

## 5 Diskussion

### 5.1 Sequenzdaten der PS Decarboxylasen von *Arabidopsis thaliana*

Die Auswertung der Sequenzdaten von *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* und der Vergleich zu den Sequenzen anderer PS Decarboxylasen konnte für alle drei Sequenzen die bisher bekannten, sequenztypischen Merkmale der PS Decarboxylasen aufzeigen. So besitzen alle drei das konservierte GST-Motiv, das als Schnittstelle des Proenzym für die Funktion des Enzyms essentiell ist. Weiterhin konnte in allen Sequenzen eine Reihe konservierter Aminosäuren gefunden werden, die sich auch in neun anderen PS Decarboxylase Sequenzen aus acht verschiedenen Organismen fanden.

Die Sequenzen von *atPSD1* und *atPSD2* weisen eine Identität von 85,3 % auf Proteinebene (Methode nach Pearson *et al.*, 1997) auf. Die Exon-Intron-Struktur ist sehr ähnlich; die Anzahl und Größe der Exons sind vergleichbar. Beide besitzen ein GGST-Motiv als PSD-typische Schnittstelle. Es konnten keine eindeutigen Signalpeptide identifiziert werden (Methode nach Emanuelsson, 2000, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Dahingegen nimmt *atPSD3* eine Sonderstellung ein. Die meisten der bisher bekannten PSD-Sequenzen lassen sich in Bezug auf das GST-Motiv in zwei Gruppen aufteilen (LGST oder GGST-Motiv). *atPSD3* weist jedoch ein MGST-Motiv auf. Dieses teilt sie mit einer anderen pflanzlichen PSD-Sequenz, die erst vor Kurzem in der NCBI-Datenbank hinterlegt und veröffentlicht wurde (Rontein *et al.*, 2003). Mit der unter der Zugriffsnummer AY093689 hinterlegten Sequenz einer „mitochondrialen Phosphatidylserin Decarboxylase“ (*lePSD1*) aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) teilt *atPSD3* 64,2 % Identität auf Proteinebene. Zu *atPSD1* ist diese Sequenz nur zu 36 % und zu *atPSD2* zu 34,2 % identisch ist (Methode nach Pearson *et al.*, 1997, <http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi>). Damit besteht für *atPSD3* mit dieser Sequenz eine größere Identität als mit allen anderen, bisher bekannten PS Decarboxylasen; inklusive der PSD1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diese, nachgewiesenermaßen mitochondrial lokalisierte PSD der Hefe, lieferte durch ihre Identität von 22 % den ersten Hinweis, daß es sich auch bei *atPSD3* um eine mitochondrial lokalisierte PSD handeln könnte. In dem auf dem Vergleich der letzten 300 Aminosäuren basierenden Cladogramm wird *lePSD1* zusammen mit den anderen mitochondrial lokalisierten PS Decarboxylasen *atPSD3* und *scPSD1* als distinkte Gruppe dargestellt, die von der aus pflanzlichen, extramitochondrialen PSDs gebildeten Gruppe weit entfernt liegt (siehe Abb. 44).

Diese beiden bisher als mitochondrial einzuordnenden PS Decarboxylasen sind deutlich kürzer und weisen andere GST-Motive als die extramitochondrialen PSDs der gleichen Spezies auf. *atPSD3* ist im Vergleich zu den anderen pflanzlichen PSDs (*atPSD1*, *atPSD2*, *ppPSD*) mit nur 453 Aminosäuren relativ kurz. *lePSD1* aus Tomate weist 466 Aminosäuren auf und ist damit ebenfalls wesentlich kürzer als die rund 630 Aminosäuren-lange *atPSD1* und *atPSD2*. Die mitochondriale Lokalisierung der *atPSD3* erhält weitere Unterstützung durch die Untersuchung auf Signalpeptide durch die computergestützte Untersuchung mit TargetP 1.0 (Methode nach Emanuelsson, 2000, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Hierbei wurde mit hoher Zuverlässigkeit für *atPSD3* eine mitochondriale Lokalisation angegeben. Weitere Hinweise lieferten die Experimente mit GFP-Fusionsproteinen (siehe 5.3). Untersuchungen an der sequenzähnlichen *lePSD1* belegten deren mitochondrialen Lokalisation bei der heterologen Expression in Hefe (Rontein *et al.*, 2003).

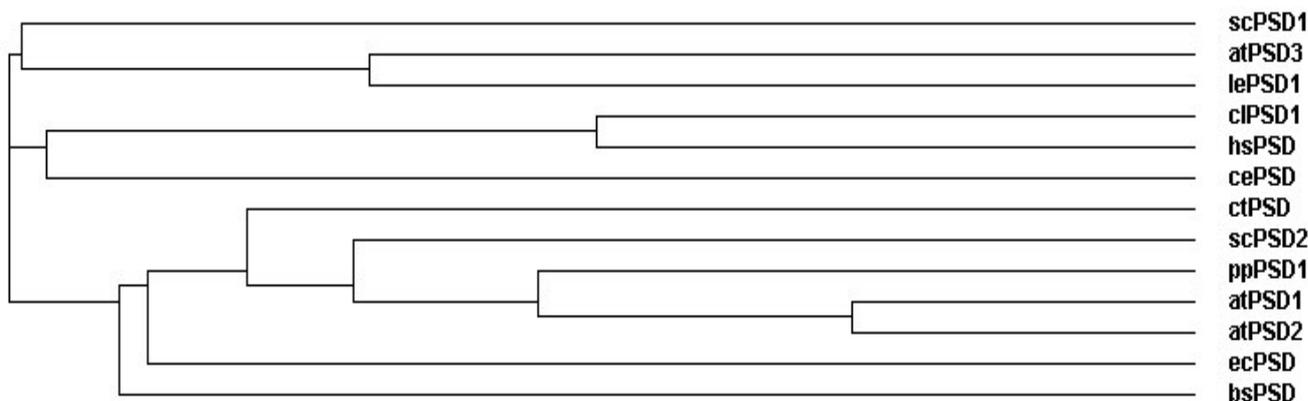


Abb. 44: **Cladogramm verschiedener PS Decarboxylasen unter Berücksichtigung von PSD1 aus *Lycopersicon esculentum*.** Auf Basis der letzten 300 Aminosäuren des C-Terminus verschiedener PSD-Proteine erstelltes Cladogramm; dabei bedeuten at = *Arabidopsis thaliana*, cl = *Cricetulus longicaudatus* (Chinesischer Hamster), hs = *Homo sapiens*, bs = *Bacillus subtilis*, ct = *Chlamydia trachomatis*, pp = *Physcomitrella patens*, ce = *Caenorhabditis elegans*, ec = *Escherichia coli*, sc = *Saccharomyces cerevisiae*, le = *Lycopersicon esculentum* (Tomate)

## 5.2 Heterologe Expression der PS Decarboxylase in *Escherichia coli* und Hefe

Die heterologe Proteinexpression zur Komplementation von PSD-defizienten Linien von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* mittels verschiedener PSD-Expressionskonstrukte war nicht erfolgreich. Zwar konnte die Akkumulation des Histidinmarkierten PSD-Proenzym gezeigt werden, aber es gab keine Veränderungen im Phänotyp der Linien oder eine in Bezug zum Wildtyp erhöhte PSD-Aktivität.

Die Komplementation von *psd*-Mutanten mittels heterologer Genexpression konnte in anderen Studien bereits gezeigt werden. *PSD1*-cDNA-Konstrukte von *S. cerevisiae* führten in der *psd*-Mutante EH150 von *E. coli* zu einer rund verdoppelten PSD-Aktivität und einer Erhöhung des PE-Gehaltes auf das Niveau des Wildtyps (Clancey *et al.*, 1993). Die Expression der PSD aus *Bacillus subtilis* in EH150 führte zum Anstieg des PE-Gehaltes und Komplementation des Wachstumphänotyps (Matsumoto *et al.*, 1997). Ebenfalls erfolgreich, wenngleich ohne Auswirkung auf den Lipidphänotyp, waren Experimente zur Überexpression der *scPSD1* und *scPSD2* in Hefe (Trotter *et al.*, 1993, 1995, Kitamura *et al.*, 2002). Bei diesen Experimenten wurde gezeigt, daß vollständige PSD-Sequenzen die Phänotypen der *psd*-Mutanten von *E. coli* und *S. cerevisiae* komplementieren können. Arbeiten an anderen PSDs zeigen jedoch, daß deren heterologe Expression teilweise nur unter Verwendung chimärer Proteinexpressionskonstrukte und anderer Expressionssysteme erfolgreich war.

So gelang die Komplementation einer Hefemutante (*psd1/psd2*-Mutante) mit der pflanzlichen Phosphatidylserin Decarboxylase *lePSD1* erst mittels chimärer Konstrukte aus dem N-Terminus der *scPSD1* und dem C-Terminus von *lePSD1* (Rontein *et al.*, 2003). Dahingegen war mit der vollständigen Sequenz von *lePSD1* keine Komplementation möglich. Aus der Gruppe der extramitochondrialen, eukaryontischen PS Decarboxylasen wurde bisher *PSD2* von *S. cerevisiae*, die im Cladogramm von allen bisher bekannten PS Decarboxylase-Genen den pflanzlichen PSD-Genen am nächsten steht, erfolgreich heterolog exprimiert – jedoch nicht in *Escherichia coli*, sondern in Sf-9-Insektenzellen. Nach Transformation über das Baculovirensystem wurde dort ein zehnfacher Anstieg der PS Decarboxylase-Aktivität beobachtet (Trotter *et al.*, 1995).

Diese Experimente zeigen, daß die Expression bestimmter PS Decarboxylasen offenbar erst in anderen eukaryontischen Expressionssystemen wie Insektenzellen oder über

chimäre Fusionsproteine in Hefe möglich ist. Eine weitere Bedeutung könnte in der Verwendung der *psd1/psd2*-Hefemutante anstelle der hier verwendeten *psd1*-Mutante liegen. So war die Komplementation dieser Ethanolamin-auxotrophen Mutante durch Expression von *atPSD1* möglich (Rontein *et al.*, 2003), was in dieser Arbeit unter Verwendung der *psd1*-Mutante nicht erfolgreich war.

Diese Gruppe der offenbar schwer heterolog zu exprimierenden PS Decarboxylasen zeigt keine auffälligen Gemeinsamkeiten auf DNA-Ebene, die diese besondere Problematik begründen könnten. Sie zeigt auf Proteinebene im C-Terminus keine Abweichungen von den anderen PSDs. Allerdings besitzen die pflanzlichen PSDs (ausgenommen die mitochondrialen PSDs *lePSD1* und *atPSD3*) wie auch PSD2 von *S. cerevisiae* einen auffallend langen N-Terminus. Mit über 800 Aminosäuren ist der von PSD2 von *S. cerevisiae* der längste aller bisher bekannter PSDs. Die pflanzlichen PSDs aus *A. thaliana* und *P. patens* besitzen mit um die 300 Aminosäuren ebenfalls wesentlich längere N-Termini als die PSDs der anderen Gruppe, deren längste PSD, PSD1 von *S. cerevisiae*, es auf einen knapp 200 Aminosäuren-langen N-Terminus bringt. Bereits der relativ kurze N-Terminus von *lePSD1* führte bei der heterologen Expression in der *psd1/psd2*-Hefemutante zu nur sehr geringen PSD-Aktivitäten. Womöglich hat der N-Terminus entscheidende Auswirkungen auf Lokalisation, Expression und Prozessierung, die die heterologe Expression erschweren können.

Die bisherigen Erkenntnisse über die Prozessierung und Aktivität der PSD wurden nahezu ausschließlich durch Untersuchungen an *PSD1* aus Hefe und der *PSD* aus *E. coli* gewonnen. So kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Prozessierung der pflanzlichen PS Decarboxylasen komplexer ist als bei den bisher untersuchten Modellen. Da die Phosphatidylserin Decarboxylase eine posttranslationale Modifikation durchlaufen muß, um in Form aktiver Untereinheiten mit korrekt gebildetem Cofaktor tätig werden zu können, ist dieser Schritt besonders kritisch für den Funktionsnachweis des exprimierten Proteins. Über Immunodetektion konnte die akkumulierte Histidin-markierte PSD identifiziert werden. Die anhand des Proteingrößenstandards ermittelte Größe des Proteins entsprach der Länge des je nach eingesetzten Expressionskonstruktes zu erwartenden Proenzym. Es war jedoch selbst mit N- und C-terminaler Histidinmarkierung nicht möglich, die zugehörigen, aktiven Untereinheiten nach Spaltung am GST-Motiv ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit) zu detektieren. Neben dem Problem der starken Verdünnung der Proteinextrakte durch die erforderlichen hohen Elutionsvolumen bei der Proteinaufreinigung über Nickelsäulenchromatographie, kann auch vermutet werden, daß die Prozessierung nicht oder nur in geringem Maße abläuft. Hierfür können diverse Ursachen in Frage kommen. So kann die für die Prozessierung des Proenzym erforderliche Proteinfaltung durch fehlende Umgebungsbedingungen erschwert sein oder ein Mangel an einem eventuell für die Prozessierung erforderlichen Cofaktors die Ursache sein. Im Gegensatz zu bakteriellen PSDs weisen die hier getesteten, pflanzlichen PSDs einen wesentlich längeren Aminoterminus auf, was die korrekte Faltung und Prozessierung in den verwendeten Expressionssystemen zusätzlich erschweren könnte. Durch die Histidin-Reste bei Verwendung der pQE-Vektoren sind zudem Störungen der Prozessierung und des Proteintransportes zu den korrekten Zellkompartimenten nicht auszuschließen. Ein Hinweis, daß die Prozessierung der pflanzlichen PSDs jedoch im Prinzip analog zu dem beschriebenen Mechanismus erfolgt, lieferten Untersuchungen der mitochondrialen PSD in Mitochondrien-Präparationen aus Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), die verwandtschaftlich der Tomate sehr nahe steht (Rontein *et al.*, 2003). In den Mitochondrien konnte über *lePSD1*-spezifische Antikörper ein 35 kDa-großes Protein nachgewiesen werden, was der Größe nach der anhand der *lePSD1*-Sequenz vorhergesagten  $\beta$ -Untereinheit nach vollständiger Prozessierung entspricht. Derartige Untersuchungen stehen für extramitochondriale, pflanzliche PS Decarboxylasen noch aus.

Ein weiteres Problem bei der Expression in EH150 ist die zum Teil erhebliche Hintergrundaktivität durch endogene PSD-Aktivität von *Escherichia coli*. Es war nicht möglich, diese selbst noch nach Tagen im Proteinextrakt nachzuweisene Aktivität durch entsprechendes Verdünnen des Proteinextraktes oder durch Nickel-Agarose-Chromatographie ausreichend zu entfernen. Ein Versuch, dieses Problem durch Verwendung eines in-vitro-Expressionssystems (Roche, Basel, CH) zu umgehen, war nicht erfolgreich, da das auf Zelllysaten von *Escherichia coli* basierende System ebenfalls eine starke, endogene PSD-Aktivität aufwies.

### **5.3 Lokalisierung der PSD mittels GFP-Fusionsprotein-Expression**

Die Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen, die mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie in Blattepidermiszellen von *Arabidopsis thaliana* dokumentiert wurde, zeigt, daß atPSD3-GFP eine partikuläre Verteilung innerhalb der transformierten Zellen einnimmt. Aufnahmen von schwach exprimierenden Zellen, die mit dem mitochondrial-lokalisierten Positivkontrollkonstrukt pre-101-GFP transformiert wurden, zeigen eine ähnliche Anordnung, so daß eine mitochondriale Lokalisation angenommen werden kann. Dies wird zusätzlich durch den Fund entsprechender Signalpeptide bei der Sequenzanalyse gestützt. Auch die bereits angesprochene Sequenzähnlichkeit zu der mitochondrial lokalisierten *lePSD1* unterstützt diese Annahme (siehe 5.1). atPSD1-GFP und atPSD2-GFP zeigen eine andere Verteilung, die sich auf Zellkern, Zellrandbereiche und netzartige Strukturen konzentriert. Für *atPSD1* und *atPSD2* wurden nach Abgleich mit den GFP-Positivkontrollen Hinweise auf eine membrangebundene Position am Endoplasmatischen Retikulum, dem Zellkern und dem Tonoplasten gefunden. Da alle bisher näher untersuchten PS Decarboxylasen membranständige Enzyme darstellen (Voelker, 1997), was auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Proteinexpression und Enzymaktivität in der Pelletfraktion), können diese Zellkompartimente als mögliche Wirkungsorte der extramitochondrialen PS Decarboxylasen angeführt werden. Eine Lokalisation in Plastiden, Mitochondrien und Golgi-Apparat läßt sich dahingegen für diese Proteine ausschließen. Die Expression von GFP-markiertem PSD-Protein aller drei bekannter PSD-Gene von *Arabidopsis thaliana* bestätigte damit die bisherigen Erkenntnisse zur PSD-Lokalisierung in Eukaryonten, die bisher hauptsächlich an Hefe gewonnen wurden.

Überraschend war trotz identischen Vektors und gleichen Expressionssystems die stark unterschiedliche Intensität des GFP-Signals. Da diese Beobachtung in mehreren unabhängigen Versuchswiederholungen mit verschiedenen Plasmidpräparationen reproduzierbar war, können physiologische Effekte des transformierten Gewebes (ausgelöst durch z.B. leicht unterschiedliche Kulturbedingungen) oder der Versuchsbedingungen weitgehend ausgeschlossen werden. Eventuell haben die unterschiedlichen Bedingungen des jeweiligen Zellkompartimentes Einfluß auf die Faltung des Fusionsproteins und damit auf die Intensität des GFP-Signals. Weiterhin könnten Transkription, Translation und Faltung des GFP-Proteins durch die jeweils verschiedenen PSD-Sequenzen beeinflusst werden. Es ist auffällig, daß die Expressionsstärke der GFP-Fusionsproteine der beobachteten Expressionsstärke der nativen, endogenen PSDs entsprachen. atPSD1-GFP wies die größte Signalintensität auf und konnte in einer Vielzahl transformierter Zellen dokumentiert werden. Im Northern Blot mit verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana* wurde *atPSD1* ebenfalls als die offenbar am stärksten exprimierte PSD nachgewiesen. atPSD2-GFP lieferte ein weitaus schwächeres Signal und es konnten weniger Transformanden dokumentiert werden. Im Northern Blot konnte kein Signal für *atPSD2* gefunden werden, was für eine schwache oder nur unter bestimmten Umständen eintretende Expression spricht. Für atPSD3-GFP waren nur sehr schwache

Signale bei einer sehr geringen Zahl an Transformanten detektierbar. Für dieses Gen konnte in dieser Arbeit kein Signal im Northern Blot ermittelt werden. Untersuchungen an der sequenzähnlichen *lePSD1* bestätigten auch dort die extrem schwache Expression dieser mitochondrialen PS Decarboxylase, die erst durch quantitative RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Rontein *et al.*, 2003). So könnte die in *Arabidopsis thaliana* herrschende Expressionsregulation der PSD-Gene womöglich trotz des gleichstarken Promotors auch auf die eingeschleusten Konstrukte wirken.

Bei diesen Betrachtungen ist zu berücksichtigen, daß die Lokalisierung mittels Expression von GFP-Fusionsproteinen als unterstützender, nicht jedoch als beweisender Ansatz herangezogen werden kann, da diese Technik stark von den jeweiligen Geräteparametern, der Dokumentationsmethodik und der Bewertung durch den Experimentator abhängt. Um fehlerhafte Eindrücke aus einzelnen Schnittebenen zu minimieren, wurden hier grundsätzlich dreidimensionale Bilder erstellt, um die Gesamtheit aller Bildebenen und damit der gesamten Zelle zu repräsentieren. Zudem wurden von jedem Ansatz stets mehrere exprimierende Zellen dokumentiert und bewertet. Da diese Bewertung jedoch durch den rein visuellen Vergleich mit den jeweiligen Positivkontrollen erfolgte, kann diese Methode nur begrenzt als Nachweisinstrument eingesetzt werden. Ein weiteres Risiko besteht in der Möglichkeit, daß das lange GFP-Protein die korrekte Lokalisation des fusionierten Proteins stört oder abgetrennt wird und damit an anderer Stelle detektiert wird. Daher sollte die Lokalisation von GFP-Proteinen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie im Kontext mit anderen Experimenten (z.B. Immunfluoreszenz Detektion an Gewebeschnitten), anderen Publikationen und Daten (z.B. Überprüfung auf Signalpeptide) betrachtet werden.

## 5.4 T-DNA-Insertionsmutanten *psd1* und *psd2*

Die mittels PCR und Southern Blot identifizierten Mutanten wurden durch Sequenzierung als auch durch die Southern Analyse der genomischen Restriktionsfragmente als homozygote *psd*-Mutanten bestätigt. Während die Southern Analyse und die Ergebnisse der PCR bei *psd1* auf das Vorliegen einer einzelnen T-DNA-Insertion in *atPSD1* hinweisen, liegt bei *psd2* vermutlich eine konkatomere T-DNA-Insertion vor. Derartige Insertionsereignisse sind nicht untypisch und haben für die physiologische Charakterisierung der Mutanten keine Relevanz. Hinweise auf weitere Insertionen im Genom liegen gemäß der Segregationsanalyse nicht vor, so daß die Anwesenheit von weiteren Insertionen und damit von Hintergrundmutationen nicht anzunehmen war. Daher wurde auf zeitintensive Rückkreuzungen der Einzelmutanten vor der Kreuzung verzichtet. Durch Untersuchungen anderer *psd*-Mutanten aus z.B. der Syngenta-Population ist die unabhängige Bestätigung des Phänotyps zusätzlich möglich.

### 5.4.1 Welche Bedeutung hat *atPSD2* für die Gesamt-PSD-Aktivität bei *Arabidopsis thaliana* ?

Überraschend war die offenbar stark unterschiedliche Expression, die *atPSD1* und *atPSD2* unter den Standardkulturbedingungen zeigten. Die mRNA von *atPSD1* konnte im Wildtyp im Gegensatz zu der von *atPSD2* in verschiedenen Geweben eindeutig nachgewiesen werden. In der *psd1/psd2*-Mutante und in der *psd1*-Mutante war dieses *atPSD1*-Transkript wie zu erwarten nicht mehr detektierbar. Die Abwesenheit des *atPSD1*-Transkriptes führte bei der *psd1/psd2*-Mutante und der *psd1*-Mutante zu einer rund 83 % schwächeren PSD-Aktivität als beim Wildtyp und der *psd2*-Mutante. Dahingegen konnte kein Unterschied zwischen den PSD-Aktivitäten des Wildtyps und der *psd2*-Mutante gefunden werden. Offenbar wird *atPSD2* unter den Kulturbedingungen nicht oder nur sehr schwach exprimiert und hat damit keinen oder nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamt-PSD-Aktivität von *Arabidopsis thaliana*. *atPSD2*-cDNA wurde mittels PCR aus

Einzelstrang-cDNA von *Arabidopsis thaliana* erfolgreich amplifiziert. Daher kann es sich nicht um ein Pseudogen handeln, das als nicht-exprimierte Kopie eines Genes definiert wird (<http://www.hospvd.ch/public/chuv/genmol/ssgm/bul/article/ssgm37d-5.htm>).

Womöglich ist die Expressionsstärke von *atPSD2* an bestimmte Wachstumsbedingungen oder Entwicklungsschritte gebunden. Zur Überprüfung dieser Annahme sind weitere PSD-Enzymtests und Northern Blots zur Ermittlung der *atPSD2*-Expression unterschiedlicher Entwicklungsstadien und unter Variation der Anzuchtbedingungen (z.B. Lichtstärke, Temperatur, Feuchte, Nährstoffe) erforderlich. Eventuell sind auch Expressionsstudien mit sensibleren Methoden (z.B. RT-PCR) erforderlich um das *PSD2*-Transkript in den Mutanten genau zu quantifizieren.

#### **5.4.2 Wodurch erfolgt die noch nachweisbare Decarboxylierung des PS-Substrates in der *psd1/psd2*- und *psd1*-Mutante ?**

In dieser Arbeit wurde mittels Northern und Southern Blot sowie Sequenzierung gezeigt, daß die Gene von *atPSD1*, bzw. *atPSD2* in den *psd1*- und *psd1/psd2*-Mutanten durch die T-DNA-Insertion unterbrochen sind und zumindest das Transkript von *atPSD1* in diesen Mutanten nicht mehr detektierbar ist. Bei den PSD-Enzymtests zeigte sich, daß die *psd1/psd2*-Mutante und *psd1*-Mutante in Bezug auf ihre PSD-Aktivität nicht voneinander zu unterscheiden sind. Beide weisen noch eine geringe PS-Substrat-Decarboxylierung auf, die etwa nur 17 % von der des Wildtyps beträgt. Diese Decarboxylierung ist nicht mehr nachweisbar, wenn die Proteinextrakte vor dem Enzymtest auf 95 °C erhitzt werden. Dies weist auf eine tatsächlich durch enzymatische Aktivität verursachte Substratdecarboxylierung hin, da diese Aktivität durch das Erhitzen zerstört werden kann. Eine Autodecarboxylierung des Substrates im Rahmen eines chemischen Zerfallsprozesses kann damit weitgehend ausgeschlossen werden. Mögliche Erklärungsansätze für diese Substratdecarboxylierung sind daher:

1. PSD-Aktivität der mitochondrialen PSD3
2. Substratdecarboxylierung durch andere zelluläre Decarboxylasen
3. Existenz weiterer PS-Decarboxylasen

Die beobachtete Decarboxylierung des Substrates könnte durch die mitochondriale PSD3 verursacht werden. Diese Annahme läßt sich anhand der vorliegenden Enzymaktivitätsdaten nicht stützen, da diese Tests mit einer microsomalen Fraktion durchgeführt wurden, bei der die Mitochondrien weitgehend entfernt wurden. Bei dem PSD-Enzymtest wird ein mikrosomaler Proteinextrakt aus Gesamtgewebe eingesetzt, der hauptsächlich Membranbestandteile der Plasmamembran, des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi Apparates und des Tonoplasten enthält. Damit wurden mit diesem Verfahren hauptsächlich die Aktivitäten extramitochondrialer PSDs ermittelt. Die in *psd1/psd2* beobachtete Restaktivität ist dementsprechend nicht oder nur zu geringem Teil mitochondrialer Herkunft. Dementsprechend ist die Aussagekraft der Enzymaktivitätsdaten zu *psd3* gering da auch hier hauptsächlich extramitochondriale PSD-Aktivitäten ermittelt wurden. Allerdings wurde jedoch von Rontein *et al.* (2003) Untersuchungen zur PSD-Gesamtaktivität und zur mitochondrialen PSD-Aktivität an einer sehr ähnlichen Mutante durchgeführt. Die dort untersuchte Mutantenlinie 508\_C12 weist die T-DNA-Insertion 66 bp vor dem Startcodon auf, während die hier verwendete *psd3*-Mutante mit der Bezeichnung 508\_C10 die Insertion 68 bp vor dem Startcodon aufweist. Die Untersuchungen zeigten, daß es sich bei 508\_C12 sogar um eine überexprimierende Mutante handelt. Demnach ist die mitochondriale PSD-Aktivität in dieser Mutante um das Neunfache gegenüber dem Wildtyp gesteigert, während der Lipidphänotyp und die Gesamt-PSD-Aktivität unverändert bleibt. Damit wird die Annahme gestützt, daß die

mitochondriale PSD offenbar nur sehr gering an der Gesamt-PSD-Aktivität bei *Arabidopsis thaliana* beteiligt ist.

Weitere Hinweise dafür ist die in dieser Arbeit bereits vermutete, geringe Expression von atPSD3, was durch die Untersuchungen von Rontein *et al.*, (2003) bestätigt wird, die für dieses Gen eine sehr niedrige Expressionsrate (mRNA Häufigkeit 1:10000) nachwies. Demnach ist PSD3 vermutlich nicht oder nur in sehr geringem Maße an der bei *psd1* und *psd1/psd2* beobachteten Substratdecarboxylierung beteiligt. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß es sich zumindest bei einem Teil der Restaktivität in der *psd1/psd2*-Mutante um PSD3-Aktivität, z.B. durch Verunreinigungen mit Mitochondrien, handelt. Hierzu besteht weiterer Klärungsbedarf, z.B. durch Enzymtests mit weiter fraktionierten Proteinextrakten.

Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß bei diesem Enzymtest Decarboxylasen aus anderen Zellkompartimenten aktiv sind, das Substrat umsetzen können. Dieser mögliche Nebeneffekt wurde bei der Entwicklung des Enzymtests durch Marshall und Kates weder näher untersucht oder diskutiert. Hinweise auf solche Nebenreaktionen in pflanzlichen Proteinextrakten in Anwesenheit von Serin und anderen Aminosäuren liegen jedoch bereits vor (Rontein *et al.*, 2001, Birecka *et al.* 1985). Daher ist dem Enzymtest besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

Der hier verwendete Test unterscheidet sich nur geringfügig von dem für Hefe etablierten System. Die *psd1/psd2*-Doppelmutante von *S. cerevisiae* zeigt in diesem klassischen PSD-Enzymtest nach Kanfer und Kennedy (1964) keine nachweisbare PSD-Aktivität mehr (Trotter *et al.*, 1995). Bei diesem klassischen Verfahren wird im wesentlichen ein Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) und eine Detergenz (Triton X-100) eingesetzt, wobei die Reaktion bei 36 °C stattfindet. Als Substrat kommt hauptsächlich Phosphatidyl-[1-<sup>14</sup>C]serin zum Einsatz. Der eigentliche Nachweis des Umsatzes erfolgt im klassischen Enzymtest durch Auffangen des abgespalteten und radioaktiv markierten CO<sub>2</sub> durch einen Filter, der anschließend im Szintillationszähler vermessen wird.

Der in dieser Arbeit verwendete PSD-Enzymtest unterscheidet sich im wesentlichen durch das Substrat 1,2,-dioleoyl-L-3-Phosphatidyl-L-[3-<sup>14</sup>C]serin, das damit radioaktiv markiertes Phosphatidylethanolamin anstelle von CO<sub>2</sub> liefert, sowie in der Methodik der Detektion (Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie). Es gibt jedoch Hinweise, daß die Art des Enzymtestes und insbesondere des Substrates eine wichtige Rolle bei der Ermittlung der PSD-Aktivität haben.

Bei Studien durch Rontein *et al.* (2003) ergaben sich bei Verwendung des löslichen Substrates 1-acyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]caproyl-phosphatidyl-[1'-<sup>14</sup>C]serin anstatt des membranständigen Phosphatidyl-L-[1'-<sup>14</sup>C]serin deutlich niedrigere PSD-Aktivitäten. Eventuell ist damit die Sensibilität und Spezifität der verschiedenen Testmethoden für Untersuchungen pflanzlicher PS Decarboxylasen von Bedeutung. Ob hier also diese Unterschiede im Substrat oder die komplexe Biochemie des Modellsystems *Arabidopsis thaliana* für die beobachtete Decarboxylierung verantwortlich sind, ist noch weiter zu untersuchen. So wären Enzymtests mit weiter fraktionierten Proteinextrakten und eventuell unter den verschiedenen Testsystemen mögliche Ansätze.

Für die Existenz weiterer PS Decarboxylase Gene in *Arabidopsis thaliana* gibt es bisher keinen Hinweis. Da *Arabidopsis thaliana* inzwischen vollständig durchsequenziert wurde, ist die genomweite Suche mittels Sequenzvergleich mit bekannten PS Decarboxylasen möglich. Diese ergab mit PSD-Genen aus verschiedenen Organismen keine weiteren PSD-Gene außer den drei bisher bekannten Sequenzen. Insbesondere der zum Teil stark konservierte C-Terminus, der bei allen bisher bekannten PSDs gefunden wurde, sollte weitere mögliche PSD-Gene mit großer Sicherheit identifizieren. Daher ist dieser Erklärungsansatz eher unwahrscheinlich.

### 5.4.3 Welche Bedeutung hat *atPSD3* für die Gesamt-PSD-Aktivität in *Arabidopsis thaliana* ?

Die Lage der T-DNA-Insertion in der Promotorregion der *psd3*-Mutante wurde durch Sequenzierung überprüft. Es war nicht möglich, dieses Transkript in der Mutante oder im Wildtyp über Northern Blot nachzuweisen, so daß der Nachweis für die tatsächlich in der Mutante unterbundene Expression noch aussteht. Durch den auch für den Wildtyp fehlenden Nachweis der *atPSD3*-Expression bleibt ungeklärt, ob *atPSD3* unter diesen Bedingungen überhaupt exprimiert wird. Damit fehlt wie auch bei *atPSD2* der Nachweis, daß die Insertion im Promotorbereich des *PSD3*-Genes die Transkription des Genes tatsächlich unterbindet. Die große Ähnlichkeit zu der durch Rontein *et al.* (2003) untersuchten Mutante (siehe 5.4.2) könnte sogar bedeuten, daß es sich auch hier um eine Überexpressionsmutante handelt. Da die Amplifikation der *atPSD3*-cDNA aus Einzelstrang-cDNA möglich ist, liegt auch hier wie im Fall von *atPSD2* kein Pseudogen vor. Allerdings ist es möglich, daß *atPSD3* generell nur einen geringen Anteil an der Gesamt-PSD-Aktivität hat oder aber nur unter bestimmten Umständen (Entwicklungsstadien, Wachstumsbedingungen) exprimiert wird. Die Studien von Rontein *et al.* (2003) zeigten, daß *atPSD3* in der von ihnen untersuchten *psd3*-Mutante noch exprimiert wird und aktiv ist. Tatsächlich wurde sogar in mitochondrialen Proteinextrakten eine neunfach stärkere PSD-Aktivität als im Wildtyp ermittelt. Dabei blieb jedoch der Lipidphänotyp und die PSD-Gesamtaktivität unverändert. Der in der Arbeit von Rontein *et al.* (2003) ermittelte PS-Anteil von rund 8,6 %, bezogen auf der Summe aus PS und PE in der *psd3*-Mutante und im Wildtyp deckt sich mit den hier ermittelten Werten für die Mutante 508\_C10. Die im Wildtyp nachgewiesene, geringe Expression der *atPSD3* mit einer Kopienhäufigkeit von 1:10000 durch Rontein *et al.* (2003) unterstützt die Deutung, daß nur ein geringer Anteil der mitochondrialen PSD an der Gesamt-PSD-Aktivität beteiligt ist. Dies überrascht insofern, als daß die mitochondriale PSD bei Hefe (*scPSD1*) dort den Hauptanteil an der Gesamt-PSD-Aktivität darstellt. Bis zu 96 % der zellulären Gesamt-PSD-Aktivität wird von der mitochondrialen *scPSD1* gestellt (Trotter und Voelker, 1994). Allerdings fehlen weitere Untersuchungen zu der PSD-Aktivität in anderen Eukaryonten so daß die Datenlage damit für allgemeine Aussagen noch unzureichend ist. Die Anwesenheit einer mitochondrialen PSD in Pflanzen läßt vermuten, daß analog zu den Hefe-Mitochondrien auch pflanzliche Mitochondrien auf eine interne PE-Versorgung angewiesen sind, die nicht durch Importe aus extramitochondrialen PE-Pools gedeckt werden kann. Allerdings sind für weitere Aussagen noch zusätzliche Experimente wie Expressionsstudien mittels RT-PCR und PSD-Enzymtests mit mitochondrialen Fraktionen an der hier verwendeten *psd3*-Mutante erforderlich. Aufgrund der Ähnlichkeit zu der von Rontein *et al.* (2003) untersuchten Mutante besteht das Risiko, daß es sich auch hier nicht um eine *PSD3*-defiziente Linie handelt, so daß die Durchmusterung anderer Mutantenpopulationen nach *psd3*-Mutanten mit T-DNA-Insertionen im ORF ein alternativer Ansatz wäre.

### 5.4.4 Warum bleiben die PS- und PE-Gehalte in den Mutanten unverändert ?

Bei der physiologischen Charakterisierung der *psd*-Mutanten waren keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp festzustellen. Das Gesamtfettsäuremuster wie das Fettsäuremuster von PE und PS sind unverändert. Das Mengenverhältnis von PS zu PE ist ebenfalls unverändert. Es beträgt in etwa 1:12 in allen Linien.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß *atPSD1* mit über 80 % den Hauptanteil an der extramitochondrialen Gesamt-PSD-Aktivität bei *Arabidopsis thaliana* stellt und aufgrund der geringen *PSD3*-Aktivität offenbar auch für den größten Anteil der zellulären PSD-Gesamtaktivität verantwortlich ist. Damit wäre unter der Annahme, daß die Decarboxylierung des Phosphatidylserins für einen Großteil des zellulären PE-Pools verantwortlich ist und dieser Stoffwechselweg nicht oder nur unzureichend durch

alternative Wege kompensiert werden kann, in der *psd1*- und *psd1/psd2*-Mutante zumindest eine Verschiebung des PS-PE-Verhältnisses zu erwarten. Da dies nicht auftritt, ist zu vermuten, daß die Decarboxylierung von Phosphatidylserin durch die Phosphatidylserin Decarboxylase unter den Standardkulturbedingungen keinen wesentlichen Beitrag zum Gesamt-PE-Pool liefert.

Damit würde dies die bisherige Lehrmeinung stützen, daß die PE-Synthese über CDP-Ethanolamin (Kennedy und Weiss, 1956) in Eukaryonten wie Hefe (Birner *et al.*, 2001), Pflanzen (Sparace *et al.*, 1981) und Säugetieren (Henneberry *et al.*, 2002) den Hauptweg für die PE-Synthese darstellt. Die Synthese über die PSD leistet demnach nur einen sehr kleinen Beitrag oder einen Anteil, der in den *psd*-Mutanten problemlos durch den CDP-Ethanolamin-Weg oder anderen Wegen ersetzt werden kann. Um dies zu überprüfen, müßte die PE-Synthese vor allem über den CDP-Ethanolamin-Weg in den Mutanten und im Wildtyp quantifiziert werden (z.B. Expressionsstudien und Enzymtests für die CDP-ethanolamin:1,2-diacylglycerol ethanolaminphosphotransferase). Es ist weiterhin möglich, daß die PE-Synthese über die PSD nur unter bestimmten Bedingungen relevant wird. Unter Stressbedingungen, bei bestimmten Entwicklungsschritten oder unter Mangelsituationen könnte dieser Weg eine bedeutendere Rolle bei der Synthese von Phosphatidylethanolamin einnehmen. So kann der Bedarf, bzw. die Verfügbarkeit von Ethanolamin eine Rolle spielen, das sowohl über die PSD als auch über die Decarboxylierung von freiem Serin synthetisiert werden kann (Mudd und Datko, 1989; Ronteil *et al.*, 2001). Die Verfügbarkeit von Ethanolamin hat direkten Einfluß auf die Produktion des osmoprotektiven Agens Glycinbetain und ist damit ein wichtiger Forschungszweig in der „grünen“ Gentechnik (Rontein *et al.*, 2002; Nuccio *et al.*, 1998). In der *psd3*-Mutante 508\_C12 zeigten sich dort trotz gesteigerter Expression und PSD-Aktivität ebenfalls keine Veränderungen in der Lipidkomposition der Mitochondrien was auf eine strenge Regulation der Lipidzusammensetzung; womöglich durch Veränderungen im PS-Import oder PE-Export, hinweist (Rontein *et al.*, 2003). Eventuell wirkt diese strenge Regulation nicht nur mitochondrial, sondern betrifft die gesamte Zelle. An Hefe konnte zudem gezeigt werden, daß die Stoffwechselwege zum PE nicht redundant sind. Obwohl auch dort der CDP-Ethanolamin-Weg vorhanden ist, führt ein Ausschalten der mitochondrialen *scPSD1* bereits zu einem deutlichen Lipidphänotyp. Allerdings ist in Hefe der mitochondriale PE-Gehalt generell sehr hoch (Tuller *et al.*, 1999) und die mitochondriale lokalisierte *scPSD1* macht zwischen 88 bis 96 % der gesamten zellulären PSD-Aktivität aus (Trotter und Voelker, 1994). In *Arabidopsis thaliana*, bei der die mitochondriale PSD-Aktivität nur einen marginalen Anteil einnimmt, sind derartig drastische Effekte bisher nicht zu beobachten. Letztlich wäre auch hier die Erzeugung einer Dreifachmutante hilfreich, um kompensatorische Effekte der verschiedenen PS Decarboxylasen untereinander restlos auszuschließen.

## 6 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden erste Grundlagen für die Erforschung eines noch weitgehend unbekanntes Bereiches der pflanzlichen Phospholipidbiosynthese gelegt. Mit den hier vorgestellten Ergebnissen und Mutanten bieten sich diverse Ansätze, um die Bedeutung und Funktion dieses Stoffwechselweges weiter zu klären. So wären Untersuchungen zur Expression und Aktivität der am Kennedy-Weg maßgeblich beteiligten Enzyme notwendig um zu klären, ob der Ausfall der PSD eine Kompensation bei der PE-Produktion durch diesen wichtigen Stoffwechselweg zur Folge hat. Die Erzeugung einer Dreifach-Mutante für alle *PSD*-Gene in *Arabidopsis thaliana* wäre ein weiterer Schritt, der zur Klärung dieser Fragestellung beiträgt. Allerdings ist bisher keine geeignete *psd3*-Mutante, bei der die Expression von *atPSD3* nachweislich unterbunden ist, bekannt. Die Arbeiten von Rontein *et al.* (2003) haben zudem gezeigt, daß die heterologe Expression und Komplementation pflanzlicher *PSD*-Gene in Hefemutanten grundsätzlich möglich ist. Auf Basis dieser Techniken wäre dies auch für die *PSD*-Gene von *A. thaliana* ein geeigneter Ansatz. Alternativ und ergänzend wären Versuche wie die Expression in Insektenzellen oder die Komplementation der *psd*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* möglich. Weitere Untersuchungen an den in dieser Arbeit beschriebenen *psd*-Mutanten wären Untersuchungen zur *PSD*-Expression, bzw. *PSD*-Aktivität unter Streßbedingungen, die vor allem der Frage nach der Bedeutung von *atPSD2* nachgehen würden. Untersuchungen der *PSD*-Aktivität unter den verschiedenen verfügbaren Testsystemen und mit weiter fraktionierten Proteinextrakten wären mögliche Ansätze um die Ursachen der hier noch beobachteten Substratdecarboxylierung in der Doppelmutante aufzuklären.