

Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie
Abteilung für Molekulare Pflanzenphysiologie
Arbeitsgruppe Peter Dörmann

**Die Rolle der Phosphatidylserin Decarboxylase für die
mitochondriale Phospholipid-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie“

eingereicht an der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Annika Nerlich

Potsdam, den 15.01.2007

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 Germany License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/> or send a letter to Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2007/1452/>
urn:nbn:de:kobv:517-opus-14522
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-14522>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Lipide	1
1.2 Biosynthese pflanzlicher Glycerolipide	2
1.3 Die Synthesewege von Aminophosphoglyceriden in Pflanzen	4
1.4 Transport von Phosphatidylserin vom ER zum Mitochondrium	5
1.5 Die Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD)	7
1.5.1 PSDs in verschiedenen Organismen	8
1.5.1.1 PSD in <i>Escherichia coli</i>	8
1.5.1.2 PSD in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.5.1.3 PSD in Pflanzen	9
1.6 Funktionen von PS und PE	10
1.7 Mitochondrien und deren Funktion	11
1.8 Zielsetzung	14
2. Materialien und Methoden	15
2.1 Geräte, Chemikalien, Kits und Enzyme	15
2.2 Synthetische Oligonucleotide	18
2.3 Plasmide und Konstrukte	19
2.4 Bakterienstämme	20
2.5 Pflanzenmaterial	20
2.6 Medien	21
2.7 Sequenzierungen und Sequenzanalysen	22
2.8 Molekularbiologische Methoden	22
2.8.1 Klonierungen	22
2.8.2 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.8.3 Southern Blot Analysen	23
2.8.4 Northern Blot Analysen	25
2.8.5 Semiquantitative real-time PCR	25
2.8.6 Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i> Blättern (Kurzprotokoll)	26
2.8.7 Amplifizierung von Genloci und Aufreinigung des PCR Produkts	26
2.8.8 Identifizierung von T-DNA Insertionsmutanten	27
2.8.9 Western Blot Analysen	27
2.8.10 Lokalisierungsstudien mit GFP-Konstrukten	28

2.9 Biochemische Methoden	28
2.9.1 Lipidanalysen.....	28
2.9.1.1 Lipidextraktion aus <i>A. thaliana</i>	28
2.9.1.2 Lipidextraktion aus Mitochondrien.....	29
2.9.1.3 Auftrennung der polaren Lipide über Dünnschichtchromatographie.....	29
2.9.1.4 Visualisierung und Lokalisierung der Lipide auf einer Dünnschichtplatte	29
2.9.1.5 Gaschromatographische Analyse von Fettsäuremethylestern	30
2.9.2 Isolation von Mitochondrien.....	30
2.9.3 Isolation von Protoplasten	31
2.9.4 Färbung von Mitochondrien mit MitoTracker® Orange.....	32
2.9.5 Konfokale Fluoreszenz Laserscanning Mikroskopie	32
2.9.6 PSD-Enzymtest	32
2.9.6.1 PSD-Enzymtest mit <i>A. thaliana</i>	32
2.9.6.2 PSD-Enzymtest mit <i>E. coli</i>	33
2.9.6.3 PSD-Enzymtest mit Mitochondrien.....	34
2.9.7 Extraktion von Nukleotiden und Analyse mit HPLC	34
2.9.8 Messung der Atmungsraten mit Sauerstoffelektrode	35
2.9.9 Alexander-Färbung.....	36
2.10 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
2.10.1 Induktion des Ethanol induzierbaren Promotors	36
2.10.2 Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	37
2.10.3 Infiltration von <i>A. thaliana</i> Blüten mit Jasmonsäure	37
2.10.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>A. thaliana</i>	37
2.11 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	37
3. Ergebnisse	39
3.1 Expression verschiedener PSDs in heterologen Systemen und in <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
3.1.1 Heterologe Expression von <i>atPSD2</i> und <i>atPSD3</i> in <i>E. coli</i>	39
3.1.2 Heterologe Expression von <i>atPSD2</i> und <i>atPSD3</i> in <i>S. cerevisiae</i>	40
3.1.3 Charakterisierung transgener <i>Arabidopsis</i> Überexpressionslinien	41
3.1.3.1 Überexpression von <i>atPSD3</i> in <i>Arabidopsis</i> Col-0 Wildtyppflanzen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors	42
3.1.3.2 Überexpression von <i>atPSD3</i> in <i>Arabidopsis</i> Col-0 Wildtyppflanzen unter Kontrolle eines ethanolinduzierbaren Promotors	42
3.1.3.3 Überexpression von <i>ppPSD</i> in <i>Arabidopsis</i> Col-0 Wildtyppflanzen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors	42
3.2 Subzelluläre Lokalisierung der Phosphatidylserin Decarboxylasen aus <i>Arabidopsis</i>	43
3.3 Expressionsanalyse von <i>atPSD1</i> , <i>atPSD2</i> und <i>atPSD3</i> in verschiedenen Geweben	44
3.4 Isolation der T-DNA Insertionsmutanten <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	45
3.4.1. Isolation der T-DNA Insertionsmutante <i>psd1</i>	45

3.4.2 Isolation einer <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante.....	45
3.5 Southern Blot Analyse der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante	47
3.6 PSD Genexpressionsanalyse in <i>psd1</i> , <i>psd2-1</i> und <i>psd3-1</i>	48
3.7 PSD-Enzymtest mit <i>psd1</i> und der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante.....	50
3.8 Phänotypische Charakterisierung der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante.....	52
3.8.1 Bestäubungsversuche.....	53
3.8.2 Veränderte Blütenmorphologie der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Mutante	53
3.8.3 Pollenvitalitätstest der <i>psd</i> Dreifachmutante	55
3.8.4 Samenbildung in Schoten der <i>psd</i> Dreifachmutante.....	56
3.9 Lipidanalysen.....	57
3.9.1 Lipidkomposition in Blättern und Blüten von Col-0 und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	57
3.9.1.1. Fettsäuremuster von PE und PS aus Blättern und Blüten von Col-0 und <i>psd1psd2-1psd3-1</i> .	58
3.9.2 Lipidanalyse isolierter Mitochondrien	60
3.10 Charakterisierung der Mitochondrien und deren Funktionalität in <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Mutanten.....	61
3.10.1 Analyse der Anzahl der Mitochondrien in <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Mutanten.....	61
3.10.2 Keimungsrate von <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i> bei 21 % und 1 % Sauerstoff.....	63
3.10.3 Messung der Atmung von <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Keimlingen.....	64
3.10.4 Messung des ADP/ATP-Verhältnisses.....	65
3.10.5 Mitochondrien-Ultrastruktur in <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	66
3.10.6 Expressionsanalyse kerncodierter Komplex I Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette	67
3.11 Komplementationsanalysen der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante	68
3.11.1 Transformation der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante mit <i>atPSD1</i>	68
3.11.1.1 Untersuchung der Pollen von WT Col-0, <i>psd1</i> , <i>psd1psd2-1psd3-1</i> und <i>atPSD1-psd1psd2-1psd3-1</i>	69
3.11.2 Transformation der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante mit <i>atPSD3</i>	70
3.12 Homöotische Gene in der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante	71
3.12.1 Expressionsanalyse von homöotischen Genen der Blütenbildung	71
3.12.2 Überexpression von <i>APETALA3</i> in <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	73
3.13 Isolation und Charakterisierung einer zweiten <i>psd1psd2-2psd3-2</i> Mutante	74
3.13.1 Isolation und Charakterisierung der <i>psd1psd2-2psd3-2</i> Mutante	74
3.13.2 Expressionsanalyse von <i>APETALA3</i> in <i>psd1psd2-2psd3-2</i>	75
4. Diskussion	77
4.1 Funktionalität und subzelluläre Lokalisierung einzelner PSDs.....	77
4.1.1 Die Gene <i>atPSD1</i> , <i>atPSD2</i> und <i>atPSD3</i> codieren für funktionale Phosphatidylserin Decarboxylasen.....	77

4.1.2 <i>at</i> PSD1 ist am Mitochondrium, <i>at</i> PSD2 am Tonoplasten und <i>at</i> PSD3 am ER lokalisiert.....	79
4.2 Charakterisierung der <i>psd</i> Mutanten	79
4.3 Der Blütenphänotyp der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Mutante und mögliche Ursachen	81
4.3.1 Der Einfluss von Jasmonsäure auf die Blütenmorphologie.....	81
4.3.2 Der Einfluss der Mitochondrien auf die Blütenmorphologie	82
4.3.3 Der Einfluss von homöotischen Genen auf die Blütenmorphologie.....	85
4.4 Einfluss des T-DNA Insertionsvektors pD991-AP3 auf den Blütenphänotyp.....	86
4.4.1 Mehrere Faktoren führen zum Blütenphänotyp der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Mutante	89
5. Zusammenfassung.....	90
6. Ausblick.....	91
7. Literatur	92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Eukaryotischer und prokaryotischer Biosyntheseweg der Glycerolipide	3
Abb. 2: Synthesewege der Aminophosphoglyceride	5
Abb. 3: Translokation und Decarboxylierung von PS in Säugerzellen	6
Abb. 4: Die Reaktion der Phosphatidylserin Decarboxylase	7
Abb. 5: Phylogenetischer Baum der PSDs aus verschiedenen Organismen	9
Abb. 6: Schematische Darstellung des mitochondrialen Energiestoffwechsels	12
Abb. 7: PSD-Aktivitätstest mit Proteinen aus transformierten EH150 Zellen	40
Abb. 8: Komplementation der Hefe <i>psd1psd2</i> Doppelmutante mit <i>Arabidopsis PSD</i> cDNAs	41
Abb. 9: GFP Lokalisierungsstudien von <i>atPSDs</i> in Blattepidermiszellen von <i>A. thaliana</i>	43
Abb. 10: Expressionsanalyse der <i>PSD</i> Gene in verschiedenen Geweben von <i>A. thaliana</i>	44
Abb. 11: Lokalisierung der T-DNA innerhalb der <i>psd</i> Mutanten Linien	46
Abb. 12: Southern Blot Analyse zur Identifizierung der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Dreifachmutante	48
Abb. 13: PSD Expressionsanalyse in <i>psd1</i> , <i>psd2-1</i> , <i>psd3-1</i> und <i>psd2-1psd3-1</i> Mutanten	49
Abb. 14: PSD Enzymtest mit Proteinen aus Mikrosomen und aus Mitochondrien	50
Abb. 15: Der Umsatz von PS zu PE in verschiedenen <i>psd</i> Mutanten	51
Abb. 16: Wachstumsphänotyp aller <i>psd</i> Mutanten	52
Abb. 17: Schotenbildung der <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Mutante und im WT Col-0	52
Abb. 18: Blütenphänotyp der <i>psd</i> Dreifachmutante	54
Abb. 19: Vitalitätstest für Pollen (Alexander-Färbung) in Col-0 und der <i>psd</i> Dreifachmutante	55
Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollen aus Col-0 und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	56
Abb. 21: Samenbildung in Schoten von Col-0 und der <i>psd</i> Dreifachmutante	57
Abb. 22: Lipidzusammensetzung in Blättern und Blüten von Col-0 und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	58
Abb. 23: Phospholipidzusammensetzung der Mitochondrien aus Col-0, <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	60
Abb. 24: Anzahl der Mitochondrien in Protoplasten von WT Col-0, <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	62
Abb. 25: Immunodetektion von Cytochrom C in <i>psd</i> Mutanten	63
Abb. 26: Keimungsrate verschiedener <i>psd</i> Mutanten bei 21 % und 1 % Sauerstoff	64
Abb. 27: Atmungsraten von Col-0, <i>Ws</i> , <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Keimlingen	65
Abb. 28: ATP/ADP-Verhältnis in Col-0, <i>Ws</i> , <i>psd1</i> und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	66
Abb. 29: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur von Mitochondrien	67
Abb. 30: Expressionsanalyse kerncodierter Untereinheiten des Komplexes I in Mitochondrien	68
Abb. 31: Komplementation der <i>psd</i> Dreifachmutante mit <i>atPSD1</i>	69
Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Staubblättern (A) und Pollen (B) von WT Col-0 (1), <i>psd1</i> (2), <i>psd1psd2-1psd3-1</i> (3) und <i>atPSD1-psd1psd2-1psd3-1</i> (4)	70
Abb. 33: Komplementation der <i>psd</i> Dreifachmutante mit <i>atPSD3</i>	71
Abb. 34: Organisation der Blüte in Wirteln (A) und das ABC-Model (B)	72
Abb. 35: Northern Blot Analyse zur Expression von <i>APETALA3</i> , <i>PISTILATA</i> und <i>AGAMOUS</i> in verschiedenen <i>psd</i> Mutanten und Wildtypen	72
Abb. 36: Blüte einer mit <i>AP3</i> transformierten <i>psd1psd2-1psd3-1</i> Mutante	74

Abb. 37: Blüten von Col-0 und der <i>psd1psd2-2psd3-2</i> Mutante	75
Abb. 38: Expression von <i>APETALA3</i> in verschiedenen <i>psd</i> Mutanten	75
Abb. 39: Sequenzvergleich des Vektors pD991-AP3 mit dem Gen <i>APETALA3</i>	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Kreuzungsschema der Kreuzung von <i>psd2-1psd3-1</i> mit <i>psd1</i>	46
Tab. 2: Fettsäurezusammensetzung von PE und PS in Col-0 und <i>psd1psd2-1psd3-1</i>	59

Abkürzungsverzeichnis

2D-DC	zweidimensionale Dünnschichtchromatographie
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADP / ATP	Adenosindi- / -tri-phosphat
AMÖZ	<i>Arabidopsis</i> -Medium ohne Zucker
<i>AP3</i>	<i>APETALA3</i>
<i>at / A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BE	Basenaustauschenzym
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
<i>bs</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CL	Cardiolipin
CMP / CDP / CTP	Cytidin- / Mono- / Di- / Triphosphat
CMS	cytoplasmic male sterility (cytoplasmatisch männliche Sterilität)
CoA	Coenzym A
<i>coi1</i>	<i>coronatine insensitive1</i>
Col-0	Columbia 0 (Ökotyp von <i>Arabidopsis</i>)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
<i>dad1</i>	<i>defective in anther dehiscence1</i>
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleinsäuretriphosphat
<i>ec / E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence Tag (exprimierte Sequenz)
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
Ex	Extine
<i>fad</i>	<i>fatty acid desaturase</i>
GC	Gaschromatographie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HPLC	high pressure liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
In	Intine
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonic acid (Jasmonsäure)
LA	Linolenic acid (Linolensäure)

LB	Luria Bertani Medium (Anzucht von <i>E. coli</i>)
<i>le</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Lk	Lipidkörperchen
MAM	Mitochondrien assoziierte Membran
MCS	Multi cloning site (Multi-Klonierungsstelle)
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Murashige und Skoog (Anzuchtmedium für <i>Arabidopsis</i>)
NAD / NADH	Nicotinamadenindinukleotid / reduzierte Form
n.d.	nicht detektierbar
PA	Phosphatidic acid (Phosphatidsäure)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
<i>PI / pi</i>	<i>PISTILLATA</i>
PS	Phosphatidylserin
PSD	Phosphatidylserin Decarboxylase
PSS	Phosphatidylserin Synthase
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>sc / S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDC	Serin Decarboxylase
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SL	Sulfolipid (Sulfochinovosyldiacylglycerol)
T-DNA	Transfer-DNA
UDP	Uridin-Diphosphat
Ws	Wassilewskjia (Ökotyp von <i>Arabidopsis</i>)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Lipide

Lipide sind wasserunlösliche, hydrophobe, organische Moleküle und wichtige Grundbausteine lebender Organismen. Auf Grund ihrer Vielfältigkeit können spezielle Lipide spezifische Aufgaben erfüllen. Zum Beispiel sind Chlorophylle und Carotinoide als photosynthetische Pigmente an der Umsetzung von Lichtenergie in chemische Energie bzw. als Schutz vor überschüssiger Energie beteiligt. Vitamin K, als ein weiteres Beispiel, fungiert als Cofaktor oder Elektronenträger. Weitere Lipide besitzen Funktionen als Transporter (Dolichole), als Signalmoleküle (Diacylglycerol) oder zählen zu den Phytohormonen (Jasmonsäure). In pflanzlichen Samen dient das Acyl-Lipid Triacylglycerol als Kohlenstoff- und Energiespeicher. Die in Acyl-Lipiden enthaltenen Fettsäuren werden zur Energiegewinnung durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut und im Citrat-Zyklus zu CO_2 und Wasser umgesetzt. Eine der wichtigsten Vertreter der Lipide umfaßt die Gruppe der Membranlipide. Membranlipide sind amphipatische Moleküle, das heißt sie sind aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil aufgebaut. Diese Eigenschaft ist die Voraussetzung zur Bildung einer Lipiddoppelschicht, der Grundstruktur von Membranen. Neben Lipiden enthalten Membranen auch Proteine, wobei das Protein-Lipid-Verhältnis Unterschiede aufweisen kann. Die Lipidzusammensetzung beeinflusst die Membraneigenschaften und variiert stark. Aufgrund der Diversität der Lipide ist es der Zelle möglich, eine geeignete Umgebung für die Funktion der vielen verschiedenen Membranproteine zu schaffen. So können Membranproteine am Aufbau eines elektrochemischen Membranpotentials, am Stofftransport über eingebettete Kanäle oder als Transportproteine an Transportprozessen beteiligt sein. Mit der Membran assoziierte Rezeptoren können bei der Signaltransduktion von Bedeutung sein. Die Ausbildung von Membranen dient einerseits der Abgrenzung von Zellen und andererseits der Bildung von funktionell spezialisierten Bereichen, den Kompartimenten. Die Membran stellt eine selektive Barriere für andere Moleküle dar und wird im Modell als flüssig-kristalline Struktur beschrieben (Singer *et al.*, 1972). Dieses „Flüssig-Mosaik-Modell“ besagt, dass die Membranbestandteile, Lipide und Proteine, in der Membranebene lateral diffundieren, rotieren sowie sich von einer Membranseite auf die andere bewegen können. Die Membranlipide setzen sich aus

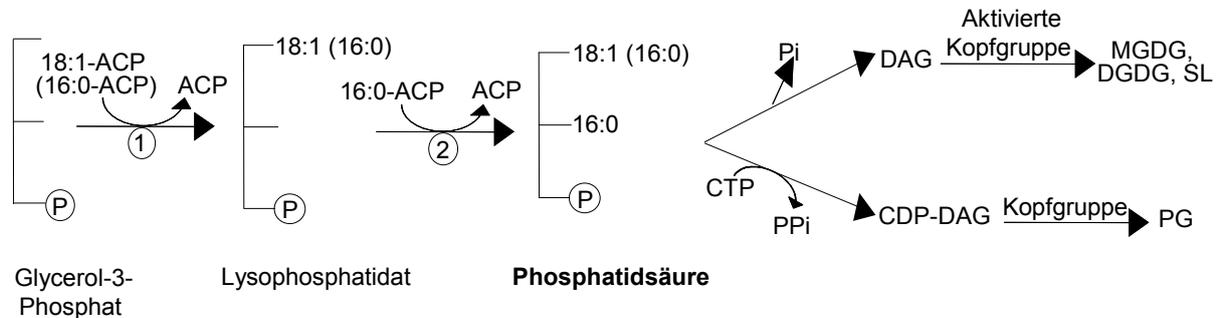
folgenden Lipidklassen zusammen: Phosphoglycerolipide, Glykoglycerolipide, Sterollipide und Sphingolipide. Die verschiedenen Glycerolipide unterscheiden sich in den Kopfgruppen und in ihrer Fettsäurezusammensetzung. Die Fettsäuren, die aus langen Kohlenwasserstoffketten und einer Carboxylgruppe bestehen, bilden den hydrophoben Anteil der amphipatischen Moleküle. Die Anzahl der ungesättigten Bindungen bestimmt die Fluidität der Membran. Gesättigte Fettsäuren können sich eng aneinander lagern, Doppelbindungen verursachen einen „Knick“ und stören so die regelmäßige Packung, was zu einer Herabsetzung des Schmelzpunktes führt. Die wichtigsten Vertreter der pflanzlichen Fettsäuren sind Palmitinsäure (16:0), Palmitoleinsäure (16:1 Δ^{3t}), Hexadecatriensäure (16:3 $\Delta^{7,10,13c}$), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1 Δ^{9c}), Linolsäure (18:2 $\Delta^{9,12c}$) und α -Linolensäure (18:3 $\Delta^{9,12,15c}$). Die erste Zahl in den Klammern gibt die Anzahl der Kohlenstoffatome und die zweite Zahl die Anzahl der Doppelbindungen an. Die hochgestellten Zahlen geben die Lage der Doppelbindungen wieder, dabei steht c für *cis*- und t für *trans*-Konfiguration. Von den Vertretern der Glycerolipide stellen die Glykoglycerolipide (Galaktolipide, Sulfolipid) in Pflanzen den größten Anteil an Lipiden in Thylakoidmembranen der Chloroplasten dar. Extraplastidäre Membranen sind dagegen hauptsächlich aus Phosphoglycerolipiden (Phospholipiden) aufgebaut.

1.2 Biosynthese pflanzlicher Glycerolipide

Glycerolipide bestehen aus zwei Fettsäuren, verestert an der sn-1 und sn-2 Position des Glycerols, und einer polaren Kopfgruppe an der sn-3 Position. Dabei sind spezielle Fettsäuren an den sn-1 und sn-2 Positionen der unterschiedlichen Lipidklassen zu finden (Heinz, 1977). Die Glycerolipidsynthese in Pflanzen erfolgt hauptsächlich in den Chloroplasten und im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Bedingt durch die unterschiedlichen Substratspezifitäten der Enzyme (Acyltransferasen), die bei der Acylierung des Glycerolrückgrats eine Rolle spielen, lassen sich die entstandenen Glycerolipide in zwei Gruppen einteilen. Die „prokaryotischen“ Glycerolipide, die hauptsächlich C18 Fettsäuren und zu einem geringen Anteil C16 an der sn-1 Position und nur C16 an der sn-2 Position enthalten, werden im Chloroplast synthetisiert. Die „eukaryotischen“ Glycerolipide mit C18 an der sn-1 und sn-2 Position und zu einem geringen Anteil C16 an der sn-1 Position

werden im ER synthetisiert (Roughan und Slack, 1982; Browse *et al.*, 1986). Die ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, typisch für pflanzliche Lipide, werden durch Desaturasen im Chloroplasten und ER gebildet (Browse und Somerville, 1991; Heinz, 1993).

Prokaryotischer Syntheseweg (im Chloroplasten)



Eukaryotischer Syntheseweg (in extraplastidären Membranen)

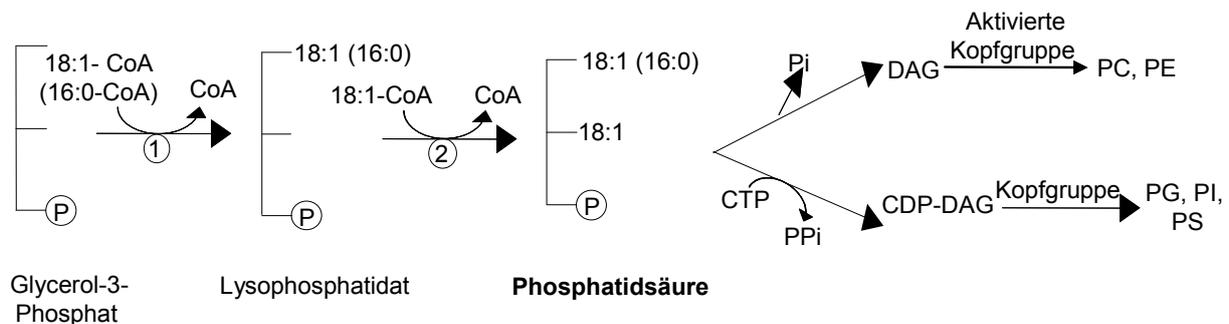


Abb. 1: Eukaryotischer und prokaryotischer Biosyntheseweg der Glycerolipide

(nach Ohlrogge und Browse, 1995)

Glycerol-3-Phosphat wird über Lysophosphatidat zu Phosphatidat acyliert. Dabei übertragen Acyltransferasen die Fettsäuren auf das Glycerolrückgrat. Im prokaryotischen Syntheseweg ist Acyl-Acyl-Carrier-Protein (Acyl-ACP) der Fettsäuredonor, im eukaryotischen Weg ist Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA) der Donor. Die Phospholipidsynthese erfolgt über den CDP-Diacylglycerol- (CDP-DAG) Weg oder über den Diacylglycerol- (DAG) Weg. CDP, Cytidin-Diphosphat; 1: Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase; 2: Lysophosphatidat Acyltransferase; 16:0, Palmitat; 18:0, Stearat; 18:1, Oleat.

Bei der Glycerolipidsynthese (Abb. 1) wird Glycerol-3-Phosphat durch zwei aufeinanderfolgende Acylierungsschritte zunächst zu Lysophosphatidat und dann zu Phosphatidat umgesetzt. Dabei werden Fettsäuren durch Acyltransferasen (Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase, Lysophosphatidat Acyltransferase) auf Glycerol-3-Phosphat übertragen. Bei dem prokaryotischen Syntheseweg ist das Acyl-Acyl-Carrier-Protein (Acyl-ACP) der Fettsäuredonor, im eukaryotischen Syntheseweg ist

dies Acyl-Coenzym A (-CoA). Eine spezifische Phosphatase synthetisiert durch Abspaltung der Phosphatgruppe der Phosphatidsäure Diacylglycerol (DAG). Durch die Reaktion mit Cytidin-5-triphosphat (CTP) entsteht CDP-DAG (Cytidin-5-diphosphat-DAG). Die Aktivierung mit einem Nukleotid stellt die erforderliche Energie für die Übertragung der polaren Kopfgruppe während der *de novo* Synthese der Glycerolipide zur Verfügung. CDP-DAG dient als Substrat zur Lipidsynthese der Phospholipide Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylglycerol (PG). Für die Synthese von Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG) und Sulfochinovosyldiacylglycerol (SL) dient DAG als Akzeptor der als CDP-Cholin, CDP-Ethanolamin, UDP-Galaktose oder UDP-Sulfochinovose vorliegenden aktivierten Kopfgruppen. Digalaktosyldiacylglycerol (DGDG) entsteht durch den Transfer von Galaktose auf ein MGDG Molekül, mit UDP-Galaktose als Donor (Joyard *et al.*, 1993, Kelly *et al.*, 2003).

1.3 Die Synthesewege von Aminophosphoglyceriden in Pflanzen

Die Komplexität der Glycerolipidsynthese ergibt sich daraus, dass die Fettsäuren in Chloroplasten und die Kopfgruppen in hydrophilen Kompartimenten der Zelle, also im Cytosol synthetisiert werden und der Zusammenbau der Phospholipide vorwiegend im ER erfolgt (Moore, 1982). Die häufigsten Phospholipide, die im ER synthetisiert werden, sind PC, PE, PI, PS und PA. Davon sind PS, PE und PC Aminophosphoglyceride, d.h. sie besitzen eine Aminogruppe. Die Synthese von PS, PC und PE ist in Pflanzen aufgrund verschiedener Biosynthesewege und Umwandlungsprozesse sehr komplex. PC und PE werden hauptsächlich über den sogenannten „Kennedy-Weg“ gebildet. Dabei wird die Phosphoethanolamingruppe des CDP-Ethanolamins bzw. Phosphocholingruppe des CDP-Cholins, auf DAG übertragen (Abb. 2, unterbrochene Pfeile; Kennedy und Weiss, 1956; Weiss *et al.*, 1958). Die Vorstufe von CDP-Ethanolamin ist L-Serin, welches über mehrere Zwischenschritte, unter anderem über die Decarboxylierung von Serin zu Ethanolamin mittels Serin Decarboxylase (SDC), zu CDP-Ethanolamin umgewandelt wird (Rontein *et al.*, 2001). Zudem kann die Synthese von PE über die Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD) katalysierte Decarboxylierung von PS

erfolgen (Rontein *et al.*, 2003). Das in geringen Anteilen vorkommende PS wird aus L-Serin über den CDP-DAG Weg gebildet. Diese Synthese wird durch die PS Synthase (PSS) katalysiert, welche bisher in Pflanzen nur aus Weizen isoliert wurde (Delhaize *et al.*, 1999). Da in *Arabidopsis thaliana* bisher kein Ortholog mit Sequenzähnlichkeit zur PSS aus Weizen identifiziert werden konnte, wurde angenommen, dass ein alternativer Weg der PS Synthese besteht. Dieser wurde durch Shin und Moore (1990) bei Untersuchungen an *Ricinus communis* identifiziert. Dabei katalysiert ein Basenaustauschenzym (BE) den reversiblen Austausch der Kopfgruppe von PE gegen L-Serin. In Abb. 2 ist eine Übersicht der beschriebenen Synthesewege dargestellt.

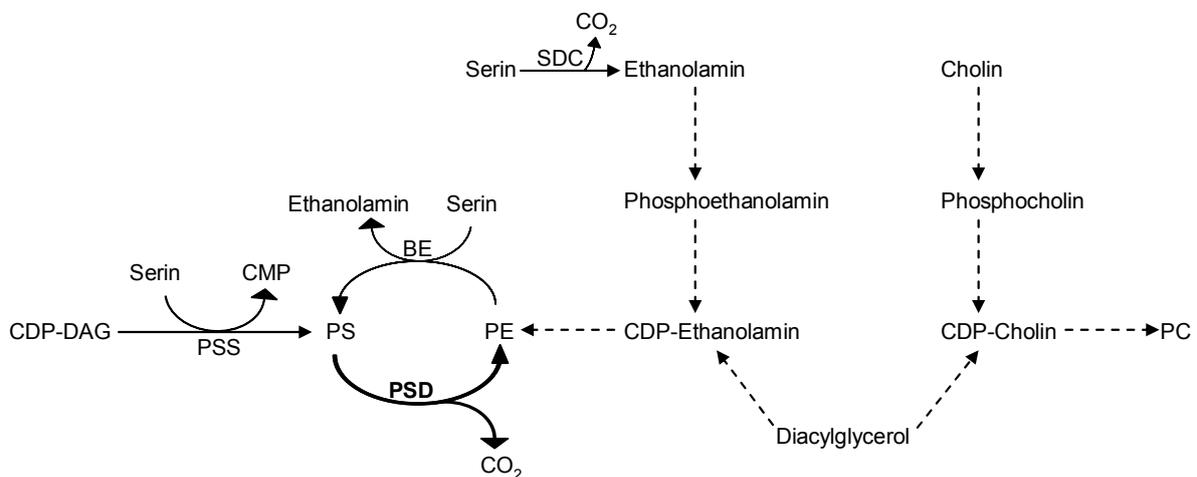


Abb. 2: Synthesewege der Aminophosphoglyceride

Die wichtigsten Syntheseschritte der Umwandlung der Aminophosphoglyceride (abgewandelt nach Rontein *et al.*, 2003). Erläuterungen siehe Text.

1.4 Transport von Phosphatidylserin vom ER zum Mitochondrium

Für die Entstehung und das Wachstum neuer Organellen müssen synthetisierte Lipide innerhalb der Zellen verteilt werden (Bell *et al.*, 1981). Als Beispiel soll die Translokation von PS angeführt werden (Abb. 3).

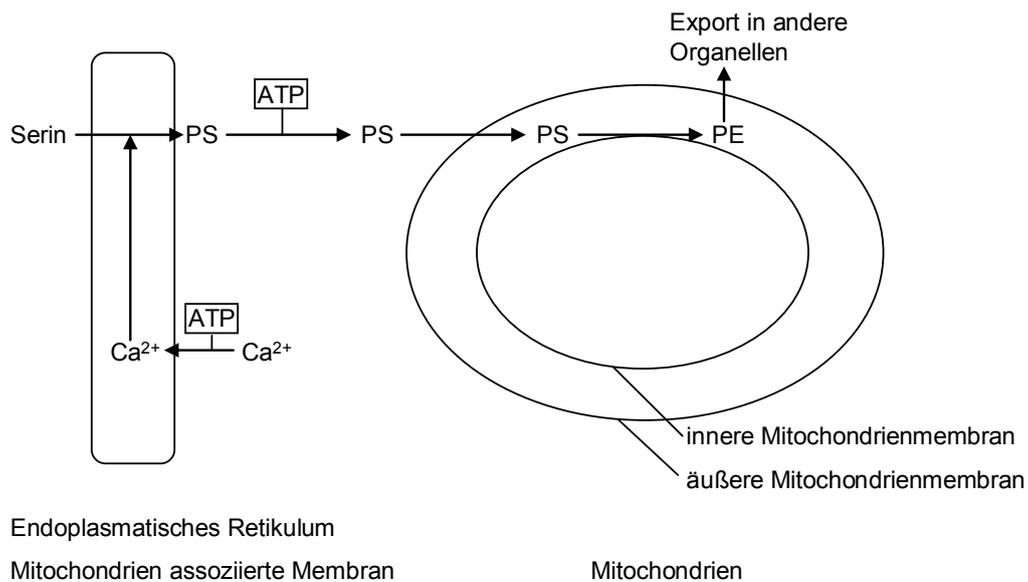


Abb. 3: Translokation und Decarboxylierung von PS in Säugerzellen

(nach Voelker, 2000)

PS wird im ER (Vance und Vance, 1988) oder in einem Subkompartiment des ER, der Mitochondrien assoziierten Membran (MAM), synthetisiert (Vance, 1990). Die Synthese von PS im ER ist an den ATP-abhängigen Ca²⁺-Import in das ER-Lumen gekoppelt (Matsumoto *et al.*, 1985). Das synthetisierte PS wird aus dem ER zu den Mitochondrien transportiert. Eine maßgebliche Rolle für diesen Transport spielt die MAM, welche Kontaktstellen zum Mitochondrium ausbildet. Gleichzeitig bilden diese Kontaktstellen Verbindungen zwischen MAM und innerer sowie äußerer Mitochondrienmembran (Ardail *et al.*, 1991; Ardail *et al.*, 1993). In Säugerzellen erfolgt der Import von PS aus der MAM in die Mitochondrien über einen ATP-abhängigen Schritt (Shiao *et al.*, 1995). Dieser Schritt kann in Hefe ohne ATP erfolgen (Achleitner *et al.*, 1999). Die Ursache für den Unterschied im Bedarf an Nukleotiden zwischen diesen beiden Vertretern der Eukaryoten ist Gegenstand weiterer Forschung. In die Mitochondrien importiertes PS gelangt zur inneren Mitochondrienmembran und wird durch die dort lokalisierte Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD) zu PE decarboxyliert (Voelker, 1984; Voelker, 1989). Das im Mitochondrium synthetisierte PE ist für dessen Funktionalität essentiell (Birner *et al.*, 2001; Storey *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass im ER synthetisiertes PE das mitochondrial gebildete PE nicht ersetzen kann und demzufolge wird wahrscheinlich auch kaum PE aus dem ER in Mitochondrien importiert (Birner *et al.*, 2001; Storey *et al.*, 2001; Trotter und Voelker, 1995). In Mitochondrien synthetisiertes PE hingegen

kann in andere Organellen exportiert werden und so den zellulären Bedarf an PE decken (Voelker, 2000). Neben PE kann auch PA in Mitochondrien synthetisiert werden. Dort dient PA als Vorstufe für mitochondriales PG und Cardiolipin (CL) (Chakraborty *et al.*, 1999). Die beiden mitochondrial gebildeten Phospholipide verbleiben im Mitochondrium.

1.5 Die Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD)

Auf die im vorhergehenden Abschnitt erwähnte Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD) soll hier näher eingegangen werden. Dieses Enzym (EC-Nummer 4.1.1.65; systematischer Name Phosphatidyl-L-serin-carboxy-lyase) ist für die Synthese von PE aus PS in Pro- und Eukaryoten von Bedeutung (Abb. 4). Der Syntheseweg von PE über die PS-Decarboxylierung mittels PSD wurde 1964 durch Kanfer und Kennedy erstmals beschrieben.

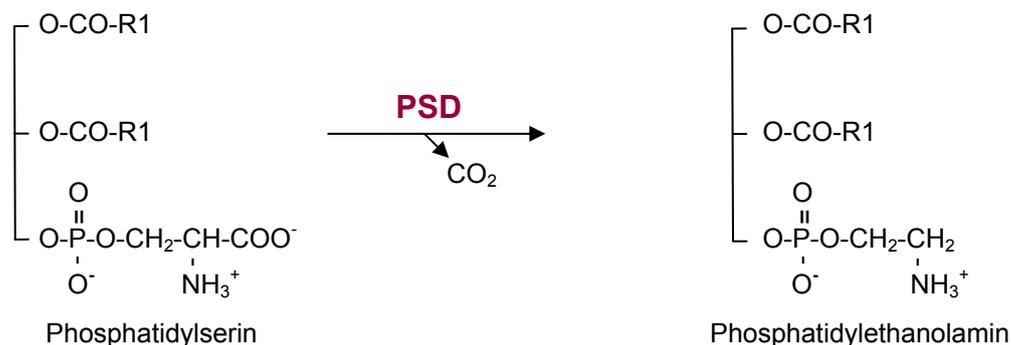


Abb. 4: Die Reaktion der Phosphatidylserin Decarboxylase

Die PSD katalysiert die Decarboxylierung von PS zu PE.

Die PSDs gehören zu einer kleinen Familie von Decarboxylasen, die anstelle der weitaus verbreiteteren Pyridoxalphosphat-Gruppe eine Pyruvoyl-Gruppe als prosthetische Gruppe tragen (Li und Dowhan, 1988). Alle bekannten PSDs sind integrale Membranproteine, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen. Im nativen Enzym lagern sich diese zu einem Heterodimer oder Multimer zusammen (Dowhan *et al.*, 1974). Untersuchungen zur Prozessierung der PSD erfolgten mit dem Enzym aus *E. coli*. Das bakterielle Gen codiert für ein Proenzym (36 kDa), das in Untereinheiten gespalten wird (7,3 kDa und 28,7 kDa, Voelker, 1997). Die Spaltung in die beiden Untereinheiten erfolgt autokatalytisch zwischen Glycin-253 und Serin-

254, wobei das Serin zur Pyruvoyl-Gruppe umgewandelt wird. Diese beiden Aminosäuren liegen innerhalb eines LGST-Motivs (Lysin, Glycin, Serin, Threonin), das für viele PSDs charakteristisch ist, z.B. PSD1 und PSD2 in *A. thaliana* (von Orlow, 2003), PSD1 in Hefe (Hackert und Pegg, 1998) sowie PSD in *Escherichia coli* (Hackert und Pegg, 1998). Ausnahmen zum LGST-Motiv sind das MGST-Motiv (Methionin, Glycin, Serin, Threonin), z.B. von PSD3 in *A. thaliana* (von Orlow, 2003) und das GGST-Motiv (Glycin, Glycin, Serin, Threonin), z.B. von PSD2 in Hefe (Hackert und Pegg, 1998).

1.5.1 PSDs in verschiedenen Organismen

Die PSD codierenden Gene kommen ubiquitär, jedoch in den verschiedenen Organismen in unterschiedlicher Anzahl vor. Die meisten Erkenntnisse über die PSD wurden durch Untersuchungen an *E. coli* (Hawrot und Kennedy, 1975, 1976, 1978) und *Saccharomyces cerevisiae* (Trotter *et al.*, 1993, 1995) gewonnen.

1.5.1.1 PSD in *Escherichia coli*

In prokaryotischen Zellen ist PE das häufigste Membranlipid. Das gesamte PE wird über den PSD-Weg synthetisiert. In *E. coli* ist nur ein *PSD* Gen bekannt. Das Genprodukt befindet sich in der inneren Cytoplasmamembran (Dowhan *et al.*, 1974) und stellt weniger als 0,1% an der Gesamtproteinmenge in *E. coli* dar (Tyhach *et al.*, 1979). Das Enzym ist konstitutiv aktiv und für das Wachstum dieser Bakterien unter Normalbedingungen essentiell (Voelker, 1997). Es konnte eine Mutante (EH150) isoliert werden, die eine temperaturabhängige PSD-Defizienz zeigt (Hawrot und Kennedy, 1975, 1976). In den Mutantenzellen ist die endogene PSD thermolabil und bei Temperaturen ab 42°C inaktiv. Die dadurch verursachte Reduktion des PE-Gehaltes beeinträchtigt das Wachstum der Zellen.

1.5.1.2 PSD in *Saccharomyces cerevisiae*

In *S. cerevisiae* wurden zwei PSDs identifiziert, PSD1 in der inneren Mitochondrienmembran (Clancey *et al.*, 1993; Trotter *et al.*, 1993) und PSD2 in der Vakuolenmembran und im Golgi-Apparat (Trotter *et al.*, 1995; Trotter und Voelker, 1995). Einzelmutanten der beiden PSDs (*psd1* oder *psd2*) zeigen auf Glukosemedium wildtypähnliches Wachstum. Die Doppelmutante *psd1psd2* ist auxotroph für Ethanolamin oder Cholin (Trotter und Voelker, 1995). Membranen in *psd1psd2* Hefemutanten enthalten im Vergleich zum Wildtyp (WT) anstatt 25 % nur 2% PE, was zu verringertem Wachstum führt (Trotter *et al.*, 1995; Birner *et al.*, 2001). Durch Zugabe von Ethanolamin kann das beeinträchtigte Wachstum und die Reduktion des PE-Gehalts komplementiert werden. Dabei dient Ethanolamin als Vorstufe zur PE-Synthese über den Kennedy-Weg.

1.5.1.3 PSD in Pflanzen

In *A. thaliana* wurden drei Gene identifiziert, die für eine PSD codieren. PSD1 ist mitochondrial lokalisiert (von Orlow, 2003; Rontein *et al.*, 2003) und laut mRNA-Analysen in Pflanzen gering exprimiert (Rontein *et al.*, 2003). Vergleicht man die PSD Proteinsequenzen aus *Arabidopsis* mit anderen bekannten PSD Proteinsequenzen (Abb. 5), so bilden *atPSD2*, *atPSD3* und *scPSD2* eine Gruppe und die mitochondrialen PSDs (*atPSD1*, *scPSD1*, *lePSD1*) sowie die *ecPSD* aus *E. coli* bilden eine zweite Gruppe.

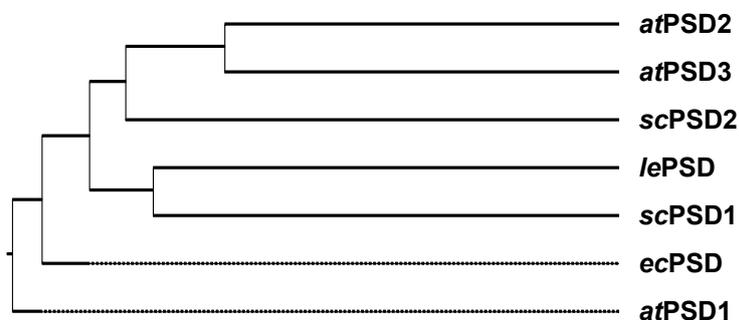


Abb. 5: Phylogenetischer Baum der PSDs aus verschiedenen Organismen

Dargestellt sind die PSDs aus *Arabidopsis thaliana* (*at*), *Saccharomyces cerevisiae* (*sc*), Tomate (*Lycopersicon esculentum*, *le*) und *Escherichia coli* (*ec*).

1.6 Funktionen von PS und PE

Obwohl der PS-Anteil weniger als 1 % des Gesamtlipidgehalts in pflanzlichen Zellen beträgt (Galliard, 1968a, 1968b), ist dieses Aminophosphoglycerid für spezifische zelluläre Funktionen von Bedeutung. Eine Akkumulation von PS führt in Pflanzenzellen zu „nekrotischen Läsionen“, bei denen es sich um Areale abgestorbener Zellen in Blättern handelt (O'Brien *et al.*, 1998). Normalerweise ist PS asymmetrisch über die Membran verteilt, wobei sich der Hauptanteil von PS an der Innenseite der Doppelmembran befindet. Verlagert sich PS auf die äußere Seite der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran, so ist dies in Säugerzellen ein Indikator für Apoptose (Fadok *et al.*, 1992). Man vermutet, dass die Exposition von PS an der äußeren Membran ebenfalls bei der Erkennung von Apoptosezellen durch Phagozyten (Fadok *et al.*, 1998) eine Rolle spielt. Zudem ist PS in den Prozess der Blutgerinnung involviert (Schroit und Zwaal, 1991). PS-defiziente Hefemutanten sind lebensfähig, besitzen jedoch unter anderem Defekte im Tryptophantransport (Nakamura *et al.*, 2000) sowie eine abnormale Vakuolenmorphologie, die mit der Störung der Vakuolenfunktion einhergeht (Hamamatsu *et al.*, 1994).

Große Bedeutung zur Aufklärung der Funktion von PE hatten Untersuchungen an *E. coli*. Ein PE-Mangel kann in diesem Organismus durch erhöhte Cardiolipinmengen in Anwesenheit von divalenten Kationen kompensiert werden (Morein *et al.*, 1996). PE ist für die korrekte Faltung der membrangebundenen LacY-Laktose Permease von Bedeutung (Bogdanov und Dowhan, 1995; Bogdanov *et al.*, 1999). PE-defiziente *E. coli* Mutanten zeigen phänotypische Veränderungen, wie das durch gestörte Zellteilung hervorgerufene filamentöse Wachstum. Untersuchungen dieses Phänotyps zeigten, dass PE für die Bildung des FtsZ-Teilungsrings essentiell ist (Mileykovskaya *et al.*, 1998). Auch in Hamstereizellen konnte der Einfluss von PE während der Cytokinese, insbesondere bei der Auflösung des kontraktiven Rings, gezeigt werden (Emoto und Umeda, 2000). Die Bedeutung von PE für eukaryotische Zellen wurde vorwiegend an Hefe untersucht. In Hefe ist mitochondrial gebildetes PE für die Mitochondrienbiogenese und -Stabilität verantwortlich (Völker, 1997). Zusätzlich wurde in Mitochondrien ein hoher Anteil an PE nachgewiesen (Tuller *et al.*, 1999). Wird Hefe auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen angezogen, so ist der PE-Anteil in den Mitochondrien für das Wachstum der Hefe bestimmend. Die Verarmung an PE in den Mitochondrien führt jedoch nicht zur offensichtlichen Schädigung der

Mitochondrienmembran (Birner *et al.*, 2001). Wie stark jedoch Auswirkungen eines PE-Defizits in Mitochondrien sein können, zeigt eine Studie an Mäusen, in denen der Verlust der mitochondrial lokalisierten PSD zu Änderungen der Mitochondrien-ultrastruktur und zu Embryoletalität führt (Steenbergen *et al.*, 2005).

1.7 Mitochondrien und deren Funktion

Mitochondrien sind Organellen, die durch Zellatmung unter Sauerstoffverbrauch ATP synthetisieren. Das Zusammenspiel von Zellatmung und ATP Synthese wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Dabei erfolgt in der mitochondrialen Matrix mit Hilfe des Citratzyklus zunächst der stufenweise Abbau von Pyruvat (Produkt der Glykolyse) und Fettsäuren zu CO₂ und Wasser. Insgesamt werden dabei 10 Reduktionsäquivalente ([H] gebunden an NADH) gebildet, welche durch die in der Matrix lokalisierte Atmungskette oxidiert werden. Die Atmungskette besteht aus den folgenden Enzymkomplexen: NADH-Dehydrogenase (Komplex I); Succinat-Dehydrogenase (Komplex II); Cytochrom b/c₁ (Komplex III); Cytochrom Oxidase (Komplex IV) und die F₀F₁-ATP-Synthase (Komplex V). Diese Komplexe sind an der Übertragung der Elektronen von NADH auf Sauerstoff beteiligt. Der Elektronentransfer entlang der Atmungskette wird von einem Protonenfluss durch die innere Mitochondrienmembran nach außen begleitet. Dieser führt zu einer Transmembrandifferenz in der Protonenkonzentration (Protonengradient) und damit zu einem pH-Gradienten. Die elektrochemische Energie, die aus dieser Differenz der Protonenkonzentration und der Ladungstrennung resultiert, die protonenmotorische Kraft, dient zur Speicherung eines Teils der oxidativen Energie. Die protonenmotorische Kraft treibt die ATP-Synthase an, die von dem Rückfluss der Protonen über die membranständige F₀F₁-ATP-Synthase in die Matrix begleitet wird (Mitchel, 1961). Das gebildete ATP wird aus dem Mitochondrium exportiert und als Energiequelle für die Zelle zur Verfügung gestellt. Ein vereinfachtes Schema dieses Vorganges ist in Abb. 6 zu sehen. Zudem sind neben dem Citratzyklus noch weitere Stoffwechselwege in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, die Reduktionsäquivalente für die ATP-Synthase liefern, z.B. Teile des Harnstoffzyklus und die oxidative Decarboxylierung.

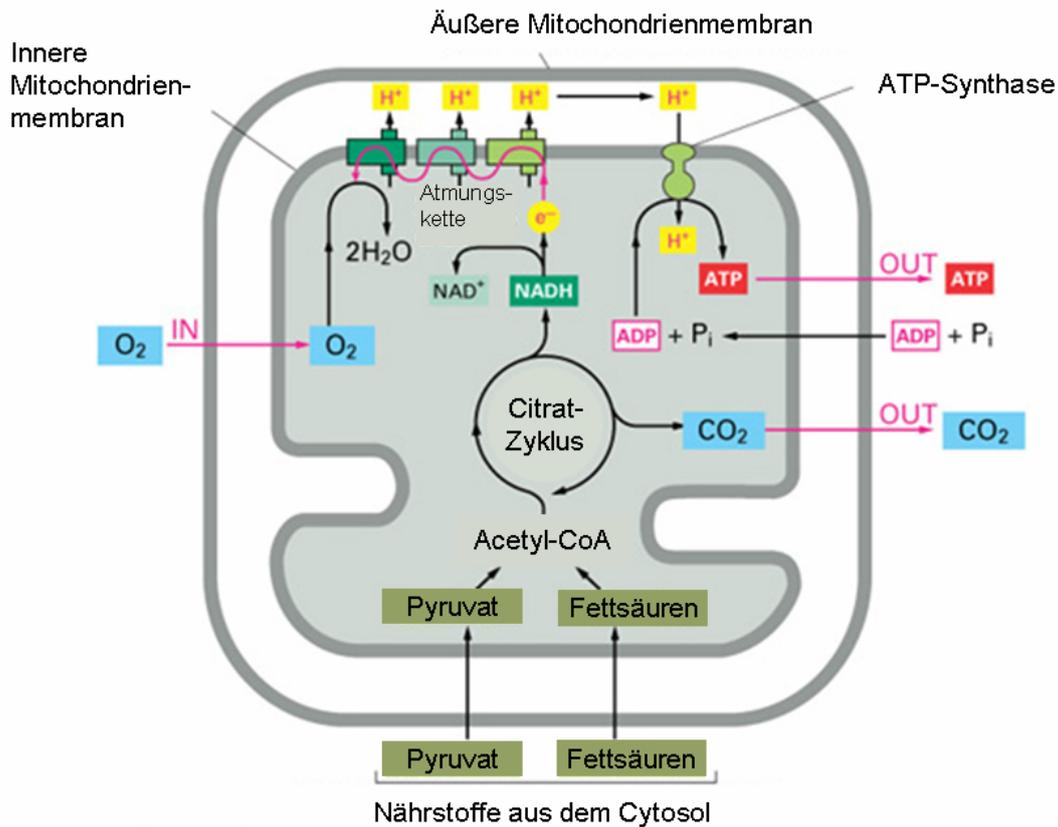


Abb. 6: Schematische Darstellung des mitochondrialen Energiestoffwechsels

Es sind Stoffwechselprozesse in Mitochondrien vereinfacht dargestellt, die Reduktionsäquivalente für die ATP-Synthese liefern. (Nach Alberts *et al.*, 2004, Essential Cell Biology, 2/e. (©2004, Garland Science))

Die bisher beschriebene Funktion der Mitochondrien als „Kraftwerke der Zelle“ trifft auf Mitochondrien aller Organismen zu (Attardi und Schatz, 1988). Im Vergleich zu ihren Vertretern aus Säugetieren und Pilzen erfüllen Mitochondrien aus Pflanzen eine Vielzahl an zusätzlichen Funktionen (Mackenzie und MacIntosh, 1999; Rasmusson *et al.*, 1999). Pflanzliche Mitochondrien sind durch die Decarboxylierung von Glycin, einem Schritt der Photorespiration, indirekt an der Photosynthese beteiligt (Raghavendra *et al.*, 1998). Weiterhin finden sich in ihnen Enzyme und Synthesewege, die bei Mitochondrien anderer Eukaryoten nicht zu finden sind, z.B. das NAD-abhängige Enzym bei der Malat-Oxidation. Eine weitere Besonderheit pflanzlicher Mitochondrien ist eine zusätzliche Oxidase, mit der eine Zyanid-unempfindliche Atmung möglich ist. Eine alternative NADH-Dehydrogenase kann sowohl internes als auch externes NAD oder NADH als Substrat verwenden (Vanlerberghe und McIntosh, 1994; Rasmusson *et al.*, 1999). Auf genetischer Ebene finden sich, im Gegensatz zu tierischen Mitochondrien, bei pflanzlichen

Mitochondrien ebenfalls Besonderheiten (Brennicke *et al.*, 1999; Mackenzie und MacIntosh, 1999). So ist das Mitochondriengenom vergleichsweise groß. Die Transkripte werden vor der Translation editiert, und einige Transkripte entstehen durch *trans*-splicing (Janska *et al.*, 1998). Die Mitochondrienbiogenese und die Funktionalität hängen von komplexen Interaktionen zwischen nukleärem und mitochondrialem Genom ab (Attardi und Schatz, 1988; Clayton, 1998; Garesse und Vallejo, 2001). Störungen der Interaktionen können zur cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) führen, d.h. die Pollen sind steril oder werden abgestoßen. Entsteht CMS durch eine Mutation im Genom der Mitochondrien, können sogenannte „Restorer Gene“ (Wiederherstellungsgene), die im Kerngenom codiert sind, die cytoplasmatische Sterilität wieder aufheben (Hanson und Bentolila, 2004).

1.8 Zielsetzung

Die Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD) katalysiert die Decarboxylierung von Phosphatidylserin (PS) zu Phosphatidylethanolamin (PE). Bisherige Untersuchungen zu diesem Enzym beschränkten sich überwiegend auf die Mikroorganismen *E. coli* und *S. cerevisiae*, in denen PE ausschließlich (*E. coli*) oder überwiegend (*S. cerevisiae*) über den PSD-Syntheseweg gebildet wird. In Eukaryoten befindet sich die Phosphatidylserin Decarboxylase an der inneren Mitochondrienmembran. Treten jedoch Paraloge auf, kann PSD-Aktivität auch in anderen Membransystemen nachgewiesen werden. Das in Mitochondrien synthetisierte PE ist für die Mitochondrienbiogenese und Funktion von essentieller Bedeutung. So hat der Verlust der PSD Enzymaktivität für den betroffenen Organismus schwerwiegende Folgen (Hefe, Hamsterzellen, Maus). Bisher wurden keine Studien zur Funktion der PSD in Pflanzen angefertigt. In der vorliegenden Arbeit soll der Beitrag des PSD-Syntheseweges zur Phosphatidylethanolaminsynthese im Lipidstoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* analysiert werden.

Im *Arabidopsis* Genom konnten drei PSD Gene durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten *PSDs* anderer Organismen identifiziert werden. Um diese Gene als funktionelle Phosphatidylserin Decarboxylasen charakterisieren zu können, werden sie heterolog in der *E. coli* Mutante EH150 und in der Hefe *psd1psd2* Doppelmutante exprimiert. Zudem soll in Pflanzen die Expression der einzelnen PSD Gene in den verschiedenen Geweben sowie deren subzelluläre Lokalisierung untersucht werden.

Mit T-DNA Insertionsmutanten der drei *PSD* Gene soll der Beitrag der einzelnen Gene zur PE-Synthese analysiert werden. Durch Kreuzung wird eine *psd* Dreifachmutante erzeugt, deren vollständiger Verlust der PSD-Aktivität mit Northern Blot und Enzymaktivitätstests belegt werden soll. Die Folgen des PSD-Aktivitätsverlustes in der *psd* Dreifachmutante sollen durch Analysen der Lipidzusammensetzung, insbesondere der Mitochondrien, untersucht werden. Zudem wird die Mitochondrienanzahl, die Mitochondrienultrastruktur und die Funktionalität der Mitochondrien (Respiration, ATP-Produktion) analysiert. Eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Mitochondrien kann Auswirkungen auf die Blütenmorphologie haben, so dass der Blütenaufbau in PSD-defizienten Mutanten ebenfalls untersucht wird.

2. Materialien und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien, Kits und Enzyme

Geräte

Autoklav	Münchner Medizin Mechanik GmbH, München, D
Heizbad mit Thermostat	Gesellschaft für Labortechnik, Bergwedel, D
Waage	Satorius, Göttingen, D
Eppendorf 5417 C (Zentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Varifuge3.OR (Untertischmodell)	Heraeus, Hanau, D
Ultrazentrifuge Centricon T-1080 mit Ausschwingrotor TST 41.14	Kontron, AG Zürich, CH
Centrikon T-124 (Zentrifuge)	Kontron, Bio-Tek-Neufahrn, D
Vakuum-Konzentrator	Eppendorf, Hamburg, D
Trennkammer für Dünnschicht- chromatographie	Sigma-Aldrich, München, D
Vortex Genie 2	Bender Hobein AG, Zürich, CH
Uvikon 942	Kontron Instruments, Watford, GB
Midi-I Horizontalkammer für DNA-Gelelektrophorese	Ziege, Luckenwalde, D
PCR-Thermocycler, Biometra	BioRad, München, D
UV Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam, NL
Sample Concentrator	Labtech International, Ringmer, GB
Geldoku: UV-Transilluminator	BioRad, München, D
Phosphoimagescanner BAS	Fuji, Akasaka, JP
Ultraschallbad: Sonorex RK100H	Bandelin, Berlin, D
Ultraschallstab: Sonopuls	Bandelin, Berlin, D
semi-dry Blot Maschine	Biometra GmbH, Göttingen, D
Heizblock: DRI-BLOCK® DB-3A	Techne, Oxford/ Cambridge, UK
1500 Pflanzenanzucht: Phytotron für <i>Arabidopsis</i> -Keimung	York International, York, USA

Biolistic PSD-1000/He Particle delivery System	BioRad, München, D
1100 Psi rupture discs	BioRad, München, D
Leica TCS SP2 Konfokal Fluoreszenz-mikroskop	Leica, Wetzlar, D
Gaschromatograph Agilent HP6890	Agilent, Böblingen, D
Kapillarsäule Supelco SP-2330	Sigma-Aldrich, München, D
Partisal SAX10 Anion Austausch Säule	Whatman, Maidstone, UK
Sauerstoff Mikrosensor und optisches Glasfaser Sauerstoff-Messgerät	Microx TX2, Presens, Regensburg, D
1-Liter Labor Mixer	VWR International, Darmstadt, D

Material

Film X-OMAT AR	Kodak, Rochester, NY, USA
Hybond N+ Membran und Filter	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Klingen mit Griffschutz	Merck, Darmstadt, D
DC-Platten: Si250-PA	J.T.Baker, Philipsburg, USA
Silica 60	Merck, Darmstadt, D
BAS-1500 Autoradiographie und Imagingplatte BAS-MS 2040	Raytest, Straubenhardt, D
Software für Phosphoimager: BAS-Reader (Win 3.1, 1999)	Fuji, Akasaka, JP
Analyse der Phosphoimager-Scans mit Tina Vers. 2.10i	Raytest, Straubenhardt, D
Software zur Analyse von DNA-Sequenzen: DNAStar	DNAStar Inc., Madison, USA
Micro Bio-Spin Säulen	BioRad, München, D
3MM Filterpapier	Whatman International Ltd., GB
Glasröhrchen mit Schraubkappe	Schott, Mainz, D
Kapillarröhrchen	Brand, Wertheim, D
Pipetten	Gibson, FR
Plastikröhrchen (Falcon)	BD™ Biosciences, Heidelberg, D
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Plastik-Einmalküvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchsschlag, D

GC- und HPLC-Röhrchen	Chromacol, Abimed Analysentechnik, Langenfeld, D
Chemstation Software	Agilent, Böblingen, D
Miraclloth	Calbiochem, Darmstadt, D
Percoll™	Amersham Pharmacia, Uppsala, S
Chromeleon Version 6.60	Dionex GmbH, Idstein, D
Silwett L-77	Helena Chemicals, Fresno, USA
Protran® Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, D

Chemikalien

Allgemeine Chemikalien (z.B. Ethanol, Chloroform) für Puffer, Lösungen und Medien sind in *pro analysi* Qualität von den verschiedenen Herstellern Merck AG, Darmstadt, D; Fluka, Taufkirchen, D oder Sigma-Aldrich, München, D bezogen worden.

Radiochemikalien

L-3-Phosphatidyl-L-[3- ¹⁴ C]-serin, 1,2-dioleoyl, 2,0 GBq/mmol	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, GB
[α- ³² P]-dCTP 370 MBq/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig, D

Enzyme

T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Beverly, USA
RNAase	Ambion Ltd., Huntington, UK
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim, D
<i>Pfu</i> -Polymerase	TAKARA BIO INC., Otsu Shiga, J
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTPs	Bioline GmbH, Luckenwalde, D
DNAse (RNAse frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Macerozyme R-10	Yakult Honsha Co, Tokyo, J
Cellulase R-10	Yakult Honsha Co, Tokyo, J

Kits, Marker, Antikörper

NucleoSpin Plasmid	Macherey & Nagel, Düren, D
NucleoBond 500AX	Macherey & Nagel, Düren, D
QiaQuick Gelextraktion Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen, Hilden, D
Rediprime DNA Labeling System	New England Biolabs, Beverly, USA
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Sigma-Aldrich, München, D
TRizol [®] -Reagent	Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D
Plant RNA Purification Reagent	Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Superscript [™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR –Kit	Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D
MitoTracker [®] Orange CMTMRos	Molecular Probes, Eugene, USA
Precision Plus Protein [™] Standard	BioRad, München, D
DNA-Längen- und Mengenstandard „1kbp-Leiter“, SmartLadder	Eurogentec, Serraing, B
Maus Anti-Cytochrome C Antikörper	BD [™] Biosciences, Heidelberg, D
Phosphatase markierter Ziegen-Anti-Maus-Antikörper	Roche, Mannheim
NBT/BCIP Tabletten	Roche, Mannheim, D

2.2 Synthetische Oligonucleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, B) hergestellt.

Primer zur Identifizierung der PSD Gene

PD189: 5'-CTCGTTGTTCCCTACAGTTACAAACTACTAC	(<i>atPSD1</i> sense)
PD176: 5'-TGTTTATAAGTAGCCTCGACTCTCAAGTA	(<i>atPSD1</i> antisense)
PD90: 5'-ATGCTCGCTCAACTGCTCATGAAGTATAG	(<i>atPSD2</i> sense)
PD242: 5'-AACTGAGCTCATTTTCTTCCCCTGCTTCT	(<i>atPSD2</i> antisense)
PD88: 5'-CTGCGACATTCTCCAAAGGAAATGATCAAC	(<i>atPSD3</i> sense)
PD185: 5'-GAAATCTAACCATATGAAGCCTGCCTAT	(<i>atPSD3</i> antisense)

Primer zur Identifizierung der entsprechenden T-DNA

- LB T-DNA Syngenta
PD206: 5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
- LBb1, T-DNA SALK
PD300: 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
- JL-202, T-DNA University of Wisconsin, Madison, USA
PD 35: 5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC

Primer für die semiquantitative real-time PCR

PD344: 5'-GCCACTGAACTGATTACCAGAGA	(<i>PSD2</i> sense)
PD345: 5'-GAGTTATTATGCACGAAACAAGAGG	(<i>PSD2</i> antisense)
PD348: 5'-CACACTCCACTTGGTCTTGCGT	(Ubiquitin sense)
PD349: 5'-TGGTCTTTCCGGTGAGAGTCTTCA	(Ubiquitin antisense)

Primer für Klonierungen

PD243: 5'-GCCGAATTCATGAAACCTCGTTTTCTCAAAA	(<i>PSD1</i> sense)
PD244: 5'-AATGGATCCCGTTCCTCTTTCCATCTTCCCAA	(<i>PSD1</i> antisense)
PD98: 5'-GTCGGTACCTCAGTGGCAAAGATTTTCAGATC	(<i>PSD2</i> antisense)
PD378: 5'-GCGCCATGGATCAAGGGGCAAAGGAG	(<i>PSD2</i> sense)

2.3 Plasmide und Konstrukte

Vektoren:

pBinAR-Hyg	Höfgen und Willmitzer (1990)
pBluescript II SK(+)	Stratagene, Amsterdam, NL
pKK-MCS	Derivat von pKK-233-2, Clontech, Heidelberg, D modifiziert durch H. Schmidt, Hamburg, D
pGemTeasy	Promega, Mannheim, D
pSRN	Caddick <i>et al.</i> (1998)

Donorkonstrukte für weitere Klonierungen

pGEM Teasy- <i>atPSD1</i>	von Orlow (2003)
pGEM Teasy- <i>atPSD2</i>	von Orlow (2003)
pYES- <i>PSD3</i>	von Orlow (2003)
pBlueSKII+-ppPSD1	von Orlow (2003)
U19624 (At3g54340)	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center, Columbus, USA

Konstrukte für Lokalisierungsstudien mit Hilfe von GFP

KDEL-GFP	Scott <i>et al.</i> , (1999)
pA7-KCO1	Czempinski <i>et al.</i> , (2002)
pEZR-KLN- <i>PSD2</i>	von Orlow (2003)
pEZR-KLN- <i>PSD3</i>	von Orlow (2003)

Konstrukte für Komplementationsstudien in EH150 Zellen

pKK-MCS- <i>PSD3</i>	Nerlich (2003)
pKK-MCS- <i>PSD3</i> -C-Terminus	Nerlich (2003)
pKK-MCS- <i>PSD2</i>	Nerlich (2003)

Klone für Northern Analysen auf Komplex I-Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette (●) und auf ABC Gene (○) in Blüten

● 109I15 (At5g0853)	}	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center , Columbus, USA
● U13076 (At1g79010)		
● U25472 (At5g11770)		
○ U19624 (At3g54340)		
○ U60728 (At5g20240)		
○ SQ181c02 (At4g18960)		Kazusa DNA Research Institute, Chiba, J

2.4 Bakterienstämme

<i>A. tumefaciens</i> (GV 3101)	Stratagene, Amsterdam, NL
<i>E.coli</i> XL1 blue	Stratagene, Amsterdam, NL
<i>E.coli</i> EH150	Hawrot und Kennedy (1976)
<i>E.coli</i> DH10B	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.5 Pflanzenmaterial

<i>A. thaliana</i> Columbia-0	ABRC, Columbus, USA
<i>A. thaliana</i> Wassilewskija	ABRC, Columbus, USA
<i>psd2-1</i> (Wassilewskija/ At5g57190)	Arabidopsis Knockout Facility, Madison, USA
<i>psd3-1</i> (Wassilewskija/ At4g25970)	Arabidopsis Knockout Facility, Madison, USA
<i>psd2-1psd3-1</i>	von Orlow (2003)

<i>psd2-2</i> (Columbia-0/ At5g57190)	Syngenta, San Diego, USA
<i>psd3-2</i> (Columbia-0/ At4g25970)	Syngenta, San Diego, USA
<i>psd2-2psd3-2</i>	Nerlich (2003)
<i>psd1-3</i> (Columbia-0/ At4g16700)	SALK Institute, San Diego, USA

2.6 Medien

Alle Medien und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Billerica, USA) hergestellt. Die Lösungen wurden für 25 Minuten bei 125°C sterilisiert.

Anzuchtmedium für *A. thaliana*: (2MS; Murashige und Skoog, 1962):

0,44 % (w/v) MS, 1 % (w/v) Saccharose (pH 5,8), zur Verfestigung wurde 0,8 % Select-Agar zugegeben

Anzuchtmedium für Bakterien:

E. coli wurde über Nacht bei 37°C in YT-Medium (Sambrock *et al.*, 1989) und *A. tumefaciens* bei 28°C in YEB-Medium angezogen (Vervliet *et al.*, 1975).

YT-Medium:

0,8 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 0,5 % (w/v) NaCl
 pH 7,0

YEB-Medium:

0,5 % (w/v) Rindfleisch-Extrakt
 0,1 % (w/v) Hefe-Extrakt
 0,5 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Saccharose
 2 mM Magnesiumsulfat
 pH 7,0

Für festes Medium wurde 1,5 % (w/v) Bacto Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Je nach Organismus wurden dem Medium Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin:	100 µg / l Medium
Kanamycin	50 µg / l Medium
Hygromycin B	25 µg / l Medium
Rifampicin	100 µg / l Medium

2.7 Sequenzierungen und Sequenzanalysen

Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA GmbH – Sequenzier Service, Berlin, D durchgeführt. Die Sequenzanalysen erfolgten mit der Lasergene Software (DNASStar Inc., Madison, USA).

2.8 Molekularbiologische Methoden

Es wurden Standardmethoden (Restriktionsanalysen, Ligationen, *E. coli* und *A. tumefaciens* Transformationen, elektrophoretische Auftrennung der DNA, Plasmidpräparationen) nach Sambrock *et al.* (1989) verwendet oder die Protokolle der entsprechenden Kits. DNA Fragmente für Klonierungen wurden mit *Pfu*-Polymerase von TaKaRa (TAKARA BIO INC., Otsu Shiga, J) amplifiziert. Für die Amplifizierung von PCR-Fragmenten zum Durchsuchen von Mutanten-Populationen wurde *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, D) eingesetzt.

2.8.1 Klonierungen

pSRN-PSD3

Aus dem Konstrukt pYES-PSD3 (PD304; von Orlow (2003)) wurde die cDNA von PSD3 mit *Xba*I ausgeschnitten. Der Vektor pSRN wurde mit *Spe*I aufgeschnitten und die PSD3-cDNA in diese Schnittstelle kloniert.

pBinAR-Hyg-PSD3

Für diese Klonierung wurde ebenfalls das Konstrukt pYES-PSD3 (PD304) verwendet. Die PSD3-cDNA wurde über *Kpn*I / *Xho*I ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor pBinAR-Hyg ligiert.

pBinAR-Hyg-PSD1

Die cDNA von PSD1 wurde aus dem Konstrukt pGemTeasy-PSD1 (PD306; von Orlow (2003)) mit den Primern PD243 (*Eco*RI) und PD244 (*Bam*HI) amplifiziert und die entsprechenden Schnittstellen angefügt. Mit diesen Schnittstellen wurde die cDNA in pBluescriptSKII+ ligiert. Aus diesem Zwischenkonstrukt wurde die PSD1 cDNA mit *Kpn*I / *Xba*I ausgeschnitten und in pBinAR-Hyg kloniert.

pBinAR-Hyg-ppPSD1 (*Physcomitrella patens* PSD)

Für diese Klonierung wurde das Konstrukt pBluescriptSKII+-ppPSD1 (PD233; von Orlow (2003)) genutzt. Die cDNA wurde mit *KpnI* / *XbaI* ausgeschnitten und in den Vektor pBinAR-Hyg ligiert.

pBinAR-Hyg-*Apetala3*

Der Klon U19624 stammt von dem Arabidopsis Biological Resource Center (pUNI51-AP3; Arabidopsis Biological Resource Center, Columbus, USA). Die cDNA wurde über Restriktion mit *KpnI* / *Sall* aus dem Konstrukt gelöst und mit diesen Schnittstellen in pBinAR-Hyg gebracht.

pKK-MCS-PSD2-C-Terminus

Als Vorlage diente das Konstrukt pGemTeasy-PSD2 (PD244, von Orlow (2003)). Mit den Primern PD378 (*NcoI*) und PD98 (*KpnI*) wurde die cDNA amplifiziert und die entsprechenden Schnittstellen angefügt. Das PCR Produkt wurde in pGemTeasy zwischenkloniert und über die Schnittstellen *KpnI* / *NcoI* in pKK-MCS eingefügt.

2.8.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Erzeugung transgener *A. thaliana* Linien erfolgte durch den *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer. Dazu wurden Übernachtskulturen der *Agrobakterien* zentrifugiert (5000 g, 30 min, Raumtemperatur) und die Zellen im gleichen Volumen Infiltrationsmedium (5 % (w/v) Saccharose, 0,22 % (w/v) MS-Salze, 2,5 mM MES-KOH pH 5,7, 44 nM Benzylaminopurin) resuspendiert. Pro Konstrukt wurden 200 ml Bakteriensuspension, 100 ml Infiltrationsmedium und 500 µl Silwett L-77 gemischt. Die Knospen von 6 Wochen alten Pflanzen wurden etwa 10 sec in diese Lösung getaucht (Clough und Bent, 1998). Nach der Samenreife wurden die Samen zur Selektion auf antibiotikahaltige Medienplatten ausgebracht.

2.8.3 Southern Blot Analysen

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus 2-5 g Blattmaterial. In flüssigem Stickstoff zerkleinertes Material wurde mit 25 ml CTAB-Puffer (140 mM Sorbitol, 220 mM Tris-HCl, pH 8, 22 mM EDTA, 800 mM NaCl, 1 % (w/v) Sarkosyl, 0,8 % (w/v) CTAB, pH 8, autoklaviert) 10 min bei 65°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

Danach wurden 10 ml Chloroform hinzugefügt, gemischt und die Phasen durch Zentrifugation (5 min, 3000 x g) getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, zu 17 ml Isopropanol gegeben und auf Eis die DNA gefällt. Die DNA wurde pelletiert (10000 x g, 5 min) und in 4 ml TE-Puffer gelöst. Nach 10 min Inkubation mit 10 µg RNAase bei Raumtemperatur wurden 400 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) zugegeben und der Ansatz mit ½ Volumen Rotiphenol™, Roth, D extrahiert. Nach einer weiteren Extraktion mit Chloroform wurde die DNA mit 2 Volumen Ethanol erneut auf Eis gefällt, bei 20000 x g abzentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde es in 500 µl TE-Puffer gelöst und die DNA spektralphotometrisch quantifiziert. Für den Southern Blot wurden 50-100 µg genomischer DNA mit Restriktionsenzymen über Nacht geschnitten. Am nächsten Tag wurden erneut 10 U Restriktionsenzym zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die geschnittene DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100 % Ethanol bei -20°C für 30 min gefällt. Die gefällte DNA wurde nun 5 min bei 12000 x g pelletiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die DANN-Fragmente wurde in einem 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch bei 100 V über 4-5 Stunden aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel photographisch dokumentiert. Der Transfer der DNA auf die Nylon-Membran (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) erfolgte mit 0,4 M Natriumhydroxid über Nacht. Am nächsten Tag wurde die auf der Membran befindliche DNA durch cross-linking (UV Stratalinker 1800, Stratagene, Amsterdam, NL) fixiert. Anschließend wurde die Membran in 2 x SSC (1l 20 x SSC: 175,3 g Natriumchlorid, 88,2 g Natriumcitrat, pH 7,0) angefeuchtet und für 4 h bei 65 °C in Hybridisierungspuffer (250 mM Na₂HPO₄, pH 7,4; 7 % (w/v) SDS, 1mM EDTA, 1 % (w/v) BSA, 0,1 mg/ml frisch denaturierte Heringsperma-DNA) inkubiert. Als Sonden wurden 70 ng gereinigte PCR- oder DNA-Fragmente verwendet. Nach Denaturierung für 5 min bei 95°C wurde mit Hilfe des „Rediprime DNA-Labelingsystem“ (New England Biolabs, Beverly, USA) und 50 µCi [α-³²P]-dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig, D) eine radioaktive Sonde hergestellt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Im Anschluss wurde die Membran mehrfach mit 2 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen und in Expositionskassetten mit Verstärkerfolie mit einem Film (Kodak, X-Omat AR Films, Kodak Rochester, USA) bei -80°C exponiert.

2.8.4 Northern Blot Analysen

Die RNA wurde aus 0,1 g Pflanzenmaterial extrahiert. Dafür wurde zu dem in flüssigem Stickstoff zerkleinerten Material 1 ml TRIzol[®]-Reagent (Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D) gegeben und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 10 min, 4 °C) wurde zum Überstand 0,2 ml Chloroform/Isoamylalkohol pro 1 ml TRIzol[®] zugegeben und vermischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C) wurde die RNA bei Raumtemperatur mit 0,5 Volumen Isopropanol aus dem Überstand gefällt (12000 g, 10 min, 4 °C). Das erhaltene RNA Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und in RNase freiem Wasser gelöst. Der RNA Gehalt wurde spektralphotometrisch bestimmt. 5-10 µg Total-RNA wurden in 1 x RNA Probenpuffer (0,8 x MEN [1 x MEN = 20 mM MOPS-NaOH, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH7,0] 4,44 % Formaldehyd, 40 % Formamid, 0,1 mg/ml Ethidiumbromid, 0,01 mg/ml Bromphenolblau) gelöst, denaturiert (56 °C, 10 min) und elektrophoretisch in einem 1,5 % Agarosegel (1 x MEN, 6 % Formaldehyd, Elektrophoresepuffer: 1 x MEN) getrennt. Der Transfer der RNA auf die Nylon-Membran (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) erfolgte über Nacht in 10 x SSC (1,5 M NaCl; 0,015 M Natriumcitrat) als Transferpuffer. Anschließend wurde die RNA auf der Membran fixiert (UV Stratalinker 1800, Stratagene, Amsterdam, NL). Die anschließende Hybridisierung wurde, wie im Southern Blot Experiment (2.8.3) beschrieben, durchgeführt.

2.8.5 Semiquantitative real-time PCR

Die RNA für die semiquantitative Real-time PCR wurde wie unter dem Punkt 2.8.4 beschrieben isoliert. Für die Isolation der RNA aus Schoten wurde das Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D) und dessen Protokoll verwendet. Die DNA aller erhaltenen total RNAs wurde mit RNase freier DNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) entfernt. Aus dem total RNA Gemisch wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) die mRNA isoliert. Die isolierten mRNAs dienten anschließend als Vorlage zur Synthese der cDNAs. Dafür wurde das Superscript[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR-Kit (Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D) angewandt. Die semiquantitative real-time PCR fand unter gleichen Bedingungen statt, wie sie für die

Polymerasekettenreaktion (2.8.7) beschrieben wurden. Die Sequenzen der Primer wurden so gelegt, dass ein etwa 120 bp großes Amplicon entstand.

2.8.6 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis* Blättern (Kurzprotokoll)

Zunächst wurde Pflanzengewebe (~0,5 g) in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 550 µl „Shorty“-Puffer (0,2 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1 % SDS) und 550 µl Phenol/Chloroform (1:1, pH 7,5) gut vermischt. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 20000 x g erreicht. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt. Die pelletierte DNA (10 min bei 20000 x g) wurde 30 min an Luft getrocknet und in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) mit 2 µl RNAase (10 mg/ml Stock) bei 37°C für 10 min inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Phenolextraktion mit anschließender Isopropanolfällung. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE-Puffer gelöst. Für die PCR wurde 1 µl DNA verwendet.

2.8.7 Amplifizierung von Genloci und Aufreinigung des PCR Produkts

Geringe Mengen DNA können mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifisch amplifiziert werden. Dafür wurden 1-10 ng DNA pro Reaktion in einem Reaktionsvolumen von 25-100 µl eingesetzt. Weiterhin wurden 0,25 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1 x Reaktionspuffer und 1 U *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe, D) hinzugefügt. Folgende Temperaturzyklen wurden verwendet:

1. Denaturierung	94 °C	3 min	} 34 Wiederholungen
2. Denaturierung	94 °C	30 sec	
3. Annealing	60 °C	30 sec	
4. Elongation	72 °C	1 min / 1000 bp	
5. Elongation	72 °C	10 min	
6. Abkühlen	4 °C	∞	

Sollten Amplicons für Sequenzierungen oder Klonierungen verwendet werden, wurden die Reaktionsansätze mit dem QIAquick PCR Purification Kit (50) (Qiagen, Hilden, D) aufgereinigt.

2.8.8 Identifizierung von T-DNA Insertionsmutanten

Auf der Webseite <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> wurde eine neue T-DNA Insertionslinie für *PSD1* ausgewählt und deren Samen bestellt (SALK-Institute, San Diego, USA). Die *psd2-1psd3-1* Doppelmutante wurde mit dieser *psd1* Mutante gekreuzt, um eine *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante zu erhalten. Die verwendeten Primerkombinationen zum Auffinden der jeweiligen Mutanten mittels PCR sind unter dem Punkt Oligonukleotide aufgeführt.

2.8.9 Western Blot Analysen

Die Proteinextraktion erfolgte mit Phenol nach Cahoon *et al.* (1992). Die Menge an Protein wurde mit der BCA-Methode bestimmt (siehe 2.9.6.1). Für das Gel wurden 60 µg Protein eingesetzt. Zu den Proben wurde Laemmli-Puffer (50 mM Tris HCl [pH 6,8], 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerol) gegeben, bevor sie 10 min bei 60°C denaturiert wurden. Die Proben wurden anschließend auf ein Gel (10 % SDS, 30 % Acrylamid, 1,5 mM Tris [pH 8,8], 10 % Ammoniumpersulfat, TEMED) aufgetragen und aufgetrennt (100 V, Raumtemperatur, Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin [pH 8,3], 0,1 % SDS). Als Molekulargewichtsmarker wurde Precision Plus Protein™ Standard (BioRad, München, D) verwendet. Der Transfer der gelelektrophoretisch getrennten Proteine aus SDS-PAGE Gelen auf Nitrocellulosemembranen wurde nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Die Übertragung erfolgte mit einer semi-dry Blot Maschine (Biometra GmbH, Göttingen, D) in 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol für 1 h bei 130 mA. Für die Immunodetektion spezieller Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation in Blockpuffer (0,3 % Milchpulver, 20 mM Tris HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Inkubation mit gereinigten

monoklonalen Maus Anti-Cytochrome C Antikörper (BD™ Biosciences, Heidelberg, D) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur im gleichen Puffer. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit Blockpuffer entfernt (4 x 10 min). Die Markierung der spezifisch gebundenen, monoklonalen Antikörper erfolgte durch einstündige Inkubation mit einem Phosphatase markiertem Ziegen-Anti-Maus-Antikörper. Nach Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper (4 x 10 min waschen in 20 mM Tris [pH 7,5], 50 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) erfolgte ein Nachweis der Antikörper bzw. der Proteine in 20 ml Färbelösung (2 NBT/BCIP Tabletten von Roche, Mannheim, D).

2.8.10 Lokalisierungsstudien mit GFP-Konstrukten

Es wurden GFP-Fusionskonstrukte der Gene *PSD1*, *PSD2*, *PSD3* und GFP-Positivkontrollen mit bekannter Lokalisierung verwendet. Die für die biolistische Methode nötigen Materialien wurden von der Firma BioRad (BioRad, München, D) bezogen. Die DNA wurde an Gold-Microcarrier gebunden und in Blattepidermiszellen transferiert. Dazu wurde ein Biolistic PSD-1000/He Partikel Delivery System (BioRad, München, D) mit 1100 Psi rupture discs verwendet. Die Proben wurden 48 h nach Transformation unter einem Leica TCS SP2 Konfokal Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar, D) betrachtet (siehe auch 2.9.5).

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 Lipidanalysen

2.9.1.1 Lipidextraktion aus *A. thaliana*

Lipide wurden nach einem modifizierten Protokoll von Bligh und Dyer (1959) isoliert. Für die Lipidextraktion aus Pflanzen wurden etwa 0,1 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 2 Volumen Methanol/Chloroform/Ameisensäure (1:1:0,1) und 1 Volumen 1 M KCl, 0,2 M H₃PO₄ vermischt. Für eine Phasentrennung wurde das Gemisch 2 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die organische, untere Phase wurde im Stickstoffstrom getrocknet und erneut in Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen.

2.9.1.2 Lipidextraktion aus Mitochondrien

Isolierte Mitochondrien (2.9.2) wurden pelletiert (14000 g, 10 min, 4°C) und die Lipide wie im Punkt 2.9.1.1 beschrieben isoliert.

2.9.1.3 Auftrennung der polaren Lipide über Dünnschichtchromatographie

Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

Es wurden Si250-PA Platten (J.T.Baker, Phillipsburg, USA) zunächst kurz in 0,15 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ getaucht und zwei Tage getrocknet. Vor der Dünnschichtchromatographie wurden diese Platten 2,5 Stunden bei 120°C aktiviert. Die Beladung der Platten mit Proben erfolgte mit Kapillarröhrchen. Das Laufmittel war Aceton/Toluol/Wasser (91:30:8).

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (nach Benning *et al.*, 1995):

Die Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (2D-DC) wurde genutzt, um die Phospholipide PS und PI eindeutig voneinander zu trennen. Bei der 2D-DC wurden Silica 60 Platten (Merck, Darmstadt, D) verwendet. Es wurde der Lipidextrakt an der unteren Ecke der Platte aufgetragen. Zuerst lief die Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol/ Wasser (65:25:4). Nach Beendigung der ersten Chromatographie wurde die Dünnschichtplatte vollständig getrocknet und um 90° nach links gedreht und der zweiten Chromatographie im Laufmittel Chloroform/Aceton/ Methanol/Eisessig/Wasser (50:20:10:10:5) unterzogen.

2.9.1.4 Visualisierung und Lokalisierung der Lipide auf einer Dünnschichtplatte

Die aufgetrennten Lipide wurden mit Anilinnaphthalinsulfonsäure in Methanol (0,2 % (w/v)) besprüht. Dieses führt zur Fluoreszenz aller hydrophoben Komponenten unter UV-Licht (366 nm) und somit zur Visualisierung der Lipide auf der Dünnschichtplatte. Die Lage der Phospholipide PI, PS, PE, PC und PG wurde durch Co-Migration mit Standardlipiden ermittelt. Zusätzlich kann man die Lipide PS und PE durch Färbung mit Ninhydrin lokalisieren. Die Phospholipide PS und PE enthalten Aminogruppen, die mit Ninhydrin reagieren und somit gesondert nachgewiesen werden können.

Dazu wurde die Dünnschichtplatte mit Ninhydrinlösung (0,25 % (w/v) Ninhydrin in Aceton) besprüht. Nach Verdunstung des Lösungsmittels wurde die Platte zur Entwicklung 5 min bei 120°C erhitzt. PE und PS erscheinen violett.

2.9.1.5 Gaschromatographische Analyse von Fettsäuremethylestern

Chromatographisch aufgetrennte Lipide wurden für die gaschromatographische Quantifizierung nach Browse *et al.* (1986) transmethyliert. Nach Zugabe von 1 ml methanolischer HCl sowie 5 µg Pentadecansäure (15:0) als internen Standard wurden die Proben bei 80°C für 25 min verestert. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Extraktion der Fettsäuremethylester durch Zugabe von 1 ml Hexan und 1 ml 0,9 % NaCl und Zentrifugation (235 g, 3 min). Die Hexanphase mit den darin enthaltenen Fettsäuremethylestern wurde abgenommen und im Stickstoffstrom auf 100 µl eingeeengt. Nach Überführen in GC-Röhrchen (Chromacol, Abimed Analysetechnik, Langenfeld, D) erfolgte die Analyse von 2 µl Probenvolumen im Gaschromatographen (Agilent HP6890; Agilent, Böblingen, D). Verwendet wurde eine Kapillarsäule (30 m Länge, Durchmesser 750 µm und 0,2 µm Schichtdicke; Supelco SP-2330; Sigma-Aldrich, München, D) und ein Flammenionisationsdetektor. Die Injektionstemperatur betrug 220°C. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 11 ml/min verwendet. Die Ausgangstemperatur der Säule lag bei 100°C und wurde 1 min lang gehalten. Anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 2,40 min auf 160°C erhöht und in weiteren 6 min auf 220°C gesteigert. Diese Temperatur wurde 4 min lang gehalten, bevor die Säule dann in 5 min wieder auf 100°C gebracht wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Chemstation (Agilent, Böblingen, D).

2.9.2 Isolation von Mitochondrien

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte nach einer vereinfachten Version von Klein *et al.* (1998). *Arabidopsis* Samen wurden oberflächensterilisiert und in 300 ml Medium (2 MS, 3 % Saccharose, 20 mM Isobutylsäure) für 3 Wochen, im Dunkeln angezogen. Das Pflanzenmaterial wurde im Extraktionspuffer (450 mM Saccharose, 15 mM MOPS, 1,5 mM EGTA-KOH, pH 7,4, 10 mM Dithiothreitol, 6 g/l Polyvinylpyrrolidon)

mit einem Mixer zerkleinert (1 Mal high speed, 2 Mal low speed mit je 30 sec Pause dazwischen). Zelltrümmer wurden durch Filtern der Suspension durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Darmstadt, D) und anschließender Zentrifugation (2000 g, 5 min) abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die verbleibenden Zellbestandteile einschließlich Mitochondrien durch Zentrifugation (16000 g, 10 min) pelletiert. Das Pellet wurde in Waschpuffer (300 mM Saccharose, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA-KOH, pH 5,2) suspendiert und auf einen Percoll™-Gradienten (18 % / 23 % / 40 %) gegeben. Nach der Zentrifugation (12000 g, 45 min) konnten die Mitochondrien an der Phasengrenze zwischen 40 % und 23 % Percoll™ abgenommen werden. Die so gewonnen Mitochondrien wurden in Resuspensionspuffer (400 mM Mannitol, 10 mM Tricine-KOH, 1 mM EGTA-KOH, pH 7,2) gewaschen und pelletiert (14000 g, 10 min).

2.9.3 Isolation von Protoplasten

Es wurden 5 g Blattmaterial sehr fein zerkleinert und in 30 ml Enzymlösung (0,25 % Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co, Tokyo, J), 1,0 % Cellulase R-10 (Yakult Honsha Co, Tokyo, J), 400 mM Mannitol, 8 mM CaCl₂, 5 mM MES-KOH, pH 5,6) für 5 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Die Protoplasten wurden durch einen 100 µm Filter filtriert und danach bei 46g, 4°C für 5 min sedimentiert. Die pelletierten Protoplasten wurden in W5 Puffer (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, 1,5 mM MES-KOH, pH 5,6) aufgenommen und auf 20 ml 21 % Saccharose gegeben. Die Trennung der intakten von den zerstörten Protoplasten erfolgte durch Zentrifugation bei 78 g, 4°C für 10 min. Die intakten Protoplasten sammelten sich an der Interphase und wurden pelletiert (55 g, 4°C, 5 min). Anschließend wurden die Protoplasten erneut in W5 Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis belassen.

2.9.4 Färbung von Mitochondrien mit MitoTracker® Orange

Isolierte Protoplasten wurden 1 h auf Eis mit MitoTracker® Orange CMTMRos (Molecular Probes, Eugene, USA) inkubiert. Die Fluoreszenz markierten Mitochondrien wurden unter dem Konfokalmikroskop (Excitation 554 nm, Emmission 576 nm) betrachtet und dokumentiert.

2.9.5 Konfokale Fluoreszenz Laserscanning Mikroskopie

Diese Art der Mikroskopie dient der Detektion von fluoreszierenden Molekülen auf zellulärer Ebene. Dabei wird monochromatisches Licht mit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des fluoreszierenden Moleküls auf die Probe gestrahlt. Das vom Molekül emittierte Licht wird mit einem Detektor erfasst und in Form von Digitalbildern wiedergegeben. Dazu wurde das TCS SP2 (Leica, Solms, D) konfokale Fluoreszenz Mikroskop eingesetzt. Die Fluorophore wurden mit einem Ar/He/Ne Laser angeregt und mit Hilfe der Leica Confocal Software analysiert. Für GFP betrug die Excitation 488 nm und die Emmission 510 nm. Die Autofluoreszenz des Chlorophylls in den Chloroplasten wurde durch Licht der Wellenlänge 633 nm angeregt. Die Emission erfolgte bei 700 nm.

2.9.6 PSD-Enzymtest

2.9.6.1 PSD-Enzymtest mit *A. thaliana*

Es wurden 0,5 g Blattmaterial geerntet und in ca. 8 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7) mit etwas Seesand bei 4°C gemörsert. Die Zentrifugation (1 min, 4°C, 1200 x g) trennte die Zelltrümmer und den Seesand ab. Die Microsomenmembranen aus dem Überstand wurden durch Zentrifugation (1 h, 4°C, 100000 x g) in der Ultrazentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 150 µl Extraktionspuffer aufgenommen. Um für die Enzymreaktion die gleichen Proteinmengen einsetzen zu können, wurden die Proteinkonzentrationen der Ansätze nach der BCA-Methode bestimmt. Dafür stellt man eine Verdünnung der Probe in 50 µl Gesamtvolumen her und versetzt diese mit 1 ml BCA Reagenz (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, München, D) (50 Teile Bicinchoninic Acid + 1 Teil CuSO₄-Lösung). Das

Gemisch wird für 15 min bei 60°C inkubiert und die Extinktion bei 560 nm bestimmt. Die Ermittlung des Proteingehalts erfolgt über eine Eichgerade. Pro Reaktionsansatz sollte 1 mg Protein in 50 mM Tris-HCl, pH 7, 0,1 % Triton X-100 eingesetzt werden. Zur Bestimmung der PSD-Enzymaktivität wurde die von Dowhan *et al.* (1974) beschriebene Methode leicht verändert. Als Substrat wurden 0,01 µCi (130 ng) L-3-Phosphatidyl-L-[3-¹⁴C]-serin, 1,2-dioleoyl (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, GB) und 1,3 µg PS in 75 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7, 0,1 % Triton X-100 eingesetzt. Durch die katalysierte Decarboxylierung von PS zu PE und Kohlendioxid wurde das entstehende Produkt PE ebenfalls radioaktiv markiert. Im Anschluss an die Reaktion (1 h, Raumtemperatur) wurden die Lipide PS und PE durch Zugabe von 200 µl Chloroform/Methanol (2:1) und 100 µl 1 M KCl, 0,2 M H₃PO₄ extrahiert. Die Auftrennung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie mit Si250-PA Platten (J.T.Baker, Phillipsburg, USA) in Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) als Laufmittel. Anschließend wurde die Verteilung der Radioaktivität zwischen dem Edukt und dem Produkt über Autoradiographie mit dem Phosphoimager (Raytest, Straubenhardt, D) detektiert. Die Autoradiographie mit dem Phosphoimager stellt eine Alternative zu dem üblichen Nachweis mit dem Röntgenfilm dar. Die Detektion des Lipidmusters im Lipidextrakt erfolgte durch über Nacht Exposition der getrockneten DC-Platten auf der Phosphoimager-Platte. Diese konnte mit dem Gerät BAS 1500 (Raytest, Straubenhardt, D) ausgelesen werden. Durch Abgleich mit dem 1:1 Ausdruck konnten so die Phospholipide auf der DC lokalisiert werden. Die Quantifizierung der schwarzen Banden wurde im Programm „TINA“ (Raytest, Straubenhardt, D) durchgeführt. Dieses Programm ermittelt die Stärke der Pixeldichte auf dem Phosphoimager in bestimmten Bereichen des Bildes, welche zuvor als Regionen definiert wurden. Die Schwärzung (Pixeldichte) steht im direkten Verhältnis zur Menge des radioaktiven Lipids.

2.9.6.2 PSD-Enzymtest mit *E. coli*

Der *in vitro* Enzymtest wurde mit *E. coli* auf der Grundlage des unter 2.9.6.1 beschriebenen Tests durchgeführt. Es wurde eine 200 ml Kultur angeimpft und mit 0,5 mM IPTG induziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet (6000 x g, 5 min). Die Zellen wurden mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 (4 g KH₂PO₄ + 10,7 g K₂HPO₄ in 100 ml = 1 M Kaliumphosphatpuffer) gewaschen und anschließend

in 1 ml des Puffers aufgenommen. Durch Ultraschall (Sonopuls, Bandelin, Berlin) wurden die Zellen aufgebrochen. Die Proteinkonzentration der Zellsuspension wurde mit der BCA-Methode bestimmt. Für den Enzymtest wurden 50 µg Protein eingesetzt. Das Substrat wurde, wie in dem Abschnitt 2.9.6.1 beschrieben, vorbereitet. Das Substrat wurde für den *E. coli* Enzymaktivitätstest in einen auf 42°C temperierten Heizblock gestellt und die Proteinlösung zu dem Substrat pipettiert. Die Reaktionsdauer betrug 10 min. Alle weiteren Schritte erfolgten wie unter 2.9.6.1 beschrieben.

2.9.6.3 PSD-Enzymtest mit Mitochondrien

Für den Enzymtest wurde die Proteinkonzentration der isolierten Mitochondrien mit der BCA-Methode bestimmt und der Enzymtest durchgeführt (siehe 2.9.6.1).

2.9.7 Extraktion von Nukleotiden und Analyse mit HPLC

(Abgewandelt nach Weiner *et al.*, 1987 und Jellito *et al.*, 1992)

Etwa 100 mg gefrorenes Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und mit 1 ml auf -20°C temperierter 16 % Trichloressigsäure in Diethylether versetzt. Der Ansatz wurde 2 min gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert, bevor 300 µl 16 % Trichloressigsäure in Diethylether mit 5 mM EGTA pro 100 mg Blattmaterial zugegeben wurden. Nach 3 stündiger Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert (20800 g, 10 min). Der wässrige Überstand wurde zu 5 ml Wasser-gesättigtem Diethylether gegeben, gemischt und erneut zentrifugiert (1400 g, 4°C, 5 min). Die Etherphase wurde verworfen und die wässrige Phase erneut mit Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und der pH-Wert mit 5 M KOH, 1 M Triethanolamin auf 6-7 eingestellt. Zum Verdunsten des restlichen Diethylethers wurde das Reaktionsgefäß 30 min offen stehen gelassen. Um den eventuell entstandenen Niederschlag zu entfernen, wurde ein weiteres Mal 10 min bei 20800 g und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in HPLC-Röhrchen überführt und durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie, unter Verwendung des HPLC-Systems 450 MT2 (Probeninjektor Cotati 9125, UV Detektor 430; Kontron

Instruments, Eichung, D) vermessen. Die Kalibrierung erfolgte über einen externen Standard. Es wurden 20 µl der Probe injiziert. Die Proben wurden zunächst über eine selbst gefüllte Partisal 10 SAX Vorsäule, dann mit einer Durchflussrate von 1 ml pro min durch eine Partisal-SAX10 (N(CH₃)₃⁺) Anionen Austausch Säule (Whatman, Maidstone, UK) geleitet. Zum Aufbau des Gradienten wurden die Puffer A (40 mM NH₃PO₄, pH 2,8 mit H₃PO₄) und B (750 mM NH₄PO₄, pH 3,7) verwendet. Der Gradient sah folgendermaßen aus: 0 min 95 % Puffer A, 12 min 95 % Puffer A, 15 min 50 % Puffer A, 20 min 10 % Puffer A, 34 min 0 % Puffer A, 36 min 0 % Puffer A, 37 min 95 % Puffer A, 42 min 95 % Puffer A. Die Detektion erfolgte mit dem UV/VIS Detektor bei 254 nm. Zur Integration der Peaks wurde die Software Chromeleon Version 6.60 (Dionex GmbH, Idstein, D) verwendet.

2.9.8 Messung der Atmungsraten mit Sauerstoffelektrode

Für die Bestimmung der Atmungsraten wurden *Arabidopsis* Samen oberflächensterilisiert und in 300 ml Medium (2 MS, 3 % Saccharose, 20 mM Isobutylsäure) für 3 Wochen, in Dunkelheit angezogen. Vor der Messung wurde frisches Medium zu den Keimlingen gegeben und 48 h Luft durch die Kolben geleitet, um die Keimlinge in den verschiedenen Kolben in einen ähnlichen physiologischen Zustand zu bringen. Anschließend wurde den Keimlingen frisches MS-Medium mit 1 % Saccharose zugegeben, der Kolben luftdicht verschlossen und sofort mit der Messung begonnen. Die Messung erfolgte in Dunkelheit mit einem Sauerstoff Mikrosensor, der mit einem optischen Glasfaser Sauerstoff-Messgerät (Microx TX2, Presens, Regensburg, D) verbunden war. Diese Art des Sensors ermöglichte die präzise schnelle Messung von Änderungen der Sauerstoffkonzentration innerhalb des Mediums. Es wurden im Abstand von 1 min die Sauerstoffkonzentrationen gespeichert, bis sich ein Gleichgewicht einstellte. Die Atmungsrate wurde im linearen Bereich der aufgezeichneten Kurve in Bezug auf die Trockenmasse der Keimlinge bestimmt.

2.9.9 Alexander-Färbung

Mit der Alexander-Färbung ist es möglich, entwicklungsfähige Pollen von nicht lebensfähigen Pollen zu unterscheiden. Es wurden Blütenstände geerntet und in FPA50 (5 ml Formaldehyd 37 %, 5 ml Propionsäure, 90 ml Ethanol 50 %) 1-3 h fixiert. Anschließend wurden die Antheren auf Objektträger gebracht und mit wenigen Tropfen Alexander Färbelösung (10 ml Ethanol, 1 ml Malachit Grün [1 % in Ethanol], 5 ml Fuchsinäure [1 % in Wasser], 0,5 ml Orange G [1 % in Wasser], 5 g Phenol, 5 g Chloralhydrat, 2 ml Eisessig, 25 ml Glycerol, 50 ml Wasser) bedeckt. Nach 15 min konnten die Proben unter dem Stereomikroskop (Leica MZ125, Leica, Solms, D) betrachtet werden. Die Wand lebensfähiger Pollen ist grün gefärbt, das Cytoplasma violett.

2.10 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana Samen wurden oberflächensterilisiert, indem die Samen 1 Minute in 70 % Ethanol gewaschen und für maximal 15 Minuten in 5 % (v/v) Natriumhypochlorit, 0,1 % (v/v) Triton X-100 inkubiert wurden. Anschließend wurden die Samen drei Mal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden in steriler Agarose 0,1 % (w/v) aufgenommen und gleichmäßig auf 2 MS-Medienplatten verteilt, je nach Linie mit oder ohne Antibiotikum. Diese Platten wurden über Nacht bei 4°C vernalisiert. Die *Arabidopsis* Pflanzen wurden 10-14 Tage in Sterilkultur in einer Gewebekulturkammer (22°C, 16 h Tageslänge, 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 70 % Luftfeuchtigkeit) angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge auf *Arabidopsis*-Erde (Vermiculit und Gartenerde 1:1) pikiert. Das weitere Wachstum erfolgte unter *Arabidopsis thaliana* Standardbedingungen: Tag: 16h, 20°C, 60 % Luftfeuchte, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht; Nacht: 16°C, 75 % Luftfeuchte.

2.10.1 Induktion des Ethanol induzierbaren Promotors

Die Induktion des Ethanol induzierbaren Promotors musste erfolgen, bevor die Pflanzen begannen, einen Spross hervorzubringen. Dazu wurden drei Wochen alte Pflanzen genutzt. Pro Pflanze (6 cm Topf) wurde mit 10 ml 0,5 % Ethanol zum

Zeitpunkt 0 h, 6 h, und 16 h bewässert. Das Blattmaterial wurde 29 h nach der ersten Ethanolgabe geerntet.

2.10.2 Kreuzung von *A. thaliana*

Von einer jungen Blüte wurden einige Pollen entnommen und der Pollen auf die Narbe einer noch nicht geöffneten Blüte getupft. Anschließend wurde die Knospe zum Schutz vor Austrocknung mit etwas Klarsichtfolie umhüllt und der Spross markiert. Innerhalb von 4 – 7 Tagen war der Erfolg der Kreuzung an der beginnenden Schotenbildung zu erkennen.

2.10.3 Infiltration von *A. thaliana* Blüten mit Jasmonsäure

Dieses Experiment wurde wie in der Veröffentlichung von Ishiguro *et al.* (2001) beschrieben durchgeführt.

2.10.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *A. thaliana*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Gewebe und Organellen von *A. thaliana* Linien wurden durch Michael Melzer am IPK Gatersleben, D angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.11 Anzucht von *Escherichia coli*

Von den benötigten Bakterienstämmen existierten Glycerolstocks, die bei –80°C gelagert wurden. Für Untersuchungen wurden zunächst die gewünschten *E. coli*-Stämme aus der Glycerol-Stocksammlung auf LB-Medienplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für weitere Untersuchungen wurden Einzelkolonien von den Platten entnommen und diese in 3 ml LB-Flüssigmedium mit

entsprechendem Antibiotikum angeimpft (Reagenzglas mit Aluminiumkappe). Diese wurden über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln angezogen. Wurden größere Kulturen benötigt, wurde mit einer 3 ml Kultur eine 250 ml Kultur inokuliert. Die Bakterienstämme wurden gegebenenfalls mit IPTG induziert. Die Induktion erfolgte nach Erreichen der optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 x g geerntet.

3. Ergebnisse

3.1 Expression verschiedener PSDs in heterologen Systemen und in *Arabidopsis thaliana*

3.1.1 Heterologe Expression von *atPSD2* und *atPSD3* in *E. coli*

Phosphatidylserin Decarboxylasen (PSD) wurden bereits unter anderen aus Hefe und *E. coli* charakterisiert (Clancy *et al.*, 1993; Trotter *et al.*, 1993; Trotter und Voelker, 1995a; Trotter *et al.*, 1995b; Hawrot und Kennedy, 1975; Hawrot und Kennedy, 1978). Aus Pflanzen sind bisher die *lePSD1* aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und die *atPSD1* aus *Arabidopsis* identifiziert und untersucht worden (Rontein *et al.*, 2003). Es konnte dabei gezeigt werden, dass *atPSD1* in allen Geweben der Pflanze sehr gering exprimiert wird und das Genprodukt im Mitochondrium lokalisiert ist (Rontein *et al.*, 2003). Insgesamt wurden in *Arabidopsis* drei Gene (*atPSD1*: At4g16700, *atPSD2*: At5g57190, *atPSD3*: At4g25970) durch Vergleich mit Sequenzen bereits bekannter *PSD* Gene identifiziert (von Orlow, 2003; Rontein *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte für die beiden Gene *atPSD2* und *atPSD3* aus *Arabidopsis* zunächst die Funktionalität gezeigt werden. Dafür wurden beide cDNAs in den Vektor pKK-MCS kloniert. Da die C-Termini der *atPSD2* und *atPSD3* ortholog zu *ecPSD* aus *E. coli* sind, wurden zusätzlich auch Konstrukte erstellt, die nur den C-Terminus des jeweiligen Proteins trugen. Für den Nachweis der Funktionalität wurde die *E. coli* Mutante EH150, die eine temperatursensitive *PSD* Mutation trägt, mit den Konstrukten transformiert. EH150 zeigt bei 37°C Wachstumstemperatur ein Lipidmuster wie ein WT Stamm, z.B. XL1blue. Bei einer Wachstumstemperatur von 42°C jedoch wird die endogene *PSD* inaktiviert und im Lipidmuster ist eine Akkumulation von PS und eine Reduktion von PE detektierbar (Hawrot und Kennedy, 1975; Hawrot und Kennedy, 1978). Die EH150 Zellen wurden mit folgenden Konstrukten transformiert: pKK-MCS (leerer Vektor), *atPSD2*, *atPSD3*, *atPSD2*-C-Terminus und *atPSD3*-C-Terminus und bei 37°C angezogen. Aus den EH150 Transformanten wurden Proteine isoliert und mit radioaktiv markierten ¹⁴C-PS bei 42°C inkubiert. Die Autoradiographie der anschließend isolierten und aufgetrennten Lipide lässt erkennen, welche Transformanten ¹⁴C-PS zu ¹⁴C-PE umsetzen konnten. Abb. 7 zeigt, dass in XL1blue Zellen der Umsatz von PS in PE bei 42°C erfolgen kann. Bei der Mutante EH150 sowie bei der mit leerem Vektor

transformierten EH150 Transformante ist dieser Umsatz stark reduziert. Transformation von EH150 mit der vollständigen *atPSD3*-cDNA führte zu einer schwachen Komplementation der PE-Synthese. Die Transformation mit dem C-Terminus von *atPSD3* komplementierte den EH150 Lipidphänotyp vollständig, da die PE-Synthese mit ähnlicher Effizienz wie in XL1blue Zellen erfolgen konnte. Obwohl *atPSD2* und *atPSD3* auf Aminosäureebene eine starke Identität aufweisen (84,5 %), wurde eine Komplementation mit *atPSD2* sowie mit dem C-Terminus von *atPSD2* nicht erzielt (Abb. 7).

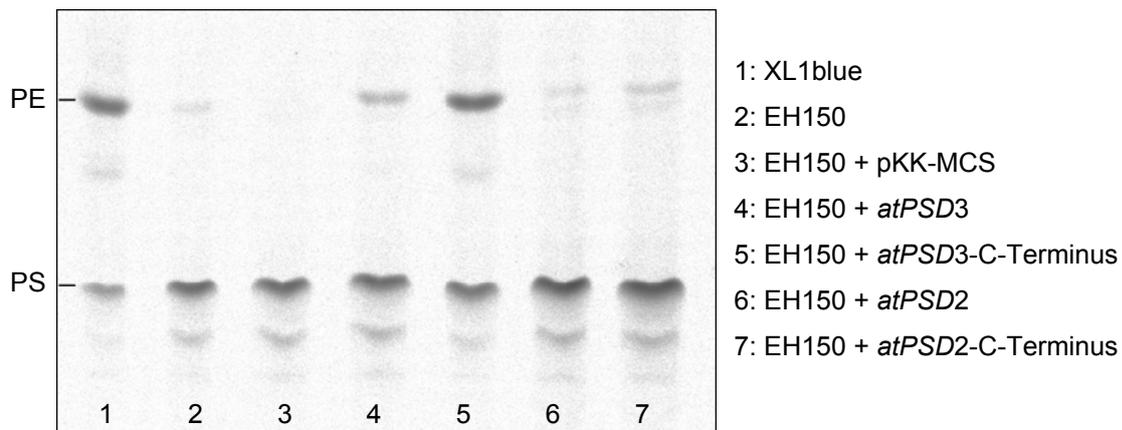


Abb. 7: PSD-Aktivitätstest mit Proteinen aus transformierten EH150 Zellen

Es wurden Proteine aus mit *Arabidopsis* cDNAs von *atPSD3*, *atPSD2*, *atPSD3*-C-Terminus und *atPSD2*-C-Terminus transformierten *E. coli* Mutanten EH150 isoliert und bei 42°C mit dem ¹⁴C markierten Substrat (PS) inkubiert. Die dargestellte Autoradiographie der durch Dünnschichtchromatographie getrennten Lipide zeigt, welche Transformanten PS zu PE umwandeln können.

3.1.2 Heterologe Expression von *atPSD2* und *atPSD3* in *S. cerevisiae*

PSD2 aus *Arabidopsis* konnte den Lipidphänotyp der EH150 Zellen nicht komplementieren, und somit konnte die Funktionalität dieses Gens nicht gezeigt werden. Aus diesem Grund sollte ein anderes System verwendet werden. PE wird in Hefezellen hauptsächlich über den PSD Weg synthetisiert. In PSD-defizienten *psd1psd2* Hefemutanten ist keine PSD-Aktivität nachweisbar, was dazu führt, dass in Abwesenheit von Ethanolamin kein Wachstum erfolgt, d.h. die *psd1psd2* Mutanten sind ethanolaminauxotroph (Trotter *et al.*, 1995b; Birner *et al.*, 2001; Abb. 8B, 2. Sektor). Mit Hilfe dieser Hefe *psd1psd2* Mutante wurde bereits die Funktionalität der mitochondrial lokalisierten *lePSD1* aus Tomate gezeigt (Rontein *et al.*, 2003). Dies

sollte für *atPSD2* und *atPSD3* aus *Arabidopsis* ebenfalls erfolgen. Die mit dem leeren Vektor transformierte *psd1psd2* Mutante blieb ethanolaminauxotroph (Abb. 8B, 3. Sektor). Durch die Transformation mit den pflanzlichen cDNAs konnte das Wachstum unter Ethanolaminmangel wiedererlangt werden, was in Abb. 8B, Sektor 4 und 5 zu sehen ist. Unter Zugabe von Ethanolamin ist es allen verwendeten Hefelinien möglich zu wachsen (Abb. 8A).

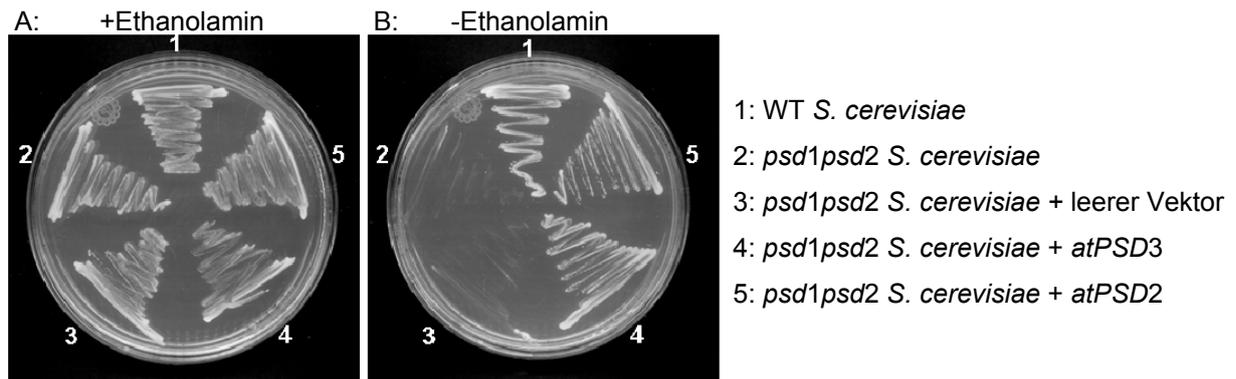


Abb. 8: Komplementation der Hefe *psd1psd2* Doppelmutante mit *Arabidopsis PSD* cDNAs

Die *psd1psd2* Doppelmutante von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist durch den kompletten Verlust der PSD-Aktivität ethanolaminauxotroph. Die pflanzlichen cDNAs *atPSD2* und *atPSD3* komplementieren die *psd1psd2* Doppelmutante, so dass die Hefe Doppelmutante auch in Abwesenheit von Ethanolamin wächst.

3.1.3 Charakterisierung transgener *Arabidopsis* Überexpressionslinien

Zur weiteren Aufklärung der Funktion der PSD Enzyme wurde *atPSD3* nicht nur im heterologen System, sondern auch in *Arabidopsis* Pflanzen überexprimiert. Dazu wurden verschiedene Konstrukte (pBinAR-Hyg-*atPSD3*, pSRN-*atPSD3*) hergestellt. Neben diesen Konstrukten sollte ebenfalls die PSD aus dem Moos *Physcomitrella patens* in den Vektor pBinAR-Hyg kloniert werden (pBinAR-Hyg-*ppPSD*). Diese Konstrukte wurden in *Arabidopsis* Wildtyppflanzen mittels *Agrobacterium* vermitteltem Gentransfer transferiert. So sollte geklärt werden, ob eine Überexpression von PSD-Enzymen zu einer Akkumulation von PE im Lipidmuster führt.

3.1.3.1 Überexpression von *atPSD3* in *Arabidopsis* Col-0 Wildtyppflanzen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors

Das Konstrukt pBinAR-Hyg-*atPSD3* sollte zu einer konstitutiven Expression von *atPSD3* unter Kontrolle des 35S-Promotors führen. Transformierte *Arabidopsis* Wildtyppflanzen Col-0 wurden mit Hygromycin B selektiert. Aus den 26 Transformanten wurden über Northern Blot Analyse vier Pflanzen identifiziert, die eine stärkere Expression als der WT zeigten. Die Proteine aus Blättern dieser vier Pflanzen wurden für den PSD-Enzymtest eingesetzt. Trotz erhöhter Transkription konnte jedoch keine erhöhte PSD-Aktivität nachgewiesen werden.

3.1.3.2 Überexpression von *atPSD3* in *Arabidopsis* Col-0 Wildtyppflanzen unter Kontrolle eines ethanolinduzierbaren Promotors

Das Konstrukt pSRN-*atPSD3* mit dem ethanolinduzierbaren Promotor wurde ebenfalls für die Überexpression von *atPSD3* verwendet, da die ethanolinduzierte Genexpression eine stringente Kontrolle der Transgenexpression in genetisch modifizierten Pflanzen bietet (Caddick *et al.*, 1998). Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte mit Hilfe des Antibiotikums Hygromycin B. Nach der Zugabe von Ethanol wurden die induzierten Überexpressionspflanzen ebenfalls über Northern Blot Analyse identifiziert. Von 29 untersuchten Pflanzen zeigten drei Pflanzen eine Überexpression von *atPSD3*. Jedoch führte diese Überexpression auch hier nicht zu einer Erhöhung der PSD Enzymaktivität.

3.1.3.3 Überexpression von *ppPSD* in *Arabidopsis* Col-0 Wildtyppflanzen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors

Da die bisherigen Überexpressionsversuche nicht zu einer erhöhten PSD-Aktivität führten, wurde beim nächsten Versuch keine *Arabidopsis* cDNA, sondern eine cDNA aus dem Moos *Physcomitrella patens* heterolog in *Arabidopsis* überexprimiert. Es wurden aus 25 durch Hygromycin B selektierte Transformanten drei Überexpressionspflanzen identifiziert und ebenfalls der PSD Enzymtest durchgeführt.

Wie in den vorhergehenden Versuchen konnte auch hier keine erhöhte Enzymaktivität gezeigt werden.

3.2 Subzelluläre Lokalisierung der Phosphatidylserin Decarboxylasen aus *Arabidopsis*

Das Enzym *atPSD1* aus *Arabidopsis* ist im Mitochondrium lokalisiert (Rontein *et al.*, 2003; von Orlow, 2003; Abb. 9A). Bei allen bisher bekannten PSDs handelt es sich um Membranproteine, so dass für *atPSD2* und *atPSD3* ebenfalls eine Lokalisierung an interzellulären Membranen erwartet wurde (von Orlow, 2003).

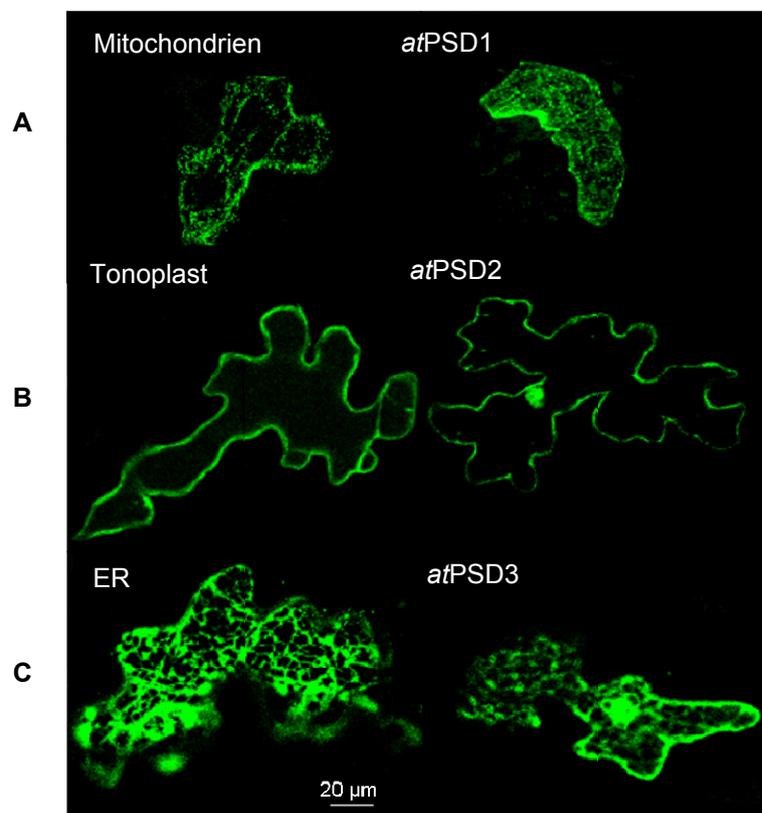


Abb. 9: GFP Lokalisierungsstudien von *atPSDs* in Blattepidermiszellen von *A. thaliana*

Zu sehen sind Blattepidermiszellen, die *atPSD1*-GFP, *atPSD2*-GFP und *atPSD3*-GFP exprimieren. Das Konstrukt *atPSD1*-GFP wurde in Mitochondrien (Kontrolle: pre-101-GFP) lokalisiert (von Orlow, 2003). Die Kontrolle für die Lokalisierung am Tonoplasten war KCO1-GFP und für die Lokalisierung am Endoplasmatischen Retikulum (ER) war KDEL-GFP.

3.3 Expressionsanalyse von *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* in verschiedenen Geweben

Es wurden Expressionsanalysen der drei *PSD* Gene von *Arabidopsis* durchgeführt, um Rückschlüsse auf Funktionen der einzelnen *PSDs* zu ziehen. Hierfür wurden für *atPSD1* und *atPSD3* Northern Blots durchgeführt (Abb. 10). Es stellte sich heraus, dass *atPSD2* mit der Northern Blot Analyse nicht eindeutig detektiert werden konnte, da die Sonde mit *atPSD3* aufgrund der starken Sequenzhomologie ebenfalls hybridisiert. Deshalb wurde für dieses Gen die semiquantitative real-time PCR mit Primersequenzen über Basenfehlpaarungen zwischen den cDNAs von *atPSD2* und *atPSD3* verwendet. In Abb. 10 sind die Ergebnisse dargestellt.

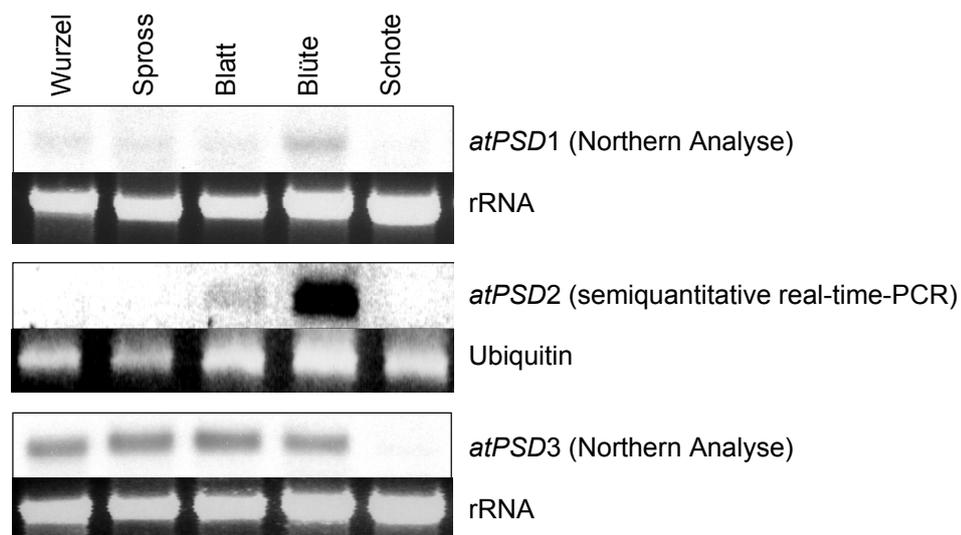


Abb. 10: Expressionsanalyse der PSD Gene in verschiedenen Geweben von *A. thaliana*

Die Expression von *PSD1* und *PSD3* konnte mit Northern Blot analysiert werden, *PSD2* mit semiquantitativer real-time PCR. rRNA: ribosomale RNA

Von allen drei *PSD* Genen wird *atPSD3* am stärksten transkribiert und konnte in Wurzel, Spross, Blatt und Blüte nachgewiesen werden. Wie bei den anderen beiden Genen, ist auch das Transkript von *atPSD3* in Schoten nicht detektierbar. Das Transkriptlevel von *atPSD2* ist in Blüten am höchsten. Zusätzlich konnte die Expression von *atPSD2* in Blättern detektiert werden während sie in anderen Organen nicht nachzuweisen war. Die Expression von *atPSD3* konnte ausschließlich für Blüten gezeigt werden. Um zu belegen, dass bei der semiquantitativen real-time

PCR gleiche Mengen genetisches Material eingesetzt wurden, wurde ein Haushaltsgen (Ubiquitin) amplifiziert. Für Northern Blot Analysen wurde die Menge der ribosomalen RNA (rRNA) als Vergleich eingesetzt.

3.4 Isolation der T-DNA Insertionsmutanten *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1*

3.4.1. Isolation der T-DNA Insertionsmutante *psd1*

Die Einzelmutanten *psd2-1* und *psd3-1* wurden bereits zuvor isoliert (von Orlow, 2003). Für eine vollständige Untersuchung der Funktion aller *PSD* Gene sollte auch eine Mutante für *psd1* isoliert werden. Nachkommen der T-DNA Insertionslinie SALK_064716 (At4g16700), Ökotyp Columbia, wurden nach homozygoten *psd1* Mutanten mittels PCR durchmustert. Das Wildtypgen wurde mit dem Primerpaar PD189 / PD176 amplifiziert und der Bereich des Übergangs der T-DNA in die genomische DNA mit dem Primerpaar PD176 / LBb1. Die vom SALK Institut vorgeschlagene Lage der T-DNA im Exon 11 wurde über Sequenzierung des T-DNA Fragmentes nach PCR mit dem Primerpaar PD176 / LBb1 bestätigt.

3.4.2 Isolation einer *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante

Melanie von Orlow (2003) isolierte *psd2-1* (At5g57190) und *psd3-1* (At4g25970) Mutanten von *Arabidopsis*, Ökotyp Wassilewskija (Ws), aus der T-DNA Population der Arabidopsis Knockout Facility, Madison, USA. Aus der Kreuzung der beiden Einzelmutanten wurde die *psd2-1psd3-1* Doppelmutante erhalten. Mit der *psd1* Mutante sollte durch Kreuzung mit der *psd2-1psd3-1* Mutante eine Dreifachmutante *psd1psd2-1psd3-1* erzeugt werden. In Abb. 11 ist die Lage der T-DNA in allen *psd* Mutanten dargestellt. Weiterhin sind die zur Isolation der *psd* T-DNA Insertionsmutanten verwendeten Primerpaare und deren Lage im Gen aufgeführt. Zur Erzeugung der Dreifachmutante *psd1psd2-1psd3-1* wurde der Stempel der *psd2-1psd3-1* Doppelmutante mit dem Pollen der *psd1* Mutante bestäubt. Die daraus resultierende F1 Pflanze wurde geselbstet und die F2-Generation nach der Dreifachmutante durchsucht. Nach Mendel (1865) sollte eine von 64 Pflanzen in der F2-Generation die gesuchte Dreifachmutante sein (Tab. 1).

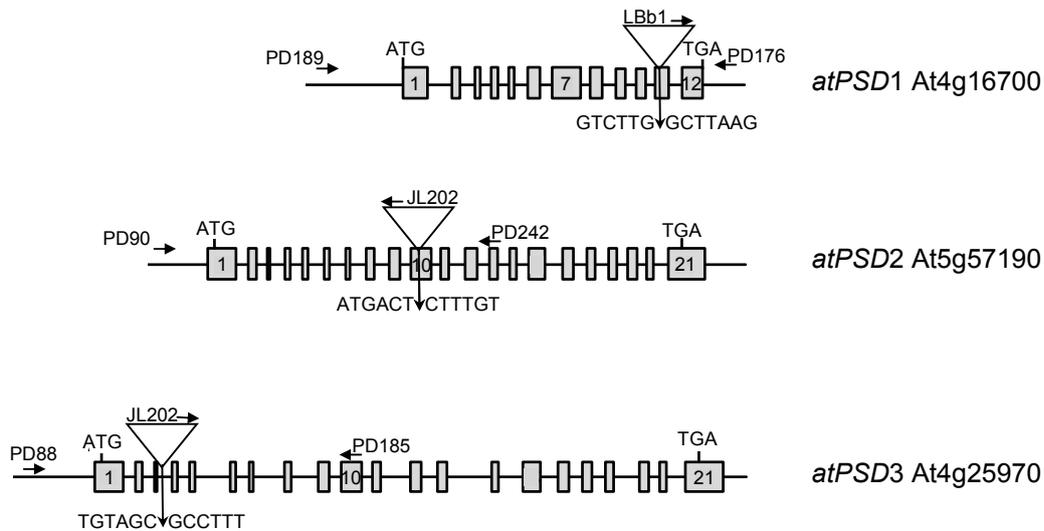


Abb. 11: Lokalisierung der T-DNA innerhalb der *psd* Mutanten Linien

Die Mutanten *psd2-1* und *psd3-1* wurden aus der T-DNA Insertionspopulation der Arabidopsis Knockout Facility der Universität von Wisconsin, Madison, USA isoliert; die *psd1* Mutante aus der T-DNA Insertionspopulation des SALK Instituts, San Diego, USA. Die zur Isolation verwendeten Primer und deren Lage sind für jedes Gen dargestellt.

Tab. 1 Kreuzungsschema der Kreuzung von *psd2-1psd3-1* mit *psd1*.

Nach der Kreuzung der *psd2-1psd3-1* Mutante mit der *psd1* Mutante sollte eine von 64 Pflanzen in der F2-Generation in allen drei Genen die T-DNA homozygot tragen (orange unterlegt).

F0 $\begin{matrix} psd2psd3 \\ psd2psd3 \end{matrix} \times \begin{matrix} psd1 \\ psd1 \end{matrix}$

F1 $\begin{matrix} PSD1PSD2PSD3 \\ psd1 psd2 psd3 \end{matrix}$

F2	♀	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
	♂	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
PSD1 <i>psd2</i> <i>psd3</i>	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
<i>psd1</i> PSD2 <i>psd3</i>	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 <i>psd3</i>	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>
<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>	PSD1 <i>psd2</i> <i>psd3</i>	<i>psd1</i> PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 <i>psd3</i>	<i>psd1</i> <i>psd2</i> PSD3	PSD1 <i>psd2</i> PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	PSD1 PSD2 PSD3	<i>psd1</i> <i>psd2</i> <i>psd3</i>

Die Isolation der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante erfolgte über PCR mit den in Abb. 11 dargestellten Primerpaaren (Amplifikation der Gene: *atPSD1* mit PD176 und PD189; *atPSD2* mit PD90 und PD242; *atPSD3* mit PD88 und PD185; Amplifikation der T-DNA Insertion: *psd1* mit LBb1 und PD176; *psd2-1* mit PD90 und JL202; *psd3-1* mit JL202 und PD185). In der F2-Generation konnte eine von 100 durchmusterten Pflanzen gefunden werden, die für zwei *PSD* Genloci homozygot war und für einen Locus heterozygot (*psd1psd1 psd2psd2 PSD3psd3*). Von deren Nachkommen (F3) wurden 30 Pflanzen analysiert. Unter diesen 30 Pflanzen konnten drei *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutanten isoliert werden. Es ist zu beachten, dass die *psd1psd2-1psd3-1* Mutante die Ökotypen Col-0 und Ws vereinigt.

3.5 Southern Blot Analyse der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante

Zur Bestätigung der Ergebnisse der PCR wurde zusätzlich eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Dafür wurde die genomische DNA aus allen Linien isoliert und mit *EcoRV* geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit genspezifischen PCR Produkten der drei *PSD* Gene. Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt. Der Southern Blot für das Gen *atPSD1* sollte im WT Banden der Größe 2085 bp, 1580 bp und 585 bp detektieren und in der homozygoten *psd1* Mutante sowie der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante Banden der Größe 2085 bp, 6065 bp und 585 bp. Dabei konnte durch die Anwesenheit der 6065 bp Bande und das Fehlen der 1580 bp Bande in den entsprechenden Mutanten ausgeschlossen werden, dass diese Mutanten für *atPSD1* heterozygot sind. Im Fall von *atPSD2* wurde im WT eine 5385 bp große Bande erwartet. Für die Mutanten *psd2-1*, *psd2-1psd3-1* und *psd1psd2-1psd3-1* sollten zwei Banden zu sehen sein (7750 bp und 2750 bp). Für *PSD3* wurden im WT Banden der Größe 5457 bp und 1810 bp erwartet, für die Mutante *psd3-1*, *psd2-1psd3-1* und *psd1psd2-1psd3-1* Banden der Größe 5764 bp, 4687 bp und 1810 bp. Die erwarteten Bandenmuster konnten in der Southern Analyse detektiert werden. Somit konnte bestätigt werden, dass es sich bei der durch PCR ermittelten *psd* Dreifachmutante tatsächlich um die Mutante *psd1psd2-1psd3-1* handelt.

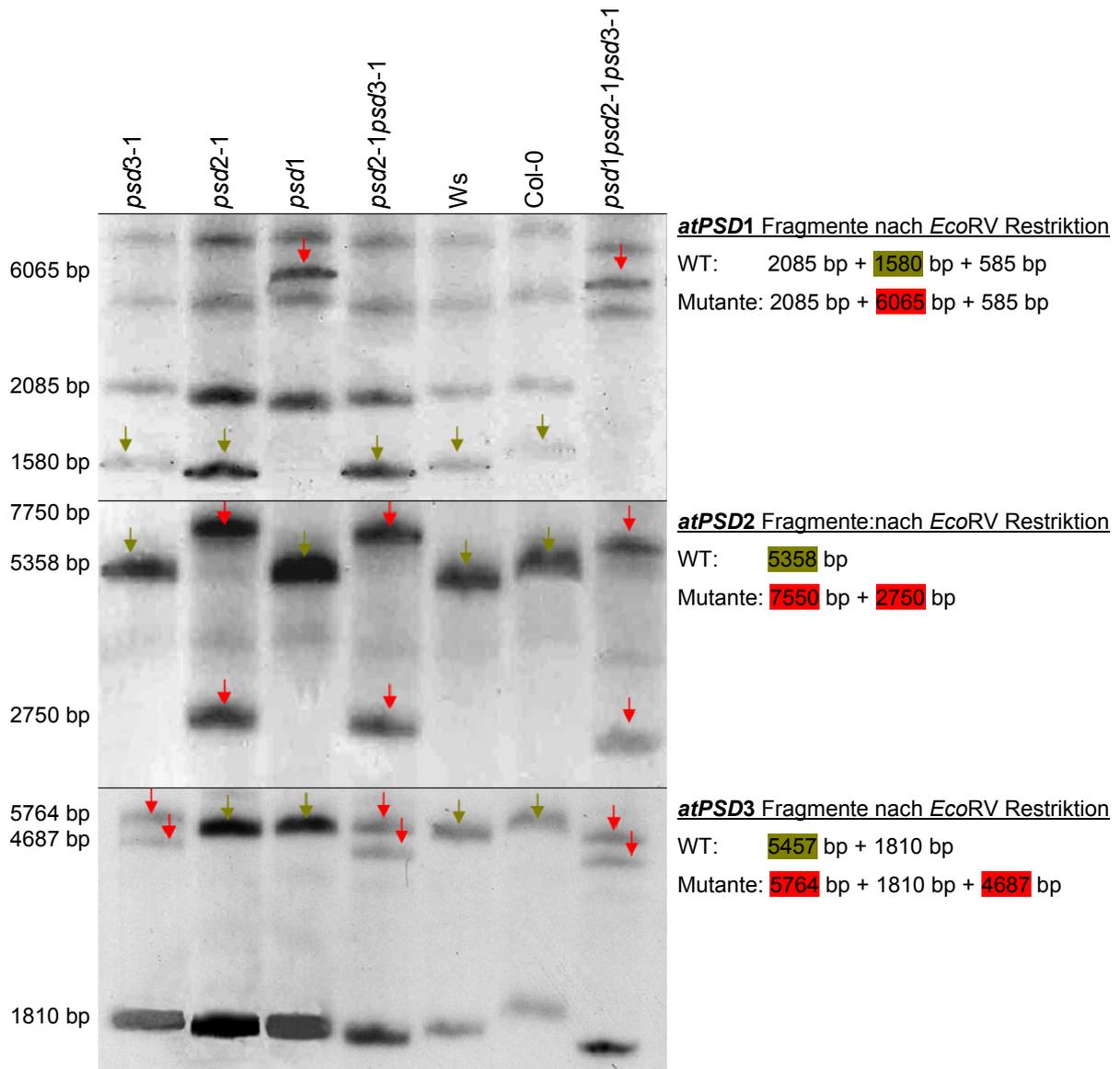


Abb. 12: Southern Blot Analyse zur Identifizierung der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante

Die genomische DNA wurde mit *EcoRV* geschnitten und mit genspezifischen PCR Produkten von jedem der drei PSD Gene hybridisiert. Rot markierte Fragmente sind spezifisch für die Mutante, grün markierte Fragmente spezifisch für Wildtyp (WT).

3.6 PSD Genexpressionsanalyse in *psd1*, *psd2-1* und *psd3-1*

Parallel zur Suche der *psd* Dreifachmutante erfolgte mit Northern Blot Analyse der Nachweis, dass in den zur Kreuzung verwendeten Elternpflanzen kein Transkript des entsprechenden Gens detektierbar ist (siehe Abb. 13). Für *atPSD1* wurde Blüten

RNA verwendet, da nur darin die *atPSD1* Expression im WT nachzuweisen ist. Die vorher beschriebene Sequenzhomologie zwischen *atPSD2* und *atPSD3* stellte auch hier ein Problem dar, da mit der *atPSD2* Sonde auch *atPSD3* hybridisieren konnte. So wurde semiquantitative real-time PCR für *atPSD2* durchgeführt. Die Expression von *atPSD3* ist in den entsprechenden Mutanten nicht nachzuweisen. Es ist ein Fragment mit falscher Größe zu sehen. So konnte in allen *psd* Mutanten gezeigt werden, dass das entsprechende Transkript des ausgeschalteten Gens nicht mehr detektierbar ist. Wie schon bei der Expressionsanalyse der einzelnen PSD Gene wurde auch hier gezeigt, dass gleiche Mengen genetischen Materials eingesetzt wurden, indem bei der semiquantitativen real-time PCR ein Haushaltsgen (Ubiquitin) amplifiziert wurde und für die Northern Blot Analyse die Menge der rRNA dokumentiert wurde.

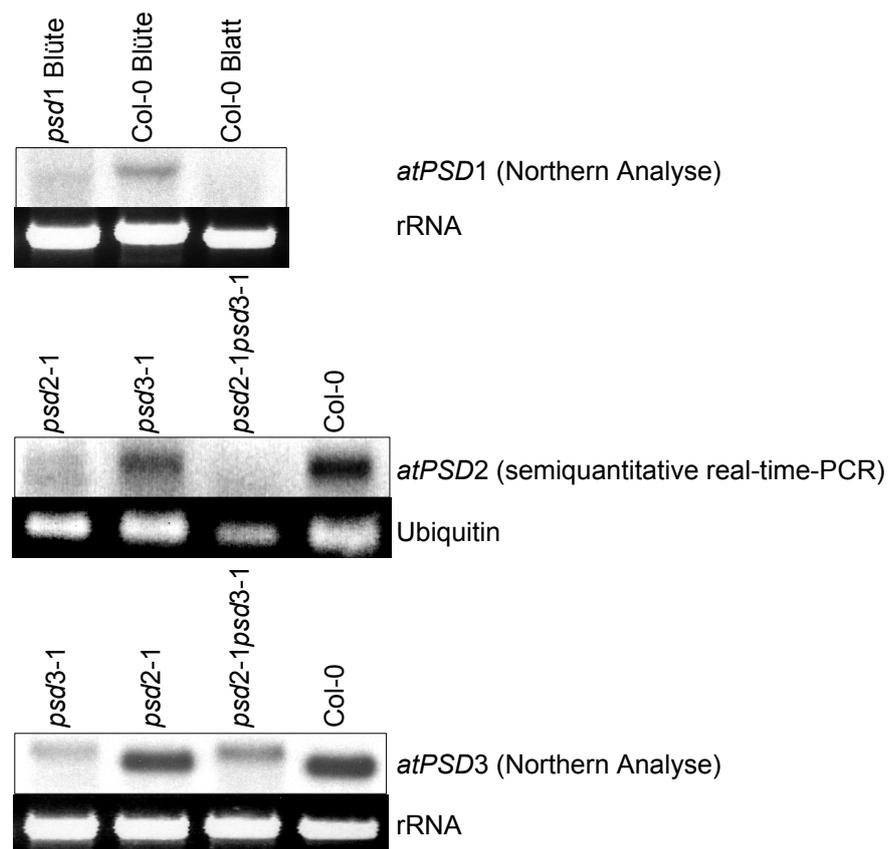


Abb. 13: PSD Expressionsanalyse in *psd1*, *psd2-1*, *psd3-1* und *psd2-1psd3-1* Mutanten

Die Expression von *atPSD1* und *atPSD3* wurde mit Northern Blot untersucht. Für *atPSD2* Expressionsanalysen wurde die semiquantitative real-time PCR genutzt. Die Expression von *atPSD1* ist in Blüten-RNA, *atPSD2* und *atPSD3* in Blatt-RNA gezeigt worden.

3.7 PSD-Enzymtest mit *psd1* und der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante

Die Transkription der Gene in denen die T-DNA inseriert ist, ist nicht nachzuweisen. Der PSD-Enzymtest mit der *psd1* und der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante sollte zeigen, inwiefern die Aktivität der PSDs in den Mutanten beeinträchtigt ist (Abb. 14).

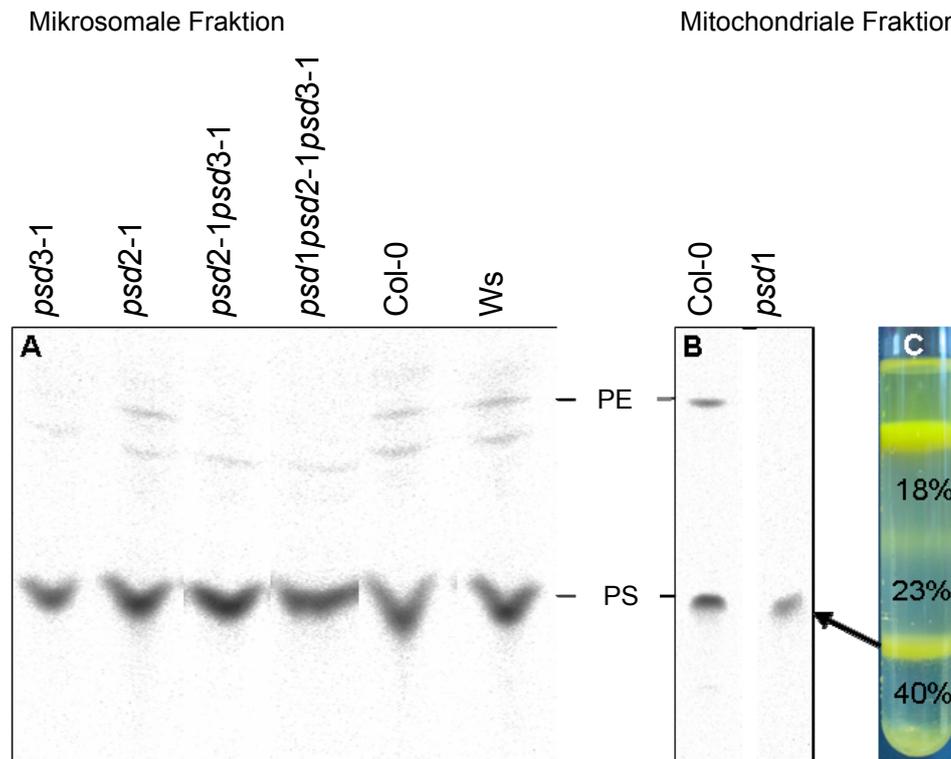


Abb. 14: PSD Enzymtest mit Proteinen aus Mikrosomen und aus Mitochondrien

Es ist in A und B die Autoradiographie der über Dünnschichtchromatographie getrennten Lipide dargestellt. Diese zeigt, welche *psd* Mutanten die Synthese von Phosphatidylethanolamin (PE) aus radioaktiv markiertem Phosphatidylserin (PS) durchführen. A: Enzymtest mit mikrosomalen Proteinen aus *psd2-1*, *psd3-1*, *psd2-1psd3-1*, *psd1psd2-1psd3-1*, WT Col-0 und WT Ws ; B: Enzymtest mit mitochondrialen Proteinen aus *psd1* und WT Col-0; C: verwendeter Percoll-Gradient; Intakte, für diesen Enzymtest verwendete Mitochondrien wurden von der Phasengrenze zwischen 40 % und 23 % Percoll abgenommen.

Aus den zu untersuchenden Linien wurden Mikrosomen isoliert und die Proteine mit radioaktiv markiertem ^{14}C -PS inkubiert. Wie in Abb. 14A zu sehen ist, konnte in der *psd* Dreifachmutante kein Umsatz zu Phosphatidylethanolamin (PE) stattfinden. In der *psd3-1* und *psd2-1psd3-1* Mutante konnte eine sehr geringe Menge an PE synthetisiert werden. Dieses wurde wahrscheinlich durch Kontamination mit noch intaktem PSD1 aus Mitochondrien erzeugt. Für den Enzymtest mit PSD1 wurden aus

etiolierten WT Col-0 und *psd1* Keimlingen die Mitochondrien isoliert. In Abb. 14B ist zu sehen, dass mit Mitochondrienproteinen aus WT Col-0 ein Umsatz zu PE möglich war, jedoch nicht mit Mitochondrienproteinen aus *psd1* Mutanten.

Um die Enzymaktivität zu quantifizieren, wurde die Pixeldichte der detektierten Spots der Autoradiographie bestimmt und damit der Umsatz von PS zu PE in nmol PE pro $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ berechnet (Abb. 15). In Mikrosomen des WT Ws konnte ein Umsatz von $0,00132 \text{ nmol PE min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ermittelt werden. Ein ähnlicher Umsatz ($0,00136 \text{ nmol PE min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) war auch in Mikrosomen von *psd2-1* Mutanten zu sehen. Im Fall der *psd3-1* Mutante war der Umsatz reduziert auf $0,00047 \text{ nmol PE min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, bei der *psd2-1psd3-1* Mutante auf $0,00039 \text{ nmol PE min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Abb. 15). Offenbar ist der Einfluss von PSD2 auf die Gesamtaktivität gering. Die PSD-Enzymaktivität der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante konnte nicht detektiert werden. Bei isolierten Mitochondrien aus WT Col-0 und *psd1* konnte gezeigt werden, dass der Umsatz von $0,00197 \text{ nmol PE min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ in WT Col-0 auf $0,00013 \text{ nmol PE min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ in *psd1* abnimmt.

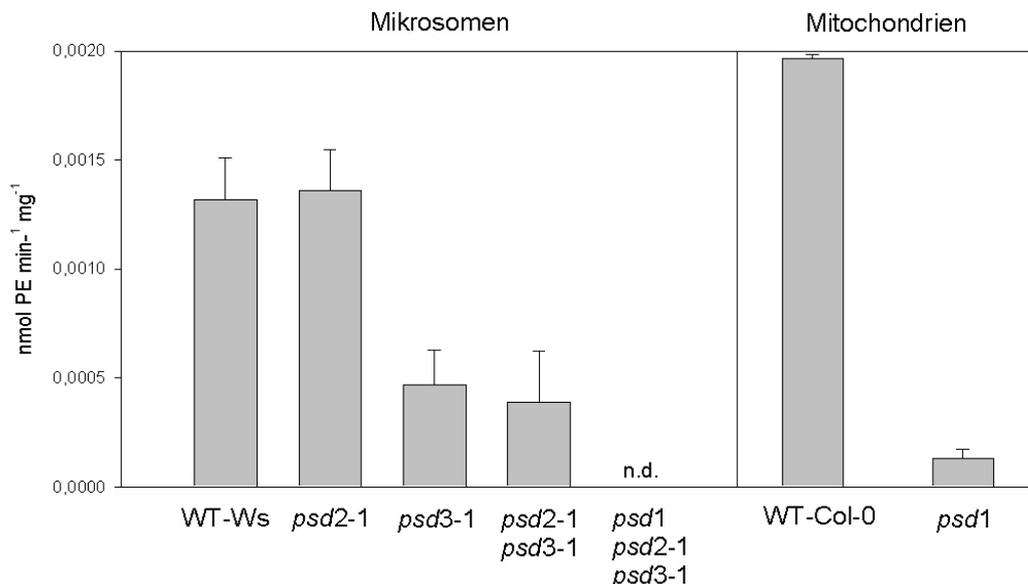


Abb. 15: Der Umsatz von PS zu PE in verschiedenen *psd* Mutanten

Mikrosomale Proteine aus *psd2-1*, *psd3-1*, *psd2-1psd3-1*, *psd1psd2-1psd3-1*, WT Col-0 und WT Ws sowie mitochondriale Proteine aus *psd1* und WT-Col-0 wurden für den Enzymtest verwendet. Anhand der Umgesetzten Menge von PS zu PE wurde der Umsatz bestimmt. n.d.: nicht detektierbar

3.8 Phänotypische Charakterisierung der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, sind keine Unterschiede im Wachstum zwischen den Mutanten, insbesondere der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante und den WT Pflanzen *Ws* und *Col-0* unter Standardbedingungen sichtbar.



Abb. 16: Wachstumsphänotyp aller *psd* Mutanten

Das Wachstum ist in allen untersuchten Linien ähnlich. Zu sehen sind etwa 6 Wochen alte, unter Standardbedingungen angezogene *psd* Mutanten.

Je älter die *psd* Dreifachmutanten wurden, umso auffälliger wurde, dass diese kaum Schoten bildeten. In der Abb. 17 soll verdeutlicht werden, dass bei der *psd* Dreifachmutante im Gegensatz zu WT *Col-0* die Bestäubung oft nicht erfolgte und somit kaum Schoten gebildet wurden.



Abb. 17: Schotenbildung der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante und im WT *Col-0*

In *psd1psd2-1psd3-1* Mutanten konnten keine bzw. nur in seltenen Fällen Schoten gebildet werden.

3.8.1 Bestäubungsversuche

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit die Staubblätter der *psd* Dreifachmutante lebensfähige Pollen produzieren oder ob das Fruchtblatt nicht bestäubungsfähig war. Dazu wurde Pollen von WT Pflanzen auf die Narbe von *psd* Dreifachmutanten gegeben und Pollen der *psd* Dreifachmutante auf die Narbe von WT Pflanzen. Jedoch war es schwer, Pollen der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante zu finden, der dem Pollen der WT Pflanze ähnlich war. In allen Bestäubungsversuchen wurden Schoten gebildet. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass mit fortschreitendem Alter der *psd* Dreifachmutante in seltenen Fällen Schoten gebildet werden konnten. Im Verlauf der Bestäubungsversuche wurde unter der Stereolupe eine veränderte Blütenmorphologie der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante festgestellt.

3.8.2 Veränderte Blütenmorphologie der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante

Die veränderte Blütenmorphologie beschränkt sich auf die Blüten- und Staubblätter der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante. Dabei fällt zunächst auf, dass die Blütenblätter kürzer sind als im WT Col-0 (siehe Abb. 18 Reihe A). Entfernt man die Kelchblätter der *psd* Dreifachmutante, so sind die Blütenblätter sichtbar (siehe Abb. 18 Reihe A rechtes Bild). Die Blütenblätter sind grün und kelchblattähnlich. In Reihe B (Abb. 18) sind die Staubblätter von WT Col-0 und der *psd* Dreifachmutante zu sehen. Die WT Col-0 Staubblätter reichen bis zur Narbe und die gelben Pollen sind zu sehen (Abb. 18, B). Die Staubblätter der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante sind kürzer als die vom WT. Zudem scheint es, als könnten die Pollensäcke nicht aufreißen und die Pollen entlassen. Die Staubblätter in dieser Abbildung (Abb. 18, Reihe B) und in Abb. 18, Reihe C, linkes Bild, stellen die typischen Staubblätter der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante dar. Es konnten zusätzlich stärker veränderte Staubblätter gefunden werden. In diesen seltenen Fällen sahen die Staubblätter zum einen Fruchtblättern mit Stigma ähnlich (Abb. 18, C, Mitte), zum anderen Kelchblättern (Abb. 18, C, rechtes Bild). Die Veränderung der Staubblätter wurde in 30 Blüten untersucht. Es konnten jedoch keine Regelmäßigkeiten festgestellt werden. Das heißt, es kamen in einer Blüte fruchtblattähnliche Staubblätter in unterschiedlicher Anzahl vor (1 und 2) oder aber auch in Kombination mit kelchblattähnlichen Staubblättern, die auch einzeln in einer

Blüte vorkamen. Einige Blüten zeigten eine reduzierte Anzahl an Staubblättern. Selten waren wildtypähnliche Staubblätter zu beobachten, die die Fruchtblätter bestäuben konnten und so Samen der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante entstehen konnten.



Abb. 18: Blütenphänotyp der *psd* Dreifachmutante

Dargestellt sind die Veränderungen der Blütenblätter der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante (Reihe A, rechts) und deren typischen Staubblätter (Reihe B, rechts) im Vergleich zum WT. In Reihe C sind fruchtblattähnliche Staubblätter (Mitte) und kelchblattähnliche Staubblätter (Rechts) der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante zu sehen.

3.8.3 Pollenvitalitätstest der *psd* Dreifachmutante

Durch das Färben der Pollen mit Alexander-Färbelösung sollte gezeigt werden, ob der Pollen in den Pollensäcken der *psd* Dreifachmutante vital ist oder nicht. Vitale Pollen werden dabei violett gefärbt, wie es für Col-0 in Abb. 19A zu sehen ist. Nicht-vitale Pollen werden grün gefärbt.

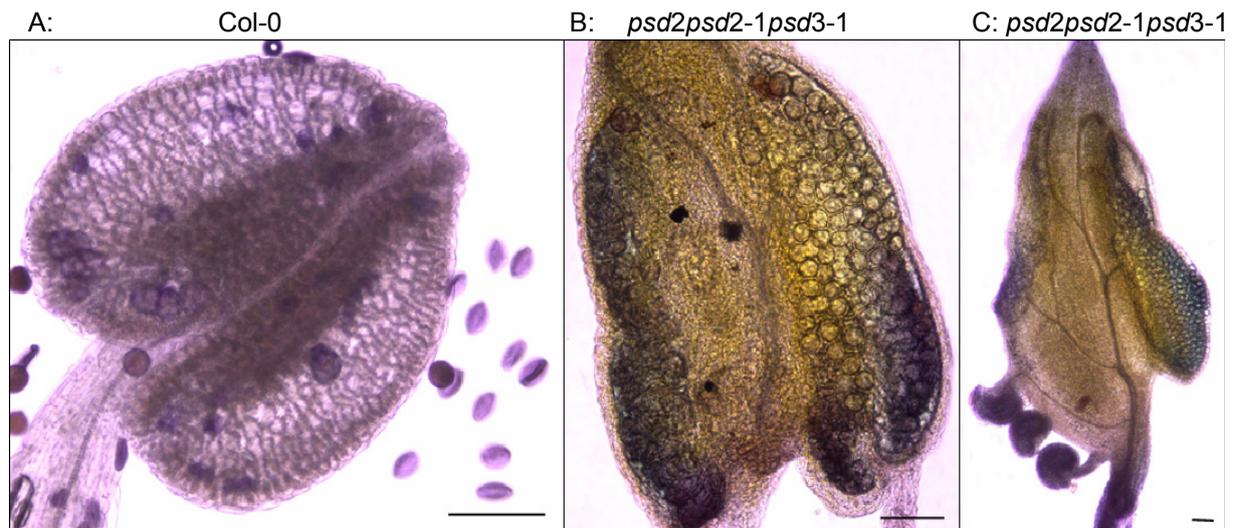


Abb. 19: Vitalitätstest für Pollen (Alexander-Färbung) in Col-0 und der *psd* Dreifachmutante

Vitale Pollen werden violett gefärbt, nicht vitale Pollen grün. Der Balken in den Bildern entspricht 50 μm . A: Pollensack von WT Col-0; B: Pollensack von *psd1psd2-1psd3-1*; C: kelchblattähnliches Staubblatt von *psd1psd2-1psd3-1*

In den Pollensäcken der *psd* Dreifachmutante gibt es sowohl violett als auch grün gefärbte Pollen (B). In kelchblattähnlichen Staubblättern der *psd* Dreifachmutante ist dies ebenfalls zu sehen (C). Zusätzlich sieht man die veränderten Pollensäcke. Es ist weiterhin zu erkennen, dass die Pollen des WT sehr leicht aus dem Pollensack treten. Die Hülle der Pollensäcke der *psd* Dreifachmutante ist stabiler und lässt die Pollen nicht frei. Diese Beobachtung konnte auch in der *Arabidopsis* Mutante *defective in anther dehiscence1* (*dad1*) gemacht werden. Durch die Zugabe von Jasmonsäure oder Linolensäure wird dieser Phänotyp in der *dad1* Mutante wieder aufgehoben, so dass bestäubungsfähige Pollen entstehen können (Ishiguro *et al.*, 2001). Auch die Blüten der *psd* Dreifachmutante wurden mit Jasmonsäure infiltriert, um zu sehen, ob dadurch vitale Pollen gebildet werden können. Dieses Experiment führte im Gegensatz zur *dad1* Mutante nicht zur Bildung bestäubungsfähiger Pollen. Um ein

noch genaueres Bild der Pollen von WT Col-0 und der *psd* Dreifachmutante zu erhalten, wurden diese unter dem Elektronenmikroskop betrachtet (Abb. 20).

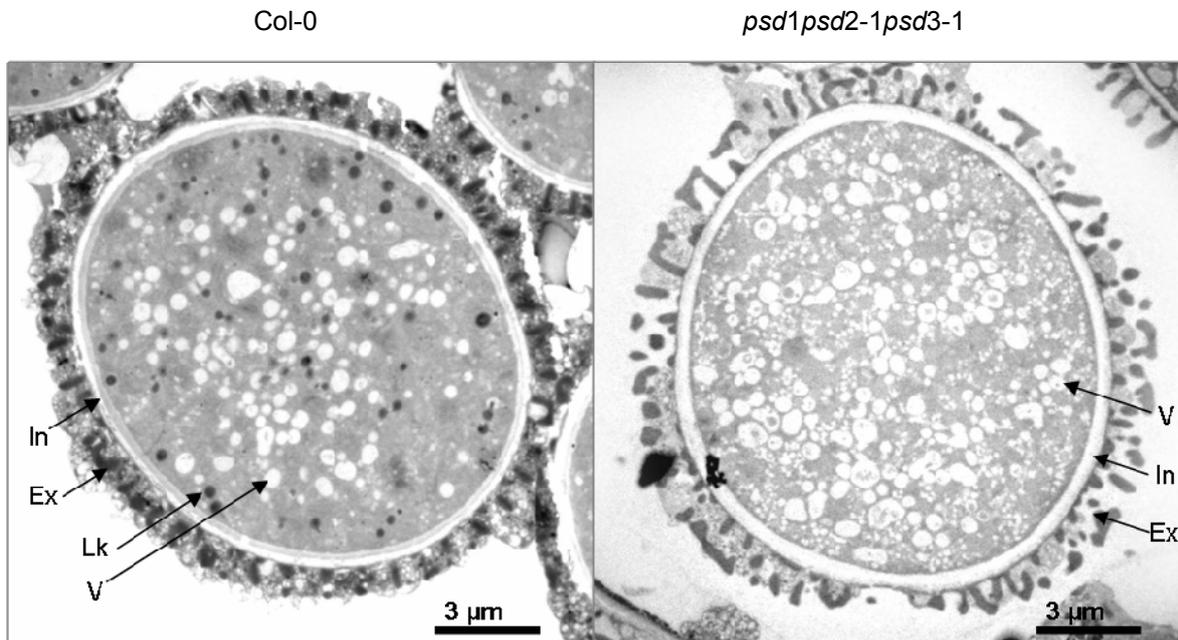


Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollen aus Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1*

Die Pollen sind 3100fach vergrößert dargestellt. Michael Melzer, IPK, Gatersleben; In: Intine; Ex: Exine; V: Vakuole; Lk: Lipidkörperchen

Im Vergleich zu Pollen aus Col-0 Blüten ist in Pollen von *psd1psd2-1psd3-1* eine erhöhte Anzahl kleiner Vakuolen festgestellt worden. Weiterhin fällt auf, dass in Pollen der *psd* Dreifachmutante weniger bzw. kaum Lipidkörperchen sichtbar sind (siehe Abb. 20). Die Veränderung in der Morphologie der Staubblätter und Pollen könnte die Ursache für die stark reduzierte Bildung von Schoten sein.

3.8.4 Samenbildung in Schoten der *psd* Dreifachmutante

Betrachtet man die geöffneten Schoten von WT Col-0 unter der Stereolupe, so sind in ihr viele Samen aneinander gereiht (Abb. 21). In Schoten der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante sind nicht so viele Samen angelegt (Abb. 21). Von diesen wenigen Samen scheinen einige nicht voll entwickelt zu sein (Abb. 21, Pfeile und rechtes Bild). Möglich ist, dass diese kleineren Samen nicht keimungsfähig sind. Die

wildtypähnlichen Samen der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante sollten hingegen keimungsfähig sein.

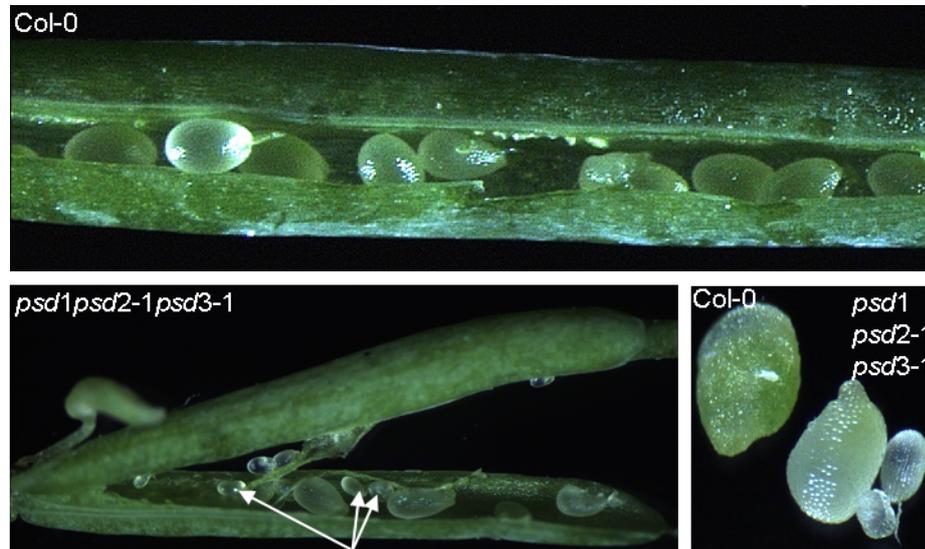


Abb. 21: Samenbildung in Schoten von Col-0 und der *psd* Dreifachmutante

In Schoten von WT Col-0 sind die Samen aneinander gereiht (oberes Bild). In der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante sind nicht an allen Samenanlagen Samen gebildet worden (Bild unten links). Von den wenigen gebildeten Samen scheinen einige nicht voll entwickelt zu sein. Sie sind kleiner als die Col-0 Samen sowie auch weniger grün (Pfeile Bild unten links und Bild unten rechts).

3.9 Lipidanalysen

3.9.1 Lipidkomposition in Blättern und Blüten von Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1*

Um zu sehen, ob durch den totalen Verlust der PSD-Aktivität eine Verschiebung der Lipidzusammensetzung erfolgt ist, wurden Lipide aus Blättern und Blüten der WT Col-0 Pflanzen und der *psd* Dreifachmutante isoliert. Diese wurden anschließend durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (2D-DC) getrennt, ausgekratzt, transmethyliert und anhand von Fettsäuremethylestern mittels Gaschromatographie (GC) quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abb. 22 zu sehen.

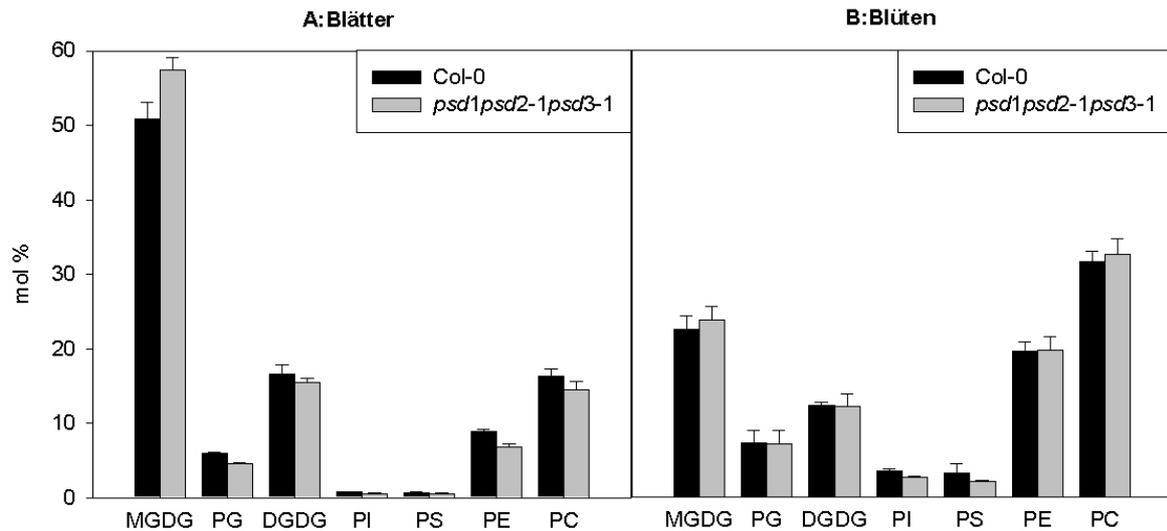


Abb. 22: Lipidzusammensetzung in Blättern und Blüten von Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1*

Die Lipide wurden über 2D-DC aufgetrennt und transmethyliert. Die Fettsäuremethylester wurden über GC quantifiziert.

Im WT Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1* sind in Blättern keine deutlichen Unterschiede zu finden. Die Lipide sind aus etwa 52 % MGDG, 5 % PG, 17 % DGDG, 1,5 % PI, 1,5 % PS, 8 % PE und 15 % PC zusammengesetzt. Die Blütenlipide setzen sich aus etwa 25 % MGDG, 6 % PG, 12 % DGDG, 4 % PI, 4 % PS, 20 % PE und 30 % PC zusammen. Es war kein Unterschied zwischen der *psd* Dreifachmutante und dem WT festzustellen.

3.9.1.1. Fettsäuremuster von PE und PS aus Blättern und Blüten von Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1*

Aus den Daten der Gaschromatographie konnten die Fettsäurezusammensetzungen aller Lipide bestimmt werden (Tab. 2). Phospholipide, wie PS und PE, bestehen hauptsächlich aus Palmitinsäure (16:0), Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3). Außerdem konnte zuvor gezeigt werden, dass PS aus dem ER und der Plasmamembran von Pflanzen reich an langkettigen Fettsäuren wie Docosansäure (22:0) und Tetracosansäure (24:0) ist (Vincent *et al.*, 2001; Bohn *et al.*, 2001). Die Fettsäurezusammensetzung von PE und PS aus Blüten und Blättern von WT Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1* ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Fettsäurezusammensetzung von PE und PS in Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1*

Lipide wurden aus Blättern und Blüten isoliert und mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Quantifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte mit GC. Die Daten sind in mol % angegeben.

PE	Fettsäure	Blätter		Blüten	
		WT Col-0	<i>psd1psd2-1psd3-1</i>	WT Col-0	<i>psd1psd2-1psd3-1</i>
	16:0	21,3 ± 2,6	21,8 ± 0,5	21,3 ± 0,8	19,7 ± 1,0
	16:1	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,2
	16:2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1
	16:3	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,5	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,0
	18:0	0,9 ± 0,8	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,5	1,4 ± 0,1
	18:1	2,6 ± 0,5	2,5 ± 0,1	2,6 ± 1,1	2,5 ± 0,3
	18:2	38,5 ± 1,0	38,5 ± 1,1	36,1 ± 2,9	35,0 ± 0,7
	18:3	33,8 ± 3,3	33,0 ± 0,9	35,8 ± 2,9	38,7 ± 2,5
	22:0	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1
	24:0	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2
PS					
	16:0	13,9 ± 1,0	15,0 ± 2,1	16,1 ± 5,2	13,6 ± 1,2
	16:1	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,8 ± 0,1
	16:2	0,9 ± 0,4	1,4 ± 1,1	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1
	16:3	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,8	0,2 ± 0,2
	18:0	4,5 ± 0,8	4,0 ± 0,1	4,5 ± 1,1	5,3 ± 0,7
	18:1	2,7 ± 0,7	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,5	1,8 ± 0,2
	18:2	27,6 ± 1,0	26,9 ± 1,4	27,8 ± 3,1	25,0 ± 0,2
	18:3	32,4 ± 2,2	35,3 ± 2,5	38,5 ± 5,1	41,6 ± 3,7
	22:0	3,8 ± 0,5	3,5 ± 0,4	2,2 ± 0,2	3,1 ± 1,0
	24:0	7,2 ± 1,3	6,6 ± 1,1	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,4

Die Fettsäurezusammensetzung von PE und PS in WT Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1* ist in den Blättern sowie auch in den Blüten ähnlich. Sehr langkettige Fettsäuren konnten vor allem in PS detektiert werden. In allen anderen Membranlipiden waren

diese kaum vorhanden. PE und PS aus Blättern von WT Col-0 und der *psd* Dreifachmutante sind hauptsächlich aus 16:0 (circa 21 %), 18:2 (circa 37 %) und 18:3 (circa 34 %) zusammengesetzt. Dieses Ergebnis trifft auch für PE und PS aus Blüten zu. Die genaueren Angaben sind der Tab. 2 zu entnehmen.

3.9.2 Lipidanalyse isolierter Mitochondrien

Es könnte sein, dass die Mitochondrien der *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* Mutante durch Veränderung des Lipidmusters der Mitochondrienmembran in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Daher wurden Mitochondrien isoliert und deren Lipide analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 23 zu sehen.

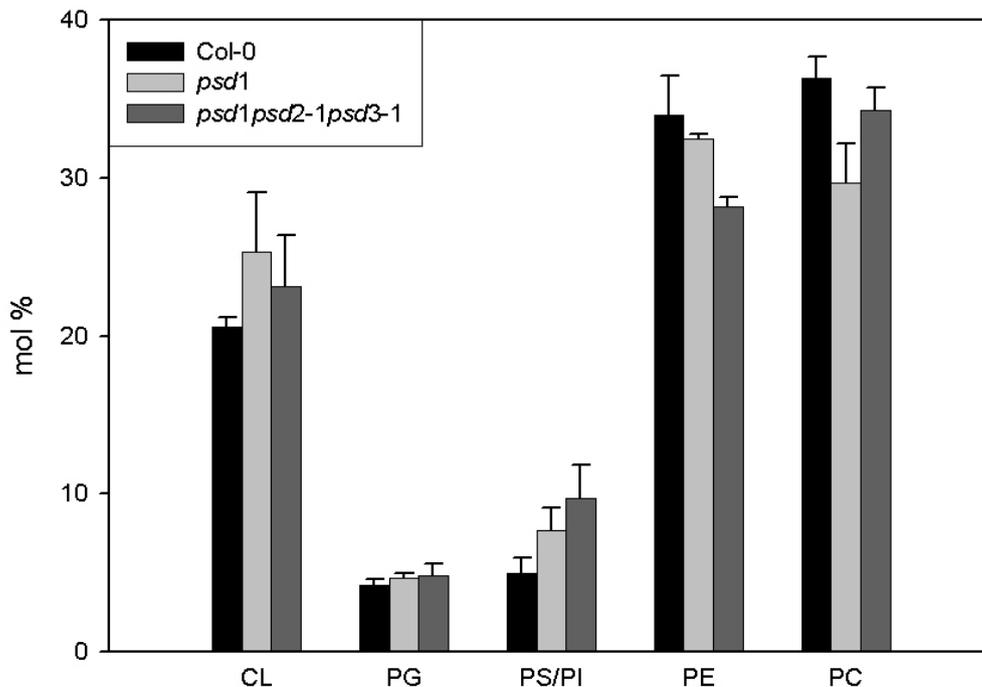


Abb. 23: Phospholipidzusammensetzung der Mitochondrien aus Col-0, *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1*

Die Lipide wurden aus *Arabidopsis* Keimlingen isoliert, die drei Wochen bei Dunkelheit im Flüssigmedium angezogen wurden.

Die Lipide setzen sich aus ungefähr 22 % CL (WT Col-0: 20,6 %, *psd1*: 25,3 %, *psd1psd2-1psd3-1*: 23,1 %), 4,5 % PG (WT Col-0: 4,2 %, *psd1*: 4,7 %, *psd1psd2-1psd3-1*: 4,8 %) und 34 % PC (WT Col-0: 36,3 %, *psd1*: 29,7 %, *psd1psd2-1psd3-1*: 34,3 %) zusammen. Im WT Col-0 sind zudem noch 34,0 % PE

und 5,0 % der Lipide PI und PS. Im Vergleich zum WT Col-0 ist in diesen Lipiden (PE, PI/PS) in den Mutanten *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* ein Unterschied zu finden. Die Mutante *psd1* hat etwas weniger PE (32,5 %) und mehr PS und PI (7,7 %). In der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante ist der Unterschied deutlicher, PE ist um etwa 6 % (28,2 %) reduziert und PS um knapp 5 % (9,7 %) erhöht. Die Lipide PI und PS waren mit diesem System nicht trennbar.

3.10 Charakterisierung der Mitochondrien und deren Funktionalität in *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* Mutanten

3.10.1 Analyse der Anzahl der Mitochondrien in *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* Mutanten

Während der Aufreinigung der Mitochondrien für den PSD-Enzymtest fiel auf, dass bei der *psd1* Mutante nie die gleiche Menge an Mitochondrien wie aus WT Keimlingen isoliert werden konnte, obwohl eine vergleichbare Menge an Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine geringere Anzahl an Mitochondrien in der *psd1* Mutante, vor allem aber in der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante vorhanden ist. Diese reduzierte Anzahl an Mitochondrien könnte zu dem beschriebenen Blütenphänotyp führen. Um dies zu testen, wurden aus etiolierten Keimlingen von WT Col-0, *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* Protoplasten isoliert. Diese wurden mit dem mitochondrienspezifischen MitoTracker® Orange Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Die nun von den Mitochondrien ausgehende Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anzahl der Mitochondrien war in allen Linien ähnlich (Abb. 24).

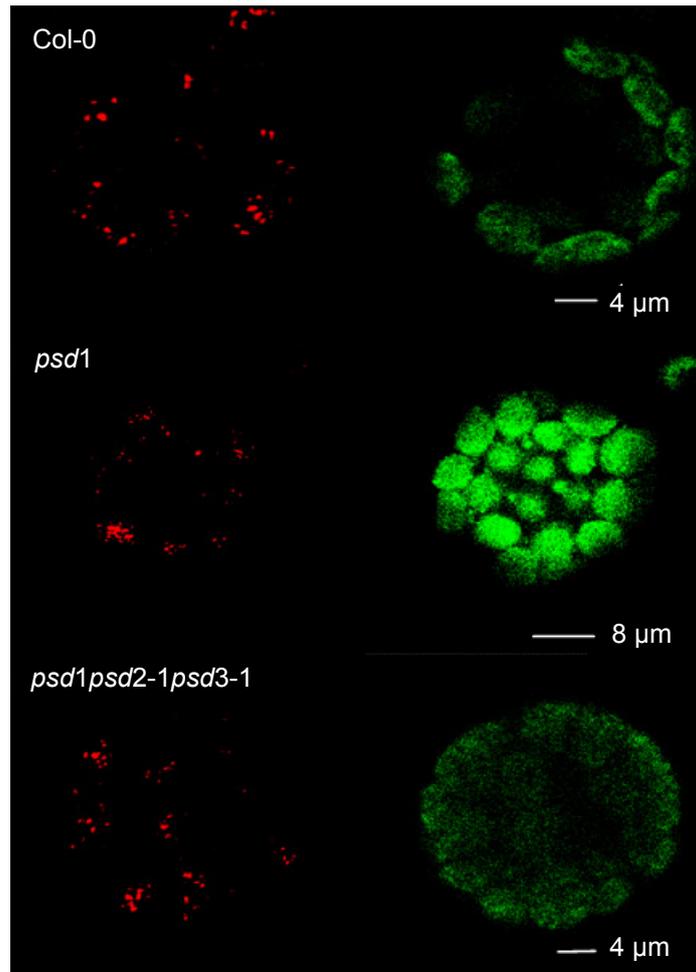


Abb. 24: Anzahl der Mitochondrien in Protoplasten von WT Col-0, *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1*

Die Mitochondrien wurden mit mitochondrienspezifischem MitoTracker® Orange in Protoplasten visualisiert. Die Bilder wurden unter dem Leica TCS SP2 Konfokal Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die linke Seite zeigt die Fluoreszenz der markierten Mitochondrien, die rechte Seite zeigt die Autofluoreszenz der Chloroplasten.

Zusätzlich sollte die Anzahl der Mitochondrien mit einer Western Blot Analyse überprüft werden. Dafür wurden Proteine aus Blättern und etiolierten Keimlingen isoliert und mit ihnen ein Western Blot durchgeführt. Anhand von Unterschieden der Bandenintensität der etwa 60 kDA großen Proteinkomplexe von Cytochrom C sollte zu erkennen sein, ob die Anzahl der Mitochondrien in den Mutanten im Vergleich zum WT verändert ist. Dies konnte in diesem Versuch jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 25).

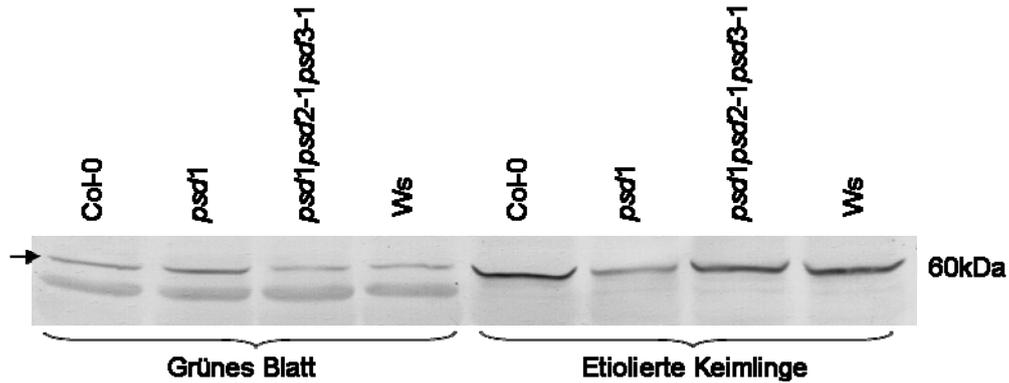


Abb. 25: Immunodetektion von Cytochrom C in *psd* Mutanten

Es wurden 60 µg Protein aus grünen Blättern und aus etiolierten Keimlingen aufgetragen. Die Detektion der mitochondrienspezifischen Cytochrom C Bande erfolgte mit einem monoklonalen Maus Anti-Cytochrome C Antikörper (BD™ Biosciences, Heidelberg, D).

3.10.2 Keimungsrate von *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* bei 21 % und 1 % Sauerstoff

Die veränderte Lipidzusammensetzung könnte die Funktionalität der Mitochondrien, insbesondere die Respiration, negativ beeinflussen. Inwieweit diese in der mitochondrialen *psd1* Mutante und in der *psd* Dreifachmutante betroffen ist, sollte die Untersuchung der Keimungsfähigkeit der Linien WT Col-0, WT Ws, *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* bei 1 % Sauerstoff über drei Wochen zeigen. Während der Respiration werden durch die Cytochrom C Oxidase Elektronen auf Sauerstoff übertragen, der mit vier Protonen aus der Matrix zu Wasser reagiert. Bei 1 % Sauerstoff kann dieser Prozess kaum ablaufen. Damit die Sauerstoffkonzentration konstant gehalten werden konnte, wurden die Keimlinge im Dunkeln angezogen, wodurch Photosynthese, bei der Sauerstoff entsteht, nicht stattfinden kann. Als Kontrolle wurden die verschiedenen Linien bei 21 % Sauerstoff unter denselben Bedingungen angezogen. Die Samen wurden steril auf 2MS-Medium in Weckgläsern ausgebracht, welche in Boxen verblieben, in denen die entsprechende Sauerstoffkonzentration eingestellt wurde. In Abb. 26 ist zu sehen, dass bei 21 % Sauerstoff von allen angezogenen Linien ähnlich viele Samen keimten (WT Col-0: 90,41 %; WT Ws: 84,18 %; *psd1*: 88,41 %; *psd1psd2-1psd3-1*: 85,20 %). Bei 1 % Sauerstoff keimten alle Linien erwartungsgemäß etwas schlechter (WT Col-0:

84,81 %; *psd1*: 77,62 %). Überraschenderweise keimten die Samen der Linie WT Ws schlechter (29,06 %) als die *psd* Dreifachmutante (54,4 %). Es kann aufgrund des Unterschiedes zwischen den beiden Wildtyppflanzen Col-0 und Ws bei 1 % Sauerstoff keine Aussage zum Einfluss der Mutationen auf die Keimungsrate getroffen werden.

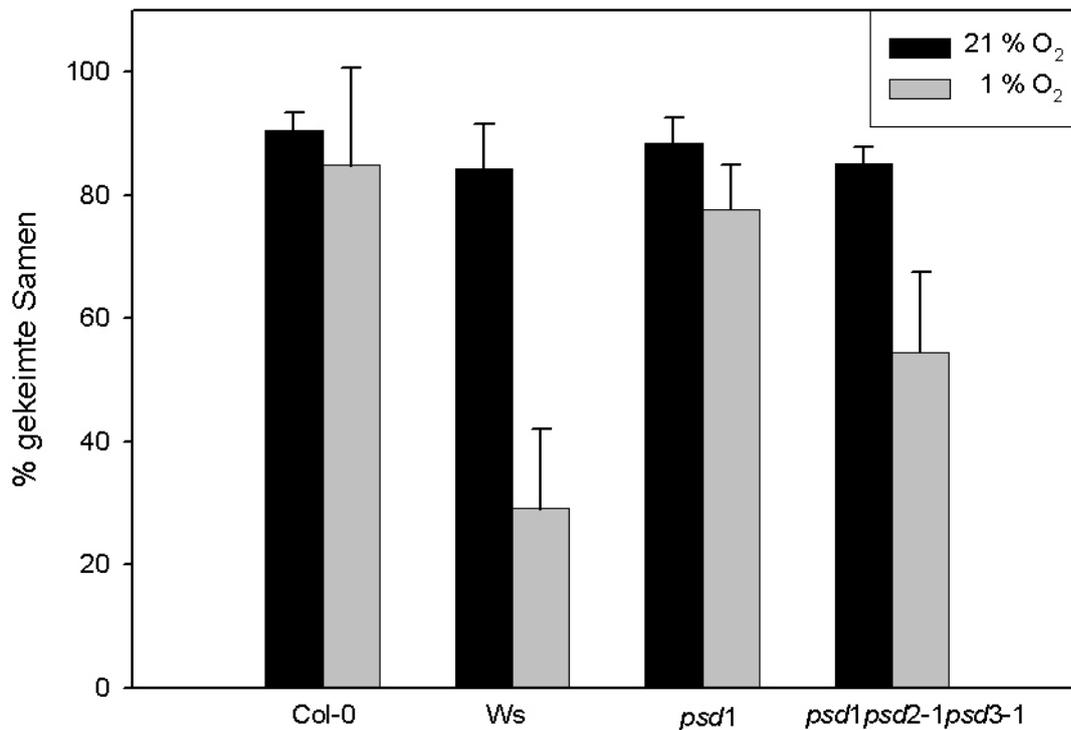


Abb. 26: Keimungsrate verschiedener *psd* Mutanten bei 21 % und 1 % Sauerstoff

Arabidopsis Keimlinge wurden bei 21 % bzw. 1 % Sauerstoff im Dunkeln angezogen. Die Keimungsrate wurde aus der Anzahl der gekeimten und der ungekeimten Samen bestimmt.

3.10.3 Messung der Atmung von *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* Keimlingen

Ist die Respiration der Mitochondrien beeinträchtigt, so läuft die Atmung der Pflanzen nicht optimal. Dafür wurde die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Medium durch Atmung von Keimlingen gemessen. Keimlinge wurden für drei Wochen in Flüssigmedium angezogen. Durch die Anzucht bei Dunkelheit wurde Photosynthese verhindert. Vor der Respirationmessung wurden die Keimlinge 48 h mit Luft begast, um alle Keimlinge in einen vergleichbaren physiologischen Zustand zu bringen. Anschließend wurde frisches Medium zugegeben und die Abnahme der Sauerstoffkonzentration innerhalb des Mediums aufgezeichnet, bis sich ein

Gleichgewicht einstellte. In Abb. 27 sind die ermittelten Atmungsraten in % Sauerstoff, der pro Minute und mg Trockenmasse der Keimlinge veratmet wurde, dargestellt. Wie schon im vorangegangenen Experiment ist hier ein Unterschied zwischen beiden Wildtypen zu erkennen, Col-0: $0,0282 \text{ \% min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, Ws: $0,0157 \text{ \% min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Die Atmung von *psd1* ($0,0302 \text{ \% min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) war ähnlich zum WT Col-0 ($0,0282 \text{ \% min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Die Atmung der *psd1psd2-1psd3-1* Keimlinge ($0,0202 \text{ \% min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) war vergleichbar mit der Atmung von WT Ws ($0,0157 \text{ \% min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

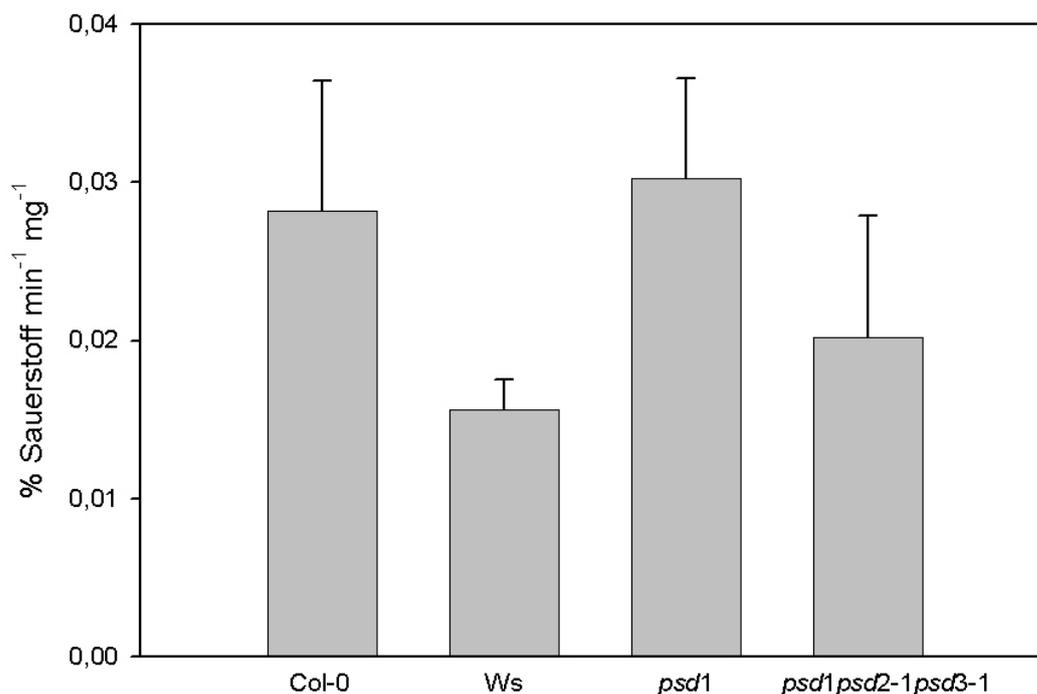


Abb. 27: Atmungsraten von Col-0, Ws, *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1* Keimlingen

Die Atmung wurde mit etiolierten Keimlingen bei Dunkelheit in Flüssigkultur gemessen. Dabei wurde die Sauerstoffabnahme im Flüssigmedium aufgezeichnet und ins Verhältnis zur Trockenmasse gesetzt.

3.10.4 Messung des ADP/ATP-Verhältnisses

Ein weiterer Parameter, mit welchem die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien beurteilt werden kann, ist das ADP/ATP-Verhältnis. Die Respiration der Mitochondrien wird genutzt, um der Zelle ausreichend ATP zur Verfügung zu stellen. Die Messung der Nukleotide erfolgte aus Blütenextrakten. In Abb. 28 sind die ATP/ADP-Verhältnisse dargestellt. Alle untersuchten Linien wiesen sehr ähnliche

ATP/ADP-Verhältnisse auf (Col-0: 2,2494; Ws: 1,8458; *psd1*: 1,8941; *psd1psd2-1psd3-1*: 1,9728).

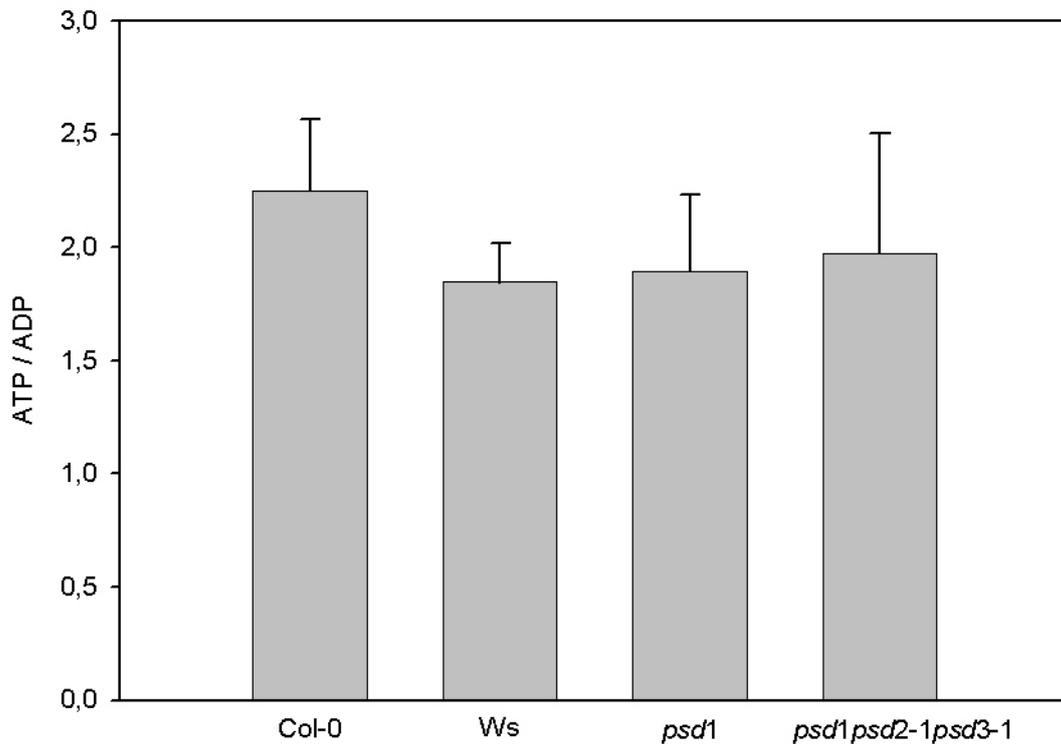


Abb. 28: ATP/ADP-Verhältnis in Col-0, Ws, *psd1* und *psd1psd2-1psd3-1*

Die Nukleotide ATP und ADP wurden aus Blüten isoliert und mit Hilfe von HPLC analysiert.

3.10.5 Mitochondrien-Ultrastruktur in *psd1psd2-1psd3-1*

Es konnte gezeigt werden, dass die Lipidzusammensetzung der Mitochondrien der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante verändert ist. Dies könnte einen Einfluss auf die Ultrastruktur der Mitochondrien haben. Aus diesem Grund wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien aus Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1* erstellt. Da die drastischsten Veränderungen die Blüten- und Staubblätter betreffen, wurden Mitochondrien in diesen Blütenorganen untersucht. Wie in Abb. 29 deutlich wird, sind keine Unterschiede in der Ultrastruktur der Mitochondrien aus Blüten- bzw. Staubblättern sichtbar.

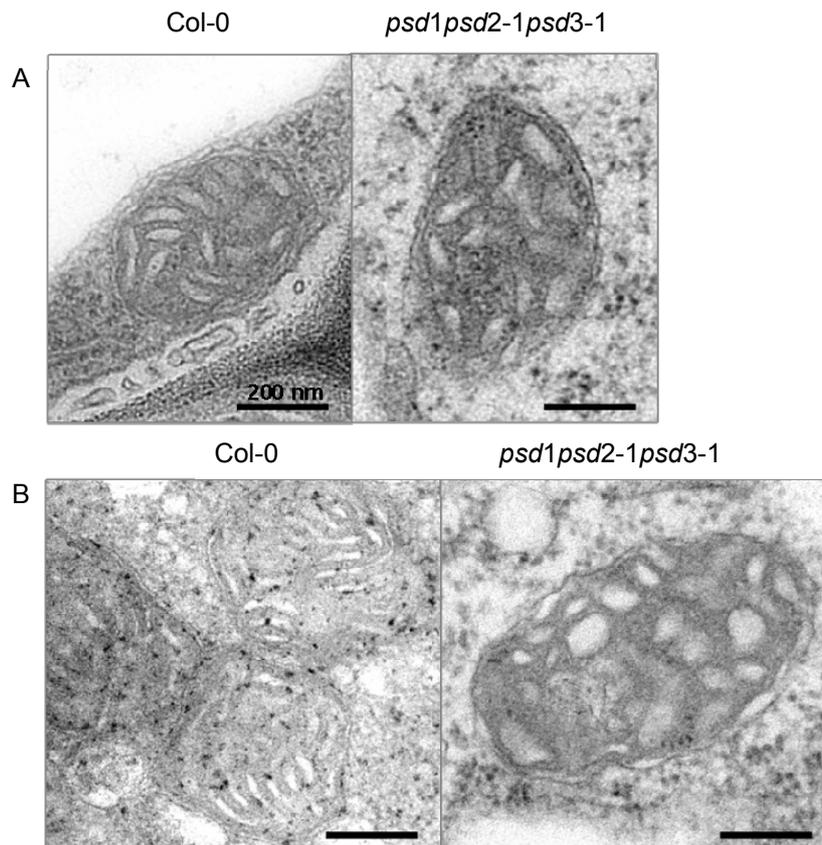


Abb. 29: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur von Mitochondrien

Mitochondrien in Blüten- (A) und Staubblättern (B) von WT Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1* bei 55000facher Vergrößerung. Michael Melzer, IPK, Gatersleben

3.10.6 Expressionsanalyse kerncodierter Komplex I Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette

Die veränderte Lipidzusammensetzung der Mitochondrien könnte zu einer Einschränkung der mitochondrialen Respiration führen. Es konnte durch Zabaleta *et al.* (1998) und Gómez-Casati *et al.* (2002) gezeigt werden, dass die Expression verschiedener kerncodierter Untereinheiten des Komplexes I der Atmungskette erhöht wird, wenn die Mitochondrien nicht intakt sind. Deshalb wurde die Expression der kerncodierten Komplex I Gene für das NADH bindende Protein (At5g08530), PSST (At5g11770) und TYKY (At1g08530) im Northern Blot analysiert. Wie in Abb. 30 zu sehen ist, sind die Gene At5g08530 und At1g08530 im Vergleich zu At5g11770 sehr schwach exprimiert. Hinsichtlich der Expression aller drei

kerncodierten Untereinheiten des Komplex I konnten zwischen den analysierten Linien keine Unterschiede detektiert werden.

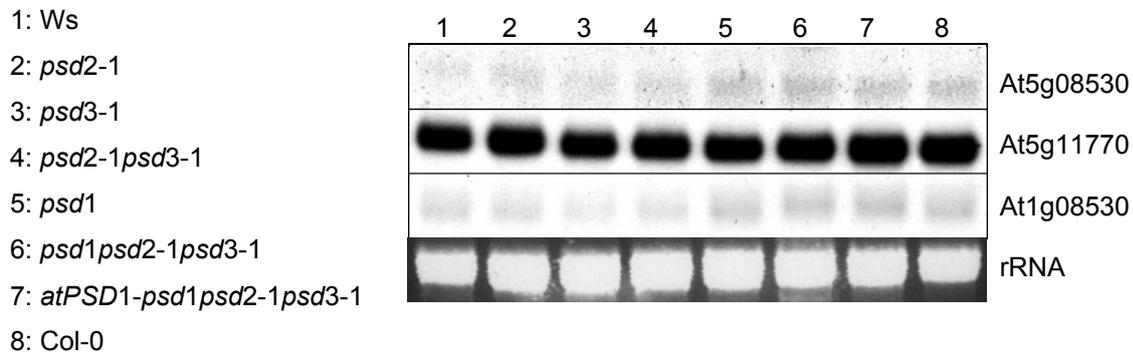


Abb. 30: Expressionsanalyse kerncodierter Untereinheiten des Komplexes I in Mitochondrien

Blüten-RNA wurde isoliert und mit den Sonden für das NADH-bindende Protein (At5g08530), PSST (At5g11770) und TYKY (At1g08530) hybridisiert.

3.11 Komplementationsanalysen der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante

3.11.1 Transformation der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante mit *atPSD1*

Wenn die vollständige Defizienz an PSD-Aktivität für den beschriebenen Blütenphänotyp verantwortlich ist, so sollte eine Transformation der Dreifachmutante mit einer der PSD cDNAs diesen Blütenphänotyp wieder aufheben können. In Studien von Steenbergen *et al.* (2005) wurde gezeigt, dass Defekte der mitochondrialen PSD in Mäusen zum Absterben der Embryonen und Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur führt. Außerdem ist die mitochondriale PSD für die Synthese von mitochondrialem PE in Hefe und tierischen Zellen verantwortlich (Vance und Steenbergen, 2005). Deshalb wurde die mitochondriale Isoform der PSD aus *Arabidopsis* in die *psd* Dreifachmutante transferiert. Dafür wurde die cDNA von *atPSD1* in den Vektor pBinAR-Hyg kloniert und in *psd1psd2-1psd3-1* Mutanten transformiert. Die über Hygromycin B selektierten Transformanten wurden im Hinblick auf ihren Blütenphänotyp durchmustert. Transformanten mit wildtypähnlichen Blüten wurden genauer unter der Stereolupe betrachtet.

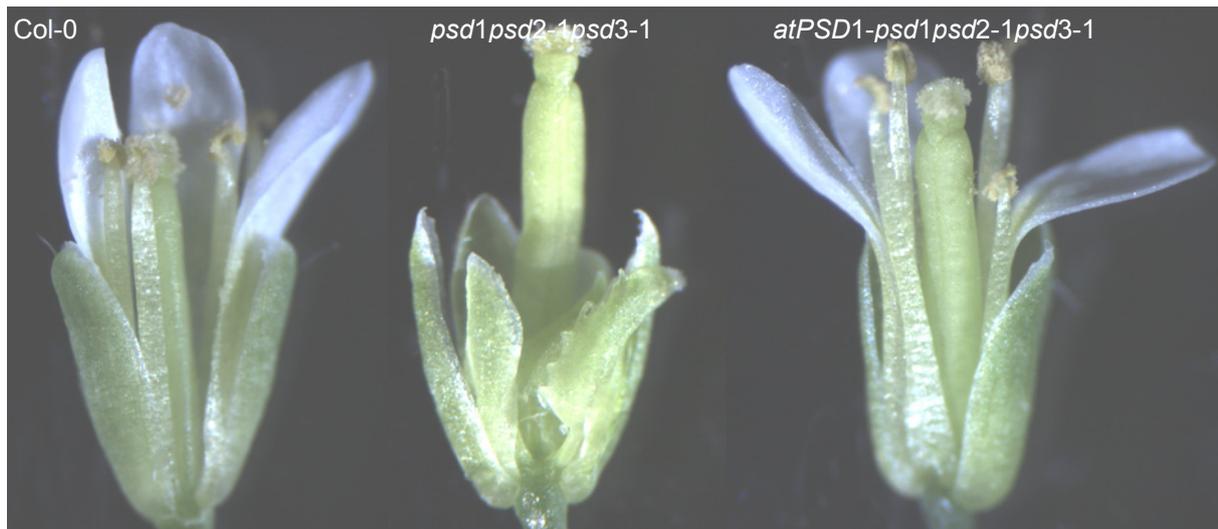


Abb. 31: Komplementation der *psd* Dreifachmutante mit *atPSD1*

Es wurde die cDNA der mitochondrialen *atPSD1* in die *psd1psd2-1psd3-1* Mutante transformiert. Damit konnte die Morphologie einer WT Blüte wieder hergestellt werden. Zur besseren Einsicht in die Blüte wurden das vorderste Kelch- und Blütenblatt entfernt.

In Abb. 31 ist rechts eine mit *atPSD1* komplementierte *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante dargestellt. Diese kann normale Blütenblätter ausbilden, die Staubblätter reichen bis zur Narbe wie im WT Col-0 und der Pollen kann aus den Pollensäcken treten. Außerdem konnten Schoten beobachtet werden und eine wildtypähnliche Samenproduktion. Von 28 Transformanten waren 16 hinsichtlich der Samenproduktion komplementiert. Die Bestätigung, dass es sich weiterhin um den genetischen Hintergrund der *psd* Dreifachmutante handelte, erfolgte über PCR.

3.11.1.1 Untersuchung der Pollen von WT Col-0, *psd1*, *psd1psd2-1psd3-1* und *atPSD1-psd1psd2-1psd3-1*

Inwieweit die Vitalität der Pollen wieder vollständig hergestellt werden konnte, sollten lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen. Die Staubblätter von WT Col-0, *psd1* und *atPSD1-psd1psd2-1psd3-1* ähneln sich. Die Morphologie der Staubblätter der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante unterscheidet sich deutlich vom WT Col-0 (Abb. 32, A). Zwischen den Pollen aus WT Col-0 und aus *psd1* Mutanten konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 32, B, 1 und 2). Anders verhält es sich bei der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante. Bei ihr sind viele kleine oder aber eine sehr große

Vakuole innerhalb der Pollen zu sehen, ein Zeichen für Degradation (Abb. 32, B, 3). In der mit *atPSD1* transformierten *psd1psd2-1psd3-1* Mutante treten solche großen Vakuolen in den Pollen seltener auf. Dafür sind mehr wildtypähnliche Pollen vorhanden. Zusätzlich sind deformierte Pollen zu sehen (Abb. 32, B, 4).

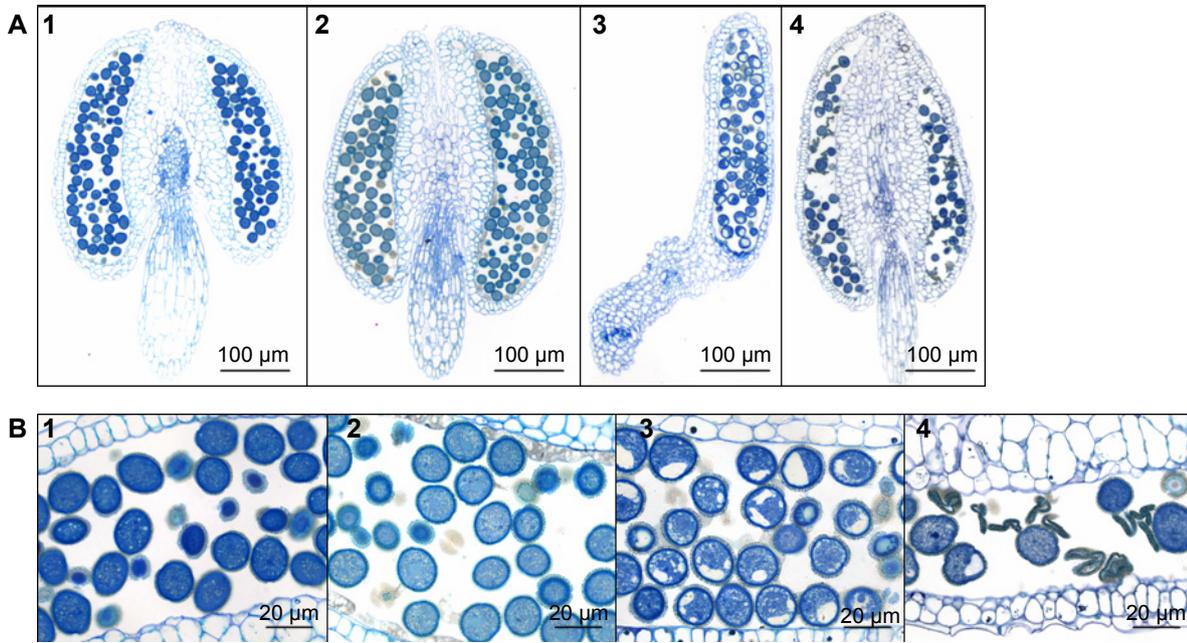


Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Staubblättern (A) und Pollen (B) von WT Col-0 (1), *psd1* (2), *psd1psd2-1psd3-1* (3) und *atPSD1-psd1psd2-1psd3-1* (4)

Die Staubblätter und Pollen wurden für einen besseren Kontrast mit Toluidinblau angefärbt. Michael Melzer, IPK, Gatersleben

3.11.2 Transformation der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante mit *atPSD3*

Durch Transformation der *atPSD1* cDNA in die *psd* Dreifachmutante konnte der Blütenphänotyp komplementiert werden. Dies sollte auch mit der *atPSD3*-cDNA durchgeführt werden, welche *in vivo* am stärksten transkribiert wird und die stärkste Enzymaktivität zeigt. Die cDNA wurde ebenfalls hinter den 35S Promotor im Vektor pBinAR-Hyg kloniert. In Abb. 33 ist zu sehen, dass die Transformation der *psd* Dreifachmutante mit der *atPSD3*-cDNA zur Komplementation des Blütenphänotyps führt. Die Bestätigung, dass es sich weiterhin um den genetischen Hintergrund der *psd* Dreifachmutante handelte, erfolgte über PCR.

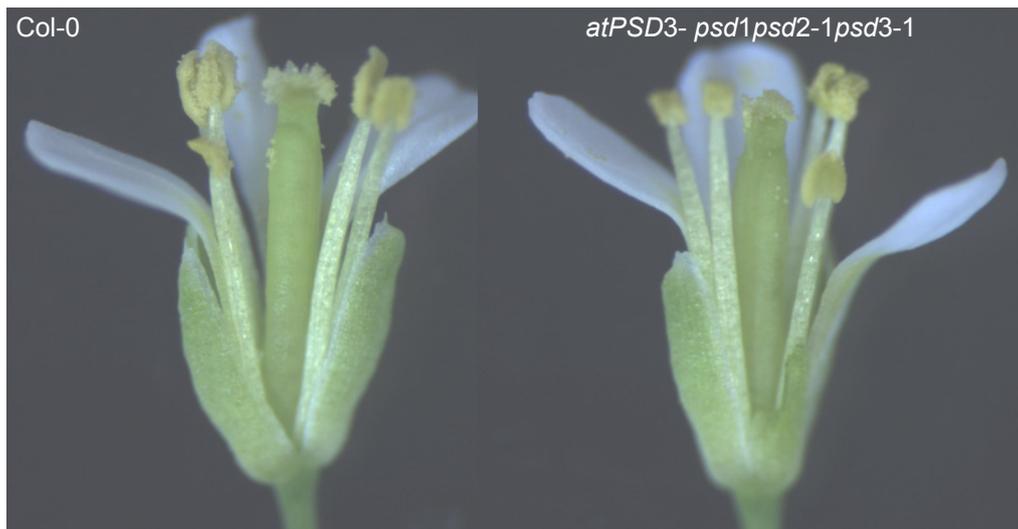


Abb. 33: Komplementation der *psd* Dreifachmutante mit *atPSD3*

Es wurde die cDNA der *atPSD3* in die *psd1psd2-1psd3-1* Mutante transformiert. Damit konnte die Morphologie einer WT-Blüte wieder hergestellt werden. Zur besseren Einsicht in die Blüte wurde das vorderste Kelch- und Blütenblatt entfernt.

3.12 Homöotische Gene in der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante

3.12.1 Expressionsanalyse von homöotischen Genen der Blütenbildung

Die *psd1psd2-1psd3-1* Mutante zeigt in den meisten Fällen homöotische Veränderungen der Blütenblätter und der Staubblätter, d.h. Organen des 2. und 3. Wirtels einer Blüte. Eine vollständige Angiospermenblüte besteht im typischen Fall aus vier verschiedenen Organen, die an der Blütenachse von außen nach innen in Wirteln angelegt sind: Kelchblätter (Wirtel 1), Blütenblätter (Wirtel 2), Staubblätter (Wirtel 3) und Fruchtblätter (Wirtel 4). In Abb. 34 ist die Organisation einer Blüte in Wirteln dargestellt. Bei homöotischen Mutanten wird ein Organ an einer Stelle gebildet, an der sich normalerweise ein anderes Organ entwickeln würde, z.B. Kelchblätter statt Blütenblätter. Genetische und molekulare Untersuchungen an diesen Blütenmutanten führten zu dem so genannten ABC-Modell. Dieses erklärt, wie die Identität der Organe bei Blütenpflanzen festgelegt wird (Coen und Meyerowitz, 1991, siehe auch Abb. 34). Die drei Klassen der homöotischen Gene (ABC-Gene) wirken zusammen oder allein, um die Bildung

von Kelchblättern (A), Blütenblättern (A und B), Staubblättern (B und C) und Fruchtblättern (C) zu bewirken.

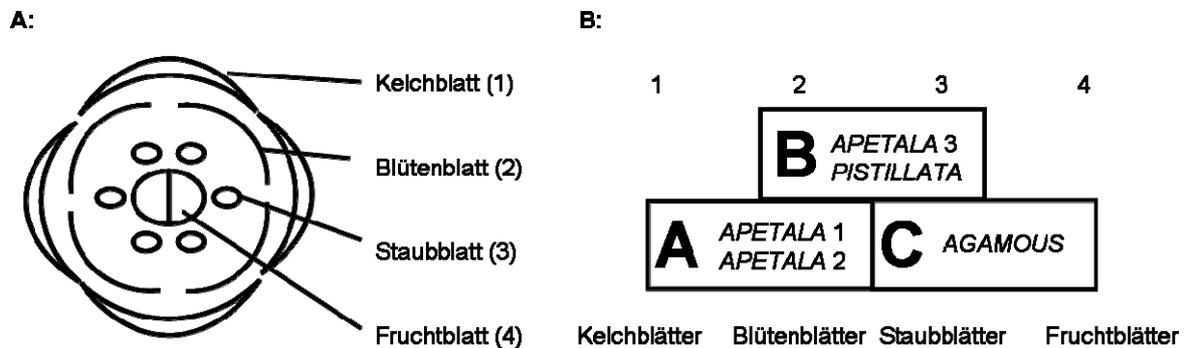


Abb. 34: Organisation der Blüte in Wirteln (A) und das ABC-Modell (B)

Zu den ABC-Genen gehören *APETALA1* und *APETALA2* als Vertreter der A-Gene, *APETALA3* und *PISTILLATA* als Vertreter der B-Gene und *AGAMOUS* als Vertreter des C-Gens. Da die *psd* Dreifachmutante nur Veränderungen im 2. und 3. Wirtel zeigt, sollte überprüft werden, wie stark die Expression von *APETALA3*, *PISTILLATA* und *AGAMOUS* in Blüten von *psd1psd2-1psd3-1* ist. Für *APETALA3* konnte eine deutliche Reduktion der Transkription in *psd2-1*, *psd3-1*, *psd2-1psd3-1* und *psd1psd2-1psd3-1* nachgewiesen werden (Abb. 35).

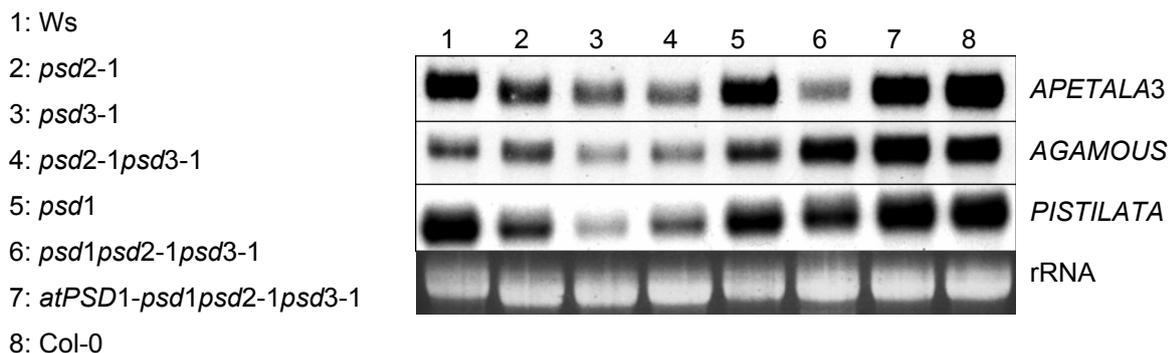


Abb. 35: Northern Blot Analyse zur Expression von *APETALA3*, *PISTILLATA* und *AGAMOUS* in verschiedenen *psd* Mutanten und Wildtypen

Aus Blüten wurde RNA isoliert und mit den entsprechenden Sonden hybridisiert. Um zu zeigen, dass gleiche Mengen RNA eingesetzt wurden, ist die rRNA Bande abgebildet.

Der Blütenphänotyp der *psd* Dreifachmutante ist vergleichbar dem Blütenphänotyp der *ap3* Mutante. Es könnte also sein, dass die Reduktion der *AP3* Expression die Ursache für die veränderte Blütenmorphologie ist. Für *APETALA3* (*AP3*) konnte zudem gezeigt werden, dass die komplementierte *atPSD1-psd1psd2-1psd3-1* Pflanze eine Transkription ähnlich den beiden WT Pflanzen erreicht. Die Menge des *AGAMOUS* Transkripts ist in *psd3-1* und *psd2-1psd3-1* reduziert, *PISTILLATA* in *psd2-1*, *psd2-1psd3-1* und am stärksten in *psd3-1* reduziert (Abb. 35).

3.12.2 Überexpression von *APETALA3* in *psd1psd2-1psd3-1*

Aufgrund der Reduktion der *AP3* Expression und der starken Ähnlichkeit der Blüten der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante zu Blüten der *ap3* Mutante, sollte die cDNA für *AP3* in die Dreifachmutante gebracht werden, um zu testen, inwieweit dadurch der Blütenphänotyp komplementiert werden kann. Für dieses Experiment wurde die *AP3* cDNA hinter den 35S Promotor des pBinAR-Hyg Vektors kloniert und in die *psd* Dreifachmutante transformiert. Die auf Hygromycin B selektierten Transformanten wurden nach wildtypähnlichen Blüten durchsucht. Von 105 Transformanten konnten 15 mit WT-Blüten identifiziert werden. Durch PCR wurde bestätigt, dass es sich bei den selektierten Transformanten um Pflanzen mit dem genetischen Hintergrund der *psd* Dreifachmutante handelte. In Abb. 36 ist eine Beispielblüte der komplementierten *psd1psd2-1psd3-1* Mutante (*AP3-psd1psd2-1psd3-1*) dargestellt. Es ist in Abb. 36 zu sehen, dass die Staubblätter sowie auch die Blütenblätter WT-ähnlich sind. Die Transformation mit dem Konstrukt pBinAR-Hyg-*AP3* konnte demnach die normale Blütenmorphologie wiederherstellen.

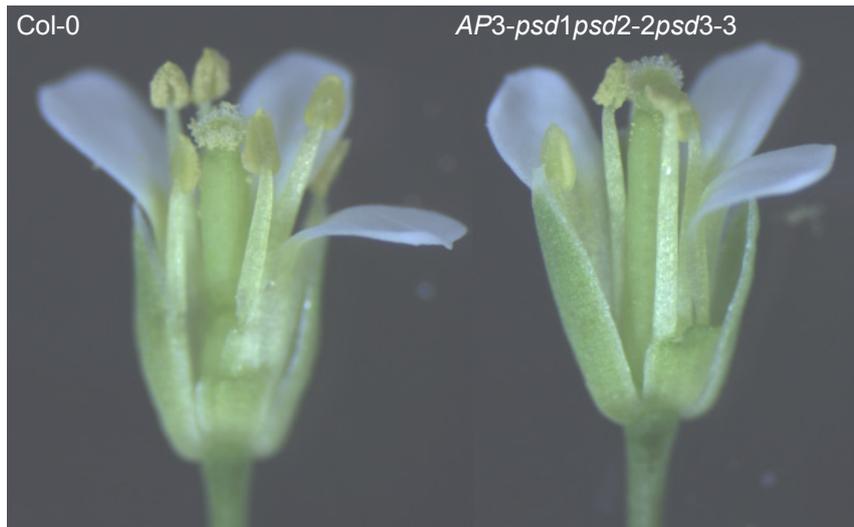


Abb. 36: Blüte einer mit *AP3* transformierten *psd1psd2-1psd3-1* Mutante

Die cDNA von *AP3* wurde in den Vector pBinAR-Hyg kloniert und in die *psd* Dreifachmutanten transformiert. Zur besseren Einsicht in die Blüte wurde das vorderste Kelch- und Blütenblatt entfernt.

3.13 Isolation und Charakterisierung einer zweiten *psd1psd2-2psd3-2* Mutante

3.13.1 Isolation und Charakterisierung der *psd1psd2-2psd3-2* Mutante

Um zu zeigen, dass der Blütenphänotyp durch die völlige *PSD*-Defizienz verursacht wird, sollte eine zweite Dreifachmutante erzeugt werden. Die *psd2-2psd3-2* Mutante (Syngenta, San Diego, USA; Nerlich, 2004) und die *psd1* Mutante (SALK Instituts, San Diego, USA) wurden gekreuzt, um die zweite *psd* Dreifachmutante zu generieren. Beide Pflanzen sind vom Ökotyp Columbia. Pollen der *psd1* Mutante wurde auf die Narbe von *psd2-2psd3-2* Mutanten gegeben. Samen aus den daraus resultierenden Schoten wurden ausgebracht. Wie schon in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, ist die F2-Generation heterozygot für alle drei Gene. Erst in der F5-Generation war es möglich, die neue *psd* Dreifachmutante mittels PCR zu isolieren. Die Blüten dieser *psd1psd2-2psd3-2* Mutante wurden unter der Stereolupe betrachtet. Es konnte jedoch kein Unterschied zu WT-Blüten festgestellt werden, wie in Abb. 37 zu sehen ist.



Abb. 37: Blüten von Col-0 und der *psd1psd2-2psd3-2* Mutante

Zur besseren Einsicht in die Blüte wurde das vorderste Kelch- und Blütenblatt entfernt.

3.13.2 Expressionsanalyse von *APETALA3* in *psd1psd2-2psd3-2*

Die Expression von *AP3* war in der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante stark reduziert. Bei der *psd1psd2-2psd3-2* Mutante ist eine normale Blütenmorphologie zu beobachten. Es sollte überprüft werden, inwieweit die Expression von *AP3* in ihr verändert ist. Das Ergebnis ist in Abb. 38 dargestellt.

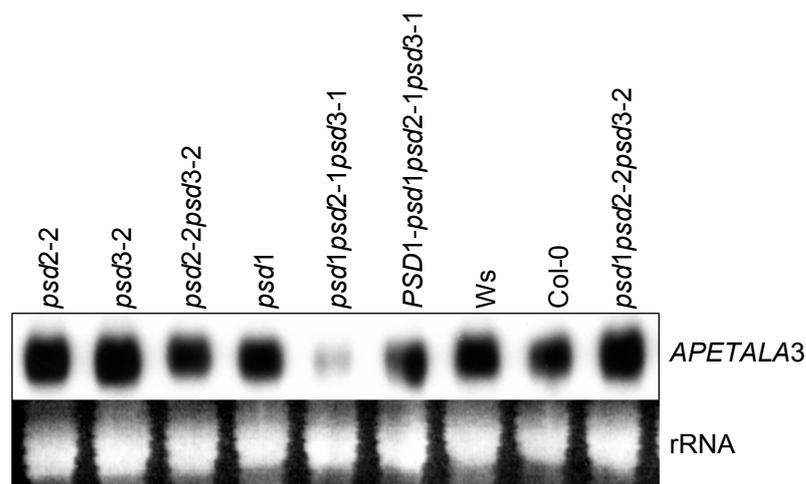


Abb. 38: Expression von *APETALA3* in verschiedenen *psd* Mutanten

Aus Blüten wurde RNA isoliert und mit der *AP3* cDNA hybridisiert. Um zu zeigen, dass gleiche Mengen RNA eingesetzt wurden, ist die rRNA abgebildet.

Die Expression von *AP3* in den Mutanten *psd2-2*, *psd3-2*, *psd2-2psd3-2*, *psd1* und *psd1psd2-2psd3-2* ist ähnlich zur Expression in beiden WT-Pflanzen Col-0 und Ws. Die *psd1psd2-1psd3-1* Mutante zeigte erneut eine starke Reduktion der *AP3* Expression. In der mit *atPSD1* komplementierten *psd1psd2-1psd3-1* Mutante ist die *APETALA3* Expression wie im WT.

4. Diskussion

4.1 Funktionalität und subzelluläre Lokalisierung einzelner PSDs

4.1.1 Die Gene *atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3* codieren für funktionale Phosphatidylserin Decarboxylasen

Sequenzvergleichsanalysen mit bereits bekannten PSDs führten zur Identifizierung von drei Genen (*atPSD1*, *atPSD2* und *atPSD3*), die für PSDs in *Arabidopsis* codieren. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Expression in PSD-defizienten Linien von *E. coli* (EH150 Mutante) und Hefe (*psd1psd2* Mutante) gezeigt, dass diese Gene für funktionelle PSDs codieren. Vergleichbare Studien zeigten die erfolgreiche Komplementation des Lipidphänotyps der EH150 Mutante von *E. coli* mit der cDNA von *scPSD1* aus Hefe und der *bsPSD* cDNA aus *Bacillus subtilis* (Clancey *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1998). Die Komplementation der Hefe-Doppelmutante *psd1psd2* mit der mitochondrialen *lePSD1* aus Tomate war erfolgreich, wenn entweder der N-terminale Bereich von *lePSD1*, der für die Lokalisierung des Enzyms im Mitochondrium verantwortlich ist, durch den N-terminalen Bereich der mitochondrialen *scPSD1* aus Hefe ersetzt wurde, oder wenn das Enzym ohne den N-terminalen Bereich exprimiert wurde (Rontein *et al.*, 2003). Somit wird die mitochondriale Targeting Sequenz im N-terminalen Bereich der *lePSD1* in Hefe nicht erkannt. Dies könnte darauf hinweisen, dass der N-terminale Bereich der PSDs Targeting-Sequenzen enthält, die für die spezifische subzelluläre Lokalisierung verantwortlich sind.

Die vollständigen cDNAs von *atPSD2* und *atPSD3* wurden zunächst heterolog in der PSD-defizienten *E. coli* Mutante EH150 exprimiert. Die Transformanten zeigten jedoch keine Komplementation des Lipidphänotyps der EH150 Mutante (Abb. 7). Es kam nur zu einer erfolgreichen Komplementation, wenn EH150 mit dem *atPSD3* C-Terminus transformiert wurde (Abb. 7). Dieser ist zu dem *E. coli* Enzym ortholog. Dieses Ergebnis zeigt, dass der N-terminale Bereich des Proteins für die Enzymaktivität nicht essentiell ist. Transformanten mit dem C-Terminus von *atPSD2*, der ebenfalls zu dem *E. coli* Enzym *ecPSD* ortholog ist, zeigten jedoch keine Komplementation des Lipidphänotyps der EH150 Mutante (Abb. 7). Enzymaktivitätstests mit der *Arabidopsis* Mutante *psd2-2* zeigten eine ähnliche PSD-

Enzymaktivität wie WT Pflanzen (Abb. 14). Im Gegensatz dazu zeigte die *psd3-2* Mutante eine Reduktion der Enzymaktivität (Abb. 14). Der Verlust des *atPSD2* Gens in *Arabidopsis* hat also kaum Einfluss auf die gesamte PSD-Aktivität. Die in dem *in planta* Experiment gezeigte geringe Enzymaktivität von *atPSD2* könnte in *E. coli* die Ursache für die nicht erfolgte Komplementation sein. Der Transfer der vollständigen cDNAs von *atPSD2* und *atPSD3* in die Hefedoppelmutante *psd1psd2* führte zur Komplementation des ethanolaminauxotrophen Wachstumsphänotyps (Abb. 8). Die N-terminale Extension ist vor allem in PSDs aus Eukaryoten vorhanden. PSD-Enzyme, die keine lange N-terminale Extension enthalten, sind hauptsächlich PSDs aus Prokaryoten und Mitochondrien. *atPSD2* und *atPSD3* gehören somit zu den „eukaryotischen“ PSDs und dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Transformation mit *atPSD2* oder *atPSD3* die „eukaryotische“ *psd1psd2* Hefemutante komplementieren kann. Die Komplementation von EH150, als Vertreter der Prokaryoten, durch Expression „prokaryotischer“ PSDs (*bsPSD* und *scPSD1*) wurde bereits gezeigt (Clancey *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1998). Jedoch ist die Komplementation von EH150 durch Transformation mit den vollständigen „eukaryotischen“ PSD- cDNAs aus *Arabidopsis* nicht möglich. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die Prozessierung des pflanzlichen Enzyms wegen des verhältnismäßig langen N-terminalen Bereichs in *E. coli* gestört wird. Da die PSD eine posttranslationale Modifikation durchlaufen muss, um in Form funktioneller Untereinheiten mit korrekt gebildetem Cofaktor aktiv werden zu können, ist dieser Schritt besonders kritisch für den Funktionsnachweis des exprimierten Proteins.

Es wurden die cDNA von *atPSD3* und die orthologe cDNA aus *Physcomitrella patens* (*ppPSD*) in *Arabidopsis* WT-Pflanzen überexprimiert. Transformanten mit erhöhter Transkription des jeweiligen Gens wurden identifiziert, zeigten jedoch keine erhöhte Enzymaktivität. Rontein *et al.* (2003) isolierte eine *Arabidopsis psd1* „knock-up“ Mutante (SAIL_508_C12) mit einem 6- bis 13fachen Anstieg der *atPSD1* Expression und einer 9fach höheren PSD-Aktivität in den Mitochondrien verglichen mit dem WT. Der Grund dafür, dass die erhöhte Transkription von *atPSD1* zu einer erhöhten Enzymaktivität führt, die erhöhte Transkription von *atPSD3* jedoch nicht, könnte an der Lokalisierung der Enzyme in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle liegen. *atPSD1* ist in Mitochondrien und *atPSD3* im ER lokalisiert (Abb. 9). So könnte es sein, dass es im ER zu einem Mangel an PS oder zu einer Produktüberschusshemmung kommt, im Mitochondrium jedoch nicht. Zudem sind

posttranskriptionale Regulationsmechanismen bekannt, die die Stabilität, die Translationseffizienz (Mignone *et al.*, 2002) oder den Export der mRNA aus dem Nukleus kontrollieren (Sommer und Nehrbass, 2005) und auf diese Weise die PSD-Aktivität der Transformanten beeinflussen könnten.

4.1.2 *atPSD1* ist am Mitochondrium, *atPSD2* am Tonoplasten und *atPSD3* am ER lokalisiert

Die ersten PSDs höherer Pflanzen wurden in Tomate und *Arabidopsis* identifiziert, wobei es sich um mitochondriale Enzyme handelt (Rontein *et al.*, 2003; von Orlow 2003). *atPSD2* und *atPSD3* enthalten im Gegensatz zu *atPSD1* einen N-terminalen Bereich, der auf eine Lokalisierung außerhalb der Mitochondrien hinweisen könnte. Mit Hilfe der Analyse von GFP-Fusionsproteinen wurde *atPSD2* am Tonoplasten und *atPSD3* am ER lokalisiert (Abb. 9). Die im Nukleus detektierte Fluoreszenz in Abb. 9 (*atPSD2*-GFP und *atPSD3*-GFP) könnte eventuell daher rühren, dass das PSD-GFP Fusionsprotein gespalten und das GFP in den Nukleus transportiert wird. Die Ergebnisse für die Lokalisierung der *Arabidopsis* PSDs zeigen, dass die Synthese von PE über den PSD-Weg am ER, im Tonoplast und im Mitochondrium erfolgen kann.

4.2 Charakterisierung der *psd* Mutanten

PE als eines der häufigsten Phospholipide ist Bestandteil der ER-, Tonoplast-, Nukleus-, Mitochondrien- und der Plasmamembran, jedoch nicht der Plastiden. Die Synthese von PE kann in Pflanzen über drei Biosynthesewege erfolgen, durch den Transfer von Phosphoethanolamin auf DAG, mittels der Aminoalkoholphosphotransferase, durch die PSD katalysierte Decarboxylierung von PS oder durch Kopfgruppentausch an PS durch Ethanolamin. Um den Beitrag des PSD-Wegs an der PE-Synthese zu untersuchen, wurden aus den T-DNA Insertionsmutanten *psd1*, *psd2-1* und *psd3-1* die *psd2-1psd3-1* Doppelmutante und die *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante erzeugt. Mit Northern Blot Analysen und semiquantitativer real-time PCR konnte für alle *psd* Einzelmutanten keine Transkription der entsprechenden

Gene nachgewiesen werden (Abb. 13). So kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei allen *psd* Mutanten um Null-Mutanten handelt. Alle isolierten *psd* Mutanten zeigten im Vergleich zum WT keinen Unterschied im Wachstum (Abb. 16).

Die Auswirkung der Mutationen auf die Aktivität der einzelnen PSDs wurde mit Enzymtests untersucht. In Blättern ist etwa 2/3 der gesamten PSD-Aktivität der *atPSD3* zuzuordnen, während *atPSD2* nur eine sehr schwache Aktivität zeigt (Abb. 14). Die geringe Aktivität, die in der mikrosomalen Fraktion der *psd3-1* und der *psd2-1psd3-1* Mutante noch detektiert werden konnte, resultiert aus Verunreinigungen mit mitochondrialer *atPSD1*, da in der *psd* Dreifachmutante keine Aktivität in mikrosomalen Fraktionen nachzuweisen ist (Abb. 14). So ist *atPSD1* für das restliche Drittel der gesamten PSD-Aktivität in Blättern verantwortlich (Abb. 14). Die vollständige Reduktion der PSD-Aktivität in der *psd* Dreifachmutante führte nicht zu Veränderungen im PE-Gehalt in Blättern oder Blüten der Dreifachmutante (Abb. 22). Dies lässt vermuten, dass der PSD-Syntheseweg in *Arabidopsis* für die extramitochondriale PE-Synthese nicht von Bedeutung ist und somit die Aminoalkolphosphotransferase hauptsächlich zur extramitochondrialen PE-Synthese beiträgt (Mizoi *et al.*, 2006). Es konnte jedoch eine leichte, aber signifikante Reduktion des PE-Gehalts in der Mitochondrienmembran der *psd* Dreifachmutante nachgewiesen werden (Abb. 23). So scheint der PSD-Weg für die normale PE-Versorgung in Mitochondrien von Bedeutung zu sein. Demzufolge müssten in *Arabidopsis* Lipidtransportwege für den Phospholipidtransfer vom ER zum Mitochondrium, wie für Hefe und Säugerzellen beschrieben (Wu und Voelker, 2001; Heikinheimo und Somerharju, 1998), vorhanden sein, die das am ER synthetisierte PS zu den Mitochondrien transportieren, wo es durch die PSD zu PE umgewandelt wird. In Hefe ist die PE Produktion durch die *scPSD1* essentiell für den PE-Pool der gesamten Zelle. Für die Synthese neuer Membranen wird PE von den Mitochondrien zu den entsprechenden Organellen transportiert. Der Verlust der mitochondrialen *scPSD1* oder der am Golgi Apparat oder an Vakuolen lokalisiertem *scPSD2* führt nicht zur Reduktion des Wachstums der Hefezellen. Erst in der *psd1psd2* Doppelmutante tritt die Ethanolamin-Auxotrophie auf (Trotter und Voelker, 1995). Demzufolge könnten sich die PSDs innerhalb eines Organismus gegenseitig ergänzen. Am Beispiel von Hefe heißt das, dass in der *psd1* Hefemutante das am Golgi Apparat oder an der Vakuole gebildete PE zum Mitochondrium transportiert werden kann, um dessen Funktion aufrecht zu erhalten. In der *psd2* Hefemutante

können die Mitochondrien ausreichend PE bilden, um die Versorgung aller Membranen mit PE zu gewährleisten. In *Arabidopsis* könnte es ebenfalls der Fall sein, dass sich die PSD Isoenzyme gegenseitig ergänzen können, denn die PSD-defiziente Dreifachmutante zeigt als einzige *psd* Mutante eine Reduktion von PE in Mitochondrienmembranen (Abb. 23). Alle *psd* Mutanten, die noch mindestens eine funktionelle PSD enthalten, zeigen keine signifikante Reduktion des PE-Gehalts (Abb. 22). So scheint in *Arabidopsis* ein kleiner Teil des über die PSD gebildeten PE-Pools für Mitochondrien bedeutend zu sein, der nicht durch den PE-Pool, synthetisiert durch die Aminoalkoholphosphotransferase, ersetzt werden kann.

Die Mutation der mitochondrialen PSD aus Mäusen führte zu Veränderungen der Mitochondrienstruktur und -größe mit der Folge, dass die Embryonen absterben (Steenbergergen *et al.* 2005). In der *psd1* Mutante sowie der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante von *Arabidopsis* wurden keine Veränderung der Ultrastruktur oder der Größe der Mitochondrien festgestellt (Abb. 29). Vermutlich hat die totale PSD-Defizienz und die damit verbundene leichte Veränderung der Lipidzusammensetzung der Mitochondrien keinen Einfluss auf die Größe und Ultrastruktur der Mitochondrien.

4.3 Der Blütenphänotyp der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante und mögliche Ursachen

4.3.1 Der Einfluss von Jasmonsäure auf die Blütenmorphologie

Es konnten homöotische Transformationen der Blütenorgane in der Mutante *psd1psd2-1psd3-1* festgestellt werden, z.B. die Umwandlung der Blütenblätter in kelchblattähnliche Organe sowie die teilweise Umwandlung von Staubblättern in fruchtblattähnliche und kelchblattähnliche Organe. Der überwiegende Teil der Staubblätter besaß kürzere Filamente und grüne Pollensäcke, die nicht aufreißen konnten, um Pollen zu entlassen (Abb. 18). Dies führte zu reduzierter Schoten- und Samenbildung (Abb. 17, Abb. 21). Zusätzlich wurde durch die Alexander-Färbung gezeigt, dass ein Teil der Pollen nicht vital ist (Abb. 19). Bei der Reifung der Pollensäcke spielt die Jasmonsäure (JA) eine wichtige Rolle. Der Einfluss der JA während der Reifung der Pollensäcke wurde durch Analysen von *Arabidopsis* Mutanten belegt, z.B. durch die JA-insensitive Mutante „*coronatine insensitive1*“

(*coi1*, Feys *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1998), durch die Dreifachmutante *fad3 fad7 fad8*, deren Linolensäuresynthese (LA, Ausgangsprodukt der JA Synthese) gestört ist, (McConn und Browse, 1996) und durch die *Arabidopsis* Mutante „*defective in anther dehiscence1*“ (*dad1*; Ishiguro *et al.*, 2001). In diesen Mutanten ist die Organisation und Differenzierung der Zellen im Pollensack normal, jedoch kann der Pollensack nicht aufreißen und die Pollen entlassen. Zudem sind die Pollen nicht vital. In der *dad1* Mutante können diese Defekte durch die Zugabe von JA oder Linolensäure wieder aufgehoben werden, so dass bestäubungsfähige Pollen entstehen können (Ishiguro *et al.*, 2001). Die *psd* Dreifachmutante zeigte im Hinblick auf die Pollensäcke einen vergleichbaren Phänotyp wie die *dad1* Mutante. Daher wurden die Blüten der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante ebenfalls mit JA infiltriert, was jedoch die WT-Blütenmorphologie nicht wiederherstellen konnte. So konnte ausgeschlossen werden, dass der Biosyntheseweg der JA von der PSD-Defizienz der *psd* Dreifachmutante betroffen war und zu den Pollensackveränderungen führt.

4.3.2 Der Einfluss der Mitochondrien auf die Blütenmorphologie

Es gibt mehrere Hinweise dafür, dass die Entwicklung männlicher Gameten eine außergewöhnlich hohe mitochondriale Aktivität erfordert. Ultrastrukturanalysen an Pollensäcken von Mais zeigten einen 20- bis 40fachen Anstieg der Mitochondrienanzahl bei der Bildung der sporogenen und tapetalen Zellen (Lee und Warmke, 1979). Zusätzlich wurden erhöhte Mengen an mitochondrialen Transkripten und Proteinen während der Meiose der männlichen Gametophyten gefunden, welche ebenfalls die erhöhten Anforderungen an die mitochondriale Respiration in diesen Geweben belegen (Conley und Hanson, 1994; Smart *et al.*, 1994). Bei der Untersuchung der *psd* Dreifachmutante konnte jedoch keine reduzierte Mitochondrienanzahl festgestellt werden, welche Ursache der Bildung nicht vitaler Pollen sein könnte (Abb. 24). Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass für diese Analysen Proben aus Blattgewebe und Gewebe etiolierter ganzer Keimlinge verwendet wurden und nicht Proben aus Blütengewebe. Eventuell könnte bei der Untersuchung von Staubblättern ein Unterschied bei der Anzahl der Mitochondrien festgestellt werden, jedoch ist dies mit Staubblättern aus *Arabidopsis* schwer durchführbar.

Störungen der Interaktionen zwischen Kern- und Mitochondriengenom sowie der Funktionsfähigkeit von Mitochondrien haben Einfluss auf essentielle Entwicklungsprozesse der Blütenbildung und die Entstehung cytoplasmatisch männlicher Sterilität (CMS) in Pflanzen. Alle bisher analysierten CMS Systeme belegen diese These (Vedel *et al.*, 1982; Earle *et al.*, 1992; Hanson und Bentolila, 2004). CMS Pflanzen weisen oft abnormale Blütenphänotypen sowie Änderungen in der mitochondrialen Genexpression auf (Hanson, 1991; Braun *et al.*, 1992; Mackenzie *et al.*, 1994). Die Bildung funktionsfähiger Pollen wird gestört oder Staubblätter sind vollständig durch andere Blütenorgane ersetzt (homöotischer Defekt). Ursachen der Pollensterilität können sein: ein zusätzliches offenes oder unbekanntes Leseraster im mitochondrialen Genom (Schnabel und Wise, 1998), Änderungen der Mitochondrienstruktur bzw. -funktion (Bergman *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005) oder die Deletion mitochondrialer Gene (in Tabak gezeigt; Gutierrez *et al.*, 1997). Die Änderung der Mitochondrienstruktur in Blättern und Staubblättern kann als Ursache für die veränderte Blütenmorphologie in der Dreifachmutante ausgeschlossen werden, da keine Abnormalitäten der Mitochondrienstruktur nachgewiesen wurden (Abb. 25).

Die männliche Sterilität tritt häufig nach Artkreuzungen auf und wird als alloplasmatische männliche Sterilität bezeichnet, z.B. bei der Kreuzung von *Helianthus annuus* mit *Helianthus petiolaris* (Leclercq, 1969; Schnabel und Wise, 1998). Die Kombination des Nukleus aus *Nicotiana tabacum* mit dem Cytoplasma einer anderen *Nicotiana* Spezies resultierte in Nachkommen mit gestörter Pollenentwicklung oder homöotischen Veränderungen der Blütenorgane. Hauptsächlich waren die Blüten- und Staubblätter betroffen, wobei Staubblätter verkürzte Filamente oder auch stigmaähnliche Strukturen besaßen (Bonnett *et al.*, 1991). Diese homöotischen Veränderungen konnten ebenfalls bei CMS Linien von *Brassica napus* (Polowick und Sawhney, 1986) und Weizen (Murai *et al.*, 2002) nachgewiesen werden. Bei der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante handelt es sich nicht um eine Kreuzung unterschiedlicher Spezies, sondern um eine Kreuzung der beiden Ökotypen Col-0 (*psd1*) und Ws (*psd2-1psd3-1*). Bei der Kreuzung wurde Pollen der *psd1* Mutante auf die *psd2-1psd3-1* Mutante übertragen. Da die Mitochondrien von der Mutter vererbt werden, stammen diese in der Dreifachmutante aus dem Ökotyp Ws. Dieser Ökotyp zeigte jeweils deutlich geringere Respirations- bzw. Keimungsraten als Col-0 (Abb. 26 und Abb. 27). Die Ergebnisse der

psd1psd2-1psd3-1 Mutante in diesen Experimenten lagen zwischen den Werten der beiden Ökotypen (Abb. 26 und Abb. 27). Obwohl im WT Ws keine veränderte Blütenmorphologie auftritt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Respiration einen geringen Beitrag zu der Blütenveränderung in der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante leistet.

Eine Kreuzung verschiedener Tabakspezies führte zu einer männlich sterilen Mutante, die zusätzliche mRNA Transkripte des mitochondrialen *atp1* Gens (codiert für die α -Untereinheit der ATP Synthase) transkribiert, wodurch das ATP/ADP Verhältnis in Blüten reduziert wird (Bergman *et al.*, 2000). Die Messung von ATP und ADP in Blüten der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante ergab keine Veränderung des ATP/ADP Verhältnisses (Abb. 28). Es kann also ausgeschlossen werden, dass es aufgrund eines reduzierten ATP/ADP Verhältnisses zu der veränderten Blütenmorphologie kommt. Zusätzlich zu der Messung von ATP und ADP wurde die Expression der drei Untereinheiten TYKY, PSST und des NADH-Bindeproteins des Komplex I der Atmungskette über Northern Blot analysiert. Gómez-Casati *et al.* (2002) zeigte in *Arabidopsis*, dass diese Untereinheiten als Antwort auf mitochondriale Fehlfunktion verstärkt exprimiert werden. Die Fehlfunktion wurde dabei durch die uneditierte neunte Untereinheit der ATP Synthase (*atp9*) hervorgerufen, die die Assemblierung des ATP Synthase Komplexes stört. Die transgenen Pflanzen zeigten morphologische Veränderungen der Blüten- und Staubblätter, wie sie für CMS charakteristisch sind (Gómez-Casati *et al.*, 2002). In der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante konnte jedoch keine Induktion der Expression von TYKY, PSST und des NADH-Bindeproteins festgestellt werden (Abb. 30). Aufgrund dieses Ergebnisses und der ATP/ADP Messung ist auszuschließen, dass die Mitochondrien in ihrer Funktion stark gestört sind.

Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle während der Apoptose, dem programmierten Zelltod (Übersichtsartikel Green und Reed, 1998). Mit der Apoptose sind folgende Prozesse unmittelbar verknüpft: die Störung der mitochondrialen Respiration, die Freisetzung von Proteinen, die zur Aktivierung von Proteasen der Caspase Familie führen und die Änderung des zellulären Redoxpotentials (Übersichtsartikel Green und Reed, 1998). Während der Pollenentwicklung erleiden bestimmte Gewebe des Pollensacks einen präzise koordinierten Zelltod (Goldberg *et al.*, 1993; Wu und Cheung, 2000). Die Zellen des Tapetums werden lysiert und

entlassen Lipidbestandteile, die die Exine der Pollen überziehen (Piffanelli und Murphy, 1998). Die elektronenmikroskopische Analyse der Pollen von Col-0 und *psd1psd2-1psd3-1* zeigte Unterschiede der Exine hinsichtlich der Lipidkörperchen und Vakuolen (Abb. 20). In Pollen von *psd1psd2-1psd3-1* Mutanten sind kaum Lipidkörperchen, jedoch deutlich mehr kleine Vakuolen sichtbar (Abb. 20). Lichtmikroskopische Untersuchungen der *psd1psd2-1psd3-1* Pollen zeigten ebenfalls Abnormalitäten zum WT. Die *psd1psd2-1psd3-1* Pollen besitzen auffällig große Vakuolen (Abb. 32), was ein Hinweis für Apoptose sein könnte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Pollenentwicklung nicht normal ablaufen kann.

4.3.3 Der Einfluss von homöotischen Genen auf die Blütenmorphologie

Laut dem ABC-Model der Blütenentwicklung bestimmen homöotische Gene die Identität der Organe in den vier Wirteln der Blüte (Jack, 2004; Kramer und Hall, 2005). Die beiden homöotischen Gene *APETALA3* und *PISTILLATA* legen die Organe des zweiten und dritten Wirtels, die Blüten- und Staubblätter, fest. Die beiden Gene sind sehr sequenzähnlich und codieren „MADS-Box“ Transkriptionsfaktoren, die in den Primordien der Blüten- und Staubblätter exprimiert werden (Jack *et al.*, 1992; Goto und Meyerowitz, 1994). *AP3* und *PI* Genprodukte bilden Heterodimere *in planta* (Goto und Meyerowitz, 1994). Zusätzlich wird die Transkription homöotischer Gene von unterschiedlichen ABC-Genen kontrolliert. Beispielsweise wird die *AP3* Expression durch *AP3*, *PI* und zusätzlichen homöotischen Genen kontrolliert. Es wurde gezeigt, dass diese Transkriptionsfaktoren an konservierten Sequenzmotiven innerhalb des *AP3* Promotors binden (Hill *et al.*, 1998). Die *ap3* und *pi* Mutanten zeigen Kelchblätter im Wirtel der Blütenblätter sowie Fruchtblätter anstelle von Staubblättern. Überexpression des *AP3* Genes unter Kontrolle des 35S Promotors komplementiert den *ap3* Blütenphänotyp (Jack *et al.*, 1994). Transformation des 35S-*AP3* Konstrukts in WT Pflanzen führt zur Umwandlung der Kelchblätter in Staubblätter. Die Überexpression von *AP3* in *pi* Mutanten konnte die Blütenveränderungen des zweiten und dritten Wirtels nicht komplementieren (Jack *et al.*, 1994). Daraus lässt sich folgern, dass beide Proteine (*AP3* und *PI*) für die normale Blüten- und Staubblattentwicklung nötig sind. Der *psd1psd2-1psd3-1* Blütenphänotyp ist vergleichbar mit dem Phänotyp der *ap3* und *pi* Mutanten. Die

Untersuchung der Expression von *AP3* und *PI* zeigt eine Reduktion des *AP3* Transkripts in *psd2-1*, *psd3-1*, *psd2-1psd3-1* sowie *psd1psd2-1psd3-1* Blüten (Abb. 35). Die Transkription von *PI* in der Mutante *psd1psd2-1psd3-1* ist ähnlich zu beiden Wildtypen (Abb. 35). Die Transformation der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante mit *AP3* führte zur Bildung normaler Blüten (Abb. 36). So ist der Blütenphänotyp der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante auf eine reduzierte *AP3* Expression zurückzuführen. Zusätzlich führte die Transformation der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante mit der mitochondrialen *atPSD1* (Abb. 31) und der *atPSD3* (Abb. 33) zur Wiederherstellung des normalen Blütenphänotyps. Es war bis zu diesem Zeitpunkt unklar, welche Verbindung zwischen PSD-Defizienz und *AP3* Expression besteht.

4.4 Einfluss des T-DNA Insertionsvektors pD991-AP3 auf den Blütenphänotyp

Neben den *psd2-1* und *psd3-1* Mutanten wurden auch *psd2-2* und *psd3-2* Mutanten isoliert (Nerlich, 2004). Sie besaßen ebenfalls Insertionen in codierenden Bereichen der *PSD* Gene und eine reduzierte PSD-Enzymaktivität, wie sie für die *psd2-1* und *psd3-1* Mutanten beschrieben wurde (Nerlich, 2004). Es handelt sich also auch bei diesen Mutanten um Null-Mutanten. Mit diesen *psd2-2* und *psd3-2* Mutanten wurde eine weitere *psd* Dreifachmutante erzeugt, *psd1psd2-2psd3-2*, deren Blüten keinen Unterschied zu WT-Blüten zeigten (Abb. 37). Der Unterschied der beiden Dreifachmutanten lag zum einen darin, dass die zur Kreuzung verwendeten Mutanten aus unterschiedlichen T-DNA Populationen isoliert wurden und somit unterschiedliche T-DNA Vektoren beinhalten. Zum anderen vereinigt die Mutante *psd1psd2-1psd3-1* die Ökotypen *Ws* und *Col-0*, während die *psd1psd2-2psd3-2* im Ökotyp *Col-0* vorliegt. Bei *psd2-1* und *psd3-1* handelt es sich um T-DNA Insertionsmutanten der *Arabidopsis* Knockout Facility der Universität von Wisconsin, Madison, USA. Diese verwendete für die Transformation der WT *Ws* Pflanzen mit T-DNA einen Vektor (pD991-AP3), der den Promotor des *APETALA3* Gens enthält. Ein Vergleich der pD991-AP3 Vektorsequenz mit der *APETALA3* Gensequenz zeigte, dass der Teil des Vektors pD991-AP3, der als *AP3*-Promotor deklariert wurde, mit dem etwa 500 bp langen DNA-Stück der *AP3* Sequenz vor dem ATG Startcodon übereinstimmt (Abb. 39).

pD991-AP3	ATTGGCTTTT	AACACCAATA	TAAAACTTG	CTTCACACCT	AAACACTTTT	300 bp
APETALA3			n	nnTCACACCT	AAACACTTTT	20 bp
pD991-AP3	GTTTACTTTA	GGGTAAGTGC	AAAAAGCCAA	CCAAATCCAC	CTGCACTGAT	350 bp
APETALA3	GTTTACTTTA	GGGTAAGTGT	AAAAAGCCAA	CCAAATCCAC	CTGCACTGAT	70 bp
pD991-AP3	TTGACGTTTA	CAAACGCCGT	TAAGTTTGTC	ACCGTCTAAA	CAAAAACAAA	400 bp
APETALA3	TTGACGTTTA	CAAACGCCGT	TAAGTTTGTC	ACCGTCTAAA	CAAAAACAAA	120 bp
pD991-AP3	GTAGAAGCTA	ACGGAGCTCC	GTTAATAAAT	TGACGAAAAG	CAAACCAAGT	450 bp
APETALA3	GTAGAAGCTA	ACGGAGCTCC	GTTAATAAAT	TGACGAAAAG	CAAACCAAGT	170 bp
pD991-AP3	TTTTAGCTTT	GGTCCCCCTC	TTTTACCAAG	TGACAATTGA	TTTAAGCAGT	500 bp
APETALA3	TTTTAGCTTT	GGTCCCCCTC	TTTTACCAAG	TGACAATTGA	TTTAAGCAGT	220 bp
pD991-AP3	GTCTTGTAAT	TATACAACCA	TCGATGTCCG	TTGATTTAAA	CAGTGTCTTG	550 bp
APETALA3	GTCTTGTAAT	TATACAACCA	TCGATGTCCG	TTGATTTAAA	CAGTGTCTTG	270 bp
pD991-AP3	TAATTA AAAA	AATCAGTTTA	CATAAATGGA	AAATTTATCA	CTTAGTTTTC	600 bp
APETALA3	TAATTA AAAA	AATCAGTTTA	CATAAATGGA	AAATTTATCA	CTTAGTTTTC	320 bp
pD991-AP3	ATCAACTTCT	GAACTTACCT	TTCATTAATT	AGGCAATACT	TTCCATTTTT	650 bp
APETALA3	ATCAACTTCT	GAACTTACCT	TTCATGGATT	AGGCAATACT	TTCCATTTTT	370 bp
pD991-AP3	AGTAACTCAA	GTGGACCCTT	TACTTCTTCA	ACTCCATCTC	TCTCTTTCTA	700 bp
APETALA3	AGTAACTCAA	GTGGACCCTT	TACTTCTTCA	ACTCCATCTC	TCTCTTTCTA	420 bp
pD991-AP3	TTTCACTTCT	TTCTTCTCAT	TATATCTCTT	GTCCTCTCCA	CAAATGGGG	750 bp
APETALA3	TTTCACTTCT	TTCTTCTCAT	TATATCTCTT	GTCCTCTCCA	CAAATCTCT	470 bp
pD991-AP3	TACCGATATC	CTCGAGTCTA	GAGGATCCCC	CCCACTATCC	TTCGCAAGAC	800 bp
APETALA3	TCAACAAAAA	GATTAACAA	AGAGAGAAGA	ATATGBCGAG	AGGGAAGATC	520 bp

Abb. 39: Sequenzvergleich des Vektors pD991-AP3 mit dem Gen APETALA3

Grau unterlegt sind die sequenzgleichen Abschnitte des Vektors pD991-AP3 und des *APETALA3* Gens. Die 5'-untranslatierte Region ist unterstrichen. Der anhand des EST-Klons EG501838 identifizierte Transkriptionsstart ist mit einem (*) markiert. Das Startcodon (ATG) des *APETALA3* Gens ist eingerahmt.

Über Sequenzvergleiche des *AP3* Gens mit Klonen exprimierter Sequenzen (Expressed Sequence Tags; EST) der NCBI Datenbank wurde der EST EG501838.1 identifiziert. Mit Hilfe dieses ESTs konnte der Transkriptionsstart bei 366 bp im *AP3* Gen ermittelt werden. Der Bereich zwischen Transkriptionsstart und dem Startcodon wird als 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) bezeichnet. Dieser Bereich zeigt Sequenzübereinstimmungen mit dem Vektor pD991. Der Bereich des 5'-UTRs im *AP3* Gen, der mit der Vektorsequenz übereinstimmt, kann zu einer so genannten Co-Suppression des endogenen *APETALA3* Gens führen und somit zu dem *ap3*

Mutanten ähnlichen Blütenphänotyp. Napoli *et al.* (1990) und Van der Krol *et al.* (1990) beschrieben, dass Transgene, die für die Überexpression einer codierenden Sequenz synthetisiert wurden und ähnlich zu einem endogenen Gen sind, nicht immer in Angiospermen zu der gewünschten Überexpression führen. Stattdessen kann die Transkription des endogenen sowie des Transgens unterdrückt werden und in einen Null-Phänotyp resultieren. Dies wurde ursprünglich mit Genen für die Blütenblatffärbung gezeigt (Napoli *et al.*, 1990; Van der Krol *et al.*, 1990). Dieses Phänomen wird als Co-Suppression, „sense Suppression“ oder „sense Co-suppression“ bezeichnet (de Carvalho *et al.*, 1992; Dehio und Schell, 1994; Van Blokland *et al.*, 1994; Kunz *et al.*, 1996). In einigen Fällen wurde gezeigt, dass die „sense Co-Suppression“ von der endogenen Genexpression (Smith *et al.*, 1990) und von dem homozygoten Vorkommen des Transgens (de Carvalho *et al.*, 1992; Hart *et al.*, 1992) abhängig ist. Schubert *et al.*, 2004 zeigten, dass in transgenen Pflanzen transkriptlevelabhängige „silencing-Effekte“ für die Variabilität der Transgenexpression verantwortlich sind. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der eingebrachten Transgene mit dem Transkriptlevel. Dies ist so lange der Fall, bis die Menge der transkribierten mRNA ein genspezifisches Transkriptlevel überschreitet und dann zu RNA silencing führt. Die Expression von *AP3* war in fast allen Linien reduziert, die den Vektor pD991-*AP3* enthielten (*psd2-1*, *psd3-1*, *psd2-1psd3-1* und *psd1psd2-1psd3-1*; Abb. 38), so dass davon ausgegangen werden kann, dass es in diesen Linien zu der beschriebenen Co-Suppression kommt. Diese Co-Suppression führt jedoch ausschließlich in der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante zu dem Blütenphänotyp, obwohl die *AP3* Expression in *psd2-1*, *psd3-1* und *psd2-1psd3-1* in vergleichbarem Grad reduziert war (Abb. 38). In der homozygoten *psd2-1psd3-1* Mutante sowie der homozygoten *psd1psd2-1psd3-1* Mutante waren je vier Kopien der T-DNA mit dem *AP3* Promotor, in den homozygoten Einzelmutanten *psd2-1* und *psd3-1* sind zwei Kopien der T-DNA inseriert. Dass in den Einzelmutanten *psd2-1* und *psd3-1* die T-DNA ausschließlich nur in das jeweilige *PSD*-Gen im Genom inseriert war wurde anhand von Southern Blot Analysen belegt (von Orlow, 2003). Northern Blot Analysen zeigten, dass die Verdopplung der Kopienzahl der T-DNA in der *psd2-1psd3-1* und *psd1psd2-1psd3-1* Mutante jedoch nicht zu wesentlich stärkerer Reduktion der *AP3*-Expression im Vergleich zu den Einzelmutanten führt. Dies spricht dafür, dass die Co-Suppression von *AP3* nicht allein für den Blütenphänotyp verantwortlich ist.

Die einzige Linie, die den pD991-*AP3* Vektor enthält und keine Reduktion der *AP3*-Expression zeigt, ist die mit *atPSD1* transformierte *psd1psd2-1psd3-1* Mutante (Abb. 38). Es scheint, als würde die Transformation mit *atPSD1* die Co-Suppression wieder aufheben können. Inwieweit die in die *psd1psd2-1psd3-1* Mutante eingebrachten Konstrukte Einfluss auf die Co-Suppression von *AP3* haben, wird in künftigen Studien durch die Transformation mit dem leeren Vektors untersucht.

4.4.1 Mehrere Faktoren führen zum Blütenphänotyp der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante

Da die Reduktion der *AP3* Expression durch den T-DNA Insertionsvektor pD991 nicht in allen Linien zu einer veränderten Blütenmorphologie führt, tragen möglicherweise zusätzliche Faktoren zur Blütenmorphologie der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante bei. Durch die *PSD*-Defizienz wurde die Lipidkomposition der Mitochondrienmembran verändert (Abb. 23). Der Gehalt an PE ist reduziert, während der Anteil an PS erhöht ist. Die mitochondrial lokalisierte PSD befindet sich wie auch die Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran. Der über PSDs synthetisierte PE-Pool (eventuell mit speziellem Fettsäuremuster) könnte für Vorgänge in der Mitochondrienmembran von besonderer Bedeutung sein. PE ist das einzige Lipid der Mitochondrienmembran, das keine Lipiddoppelschichten (bilayer) in wässriger Lösung ausbildet (Webb und Green, 1991). Eine Veränderung des Verhältnisses der lipiddoppelschichtdestabilisierenden (non-bilayer) zu lipiddoppelschichtstabilisierenden Lipide könnte zu einer geringfügigen Störung der Atmungskette führen oder Auswirkungen auf die Stabilität der Mitochondrien haben. Zudem liegt PE als Zwitterion vor, PS hingegen ist einfach negativ geladen. Dies könnte die Bildung des pH-Gradienten und des elektrochemischen Potentials beeinflussen. Es besteht also die Möglichkeit, dass die Mitochondrien eine geringe Schädigung erfahren, die mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden nicht nachgewiesen werden konnte. Die Kombination von Mitochondrien mit beeinträchtigter Funktion und dem Auftreten der *AP3* Co-Suppression führt dann zu den beobachteten homöotischen Veränderungen der Blüten der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante.

5. Zusammenfassung

Die durch Phosphatidylserin Decarboxylase (PSD) katalysierte Decarboxylierung von Phosphatidylserin (PS) zu Phosphatidylethanolamin (PE) ist für Mitochondrien in Hefe und Mäusen von essentieller Bedeutung. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde erstmalig die Rolle dieses PE-Syntheseweges in Pflanzen untersucht.

Die drei in *Arabidopsis* identifizierten *PSD* Gene *atPSD1*, *atPSD2*, *atPSD3* codieren für Enzyme, die in Membranen der Mitochondrien (*atPSD1*), der Tonoplasten (*atPSD2*) und des Endoplasmatischen Retikulums (*atPSD3*) lokalisiert sind. Der Beitrag der einzelnen PSDs zur PE-Synthese wurde anhand von *psd* Null-Mutanten untersucht. Dabei stellte sich *atPSD3* als das Enzym mit der höchsten Aktivität heraus. Alternativ zum PSD-Weg wird in *Arabidopsis* PE auch mittels Aminoalkolphosphotransferase synthetisiert. Der Verlust der gesamten PSD-Aktivität, wie es in der erzeugten *psd* Dreifachmutante der Fall ist, wirkt sich ausschließlich auf die Lipidzusammensetzung in der Mitochondrienmembran aus. Demzufolge wird extramitochondriales PE hauptsächlich über die Aminoalkolphosphotransferase synthetisiert. Die veränderte Lipidzusammensetzung der Mitochondrienmembran hatte jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl, Größe und Ultrastruktur der Mitochondrien sowie auf das ADP/ATP-Verhältnis und die Respiration.

Neben der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten beeinflusst die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien auch die Bildung von Blüten- und Staubblättern. Diese Blütenorgane waren in der *psd* Dreifachmutante stark verändert, und der Blütenphänotyp ähnelte der *APETALA3*-Mutante. Dieses homöotische Gen ist für die Ausbildung von Blüten- und Staubblättern verantwortlich. Für die Erzeugung der Mutanten *psd2-1* und *psd3-1* wurde ein T-DNA Vektor verwendet, der den Promotor des *APETALA3* Gens enthielt, welcher in den Mutanten *psd2-1*, *psd3-1* sowie *psd2-1psd3-1* und der *psd1psd2-1psd3-1* Dreifachmutante eine vergleichbare Co-Suppression des *APETALA3* Gens hervorruft. Der Blütenphänotyp trat jedoch nur in der *psd* Dreifachmutante auf, da nur in ihr die Kombination von geringen Funktionsstörungen der Mitochondrien, hervorgerufen durch veränderte Lipidzusammensetzung, mit der Co-Suppression von *APETALA3* auftritt.

6. Ausblick

Der Verlust der PSD katalysierten PE-Synthese in Hefe und Säugerzellen führt zu einer starken Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktionen. Die *Arabidopsis psd* Dreifachmutante zeigt eine leichte Veränderung der Lipidzusammensetzung in den Mitochondrien. Mögliche Funktionsstörungen, die sich daraus ergeben könnten, wurden bisher nicht festgestellt und sollten Gegenstand weiterer Studien sein. Die mitochondrial lokalisierte PSD in Hefe befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran. So könnten Untersuchungen des PS- und PE-Gehalts in Mitochondrienfraktionen der inneren und äußeren Membran aus *Arabidopsis* zeigen, in welchem Umfang die jeweiligen Membranen verändert sind.

Zu dem Blütenphänotyp der *psd1psd2-1psd3-1* Mutante trägt die Reduktion der *APETALA3* Expression sowie eine geringe Schädigung der Mitochondrien bei. Die *psd1psd2-2psd3-2* Mutante hingegen zeigt keine Reduktion der *APETALA3* Expression und auch keine veränderte Blütenmorphologie. Geht man ebenfalls von einer Schädigung der Mitochondrien in der *psd1psd2-2psd3-2* Mutante aus, so könnten Stressexperimente durchgeführt werden, die erhöhte Anforderungen an die Funktionalität der Mitochondrien stellen (Sauerstoffmangel, Inhibierung der Atmungskette). Damit könnte möglicherweise die Schädigung der Mitochondrien nachgewiesen werden.

Durch Transformation mit *atPSD1* wird die *psd1psd2-1psd3-1* Mutante hinsichtlich ihres Blütenphänotyps und der Reduktion der *AP3* Expression komplementiert. Inwieweit die Komplementation der *AP3* Expression durch Störung der *AP3* Co-Suppression durch ein eingebrachtes Konstrukt erfolgt, soll eine Transformation mit dem leeren Vektor zeigen.

7. Literatur

Achleitner G., Gaigg B., Krasser A., Kainersdorfer E., Kohlwein S., Perktold A., Zellnig G., Daum G. (1999) Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem.* 264, 545-553

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004) *Essential Cell Biology, 2/e*, Garland Science, ISBN 081533480X

Ardail D., Gasnier F., Lerme F., Simonot C., Louisot P., Gateau - Roesch O. (1993) Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipids biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.* 268, 25985-25992

Ardail D., Lerme F., Louisot P. (1991) Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266, 7978-7981

Attardi G., Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cel. Biol.* 4, 289-333

Bell R. M., Ballas L. M., Coleman R. A. (1981) Lipid topogenesis. *J. Lipid Res.* 22, 391-403

Benning C., Huang Z.-H., Gage D. A. (1995) Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 103-111

Bergman P., Edqvist J., Farbos I., Glimelius K. (2000) Malesterile tobacco displays abnormal mitochondrial *atp1* transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. *Plant Mol. Biol.* 42, 531-544

Birner R., Bürgermeister M., Schneiter R., Daum G. (2001) Roles of phosphatidylethanolamine and its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12, 997-1007

Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917

Bogdanov M., Dowhan W. (1995) Phosphatidylethanolamine is required for *in vivo* function of the membrane-associated lactose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 732-739

Bogdanov M., Umeda M., Dowhan W. (1999) Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein. Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* 274, 12339-12345

Bohn M., Heinz E., Lühje S. (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays L.*) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 387, 35-40

Bonnett H. T., Kofer W., Hakansson O., Glimelius, K. (1991) Mitochondrial involvement in petal and stamen development studied by sexual and somatic hybridization of *Nicotiana spp.* *Plant Sci.* 80, 119-130

Braun C. J., Brown G. G., Levings C. S. I. (1992) Cytoplasmic male sterility. In: *Cell organelles*. Ed. Herrmann R.G, Springer-Verlag, Heidelberg, 219-245

Brennicke A., Marchfelder A., Binder S. (1999) RNA editing. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 297-316

Browse J., Somerville C. (1991) Glycerolipids synthesis: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42, 467-506

Caddick M. X., Greenland A. J., Jepson I., Krause K.-P., Qu N., Riddell K. V., Salter M. G., Schuch W., Sonnewald U., Tomsett A. B. (1998) An ethanol inducible gene switch for plants: manipulation of carbon metabolism. *Nature Biotechnol.* 16, 177-180

Cahoon E. B., Shanklin J., Ohlrogge J. B. (1992) Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11184-11188

Chakraborty T. R., Vancura A., Balija V. S., Haldar D. (1999). Phosphatidic acid synthesis in mitochondria. Topography of formation and transmembrane migration. J. Biol. Chem. 274, 29786-29790

Clancey C. J., Chang S. C., Dowhan W. (1993) Cloning of a gene (*PSD1*) encoding phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of an *Escherichia coli* mutant. J. Biol. Chem. 268, 24580-24590

Clayton D. A. (1998) Nuclear-mitochondrial intergenomic communication. Biofactors 7, 203-205

Clough S. J., Bent A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16, 735-753

Coen E. S., Meyerowitz E. M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature 353, 31-37

Conley C. A., Hanson M. R. (1994) Tissue-specific protein expression in plant mitochondria. Plant Cell 6, 85-91

Czempinski K., Frachisse J. M., Maurel C., Barbier-Brygoo H., Müller-Röber B. (2002) Vacuolar membrane localization of the *Arabidopsis* "two-pore" K⁺ channel KCO1. Plant J. 29, 809-820

de Carvalho F., Gheysen G., Kushnir S., van Montagu M., Inzé D., Castresana C. (1992) Suppression of β -1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. Eur. Mol. Biol. Org. J. 11, 233-249

Dehio C., Schell J. (1994) Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5538-5542

Delhaize E., Hebb D. M., Richards K. D., Lin J.-M., Ryan P. R., Gardner R. C. (1999) Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. J. Biol. Chem. 274, 7082-7088

Dowhan W., Wickner W. T., Kennedy E. P. (1974) Purification and properties of phosphatidylserine decarboxylase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 249, 3079-3084

Earle E., Temple M., Walters T. W. (1992) Organelle assortment and mitochondrial DNA rearrangements in *Brassica* somatic hybrids and cybrids. Physiologia Plantarum. 85, 325-333

Emoto K., Umeda M. (2000) An essential role for a membrane lipid in cytokinesis: Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. J. Cell Biol. 149, 1215-1224

Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L., Henson P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol. 148, 2207-2216

Fadok V. A., Bratton D. L., Frasch S. C., Warner M. L., Henson P. M. (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. Cell Death Differ. 5, 551-562

Feys B. F., Benedetti C. E., Penford C. N., Turner J. G. (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. Plant Cell 6, 751-759

Galliard T. (1968a) Aspects of lipid metabolism in higher plants-I. Identification and quantitative determination of the lipids in potato tubers. Phytochemistry 7, 1907-1914

Galliard T. (1968b) Aspects of lipid metabolism in higher plants-II. Identification and quantitative determination of the lipids from the pulp of pre- and post-climacteric apples. Phytochemistry 7, 1915-1922

Garesse R., Vallejo C. G. (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. Gene 263, 1-16

Goldberg R. B., Beals T. P., Sanders P. M. (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *The Plant Cell* 5, 1217-1229

Gomez-Casati D. F., Busi M. V., Gonzalez-Schain N., Mouras A., Zabaleta E. J., Araya A. (2002) A mitochondrial dysfunction induces the expression of nuclear-encoded complex I genes in engineered male sterile *Arabidopsis thaliana*. *Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.* 532, 70-74

Goto K., Meyerowitz E. M. (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* 8, 1548-1560

Green D.R., Reed J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312

Gutierrez S., Sabar M., Lelandais C., Chetrit P., Diolez P., Degand H., Boutry M., Vedel F., de Kouchkovsky Y., DePaepe, R. (1997) Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3436-3441

Hackert M. L., Pegg A. E. (1998) Pyruvoyl-dependant enzymes. In: *Comprehensive biological catalysis*. Ed: Sinnott MJ, Academic Press, New York 201-216

Hamamatsu S., Shibuya I., Takagi M., Ohta A. (1994) Loss of phosphatidylserine synthesis results in aberrant solute sequestration and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fed. Eur. Bio. Soc. Lett.* 348, 33-36

Hanson M. R. (1991) Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu. Rev. Genet.* 25, 461-486

Hanson M. R., Bentolila S. (2004) Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16, 154-169

Hawrot E., Kennedy E. P. (1975) Biogenesis of membrane lipids: Mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive phosphatidylserine decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1112-1116

Hawrot E., Kennedy E. P. (1976) Conditional lethal phosphatidylserine decarboxylase mutants of *Escherichia coli* - Mapping of the structural gene for phosphatidylserine decarboxylase. *Mol. Gen. Genet.* 148, 271-279

Hawrot E., Kennedy E. P. (1978) Phospholipid composition and membrane function in phosphatidylserine decarboxylase mutants of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253, 8213-8220

Heikinheimo L., Somerharju P. (1998) Preferential decarboxylation of hydrophilic phosphatidylserine species in cultured cells. Implications on the mechanism of transport to mitochondria and cellular aminophospholipid species compositions. *J. Biol. Chem.* 273, 3327-3335

Heinz E. (1977) Enzymatic reactions in galactolipid biosynthesis. In: *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. Ed: Tevini M., Lichtenthaler H.K., Springer, Berlin, 102–120

Heinz E. (1993) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. In: *Lipid Metabolism in Plants*. Ed: Moore T. S. J., CRC Press, Boca Raton, 33-89

Hill T. A., Day C. D., Zondlo S. C., Thackeray A., Irish V. F. (1998) Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3*. *Development* 125, 1711-1721

Höfgen R., Willmitzer L. (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* 66, 221-223

Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K. (2001) The *DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13, 2191-2209

Jack T., Brockman L. L., Meyerowitz E. M. (1992) The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68, 683-697

Jack T., Fox G. L., Meyerowitz E. M. (1994) *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and post-transcriptional regulation in floral meristems. *Development* 126, 5231-5243

Jack T. (2004) Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16, 1-17.

Janska H., Sarria R., Woloszynska M., Arrieta-Montiel M., Mackenzie S. A. (1998) Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 10, 1163-1180

Jellito T., Sonnewald U., Willmitzer L., Hajirezaei M. R., Stitt M. (1992) Inorganic pyrophosphate content and metabolites in leaves and tubers of potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol: biochemical evidence that sucrose metabolism has been manipulated. *Planta* 188, 238-244

Joyard J., Block M. A., Malherbe A., Marechal E., Douce R. (1993) Origin and synthesis of galactolipid and sulfolipid head groups. In: *Lipid Metabolism in Plants*. Ed: Moore T. S. J., CRC Press, Boca Raton, 231-258

Kanfer J., Kennedy E. P. (1964) Metabolism and function of bacterial lipids. II. Biosynthesis of Phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239, 1720-1726

Kelly A. A., Fröhlich J. E., Dörmann P. (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* 15, 1-14

Kennedy E. P., Weiss S. B. (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 222, 193-214

Klein M., Binder S., Brennicke A. (1998) Purification of mitochondria from *Arabidopsis*. In *Arabidopsis Protocols*, *Methods in Molecular Biology* 82, 49-53

Kramer E. M., Hall J. (2005) The evolutionary dynamics of genes controlling floral development. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 1-6

- Kunz C., Schob H., Stam M., Kooter J. M., Meins F. Jr., (1996)** Developmentally regulated silencing and reactivation of tobacco chitinase transgene expression. *Plant J.* 10, 437-450
- Leclercq P. (1969)** Une stérilité male cytoplasmic chez le tournesol. *Ann. Amélior Plant* 19, 99-106
- Lee S. J., Warmke H. E. (1979)** Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male sterile corn. *American Journal of Botany* 66, 141-148
- Li Q. X., Dowhan W. (1988)** Structural characterization of *Escherichia coli* phosphatidylserine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 263, 11516-11522
- Mackenzie S., Shichuan H., Lyznik A. (1994)** The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol.* 105, 775-780
- Mackenzie S., McIntosh L. (1999)** Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11, 571-585
- Marshall M. O., Kates M. (1973)** Biosynthesis of phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl choline in spinach leaves. *Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.* 31, 199-202
- Matsumoto K., Uno I., Ishikawa T. (1985)** Genetic analysis of the role of cAMP in yeast. *Yeast* 1, 15-24
- Matsumoto K., Okakda M., Horikoshi Y., Matsuzaki H., Kishi T., Itaya M., Shibuya I. (1998)** Cloning, sequencing, and disruption of the *Bacillus subtilis psd* gene coding for phosphatidylserine decarboxylase. *J. Bacteriol.* 180, 100-106
- McConn M., Browse J. (1996)** The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8, 403-416
- Mendel G. (1865)** Experiments in plant hybridization. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn*, Bd. IV für das Jahr 1865, Abhandlungen, 3-47
- Mignone F., Gissi C., Liuni S., Pesole G. (2002)** Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 3, Reviews 0004.1-0004.10

Mileykovskaya E., Sun Q., Margolin W., Dowhan W. (1998) Localization and function of early cell division proteins in filamentous *Escherichia coli* cells lacking phosphatidylethanolamine. J. Bacteriol. 180, 4252-4257

Mizoi J., Nakamura M., Nishida I. (2006) Defects in CTP:phosphorylethanolamine cytidyltransferase affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*. Plant Cell Preview Jan. 2007

Moore T. S. (1982) Phospholipid biosynthesis. Annu. Rev. Plant. Physiol. 33, 235-259

Morein S., Andersson A., Rilfors L., Lindblom G. (1996) Wild-type *Escherichia coli* cells regulate membrane lipid composition in a window between gel and non-lamellar structure. J. Biol. Chem. 271, 6801-6809

Murai K., Takumi S., Koga H., Ogiwara Y. (2002) Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. The Plant Journal 29, 169-181

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497

Nakamura H., Miura K., Fukuda Y., Shibuya I., Ohta A., Takagi M. (2000) Phosphatidylserine synthesis required for the maximal tryptophan transport activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 167-172

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. Plant Cell 2, 279-289

Nerlich A. (2004) Untersuchung Phosphatidylserin Decarboxylase defizienter Mutanten von *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, FB Biologie und Biochemie, Universität Potsdam, D

O'Brien I. E. W., Baguley B. C., Murray B. G., Moris B. A., Ferguson I. B. (1998) Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. Plant J. 13, 803-814

- Ohlrogge J. B., Browse J. (1995)** Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957-970
- Piffanelli P., Murphy D. J. (1998)** Novel organelles and targeting mechanisms in the anther tapetum. *Trends in Plant Sci.* 3, 250-253
- Polowick P. L., Sawhney V. K. (1986)** A scanning electron microscopic study of the initiation and development of floral organs of *Brassica napus* (cv. Westar). *Am. J. Bot.* 73, 254-263
- Raghavendra A. S., Reumann S., Heldt H. W. (1998)** Participation of mitochondrial metabolism in photorespiration. Reconstituted system of peroxisomes and mitochondria from spinach leaves. *Plant Physiol.* 116, 1333-1337
- Rasmusson A. G., Heiser V. V., Zabaleta E., Brennicke A., Grohmann L. (1999)** Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J.* 20, 79-88
- Rontein D., Nishida I., Tashiro G., Yoshioka K., Wu W.-I., Voelker D. R., Basset G., Hanson A. D. (2001)** Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 35523-35529
- Rontein D., Wu W. J., Voelker D. R., Hanson A. D. (2003)** Mitochondrial phosphatidylserin decarboxylase from higher plants. Functional complementation in Yeast, localization in plants, and Overexpression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 1678-1687
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989)** *Molecular Cloning: a laboratory manual* 2nd^{ed}. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
- Schnable P., Wise R. P. (1998)** The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Sci.* 3, 175-180
- Schroit A. J., Zwaal R. F. A. (1991)** Transbilayer movement of phospholipids in red blood cell and platelet membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1071, 313-329.

Schubert D., Lechtenberg B., Forsbach A., Gils M., Bahadur S., Schmidt S. (2004) Silencing in Arabidopsis T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* 16, 2561-2572

Scott A. C., Wyatt S., Tsou P., Robertson D., Allen N. S. (1999) Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *BioTechniques* 26, 1125-1132

Shiao Y. J., Lupo G., Vance J. E. (1995) Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* 270, 11190-11198

Shin S. H., Moore T. S. (1990) Phosphatidylethanolamine synthesis by castor bean endosperm - a base exchange reaction. *Plant Physiol.* 93, 148-153

Singer S. J., Nicholson G. L. (1972) The fluid mosaic model. *Science* 175, 720-729

Smart C. J., Monéger F., Leaver C. J. (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell* 6, 811-825

Sommer P., Nehrbass U. (2005) Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 294–301

Steenbergen R., Nanowski T. S., Beigneux A., Kulinski A., Young S. G., Vance J. E. (2005) Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J. Biol. Chem.* 280, 40032-40040

Smith C. J. S., Watson C. F., Bird C. R., Ray J., Schuch W., Grierson D. (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 224, 447-481

Storey M. K., Clay K. L., Kutateladze T., Murphy R. C., Overduin M., Voelker D. J. (2001) Phosphatidylethanolamine has an essential role in *Saccharomyces cerevisiae* that is independent of its ability to form hexagonal phase structures. *J. Biol. Chem.* 276, 48539-48548

Teixeira R. T., Knorpp C., Glimelius K. (2005) Modified sucrose, starch and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. *J. Exp. Bot.* 56, 1245-1253

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354

Trotter P. J., Voelker D. R. (1995) Identification of a non-mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase activity (PSD2) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 6062-6070

Trotter P. J., Pedretti J., Voelker D. R. (1993) Phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of mutants, cloning of the gene, and creation of a null allele. *J. Biol. Chem.* 268, 21416-21424

Trotter P. J., Pedretti J., Voelker D. R. (1995) Phosphatidylserine decarboxylase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 6071-6080

Tuller G., Nemec T., Hrastnik C., Daum G. (1999) Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast* 15, 1555-1564

Tyhach R. J., Hawrot E., Satre M., Kennedy E. P. (1979) Increased synthesis of phosphatidylserine decarboxylase in a strain of *Escherichia coli* bearing a hybrid plasmid. Altered association of enzyme with the membrane. *J. Biol. Chem.* 254, 627-633

van Blokland R., van der Geest N., MOI J. N. M., Kooter J. M. (1994) Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *fetunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* 6, 861-877

- van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., MOI J. N. M., Stuitje A. R. (1990)** Flavonoid genes in *petunia*: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299
- Vance J. E., Steenbergen R. (2005)** Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* 44, 207-234
- Vance J. E. (1990)** Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248-7256
- Vance J. E., Vance D. E. (1988)** Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion?. *J. Biol. Chem.* 263, 5898-5909
- Vanlerberghe G. C., McIntosh L. (1994)** Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol.* 105, 867-874
- Vedel F., Mathieu C., Lebacq P., Ambard-Bretteville F., Remy R. (1982)** Comparative macromolecular analysis of the cytoplasm of normal and cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 62, 255-262
- Vervliet G., Holsters M., Teuchy H., van Montagu M., Schell J. (1975)** Characterisation of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol.* 26, 33-48
- Vincent P., Maneta-Peyret L., Cassagne C., Moreau P. (2001)** Phosphatidylserine delivery to endoplasmic reticulum derived vesicles of plant cells depends on two biosynthetic pathways. *Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.* 498, 32-36
- Voelker D. R. (1984)** Phosphatidylserine functions as the major precursor of phosphatidylethanolamine in cultured BHK 21 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 2669-2673
- Voelker D. R. (1989)** Reconstitution of phosphatidylserine import into rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264, 8019-8025
- Voelker D. R. (1997)** Phosphatidylserine decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 236-244

Voelker D. R. (2000) Interorganelle transport of aminoglycerophospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 97-107

von Orlow M. (2003) Phosphatidylserin Decarboxylase in Pflanzen. Doktorarbeit, FB Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin

Webb M. S., Green B. R. (1991) Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 133-158

Weiner H., Stitt M., Heldt H. W. (1987) Compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 893, 13-21

Weiss S. B., Smith S. W., Kennedy E. P. (1958) The enzymatic formation of lecithin from cytidine diphosphate choline and D-1,2-diglyceride. *J. Biol. Chem.* 231, 53-64

Wu H.-M., Cheung A. Y. (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol. Biol.* 44, 267-281

Wu W.-I., Voelker D. R. (2001) Characterization of phosphatidylserine transport to the locus of phosphatidylserine decarboxylase 2 in permeabilized yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 7114-7121

Xie D. X., Feys B. F., James S., Nieto-Rostro M., Turner J. G. (1998) *COI1*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonateregulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094

Zabaleta E., Heiser V., Grohmann L., Brennicke A. (1998) Promoters of nuclear-encoded respiratory chain complex I genes from *Arabidopsis thaliana* contain a region essential for anther/pollen-specific expression. *Plant J.* 15, 49-59

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt zu haben. Ich versichere ebenfalls, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Potsdam, den 15.01.07

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung der Dissertation und die exzellenten Arbeitsbedingungen am Max Planck Institut für molekulare Pflanzenphysiologie möchte ich mich bei Prof. Dr. Lothar Willmitzer und PD Dr. Peter Dörmann bedanken. Zudem danke ich Herrn PD Dr. Peter Dörmann dafür, dass er meine Arbeit mit sehr viel Einsatz und großer Fachkenntnis betreute. Seine Begeisterung für die wissenschaftliche Forschung wird mir stets ein Ansporn sein.

Großer Dank gilt auch den lieben Mitgliedern der AG Dörmann und weiteren Mitgliedern des Instituts für Ihre Hilfe und freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke besonders Melanie von Orlow für die Bereitstellung der *psd* Mutanten und einiger Konstrukte.

Außerdem danke Ich Michael Melzer für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Dennis Rontein für die heterologe Expression von *atPSD2* und *atPSD3* in der *psd1psd2* Hefemutante.

Joost von Dongen war eine große Hilfe bei den Sauerstoffmessungen und der Bestimmung der Keimungsraten, auch ihm gilt mein Dank.

Weiterhin möchte ich mich bei den Gärtnern für die hervorragende Betreuung der *Arabidopsis* Pflanzenanzucht bedanken.

An dieser Stelle sei auch den Technikern, dem IT-Team und der Mitarbeiterin der Medienküche, Brigitte Amthor, gedankt.