteinextraktes auf 95° C konnte diese Aktivität vollständig zerstört werden, was als Hinweis zu werten ist, daß es sich hierbei tatsächlich um eine enzymatische Reaktion und nicht um ein chemisches Artefakt (Auto-Decarboxylierung) handelt.

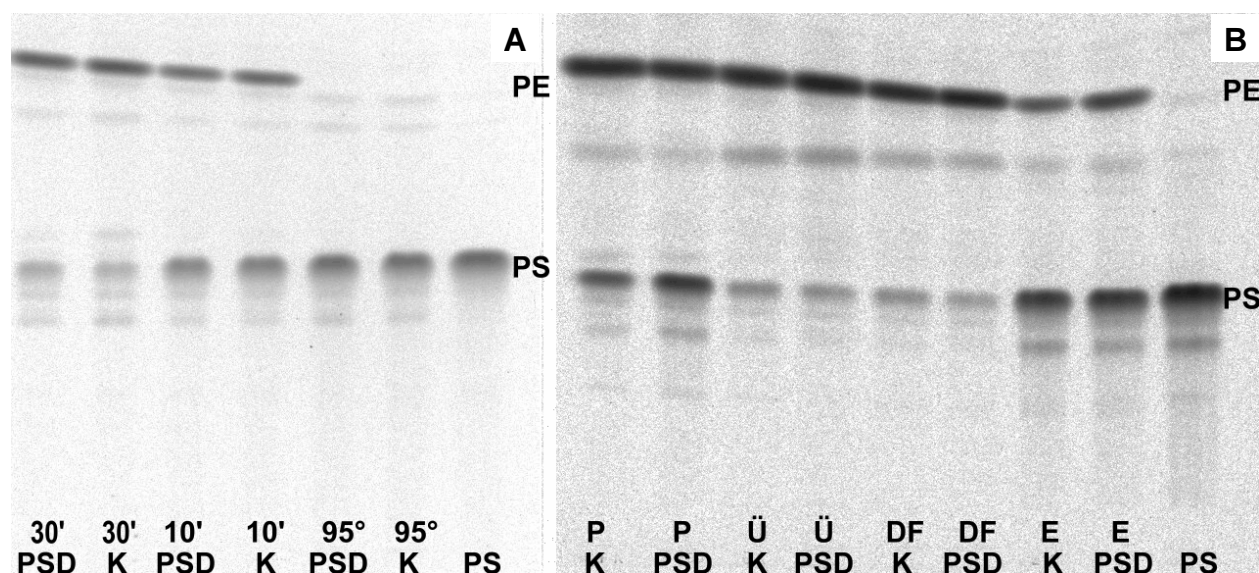


Abb. 19: **PSD-Enzymtests mit in *E. coli* überexprimierten atPSD1-Protein (Phosphor-Imager).** A: Enzymaktivität der pQE-PSD1-EC-Linie (PSD) und der Kontrolle (K) nach 30 Minuten, bzw. nach 10 Minuten Inkubation (10'). Durch Abkochen des Enzymextraktes vor der Zugabe zum Substrat wurde die PSD-Enzymaktivität beider Linien vollständig zerstört (95°). B: Enzymaktivität nach der Aufreinigung über Nickel-NTA-Säulen. Die Pelletfraktion und der Überstand der pQE-PSD1-EC-Linie (P-PSD, Ü-PSD) zeigten wie die der Kontrolle (P-K, Ü-K) noch Aktivität. Der Durchfluß (DF-PSD, DF-K), der nach dem Auftragen des Überstandes auf die Säule aufgefangen wurde, zeigte in etwa gleich große Aktivität. Im Eluat (E-K, E-PSD) konnte eine schwache Restaktivität ermittelt werden, die jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Linien zeigte.

Offenbar war es nicht möglich, die endogene *E. coli*-PSD-Aktivität ausreichend von dem überexprimierten atPSD1-Protein abzutrennen. Zur Überprüfung, ob sich bei dem über das Proteingel (siehe Abb. 18) nachgewiesenen Protein tatsächlich um das Histidin-markierte atPSD1-Protein handelt, wurde ein Western Blot mit anschließender Immunodetektion durchgeführt. Dazu wurde ein Anti-His-Antikörper verwendet, der spezifisch an den Histidin-Resten bindet. Diese Experimente bestätigten, daß das im Proteingel beobachtete, akkumulierte Protein Histidin-markiert ist, so daß dieses als Proenzym des C-terminalen Bereiches der atPSD1 bezeichnet werden kann. Es konnten keine weiteren Banden detektiert werden.

4.5 Heterologe Expression der PS Decarboxylase in Hefe

4.5.1 Dünnschichtchromatographische Untersuchung

Eine weitere Möglichkeit zur heterologen Expression bietet die Verwendung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diese weist als eukaryontisches Modell größere Ähnlichkeiten in der zellularen Organisation zur Pflanze auf als *Escherichia coli*. Damit könnten womöglich bestehende Probleme bei der Komplementation wie die korrekte Prozessierung

und Lokalisation der heterolog exprimierten *PSD*-cDNAs behoben werden. Zudem existieren bereits Mutanten für beide bekannten *scPSD*-Gene von *Saccharomyces cerevisiae*. Da eine Doppelmutante (in *scPSD1* und *scPSD2*) nicht zur Verfügung stand, wurde mit der *psd1*-Mutante der Hefe gearbeitet. Diese in der mitochondrial lokalisierten *scPSD1* betroffenen Mutante zeigt einen deutlichen Wachstums- und Lipidphänotyp. Die *psd2*-Mutante ist dagegen phänotypisch unauffällig und eignet sich daher nicht für die Komplementation.

Für diese Experimente wurden *atPSD1*, *atPSD3* (jeweils vollständig) und die N-terminal verkürzte *ppPSD1* (*ppPSD1/7*, siehe Abb. 16) in zwei verschiedenen Hefe-Vektoren (pYes2 und pDR196) verwendet. Die beiden verwendeten Hefeexpressionsvektoren unterscheiden sich hauptsächlich in der Steuerbarkeit der Expression und die Stärke des Promotors. pDR196 besitzt den konstitutiv exprimierenden PMA1-Promotor (Plasmamembran-ATPase Promotor), der eine weit stärkere Expression als pYes2 ermöglicht (Doris Rentsch, pers. Mitteilung). Die Expression von pYes2-Konstrukten wird dahingegen durch Glucose inhibiert und Galactose induziert. Um Wachstumseffekte durch die Verwendung von Galactose im Falle von pYes2-Konstrukten oder eventuell toxische Effekte des überexprimierten Proteins durch die konstitutive Expression von pDR196 auszuschließen, wurden beide Vektorsysteme getestet.

Tabelle 10: **Übersicht über die mit den verschiedenen Proteinexpressionskonstrukten in der *psd1*-Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführten Tests.** Die Transformanten wurden auf Veränderungen des Lipidphänotyps mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und auf Komplementation des Wachstumsphänotyps bei erhöhter Temperatur oder auf Milchsäuremedien getestet.

Nr.	Konstrukte			DC	Test	
	cDNA	Plasmid	Bezeichnung		Wachstumskurve bei 37 °C	Wachstumstest auf Milchsäuremedien
1	<i>atPSD3</i>	pYes2	pYes2-PSD3	nein	ja	ja
2	<i>atPSD3</i>	pDR196	pDR196-PSD3	nein	ja	ja
3	<i>atPSD1</i>	pDR196	pDR196-PSD1	nein	ja	ja
4	<i>atPSD1</i>	pYes2	pYes2-PSD1	ja	ja	ja
5	<i>ppPSD</i>	pYes2	pYes2-ppPSD1/7	ja	ja	ja

Die *psd1*-Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* zeigte nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Phospholipide im Vergleich zum Wildtyp einen reproduzierbaren Lipidphänotyp in Form eines erhöhten Gehaltes an Phosphatidylserin. Es wurde versucht, diesen Phänotyp durch Transformation mit verschiedenen PSD-Expressionskonstrukten (pYes2-PSD1 und pYes2-ppPSD1/7) zu komplementieren. Die Transformation mit PSD-Konstrukten führte bei dünnschichtchromatographischer Analyse zu keiner Veränderung des *psd1*-Phänotyps. Eine Komplementation war nicht festzustellen (siehe Abb. 20).

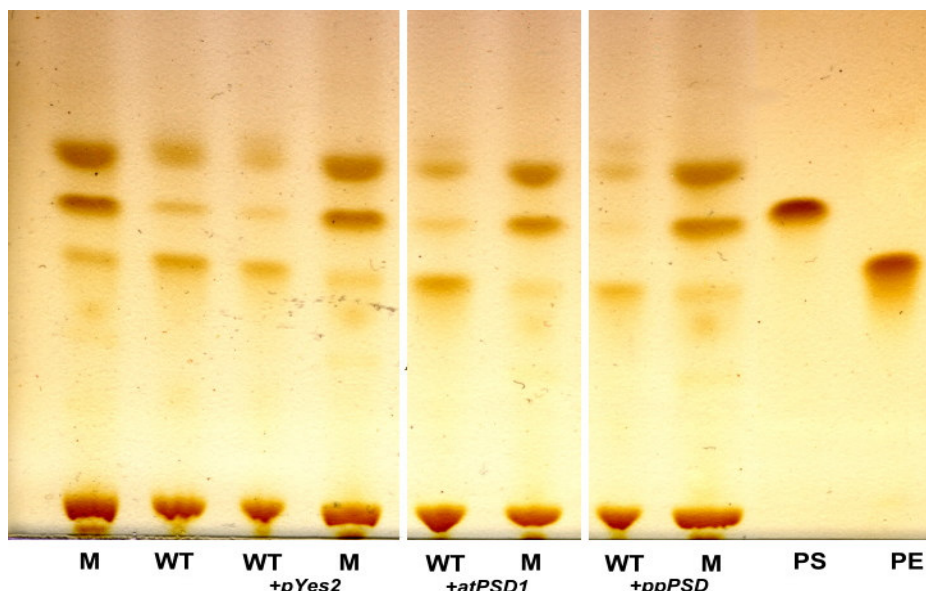


Abb. 20: **Versuch zur Komplementation der *psd1*-Mutante von *Saccharomyces cerevisiae*.** Jodgefärbte Phospholipide der *psd1*-Mutante (M) und des Wildtyps (WT), die mit leerem Vektor (+pYes2), bzw. pYes2-PSD1 (+*atPSD1*) und pYes2-ppPSD1/7 (+*ppPSD*) transformiert wurden. Als Standards wurden Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) aufgetragen. Neben den anhand der Standards identifizierten Lipiden PS und PE sind weitere, nicht identifizierte Lipide erkennbar.

4.5.2 Wachstumstests bei erhöhter Temperatur und auf Milchsäuremedien

Die *psd1*-defiziente Linie der Hefe zeigte bei Wachstum unter erhöhter Temperatur in ethanolamin- und cholin-freiem Medium einen deutlichen Phänotyp in Form stark reduzierten Wachstums (Storey *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse konnten sowohl in glucose- als auch galaktosehaltigen Selektionsmedien reproduziert werden. Es wurde mit Transformation verschiedener PSD-Expressionskonstrukte überprüft, ob eine Komplementation möglich ist (siehe Abb. 21). Eine Veränderung, bzw. Komplementation dieses Phänotyps durch die Transformation der PSD-Konstrukte konnte nicht registriert werden. Die Transformanten zeigten wie die *psd1*-Mutante durchgehend schlechtes Wachstum unter den gewählten Temperaturbedingungen und Medienbedingungen. Das Wachstum in glucosehaltigem Selektionsmedium sowie mit pDR196-PSD3 (Daten nicht gezeigt) ergab ein ähnliches Ergebnis.

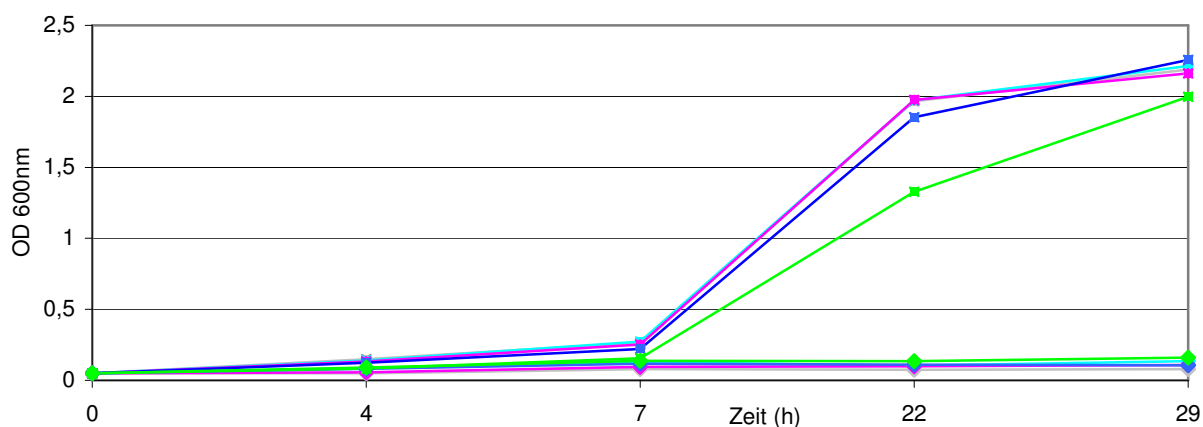


Abb. 21: **Wachstumskurven des Wildtyps und der *psd1*-Mutante von *S. cerevisiae* bei 37°C.** Photometrisch bestimmte Zelldichte der *psd1*-Hefemutante (PSD, ♦) und des Wildtyps (WT, ■) beim Wachstum bei 37°C in Galaktose-Selektionsmedium nach Transformation mit den Konstrukten pYes2-PSD3 (■), pDR196-PSD1 (■), pYes2-PSD1 (■) und den Kontrollen pYes2 (■) und pDR196 (■).

Ein weiteres Kennzeichen der *psd1*-Hefemutante ist ihr ausbleibendes Wachstum, wenn Milchsäure als einzige Kohlenstoffquelle im Medium angeboten wird (Storey *et al.*, 2001). Die eigenen Experimente bestätigten, daß das Wachstum der *psd*-Mutante auf diesem Medium wesentlich schlechter war als das des Wildtyps. Die Versuche, diesen Phänotyp durch die Transformation mit verschiedenen PSD-Konstrukten zu beeinflussen oder zu komplementieren, waren nicht erfolgreich. Die deutlich sichtbare Wachstumsdefizienz auf milchsäurehaltigen Medienplatten blieb in den transformierten *psd1*-Linien unverändert erhalten.

4.6 Expression von PSD-GFP in *Arabidopsis thaliana*

Um die Frage zu klären, in welchem Zellkompartiment die Proteine von *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* lokalisiert sind, wurden diese cDNAs in den GFP-Vektor pEZR(K)-LN (deBoer, unveröffentlicht) eingebaut. Durch Partikelbeschuss wurden die GFP-Fusionskonstrukte für *atPSD1* (pEZR-P1), *atPSD2* (pEZR-P2) und *atPSD3* (pEZR-P3) in Blattepidermiszellen von *Arabidopsis thaliana* eingeschleust. Das unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors stehende Gen wird dort als Fusionsprotein mit dem „Grün fluoreszierenden Protein“ exprimiert. Das GFP kann mittels Laserlicht gezielt angeregt und zur Fluoreszenz gebracht werden. Diese Fluoreszenz kann mittels konfokaler Mikroskopie detektiert und fotografisch dokumentiert werden.

Als Positivkontrollen dienten pA7-KCO1 für den Tonoplasten (Czempinski *et al.*, 2002), pA7 für Cytosol/Nucleus (Hong *et al.*, 1999), KDEL-GFP für das endoplasmatische Retikulum (Scott *et al.*, 1999) und pre-101 für die Mitochondrien (AG Müller-Röber, MPI, Golm). Eine ungerichtete Fluoreszenz durch die Expression von GFP ohne das PSD-Protein kann weitgehend ausgeschlossen werden, da das GFP-Protein des verwendeten Vektors pEZR(K)-LN nur sehr schwach exprimiert wird, wenn der Vektor keine zusätzlichen Sequenzen enthält (deBoer, persönliche Mitteilung). Durchgeführte Kontrollen mit leerem Vektor bestätigten dies.

Die beobachtete Fluoreszenz der Konstrukte war trotz Verwendung des gleichen GFP-Vektors sehr verschieden. *atPSD1*-GFP zeigte bereits nach 16 Stunden eine sehr starke und deutliche Fluoreszenz, die noch 72 Stunden nach der Transformation deutlich sichtbar war. *atPSD2*-GFP zeigte eine weit schwächere Fluoreszenz, deren Detektion nur unter Erhöhung der Laserenergie möglich war. Die notwendigen Änderungen an Blendendurchmesser, Rauschunterdrückung und Signalverstärkung führten zu systemimmanenten, qualitativen Einbußen an Bildschärfe und Kontrast. Es kam zu schwachen Hintergrundsignalen durch die Fluoreszenz der Chloroplasten der tieferliegenden Blattschichten. Die Detektion war nach 16 bis 48 Stunden möglich. *atPSD3*-GFP zeigte insgesamt die schwächste Fluoreszenz. Die Detektion war nur mit stark erhöhter Laserleistung und nur in einer kurzen Zeitspanne (bis 24 Stunden nach der Transformation) möglich. Die verwendeten Positivkontrollen zeigten alle relativ starke und deutliche Fluoreszenz nach 12 bis 24 Stunden. Innerhalb einer Probe konnten zahlreiche Zellen mit zum Teil unterschiedlich starker Fluoreszenz beobachtet und dokumentiert werden.

atPSD1-GFP zeigte eine Lokalisierung im Zellkern und im Randbereich der Zelle (vergleiche Abb. 22a, Bilder A1, A2). Die beobachtete Konzentration an netzartigen Zellstrukturen legt die Lokalisierung am endoplasmatischen Retikulum nahe (vergleiche Kontrolle, Abb. 22b, Bild E). Eine zusätzliche Lokalisation an der Vakuole ist möglich (vergleiche Kontrolle, Abb. 22b, Bild G).

atPSD2-GFP zeigte eine Konzentration im Nucleus (vergleiche Abb. 22a, Bilder B1, B2). Die distinkten Strukturen, wie sie bei *atPSD1*-GP auffallen, fehlen. Jedoch ist die Intensität am Randbereich erhöht und zeigt damit Ähnlichkeit zu der Tonoplasten-Positivkontrolle (vergleiche Kontrolle, Abb. 22b, Bild G). Diese, am Tonoplasten orientierte Lokalisation, ist

angesichts des Umstandes, daß es sich bei allen bisher bekannten PSDs um Membranproteine handelt, nicht unwahrscheinlich.

atPSD3-GFP zeigt eine globuläre Anordnung bei der die Fluoreszenz auf partikuläre Zellorganellen verteilt ist (vergleiche Abb. 22b, Bilder C1, C2). Die Partikel wurden im zellularen Cytoplasmastrom bewegt. Diese Bilder ähneln denen von schwach fluoreszierenden Mitochondrien-lokalisierten Positivkontrollen, so daß hier eine mitochondriale Lokalisation (vergleiche Kontrolle, Abb. 22b, Bild D) vermutet werden kann. Eine Lokalisation am Tonoplasten kann weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Verwechslung mit anderen feinpartikulären Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat konnte anhand von GFP-Fusionsprotein-Aufnahmen von Hawes *et al.*, Oxford Brookes University (<http://www.brookes.ac.uk/schools/bms/research/molcell/hawes/gfp1.htm>) weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Proteinsequenzen der atPSD1, atPSD2 und atPSD3 wurden zusätzlich mittels TargetP 1.0 (Methode nach Emanuelsson, 2000, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) auf mögliche Signalpeptide untersucht. Das Programm prüft die Proteinsequenzen auf Chloroplastentransitpeptide, Mitochondrien-Signalpeptide oder Signalpeptide für den sekretorischen Stoffwechselweg. Für atPSD1 und atPSD2 wurden keine der drei überprüften Signalpeptide identifiziert. Dahingegen wurde für atPSD3 eine Lokalisierung in den Mitochondrien prognostiziert. Der RC-Wert („Reliability Class“) dieser Interpretation wurde für alle drei Sequenzen mit dem Wert 1 angegeben. Der RC-Wert wird über den Ergebnisabstand zwischen den für die einzelnen möglichen Signalpeptiden ermittelten Werten errechnet und ist damit ein Maß für die Verlässlichkeit der Prognose. Der RC-Wert wird auf einer Skala von 1 bis 5 angegeben, wobei 1 die höchste Zuverlässigkeit darstellt. Damit wird die beobachtete Lokalisierung von atPSD3 zusätzlich unterstützt.

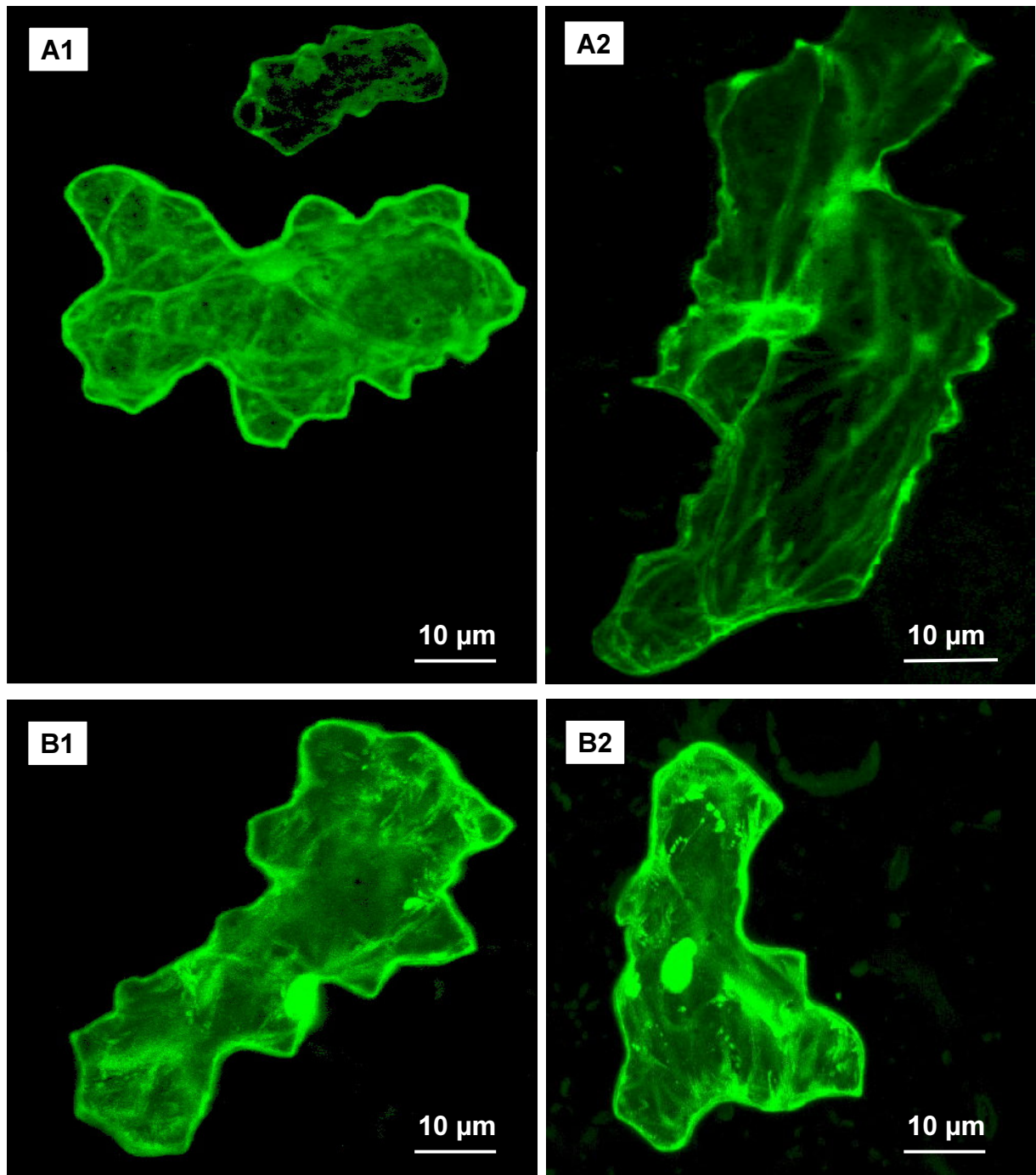


Abb.22a: Lokalisation von PSD-GFP in Blattepidermiszellen von *Arabidopsis thaliana*. Legende siehe nächste Seite.

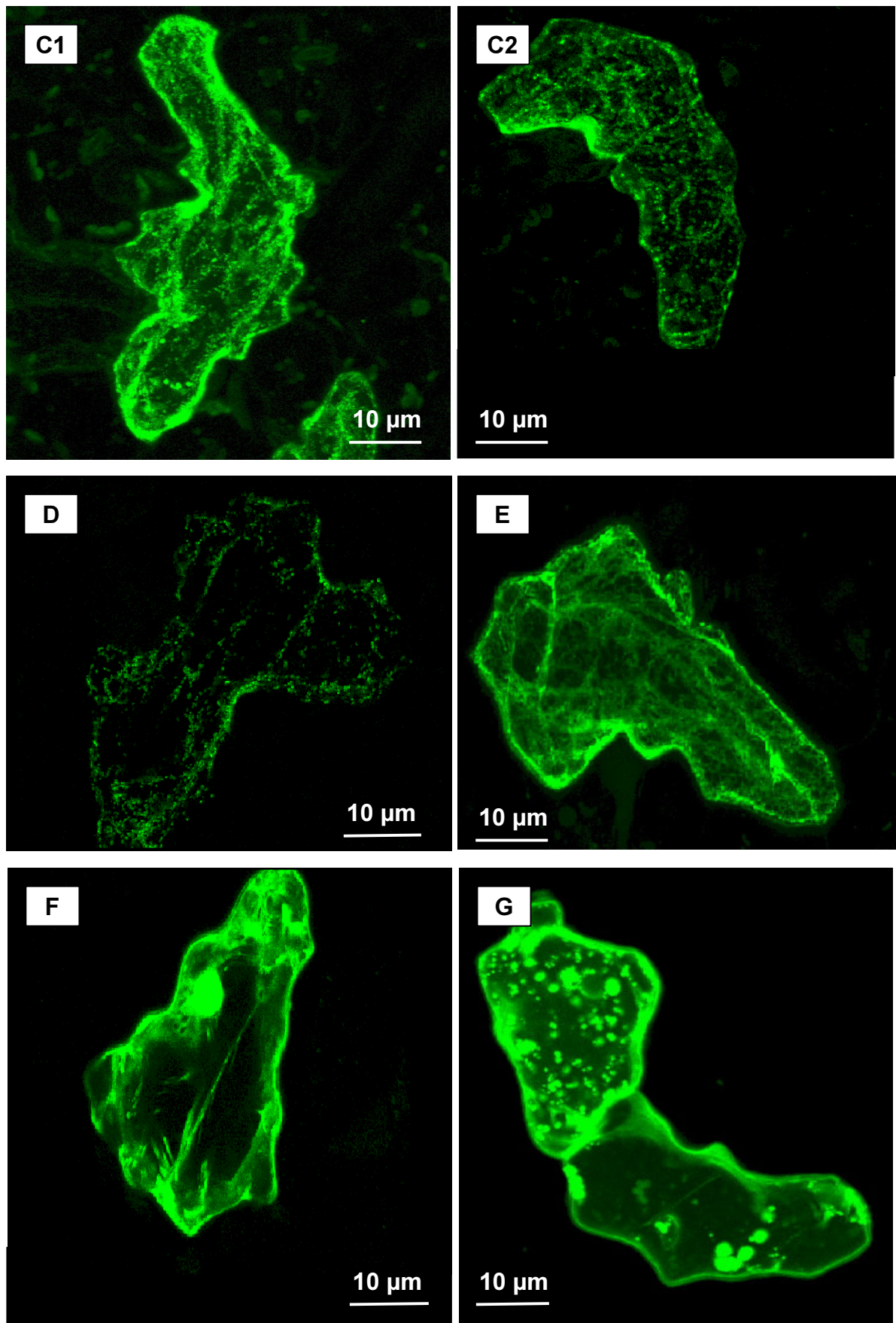


Abb. 22b: **Lokalisation von PSD-GFP in Blattepidermiszellen von *Arabidopsis thaliana*.** Anhand von Aufnahmeserien errechnete dreidimensionale Abbildungen von Blattepidermiszellen von *Arabidopsis thaliana* bei Expression von atPSD1-GFP (A1, A2), atPSD2-GFP (B1, B2), atPSD3-GFP (C1, C2), mitochondrial lokalisiertem pre-101-GFP (D), am endoplasmatischen Retikulum lokalisiertem KDEL-GFP (E), cytosolisch und am Nucleus lokalisiertem pA7-GFP (F) und am Tonoplasten lokalisiertes KCO1-GFP (G).

4.7 Isolation von T-DNA-Insertionsmutanten für die Gene der PS Decarboxylase

Für die Untersuchung der PE-Synthese über den Stoffwechselweg der Decarboxylierung von PS mittels Phosphatidylserin Decarboxylasen sind in diesem Stoffwechselweg betroffene Mutanten besonders geeignet. Eine Möglichkeit, derartige Mutanten in *Arabidopsis thaliana* zu erhalten, ist durch die Erzeugung einer T-DNA-Insertionsmutantenpopulation. Dabei werden mittels Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA-Fragmente in die Pflanzen eingeschleust und in das Genom integriert. Durch das auf der T-DNA liegende Kanamycin-Resistenzgen ist die Selektion der Transformanten möglich. Da die Integration der T-DNA ein im Wesentlichen zufälliger Prozeß ist, müssen Mutanten mit Insertion in den untersuchten Genen gezielt gesucht und isoliert werden. Die *Arabidopsis* Knockout Facility der Universität von Wisconsin, Madison, USA, bietet eine Population mit über 60000 transformierten Einzellinien an die in Gruppen und Untergruppen (sog. „Pools“) zusammengefaßt sind. Die Durchmusterung der Population erfolgte mittels PCR, die durch die *Arabidopsis* Knockout Facility selbst durchgeführt und anschließend zurückgesandt wird. Die Analyse der übersandten PCR-Proben mittels Southern Blot und Hybridisierung mit genspezifischen Sonden lieferte für *atPSD1* und *atPSD2* neben den Positivkontrollen einige Banden unterschiedlicher Länge. Die meisten dieser Ansätze konnten bereits anhand ihrer zu großen Länge als ungeeignet identifiziert werden, da bei diesen die T-DNA-Insertion vermutlich außerhalb des gesuchten PSD-Genes lag. Für *atPSD3* konnten keine Ansätze gefunden werden, die auf das mögliche Vorliegen einer T-DNA-Insertion in diesem Gen hinwies. Die verbleibenden Ansätze für *atPSD1* und *atPSD2* wurden einer erneuten PCR unterzogen um das gesuchte Fragment weiter zu amplifizieren. Die anhand ihrer Länge in Frage kommenden Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert (Sequenzdaten vergleiche Abb. 26 und Abb. 27). Durch Sequenzvergleich konnten die Pools identifiziert werden, in denen eine T-DNA-Insertion in *atPSD1* bzw. *atPSD2* vorlag. Aus diesen wurden die Ansätze ausgesucht, bei denen das Ausschalten des Genes durch Insertionen im Exon oder Intron anzunehmen war.

Für *atPSD1* konnte mit PD89 nur eine Insertion im Intron zwischen Exon 3 und 4 (Pool #20) identifiziert werden (siehe Abb. 23, Bild A). Aufgrund der sehr großen T-DNA (ca. 5900 bp) war jedoch die Unterbrechung des Leserasters als gesichert anzunehmen.

Für *atPSD2* konnte mit PD90 eine Insertion im Exon 10 im Pool #11 gefunden werden, so daß die Unterbrechung des Leserasters gegeben war (siehe Abb. 23, Bild B).

Die *Arabidopsis* Knockout Facility führte für die entsprechenden DNA-Pools eine weitere PCR mit PD89/ PD35, bzw. PD90/ PD35 durch. Die Reaktionen wurden mittels Gelelektrophorese und Southern Blot mit anschließender Hybridisierung mit genspezifischen Sonden analysiert. Da mehrere PCR-Produkte auftraten, wurde eine erneute PCR durchgeführt und diese Produkte ebenfalls über Southern Blot analysiert. In beiden Experimenten wurden eindeutig die selben Samenpools (#176 für *atPSD1* und #90 für *atPSD2*) identifiziert. Diese Samenpools wurden über ABRC bezogen. Um aus den 25 Unterpools pro Samenpool den korrekten Unterpool zu finden, wurde ein Teil der Samen für 8 Tage in sterilem Wasser zum Keimen gebracht und anschließend genomische DNA präpariert. Durch die damit durchgeführte PCR mit anschließendem Southern Blot wurden die Samenpools CSJ2259 für die *psd2*-Mutante und CSJ4362 für die *psd1*-Mutante identifiziert.

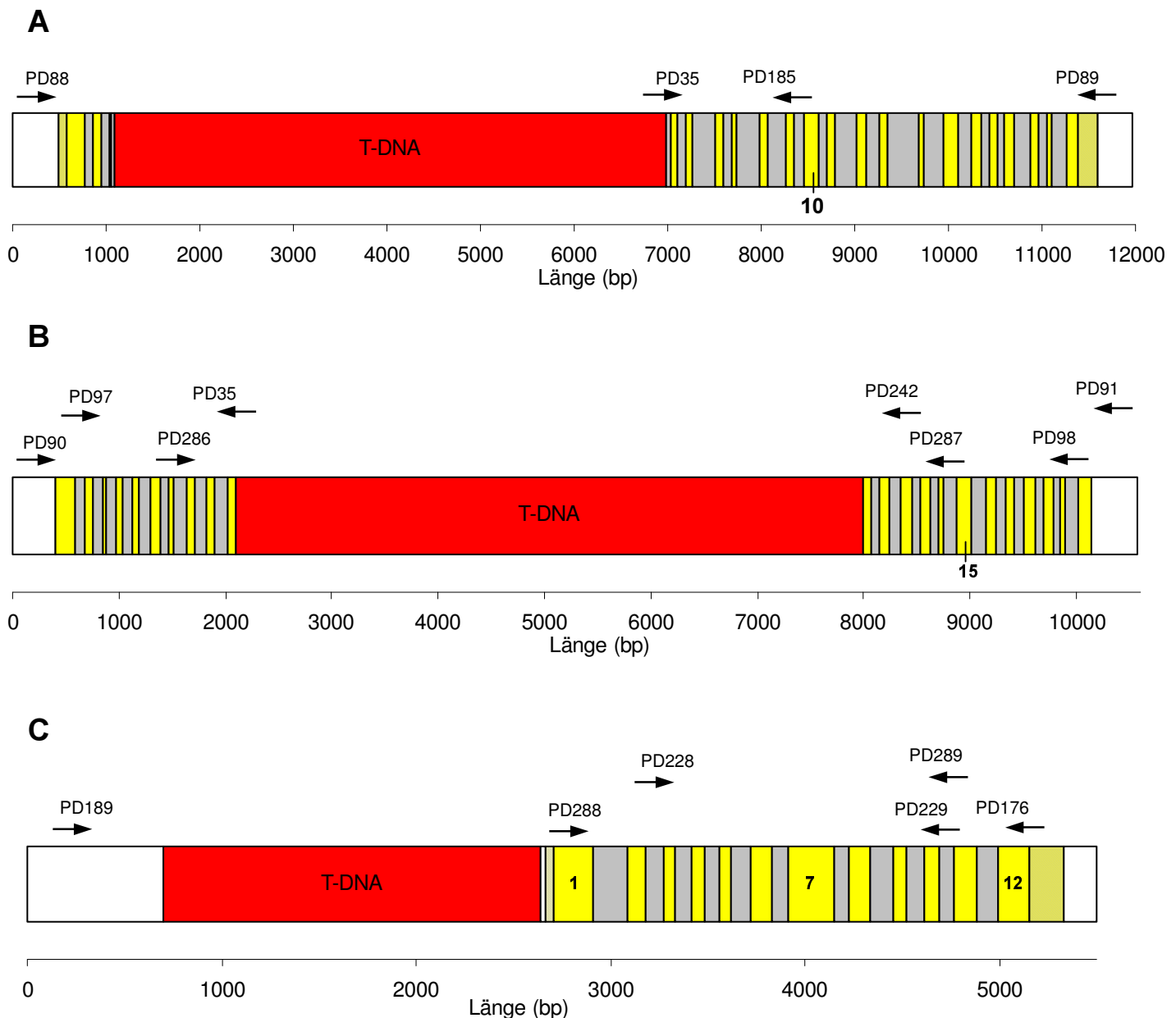


Abb. 23: Lage der T-DNA-Insertion bei den *Arabidopsis thaliana*-Mutanten *psd1*, *psd2* (*Arabidopsis Knockout Facility*) und *psd3* (*Torrey Mesa Research Institute*). Gezeigt ist die Lage der Exons (■), Introns (■) und der T-DNA-Insertion (■) innerhalb der genomischen DNA () von *psd1* (A), *psd2* (B) und *psd3* (C). Die Lage der verwendeten Oligonukleotide ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die nicht-translatierten Bereiche wurden – soweit bekannt – gelb schraffiert dargestellt. Zur besseren Orientierung sind einige Exons nummeriert.

Die restlichen Samen dieser Pools wurden angezogen und die Einzelpflanzen über PCR durchmustert. Die T-DNA-Mutanten wurden über eine zweite PCR mit PD88/ PD185 (*atPSD1*) und PD90/ PD242 (*atPSD2*) auf Homozygotie überprüft. Für die Identifikation einer homozygoten und vier heterozygoter *psd1*-Mutanten wurden 65 Pflanzen durchmustert. Die Isolierung einer homozygoten und drei heterozygoter *psd2*-Mutanten erforderte die Durchmusterung von 168 Pflanzen.

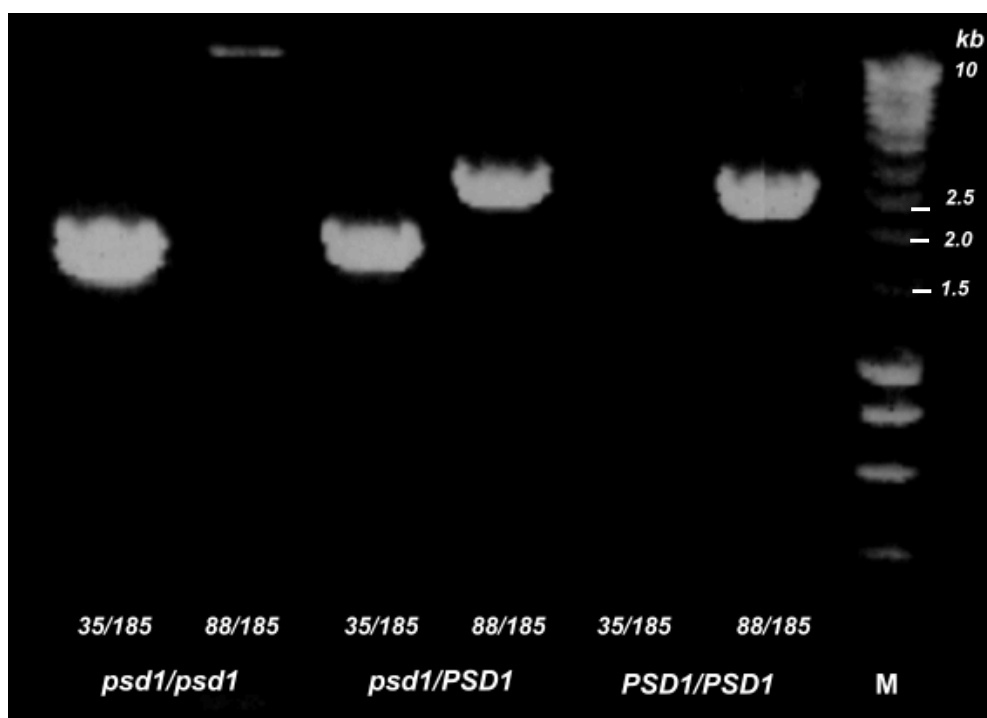


Abb. 24: **PCR-Produkte einer homo- und heterozygoten *psd1*-Mutante und des Wildtyps von *Arabidopsis thaliana*.** Die PCR wurde mit PD35 (T-DNA) und PD88 (WT) sowie mit den Wildtyp-*PSD1*-Oligonukleotiden PD185 und PD88 mit genomischer DNA der homozygoten *psd1*-Mutante (*psd1/psd1*), einer heterozygoten *psd1*-Mutante (*psd1/PSD1*) und eines Wildtyps (*PSD1/PSD1*) durchgeführt. Die dünne, über 10 kb-große Bande beim Ansatz mit PD88/PD185 auf *psd1/psd1* wurde häufig bei dieser PCR erhalten und ist vermutlich das über die gesamte T-DNA amplifizierte Produkt (vergleiche Abb. 23, Bild A). Für die Ergebnisse der PCR für den *PSD2*-Locus vergleiche Abb. 29.

Die homozygoten *psd1*- und *psd2*-Mutanten waren bei visueller Betrachtung nicht vom *Arabidopsis*-Wildtyp zu unterscheiden. Die weitergehende physiologische Charakterisierung erfolgte zusammen mit der *psd1/psd2*-Doppelmutante (siehe ab Kapitel 4.11). Die isolierten Einzelmутanten wurden einer Segregationsanalyse unterzogen, um Hinweise auf weitere T-DNA-Insertionen außerhalb der *PSD*-Gene zu erhalten. Die ermittelte Keimungsrate der Samen auf antibiotikafreiem Medium betrug bei beiden Linien 96 %. Unter Anwesenheit von Kanamycin keimten im Schnitt $76 \pm 3,5$ % der *psd1*-Samen ($n = 3$). Bei *psd2* lag die Keimung bei $70 \pm 12,2$ % ($n = 3$). Die nach dem 2. Mendel'schen Gesetz zu erwartende Aufspaltung (Segregation) läßt eine Keimungsrate von 75 % erwarten. Die erhaltenen Werte geben daher keinen Hinweis auf weitere T-DNA-Insertionen außerhalb der *PSD*-Loci bei *psd1* und *psd2*.

4.8 *psd3*-Mutante

Da in der Population der *Arabidopsis* Knockout Facility kein positiver DNA-Pool für *PSD3* identifiziert werden konnte, wurde überprüft, ob diese Linie als bereits isolierte T-DNA-Insertionsmutante in der T-DNA-Insertionsmutantenpopulation von Syngenta (Torrey Mesa Research Institute, San Diego, USA) erhältlich ist. In diesem Projekt wurden rund 115000 T-DNA-Insertionsmutantenlinien von *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia, erzeugt und isoliert. Von jeder Mutante wurde der rund 300 bp umfassende Sequenzbereich am T-DNA-Übergang ermittelt und in einer Datenbank erfaßt. Über die Webseite des Torrey Mesa Research Institute (http://www.nadii.com/pages/collaborations/garlic_files/GarlicDescription.html) wurde ein rund 4000 bp umfassender, genomischer Sequenzbereich um das *atPSD3*-Gen (Identifizierung siehe 4.2) zum Abgleich mit den

Sequenzdaten der Datenbank eingereicht. Die Ergebnisse des mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführten Abgleiches lieferten 5 Linien mit hoher Identität (zwischen 85 bis 100 %), bei denen die T-DNA-Insertion offenbar im Bereich des *atPSD3*-Genes erfolgte. Von diesen wurde die Linie mit der Bezeichnung „Garlic_86_G10“ ausgewählt, deren Insertion im Promotorbereich der *atPSD3* liegt (vergleiche Abb. 23, Bild C). Die Insertion befindet sich nur 68 bp vor dem Startcodon der *atPSD3*, so daß die Störung der Genfunktion angenommen werden konnte. Linien mit Insertionen in Exons oder Introns der *atPSD3* konnten nicht gefunden werden.

```
atPSD3gen      TCAAACAGTCAACAAACAACCCTAAAACCCCAGAGCAAAAGCGGTGTCACTGCCACCGGA
Garlic_86_G10  TCAAACAGTCAACAAACAACCCTAAAACCCCAGAGCAAAAGCGGTGTCACTGCCACCGGA

atPSD3gen      AAAACGCCATGAAACCTCGTTTTCTCATAAATGTCTATTTTTTGGCTCGCTATTCAT
Garlic_86_G10  AAAACGCCATGAAACCTCGTTTTCTCATAAATGTCTATTTTTTGGCTCGCTATTCAT
```

Abb. 25: Sequenzvergleich des T-DNA-angrenzenden Bereiches der Linie Garlic_86_G10 und des genomischen Bereiches vor der *atPSD3*. Das Startcodon der *atPSD3* ist in der genomischen Sequenz rot markiert. Die Identität beträgt 100 %.

Diese Linie wurde über die Firma Syngenta bezogen und parallel zu den anderen Mutanten angezogen und physiologisch charakterisiert. Als Wildtyp wurde *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 angezogen und untersucht. Wie die *psd1*- und *psd2*-T-DNA-Insertionsmutanten ist diese *psd3*-Mutante bei visueller Betrachtung unauffällig und nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

4.9 Molekulare Charakterisierung der *psd1*- und *psd2*-Mutanten

Um die Lage der T-DNA-Insertion zu überprüfen und sicherzustellen, daß es sich bei denen mit den Oligonukleotiden PD185/PD35 (*psd1*) und PD90/PD35 (*psd2*) tatsächlich um die gesuchten Produkte handelt, wurden diese PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzen wurden sowohl mit den PSD-Sequenzen als auch mit der Sequenz der T-DNA (http://www.biotech.wisc.edu/NewServicesAndResearch/Arabidopsis/pD991-AP3_finalseq.html) verglichen. Die Sequenzdaten belegten die Insertion durch die T-DNA sowohl bei *psd1* und *psd2*. Die Sequenz der *psd1* geht direkt von der T-DNA in die von *atPSD1* über; das Leseraster der *atPSD1*-Sequenz ist unterbrochen.

<i>psd1</i>	ACNNATAAANC	TTCTCNATTGAAAAACCATTGGTAATTACTCTTTCTTTTCTCCATATT	72
T-DNA	AC--AT-----	TTTTGAATTGAAAAAAATTGGTAATTACTCTTTCTTTTCTCCATATT	5865
<i>psd1</i>		GACCATCATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAA-----	118
T-DNA		GACCATCATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAAGCCATTACAAATTG	5925
<i>psd1</i>		-----GCCTTTTGTGAATAGTTGGGTAT	141
<i>atPSD1Gen</i>	TCGGTAAGAAACTCTCGATTACTATTTCTTTGTAGCGCCTTTTGTGAATAGTTGGGTAT		530
<i>psd1</i>		TGTATCGGTTTTGTGTGTTTCTGNATATAGGAAAAGAAGCTTCTCCTGGAGAAAAATGGA	201
<i>atPSD1Gen</i>	TGTATCGGTTTTGTGTGTTTCTGTATATAGGAAAAGAAGCTTCTCCTGGAGAAAAATGGA		590
<i>psd1</i>		CCAAGTCTGGCTAGAATCTCTGTGTTTGAGGTGTGAAGTATTCAGAGTTTTTTTACGTTC	261
<i>atPSD1Gen</i>	CCAAGTCTGGCTAGAATCTCTGTATTTGAGGTGTGAAGTATTCAGAGTTTTTTTACGTTC		650

Abb. 26: Ausschnitt aus dem Vergleich der *psd1*-Sequenz (PD185/PD35) mit der T-DNA und der *atPSD1*. Der rote Sequenzbereich der *psd1* kennzeichnet den zur T-DNA homologen Bereich; der blaue den zur *atPSD1* homologen Bereich.

Die Sequenz der *psd2* weist am T-DNA-Übergang einige zusätzliche Basen auf, die sich weder eindeutig *atPSD2* noch der T-DNA zuordnen ließen. Das Leseraster der *atPSD2* ist unterbrochen.

<i>psd2</i>	CAATTATAAACAAATTGTCCGGTGTGTGGTGAGGCTCTTCAGGTCTCTGACAAGCTCAACG	518
<i>atPSD2Gen</i>	CAATTATAAACAAATTGTCCGGTGTGTGGTGAGGCTCTTCAGGTCTCTGACAAGCTCAACG	1680
<i>psd2</i>	CGATGATTCATATGACTCT-----	537
<i>atPSD2Gen</i>	CGATGATTCATATGACTCTTTGTTTGTGACGAAGGAACGGGTAATCAAGTGATGACCGGAG	1740
<i>psd2</i>	-----A-----CATGA--ATATTCAATTGTAAAT	559
T-DNA	GCAGCGGCGGCAGGA-TATATTCAATTGTAAAT	32
<i>psd2</i>	GGCTTCATGTCCGGGAAAAGACATTAGTGAGTGTGGAATGCAATTAGGTGTCTCCACAA	619
T-DNA	GGCTTCATGTCCGGGAAATCTACATGGATCAGCAATGAGTATGATGGTCAATATGGAGAA	92

Abb. 27: Ausschnitt aus dem Vergleich der *psd2*-Sequenz (PD90/PD35) mit der T-DNA und der *atPSD2*. Der rote Sequenzbereich der *psd2* kennzeichnet den zur T-DNA homologen Bereich; der blaue den zur *atPSD2* homologen Bereich. Einige Basen an der Insertionsstelle lassen sich nicht sicher einer Sequenz zuordnen (Grün).

Die Integrationsstellen der T-DNA zwischen Exon 3 und 4 bei *psd1* und innerhalb des Exons 10 bei *psd2* wurden damit bestätigt.

4.10 Kreuzung und Isolation der *psd1/psd2*-Mutante

Um die Bedeutung des über die Decarboxylierung des Phosphatidylserins verlaufenden Stoffwechselwegs untersuchen und beurteilen zu können, ist eine Doppelmutante, bei der die *PSD*-Gene ausgeschaltet worden sind, erforderlich. Nur so kann ein möglicher Phänotyp der Mutante offenbar werden, da die Kompensation durch noch funktionierende *PSD*-Gene nicht möglich ist. Daher wurde die Kreuzung der Einzelmутanten *psd1* und *psd2* vorgenommen. Da der Kreuzungsversuch der homozygoten *psd1*- und *psd2*-Pflanzen nicht erfolgreich war, wurde die F₁-Generation aus der Kreuzung der homozygoten *psd1*- mit einer heterozygoten *psd2*-Pflanze herangezogen. Dies machte eine zusätzliche Durchmusterung der F₁-Generation erforderlich, um die nach der im Verhältnis 1:1 zu erwartenden für beide Gene heterozygote Pflanze (*psd1/PSD1*, *psd2/PSD2*) zu isolieren.

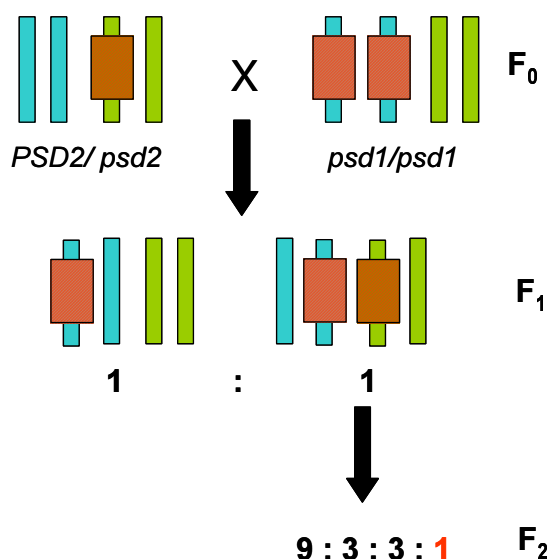


Abb. 28: Kreuzungsschema zur Erzeugung der *psd1/psd2*-Doppelmutante. Die T-DNA-Insertionen (Rot) liegen in der F₀-Generation auf beiden *PSD1*-Allelen (Blau) bei der *psd1*-Mutante, jedoch nur auf einem *PSD2*-Allel (Grün) bei der *psd2*-Mutante. In der Tochtergeneration der für beide Gene heterozygoten F₁-Pflanze ist die Doppelmutante mit einer Verteilung von 1:16 zu erwarten.

In der F₁-Generation wurden 4 Pflanzen erhalten, von denen sich eine bei der Durchmusterung mittels PCR als für beide Gene heterozygot herausstellte. Die F₂-Generation wurden ebenfalls mittels PCR durchmustert. Dabei wurde in einer ersten Runde versucht, aus der isolierten genomischen DNA der Einzelpflanzen das *atPSD1*-, bzw. *atPSD2*- Wildtypallel mit den Oligonukleotiden PD185/PD88 (*atPSD1*) und PD90/PD242 (*atPSD2*) zu amplifizieren. Alle Pflanzen, bei denen diese PCR nicht erfolgreich war, wurden in einer weiteren Runde erneut mittels PCR untersucht. Mit den Oligonukleotiden PD185/PD35 (*psd1*) und PD90/PD35 (*psd2*) wurde überprüft, ob diese Pflanzen T-DNA-Insertionen in den *PSD*-Genen aufweisen.

Bereits innerhalb dieser ersten 18 Pflanzen konnte eine Pflanze identifiziert werden, bei der es nicht möglich war, die Bereiche aus den Wildtyp - Allelen von *atPSD1* und *atPSD2* zu amplifizieren und die für die T-DNA-Insertion in beiden Genen PCR-Produkte mit den zu erwarteten Längen ergab (vergleiche Abb. 23).

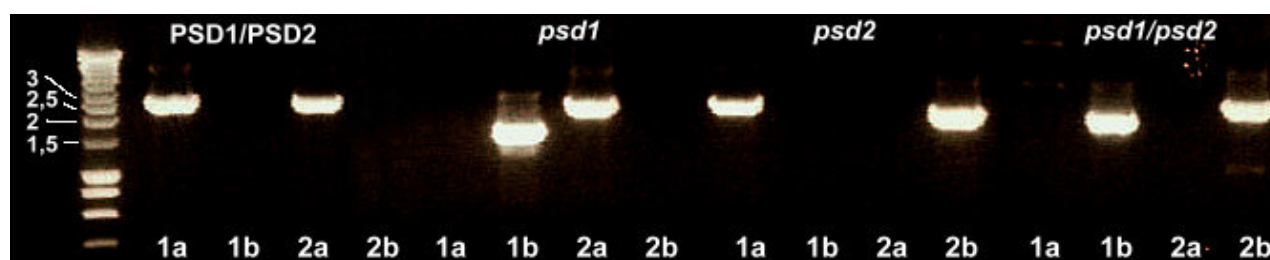


Abb. 29: PCR-Produkte des Wildtyps PSD1/PSD2, der *psd1*-, *psd2*-Mutanten und der *psd1/psd2*-Doppelmutante. Die PCR erfolgte mit den Oligonukleotiden PD185/PD88 für das *atPSD1*-Allel (1a) und PD90/PD242 für das *atPSD2*-Allel (2a). Für den Nachweis der T-DNA-Insertion in *atPSD1* wurden PD185/PD35 (1b) und in *atPSD2* PD90/PD35 (2b) verwendet.

4.11 Charakterisierung der *psd*-Mutanten

4.11.1 Überprüfung der T-DNA-Insertion mittels Southern Analyse

Die Lage der T-DNA-Insertion und das Fehlen des jeweiligen Wildtyp-*PSD*-Allels in den *psd*-Mutanten wurde mit einer Restriktionsanalyse überprüft. Dabei wird das durch die T-DNA-Insertion veränderte Restriktionsmuster mittels Hybridisierung mit genspezifischen, bzw. T-DNA-spezifischen Sonden detektiert. Da die Sequenzdaten der Loci und die T-DNA-Sequenz vollständig bekannt waren, war es möglich, die entsprechenden Fragmentlängen zu berechnen.

Zur Überprüfung der *psd*-Mutanten wurde mit *Hind*III und *Eco*RV geschnittene genomische DNA aller 3 Linien (*psd1*, *psd2*, *psd1/psd2*) und des Wildtyps gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Southern Blot hybridisiert. Als Sonden wurde über PCR amplifizierte, genomische DNA von *atPSD1* (PD185/PD88) und *atPSD2* (PD286/PD287) eingesetzt, deren Lage so gewählt worden war, daß sie über die Stelle reichten, an der bei den Mutanten die T-DNA inseriert war (vergleiche Abb. 23, Bild A, Bild B).

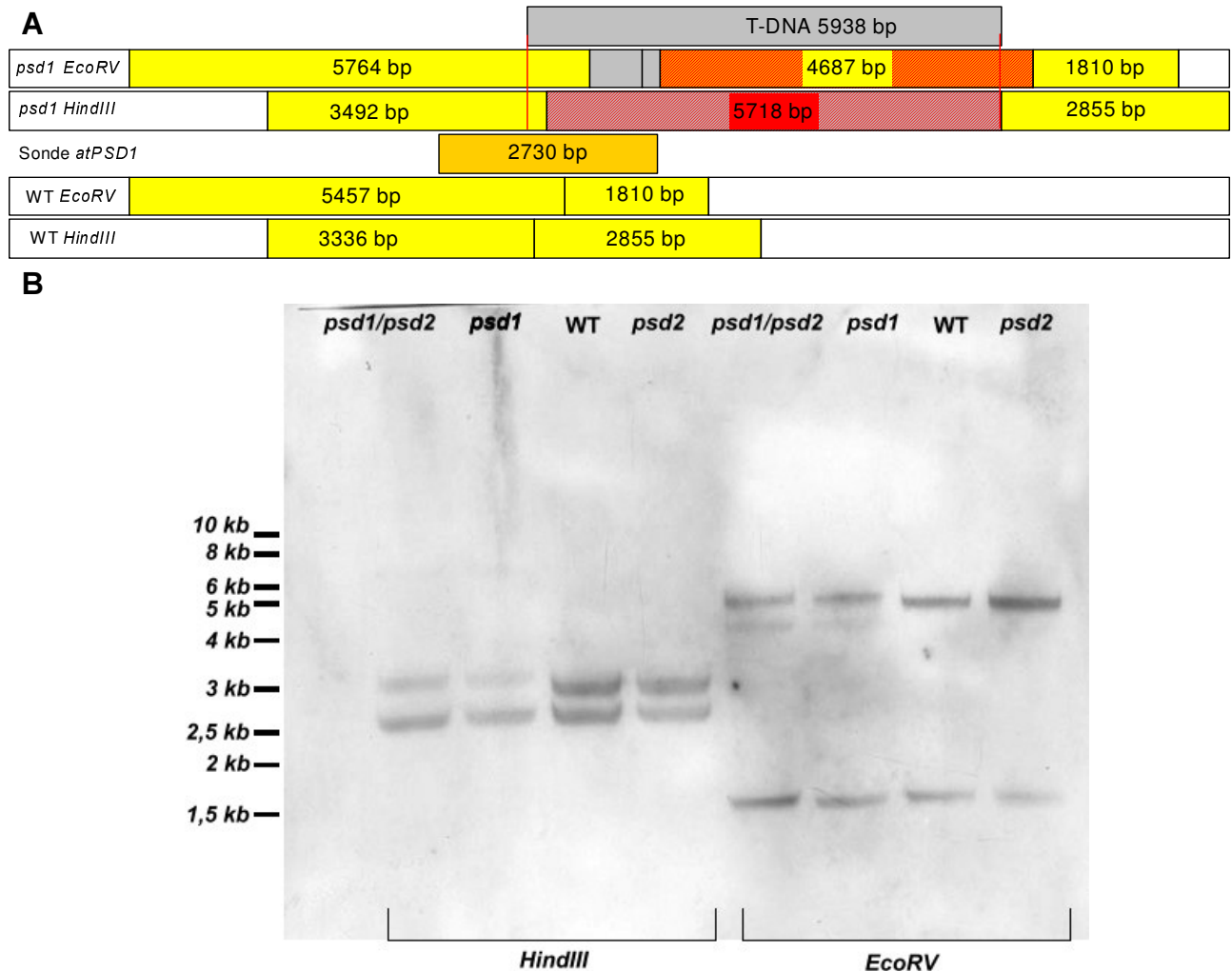


Abb. 30: **Schema der zu erwartenden Restriktionsprodukte von *atPSD1* und Ergebnis der Hybridisierung der Restriktionsansätze mit der *atPSD1*-Sonde.** A: Zu erwartende Fragmente des *PSD1*-Locus beim Wildtyp und bei *psd1* nach Restriktion mit *HindIII*, bzw. *EcoRV*. Markiert sind die von der *atPSD1*-Sonde (Orange) detektierbaren Fragmente (Gelb und Gelb-schraffiert) und die von ihr nicht-erfaßbaren Fragmente (Grau und Grau-schraffiert). Die Sonde für die T-DNA (KAN^R) bindet an dem Rot-schraffierten Fragment. B: Ergebnis der Hybridisierung geschnittener, genomischer DNA von *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2* und Wildtyp-Pflanzen (WT) mit radioaktiv-markierter *atPSD1*-Sonde.

Die *atPSD1*-Sonde erfaßte alle prognostizierten Fragmente mit den erwarteten Längen. Es gab keinen Hinweis auf Kreuzhybridisierung mit dem *atPSD2*-Locus, was angesichts der hohen Homologie grundsätzlich möglich gewesen wäre. Die Ergebnisse bestätigen die Lage der T-DNA im *PSD1*-Locus bei *psd1* und der Doppelmutante.

Das Experiment wurde analog für den *atPSD2*-Locus durchgeführt (siehe Abb. 31). Die Hybridisierung erfolgte mit *atPSD2*-Sonde, die neben den prognostizierten Banden einige zusätzliche Banden erfaßte, die jedoch durch ihr durchgängiges Auftreten offenbar auf unspezifische Hybridisierung zurückzuführen sind. Die Ergebnisse beider Experimente bestätigten die Unterbrechung der PSD-Gene in *psd1*, *psd2* und *psd1/psd2*. Für die Doppelmutante konnten erwartungsgemäß keine Wildtyp-Allele für *atPSD1* oder *atPSD2* nachgewiesen werden.

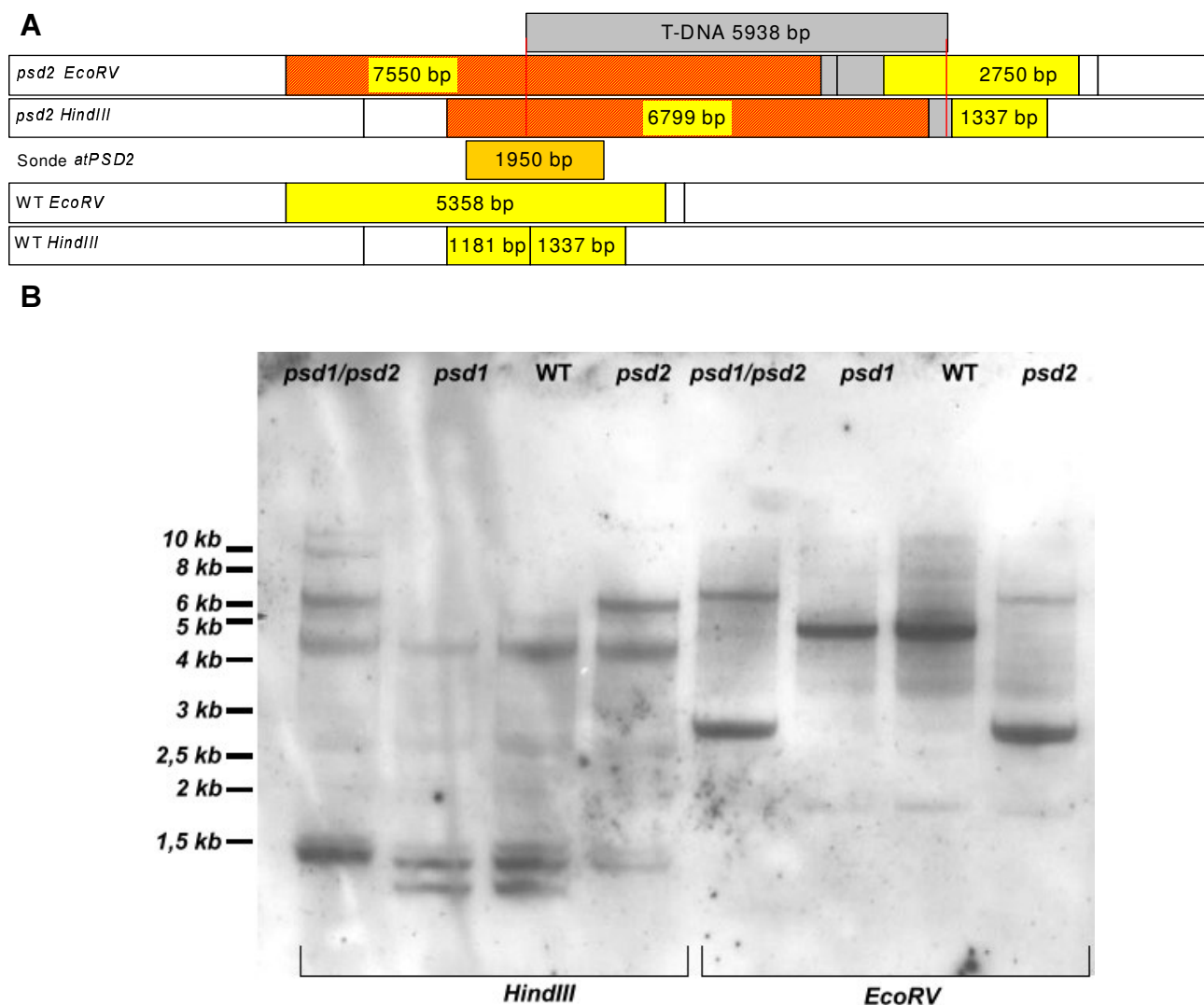


Abb. 31: **Schema der zu erwartenden Restriktionsprodukte von *atPSD2* und Ergebnis der Hybridisierung der Restriktionsansätze mit der *atPSD2*-Sonde.** A: Zu erwartende Fragmente des *PSD2*-Locus beim Wildtyp und bei *psd2* nach Restriktion mit *HindIII*, bzw. *EcoRV* und die von der *atPSD2*-Sonde (Orange) detektierbaren Fragmente (Gelb und Gelb-schraffiert). Die Sonde für die T-DNA (KAN^R) bindet an den Rot-schraffierten Fragmenten. B: Ergebnis der Hybridisierung geschnittener, genomischer DNA von *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2* und Wildtyp-Pflanzen (WT) mit radioaktiv-markierter *atPSD2*-Sonde.

Die Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Bereich des Antibiotika-Resistenzgens (KAN^R) der T-DNA lieferte erwartungsgemäß keine Signale bei der Wildtyp-DNA (siehe Abb. 32). Neben den erwarteten Fragmenten (siehe Schemen bei Abb. 30 und Abb. 31) wurden weitere, längere Fragmente erfaßt, die vermutlich auf unzureichende, partielle Restriktion hinweisen. Bei *psd2* wurden zusätzlich kürzere Fragmente detektiert, die mit dem erwarteten Restriktionsmuster nicht erklärbar sind. Dies könnte ein Hinweis auf konkatamere T-DNA-Insertion am *PSD2*-Locus sein. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse aus der PCR gestützt, bei der es im Gegensatz zum *psd1*-Locus nicht gelang, analog den *psd2*-Locus inklusive der T-DNA zu amplifizieren (vergleiche Abb. 24, Abb. 29). Dies weist auf eine besonders große, womöglich konkatamere T-DNA-Insertion hin.

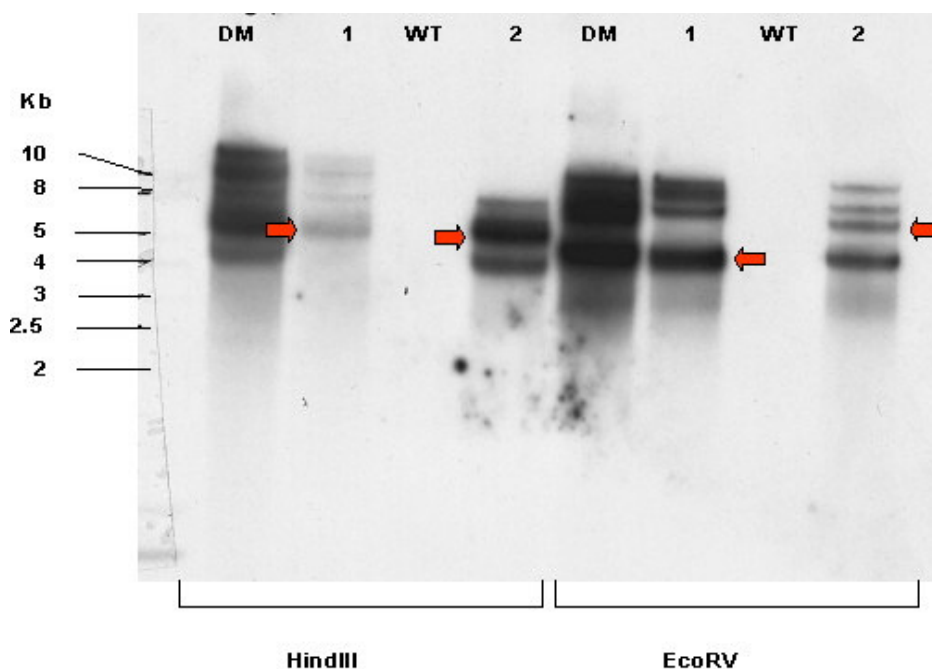


Abb. 32: **Ergebnis der Hybridisierung der Restriktionsansätze mit der KAN^R -Sonde.** Genomische, mit *Hind*III und *Eco*RV geschnittene DNA von *psd1* (1), *psd2* (2), *psd1/psd2* (DM) und Wildtyp-Pflanzen (WT), wurde mit der Sonde für das in der T-DNA enthaltene Kan^R -Gen hybridisiert. Die markierten Banden (Pfeile) entsprechen den prognostizierten Banden.

4.11.2 Untersuchung der *PSD1*- und *PSD2*-Expression in verschiedenen Gewebetypen und in den *Arabidopsis*-Mutanten

Die Transkription von *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* wurde über die Detektion der mRNA mittels Northern Blot und anschließender Hybridisierung mit spezifischen cDNA-Sonden untersucht. Dabei wurde zuerst die Expression in verschiedenen Gewebetypen des Wildtyps untersucht. Anschließend wurde die Expression in den verschiedenen Mutanten untersucht. Die RNA wurde von ca. 4 Wochen alten Pflanzen isoliert. Für die Untersuchung der gewebespezifischen Expression wurde die RNA aus einzelnen Pflanzengeweben isoliert (Blüte, Sproß, Blatt, Wurzel, Schote). Die RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend geblottet („Northern Blot“). Für die Sonden wurden die cDNAs aller drei Gene aus dem jeweiligen Klonierungsvektor (pGEM-Teasy für *atPSD2* und *atPSD3*, pBluescript II SK- für *atPSD1*) geschnitten und für den Einsatz als Sonden radioaktiv markiert.

Es konnte jedoch nur für *atPSD1* ein Transkript nachgewiesen werden. Dieses war in allen untersuchten Gewebetypen in vergleichbaren Mengen präsent (siehe Abb. 33, Bild A). Für Schoten wurde eine etwas geringere Transkriptmenge gezeigt, was aber eventuell auf den bei diesem Gewebetyp aufgrund der hohen Massenanteile an Wasser und Speicherstoffen bedingten, reduzierten Anteil an grünem, exprimierendem Gewebe zurückzuführen ist. Für *atPSD2* wurden keine Signale erhalten, die eindeutig dem Transkript zuzuordnen waren. Für *atPSD3* konnten keinerlei Signale detektiert werden. Dies könnte auf eine sehr schwache, unter der Nachweisgrenze der Methode liegende oder vollständig ausbleibende Expression dieser beiden Gene hinweisen. Die Untersuchung der Expression in den verschiedenen Linien zeigt, daß die *psd1*- und *psd1/psd2*-Mutanten kein *atPSD1*-Transkript mehr aufweisen (siehe Abb. 33, Bild B). Im Wildtyp und in der *psd2*-Mutante war dieses Transkript in unveränderter Stärke nachzuweisen. Für *atPSD2* und *atPSD3* können keine eindeutige Aussagen gemacht werden.

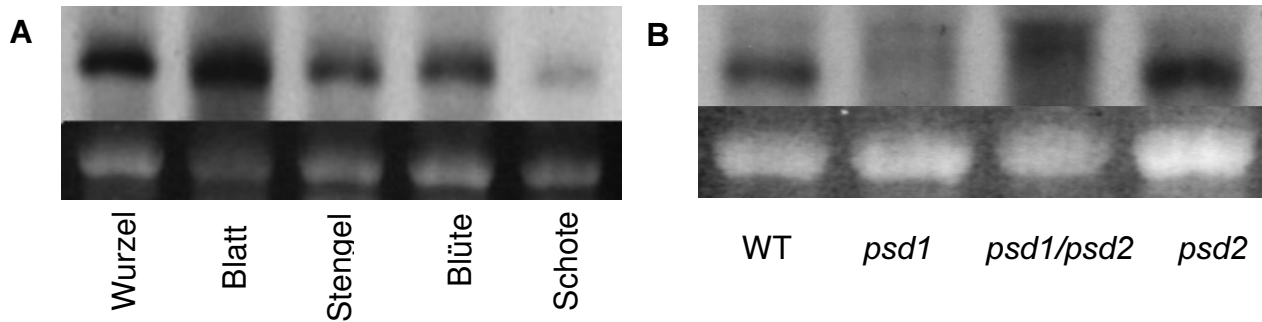


Abb. 33: **Transkript von *atPSD1* in verschiedenen Gewebetypen und in den *psd*-Mutanten.** A: Die für den Blot verwendete, gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA (untere Bildhälfte) aus *Arabidopsis thaliana* zeigte nach Hybridisierung mit einer *atPSD1*-Sonde in verschiedenen Gewebetypen deutliche *atPSD1*-Expression (obere Bildhälfte). B: Die T-DNA-Insertionsmutanten *psd1* und *psd1/psd2* zeigen im Gegensatz zu *psd2* und dem Wildtyp (WT) nach Hybridisierung mit einer *atPSD1*-Sonde kein *atPSD1*-Transkript.

4.11.3 Wachstum der *psd1*-, *psd2*- und Doppelmutante von *Arabidopsis thaliana*

Um die Doppel- und Einzelmutanten physiologisch zu charakterisieren und mögliche Unterschiede zum Wildtyp zu ermitteln, wurde ihr Wachstum anhand der Massenzunahme bestimmt. Dazu wurde über einen Zeitraum von 58 Tagen das Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile ermittelt (Mittelwert aus 6 Einzelbestimmungen). Die Anzucht erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in der Wachstumskammer (Tageslänge: 16 h 120 μ mol Licht bei 20 °C und 60 % Luftfeuchte; Nacht bei 16 °C und 75 % Luftfeuchte).



Abb. 34: ***psd*-Mutanten.** Von links nach rechts: *psd1*, *psd2*, WT und *psd1/psd2*

Die Entwicklung der Mutanten zeigte keine signifikanten Abweichungen vom Wildtyp. *psd1/psd2* wies sogar ein etwas stärkere Massenzunahme als der Wildtyp auf, wohingegen *psd2* etwas zurückblieb (siehe Abb. 35). Diese Abweichungen sind jedoch nicht signifikant und die Pflanzen unterschieden sich im Endgewicht nicht. Die durchschnittliche Massenzunahme betrug bei allen Linien zwischen 0,091 und 0,097 g/Tag. *psd3* unterschied sich im Wachstum ebenfalls nicht vom Wildtyp (siehe Abb. 36). Im Vergleich zum Wildtyp konnte für *psd3* mit $0,144 \pm 0,014$ g/Tag eine geringfügig höhere durchschnittliche Massenzunahme pro Tag ermittelt werden (Wildtyp: $0,095 \pm 0,021$ g/Tag).

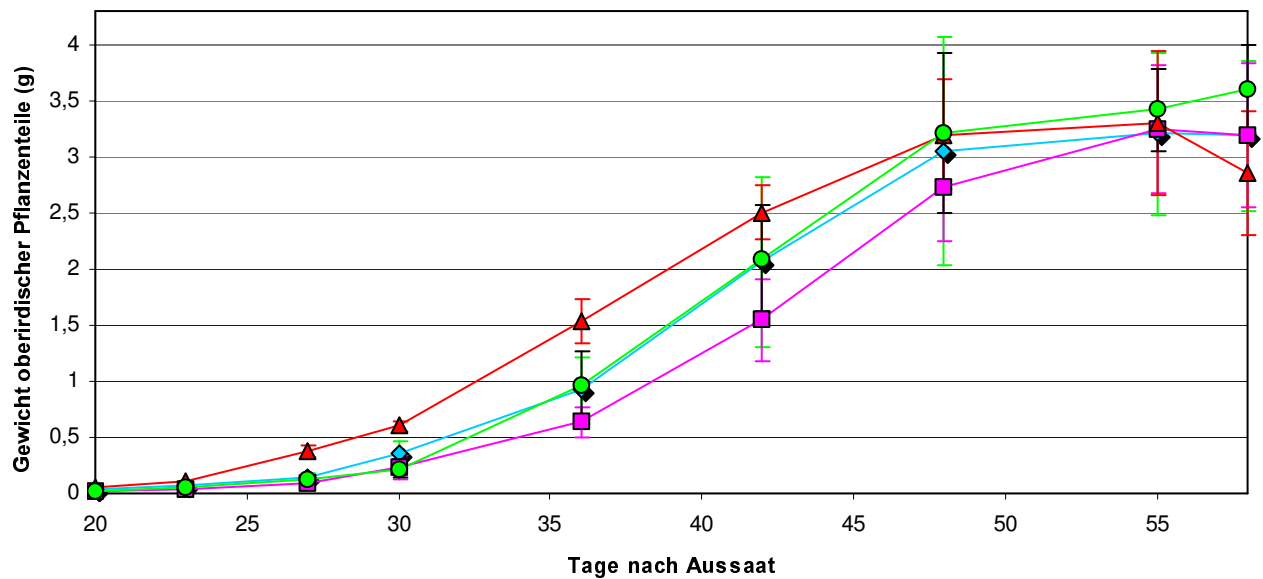


Abb. 35: **Wachstumskurven von *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2* und Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*.** Grafische Darstellung der Massenzunahme der *Arabidopsis*-Linien *psd1* (◆), *psd2* (■), *psd1/psd2* (▲), Wildtyp Ws-2 (●) in Abhängigkeit vom Alter (n = 6).

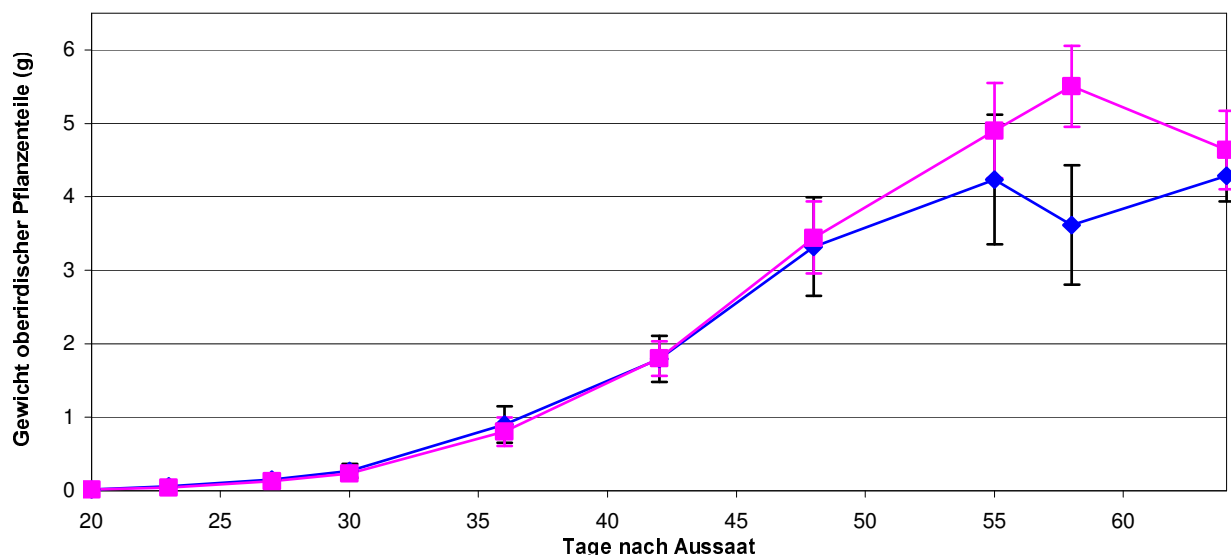


Abb. 36: **Wachstumskurven von *psd3* und Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*.** Grafische Darstellung der Massenzunahme der *Arabidopsis*-Linien Wildtyp Col-0 (◆) und *psd3* (■) in Abhängigkeit vom Alter (n = 6).

4.11.4 Blühzeitpunkt

Eine weitere charakteristische Eigenschaft ist der Beginn der Blüte. Dieser Entwicklungszeitpunkt kann am besten durch die Zahl der Rosettenblätter bei Beginn der Blüte angegeben werden, da zeitliche Angaben stark von endo- und exogenen Parametern abhängen und keinen Bezug zwischen Mutante und Wildtyp zulassen (Reeves und Coupland, 2001). Für diese Bestimmung wurde während des Wachstums in der Wachstumskammer (Tageslänge: Langtag mit 16 h 120 μ mol Licht bei 20 °C und 60 % Luftfeuchte; Nacht bei 16 °C und 75 % Luftfeuchte) bei 10 bis 15 Pflanzen pro Linie die Zahl der Rosettenblätter bei Beginn der Blüte ermittelt. Da die Rosetten zum Teil sehr kleine Blätter enthielten wurde ein Grenzwert von 5 mm festgelegt, ab dem die Blätter in die Zählung eingingen. Der Blühzeitpunkt wurde mit dem Öffnen der ersten Blüte

festgelegt. Die erste Blüte öffnete sich bei den Linien des Ökotyps Wassilewskja bei einer Rosettenblattzahl zwischen 8 und 12. Ein signifikanter Unterschied der *psd*-Mutanten zu dem Wildtyp *Ws-2* konnte nicht ermittelt werden. Beim Ökotyp Columbia setzte die Blüte erst bei Rosettengrößen von etwa 21 Blättern ein. Ein signifikanter Unterschied von *psd3* zum Wildtyp *Col-0* war ebenfalls nicht zu ermitteln.

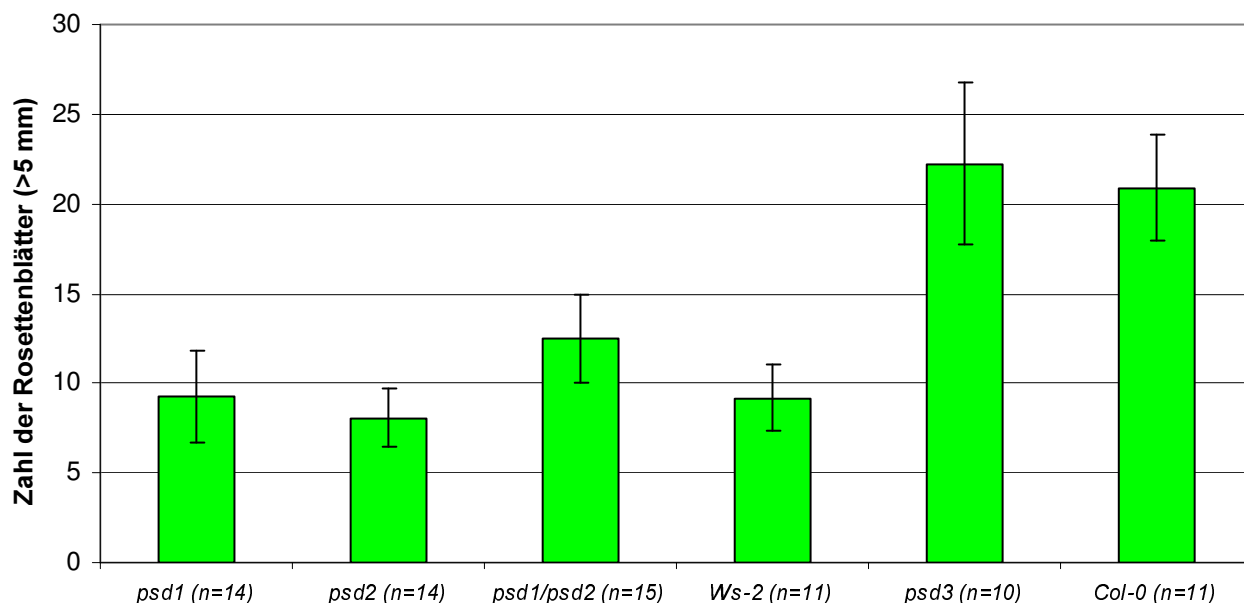


Abb. 37: **Zahl der Rosettenblätter beim Einsetzen der Blüte bei Mutanten und Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*.** Der Entwicklungsstand zum Zeitpunkt der 1. Blüte wurde anhand der Zahl der Rosettenblätter bei den *Arabidopsis*-Linien *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2*, *Ws-2*, *psd3* und *Col-0* bestimmt.

4.11.5 PSD-Enzymaktivität

Die Bestimmung der PSD-Enzymaktivität basiert auf der Umsetzung radioaktiv markierten Phosphatidylserins in Phosphatidylethanolamin. Der Enzymtest wurde bereits mit der PSD aus *E. coli* (vergleiche Abb. 19) etabliert und getestet. Der microsomale Proteinextrakt aus *Arabidopsis* – Pflanzen wurde nach Marshall und Kates (1973) durch mechanischen Zellaufschluß mit anschließender Ultrazentrifugation hergestellt und mit dem radioaktiven Substrat für bis zu 30 Minuten bei 28 °C inkubiert. Hierbei kam in allen Ansätzen die gleiche Proteinmenge im gleichen Reaktionsvolumen zum Einsatz (Proteinbestimmung nach Bradford, 1976). Anschließend wurden die Lipide mit Lösungsmitteln extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch den Phosphor-Imager über Nacht. Bereits erste PSD-Enzymtests mit den *Arabidopsis* - Proteinextrakten zeigten eine reduzierte Enzymaktivität bei den Linien *psd1* und *psd1/psd2*. (siehe Abb. 38)

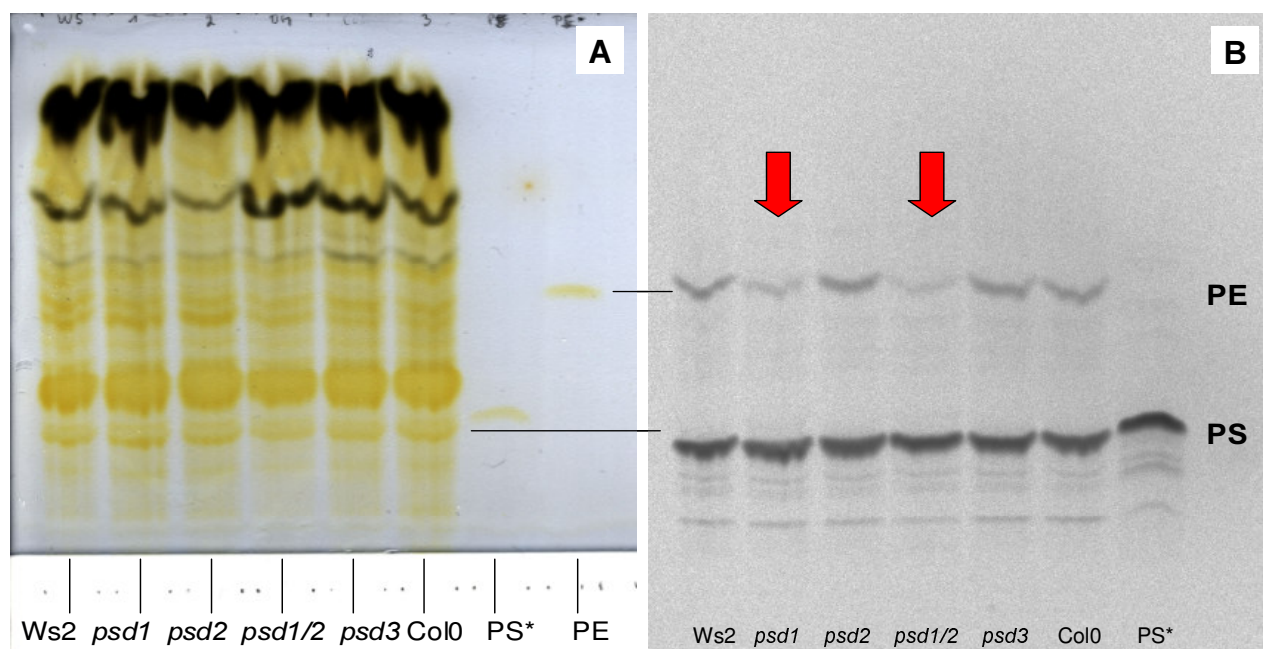


Abb. 38: **Ergebnisse der PSD-Enzymtests mit der T-DNA-Insertionsmutanten und den Wildtypen in *Arabidopsis thaliana*.** Dünnschichtchromatographische Trennung der Phospholipide (A) aus Extrakten der Linien Ws-2 (Wildtyp), *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2*, *psd3*, Col-0 (Wildtyp) nach Inkubation mit radioaktivem Phosphatidylserin (PS*). Die Exposition einer Phosphor Imager Platte zeigt bereits augenscheinlich geringere Mengen an PE für die Linien *psd1* und *psd1/psd2* (Pfeile).

Durch Erhitzen der Proteinextrakte auf 95 °C für 5 Minuten konnte die Decarboxylierung in allen Ansätzen nahezu vollständig unterbunden werden. Nach 60 min Inkubation waren mehr als 99 % der ermittelten Radioaktivität weiterhin als Substrat (PS) vorliegend und weitere Banden konnten nicht detektiert werden. Die zeitaufgelöste Messung der PSD-Enzymaktivität zeigte, daß die Enzymaktivität nur innerhalb der ersten 10 Minuten im linearen Bereich verläuft und anschließend in die Sättigung übergeht. Bei diesen Messungen wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Enzymaktivitäten der Linien *psd1*, *psd1/psd2* und *psd2*, Wildtyp deutlich.

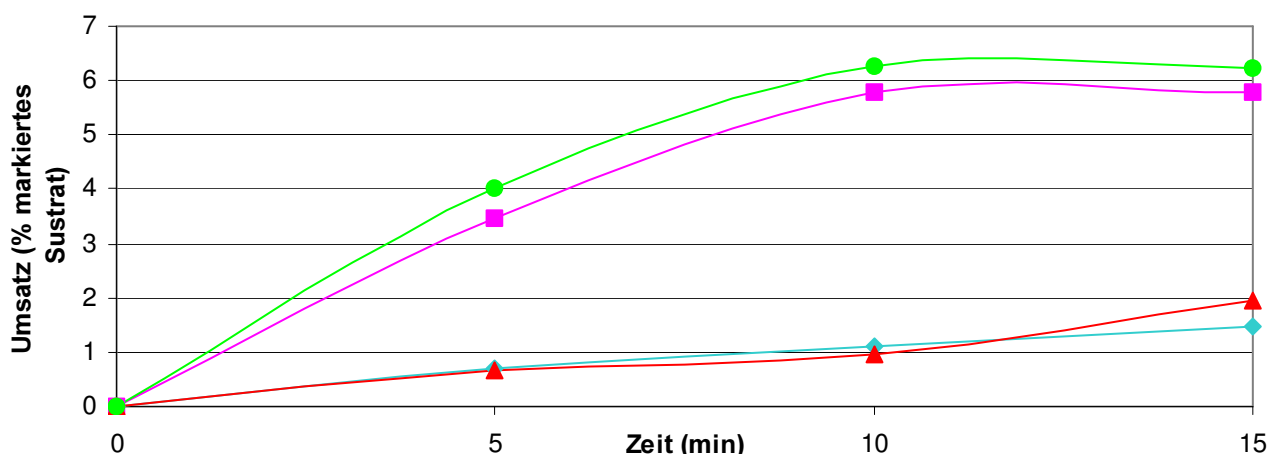


Abb. 39: **Substratumsatz durch die PSD in verschiedenen *Arabidopsis*-Linien.** Grafische Darstellung des prozentualen Umsatzes des radioaktiv markierten Phosphatidylserins durch 1 mg extrahierten Gesamtproteins der Linien *psd1* (♦), *psd2* (■), *psd1/psd2* (▲), Wildtyp (●)

Der Substratumsatz der Linien *psd1* und *psd1/psd2* erreichte auch bei längeren Inkubationszeiten (bis 1 Stunde) nur etwa ein Sechstel von dem des Wildtyps und *psd2* und ist damit in diesen beiden Linien signifikant reduziert. Eine PSD-Restaktivität konnte jedoch auch in der Doppelmutante festgestellt werden.

Die PSD-Enzymaktivitäten der Columbia-Linien *psd3* und Col-0 unterschieden sich nicht voneinander. Sie entsprachen der Wildtyp-Aktivität der Wassilewskja-Linie Ws-2. *psd3* zeigte wie *psd2* keinen Hinweis auf eine veränderte PSD-Aktivität.

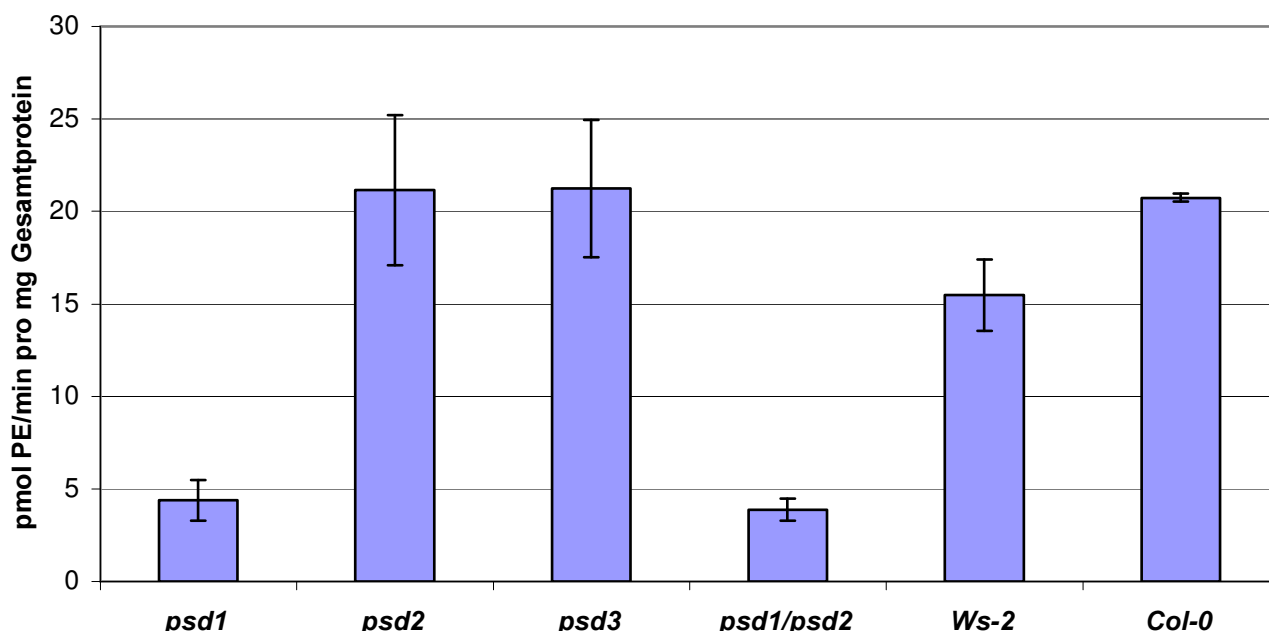


Abb. 40: **PSD-Aktivitäten in verschiedenen *Arabidopsis*-Linien.** Grafische Darstellung der PSD-Enzymaktivitäten ($n = 2$) der untersuchten T-DNA-Insertionsmutanten *psd1*, *psd2* und *psd1/psd2* (Ökotyp Wassilewskja) und *psd3* (Ökotyp Columbia) sowie der zugehörigen Wildtypen von *Arabidopsis thaliana*.

4.11.6 Gesamtfettsäuremuster

Die für einige *psd*-Mutanten bei *Arabidopsis* ermittelte Reduktion der PSD-Enzymaktivität könnte Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Lipidmusters haben. Um dies zu untersuchen, wurde das Gesamtfettsäuremuster der *psd1*-, *psd2*- und *psd1/psd2*-Mutanten und des Wildtyps untersucht. Die Fettsäuren des pflanzlichen Lipidextraktes lassen sich nach Umwandlung in flüchtige Methylester über die Gaschromatographie quantifizieren.

Die ermittelte Verteilung der Gesamtfettsäuren zeigte keine Veränderungen in den untersuchten *psd*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp. Das Verteilungsmuster mit hohen Mengen an 18:3-Fettsäuren, sowie an 16:0-, 16:3- und 18:2-Fettsäuren entspricht den bereits für *Arabidopsis* publizierten Daten (Wallis und Browse, 2001). Dies trifft auch auf die Gesamtmengen der jeweiligen Fettsäuren zu (vergleiche Abb. 41).

Die bei *psd1*- und *psd1/psd2* beobachtete Reduktion der PSD-Enzymaktivität hat offenbar keine erkennbaren Auswirkungen auf die Fettsäurezusammensetzung der Pflanzen.

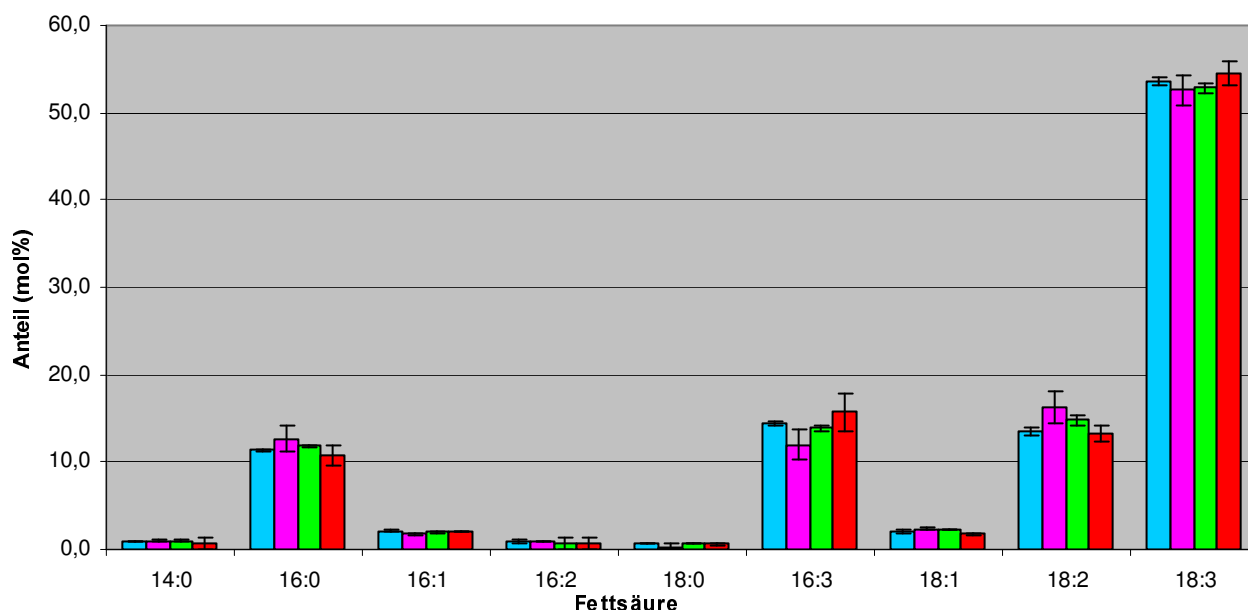


Abb. 41: Fettsäurezusammensetzung der *psd1*-, *psd2*-, *psd1/psd2*-Mutanten und dem Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*. Grafische Darstellung der Gesamtfettsäuregehalte (Mittelwerte aus 3 Bestimmungen) der Linien *psd1* (cyan), *psd2* (magenta), *psd1/psd2* (red) und Wildtyp (green).

4.11.7 PS- und PE-Gehalt

Die geringere PSD-Enzymaktivität der *psd1*- und *psd1/psd2*-Linien von *Arabidopsis thaliana* könnte das Mengenverhältnis zwischen PS und PE sowie das Fettsäuremuster dieser beiden Phospholipide verändern. Um dies zu untersuchen, wurden die Lipide über zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nach Benning *et al.* (1995) aufgetrennt. Da PS jedoch in *Arabidopsis* nur in sehr geringen Mengen auftritt, wurde es nur selten exakt quantifiziert. In dem verwendeten DC-System war die Lage des PS nicht bekannt, so daß diese erst in Vorversuchen über die Nachweisreaktion mit Ninhydrin ermittelt werden mußte (siehe Abb. 42 A). Dieses Reagenz weist Amine nach, die in den Lipiden von *Arabidopsis thaliana* nur in PS und PE vertreten sind. Die Zuordnung der anderen Lipide erfolgte nach Literaturangaben und weiteren Versuchen, bei denen große Mengen des zu identifizierenden Lipids vor der Trennung zugesetzt wurden (siehe Abb. 42 B).

Bei den für die Quantifizierung der Fettsäuren angefertigten DC-Platten wurden die entsprechenden Bereiche nach flüchtiger Jodfärbung samt des Trägermaterials von der Platte gekratzt und die Lipide gründlich extrahiert. Die quantitative Untersuchung erfolgte anschließend über gaschromatographische Untersuchung der Fettsäuremethylester.

Die zweidimensionale Trennung der Lipide aus den Linien *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2* und Wildtyp ergab nach der Jodfärbung keinen Hinweis auf Veränderungen bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp. Sowohl Lage als auch Mengenverhältnisse der einzelnen Lipide entsprachen dem Wildtyp. Die Trennung von PS war trotz des nahen Laufs diverser anderer Lipide in diesem Bereich möglich. Durch den Einsatz großer Gewebemengen (300 mg) für die Lipidextraktion war es möglich, die für eine zuverlässige Fettsäurebestimmung erforderliche Mindestmenge von ca. 5 µg pro Probe (Dörte Klaus, persönliche Mitteilung) für PS zu erreichen.

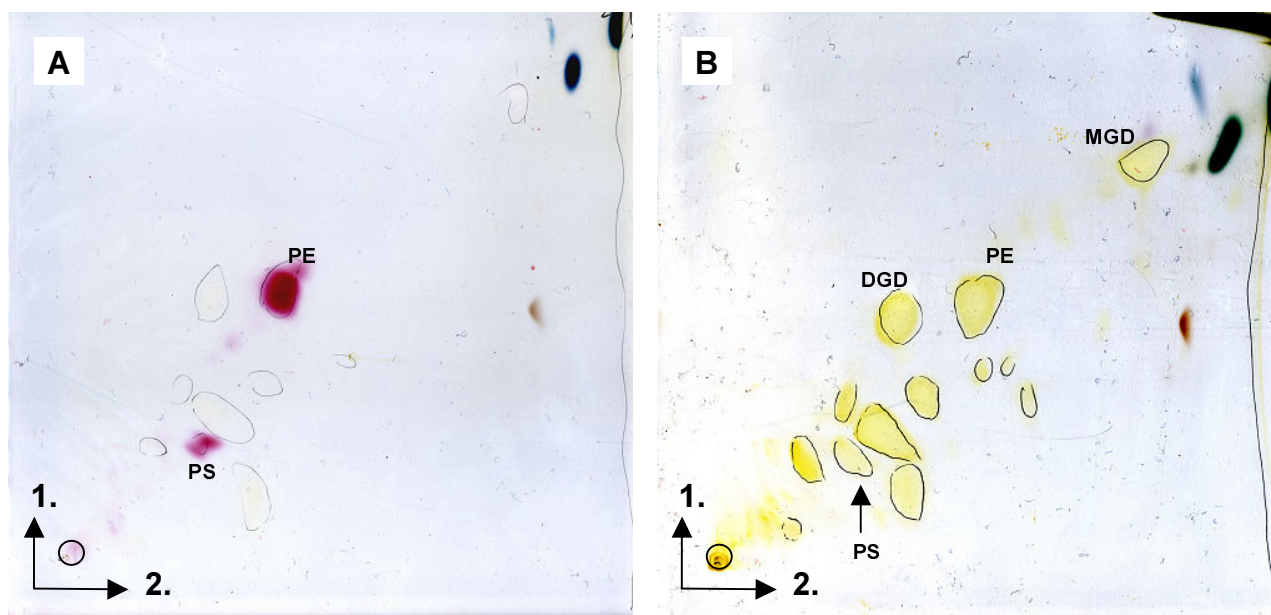


Abb. 42: **Zweidimensionale Trennung der Lipide des Wildtyps von *Arabidopsis thaliana* und Nachweisreaktionen.** A: zweidimensionale Trennung der Lipide, die nach flüchtiger Jodbehandlung für die Markierung der Lipide mit Ninhydrin behandelt wurde. B: DC-Platte unmittelbar nach der Jodfärbung bei der alle Lipide sichtbar angefärbt wurden. Die Laufrichtungen der 1. und 2. Dimension sind durch Pfeile gekennzeichnet

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in dem PS-PE-Verhältnis in Bezug zum Wildtyp bei den untersuchten Mutanten gefunden werden. Für alle Linien ergab sich ein Anteil von durchschnittlich 8,2 % PS in Bezug zu der Gesamtmenge an PS und PE.

Tabelle 11: **Absolute PS- und PE-Mengen und PS-PE Verhältnis in *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2* und Wildtyp bei *Arabidopsis thaliana*.** Basierend auf Einzelbestimmungen (n = 1) ermittelte Mengen für PS und PE.

Linie	PS	PE	PS	PE
	µg/g Frischgewicht		% (PS+PE)	
<i>psd1</i>	16,27	197,23	7,62	92,38
<i>psd2</i>	19,24	226,21	7,84	92,16
<i>psd1/psd2</i>	18,00	186,32	8,81	91,19
Ws-2	23,95	262,42	8,36	91,64

Das für PS und PE ermittelte Gesamtfettsäuremuster zeigte keine Veränderungen zwischen den Mutanten und dem Wildtyp. Es entspricht weitgehend denen bereits an anderen, verwandten Pflanzen wie Kohl und Sojabohne ermittelten und publizierten Daten (vergleiche Abb. 43). Die Fettsäurezusammensetzung für PS wurde von Murata *et al*, (1984) untersucht. Whitman und Travis (1985) publizierten die Fettsäurezusammensetzung für PE. In beiden Phospholipiden sind vor allem 16:0, 18:2 und 18:3-Fettsäuren in größeren Mengen präsent. In PS spielen noch eine Reihe weiterer Fettsäuren eine Rolle. Ihr Anteil bleibt aber mit unter 5 mol % unbedeutend. In PE nimmt nur 18:1 noch einen etwas größeren Anteil ein; dieser bleibt jedoch ebenfalls noch unter 5 mol %.

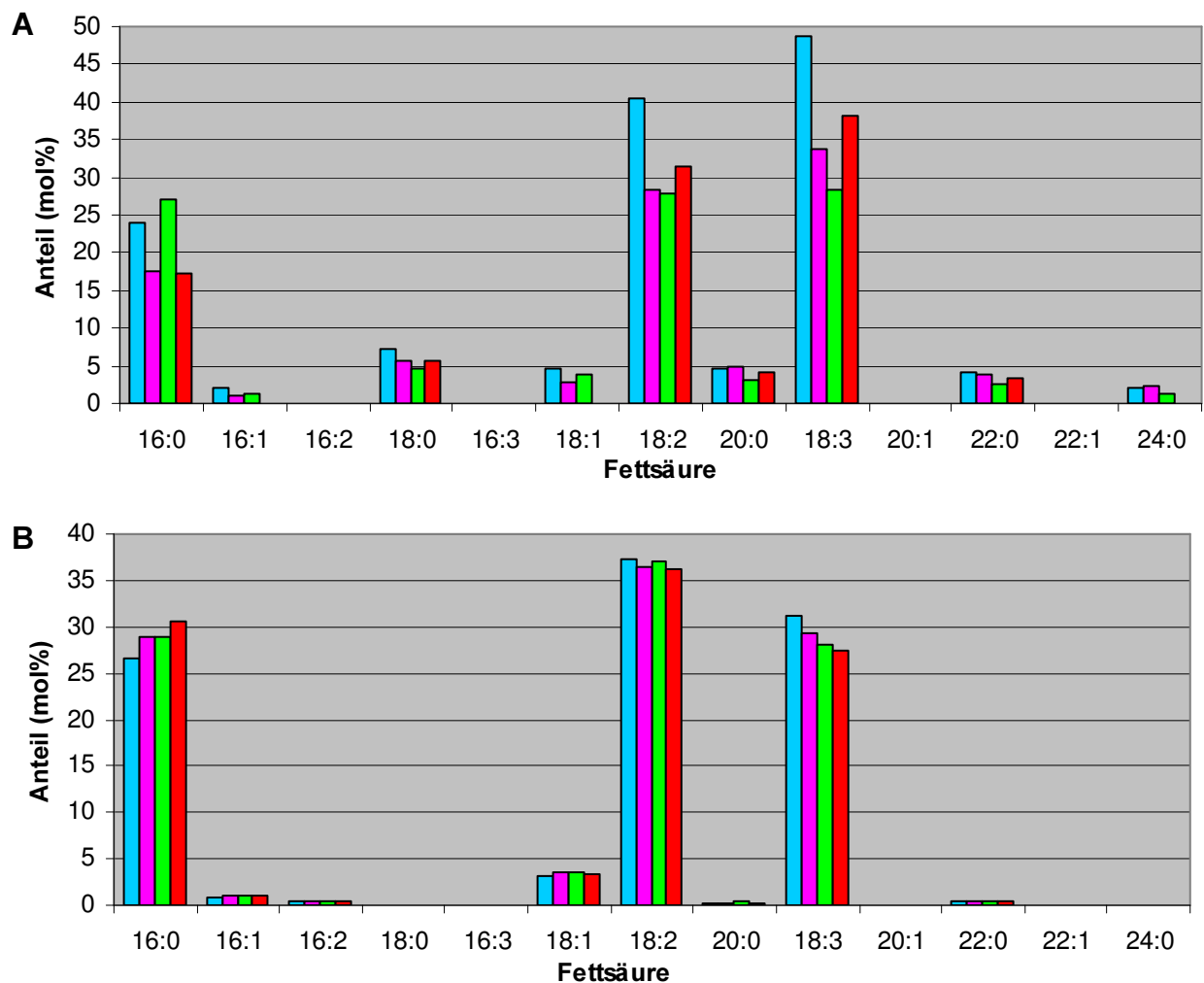


Abb. 43: Fettsäurezusammensetzung von PS und PE in *psd1*, *psd2*, *psd1/psd2* und Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*. A: Fettsäuremuster von Phosphatidylserin (PS) der Linien *psd1* (■), *psd2* (■), *psd1/psd2* (■) und Wildtyp (■). B: Fettsäuremuster von Phosphatidylethanolamin (PE) der Linien *psd1* (■), *psd2* (■), *psd1/psd2* (■) und Wildtyp (■).

Ein Lipidphänotyp konnte damit unter den gewählten Kulturbedingungen für keine der untersuchten Mutanten festgestellt werden.