

**Charakterisierung der vektoriellen Acylierung  
als Mechanismus des Fettsäuretransports in  
*Synechocystis* sp. PCC 6803**

**Inaugural-Dissertation**

**zur  
Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu  
Köln**

**vorgelegt von**

**Simon Hans Arnfrid Sittich Freiherr von Berlepsch**

**aus Bremen**

**März 2012**

Berichtersteller:

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2012

„Grau, treuer Freund, ist alle Theorie und grün des Lebens goldner Baum“

Mephisto in Goethes Faust



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Plastidäre Fettsäuresynthese .....	1
1.2	Biosynthese der Lipide .....	2
1.3	Mechanismen des Fettsäuretransports .....	5
1.4	Peroxisomaler Fettsäuretransport in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	5
1.5	Fettsäuretransport in einzelligen Organismen.....	5
1.6	Acyl-aktivierende-Enzyme in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
1.7	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 als Modellorganismus .....	10
1.8	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit .....	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1	Organismen .....	12
2.2	Kultivierung der Organismen .....	13
2.3	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	16
2.4	Transformation von Bakterien und Hefen.....	16
2.5	Amplifizierung, Aufreinigung und Klonieren von DNA .....	18
2.6	Herstellung von <i>Synechocystis</i> Funktionsverlust Mutanten .....	20
2.7	Herstellung der Komplementationslinien in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
2.8	Herstellung von Vektoren zur Überexpression des <i>SynAas</i> Gens aus <i>Synechocystis</i> und des Acyl-Carrier Protein aus <i>E. coli</i> .....	22
2.9	Proteinbestimmung nach Bradford .....	22
2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	23
2.11	Anfärben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue .....	24
2.12	Immuno-Blotting .....	24
2.13	Immunodetektion von Proteinen.....	25
2.14	Expression rekombinanter Fusionsproteine .....	26
2.15	Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie .....	26
2.16	Acyl-ACP Synthetase Assay .....	27
2.17	Liposomen Assay .....	28
2.18	Lipid Extraktion aus <i>Synechocystis</i> Zellen .....	29
2.19	Dünnschichtchromatographie.....	29
2.20	Fettsäure-Methylester-Extraktion und GC-Analyse der Fettsäure Komposition in <i>Synechocystis</i> Zellen.....	29
2.21	Fettsäure-Methylester-Extraktion und GC-Analyse sekretierter Fettsäuren aus dem Außenmedium .....	30
2.22	Zellextrakt-Fraktionierung und Aktivitätsassay .....	30
2.23	Transmissions Elektronenmikroskopie (TEM).....	31
2.24	<u>P</u> ulse <u>A</u> mplitude <u>M</u> odulation (PAM) Messungen .....	32
2.25	Fluoreszenzmikroskopie.....	32
2.26	Kurzzeit Aufnahmestudien von [1- <sup>14</sup> C]- $\alpha$ -Linolensäure.....	32

2.27	Kurzzeit Aufnahmestudien von BODIPY D3823.....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	Suche nach Acyl-aktivierenden Enzymen in <i>Synechocystis</i> .....	34
3.2	Herstellung und Kontrolle von <i>Synechocystis</i> Mutanten .....	35
3.3	<i>Synechocystis</i> Wildtyp Zellen sind sensitiv gegen mehrfach ungesättigte Fettsäuren .....	36
3.4	Die $\Delta$ <i>synaas</i> Mutante ist resistent gegen hohe Konzentrationen von $\alpha$ -Linolensäure .....	37
3.5	Einfluss von $\alpha$ -Linolensäure auf die Photosyntheserate in Wildtyp und $\Delta$ <i>synaas</i> <i>Synechocystis</i> Zellen.....	39
3.6	Einfluss von $\alpha$ -Linolensäure führt zu strukturellen Veränderungen in der <i>Synechocystis</i> Wildtyp Zelle .....	40
3.7	Wildtyp Zellen zeigen eine starke Aufnahme von $\alpha$ -Linolensäure .....	42
3.8	Akkumulation vom Fettsäurederivat BODIPY D3823 in Wildtyp Zellen .....	43
3.9	Kontinuierliche Aufnahme von $\alpha$ -Linolensäure im Langzeitexperiment .....	44
3.10	$\alpha$ -Linolensäure akkumuliert in den Zellen und wird in die Lipide eingebaut.....	46
3.11	Die Tocopherolmutante $\Delta$ <i>slr1736</i> ist hypersensitiv gegenüber $\alpha$ -Linolensäure .....	49
3.12	SynAas zeigt eine duale Lokalisation im Cytosol und an der Membran in der <i>Synechocystis</i> Zelle.....	51
3.13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mutanten des Fettsäureimport Komplexes zeigen Resistenz gegen $\alpha$ -Linolensäure .....	52
3.14	Die Hefemutanten $\Delta$ <i>fat1</i> , $\Delta$ <i>faa1</i> , $\Delta$ <i>faa4</i> zeigen eine verringerte Aufnahme des Stearinsäureanalogons BODIPY D3823 .....	53
3.15	Überexpression von SynAas im Wildtyp und $\Delta$ <i>fat1</i> führt zu erhöhter Sensitivität gegenüber $\alpha$ -Linolensäure .....	54
3.16	Biochemische Funktion des Acyl-aktivierenden Enzyms SynAas.....	58
3.17	In artifizielle Membranen eingebettete Fettsäuren dienen als Substrat für das Acyl- aktivierende Enzym SynAas.....	60
3.18	Fettsäureexport in <i>Synechocystis</i> durch den ABC-Transporter SynAbc.....	63
3.19	Knock out von SynABC führt zur Sensitivität gegenüber $\alpha$ -Linolensäure .....	63
3.20	Die $\Delta$ <i>synabc</i> Mutante akkumuliert mehr Fettsäure als der Wildtyp .....	64
3.21	Die Doppelmutante $\Delta$ <i>synaas</i> / $\Delta$ <i>synabc</i> sekretiert keine Fettsäuren ins Außenmedium.....	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
4.1	Der Defekt im SynAAS Gen schützt die Zelle vor dem toxischen Effekt der $\alpha$ - Linolensäure .....	68
4.2	Akkumulation von freien Fettsäuren und Strukturveränderung im <i>Synechocystis</i> Wildtyp .....	72
4.3	Ein Defekt im Fettsäuretransportmechanismus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vermittelt Resistenz gegenüber $\alpha$ -Linolensäure .....	75
4.4	Überexpression von SynAAS in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> führt zu Sensitivität gegenüber $\alpha$ -Linolensäure .....	76
4.5	In Membranen eingebettete freie Fettsäure dient als Substrat für SynAAS.....	77
4.6	Modell für den Import von freien Fettsäuren in <i>Synechocystis</i> .....	78

4.7	Fettsäuretransport im Chloroplasten .....	80
4.8	SynABC ist ein putativer Fettsäureexporter in <i>Synechocystis</i> .....	81
<b>5</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>101</b>





# 1 Einleitung

Fettsäuren sind essenzielle Bestandteile aller lebenden Zellen. Im Pflanzenreich bilden sie einen hohen Bestandteil aller Öle, Fette und Wachse. Sie sind wichtige Strukturkomponenten von Phospho- und Galaktolipiden, aus denen alle Membranen der Zelle bestehen, als Wachse bilden sie schützende Oberflächenschichten und dienen in Neutrallipiden als Energiespeicher. Zusätzlich sind Fettsäuren Vorläufer von Signalstoffen, die wichtig für die Entwicklung und Stressantwort der Pflanze sind. Fettsäuren bestehen aus einer Carboxylgruppe und einem unterschiedlich langen, unverzweigten Kohlenwasserstoffgerüst. Sie haben durch ihre hydrophilen Carboxylgruppe und ihre hydrophobe Kohlenwasserstoffkette amphiphile Eigenschaften. Freie Fettsäuren sind metabolisch inert, daher müssen sie unter Energieverbrauch aktiviert werden, um in den Metabolismus einzuwandern. Im Folgenden wird zunächst die Synthese der Fettsäuren und Lipide in der Pflanze beschrieben.

## 1.1 Plastidäre Fettsäuresynthese

In höheren Pflanzen ist die Fettsäuresynthese ausschließlich im plastidären Stroma lokalisiert (Ohlrogge et al., 1979). Für die Fettsäuresynthese werden Reduktionsäquivalente und Energie in Form von NADPH bzw. ATP benötigt. Dementsprechend findet sie nahezu ausschließlich in der Lichtphase statt, während die Rate der Fettsäuresynthese in der Dunkelphase bei nur 2% liegt (Nakamura, 1975; Browse et al., 1981). Für die Fettsäurebiosynthese wird das aus der cytosolischen oder plastidären Glykolyse stammende Phosphoenolpyruvat (PEP) im Plastiden durch die Pyruvat-Kinase zu Pyruvat (Valentini, 2000) und durch die plastidäre Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt (Kang und Rawthorne, 1994). Hierbei bedarf es eines regen Transports von PEP und/oder Pyruvat über die Chloroplastenmembran. PEP wird durch den Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator 1 (PPT1) über die Chloroplastenmembran transportiert (Knappe et al., 2003; Prabhakar et al., 2010), während der Pyruvattransport durch den erst kürzlich identifizierten Bile-Acid-Sodium-Symporter 2 (BASS2) vermittelt wird (Furumoto et al., 2011). Jedoch kann auch Acetat, welches durch den Dehydrogenase-Komplex und die Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase im Mitochondrium entsteht, als Vorläufer der Fettsäuresynthese dienen (Liedvogel und Stumpf, 1982). Im Chloroplasten wird

Acetat durch die Acetyl-CoA-Synthetase aktiviert und es entsteht Acetyl-CoA, welches in die Fettsäuresynthese eingehen kann (Ke et al., 2000).

Der Grundbaustein der Fettsäuresynthese ist das Malonyl-CoA. Es wird durch Carboxylierung von Acetyl-CoA durch die plastidäre Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) gebildet, wobei ATP als Energielieferant benötigt wird (Konishi et al., 1996). Die Funktion der Acetyl-CoA-Carboxylase ist lichtabhängig, so wird das Enzym durch den Anstieg des pH-Wertes und der  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Stroma aktiviert. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Bindung von Acetyl-CoA an eine SH-Gruppe einer Untereinheit der Fettsäure-Synthase (FAS). Die Fettsäure-Synthase ist ein Multienzym Komplex, welches die gesamten Enzyme der Fettsäure Synthese vereint (Harwood, 1988). Das durch die ACC gebildete Malonyl-CoA bindet an ein in der Fettsäure-Synthase gebundenes Acyl-Carrier Protein (ACP) (Sasaki et al., 1997). Unter Abspaltung eines Kohlendioxid Moleküls verbinden sich der Acetyl-Rest und der Malonylrest zum 3-Ketoacyl-ACP. Es folgen zwei NADPH-abhängige Reduktionsschritte und ein Dehydrierungsschritt. Das so entstandene Butyryl-ACP wird durch sukzessive Kondensation mit weiteren Malonylresten zu Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) oder Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) verlängert. Freigesetztes Stearoyl-ACP kann durch die Stearoyl-ACP- $\Delta 9$ -Desaturase zu Ölsäure ( $C_{18:1}$ ) umgesetzt werden (Lightner und Wu, 1994). Die resultierenden Fettsäure-ACP-Moleküle werden über zwei Wege in die Glycerolipide der Pflanzenzelle eingebaut (Benning, 2008).

### 1.2 Biosynthese der Lipide

In Pflanzen erfolgt der Einbau von „*de novo*“ synthetisierten Fettsäuren, durch zwei unabhängig voneinander funktionierende Wege (Gardiner et al., 1982): Den „prokaryontischen-Weg“, der die Lipidsynthese im Plastiden beschreibt und den „eukaryontischen-Weg“, der die Synthese von Phospholipiden im endoplasmatischen Retikulum (ER) darstellt (Abbildung 1). Im „prokaryontischen-Weg“ wird das durch die Fettsäure-Synthase (FAS) gebildeten Acyl-ACP direkt durch die Acyl-ACP:Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (ATS1) (Kunst et al., 1988) an Glycerin-3-Phosphat gebunden, es entsteht Lyso-Phosphatidsäure (Lyso-PA) . Glycerin-3-Phosphat wird durch eine Reduktion des aus der Glykolyse stammenden Dihydroxyacetonphosphates gebildet (Miquel et al., 1998) oder wird durch die Aktivität der Glycerin-Kinase durch Phosphorylierung von Glycerin synthetisiert (Sadava und Moore, 1987). Ein additiver Acyltransferase Schritt durch die Lyso-

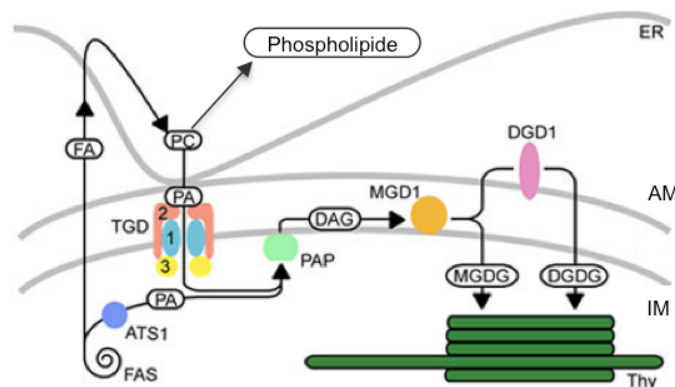
Phosphatidsäure-Acyltransferase (LPAAT) führt zur Bildung von Phosphatidsäure (PA). Dieses Enzym ist essenziell für die plastidäre Lipidsynthese, da ein Funktionsverlust des *LPAAT* Gens zur embryonalen Letalität führt (Kim und Huang, 2004; Yu et al., 2004). Die gebildete Phosphatidsäure wird im weiteren Verlauf zu den Glycolipiden Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG) und Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG) und dem Sulfolipid Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG) der plastidären Membranen umgebaut. Die Fettsäuren werden auf Lipidebene durch spezifische Desaturasen weiter desaturiert (Iba et al., 1993; Falcone et al., 1994; McConn et al., 1994; Heilmann et al., 2004). Lipide, die im „prokaryontischen-Weg“ synthetisiert werden, sind an der *sn-2* Position des Glycerinrückgrats zu einem hohen Anteil mit Hexadecatriensäure (C<sub>16:3</sub>) verestert (Browse und Somerville, 1991). An der *sn-1* Position wird vorwiegend Ölsäure (C<sub>18:1</sub>) vorgefunden (Frentzen und Heinz, 1983).

Über den „eukaryontischen-Weg“ im endoplasmatischen Retikulum werden die meisten Phospholipide der Pflanzenzelle synthetisiert. Eingangs werden die Acyl-ACP Moleküle durch eine plastidäre Acyl-ACP-Thioesterase in freie Fettsäuren und ACP gespalten (Jones et al., 1995). Die freien Fettsäureketten werden vom Plastiden zum ER transportiert und dort in Phosphatidylcholin (PC) gebunden (Bates und Ohlrogge, 2007). PC wird im ER umgebaut zu Phospholipiden wie Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylinositol (PI) oder Phosphatidylethanolamin (PE). Lipide, die im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden, sind an der *sn-1* und der *sn-2* Position vorwiegend mit C<sub>18</sub>-Fettsäuren verestert. Phosphatidsäure (PA) kann zusätzlich über den ABC-Transporterkomplex TGD1,2,3 zurück in den Plastiden transportiert werden (Abbildung 1) (Xu et al., 2005; Awai et al., 2006). Somit können auch Galaktolipide gebildet werden, die an ihrer *sn-2* Position  $\alpha$ -Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) besitzen. Die Veresterung der *sn-2* Position mit  $\alpha$ -Linolensäure ist ein Kennzeichen für im „eukaryontischen-Weg“ synthetisierte Lipide.

In Blättern von *Arabidopsis thaliana* oder *Spinacia oleracea* tragen der „eukaryontische-“ und der „prokaryontische-Weg“ zu gleichen Teilen zur Synthese der Glycerolipide im Blatt bei. Man nennt diese Pflanzen aufgrund der erhöhten Lipidsynthese über den „prokaryontischen-Weg“ daher auch „16:3-Pflanzen“. In anderen Spezies wie *Pisum sativum*, *Ricinus communis* und außerdem im nicht-photosynthetisch aktivem Gewebe, werden über 90% der Glycerolipide über den

„eukaryontischen-Weg“ synthetisiert (Ohlrogge und Browse, 1995). Pflanzen wie *Pisum sativum* und *Ricinus cummunis* nennt man daher aufgrund des erhöhten Vorkommens von  $\alpha$ -Linolensäure an der *sn*-2 Position der Lipide auch „18:3-Pflanzen“. Durch einen Defekt in der Acyl-ACP:Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (ATS1) in *Arabidopsis thaliana*, kann das Verhältnis von eukaryontischen zu prokaryontischen Lipidspezies deutlich erhöht werden (Kunst et al., 1988; Xu et al., 2006). Somit kann durch die Blockade des „prokaryontischen-Weges“ *Arabidopsis thaliana* in eine „18:3-Pflanze“ umgewandelt werden.

Der „eukaryontische-Weg“ erfordert einen massiven Transport von Fettsäuren über die plastidäre Membran. Ein Modell besagt, dass freie Fettsäuren über die innere und äußere Membran transportiert werden und auf der cytosolischen Seite als Acyl-CoA entlassen werden. Von diesem Acyl-CoA Pool aus werden sie in die im ER gebildeten Glycerolipide integriert (Roughan und Slack, 1984). Eine neuere Hypothese legt nahe, dass Acyl-Ketten die innere Membran passieren und an der äußeren Chloroplastenmembran durch die Lyso-Phosphatidylcholin-Acyltransferase (LPCAT) direkt in Phosphatidylcholin (PC) eingebunden werden (Tjellström et al., 2011). Dieses Modell wird unterstützt durch die Tatsache, dass nur die äußere Chloroplastenmembran PC als Strukturlipid beinhaltet (Dorne et al., 1985). Beide Modelle benötigen jedoch den Transport von Fettsäuren über beide oder zumindest eine plastidäre Membran. Der Mechanismus und die involvierten Enzyme beziehungsweise Transporter sind bislang nicht bekannt.



**Abbildung 1: Modell der Lipidsynthese in *Arabidopsis thaliana*.** ER: Endoplasmatisches Retikulum, AM: äußere Chloroplastenmembran, IM: innere Chloroplastenmembran, Thy: Thylakoidmembran, FAS: Fettsäure-Synthase, ATS1: Acyl-ACP:Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase, TGD 1,2,3: ABC-Transporterkomplex, DGD1: Digalaktosyldiacylglycerin Synthase, MGD1: Monogalaktosyldiacylglycerin Synthase, PAP: plastidäre Phosphatidsäure Phosphatase, FA: Fettsäure, PC: Phosphatidylcholin, PA: Phosphatidsäure, DAG: Diacylglycerin, MGDG: Monogalaktosyldiacylglycerin, DGDG: Digalaktosyldiacylglycerin. Abbildung modifiziert nach Benning, (2008).

### 1.3 Mechanismen des Fettsäuretransports

Die Eigenschaft, freier Fettsäuren sich direkt in Membranen einzulagern, aber kaum durch sie hindurch zu diffundieren (Dutta-Roy, 2000), eröffnet die Möglichkeit einer Vielfalt von Mechanismen des Fettsäuretransports. Im folgenden Abschnitt werden gegenwärtige Modelle für Fettsäure Transportmechanismen in verschiedenen Organismen beschrieben.

### 1.4 Peroxisomaler Fettsäuretransport in *Arabidopsis thaliana*

Um Fettsäuren der  $\beta$ -Oxidation zuzuführen, was insbesondere während der Keimung eine bedeutende Rolle spielt, müssen diese die Peroxisomenmembran durchqueren. Nach heutigem Stand wird in *Arabidopsis thaliana* dieser Transport durch den peroxisomalen ABC-Transporter PXA1 vermittelt (Abbildung 2A). Untersuchungen an der *pxa1*-Mutante zeigten einen verlangsamten Abbau von Speicherlipiden, eine Akkumulation von freien Fettsäuren und eine deutlich verringerte Keimlingsetablierung (Footitt et al., 2006; Graham, 2008). Kunz et al. (2009) konnten in ihrer Arbeit die Bedeutung von PXA1 in verlängerter Dunkelheit aufzeigen, die es der Pflanze ermöglicht, nach Verbrauch der transitorischen Stärke, Energie aus der Verbrennung von plastidären Fettsäuren zu gewinnen. Die *pxa1*-Mutante zeigt nach verlängerter Dunkelheit einen letalen Phänotyp, der durch die Akkumulation mobilisierter, freier Fettsäuren hervorgerufen wird (Kunz et al., 2009; Kunz et al., 2010).

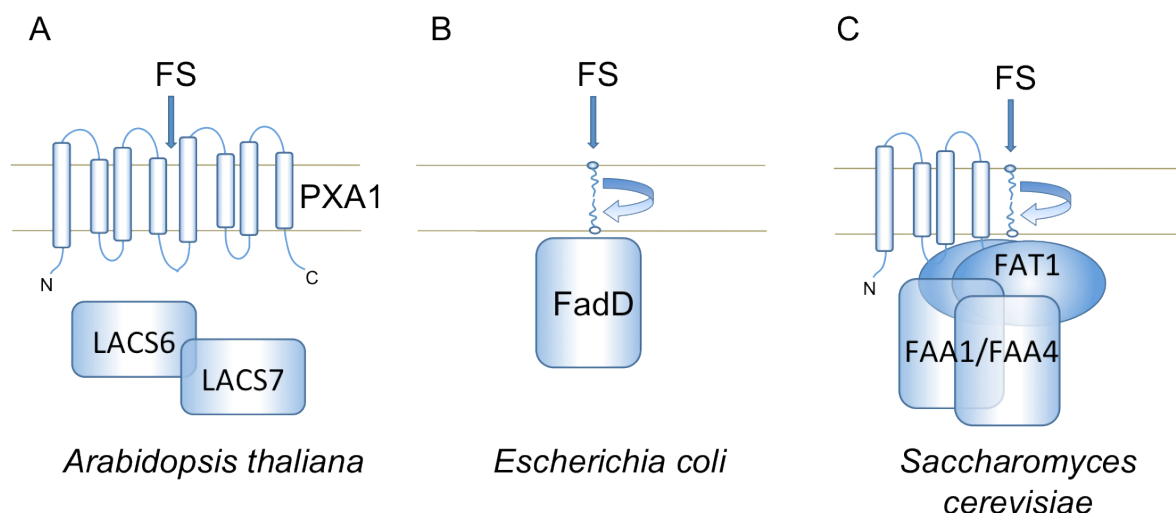
Die weitere metabolische Umsetzung der Fettsäure im Peroxisom ist zudem neben PXA1 auch an die Aktivität der Acyl-CoA Synthetasen LACS6 und LACS7 gebunden. Beide Proteine sind untereinander redundant. Eine Doppelmutante *lacs6/lacs7* zeigt entsprechend einen, bezüglich der Keimlingsetablierung ähnlich ausgeprägten Phänotyp wie *pxa1* (Fulda et al., 2002; Hayashi et al., 2002; Fulda et al., 2004).

So zeigt sich für Peroxisomen von *Arabidopsis thaliana* ein Mechanismus bei dem ein Fettsäuretransporter und zwei Acyl-CoA Synthetasen notwendig für die Aufnahme von Fettsäuren in die Peroxisomen sind.

### 1.5 Fettsäuretransport in einzelligen Organismen

Der Mechanismus des Fettsäuretransports wurde sehr detailliert in den einzelligen Organismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (Black und

DiRusso, 2003). *E. coli* gehört zu den gramnegativen Bakterien, somit wird das Cytosol von einer Außen- und Innenmembran und einer dazwischen liegenden Peptidoglycanschicht umschlossen. Die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Außenmedium wird durch zwei Komponenten vermittelt: Der Transfer der Fettsäure über die äußere Membran wird durch den Fettsäuretransporter FadL vermittelt. FadL bildet aus 20 Membranspannen einen Kanal, spezifisch für langkettige Fettsäuren. *E. coli* Stämme mit einer Deletion im FadL Transporter sind unfähig auf Medium mit langkettigen Fettsäuren als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (Nunn und Simons, 1978). Die Komponente, die den Transfer der Fettsäuren über die innere Zellmembran ermöglicht, ist FadD. FadD stellt die einzige Acyl-CoA-Synthetase in *E. coli* dar und ist spezifisch für Fettsäuren mit variabler Kettenlänge und Saturierung (Kameda und Nunn, 1981). FadD liegt in der Zelle cytosolisch wie auch membrangebunden vor. Die Aktivität des Enzyms wird jedoch durch die Rekrutierung zur Membran stark erhöht (Mangroo und Gerber, 1993). Die Deletion des *FadD* Gens hat ebenfalls eine drastisch verringerte Aufnahme von freien Fettsäuren zur Folge.



**Abbildung 2: Modelle des Fettsäuretransports.** A Der peroxisomale Fettsäure Transporter PXA1 und die Acyl-CoA-Synthetasen LACS6 und LACS7 aus *Arabidopsis thaliana*. B Transportmechanismus über die Plasmamembran durch das Acyl-aktivierenden-Enzym FadD in *Escherichia coli*. C Fettsäuretransportkomplex in *Saccharomyces cerevisiae*. Fat1p stellt das Transportprotein dar, FAA1 und FAA4 sind die assoziierten Acyl-aktivierenden-Enzyme. FS=Fettsäure.

Aus diesem Grund wurde der Acyl-CoA Synthase eine Funktion in der Aufnahme von Fettsäuren zugesprochen (Weimar et al., 2002) (Abbildung 2B). Der Mechanismus, der den Transfer von freien Fettsäuren über Membranen durch Acyl-aktivierende-Enzyme beschreibt, nennt sich vektorielle Acylierung. Die Fettsäuren, die durch FadL in die innere Zellmembran gelangt sind, können in ihrer protonierten Form durch einen sogenannten „Flip-Flop-Mechanismus“ extrem schnell zwischen den beiden Hälften der Lipiddoppelschicht einer Membran hin- und herwechseln ( $t_{1/2} = 23$  ms) (Kamp et al., 1995). Auf der cytosolischen Seite der inneren Membran werden die Fettsäuren durch die ATP-abhängige Reaktion von FadD aus der Membran entfernt und in ihrer wasserlösliche Acyl-CoA Thioester Form in das Innere der Zelle entlassen. Durch diese Aktivierung wird die Fettsäure zugänglich für die weitere Metabolisierung, wie die Umsetzung in der  $\beta$ -Oxidation (Klein et al., 1971) oder die Integration der Fettsäure in Struktur lipide. Dieser Mechanismus der Aktivierung und Metabolisierung der Fettsäure auf der cytosolischen Seite führt zu einem Fettsäuregradienten über die Membran und zum steten Einstrom von Fettsäuren aus dem Außenmedium.

In dem eukaryontischen Organismus *Saccharomyces cerevisiae* wird der Fettsäureimportkomplex aus drei Proteinen gebildet. Hierbei gilt FAT1 mit seinen vier Membranspannen als Transportprotein und FAA1 und FAA4 als assoziierte Acyl-CoA-Synthetasen (Duronio et al., 1992) (Abbildung 2C). Jedoch besitzt FAT1 ebenfalls eine Acyl-aktivierende Domäne, wodurch FAT1 auch als membrangebundene Acyl-CoA Synthetase angesehen werden kann (Obermeyer et al., 2007). Mutanten mit einem Defekt in einem der drei Proteine zeigen kein Wachstum auf Platten mit Oleat ( $C_{18:1}$ ), wenn die Fettsäurebiosynthese durch den Fettsäuresynthase-Inhibitor Cerulenin gehemmt wird. Die Mutanten sind im Gegensatz zum Wildtyp nicht fähig, Oleat aus dem Medium aufzunehmen und zum Aufbau der Lipide zu verwenden (Faergeman et al., 2001).

Ebenfalls zeigen die Hefedeletionsmutanten  $\Delta fat1$ ,  $\Delta faa1$ ,  $\Delta faa4$  eine verringerte Aufnahme des fluoreszierenden Stearinsäurederivats BODIPY D3823 (Faergeman et al., 1997; Faergeman et al., 2001; Zou et al., 2003). Die vorwiegende Meinung ist, dass auch bei *Saccharomyces cerevisiae* die Fettsäureaufnahme durch vektorielle Acylierung geschieht.

## 1.6 Acyl-aktivierende Enzyme in *Arabidopsis thaliana*

Aus den oben dargestellten Untersuchungen ergibt sich, dass Acyl-aktivierende Enzyme für den transmembranen Fettsäuretransport eine entscheidende Rolle spielen. Das *Arabidopsis thaliana* Genom kodiert für 64 Acyl-aktivierende Enzyme (Shockey und Browse, 2011) und beinhaltet damit die größte Genfamilie an Acyl-aktivierenden Enzymen aller bis dato sequenzierten Organismen (Shockey et al., 2003). Die Mitglieder wurden anhand einer konservierten Aminosäuresequenz identifiziert, welche essenziell für die Aktivierung von Carboxylsäuren ist (Babbitt et al., 1992; Conti et al., 1996). Die Reaktion der Acyl-aktivierenden Enzyme teilt sich in zwei Abschnitte: Zuerst vermittelt das Enzym die Aktivierung der Carboxylgruppe mit Adenosin-Monophosphat (AMP), wobei Energie aus der Spaltung des Adenosin-Trophosphat (ATP) bereitgestellt wird. Es bildet sich Acyl-Adenylat. Im zweiten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff durch Elektronen der Thiolgruppe des Acyl-Akzeptors (Co-A oder ACP), wobei eine Thioesterbindung entsteht und AMP und Pyrophosphat frei werden (Bar-Tana et al., 1973). Diese Reaktion ist an sich reversibel, die Rückreaktion wird jedoch durch die schnelle Hydrolyse des Pyrophosphates in der Zelle unwahrscheinlich. Das Substratspektrum der Acyl-aktivierenden-Enzyme in *Arabidopsis thaliana* reicht von Acetat (Huang und Stumpf, 1970), kurzkettigen- und langkettigen Fettsäuren (Shockey et al., 2002) zu Zimtsäure (Lee et al., 1995), Citrat, Malat und Malonate (An et al., 1999). Für die Studie des chloroplastidären Fettsäuretransports sind jene Acyl-aktivierenden-Enzyme interessant, die mittel- und langkettige Fettsäuren aktivieren. Unter diese Kategorie fallen die neun „Long-chain-acyl-CoA Synthetasen“ (LACS) Enzyme (Shockey et al., 2002), aber auch die beiden Acyl-aktivierenden Enzyme AAE15 und AAE16, welche anstatt CoA das Acyl-Carrier Protein als Co-Faktor verwenden (Koo et al., 2005). Einige der LACS Enzyme sind bereits charakterisiert. So zeigt die Doppelmutante *lacs1/lacs4* strukturelle Veränderungen der Wachsschicht des Blütenstandes, mit einer Reduktion an langkettigen Alkanen und Ketonen. Zusätzlich ist die Lipidschicht des Pollens verändert, was zu einer von der Luftfeuchte abhängigen Sterilität führt (Jessen et al., 2011). Die Doppelmutante *lacs1/lacs2* zeigt ebenfalls einen Defekt in der Wachseladung der Kutikula in *Arabidopsis thaliana*. Eine Analyse der kutikulären Wachsschicht zeigte eine deutliche Verminderung an langkettigen Alkanen und Ketonen in Blättern und Blütenstand, was einen übermäßigen Wasserverlust der Pflanze zufolge hat (Jenks et al., 1995; Lü et al., 2009). Wie



bereits in Abschnitt 1.4 beschrieben, sind LACS6 und LACS7 essenziell für die Einspeisung freier Fettsäuren in die  $\beta$ -Oxidation im Peroxisom.

Besonders LACS9 wurde in Verbindung mit dem plastidären Fettsäureexport gebracht. LACS9 wird in Geweben mit hohem Bedarf an Fettsäure Neusynthese, wie beispielsweise sich entwickelnde Schoten und junge Blätter exprimiert. Zusätzlich konnte LACS9 in der Außenmembran des Chloroplasten lokalisiert werden (Schnurr et al., 2002), was auch mit Proteom-Studien übereinstimmt (Froehlich et al., 2003). Durch Studien an der *lacs9*-T-DNA Mutante konnte dargestellt werden, dass 90% der plastidären Acyl-CoA Synthetase Aktivität auf LACS9 zurückzuführen ist. Eine Beeinträchtigung des Wachstums der *lacs9* Mutante im Vergleich zum Wildtyp konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Schnurr et al., 2002). Auf Grund dessen wurde gemutmaßt, dass redundante Enzyme die Aufgabe von LACS9 übernehmen können.

Durch eine Doppelmutation in LACS1 und LACS9 konnte allerdings ein Effekt auf die Neutrallipidmenge im Samen erzielt werden, was darauf hindeutet, dass sowohl LACS9 als auch LACS1 in der Bereitstellung von Speicherlipiden eine bedeutende Rolle spielen (Zhao et al., 2010).

AAE15 und AAE16 sind nach der Proteomestudie von Froehlich *et al.* (2003) ebenfalls an der Chloroplasten Außenmembran lokalisiert, trotz des Fehlens von Transmembranspannen. Ihnen wird die Funktion der Aktivierung von freien Fettsäuren mit dem Acyl-Carrier Protein im Plastiden zugesprochen (Koo et al., 2005). Bei der Inkubation isolierter *Arabidopsis thaliana* Chloroplasten mit radioaktiv markierter Laurinsäure ( $C_{12}$ ), zeigt sich innerhalb von Sekunden eine Aktivierung der Fettsäure mit Acyl-Carrier Protein, worauf eine Elongation und Desaturierung der Fettsäure folgt (Norman und John, 1986). Diese Beobachtung blieb bei Chloroplasten der *aae15/aae16* Doppelmutante aus (Koo et al., 2005). Allerdings zeigt auch diese Doppelmutante keinen erkennbaren Phänotyp.

Einen weiteren Hinweis für die Transportaktivität von LACS-Enzymen offenbart die Überexpression von LACS1, LACS2 und LACS3 aus *Arabidopsis thaliana* in der  $\Delta fat1$  Hefe Mutante. Der Defekt der Fettsäureaufnahme in der  $\Delta fat1$  Mutante konnte durch die Expression der drei LACS-Enzyme kompensiert werden (Pulsifer et al., 2012).

## 1.7 *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modellorganismus

Ob nun ein Fettsäuretransporter wie PXA1 oder Acyl-aktivierende Enzyme am Fettsäure Transfer über die plastidäre Membran in höheren Pflanzen beteiligt sind, ist noch unklar. Die *Arabidopsis thaliana* Genfamilie der Acyl-aktivierenden Enzyme zeigt einen hohen Grad an Redundanz, womöglich konnte deshalb durch Ausschaltung der Genfunktion noch kein Effekt auf den Fettsäuretransport beschrieben werden. Um das Problem der Redundanz in *Arabidopsis thaliana* zu umgehen, wurde in dieser Arbeit das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modell für Chloroplasten höherer Pflanzen verwendet.

Cyanobakterien gehören zu den ältesten Organismen auf der Erde (Schopf und Packer, 1987) und trugen einen bedeutenden Teil zur Erhöhung des Sauerstoffgehaltes der Atmosphäre bei, wodurch Leben der heutigen Form auf der Erde erst möglich wurde (Falkowski, 2006). Die Struktur und Organisation der zwei Photosysteme, sowie genetische und morphologische Aspekte, machen die Cyanobakterien zu wahrscheinlichen Vorläufern der Chloroplasten in eukaryontischen Pflanzen (Wallace, 1982; Pakrasi, 1995).

Über den Mechanismus des Fettsäuretransports in Cyanobakterien ist bis dato noch nichts bekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren aus dem Außenmedium aufgenommen und in die Strukturlipide eingebaut werden können (Williams et al., 1990). Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass mit SLR1609 in *Synechocystis* nur ein einziges Acyl-aktivierendes Enzym existiert, welches Homologie zu den LACS Enzymen aufweist (Kaczmarzyk und Fulda, 2010). Dieses konnte als ein Enzym charakterisiert werden, das Fettsäuren variabler Länge durch Veresterung mit dem Acyl-Carrier Protein aktiviert. Aus der Studie geht hervor, dass dieses Enzym eine Rolle bei der Wiederverwertung intrazellulärer, freigesetzter Fettsäuren spielt. Bei einer Funktionsverlust Mutante in diesem Loci wurden signifikante Mengen an sekretierten langkettigen Fettsäuren im Außenmedium festgestellt, was darauf hindeutet, dass bei einem Defekt des Recyclingprozesses die freien Fettsäuren zum Schutz der Zelle in das Außenmedium exportiert werden (Kaczmarzyk und Fulda, 2010). Viele Erkenntnisse deuten darauf hin, dass es im Modellorganismus *Synechocystis* einen Im- und Export von Fettsäuren gibt. Eine Untersuchung dieser Mechanismen in *Synechocystis* könnte Rückschlüsse über die

Funktionsweise der Transportprozesse in Chloroplasten höherer Pflanzen ermöglichen.

### **1.8 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit**

Der Transfer von freien Fettsäuren über zelluläre Membranen in Pflanzen ist ein weitgehend unbekannter Prozess. Besonders die Mechanismen des plastidären Fettsäure Im- und Export sind bis dato ungeklärt, wenn auch von großer Bedeutung, da der Chloroplast der Ort der Synthese, Verlängerung und Desaturierung von Fettsäuren ist. Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 sollte als Modell für den Chloroplasten dienen, um das Problem der starken Redundanz in *Arabidopsis thaliana* zu umgehen. In *Synechocystis* konnte mit Slr1609 ein Homolog zu der plastidären Acyl-CoA Synthetase LACS9 gefunden werden. Aufgrund der Annahme, dass Acyl-aktivierende Enzyme und besonders LACS9 eine Rolle beim plastidären Fettsäuretransport spielen, sollte in dieser Arbeit der Fokus auf dem Acyl-aktivierenden Enzym Slr1609 liegen. Studien an der Funktionsverlust Mutante sollten Aufschluss über die Funktion in Bezug auf den Fettsäuretransport geben. Anhand dieses Enzyms sollte die Möglichkeit der vektorialen Acylierung als Transportmechanismus untersucht werden. Ein weiterer Augenmerk sollte auf den *Synechocystis* ABC Transporter Sll0182 gerichtet werden, der hohe Homologie zum Fettsäuretransporter PXA1 aus *Arabidopsis thaliana* aufweist und somit ebenfalls im Fettsäuretransport von *Synechocystis* involviert sein könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Cyanobakterien Stamm

Für die Experimente wurde der Glukose tolerante *Synechocystis* sp. PCC (*Pasteur Culture Collection*) 6803 Stamm verwendet. Dieser Stamm wurde auch für die Sequenzierung des *Synechocystis* Genoms genutzt (Kaneko et al., 1996)

#### 2.1.2 *Escherichia coli* Stämme

Zur Amplifikation von Plasmiden und zur Klonierung der beschriebenen Konstrukte wurde folgender *E. coli* Stamm verwendet:

DH5 $\alpha$  : supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80, lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1  
*relA1*

Zur Aufreinigung von beschriebenen Proteinen wurde folgender Stamm verwendet:

BLR(DE3)pLys: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3)  $\Delta$ (srl-recA)306::Tn10 pLysS  
(Cam<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)

#### 2.1.3 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Zur Komplementations- und Knock-out Analyse wurden folgende Stämme verwendet:

BY4741: MATa; his3 $\Delta$  1; leu2 $\Delta$  0; met15 $\Delta$  0; ura3 $\Delta$  0

$\Delta$ fat1: BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YBR041w::kanMX4

$\Delta$ faa1: BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YOR317w::kanMX4

$\Delta$ faa4: BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YMR246w::kanMX4

Die Stämme stammen aus der Euroscarf Kollektion (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>) und wurden freundlicherweise von Dr. Takashi Tasuka, Institut für Genetik der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

Zur Überexpression und Aufreinigung von SynAas wurde der Stamm InvSC1 (*MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*) von Invitrogen verwendet.

## 2.2 Kultivierung der Organismen

### 2.2.1 Anzucht von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Zur Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Flüssigkultur wurde steriles BG11-Medium verwendet. Angezogen wurden die Zellen bei konstantem Schütteln, 30°C und einer Lichtintensität von  $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Das BG11-Medium setzt sich wie folgt zusammen (Rippka et al., 1979):

### 2.2.2 BG11-Medium (pH 8,0)

#### Stammlösung 1

Zitronensäure Monohydrat	3 g/L
Ammonium-Eisen(III)-Citrat/ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$	3 g/L
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0,5 g/L
Aufgefüllt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	

#### Stammlösung 2

$\text{NaNO}_3$	30 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,78 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1,28 g/L
Aufgefüllt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	

#### Stammlösung 3

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	19 g/L
Aufgefüllt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	

#### A<sub>6</sub>-Stammlösung

$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,86 g/L
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2,38 g/L
$\text{ZnSO}_4$	0,22 g/L

CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	0,08 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,021 g/L
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,0494 g/L
Auffüllen mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	

### 2.2.3 Flüssiges BG11-Medium

Stammlösung 1	2 ml (0,002 x)
Stammlösung 2	50 ml (0,05 x)
Stammlösung 3	2 ml (0,002x)
A <sub>6</sub> -Stammlösung	1 ml (0,001x)
1 M TES (KOH pH 8,0)	20 ml (0,02x)
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> <i>ad</i> 1000 ml	

### 2.2.4 Festes Agar BG11-Medium

Zur Herstellung von BG11-Agarplatten wurde zweifach konzentrierte BG11 und Agar Lösung autoklaviert und bei einer Temperatur von 50°C gemischt.

#### Zweifach konzentriertes BG11

Lösung 1	1 ml
Lösung 2	25 ml
Lösung 3	1 ml
A <sub>6</sub> -Lösung	0,5 ml
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,98 g
1 M TES (KOH pH 8,0)	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> <i>ad</i>	250 ml

#### Zweifach konzentrierter Agar

Bactoagar	7,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> <i>ad</i>	250 ml

### 2.2.5 Anzucht von *Escherichia coli* Kulturen

Grundsätzlich wurden die Klonierungsarbeiten mit *E. coli* Bakterien durchgeführt. Der Stamm, der verwendet wurde, war DH5 $\alpha$ . Für die Proteinüberexpression wurde der *E. coli* Stamm BLR(DE)pLys benutzt. Die Kultivierung erfolgte ausschließlich mit festem oder flüssigem LB (Luria Betani)-Medium bei 37°C.

### 2.2.6 LB-Medium Zusammensetzung

Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> <i>ad</i>	1000 ml
Für Platten Bactoagar	1,5 %

### 2.2.7 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Überexpression und zur Aufreinigung von Proteinen wurden die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme BY4741 aus der Euroscarf Kollektion und InvSC1 von Invitrogen verwendet. Angezogen wurden die Stämme in YNB-Medium, versetzt mit Aminosäurelösung und 2 % Glukose. Zur Selektion von transformierten Hefen wurde YNB-Medium ohne Uracil verwendet.

### 2.2.8 YNB-Medium

Yeast Nitrogen Base	6,7 g/L
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> <i>ad</i>	850 ml

pH Wert 5,4 wurde mit NaOH eingestellt und dann mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 1000 ml aufgefüllt

### 2.2.9 10-fach Aminosäurelösung in mg/L

Isoleucin: 300 mg/L, Valin: 1500 mg/L, Adenin: 200 mg/L, Argenin: 200 mg/L, Histidin: 200 mg/L, Leucin: 1000 mg/L, Lysin: 1000 mg/L, Methionin: 200 mg/L, Phenylalanin: 500 mg/L, Threonin: 2000 mg/L, Tryptophan: 200 mg/L, Uracil: 1000 mg/L

Aufgefüllt mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 1000 ml.

### 2.2.10 40 % Glukose Lösung

Glukose      400 g/L

H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

### 2.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen nach der Methode von Chung & Miller (Chung *et al.* 1989) wurden zunächst 5 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C angezogen. Die 100 ml Hauptkultur wurde mit 1 ml aus der Vorkultur angeimpft und bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,4 bei 37°C wachsen gelassen. Die Kultur wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann durch Zentrifugation bei 4°C und 2000 rpm für 10 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden langsam in 15 ml eiskaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 15 % Glycerin) resuspendiert und dann für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und danach in 2 ml TFB2 Puffer (10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 10 mM MOPS, 15% Glycerin) gelöst und in 100 µl Aliquots in Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.4 Transformation von Bakterien und Hefen

#### 2.4.1 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803-Zellen

Von einer *Synechocystis* Wildtyp-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>750</sub> 0,6-1,0) wurden 2 ml mit 1 µg des zu transformierenden Plasmids versetzt. In Dunkelheit wurde die Kultur unter Schütteln für 12 bis 16 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm pelletiert, in 100 µl sterilem BG11-Medium gelöst und auf einer BG11-Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen. Die Platte wurde für 24 Stunden bei 45 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> und 30°C inkubiert und dann mit 500 µl BG11/Antibiotika-Lösung unterschichtet, um eine graduelle Erhöhung der Antibiotika Konzentration in der Platte zu erhalten. Für die Kanamycin-Selektion wurde eine Endkonzentration in der Platte von 50 µg/ml benötigt, für die Spectinomycin-Selektion eine Endkonzentration von 20 µg/ml. Nach 7 Tagen Inkubation bei 45 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> und 30°C konnten die ersten Kolonien isoliert und per Kolonie-PCR verifiziert werden.



### **2.4.2 Hitze-Schock-Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Für die Transformation von Plasmiden wurde zunächst ein 100 µl Aliquot der kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Nach 10 Minuten auf Eis wurde die DNA (Ligation, LR-Reaktion, Plasmide) zu den Bakterien gegeben und weitere 10 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitze-Schock der Bakterien für 90 Sekunden, bei 42°C im Wasserbad, wodurch ermöglicht wird, dass die DNA in die Zelle eintreten kann. Nach 3 Minuten auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugefügt und die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und dann in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden dann auf LB-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

### **2.4.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen**

Für die Vorkultur wurden 5 ml YNB mit Aminosäurelösung mit Uracil und 2 % Glukose mit einer Kolonie des gewünschten Stammes (InvSC1 oder BY4741) angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Die 50 ml Hauptkultur wurde auf eine optische Dichte von OD<sub>600</sub> 0,4 eingestellt und für 2 bis 4 Stunden bei 28°C angezogen. In der nun erreichten exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 2500 rpm für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 40 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) gewaschen und dann in 2 ml 100 mM Lithium Acetat (LiAc) und 0,5-fach TE Puffer resuspendiert. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 100 µl der Hefezellen mit 1 µg Plasmid, 100 µg Herings Sperma DNA, 100 mM LiAc, 40 % PEG-3350 (Polyethylenglycol, M<sub>r</sub> 3350) und einfach konzentriertem TE-Puffer gemischt und für 30 Minuten bei 28°C inkubiert. Nach der Zugabe von 88 µl DMSO wurde der Ansatz gemischt und für 7 Minuten bei 42°C erwärmt. Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und einmal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Die in 100 µl resuspendierten Zellen wurden dann auf Selektionsplatten ohne Uracil ausgestrichen. Nach 2 Tagen bei 28°C waren die ersten Kolonien sichtbar, die mit Kolonie-PCR verifiziert wurden.

## 2.5 Amplifizierung, Aufreinigung und Klonieren von DNA

### 2.5.1 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Stocklösung	Lösungsmittel
Ampicillin	50 µg/ml	50 mg/ml	Wasser
Kanamycin	50 µg/ml	50 mg/ml	Wasser
Spectinomycin	25 µg/ml	25 mg/ml	Wasser
Carbenicillin	50 µg/ml	50 mg/ml	Wasser
Tertracyclin	12.5 µg/ml	12.5 mg/ml	EtOH
Chloramphenicol	75 µg/ml	75 mg/ml	EtOH

### 2.5.2 Plasmide

pENTR-D-Topo (Invitrogen), pGEM-T Easy (Promega), pUC4\_Kan (GenBank: X06404), pUC4\_Spec (GenBank: X06404), pDest17 (Invitrogen), pDest52 (Invitrogen), pDR-GW-eGFP (Loqué et al., 2007).

### 2.5.3 Amplifizierung von DNA-Abschnitten mittels der Polymerase-Kettenreaktion

Die von Kary Mullis (Mullis und Faloona, 1987) entwickelte Methode dient zur exponentiellen Vermehrung von spezifischen DNA Abschnitten, durch thermostabile DNA-Polymerasen. Man bedient sich dabei synthetisch hergestellter Oligonukleotiden, welche spezifisch den gewünschten DNA-Abschnitt flankieren. Durch zyklische Abfolge von Denaturierung der DNA, Hybridisierung und Elongation entstehen Amplifikate des DNA-Abschnittes, welche wiederum als Matrize dienen können.

### 2.5.4 Kolonie PCR

Zur schnellen Isolierung positiver Klone nach der Transformation wurde die Kolonie-PCR angewandt. 25 µl des PCR-Reaktionsansatzes wurden in 50 µl PCR-Eppis vorgelegt. Mit einer Pipettenspitze wurde eine Kolonie von der Platte gepickt und in

eines der 50 µl PCR-Eppis überführt. Zusätzlich zu den normalen PCR-Zyklen wurde hier ein fünfminütiger 95°C-Schritt eingefügt, der einen Aufschluss der Zellen bezwecken soll. Bei Hefezellen wurde die gepickte Kolonie vorher 10 Minuten mit 10 µl 0,2 N HCl inkubiert, um den Aufschluss beim Initialschritt der PCR zu erleichtern.

### 2.5.5 Verwendete Primer

Primername	Primersequenz (5´-3´)
SLR1736F	TATTCATATGGCAACTATCCAAGCTTTTTG
SLR1736R	GGATCCTAATTGAAGAAGATACTAAATAGTTC
Fat1 rev	TCATAATTTAATTGTTTGTGCAT
Fat1 fw	ATGTCTCCCATACAGGTTGTTG
Slr1609_s2 (429)	CTAGATGGCGAAACCATTGAC
Slr1609_as10 (430)	ATGAGAGTTTCCAGTCTGCCC
Sll0182_s1 (426)	ATGACCCAAGCCCAAGCCA
Sll0182_as6 (425)	ATCCTGGGTTATCCTTTGG
ACP_s1	CTGGATCCATGAGCACTATCGAAGAACG
ACP_as11	CGCCTGGTGGCCGTTGATGTAATCAATG
Slr1609cds_fw2	CACCGTGGACAGTGGCCATGGC
Slr1609cds_rev	AAACATTTTCGTCAATTAATGTTG

### 2.5.6 Isolation von *E. coli* Plasmid DNA (Mini-Prep)

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde eine 5 ml Kultur über Nacht angezogen. Hierzu wurde das Quantum Prep Plasmid Miniprep-Kit von Biorad gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die DNA Konzentration wurde am Photometer (NanoDrop von Peqlab) ermittelt.

### 2.5.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. In einem 20 µl Ansatz wurden 0,5 bis 3 Units Enzym pro Mikrogramm DNA eingesetzt. 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10-fach

Inkubationspuffers und das entsprechende Volumen  $H_2O_{\text{dest}}$ . Die Probe wurde dann bei der entsprechenden Temperatur 1 bis 4 Stunden inkubiert. Es folgte eine Auftrennung der Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die T4-DNA-Ligase können komplementäre DNA Überhänge verbunden werden. Unter ATP-Hydrolyse kommt es zu einer Esterbindung der endständigen 3'-OH-Gruppe des Desoxy-Riboserestes und der 5'-Phosphatgruppe, katalysiert durch die T4-DNA-Ligase. Für den Ligationsansatz wurden 50 ng Vektor sowie Insert in dreifachem Überschuss eingesetzt. Zusätzlich enthielt der Ansatz 1 x T4-Ligasepuffer und 1 bis 2 Units T4-DNA-Ligase sowie  $H_2O_{\text{dest}}$ . Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und dann in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert.

### 2.5.9 Topo- und Gateway-Klonierung

Die Topo-Klonierung ist eine schnelle und effiziente Methode um „blunt end“ PCR Produkte in der richtigen Orientierung in einen Plasmid Vektor einzufügen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Gateway kompatible pENTR/D-Topo Vektor von Invitrogen nach den Herstellerangaben verwendet. Das Gateway-Klonierungssystem beruht auf der sequenzspezifischen Rekombination von DNA-Abschnitten des Bakteriophagen  $\lambda$  in das Wirtsgenom von *E. coli*, unter Verwendung spezifischer „*attachment sites*“. Diese Erkennungssequenzen machen es möglich DNA-Abschnitte, die zwischen den „*attachment sites*“ liegen auszutauschen. Beim pENTR/D-Topo-Vektor wird das inserierte PCR Produkt von „*attachment sites*“ flankiert, wodurch ermöglicht wird, das PCR-Produkt in spezifische Destination-Vektoren zu rekombinieren, die ebenfalls über „*attachment sites*“ verfügen. Das Gateway-System wurde gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen) verwendet.

## 2.6 Herstellung von *Synechocystis* Funktionsverlust Mutanten

### 2.6.1 Knock-out des Acyl-aktivierenden Enzyms Slr1609

Die Funktionsverlust Mutante mit einem Defekt im Slr1609 Gen wird im weiteren Verlauf der Arbeit  $\Delta\text{synaas}$  (*Synechocystis* Acyl-ACP Synthetase) genannt. Die Mutante  $\Delta\text{synaas}$  wurde wie folgt hergestellt: 710 Basenpaare der kodierenden Sequenz des Genes SynAas wurden mit den spezifischen Primern slr1609\_s2 (429)

und *slr1609\_as10* (430) durch Kolonie-PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega) ligiert und ergab den Vektor pGEM-T-Easy SynAas. Der Vektor pGEM-T-Easy SynAas wurde dann mit *SmaI* in der Mitte des PCR-Produktes geöffnet. Aus dem Vektor pUC4\_Kan (GenBank: X06404) wurde durch einen Verdau mit *HincII* die Kanamycin-Resistenzkassette herausgeschnitten und in den *SmaI* geöffneten Vektor pGEM-T-Easy SynAas ligiert, was in pGEM-T-Easy-SynAas\_Kan resultierte. Der Vektor pGEM-T-Easy-SynAas\_Kan wurde in dem *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  amplifiziert und in *Synechocystis* Wildtyp Zellen transformiert. Zusätzlich wurde auf gleiche Weise der Vektor pGEM-T-Easy-SynAas\_Spec, mit inserierter Spectinomycin-Kassette, hergestellt.

### 2.6.2 Knock-out der Tocopherol Phytyltransferase *Slr1736*

Die Knock-out Linie  $\Delta$ *slr1736* wurde nach der Klonierungs-Strategie von Savidge et al., (2002) hergestellt (Savidge et al., 2002). Durch die Primer SLR1736F und SLR1736R wurde der gesamte Kodierungsbereich des Gens *Slr1736* amplifiziert und die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* angefügt. Durch den Verdau des Vektors pGEM-T (Promega) mit *NdeI* und *EcoRV* wurden passende Ligationsenden geschaffen um das *NdeI* und *BamHI* geschnittene PCR Produkt zu inserieren. Der Vektor pGEM-T-*Slr1736* wurde mit *MfeI* in der Mitte des *Slr1736* Gens geschnitten. Die Spectinomycin Resistenzkassette wurde durch den *EcoRI* Verdau von pUC4-Spec gewonnen und in den mit *MfeI* geschnittenen pGEM-T-*Slr1736* ligiert. Durch die Transformation des Vektors in den *Synechocystis* Wildtyp und in die  $\Delta$ *synaas* Mutante entstanden die Linien  $\Delta$ *slr1736* und  $\Delta$ *slr1736/\Delta**synaas*.

### 2.6.3 Knock-out des ABC-Transporters *Sll0182*

Um eine *Synechocystis* Mutante mit einem Funktionsverlust des Genes *Sll0182* zu erreichen wurde zunächst mit dem Primerpaar *sll0182\_s1* und *sll0182\_as6* ein 683 Basenpaar großes Fragment aus dem *Synechocystis* Genom per Kolonie PCR amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde in den mit *EcoRV* aufgetrennten Vektor pGEM-T Easy (Promega) ligiert. Das inserierte PCR Produkt wurde in der Mitte mit *MscI* geschnitten und die aus pUC-4 gewonnene Kanamycinresistenz inseriert. Der so generierte Vektor pGEM-T-Easy-Sll0182\_Kan wurde in den *Synechocystis* Wildtyp oder in die  $\Delta$ *synaas\_Spec* Zellen transformiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird diese Mutante  $\Delta$ *synabc* (*Synechocystis* ABC-Transporter) genannt.

## **2.7 Herstellung der Komplementationslinien in *Saccharomyces cerevisiae***

Um den Phänotyp der Hefemutanten BY4741  $\Delta fat1$ ,  $\Delta faa1$  und  $\Delta faa4$  mit der Expression des *Synechocystis SynAas* Gens zu komplementieren, wurde zunächst der kodierende Bereich des *SynAas* Genes mit dem Primerpaar Slr1609cds fw2 und Slr1609cds rev mittels Kolonie-PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde durch eine Topoklonierung in den Gateway kompatiblen Vektor pENTR-D-Topo (Invitrogen) gebracht. Durch eine Gateway LR-Reaktion wurde die *SynAas* Kodierungssequenz vom Vektor pENTR-D-Topo-*SynAas* in den Destination Vektor pDR-GW-eGFP (Loqué et al., 2007) übertragen, der eine konstitutive Expression gewährleistet. Bei der Expression des Proteins wird ein Fusionsprotein mit *SynAas* und eGFP gebildet. Der Plasmid pDR-GW-eGFP-*SynAas* wurde dann in die Hefestämme BY4741  $\Delta fat1$ ,  $\Delta faa1$  und  $\Delta faa4$  transformiert.

## **2.8 Herstellung von Vektoren zur Überexpression des *SynAas* Gens aus *Synechocystis* und des Acyl-Carrier Protein aus *E. coli***

Durch eine Gateway-LR-Reaktion von pENTR-D-Topo-*SynAas* und dem Expressionsvektor pYes-Dest52, wurde der Vektor pYes-Dest52-*SynAas* gebildet. Dieser Vektor wurde in den Hefestamm InvSC1 transformiert, welcher für die Überexpression und Aufreinigung des *SynAas* Proteins benutzt wurde. Zur Überexpression des Acyl-Carrier Proteins aus *E. coli* wurde zunächst der kodierende Bereich des ACP Genes durch das Primerpaar ACP\_s1 und ACP\_as11 amplifiziert. Als Matrize wurde genomische *E. coli* DNA verwendet. Das PCR Produkt wurde durch eine Topoklonierung in den Gateway kompatiblen Vektor pENTR-D-Topo (Invitrogen) gebracht. Durch eine Gateway-LR-Reaktion wurde die Kodierungssequenz des ACP Genes in den Destinations Vektor pDest17 (Invitrogen) rekombiniert. Dieser Vektor wurde in den *E. coli* Stamm BLR(DE3)pLys transformiert, welcher für die Überexpression und die Aufreinigung des Acyl-Carrier Proteins verwendet wurde.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Zellextrakten wurde in dieser Arbeit nach der Methode von Marion Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Hierbei wurde zunächst das Bradfordreagenz Roti-Quant von Roth 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt. Von dem Reagenz

wurden 990 µl des Reagenzes zu 10 µl des Proteinextraktes gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Höhe der Absorption der Proben wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt, wobei Bradfordreagenz ohne Protein als Null-Referenz diente. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mittels einer BSA-Eichgeraden berechnet.

## 2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden in Anlehnung an die Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) Proteine aufgrund ihrer Größe, sowie Ladung aufgetrennt. Die Proben wurden zuerst in einem Sammelgel fokussiert und nachfolgend in einem Trenngel aufgetrennt. Die Fokussierung im Sammelgel wurde bei 10 mA erreicht, danach wurde die Auftrennung bei 20 mA durchgeführt. Als Molekulargrößen Marker wurde der Prestained Molecular Weight Marker von MBI Fermentas (# 26616) verwendet.

### 4 x Sammelgelpuffer

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)

### 4 x Trenngelpuffer

Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

### 12,5% Acrylamid Trenngel

4 x Trenngelpuffer	25 % (v/v)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1)	42 % (v/v)
APS	0,05 % (w/v)
TEMED	0,05 % (w/v)

### Acrylamid Sammelgel

4 x Trenngelpuffer	25 % (v/v)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1)	15 % (v/v)
APS	0,06 % (w/v)
TEMED	0,3 % (w/v)

### **10 x Laufpuffer**

Tris HCl, pH 7,5	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	0,92 M
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	

## **2.10 Anfärben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie**

### **Brilliant Blue**

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue bindet basische Aminosäurereste und führt so zu einer Anfärbung von Proteinen. Er wird benutzt um Proteine im Acrylamidgel sichtbar zu machen. Das Acrylamidgel wird für mehrere Stunden in der Färbelösung bei Raumtemperatur geschwenkt und dann zur Entfärbung in die Entfärbelösung gegeben.

### **Coomassie Färbelösung**

Coomassie Blue R250 (Serva)	0,25 %
Methanol (J.T. Baker)	40 %
Essigsäure (AppliChem)	10 %

### **Entfärberlösung**

Methanol (J.T. Baker)	40 %
Essigsäure (AppliChem)	10 %

## **2.11 Immuno-Blotting**

Der Immuno-Blot ermöglicht die Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper nach vorheriger Übertragung auf eine Trägermembran, die anschließend für die Immunodetektion durch spezifische Antikörper benutzt werden kann. Als Trägermembran wurde die Immun-Blot PVDF Membran von BioRad verwendet. Anoden und Kathodenpuffer (Roti-Blot, Roth) wurde nach Vorschrift des Herstellers aus der Stock Lösung angefertigt. Der Blot wurde wie folgt in einer Transferkammer (Carboglass, Schleicher & Schuell) aufgebaut: Die zwei in Anodenpuffer getränkten Filterpapiere wurden auf der Anodenseite platziert, gefolgt von der mit Methanol aktivierten Transfermembran. Das Acrylamidgel wurde nun ohne Luftblasen auf die Transfermembran gelegt. Nach Auflegen der in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere wurde eine Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> für zwei Stunden angelegt,



wodurch eine Wanderung der Proteine auf die Transfermembran gewährleistet wurde.

## 2.12 Immunodetektion von Proteinen

Mittels spezifischer Antikörper können bei dieser Methode speziell markierte Proteine in der Probe detektiert werden. Dazu wurde nach der Elektrophorese und dem Übertragung und Immobilisierung aller Proteine auf der Transfermembran diese zweimal in TBS gewaschen und eine Stunde mit Blockingpuffer inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit TBS und eine mehrstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper. In dieser Arbeit wurden die Antikörper Penta-His-Antibody von Quiagen (1:2000 in Blockingpuffer) und Anti-GFP-HRP von Miltenyi (1: 5000 in Blockingpuffer) verwendet. Nach zwei Waschschriften mit TBS-T und einem Waschschrift mit TBS wurde der zweite Antikörper auf die Transfermembran gegeben und für mehrere Stunden inkubiert. In dieser Arbeit wurde als zweiter Antikörper der Goat-Anti-Mouse IgG-HRP-Antikörper (1:5000 in Blockingpuffer) von Dianova verwendet. Es folgten vier Waschschriften mit TBS-T. Die Anti-GFP-HRP und Goat-Anti-Mouse Antikörper sind zu Detektionszwecken an die „horse raddish peroxidase“ gekoppelt, welche bei Zugabe des Substrats und  $H_2O_2$  Chemilumineszenz emittiert. Es wurde das Pico Kit von Thermo Fisher nach den Herstellerangaben verwendet. Die Chemolumineszenz wurde mittels tiefgekühlter CCD-Kamera im LAS-4000 von Fuji detektiert.

### TBS

Tris/HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	1,5 M

### TBS-T

3 x TBS	
Tween 20	0,05 % (v/v)
Triton X-100	0,2 % (v/v)

### Blockingpuffer

Milchpulver	3 %
1 x TBS	

## 2.13 Expression rekombinanter Fusionsproteine

Heterologe Expression von Proteinen mittels der Vektoren pYes-Dest52-SynAas und pDest17-ACP führt zu Fusionsproteinen mit einem C-terminalen Polyhistidin Rest, durch den es möglich wird diese Fusionsproteine mittels der Ni-NTA Affinitätschromatographie aufzureinigen. Zur Expression von SynAas aus *Synechocystis* wurde der pYes-Dest52-SynAas in den Hefestamm InvSC1 transformiert. Die Proteinexpression wird induziert durch Substitution von Glukose durch Galaktose im Medium. Um ausreichend Protein aufzureinigen wurde ein Liter YNB (ohne Uracil, 2 % Galaktose), mit Zellen aus einer Vorkultur, eingestellt auf eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 und bei 29°C, für 24 Stunden geschüttelt. Die Zellen wurden geerntet und bei -20°C aufbewahrt. Zur Expression vom Acyl-Carrier Protein aus *E. coli* wurde zunächst der Vektor pDest17-ACP in den *E. coli* Stamm BLR(DE3)pLys transformiert. Hier wurde ebenfalls Liter einer Kultur bis zu einer optischen Dichte von 0,4 kultiviert. Daraufhin wurde die Expression des Fusionsproteins durch Gabe von 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach vier Stunden Wachstum bei 37°C wurden die Zellen bei 6000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert.

## 2.14 Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Ni-NTA

### Affinitätschromatographie

Das Pellet der induzierten Zellen wurde in 5 ml Extraktionspuffer resuspendiert und auf mehrere Eppendorf Gefäße aufgeteilt. Bei den *E. coli* Zellen enthielt der Extraktionspuffer zusätzlich 0,05 mg/ml Lysozym (Merck). Die folgenden Schritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Zu der Zellsuspension wurden 400 mg Glasperlen (0,3 mm  $\varnothing$ ) gegeben und der Ansatz stark gevortext, um einen Aufschluss der Zellen zu erreichen. Durch Zentrifugation bei 10.000 rpm wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und Dodecylmaltosid (Sigma) in der Endkonzentration von 1,5 % zu dem Zellextrakt gegeben. 1 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose von Macherey & Nagel wurde in einer Säule mit Waschpuffer I equilibriert und der Proteinextrakt über die Säule gegeben. Nach zwei Waschschrritten mit 3 ml Waschpuffer I und 3 ml Waschpuffer II, wurde gebundenes Fusionsproteine mit 900  $\mu$ l Elutionspuffer I von der Säule eluiert. Die ersten 400  $\mu$ l wurden verworfen, die verbliebenen 500  $\mu$ l beinhalten das aufgereinigte Protein. Zur Entsalzung des Puffers wurde das aufgereinigte Protein über eine NAP5-Säule

(Amersham) gegeben und mit 1 ml Elutionspuffer II eluiert. Das aufgereingte Fusionsprotein konnte in 10 % Glycerin (AppliChem) bei -20°C gelagert werden.

**Extraktionspuffer**

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
DTT	1 mM
NaCl	500 mM
PMSF	0,5 mg/ml
DNase	0,05 mg/ml
RNase	0,05 mg/ml

**Waschpuffer I**

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
DTT	1 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	40 mM

**Waschpuffer II**

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
DTT	1 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	80 mM

**Elutionspuffer I**

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
DTT	1 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	300 mM

**Elutionspuffer II**

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
DTT	1 mM

**2.15 Acyl-ACP Synthetase Assay**

Die Acyl-ACP Synthetase Aktivität wurde nach der Methode von Rock und Cronan (Rock und Cronan, 1981) durchgeführt. Hierbei bedient man sich der wasserlöslichen

Eigenschaften von aktivierten Fettsäuren, um sie von wasserunlöslichen freien Fettsäuren zu trennen. Der Assay setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-HCl pH 8,0	25 mM
Dithiothreitol (DTT)	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
LiCl	10 mM
aufgereinigtes Acyl-Carrier Protein	15 µM
[1- <sup>14</sup> C]-α-Linolensäure (spezifische Aktivität 55mCi/mmol; Hartmann Analytic)	30 µM
aufgereinigtes SynAas	1 µg

Die Reaktion wurde initiiert durch die Zugabe der radioaktiven Fettsäure und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf einen Filter transferiert und die Reaktion durch zwei Waschschriffe mit Chloroform : Methanol : Essigsäure im Verhältnis 3 : 6 : 1 gestoppt. Nach dem Trocknen der Filter wurde die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität im Beckmann Szintillationszähler gemessen.

### 2.16 Liposomen Assay

Die Präparation wurde durchgeführt wie bei Takei et al. (1998) beschrieben (Takei et al., 1998). 5 mg Phosphatidylcholin isoliert aus *Glycine max* wurden in Chloroform gelöst und unter kontinuierlichem Stickstoffstrom, zu einem dünnen Film in einem Rundkolben getrocknet. Der Lipidfilm wurde für 1 Stunde mit 300 µl 0,3 M Saccharose Lösung bei 37°C rehydriert. Die gebildeten Liposomen wurden in 700 µl 25 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen und durch einen Lipid-Extruder (Avanti Polar Lipids) auf eine einheitliche Größe von 200 nm gebracht. Durch Zentrifugation in der Beckmann Ultrazentrifuge bei 16.000 g für 30 Minuten wurden die Liposomen pelletiert und der Überstand verworfen. Um eine Beladung der Liposomen mit freien Fettsäuren zu erreichen, wurden die Liposomen mit 2 µM [1-<sup>14</sup>C]-α-Linolensäure in 500 µl Tris-HCl pH 8,0 für 10 Minuten bei 30°C inkubiert, gefolgt von drei Zentrifugationsschritten bei 16.000 g für 30 Minuten und drei Waschschriffen mit Tris-HCl pH 8,0. Die [1-<sup>14</sup>C]-α-Linolensäure beladenen Liposomen wurden dann mit 400

$\mu\text{l}$  des Acyl-ACP Synthetase Assays für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Liposomen und der Überstand wurden durch erneute Zentrifugation bei 16.000 g für 30 Minuten getrennt, die Radioaktivität wurde separat im Beckmann Szintillationszähler gemessen.

### **2.17 Lipid Extraktion aus *Synechocystis* Zellen**

Die Lipidextraktion aus *Synechocystis* Zellen wurde nach der Methode von Bligh & Dyer (Bligh und Dyer, 1959) durchgeführt. Pelletierte *Synechocystis* Zellen wurden mit 200  $\mu\text{l}$  Methanol : Chloroform im Verhältnis 2 : 1 und 100  $\mu\text{l}$  1 M KCl, 0.2 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  versetzt und stark durchmischt. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm entstanden zwei Phasen, die untere Phase enthielt die Lipide.

### **2.18 Dünnschichtchromatographie**

Verschiedene Lipidspezies lassen sich durch die Dünnschichtchromatographie auf Grund ihrer Polarität auftrennen. 30  $\mu\text{l}$  der Lipidextrakte wurden auf eine Silica Platte (Merck) mithilfe eines Linomaten (Camag) aufgetragen. Galaktolipide wurden mit dem Laufmittel Aceton : Toulol :  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  im Verhältnis 91:30:8 aufgetrennt. Nach dem Trocknen wurde die Silica Platte mit 10%  $\text{CuSO}_4$ / 0,8 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lösung behandelt und auf 180 °C erhitzt. Bei vorheriger Inkubation der *Synechocystis* Zellen mit 33  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Linolensäure wurden die markierten Lipide auf der Silica Platte durch einen Image Analyser (FLA-3000, Fujifilm) sichtbar gemacht.

### **2.19 Fettsäure-Methylester-Extraktion und GC-Analyse der Fettsäure Komposition in *Synechocystis* Zellen**

Zur Analyse der Fettsäurekomposition von veresterten und freien Fettsäuren in der *Synechocystis* Zelle wurde nach der Methode von Elert und Stampfl gearbeitet (Elert und Stampfl, 2000). Für die Fettsäureextraktion wurden ausschließlich Glasutensilien benutzt. 15 ml einer *Synechocystis* Flüssigkultur der optischen Dichte ( $\text{OD}_{750}$ ) 0,25 wurden auf einen Filter gezogen und über Nacht bei 4°C in 5 ml Extraktionsmittel (Dichlormethan : Methanol im Verhältnis 2 : 1) aufbewahrt. Es folgte die Zugabe von je 20  $\mu\text{g}$  des internen Standards Heptadecansäure ( $\text{C}_{17:0}$ ) und Tricosanoinsäure ( $\text{C}_{23:0}$ ). Durch mischen und 1 Minute im Ultraschallbad wurde eine vollständige Extraktion der Lipide und Fettsäuren erreicht. Bei 40°C und unter Stickstoffstrom wurde das Extraktionsmittel verdampft. Der Lipidrückstand wurde dann mit 5 ml

methanolischem HCl für 20 Minuten auf 70°C erhitzt, was zur Umesterung der Lipide zu Fettsäure-Methylestern führte. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml Isohexan hinzugegeben und stark gevortext, was den Übergang der Fettsäure-Methylester in die Isohexanphase bewirkte. Die Isohexanphase wurde abgenommen und die Prozedur noch zweimal wiederholt. Das Isohexan wurde dann bei 40°C im Stickstoffstrom abgeblasen und der Rückstand wiederum in 100 µl Isohexan gelöst. 1 µl der Lösung wurde dann in den Gaschromatographen (Agilent 6890N GC) injiziert und die aufgetrennten Fettsäuren mittels Flammen Ionisations Detektor registriert. Helium diente als Trägergas und es wurde eine GC-Säule von Agilent (J&W DB-225, 30 m, ID 0.25 mm, Film Dicke 0.25 µm) verwendet. Die Identifizierung und Quantifizierung der Fettsäuren wurde durch den Vergleich mit den internen Standards ermöglicht. Es wurde ein „Fatty-Acid-Methyl-Ester“ (FAME) Standard verwendet.

### **2.20 Fettsäure-Methylester-Extraktion und GC-Analyse sekretierter Fettsäuren aus dem Außenmedium**

Bei der Bestimmung der Fettsäuremengen im Außenmedium, wurden 20 ml Zellen in der stationären Phase bei einer optischen Dichte von  $OD_{750}$  3,0 bei 10.000rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand wurde durch wiederholtes Zentrifugieren von allen Zellen bereinigt. Die Fettsäuren wurden in 5 ml Extraktionsmedium (Dichlormethan : Methanol im Verhältnis 2 : 1) aus dem Überstand gelöst. Das Extraktionsmedium wurde abgenommen und unter Stickstoff bei 40°C abgedampft. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt um alle Fettsäuren aus dem Medium zu lösen. Zur Methylierung und Messung der Methylester wird wie in Abschnitt 2.20 verfahren.

### **2.21 Zellextrakt-Fraktionierung und Aktivitätsassay**

Die Auftrennung von *Synechocystis* Zellextrakten in cytosolische Fraktion und Membranfraktion diente der Analyse der Lokalisation des Enzyms SynAas. 50 ml einer Kultur der optischen Dichte ( $OD_{750}$ ) 0,5 wurden bei 10.000 rpm abzentrifugiert und in 250 µl Tris HCl, pH 8,0 mit 500 µM PMSF gelöst. Durch Zugabe von 400 mg Glasperlen (0,3 mm Ø) und starkes Durchmischen wurden die Zellen aufgebrochen. Der Ansatz wurde aufgefüllt mit 750 µl Tris HCl, pH 8,0 mit 500 µM PMSF und für 4 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues

Eppendorfgefäß überführt und für 20 Minuten bei 42.000 rpm bei 4°C in der Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die cytosolische Fraktion wurde abgenommen und die Membranfraktion gewaschen und in 290 µl Tris HCl, pH 8,0 mit 500 µM PMSF gelöst. Die Fraktionen wurden dann mit 5 mM ATP, 8 mM MgCl<sub>2</sub> und 33 µM α-Linolensäure Endkonzentration (1/10, d.h. 3,3 µM davon waren [1-<sup>14</sup>C]-α-Linolensäure (Hartmann Analytic)) für 30 Minuten inkubiert. Die Lipide wurden nach der Bligh & Dyer Methode gefällt und auf eine Silica Platte (Merck) aufgetragen. Als Laufmittel wurde Aceton:Toulool:H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> im Verhältnis 91:30:8 verwendet. Die radioaktiv markierten Lipide auf der Silica Platte wurden durch einen Image Analyser (FLA-3000, Fujifilm) sichtbar gemacht.

## 2.22 Transmissions Elektronenmikroskopie (TEM)

10 ml *Synechocystis* Flüssigkultur der optischen Dichte (OD<sub>750</sub>) 0,25 wurden bei 300 g für 10 bis 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 333 µl dreifach konzentriertem BG-11 Puffer aufgenommen. Zur Fixierung wurden 300 µl 2 %iges Osmiumtetroxid und 33 µl 25 %iges Glutaraldehyd zu den Zellen gegeben. Durch mehrmaliges invertieren wurde die Probe gemischt und dann für 30 bis 35 Minuten auf Eis inkubiert. Um eine Auswaschung der Fixantien zu gewährleisten wurden die Zellen einmal mit dem dreifach konzentrierten BG-11 Medium gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in BEEM-Capsules (SPI-Supplies) überführt und 150 µl 45 %iger BSA-Lösung hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 260 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Pellet mit 200 µl 1,25 %igem Glutaraldehyd überschichtet und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde der Überstand entfernt und das Pellet aus dem BEEM-Capsule gelöst. In einem 2 ml Eppendorfgefäß wurde das Pellet in mehreren Schritten dehydriert. Hierbei wurde in jeweils 15 Minuten Schritten bei -20°C die Konzentration von EtOH von 30 % auf 100 % erhöht. Es folgte eine Inkubation von 15 Minuten bei -20°C in EtOH/Propylenoxid (1:1), dann 30 Minuten in Propylenoxid. Über Nacht wurde die Probe bei 4°C in Epon/Propylenoxid (1:1) gehalten. Nach dem Abdampfen für 24 Stunden wurde die Probe für weitere 24 Stunden bei 4°C in Epon inkubiert. Anschließend folgte die Überführung in Flachbettformen und das Erhitzen der Proben für 48 Stunden bei 60°C. Die Ultradünnschnitte der Proben erfolgte am Ultramicrotom UC7 von Leica. Die Schnitte wurden mit Bleinitrat und Natriumcitrat

(1:1) kontrastiert und die Visualisierung am Transmissions Elektronenmikroskop CM 10 von Phillips durchgeführt.

### **2.23 Pulse Amplitude Modulation (PAM) Messungen**

Um eine Schädigung des Photosystems der *Synechocystis* Zelle quantitativ erfassen zu können, wurde mittels der Water PAM (Walz) die Elektronentransportrate (ETR) des Photosystems II ermittelt. Hierbei wurden Flüssigkulturen der optischen Dichte 0,25 (OD<sub>750</sub>) 1:10 verdünnt und eine Lichtkurve mit der Water PAM aufgenommen. Die Elektronentransportrate erhöht sich linear mit der Intensität der photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) bis ein Maximum erreicht ist, was eine Auslastung des Photosystems darstellt. Bei Schädigung des Photosystems II kommt es zur Abflachung der Kurve. In dieser Arbeit wurde die Elektronentransportrate bei PAR 200 Photon-Flux-Dichte/  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  dargestellt. Die Elektronentransportrate errechnet sich wie folgt:  $\text{ETR} = \text{Yield} \times \text{PAR} \times 0.5 \times 0.84$ . Es wurden die Standard Einstellungen des Herstellers verwendet.

### **2.24 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Lokalisierung GFP markierter Proteine zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Verwendet wurde das Nikon Eclipse E800 und die Filter GFP (R)-BP (EX 460-550, DM 505 and BA 610-560) und RFP (EX 535-550, DM 570 and EM 610-675).

### **2.25 Kurzzeit Aufnahmestudien von [1-<sup>14</sup>C]- $\alpha$ -Linolensäure**

Eine *Synechocystis* Flüssigkultur wurde eingestellt auf eine optische Dichte (OD<sub>750</sub>) von 3,0 und inkubiert mit 33  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure Endkonzentration in einer 1:10 Verdünnung mit 3,3  $\mu\text{M}$  [1-<sup>14</sup>C]- $\alpha$ -Linolensäure (Hartmann Analytic) bei 30°C und 45  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Alle 10 Minuten wurden 60  $\mu\text{l}$  des Ansatzes abgenommen und auf einen Membranfilter (Millipore 45  $\mu\text{m}$ ) gegeben. Der Filter wurde mit 10 ml eiskaltem BG11-Medium mit 33  $\mu\text{M}$  unmarkierter  $\alpha$ -Linolensäure gewaschen. Die zurückgebliebene Radioaktivität wurde im Beckman Szintillationszähler gemessen.

### **2.26 Kurzzeit Aufnahmestudien von BODIPY D3823**

BODIPY D3823 (4,4-Difluoro-5-Methyl-4-Bora-3,4-Diazo-s-Indacene-3-Dodecanoin Säure) ist ein Analog der Stearinsäure mit einem Fluorophor am Ende der

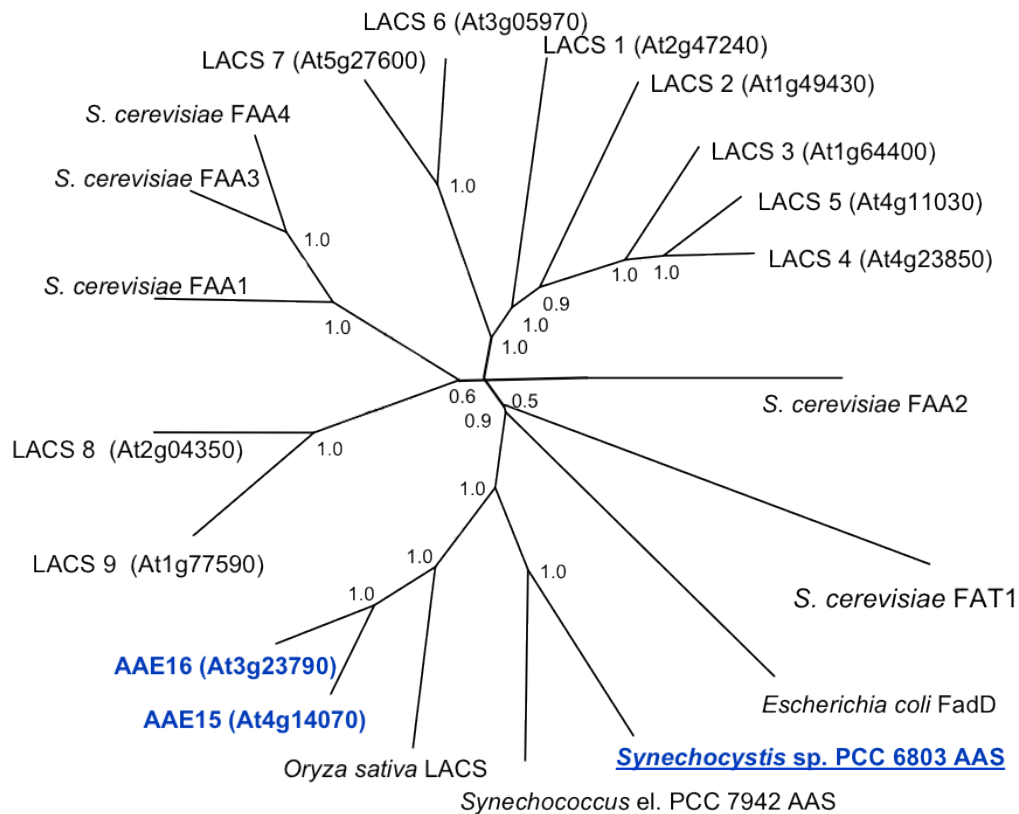


Fettsäurekette. Die Aufnahmestudien wurden wie folgt durchgeführt: Zellen wurden eingestellt auf eine optische Dichte ( $OD_{600}$  für Hefen und  $OD_{750}$  für *Synechocystis*) von 3,0 und mit 50  $\mu\text{M}$  BODIPY D3823 bei 30°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Für die Hefen wurde das Verhältnis der Gesamtzellzahl im Hellfeld zu den fluoreszierenden Zellen im RFP-Filter (EX 535-550, DM 570 and BA 610-675) berechnet. Bei den *Synechocystis* Zellen wurde das Verhältnis der fluoreszierenden Zellen beim RFP-Filter und von autofluoreszierenden Zellen beim GFP-Filter (EX 460-550, DM 505 and BA 610-560) berechnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Suche nach Acyl-aktivierenden Enzymen in *Synechocystis*

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, sind in den einzelligen Organismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* Acyl-aktivierende Enzyme in den Fettsäuretransport über die äußere Zellmembran involviert. Ebenso galt das Acyl-aktivierende Enzym LACS9 (At1g77590) aus *Arabidopsis thaliana*, auf Grund der Lokalisierung an der äußeren Chloroplastenmembran, als vielversprechender Kandidat freie Fettsäuren aus dem Chloroplasten zu exportieren (Koo et al., 2004). Jedoch konnte bis heute noch kein Zusammenhang von LACS9 und dem Export von *de novo* synthetisierten Fettsäuren nachgewiesen werden. Zwei weitere plastidär lokalisierte Acyl-aktivierende Enzyme wurden bereits charakterisiert: die Acyl-aktivierenden Enzyme 15 und 16 (AAE15 und AAE16). Diese Enzyme sind in die Aktivierung und Elongation von kurzkettigen Fettsäuren im Plastiden involviert (Koo et al., 2005). Mit BLASTp (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) wurde nach Homologen von LACS9, AAE15 und AAE16 im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im weiteren Verlauf *Synechocystis* genannt) gesucht. Cyanobakterien gelten als Vorläufer der Chloroplasten in höheren Pflanzen (Reyes-Prieto et al., 2007) und dienen so hervorragend als Modellorganismus, um Funktionsweisen des Chloroplasten zu studieren. Als einziges Acyl-aktivierendes Enzym in *Synechocystis* wurde Slr1609 identifiziert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird dieses Gen *SynAas* (*Synechocystis* Acy-Acy-Carrier Protein Synthetase) genannt. Abbildung 3 zeigt die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den Acyl-aktivierenden Enzymen von *Synechocystis*, *Synechococcus elongatus*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli*. Deutlich ist die nahe Verwandtschaft von *SynAas* zu den plastidär lokalisierten AAE15 und AAE16 aus *Arabidopsis thaliana* zu erkennen.

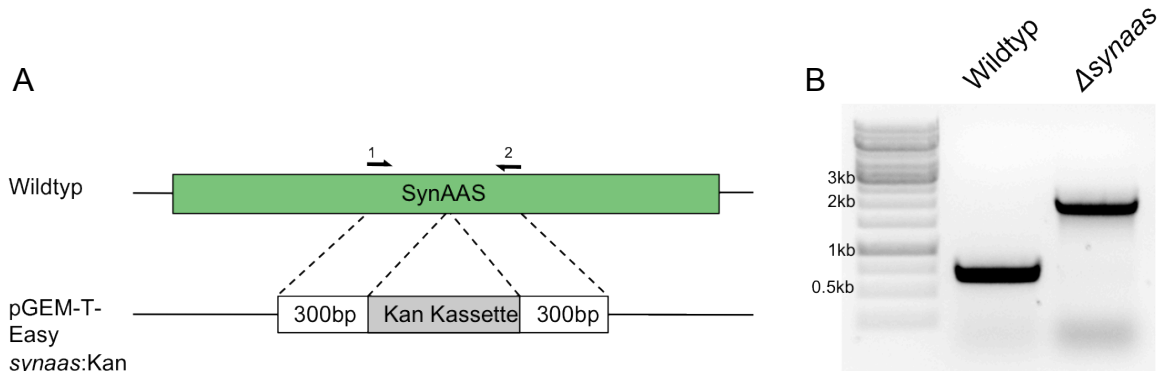


**Abbildung 3: Phylogenetische Verwandtschaft des Enzyms SynAas aus *Synechocystis*.** Phylogenetische Analysen wurden mit ClustalW durchgeführt, der Baum mit TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) dargestellt. Die Bootstrapswerte geben die Wahrscheinlichkeit der korrekten Verästelung an (1.0 = 100%). Die folgenden Proteinsequenzen wurden verarbeitet: *Synechocystis* sp. PCC 6803 AAS (Slr1609), *Synechococcus el. PCC 7942 AAS* (syc0624\_c), *Oryza sativa* LACS (Os03g0845500), *A. thaliana* LACS1 (At2g47240), *A. thaliana* LACS2 (At1g49430), *A. thaliana* LACS 3 (At1g64400), *A. thaliana* LACS4 (At4g23850), *A. thaliana* LACS5 (At4g11030), *A. thaliana* LACS6 (At3g05970), *A. thaliana* LACS7 (At5g27600), *A. thaliana* LACS8 (At2g04350), *A. thaliana* LACS9 (At1g77590), *S.cerevisiae* FAT1 (YBR041W), *S.cerevisiae* FAA1 (YOR317W), *S. cerevisiae* FAA2 (YER015W), *S. cerevisiae* FAA3 (YIL009W), *S. cerevisiae* FAA4 (YMR246W) und *Escherichia coli* FadD (EG11530).

### 3.2 Herstellung und Kontrolle von *Synechocystis* Mutanten

Um die biologische Funktion des *Synechocystis* Gens *SynAas* zu erforschen, wurde zunächst eine Linie mit einem Funktionsverlust im *SynAas* Gen hergestellt. Hierbei bedient man sich der Fähigkeit von *Synechocystis*, aufgenommene DNA mit komplementären Sequenzen über homologe Rekombination ins eigene Genom zu integrieren. In allen Linien wurde das Gen inaktiviert, indem ein Teil des Gens durch eine Antibiotikaresistenz ersetzt wurde (Abbildung 4A). *Synechocystis* enthält 6 bis 8 Genomkopien, daher ist eine komplette Segregation der Zellen notwendig, um eine vollständige Funktionsverlust-Mutante zu erhalten. Die Zellen wurden dafür mehrere Tage unter Antibiotikaeinfluss kultiviert. Zellen, die den Resistenzmarker trugen, konnten leicht durch Kolonie-PCR identifiziert werden. Durch die Insertion kam es bei der PCR mit den genspezifischen Primern zu einem größeren Fragment als im

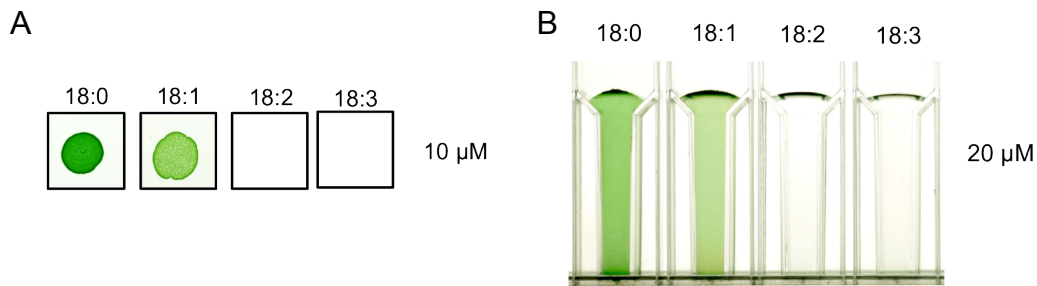
Wildtyp (Abbildung 4B). Es konnte so leicht festgestellt werden, ob alle Genome die Insertion trugen und somit eine komplette Ausschaltung des Gens erfolgreich war.



**Abbildung 4: Herstellung der SynAas „Funktionsverlust-Mutante.** (A) Mit Hilfe des pGEM-T-Easy *SynAas:Kan* Vektors wird über homologe Rekombination eine 1252 Basenpaare große Kanamycinresistenzkassette in das *SynAas* Gen eingefügt. (B) Kolonie PCR vom *Synechocystis* Wildtyp und der ausgesegrierten Mutante  $\Delta$ *synaas*. Durch die Insertion der Resistenzkassette wird das PCR Produkt 1252 Basenpaare größer.

### 3.3 *Synechocystis* Wildtyp Zellen sind sensitiv gegen mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Basierend auf den Erfahrungen aus der *Arabidopsis thaliana* Mutante *pxa1*, dass akkumulierte, freie  $\alpha$ -Linolensäure ( $C_{18:3}$ ) in der Zelle zum Ausbleichen der Pflanze und zum schnellen Verlust der Elektronentransportrate in isolierten Chloroplasten führt (Kunz et al., 2009), sollte der Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die Vitalität von *Synechocystis* Wildtyp Zellen getestet werden. In einem ersten Versuch wurden Wildtyp Zellen auf Festmedium mit  $C_{18}$ -Fettsäuren auf ihre Wachstumsfähigkeit hin getestet. Auf die Platten wurde eine stark verdünnte Flüssigkultur ( $OD_{750}$  0,05) getropft und über sieben Tage bei optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert. Es ist bekannt, dass *Synechocystis* Wildtyp Zellen befähigt sind, Fettsäuren aus dem sie umgebenden Medium aufzunehmen (Sakamoto et al., 1998; Maeda et al., 2005). Davon ausgehend wurde postuliert, dass durch die Aufnahme und Akkumulation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in *Synechocystis* Zellen eine Beeinträchtigung des Wachstums zu beobachten sein würde. Abbildung 5 zeigt, dass eine Konzentration von 10  $\mu$ M mehrfach ungesättigter Fettsäuren wie Linolsäure oder  $\alpha$ -Linolensäure stark wachstumshemmend auf die *Synechocystis* Wildtyp Zellen wirkte.



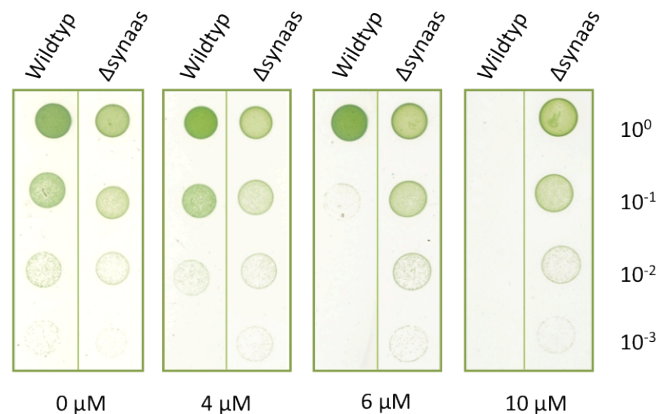
**Abbildung 5: Toxizität ungesättigter Fettsäure.** (A) *Synechocystis* Wildtyp Zellen einer  $OD_{750}$  0,05 wurden auf BG-11 Platten mit  $10 \mu\text{M}$  der angegebenen Fettsäuren getropft und für 7 Tage bei optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert. (B) *Synechocystis* Wildtyp Flüssigkultur wurde bei einer  $OD_{750}$  0,25 mit  $20 \mu\text{M}$  der angegebenen Fettsäuren für 24 Stunden inkubiert

Hierbei scheint die Anzahl an Doppelbindungen entscheidend für die Toxizität der Fettsäure zu sein, da der Effekt mit zunehmender Desaturierung der Fettsäure zunahm (Abbildung 5A und B). Ein weiteres Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob die mehrfach ungesättigten Fettsäuren das Wachstum nur hemmen oder ob es zu einer Abtötung der Zellen kommt. Hierzu wurden grüne Flüssigkulturen einer optischen Dichte von  $OD_{750}$  0,25 mit  $20 \mu\text{M}$  der Fettsäuren für 24 Stunden bei  $30^\circ\text{C}$  und  $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. Wie in Abbildung 5B deutlich zu sehen, kam es bei den Wildtyp Zellen, die mit Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) oder  $\alpha$ -Linolensäure ( $C_{18:3}$ ) behandelt wurden zum gänzlichen Ausbleichen der Kultur. Eine Wiederherstellung des Wachstums von derart behandelten Zellen durch Übertragung auf Festmedium ohne Fettsäuren war nicht möglich, was darauf hindeutet, dass die Behandlung mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren letal auf die Zellen wirkt. Die Zellen die mit Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) oder Ölsäure ( $C_{18:1}$ ) behandelt wurden, zeigten keine Beeinträchtigung des Wachstumsverhaltens, weder auf Festmedium noch in Flüssigkultur. Durch die höhere Zelldichte in der Flüssigkultur war es nötig, mindestens  $20 \mu\text{M}$  der Fettsäuren einzusetzen, um einen Effekt bei den Zellen beobachten zu können.

### 3.4 Die $\Delta$ *synaas* Mutante ist resistent gegen hohe Konzentrationen von $\alpha$ -Linolensäure

Aus den beiden ersten Experimenten lässt sich ableiten, dass eine übermäßige Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  zum Absterben von *Synechocystis* Wildtyp Zellen führt. Im Umkehrschluss würde das bedeuten, dass ein Defekt im Aufnahmemechanismus der Zelle zu einer Resistenz führen könnte. Somit wäre es möglich, mithilfe von mehrfach ungesättigten

Fettsäuren Mutanten zu finden, die einen Defekt in der Aufnahme von Fettsäuren aufweisen. Da ein Zusammenhang zwischen Acyl-aktivierenden Enzymen und der Fettsäureaufnahme in *Saccharomyces cerevisiae* (Faergeman et al., 2001) und *Escherichia coli* (Nunn und Simons, 1978) bereits festgestellt wurde, sollte im folgenden Experiment die *Synechocystis* Mutante  $\Delta$ *synaas* im Vergleich mit Wildtyp Zellen auf Platten mit ansteigenden  $\alpha$ -Linolensäure Konzentrationen getestet werden. Hierbei wurden Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Flüssigkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase auf eine OD<sub>750</sub> von 0,05 eingestellt und auf die Platten ausgebracht (Abbildung 6).

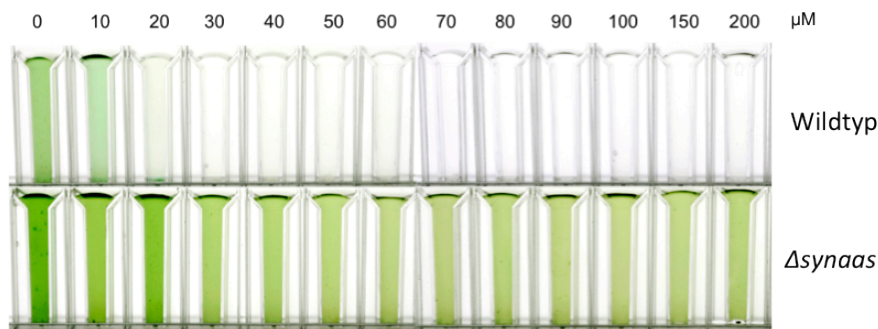


**Abbildung 6 Resistenzphenotyp der  $\Delta$ *synaas* Mutante.** Wachstumstest von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen auf BG11-Platten mit ansteigenden  $\alpha$ -Linolensäure-Konzentrationen. 5  $\mu$ l einer Flüssigkultur der optischen Dichte (OD<sub>750</sub>) 0,05 wurden in einer Verdünnungsreihe auf BG11-Fettsäure Platten getropft und 7 Tage bei optimalen Bedingungen kultiviert.

Nach 7 Tagen Inkubation unter optimalen Wachstumsbedingungen wurde deutlich, dass die Wildtyp Zellen, wie auch im vorherigen Experiment, bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure nicht lebensfähig waren. Überraschenderweise zeigten sich die  $\Delta$ *synaas* Zellen unbeeinträchtigt durch die ansteigenden Fettsäurekonzentrationen. Bereits bei 6  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure im Medium ließ der Wildtyp schon offensichtliche Wachstumsschwierigkeiten erkennen (siehe Verdünnung  $<10^{-1}$ ), wohingegen die Mutante keinen Unterschied zur Kontrolle ohne Fettsäure aufwies (Abbildung 6).

Ein zweites Experiment sollte aufklären, ob bei höheren Konzentration von  $\alpha$ -Linolensäure die Resistenz der  $\Delta$ *synaas* Mutante bestehen bleibt. Hierzu wurden Flüssigkulturen von Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* auf eine OD<sub>750</sub> von 0,25 gebracht und für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert. Wie in

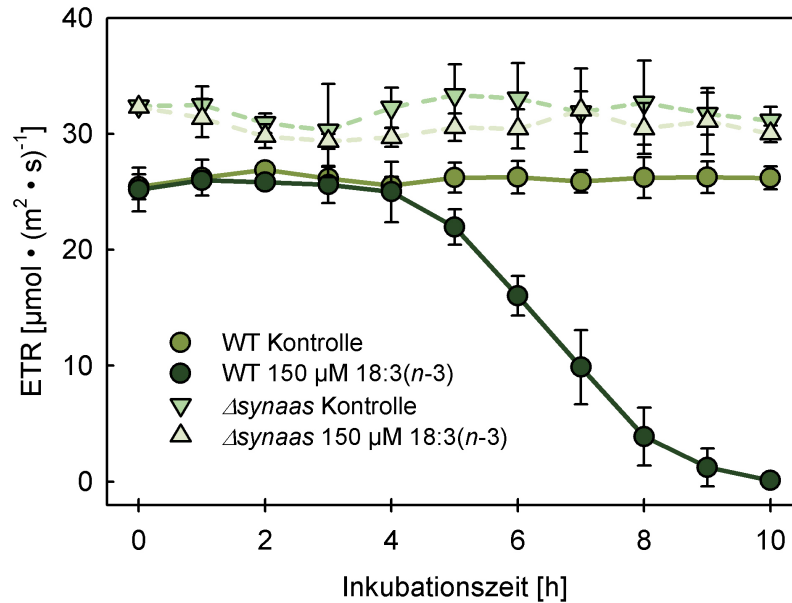
Abbildung 7 ersichtlich, war die  $\Delta synaas$  Mutante unter allen Bedingungen lebensfähig und zeigte selbst gegenüber 200  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure noch Resistenz. Im Gegensatz dazu stirbt der Wildtyp bei einer Konzentration von  $\geq 20$   $\mu\text{M}$  ab. In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich annehmen, dass die Resistenz der  $\Delta synaas$  Mutante gegenüber der toxischen  $\alpha$ -Linolensäure durch einen Defekt in der Aufnahme zustande kommt.



**Abbildung 7: Resistenz Phänotyp der  $\Delta synaas$  Mutante.** Flüssigkulturen von Wildtyp und  $\Delta synaas$  Zellen wurden auf eine optische Dichte ( $OD_{750}$ ) von 0,25 eingestellt und für 24 Stunden mit den aufgeführten  $\alpha$ -Linolensäure Konzentrationen bei Dauerlicht und 30°C inkubiert.

### 3.5 Einfluss von $\alpha$ -Linolensäure auf die Photosyntheserate in Wildtyp und $\Delta synaas$ *Synechocystis* Zellen

Um einen weiteren Einblick in die physiologischen Veränderungen der *Synechocystis* Zellen während der Inkubation mit  $\alpha$ -Linolensäure zu erhalten, wurde der Einfluss der aufgenommenen Fettsäure auf die Photosyntheserate untersucht. Durch Anregung der Chlorophyllmoleküle mit photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) und Detektion der emittierten Fluoreszenz ist es möglich, Veränderungen in der Photosyntheseleistung zu frühen Zeitpunkten zu messen. Erhöht sich die emittierte Fluoreszenz im Vergleich zur Grundfluoreszenz deutet das auf eine Schädigung des photosynthetischen Apparats hin. Aus diesen Parametern lässt sich unter anderem die Elektronentransportrate (ETR) des Photosystems II berechnen. Eine hohe ETR spiegelt eine funktionsfähige und intakte Photosyntheseleistung wider. Für den Versuch wurden Wildtyp und  $\Delta synaas$  Zellen der  $OD_{750}$  0,25 mit 150  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure inkubiert und jede Stunde die ETR des Photosystems II ermittelt. Abbildung 8 zeigt, dass bei den Wildtyp Zellen schon nach 4 Stunden Inkubation mit  $\alpha$ -Linolensäure eine Verringerung der ETR zu beobachten war. Im weiteren Verlauf des Versuchs nahm die Elektronentransportrate dramatisch ab, bis nach 10 Stunden keine photosynthetische Aktivität mehr messbar war.



**Abbildung 8 Effekt der  $\alpha$ -Linolensäure auf die Photosyntheseleistung.** Elektronentransportrate (ETR) von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ synaas zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure; als Kontrolle wurden die Zellen mit EtOH inkubiert.

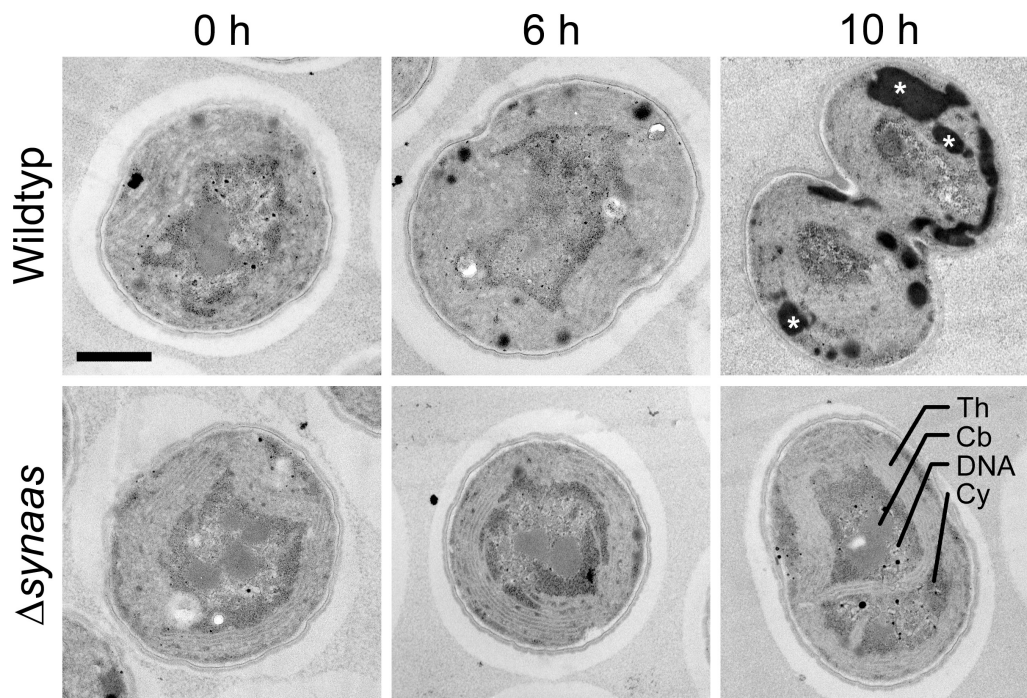
Die Mutante hingegen zeigte keinen Unterschied zu der mit Ethanol behandelten Kontrolle, was darauf schließen lässt, dass die  $\alpha$ -Linolensäure keinen Effekt auf die Photosyntheseleistung der  $\Delta$ synaas Mutante hat. Ebenfalls bemerkenswert ist, dass die Mutante eine grundsätzlich erhöhte ETR aufwies. Der schnelle Effekt der  $\alpha$ -Linolensäure auf die Wildtyp Photosyntheserate erklärt zum Teil das Ausbleichen und Absterben der Zellen nach 24 Stunden.

### 3.6 Einfluss von $\alpha$ -Linolensäure führt zu strukturellen Veränderungen in der *Synechocystis* Wildtyp Zelle

Die gestörte biochemische Funktionalität eines zellulären Prozesses wird häufig begleitet von Veränderungen und Beeinträchtigungen der zugehörigen Zellstrukturen. Dies gilt insbesondere für einen stark auf Kompartimentierung angewiesenen Prozess, wie die Photosynthese. Das legt die Vermutung nahe, dass der negative Effekt von  $\alpha$ -Linolensäure auf das Wachstum und die photosynthetische Leistung des *Synechocystis* Wildtyps Ausdruck von strukturellen Veränderungen in der Zelle ist. Schon aus früheren Publikationen war ersichtlich, dass die Exposition mit  $\alpha$ -Linolensäure Veränderungen in der Ultrastruktur von isolierten Chloroplasten bewirkte (Okamoto et al., 1977). Ob dies auch bei *Synechocystis* Wildtyp Zellen der Fall sein würde und diese strukturellen Veränderungen ebenfalls in der  $\Delta$ synaas



Mutante festzustellen sein würden, sollte im folgenden Versuch untersucht werden. Da *Synechocystis* Zellen einen Durchmesser von 2 bis 3  $\mu\text{m}$  aufweisen ist eine strukturelle Analyse nur im Elektronenmikroskop durchführbar. Hierfür wurden die Zellen bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{750}$ ) von 0,25 kultiviert und mit 150  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure inkubiert. Nach 0, 6 und 10 Stunden Inkubation wurden Proben entnommen und die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert. Die Visualisierung der Ultradünnschnitte erfolgte am Elektronenmikroskop. Vergleicht man Wildtyp und  $\Delta\text{synaas}$  Zellen, so waren diese zum Zeitpunkt Null anhand ihrer Struktur und ihres Aussehens nicht zu unterscheiden (Abbildung 9). Gut zu erkennen waren die eng gepackten Thylakoid Membranen, die zwiebelschalenförmig das Zellinnere umschließen.



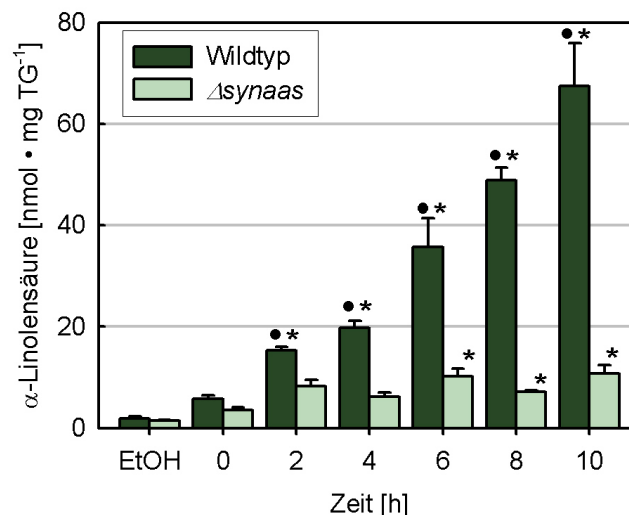
**Abbildung 9: Strukturelle Veränderung der Wildtyp Zellen.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von einzelnen *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta\text{synaas}$  Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Inkubation mit  $\alpha$ -Linolensäure für 0, 6 und 10 Stunden. Wildtyp Zellen akkumulieren elektronendichte Substanzen (weiße \*) und zeigen Auflösung der Thylakoidmembran über die Zeit. Th: Thylakoid Membran, Cb: Carboxysomen, DNA: Nukleosom, Cy: Cytoplasma. Balken = 0,5  $\mu\text{m}$ .

Das Zentrum der Zelle bildeten die der Kohlenstofffixierung dienenden Carboxysomen und die ringförmige DNA (Abbildung 9). Im Verlauf des Versuchs kam es zu einer starken Veränderung der Membranintegrität in den Wildtyp Zellen. Besonders die Thylakoidmembranen zeigten Aufschwemmung und Auflösungserscheinungen nach 10 Stunden Inkubation. Zu beobachten war

ebenfalls, dass sich die Glykokalix, die äußere Schleimhülle, nach 10 Stunden komplett aufgelöst hatte. Zusätzlich akkumulieren elektronendichte Strukturen (\*), die in der Elektronenmikroskopie oft lipophilen Substanzen entsprechen (Neiss, 1983). Das Ausmaß der zellulären Veränderungen im *Synechocystis* Wildtyp gibt eine Erklärung für den Effekt der  $\alpha$ -Linolensäure auf die Photosyntheseleistung. Ohne gut organisierte Membranstruktur in den Thylakoiden ist keine Energieleitung innerhalb der Photosysteme und kein Elektronentransport möglich. Die  $\Delta$ *synaas* Mutante zeigte sich hingegen unberührt von der Behandlung mit  $\alpha$ -Linolensäure. Nach 10 Stunden Inkubation ließ sich kein Unterschied zur Kontrolle erkennen. Folglich war hier auch kein Effekt auf die Elektronentransportrate des Photosystems II zu messen (Abbildung 8). Diese Ergebnisse liefern ein weiteres Indiz für einen Defekt im Aufnahmemechanismus durch die Ausschaltung des Acyl-aktivierenden Enzyms.

### 3.7 Wildtyp Zellen zeigen eine starke Aufnahme von $\alpha$ -Linolensäure

Um festzustellen, ob *Synechocystis* Zellen einer Kinetik folgend Fettsäure aus dem Außenmedium aufnehmen, wurden Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen mit geringen Mengen radioaktiv markierter  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert. Alle 10 Minuten wurden Zellen entnommen, mehrfach gewaschen und die aufgenommene Radioaktivität in den Zellen gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.



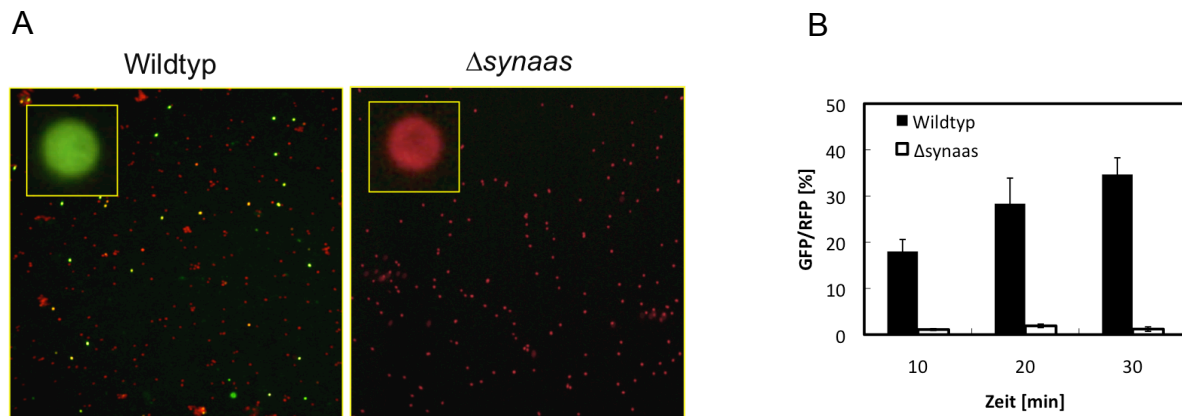
**Abbildung 10: Akkumulation von radioaktiv markierter  $\alpha$ -Linolensäure im *Synechocystis* Wildtyp.** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen wurden inkubiert mit 33  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure (1:10 Verdünnung mit [<sup>14</sup>C] markierter  $\alpha$ -Linolensäure). Kreise geben signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante an. Sterne geben signifikante Unterschiede zwischen dem jeweiligen Zeitpunkt und Zeitpunkt Null an ( $p \leq 0.01$ ).

Schon beim Zeitpunkt 0 war ein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen. Im weiteren Verlauf des Versuchs zeigte sich ein rapider Anstieg der

Radioaktivität in den Wildtyp Zellen. Schon nach 10 Minuten hatte sich die Menge von  $9,87 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{OD}_{750}^{-1}$  auf  $18,53 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{OD}_{750}^{-1}$  nahezu verdoppelt. Nach 60 Minuten zeigte sich eine 4,5-fache Anreicherung der Radioaktivität in den Wildtyp Zellen (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu blieb in der  $\Delta\text{synaas}$  Mutante eine Akkumulation aus. Detektierbar waren basale Mengen an Radioaktivität, die aber keine Steigerung oder Kinetik erkennen ließen (Abbildung 10). Dadurch, dass bei der Mutante keine ansteigende Radioaktivität über die Zeit zu beobachten war, lässt sich ableiten, dass es sich bei der Aufnahme nicht um einfache Diffusion der Fettsäure in die Zelle handelt, sondern eine gerichtete Reaktion stattfindet. Außerdem lässt sich mutmaßen, dass die Fettsäure, sobald sie in die Zelle gelangt, sehr schnell metabolisiert oder abgebaut wird, da bei den Wildtyp Zellen keine Abflachung der Aufnahmerate zu erkennen war. Anderenfalls müsste man ein sich schnell einstellendes Konzentrationsgleichgewicht an freier Fettsäure zwischen dem Außenmedium und dem Inneren der Zelle erwarten und die Akkumulation würde nachlassen.

### 3.8 Akkumulation vom Fettsäurederivat BODIPY D3823 in Wildtyp Zellen

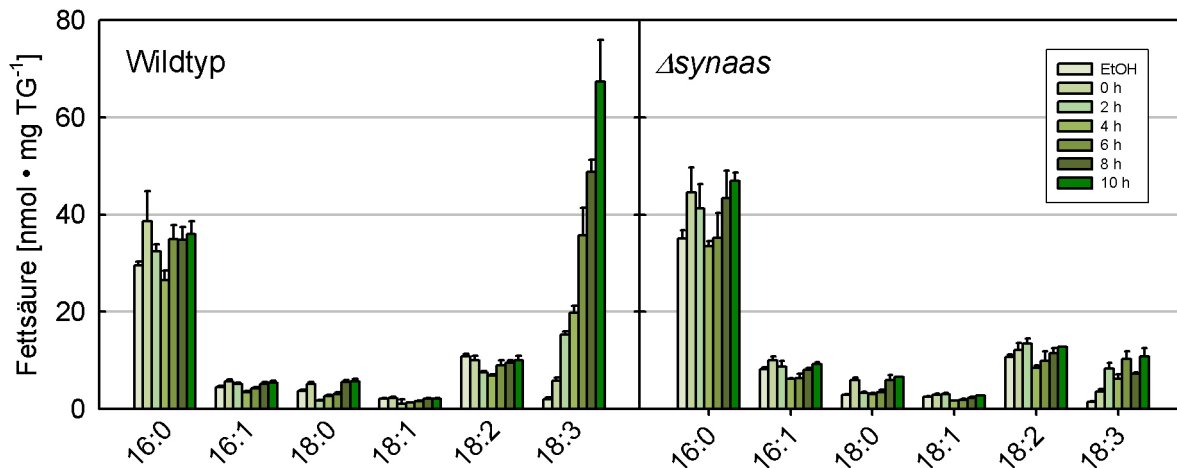
Einen weiteren Hinweis auf einen Defekt im Aufnahmemechanismus der  $\Delta\text{synaas}$  Mutante zeigte die Inkubation der Zellen mit einem fluoreszierenden Analog der Stearinsäure BODIPY D3823 (4, 4-Difluoro-5-Methyl-4-Bora-3,4-Diazo-s-Indacene-3-Dodecanoin Säure). Wildtyp und  $\Delta\text{synaas}$  Zellen wurden mit  $50 \mu\text{M}$  BODIPY D3823 inkubiert und die fluoreszierenden Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert (Abbildung 11A). Zur quantitativen Analyse wurden die Zellen mit ImageJ ausgezählt und das Verhältnis der fluoreszierenden Zellen zur Gesamtzahl der Zellen berechnet (Abbildung 11B). Es konnte ähnlich wie in Abschnitt 3.7 eine starke Anreicherung des Fettsäurederivates über die Zeit in den Wildtyp Zellen beobachtet werden. Die Mutante hingegen zeigte keine Akkumulation von Fluoreszenz. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass auch Fettsäure Derivate wie BODIPY D3823 durch SynAas vermittelt in die Zelle gelangen können.



**Abbildung 11: *Synechocystis* Wildtyp Zellen akkumulieren das Fettsäurederivat BODIPY D3823.** (A) Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops mit GFP Filter und Vergrößerung einer einzelnen Zelle. Wildtyp und  $\Delta$ synaas Zellen wurden für 10 Minuten mit 50  $\mu$ M BODIPY D3823 inkubiert. (B) BODIPY Akkumulation über die Zeit. Wildtyp und  $\Delta$ synaas Zellen wurden bis zu 30 Minuten mit 50  $\mu$ M BODIPY inkubiert, mehrfach gewaschen und die Zellen mittels ImageJ ausgezählt.

### 3.9 Kontinuierliche Aufnahme von $\alpha$ -Linolensäure im Langzeitexperiment

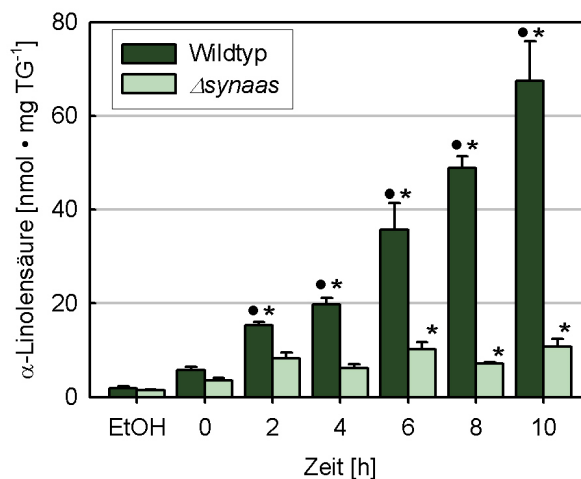
Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Aufnahme von  $\alpha$ -Linolensäure auf die Fettsäurekomposition der Gesamtlipide in *Synechocystis* Zellen hat, sollte im folgenden Versuch mittels Gaschromatographie das Fettsäure Spektrum der Zellen während der Inkubation mit  $\alpha$ -Linolensäure quantitativ ermittelt werden. Hierzu wurden Wildtyp und  $\Delta$ synaas Zellen einer optischen Dichte von  $OD_{750}$  0,25 mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure für 10 Stunden inkubiert. Alle 2 Stunden wurde ein Aliquot geerntet und die Gesamtfettsäuren durch saure Hydrolyse und Umesterung zu den korrespondierenden Fettsäuremethylestern umgewandelt. Da Fettsäuren schwer flüchtig sind, ist die Veresterung mit einem Methylrest notwendig, um einen leichteren Übergang in die Gasphase und damit Zugänglichkeit für die Gaschromatographie zu erreichen. Mittels Standards war es dann möglich, die Fettsäuren in ihrer Art und Quantität zu bestimmen.



**Abbildung 12: Langzeit Inkubation mit  $\alpha$ -Linolensäure.** Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen wurden für 10 Stunden mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit EtOH versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Zellen geerntet, die Gesamtlipide extrahiert und in ihre Methyl ester umgewandelt. Durch Gaschromatographie wurde die Art und Quantität der Fettsäuren bestimmt. Zur Identifizierung der Fettsäurespezies wurde ein FAME-Standard eingesetzt.

Bei Cyanobakterien ist die *sn-1* Position der Struktur lipide Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG) und Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG) hauptsächlich mit C<sub>18:2</sub>, die *sn-2* Position mit C<sub>16:0</sub> Fettsäuren verestert (Wada und Murata, 1990).  $\alpha$ -Linolensäure kommt unter optimalen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen vor, wird allerdings zur Anpassung an niedrige Temperaturen vermehrt gebildet (Wada und Murata, 1990). Die Fettsäureanalyse der unbehandelten Kontrolle zeigte deutlich C<sub>16:0</sub> und C<sub>18:2</sub> als vorwiegende Fettsäuren, alle anderen Fettsäuren lagen in sehr geringem Maße vor (Abbildung 12, EtOH Behandlung). Die Fettsäurezusammensetzung des unbehandelten Wildtyps und der  $\Delta$ *synaas* Mutante zeigte keine Unterschiede, was darauf hindeutet, dass das Acyl-aktivierende Enzym keine bedeutende Rolle im primären Fettsäuremetabolismus zukommt. Im Verlauf der Inkubation erfolgte jedoch eine starke Akkumulation von  $\alpha$ -Linolensäure in den Wildtyp Zellen. Nach 4 Stunden überstieg die Konzentration bereits das 10-fache der Ausgangsmenge. Nach 6 Stunden Inkubation lagen mehr C<sub>18:3</sub> als C<sub>16:0</sub> Fettsäuren in der Zelle vor. Am Ende des Versuchs nach 10 Stunden war die  $\alpha$ -Linolensäurekonzentration um das 35-fache gestiegen. Der Anstieg der Konzentration beschränkte sich allein auf die im Außenmedium angebotene  $\alpha$ -Linolensäure, eine Veränderung in den anderen Fettsäurespezies war nicht zu erkennen (Abbildung 12).

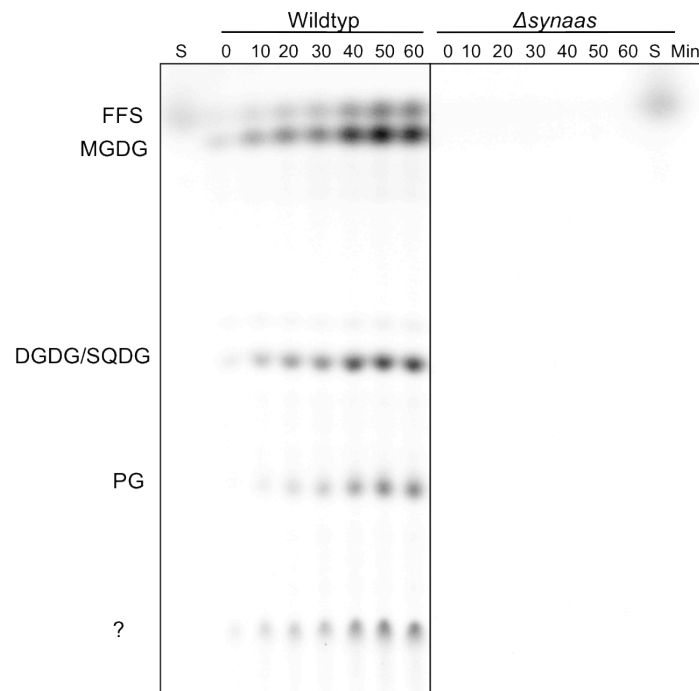
Bei der Aufnahmestudie der Mutante war zu beobachten, dass es nach Zugabe der Fettsäure einen leichten Anstieg der Konzentration von C<sub>18:3</sub> Fettsäuren gab. Hierbei war nicht zu unterscheiden, ob es sich um aufgenommene Fettsäuren handelte oder ob diese am Äußeren der Zelle anhafteten. Jedoch zeigte sich auch bei diesem Experiment, dass es zu keiner grundsätzlichen Konzentrationserhöhung über die Zeit kam. Die Aufnahme der  $\alpha$ -Linolensäure des Wildtyps gegenüber der  $\Delta$ *synaas* Mutante ist in Abbildung 13 nochmals gesondert dargestellt.



**Abbildung 13: Anreicherung der  $\alpha$ -Linolensäure im Wildtyp.** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen wurden mit 150  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten die Gesamtlipide extrahiert und die Methylester durch Gaschromatographie bestimmt und quantifiziert. Als Kontrolle wurde EtOH verwendet. Kreise geben signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante an, Sterne geben signifikante Unterschiede zwischen dem jeweiligen Zeitpunkt und Zeitpunkt Null an ( $p \leq 0.01$ ).

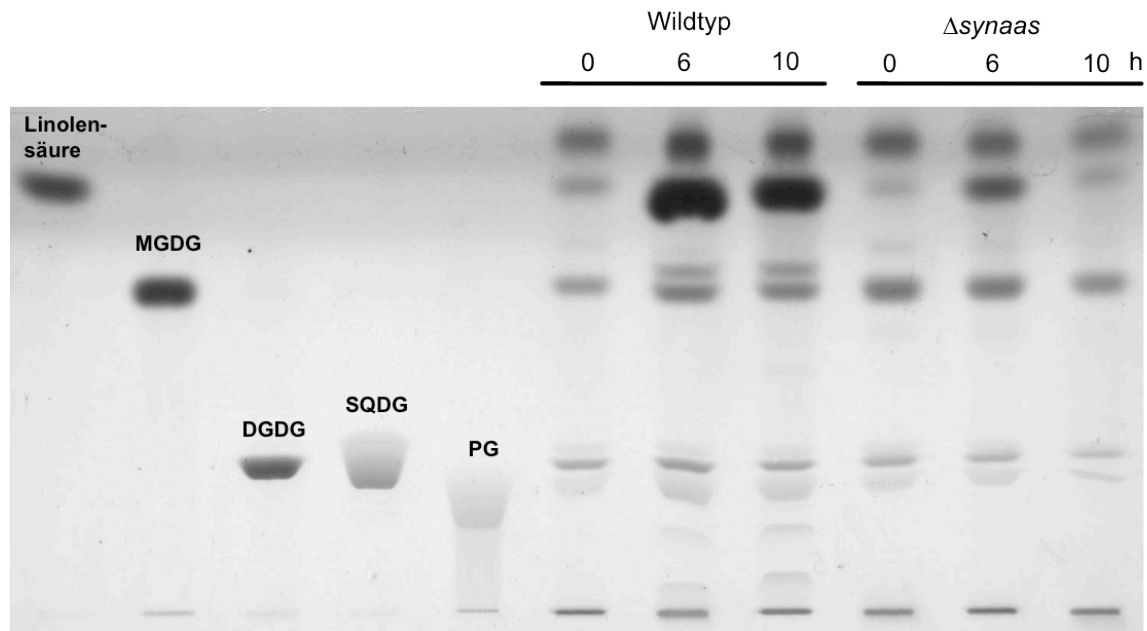
### 3.10 $\alpha$ -Linolensäure akkumuliert in den Zellen und wird in die Lipide eingebaut

In Abschnitt 3.9 konnte gezeigt werden, dass die gefütterte Fettsäure in der Wildtyp Zelle nicht verstoffwechselt wird. Es ist naheliegend zu vermuten, dass die aufgenommene  $\alpha$ -Linolensäure in Strukturlipide eingebaut wird. Um festzustellen, welchen Weg die aufgenommenen Fettsäuren in der Zelle nehmen, wurden Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen mit radioaktiv markierter  $\alpha$ -Linolensäure gefüttert, die Lipide alle 10 Minuten nach der Bligh & Dyer (Bligh und Dyer, 1959) Methode extrahiert und über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Einbau radioaktiv markierter Fettsäure in Lipide im Wildtyp.** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen wurden mit  $33 \mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-Linolensäure}$  inkubiert, die Lipide zu verschiedenen Zeitpunkten extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie nach ihrer Polarität aufgetrennt. Als Standard (S) wurde freie  $[1-^{14}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-Linolensäure}$  verwendet. FFS: freie Fettsäure, MGDG: Monogalaktosyldiacylglycerin, DGDG: Digalaktosyldiacylglycerin, SQDG: Sulfoquinovosyldiacylglycerin, PG: Phosphatidylglycerin.

Beim Wildtyp war deutlich zu sehen, dass die radioaktive  $\alpha\text{-Linolensäure}$  in alle dominanten *Synechocystis* Lipide (Siegenthaler und Murata, 1998) eingebaut wurden. Beachtlich war die Geschwindigkeit des Einbaus, schon nach 10 Minuten Inkubation zeigte sich die radioaktive Fettsäure in Monogalaktosyldiacylglycerin (MGDG) und Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG). Es erfolgte nicht nur ein Einbau in die Galaktolipide, auch in Phosphatidylglycerin (PG) war schnell radioaktives Signal zu finden. Zusätzlich war im Wildtyp eine graduelle Anreicherung von freien Fettsäuren zu beobachten. In der  $\Delta$ *synaas* Mutante ließ sich beeindruckend zeigen, dass eine Aufnahme der Fettsäure nicht stattfand. Eine Akkumulation an freien Fettsäuren blieb aus, ebenfalls tauchte keine detektierbare Menge der markierten Fettsäure in Lipiden auf. Da dieser Versuch sich auf die Dauer von 60 Minuten beschränkte, sollte in einem Langzeitexperiment über 10 Stunden, die Verteilung der gefütterten Fettsäure in der *Synechocystis* Zelle bestimmt werden. Zusätzlich könnten durch diesen Versuch Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der elektronendichten Anhäufungen in Abbildung 9 gezogen werden.



**Abbildung 15: Akkumulation und Einbau von freier  $\alpha$ -Linolensäure in Lipide.** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen wurden für die aufgeführte Zeit mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert, die Lipide extrahiert und auf eine Silika Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde Aceton:Toulol:Wasser 91:30:8 (v/v/v) verwendet. Mit Hilfe der links aufgetragenen Standards konnten die Lipidspezies identifiziert werden.

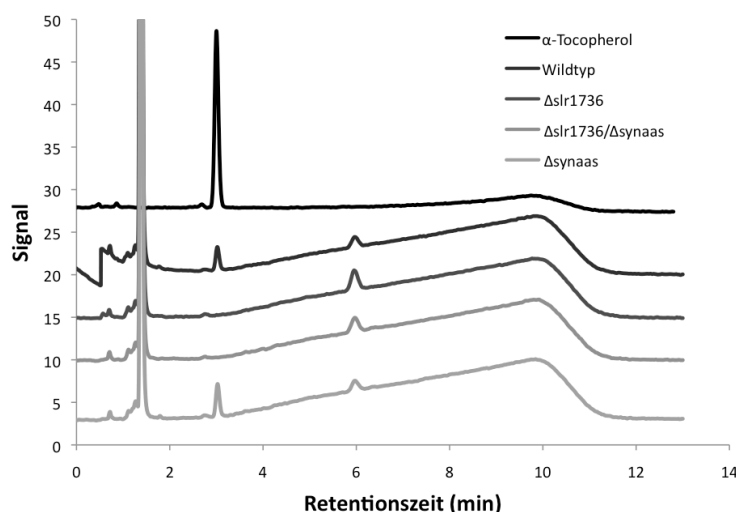
Hierzu wurden erneut Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen 0, 6 und 10 Stunden mit 150  $\mu$ M unmarkierter  $\alpha$ -Linolensäure behandelt und die Lipide nach der Bligh & Dyer Methode extrahiert. Die Gesamtlipide wurden mit den entsprechenden Standards mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abbildung 15). Um eine feinere Auftrennung der unpolaren Galaktolipide zu ermöglichen, wurde ein unpolares Laufmittel benutzt. Wenn man den *Synechocystis* Wildtyp betrachtet, war am auffälligsten die Akkumulation der freien  $\alpha$ -Linolensäure nach 6 und 10 Stunden (Abbildung 15), die wohl einen Großteil der akkumulierten Substanz in Abbildung 9 ausmachte. Unter der freien Fettsäure lief eine Bande, die dem Standard MGDG entsprach. Nach 6 und 10 Stunden wurde hier eine zweite Bande einer unpolarerer Substanz sichtbar. Weiterhin war ein Anstieg in Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG) nach 6 und 10 Stunden auszumachen. Zudem erhöhte sich die Menge an dem Phospholipid Phosphatidylglycerin (PG) über die Zeit. Eine weitere Substanz unterhalb der PG Bande konnte durch die Standards nicht identifiziert werden. Es lässt sich aber mutmaßen, dass es sich um das sehr polare Trigalaktosyldiacylglycerin handelte (TGDG). Die  $\Delta$ *synaas* Mutante zeigte wie erwartet keine Veränderung in der Lipidkomposition im Verlauf des Experiments. Es scheint, dass eine Akkumulation der freien Fettsäure nach 6 Stunden zu erkennen war; eine



Aufnahme der Fettsäure in der Mutante ließ sich aber durch die vorausgegangenen Experimente ausschließen.

### 3.11 Die Tocopherolmutante $\Delta slr1736$ ist hypersensitiv gegenüber $\alpha$ -Linolensäure

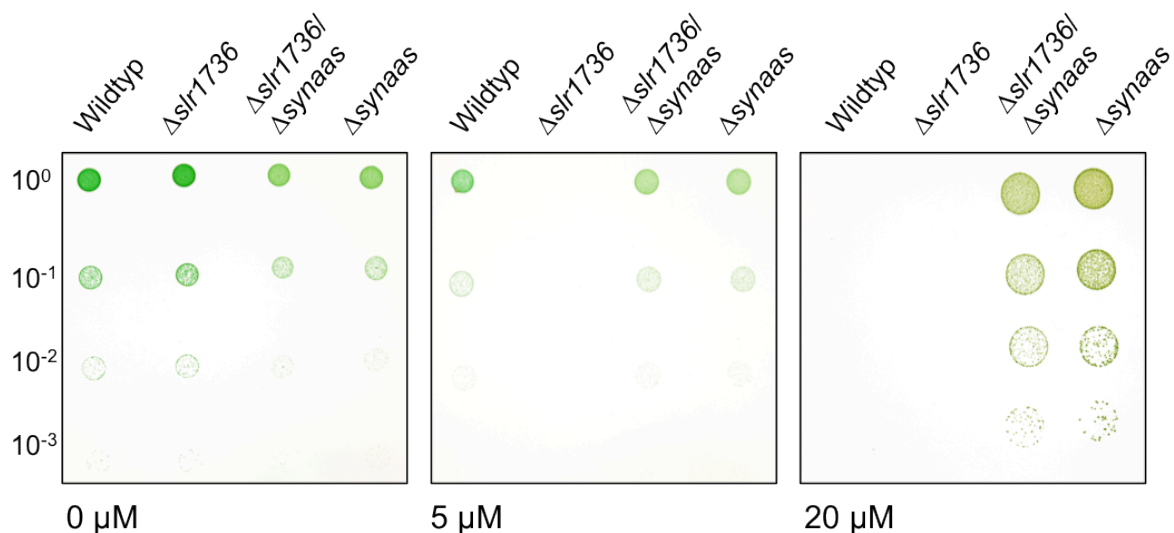
Im Jahr 2002 wurde die *Synechocystis* Mutante  $\Delta slr1736$  beschrieben, die einen Defekt in der Tocopherol Biosynthese aufweist (Maeda et al., 2005). Tocopherole, besser bekannt als Vitamin E, sind lipophile Antioxidantien, die eine Funktion im „quenchen“ von freien Radikalen besitzen. Gerade bei hohen Lichtintensitäten sind Tocopherole nötig, um die Zelle vor membranschädigender Peroxidation zu schützen (Maeda et al., 2005). Besonders anfällig für Peroxidation sind die Doppelbindungen mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Die Tocopherol Mutante  $\Delta slr1736$  erwies sich als hypersensitiv unter Einfluss von Starklicht ( $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und  $10 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 17). Wurde die Mutante nur mit Starklicht behandelt, so verhielt sie sich wie der Wildtyp. Der Phänotyp korreliert demnach mit der Aufnahme der  $\alpha$ -Linolensäure (Maeda et al., 2005). Es stellte sich nun die Frage, ob durch zusätzliches Ausschalten des Acyl-aktivierenden Enzyms in der  $\Delta slr1736$  Mutante, der hypersensitive Phänotyp revertiert und sogar in eine Resistenz gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure umgewandelt werden könnte. Hierzu wurde zuerst eine  $\Delta synaas/\Delta slr1736$  Doppelmutante hergestellt und mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) die Tocopherolmengen in Wildtyp, Einzel- und Doppelmutanten bestimmt (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Defekt im *Slr1736* Gen führt zur  $\alpha$ -Tocopherol Defizienz. Tocopherolbestimmung in *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta slr1736$ ,  $\Delta slr1736/\Delta synaas$ ,  $\Delta synaas$  Zellen durch HPLC. Als Standard wurde aufgereinigtes  $\alpha$ -Tocopherol verwendet.

Wie in Abbildung 16 deutlich zu erkennen ist, fehlte in den Mutanten  $\Delta slr1736$  und  $\Delta synaas/\Delta slr1736$  der charakteristische Peak für  $\alpha$ -Tocopherol. Da die Insertion im Gen *SLR1736* die Phytyltransferase betrifft, welche durch Kondensation von Homogentisat und Phytyl-Diphosphat die Tocopherolvorstufe 2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Menzoquinol (MPBQ) bildet, kann man davon ausgehen, dass die aus MPBQ gebildeten  $\beta$ - , $\gamma$ - , $\delta$ -Tocopherole ebenfalls nicht vorkommen (Maeda et al., 2005).

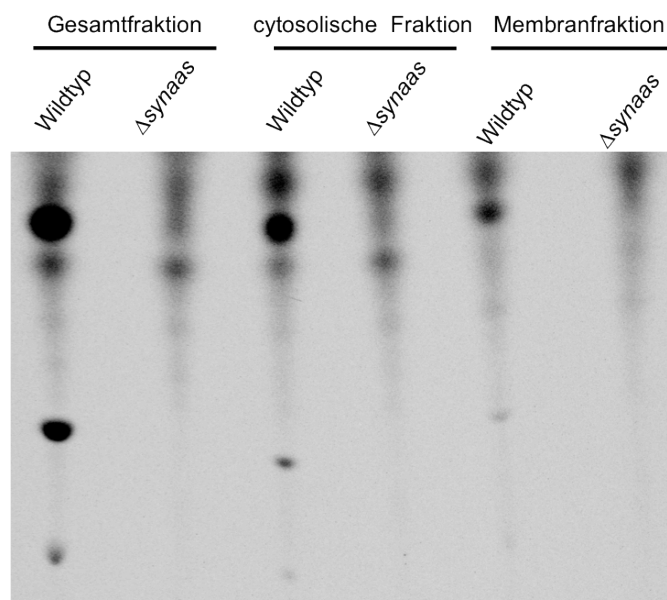
Um die oben genannte Hypothese zu überprüfen, wurden Flüssigkulturen von Wildtyp,  $\Delta synaas$ ,  $\Delta slr1736$ ,  $\Delta synaas/\Delta slr1736$  auf eine optische Dichte ( $OD_{750}$ ) von 0,05 eingestellt, auf BG-11 Platten mit unterschiedlichen Mengen  $\alpha$ -Linolensäure aufgebracht und bei  $300 \mu E m^{-2} s^{-1}$  für 7 Tage inkubiert. Wie in Abbildung 17 ersichtlich, zeigte sich eine Sensitivität der  $\Delta slr1736$  Mutante schon bei  $5 \mu M$   $\alpha$ -Linolensäure, der publizierte Phänotyp konnte also bestätigt werden. Ebenfalls war es durch die gleichzeitige Ausschaltung des *SynAas* Gens nicht nur möglich, den Phänotyp der  $\Delta slr1736$  Mutante zu revertieren, sondern auch die von der  $\Delta synaas$  Mutante bekannte Resistenz gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure wieder herzustellen. In Abbildung 17 ist die Resistenz der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Dieses Experiment gibt deutliche Hinweise darauf, dass es zu keiner Aufnahme der toxischen Fettsäure in die Zelle kommt, sobald das Acyl-aktivierende Enzym *SynAas* ausgeschaltet ist.



**Abbildung 17: Hypersensitivität der  $\Delta slr1736$  Mutante und Resistenz der  $\Delta slr1736/\Delta synaas$  Doppelmutante.** Flüssigkultur von *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta slr1736$ ,  $\Delta slr1736/\Delta synaas$ , und  $\Delta synaas$  Zellen wurden auf BG-11 Platten mit 0, 5 und  $20 \mu M$   $\alpha$ -Linolensäure getropft und bei  $300 \mu E m^{-2} s^{-1}$  für 7 Tage inkubiert.

### 3.12 SynAas zeigt eine duale Lokalisation im Cytosol und an der Membran in der *Synechocystis* Zelle

Um freie Fettsäuren mittels vektorieller Acylierung über eine Membran zu transferieren, ist eine Membranassoziiierung des Acyl-aktivierenden Enzyms essenziell. *In silico* Analysen der Proteineigenschaften des Proteins (TMHMM-Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) ergaben keine Vorhersagen von integralen Membranspannen. In einer Proteomanalyse der Plasmamembran von *Synechocystis* konnte SynAas allerdings als plasmamembranlokalisiert detektiert werden (Pisareva et al., 2007). Hingegen konnte in einer Proteomestudie der Thylakoidmembran SynAas nicht gefunden werden (Srivastava et al., 2005). Es galt daher zu verifizieren, dass SynAas membrangebunden vorliegt. Hierfür wurden Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellen aufgebrochen und die Membranfraktion von der cytosolischen Fraktion mittels Ultrazentrifugation getrennt. Die Membranen wurden mehrfach mit Puffer gewaschen, um alle cytosolischen Proteine zu entfernen. Die Fraktionen wurden dann mit radioaktiv markierter Fettsäure und Co-Faktoren für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Lipide nach der Bligh & Dyer Methode gefällt und mittels Dünnschichtchromatographie nach ihrer Polarität aufgetrennt.



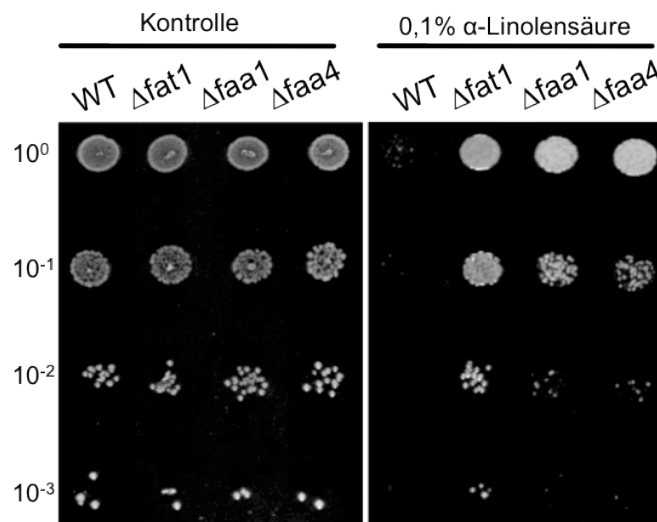
**Abbildung 18: Aktivität von SynAas in der Cytosol- und Membranfraktion.** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ *synaas* Zellextrakt wurde hergestellt und durch Ultrazentrifugation in die Cytosol- und Membranfraktion getrennt. Diese Fraktionen wurden mit  $33 \mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert, Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Acyl-aktivierende Aktivität im Gesamtextrakt von Wildtyp Zellen ausreichte, um größere Mengen an radioaktiver  $\alpha$ -Linolensäure in die verschiedenen Lipidspezies einzubauen (Abbildung 18). Betrachtet man nun den Proteinextrakt aus den  $\Delta$ *synaas* Zellen, so zeigte sich, dass hier keine Umsetzung der freien Fettsäure stattfand. Vergleicht man die cytosolische mit der Membranfraktion des Wildtyps, so erkennt man starke Banden in der cytosolischen Fraktion und schwache Banden in der Membranfraktion. Somit liegt SynAas zwar membranassoziiert vor, jedoch ist ein größerer Teil gleichzeitig im Cytosol der Zelle lokalisiert. Die Lokalisation an der Plasmamembran und im Cytosol von SynAas war auch bei der Expression von SynAas in Hefe zu erkennen (Abbildung 21). Die Ergebnisse der dualen Lokalisation des Enzyms decken sich mit Erkenntnissen vom Acyl-aktivierenden Enzym in *Escherichia coli* (Overath und Pauli, 1969).

### **3.13 *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten des Fettsäureimport Komplexes zeigen Resistenz gegen $\alpha$ -Linolensäure**

Der Resistenzphänotyp der *Synechocystis*  $\Delta$ *synaas* Mutante wirft die Frage auf, ob der Phänotyp speziell bei *Synechocystis* auftritt oder auch bei heterotrophen, eukaryontischen Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* zu finden ist. Der Fettsäureimport in Hefe ist sehr detailliert erforscht (Black und DiRusso, 2003). Der Importkomplex besteht aus drei Proteinen: FAT1, welches wegen seiner drei Transmembrandomänen als Transportprotein gilt (Obermeyer et al., 2007), FAA1 und FAA4 sind beides Acyl-aktivierende-Enzyme, die mit FAT1 assoziiert sind (Faergeman et al., 2001) (siehe Abbildung 2C). Eine Deletion eines dieser Proteine führt zur reduzierten Aufnahme der Fettsäure aus dem Medium. In diesem Versuch sollte nun analysiert werden, ob ein Defekt im Transportkomplex von *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Resistenz gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure führt. Vorerst wurden die Mutanten  $\Delta$ *fat1*,  $\Delta$ *faa1*,  $\Delta$ *faa4* (Euroscarf) bestellt und auf ihre Wachstumsfähigkeit auf YNB-Platten mit 0,1%  $\alpha$ -Linolensäure getestet. Als Kohlenstoffquelle diente 0,01% Glukose im Medium. Um ein Ausfallen der Fettsäure zu verhindern, wurde zum Medium 1% Tergitol gegeben. Wie auch bei den *Synechocystis* Wildtyp Zellen zu beobachten zeigte sich, dass der Hefe Wildtyp ebenfalls sensitiv war (Abbildung 19). Jedoch war die Menge, die benötigt wird um den Phänotyp hervorzurufen, deutlich höher als bei *Synechocystis*, was an einem Abbau der Fettsäure durch die  $\beta$ -Oxidation in Hefen liegen kann. Abbildung 19 belegt zudem, dass  $\alpha$ -Linolensäure

in großen Mengen ebenfalls für eukaryontische Zellen toxisch ist. Erstaunlicherweise zeigten sich die Mutanten, vergleichbar mit der *Synechocystis*  $\Delta$ *synaas* Mutante, resistent gegen hohe Mengen der toxischen Fettsäure. Dieser beobachtete Phänotyp, ist bis dato in Hefen unbekannt und legt Nahe, dass bei einem verringerten Import die toxische Menge an  $\alpha$ -Linolensäure nicht erreicht wird und es so zu einer Resistenz der Zelle kommt.



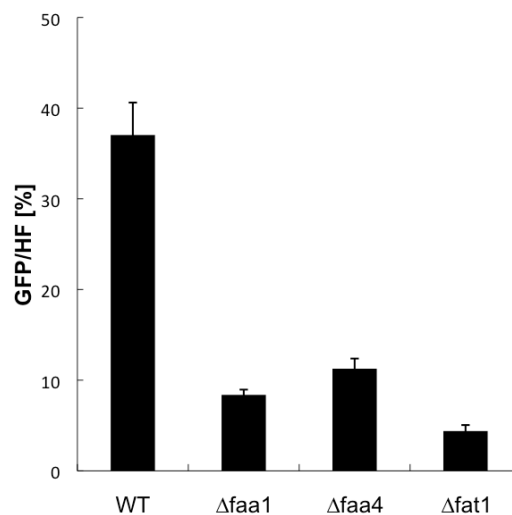
**Abbildung 19: Resistenzphänotyp der Hefemutanten  $\Delta$ *fat1*,  $\Delta$ *faa1*,  $\Delta$ *faa4* gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure.** Flüssigkultur von *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp,  $\Delta$ *fat1*,  $\Delta$ *faa1*,  $\Delta$ *faa4* wurden auf YNB Platten mit 0,01% Glukose, 1% Tergitol und 0,1%  $\alpha$ -Linolensäure getropft. Als Kontrolle wurde EtOH anstelle von  $\alpha$ -Linolensäure verwendet.

### 3.14 Die Hefemutanten $\Delta$ *fat1*, $\Delta$ *faa1*, $\Delta$ *faa4* zeigen eine verringerte Aufnahme des Stearinsäureanalogons BODIPY D3823

Eine verringerte Aufnahme der toxischen  $\alpha$ -Linolensäure wäre eine plausible Erklärung für den Resistenzphänotyp der Hefemutanten. Vorausgegangene Studien belegen: Wird die Fettsäuresynthese der Zelle durch Cerulenin inhibiert, so müssen Fettsäurebausteine aus dem Außenmedium aufgenommen werden, um ein Überleben zu gewährleisten (Goldberg und Walker, 1973). Bei den Hefemutanten  $\Delta$ *fat1*,  $\Delta$ *faa1*,  $\Delta$ *faa4* konnte das Wachstum nicht durch Zugabe von Fettsäure wiederhergestellt werden (Faergeman et al., 1997; 2001), woraus sich schließen lässt, dass eine Aufnahme von freien Fettsäuren aus dem Außenmedium in diesen Mutanten nicht möglich ist.

Durch Inkubation mit dem Stearinsäureanalogon BODIPY D3823 sollte die Aufnahmefähigkeit der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden und

somit eine Erklärung für den Resistenzphänotyp gefunden werden. Die Kulturen wurden auf eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 3,0 eingestellt und mit 50  $\mu$ M BODIPY D3823 für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und das Verhältnis von fluoreszierenden Zellen zur Gesamtzellzahl berechnet.



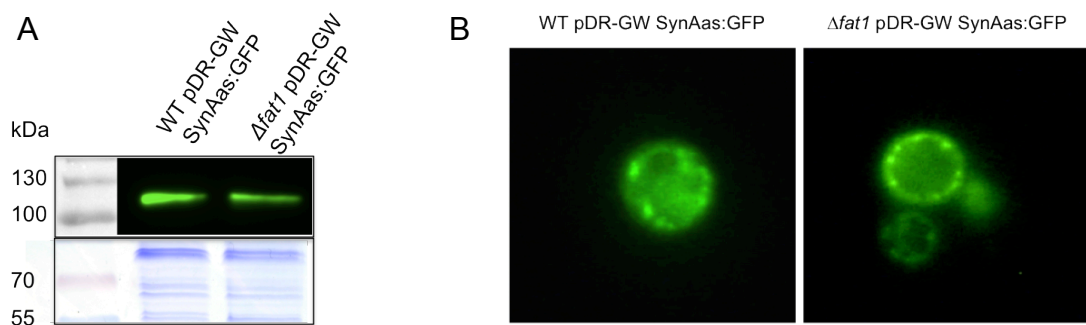
**Abbildung 20: Verringerte BODIPY Aufnahme bei den Hefemutanten  $\Delta$ fat1,  $\Delta$ faa1,  $\Delta$ faa4.** *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp,  $\Delta$ faa1,  $\Delta$ faa4 und  $\Delta$ fat1 wurden für 10 Minuten mit 50  $\mu$ M BODIPY D3823 inkubiert und die fluoreszierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Grafik zeigt das Verhältnis von fluoreszierenden Zellen (GFP) zur Gesamtzellzahl im Hellfeld (HF).

Wie durch den Resistenzphänotyp bereits vermutet, zeigten die Mutanten eine stark verringerte Aufnahme der fluoreszierenden Fettsäure im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 20). Die Ausschaltung des Transportproteins FAT1 führte zur geringsten Akkumulation, was die bereits publizierten Daten widerspiegelt. Aber auch ein Defekt in einem der beiden Acyl-aktivierenden Enzymen FAA1 und FAA4 zeigte eine deutlich verringerte Aufnahme des Fettsäurederivates BODIPY D3823.

### **3.15 Überexpression von SynAas im Wildtyp und $\Delta$ fat1 führt zu erhöhter Sensitivität gegenüber $\alpha$ -Linolensäure**

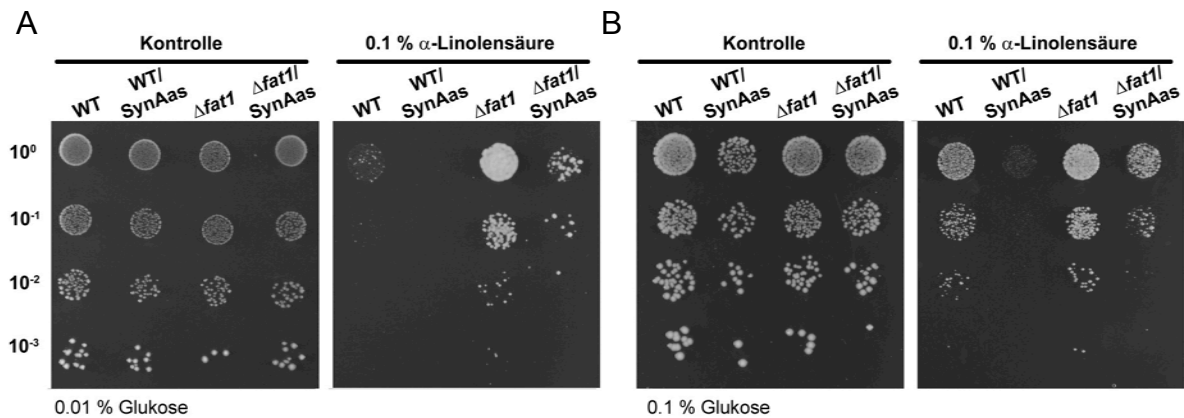
Das Transportprotein FAT1 ist essenziell, um Fettsäuren aus dem Außenmedium aufzunehmen und sie als Kohlenstoffquelle nutzen zu können (DiRusso et al., 2000). Um zu zeigen, dass Acyl-aktivierende Enzyme ohne die Aktivität eines Transporters Fettsäuren über die Außenmembran transferieren können, sollte im folgenden Versuch das *Synechocystis* Acyl-aktivierende Enzym SynAas in der  $\Delta$ fat1 Mutante überexpressiert werden. Zusätzlich wurde eine Überexpressionslinie im Wildtyp

Hintergrund hergestellt. Ein erhöhter Transfer von Fettsäuren über die Plasmamembran ins Innere der Zelle sollte in einer erhöhten Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure resultieren. Die konstitutive Überexpression des *Synechocystis* Proteins in der Hefezelle wurde durch die Verwendung des pDR-GW SynAas:GFP Vektors erreicht. Bei der Expression wird ein Fusionsprotein mit einem C-terminalen grünfluoreszierenden Protein (GFP) gebildet, welches die Lokalisation des Proteins in der Zelle ermöglicht. Die Abundanz und die korrekte Größe des Proteins von 107 kDa wurde durch Immuno-Blotting verifiziert (Abbildung 21A). Bei der Lokalisierung des Fusionsproteins zeigte sich eine Verteilung in der ganzen Zelle, jedoch eine erhöhte Dichte an der Plasmamembran (Abbildung 21B). Diese Ergebnisse decken sich mit der beobachteten Acyl-aktivierenden Aktivität sowohl in der Cytosol- als auch der Membranfraktion von *Synechocystis* Zellextrakten (Abbildung 18).



**Abbildung 21: Expression und Lokalisation von SynAas in *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp und  $\Delta fat1$ .** (A) Wildtyp und  $\Delta fat1$  wurden transformiert mit dem Vektor pDR-GW SynAas:GFP. Die Expression des Fusionsproteins SynAas:GFP wurde durch Immunodetektion mit dem Antikörper Anti-GFP-HRP bestätigt. (B) Lokalisationsstudien des Fusionsproteins SynAas:GFP im Wildtyp und in der  $\Delta fat1$  Mutante mittels Fluoreszenzmikroskopie.

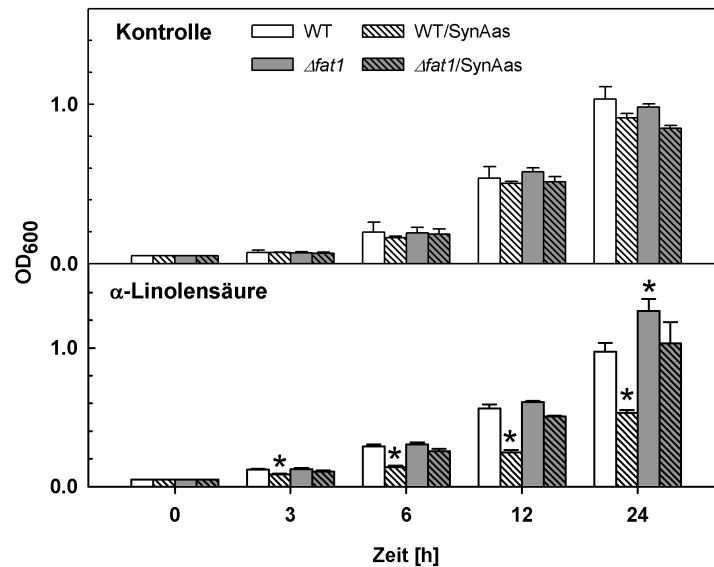
Die Sensitivität der verschiedenen Hefe-Linien sollte auf Platten mit 0,1 %  $\alpha$ -Linolensäure, 1 % Tergitol und 0,01 % Glukose getestet werden. Zur Kontrolle wurden Platten mit 0,1 % EtOH anstatt  $\alpha$ -Linolensäure verwendet (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure durch Expression von SynAas in Hefe.** *Saccharomyces* Wildtyp, Wildtyp/SynAas,  $\Delta fat1$ ,  $\Delta fat1$ /SynAas Flüssigkultur wurde auf YNB Platten versetzt mit 1 % Tergitol, 0,1 %  $\alpha$ -Linolensäure, 0,1 % EtOH als Kontrolle und (A) 0,01 % Glukose oder (B) 0,1 % Glukose aufgetropft.

Wie aus Abschnitt 3.13 bereits zu entnehmen, zeigte sich auch hier ein deutlich verringertes Wachstum des Wildtyps unter Einfluss der  $\alpha$ -Linolensäure (Abbildung 22A). Die  $\Delta fat1$  Mutante hingegen verhielt sich im Wachstum unbeeinträchtigt durch die toxische Fettsäure. Entsprechend den Erwartungen war ein deutlich vermindertes Wachstum in der  $\Delta fat1$  Mutante durch die Überexpression von SynAas zu beobachten (Abbildung 22A). Interessanterweise zeigte auch der Wildtyp durch die Überexpression eine Hypersensitivität gegenüber der  $\alpha$ -Linolensäure (Abbildung 22B). Die Ausprägung dieser Sensitivität ist offensichtlich abhängig von der Konzentration an Glukose im Medium. Kultiviert man die Zellen auf Platten mit 0,1 % Glukose, so war der Unterschied zwischen der  $\Delta fat1$  Mutante und  $\Delta fat1$ /SynAas Überexpressionslinie nur noch geringfügig sichtbar. Deutlich blieb jedoch das Wachstumsdefizit der SynAas Überexpressionslinie im Wildtyp Hintergrund (Abbildung 22B). Auf den Kontrollplatten, die nur das Lösungsmittel Ethanol beinhalteten, konnte kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Linien erkannt werden. Das Wachstum der einzelnen Linien wurde im folgenden Versuch über einen Zeitraum von 24 Stunden in Flüssigkultur ermittelt.



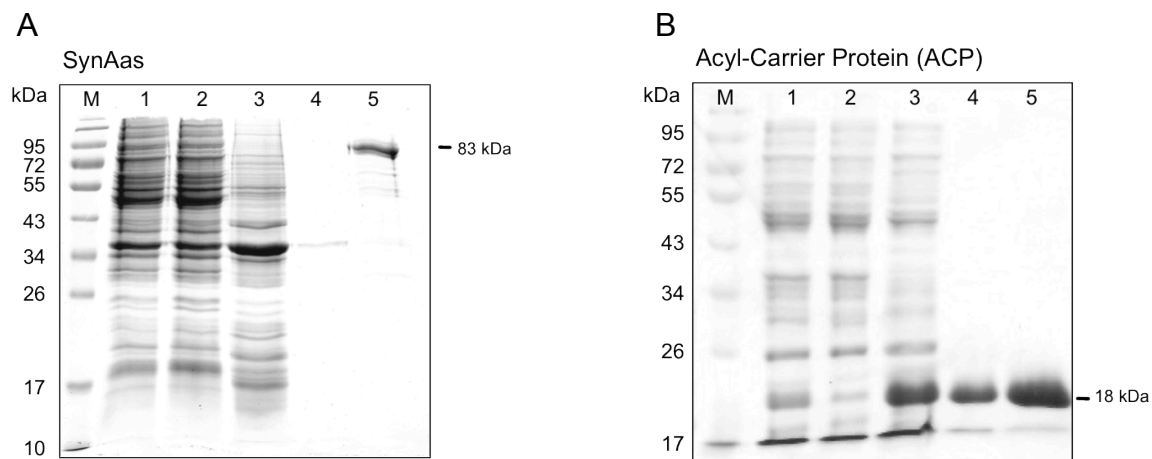


**Abbildung 23: Wachstumsdepression verschiedener Hefezelllinien durch Behandlung mit  $\alpha$ -Linolensäure.** Flüssigkulturen von *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp, Wildtyp/SynAas,  $\Delta fat1$ ,  $\Delta fat1/SynAas$  wurden eingestellt auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 und das Wachstum mit 0,1 % und ohne  $\alpha$ -Linolensäure über 24 Stunden dokumentiert. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp an. ( $P > 0.05$ ). Standardfehler,  $n=4$

Die Glukosekonzentration wurde hier auf 0,1 % eingestellt, da das Wachstum der Kultur bei dieser Konzentration konstanter verlief als bei niedrigeren Glukosekonzentrationen. Analog zum Wachstum auf Platten, zeigte sich hier ein eindeutiger Unterschied der Wachstumsrate des Wildtyps im Vergleich zur Wildtyp/SynAas Überexpressionslinie (Abbildung 23). Ein reduziertes Wachstum der Wildtyp/SynAas war in Flüssigkultur bereits nach drei Stunden erkennbar, wohingegen das Wachstum dieser Linie unter Kontrollbedingungen keinen Unterschied zum Wildtyp zeigte. Nach 24 Stunden offenbarte sich auch ein verlangsamtes Wachstum des Wildtyps im Vergleich zur  $\Delta fat1$  Mutante. In der Kontrolle schien ebenfalls ein nicht signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp,  $\Delta fat1$  und den dazu gehörigen Überexpressionslinien zu entstehen. Dies kann mit der hohen Energieaufwendung für die Überexpression des SynAas Proteins zusammenhängen. Die aufgeführten Daten sprechen jedoch für eine verstärkte Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure, wenn das Acyl-aktivierende Enzym SynAas aus *Synechocystis* im Wildtyp oder  $\Delta fat1$  Zellen exprimiert wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die Expression von SynAas ein zusätzlicher Import von toxischer  $\alpha$ -Linolensäure vermittelt wird, was in der beobachteten Sensitivität resultiert. Dieser Import erfolgte unabhängig vom Transportprotein Fat1, was andeutet, dass ein Membranprotein nicht notwendigerweise am Import beteiligt sein muss.

### 3.16 Biochemische Funktion des Acyl-aktivierenden Enzyms SynAas

Um die Funktion des Acyl-aktivierenden Enzyms SynAas zu verstehen, ist es notwendig, das Enzym isoliert von allen Zellbestandteilen und angereichert zu untersuchen. Hierfür sollten sowohl das Enzym SynAas als auch dessen Co-Faktor Acyl-Carrier Protein nach heterologer Expression aus einem Zellextrakt aufgereinigt werden. Es wurden Plasmide konstruiert, die nach der Transformation in die Wirtszelle eine induzierbare Expression des gewünschten Proteins, mit einem C-terminalen 6-fachen Histidin-Tag gewährleisten. Zur Aufreinigung von SynAas wurde der Hefestamm InvSC1 verwendet und für die Aufreinigung von ACP der *E. coli* Stamm BLR-(DE3)-pLys. Die heterolog exprimierten Proteine wurden über Nickel-Affinitäts Chromatographie aus den Zellextrakten nahezu homogen aufgereinigt.

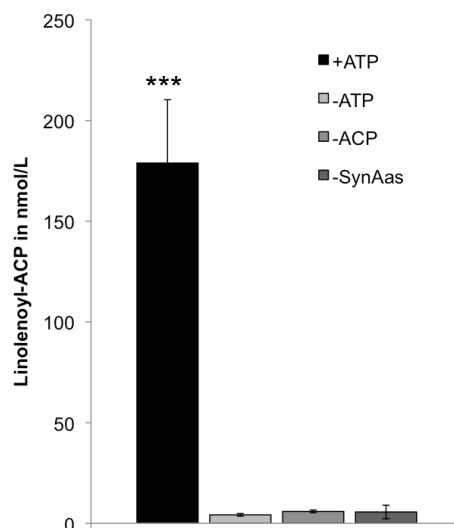


**Abbildung 24: Aufreinigung von SynAas und Acyl-Carrier Protein (ACP).** Ni-NTA Aufreinigung von den His-Tag markierten Proteinen SynAas aus *Synechocystis* (A) und ACP aus *E. Coli* (B). Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gele (12,5% w/v). M: Molekularer Marker, 1: Gesamtextrakt, 2: Durchlauf, 3: erster Waschschrift, 4: zweiter Waschschrift, 5: Elution. Die aufgereinigten Proteine haben ein apparentes Molekulargewicht Größe von 83 kDa (SynAas) und 18 kDa (ACP).

Die heterologe Expression sowohl von SynAas als auch ACP war erfolgreich (Abbildung 24). Die Größe des aufgereinigten SynAas Proteins entsprach dem berechneten Molekulargewicht von 83 kDa (Abbildung 24A). Das ACP hingegen zeigte eine unerwartete Größe von ca. 18 kDa, statt des berechneten Molekulargewichts von 9 kDa (Abbildung 24B). Eine Dimerbildung ließ sich aufgrund der denaturierenden Bedingungen im SDS-Ladepuffer ausschließen. ACP besitzt jedoch überdurchschnittlich viele negativ geladene Seitenketten, wodurch die Wanderungseigenschaft des Proteins beeinflusst werden kann (Raychaudhuri, 2003). Zusätzlich könnte die prosthetische Gruppe, 4-Phosphopantethine, zu einer

erhöhten apparenten molekularen Masse des Proteins im SDS-Gel führen. Bei einem Kontrollgel mit aufgereinigtem ACP einer kommerziellen Quelle (Sigma, Produktnummer A8725) zeigten sich vergleichbar große Banden.

Um die Aktivität des aufgereinigten Enzyms zu testen, wurde ein Acyl-ACP Synthetase Assay (Rock und Cronan, 1981) angewandt, wobei das Acyl-aktivierende Enzym mit den benötigten Co-Faktoren und radioaktiv markierter Fettsäure als Substrat inkubiert wird. Bei dem durchgeführten Assay bedient man sich der Eigenschaft Acyl-aktivierender Enzyme, eine lipophile, freie Fettsäure durch die Veresterung mit der prosthetischen Gruppe des Acyl-Carrier Proteins (ACP) in das wasserlöslichere Acyl-ACP umzuwandeln. In einem Filtrationsschritt mit einem organischen Lösungsmittel kann die aktivierte Fettsäure von der freien Fettsäuren getrennt werden. Die Menge der zurückgehaltenen Radioaktivität auf dem Filterpapier ist proportional zur Menge der aktivierten Fettsäure und somit ein Maß für die Aktivität des Enzyms.

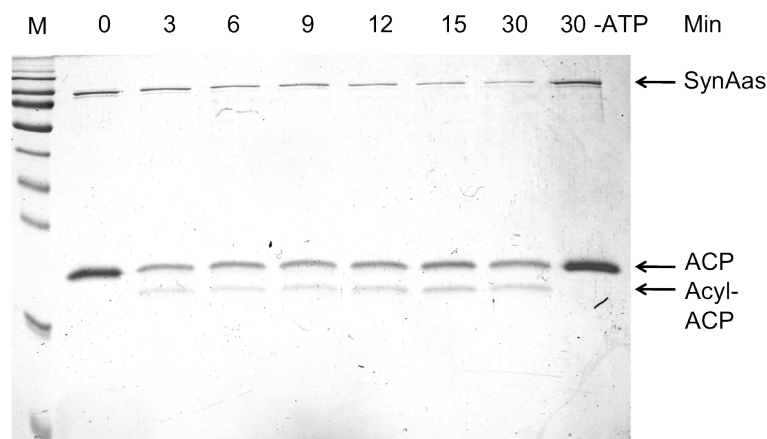


**Abbildung 25: Bildung von Linolenoyl-ACP durch SynAas.** Aufgereinigtes SynAas wurde mit den Co-Faktoren ATP und aufgereinigtem ACP für 30 Minuten bei 30°C mit freier [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert. Freie Fettsäuren wurden durch organische Lösungsmittel entfernt und die Menge an [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Linolenoyl-ACP im Szintillationszähler gemessen. Es ist keine Bildung von Linolenoyl-ACP detektierbar wenn ATP, ACP oder das Enzym im Ansatz fehlt. ( $P \leq 0.05$ ). Standardfehler,  $n=4$ , Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zu den Kontrollen.

Anhand von Abbildung 25 wird die ATP-abhängige Aktivität des Enzyms verdeutlicht. Bei Zugabe aller essenzieller Faktoren zum Ansatz stieg die Menge an aktivierter Fettsäure auf  $178,87 \pm 31,46$  nmol/L innerhalb von 30 Minuten. Ohne ACP, ATP oder SynAas im Ansatz verblieb die Menge an aktivierter Fettsäure auf einem basalen Level von durchschnittlich 5 nmol/L. Diese Untersuchungen zeigten, dass das

aufgereinigte SynAas aktiv ist und freie Fettsäuren mit ACP in einer ATP-abhängigen Reaktion aktivieren kann.

In einem zweiten Versuch sollte die Bildung von Acyl-ACP über die Zeit auf einem SDS-Gel untersucht werden. Hierbei wurde der Acyl-ACP Synthetase Assay durch Zugabe von ATP gestartet und zu definierten Zeitpunkten Aliquots entnommen, die Proteine gefällt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. In Abbildung 26 waren unmittelbar nach Zugabe von ATP auf dem SDS-Gel die Banden des Enzyms bei 87 kDa und des ACP's bei 18 kDa zu identifizieren. Nach drei Minuten Inkubationszeit ließ sich unter der ACP Bande bei etwa 15 kDa die zweite Bande des Acyl-ACP's erkennen, die im Verlauf des Versuchs leicht stärker wurde (Abbildung 26). Die Kontrolle ohne ATP zeigte nach 30 Minuten keine zweite Bande, was die ATP-Abhängigkeit der Reaktion bestätigt.

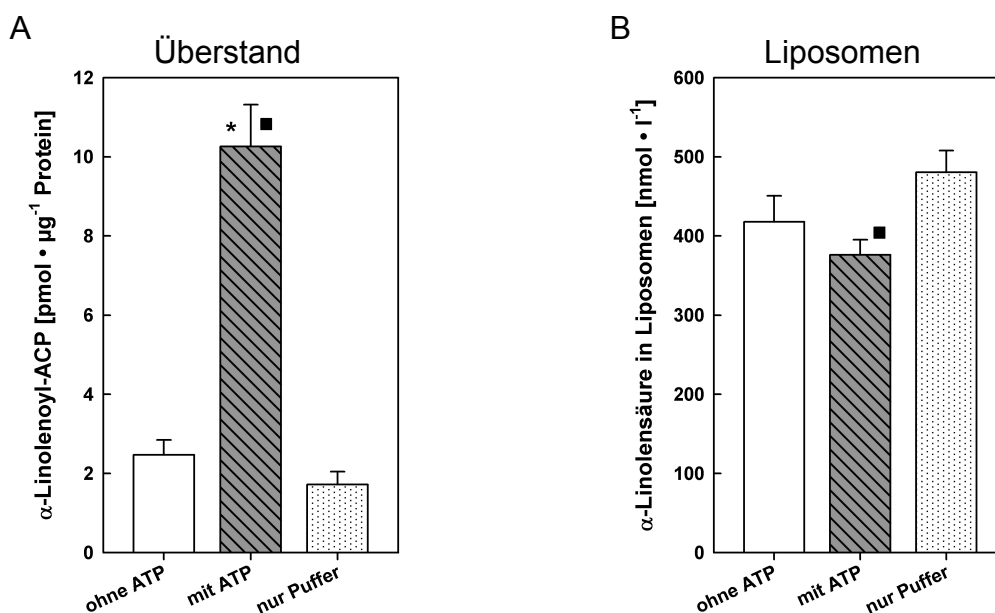


**Abbildung 26: Acyl-ACP Bildung durch SynAas.** Aufgereinigtes SynAas wurde inkubiert mit ATP, ACP und Puffer. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proteine gefällt und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

### 3.17 In artifizielle Membranen eingebettete Fettsäuren dienen als Substrat für das Acyl-aktivierende Enzym SynAas

Damit eine Fettsäure eine Lipid Doppelmembran durchqueren kann, muss sie von der einen in die andere Lipidschicht wechseln. Es konnte gezeigt werden, dass protonierte, also ungeladene Fettsäuren ohne die Hilfe von Proteinen sehr schnell zwischen der cytoplasmatischen und der exoplasmatischen Seite einer Membran wechseln können (Kamp und Hamilton, 1992). Dieser „flip-flop“ der Fettsäuren liegt im Gleichgewicht vor. Werden dem Gleichgewicht jedoch auf der exoplasmatischen Seite der Membran Fettsäuren entzogen, so kommt es zu einem rapiden Export von

Fettsäuren vom Inneren des Kompartiments nach außen. Durch die Aktivität eines Acyl-aktivierenden Enzyms könnte diese Reaktion vermittelt werden. Zu beweisen gilt jedoch, dass die Acyl-aktivierenden Enzyme, Fettsäuren die in eine Membran eingebettet sind, als Substrat nutzen können oder doch zusätzliche Proteine für diesen Schritt notwendig werden. Aus diesem Grund wurden Liposomen mit einem Durchmesser von 200 nm hergestellt und zur Beladung mit radioaktiv markierter Fettsäure für 10 Minuten mit 2  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Linolensäure bei 30°C inkubiert. Durch mehrfaches Waschen mit Tris-HCl Puffer wurden ungebundene Fettsäuren entfernt. Im folgenden Versuch wurde dann ein Acyl-ACP Synthetase Assay mit den beladenen Liposomen als Substrat durchgeführt. Durch Ultrazentrifugation wurden Liposomen und Überstand voneinander getrennt und die Radioaktivität der Fraktionen gemessen. Die Abbildung 27 stellt die Menge an aktivierter Fettsäure in den verschiedenen Ansätzen dar.



**Abbildung 27: SynAas nutzt membrangebundene Fettsäuren als Substrat.** Mit [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Linolensäure beladene Liposomen wurden für 15 Minuten mit 10  $\mu\text{g}$  aufgereinigtem SynAas, 15  $\mu\text{M}$  ACP und Co-Faktoren inkubiert. Liposomen und Überstand wurden durch Ultrazentrifugation separiert und die Radioaktivität in Überstand (A) und Liposomenfraktion (B) gemessen. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen „mit ATP“ und „ohne ATP“ an. Quadrate zeigen signifikante Unterschiede zwischen „mit ATP“ und „nur Puffer“ ( $P \leq 0.01$ ). Standardfehler,  $n=6$ .

Es lässt sich entnehmen, dass durch die Zugabe von ATP eine deutliche Erhöhung an aktivierten Fettsäuren im Überstand zu messen war. Das komplementäre Ergebnis ließ sich erkennen wenn man die verbliebene Radioaktivität in der Liposomenfraktion betrachtet. Hier wiesen die Liposomen in dem Ansatz mit ATP eine Verringerung an radioaktiv markierten Fettsäuren auf. Fehlten jedoch essenzielle Faktoren wie ATP, ACP oder das Enzym selbst, so war nur ein basaler

Level an Radioaktivität im Überstand und keine Verringerung der Radioaktivität in der Liposomenfraktion zu messen. Diese Versuche zeigen erstmals, dass Acyl-aktivierende Enzyme in Membranen eingebundene freie Fettsäuren als Substrat nutzen und sie in die wasserlösliche Acyl-ACP Form überführen können. Diese Ergebnisse belegen die Möglichkeit des Fettsäuretransports über Membranen durch vektorielle Acylierung.

### 3.18 Fettsäureexport in *Synechocystis* durch den ABC-Transporter

#### SynAbc

Bei der Frage nach dem Importmechanismus von Fettsäuren aus dem Medium wurden in den vorherigen Abschnitten schon umfangreiche Daten präsentiert, die den Mechanismus der vektorialen Acylierung als Importfunktion vorschlugen. Ein weiterer Ansatz dieser Arbeit war die Suche nach einem Exportmechanismus für freie Fettsäuren. In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass ein Defekt in dem Acyl-aktivierenden Enzym SynAas zu einer Sekretion von freien Fettsäuren ins Außenmedium führt (Kaczmarzyk und Fulda, 2010; Liu et al., 2010). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) und  $\alpha$ -Linolensäure (C<sub>18:3</sub>). Als Ursache für die Sekretion wird ein Defekt im Recyclingprozess von intrazellulären, freigesetzten Fettsäuren diskutiert (Kaczmarzyk und Fulda, 2010). Proteine, die diesen Exportmechanismus vermitteln, sind bis heute nicht bekannt. Für *Saccharomyces cerevisiae* wird davon ausgegangen, dass dieser Mechanismus ein aktiver Prozess sein muss (Scharnewski et al., 2008).

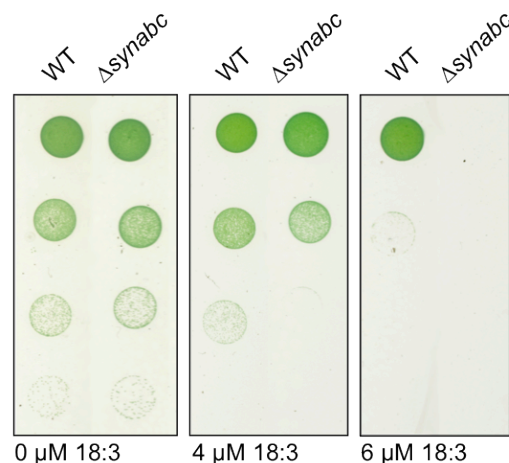
Bei der Suche nach einem Fettsäureexporter wurde im *Synechocystis* Genom nach Homologen des ABC-Transporters PMP1 aus *Arabidopsis thaliana* gesucht. PMP1 stellt das plastidäre Homolog zu dem peroxisomalen Fettsäuretransporter PXA1 aus *Arabidopsis thaliana* dar. Als vielversprechender Kandidat wurde SII0182, der 39 %ige Aminosäureidentität mit PMP1 teilt, identifiziert. Im Folgenden wird SII0182 SynAbc (*Synechocystis* ABC-Transporter) genannt.

### 3.19 Knock out von SynABC führt zur Sensitivität gegenüber $\alpha$ -

#### Linolensäure

Zur Untersuchung der Funktion des ABC-Transporters SynABC wurde zunächst eine *Synechocystis* Mutante erzeugt, die eine Spectinomycin Resistenz Kasette im Gen SII0182 trägt. Die daraus resultierende Mutante  $\Delta$ synabc sollte auf ihre Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure getestet werden. Hierzu wurde Flüssigkultur von Wildtyp und  $\Delta$ synabc in verschiedenen optischen Dichten auf BG-11 Platten aufgetropft und das Wachstum verglichen (Abbildung 28).

In Abbildung 28 ist das Wachstum der Zellen nach 7 Tagen gezeigt. Auf Medium ohne  $\alpha$ -Linolensäure zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und den  $\Delta synabc$  Zellen. Jedoch war schon bei 4  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure eine Wachstumsbeeinträchtigung bei der  $\Delta synabc$  Mutante zu erkennen. Wie schon in Abschnitt 3.3 wurde ab ca. 6  $\mu\text{M}$  auch die Sensitivität des Wildtyps erkennbar, für die  $\Delta synabc$  Mutante war indes bei dieser Konzentration bereits kein Wachstum mehr möglich.



**Abbildung 28: Hypersensitivität der  $\Delta synabc$  Mutante.** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta synabc$  Flüssigkultur einer  $OD_{750}$  0,05 wurden auf BG-11 Platten mit unterschiedlichen Mengen  $\alpha$ -Linolensäure getropft. Die Platten wurden für 7 Tage bei optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert.

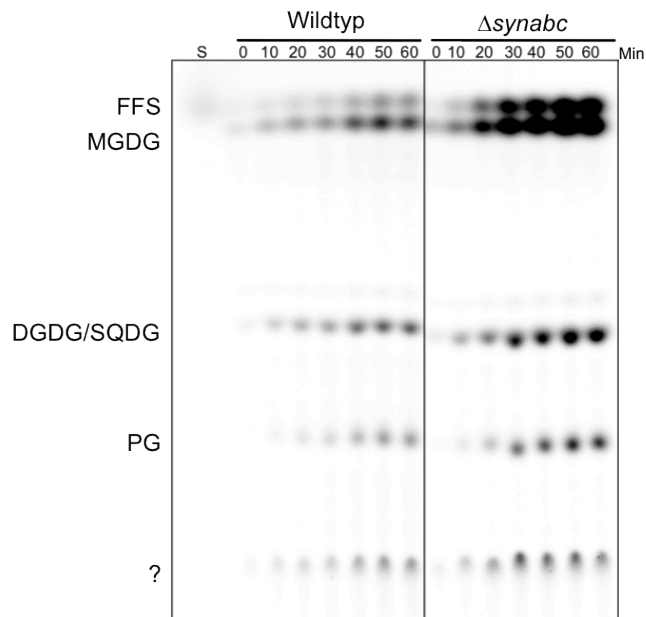
Mit dem Wachstumstest ließ sich zeigen, dass die  $\Delta synabc$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure aufwies. Der Schluss liegt nahe, dass diese hypersensitive Reaktion aufgrund einer Akkumulation an toxischer  $\alpha$ -Linolensäure zustande kommt und dadurch schon bei geringeren Konzentrationen letal wirkt.

### 3.20 Die $\Delta synabc$ Mutante akkumuliert mehr Fettsäure als der Wildtyp

Im folgenden Versuch sollte durch Fütterung der Zellen mit  $\alpha$ -Linolensäure, der Einbau der Fettsäure in die verschiedenen Lipidspezies untersucht werden. Zusätzlich sollte die Anreicherung der  $\alpha$ -Linolensäure im Wildtyp und der  $\Delta synabc$  Mutante verglichen werden. Hierfür wurden die Zellen mit  $[1-^{14}\text{C}]\alpha$ -Linolensäure inkubiert, in 10 Minuten Abständen Aliquots abgenommen und die Lipide anschließend mittels der Bligh & Dyer Methode extrahiert. Die Lipide wurden



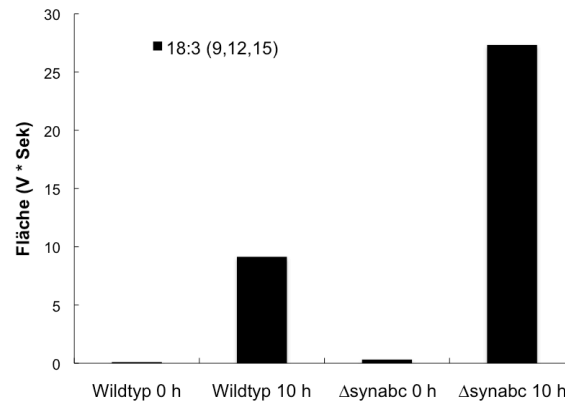
aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.



**Abbildung 29: Akkumulation an  $\alpha$ -Linolensäure im Wildtyp und  $\Delta synabc$ .** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta synabc$  Zellen wurden mit  $33 \mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert und die Lipide zu verschiedenen Zeitpunkten extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Standard (S) wurde freie [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -Linolensäure verwendet. FFS: freie Fettsäure, MGDG: Monogalaktosyldiacylglycerin, DGDG: Digalaktosyldiacylglycerin, SQDG: Sulfoquinovosyl-diacylglycerin, PG: Phosphatidylglycerin.

Aus Abbildung 29 geht hervor, dass es beim Wildtyp zu einem sehr schnellen Einbau der Fettsäure, vorwiegend in MGDG und DGDG, kam. Nach 20 bis 30 Minuten entstand zusätzlich ein Pool an freien Fettsäuren in der Zelle, der sich nach 60 Minuten deutlich auffüllte. Bei der  $\Delta synabc$  Mutante zeigte sich eine sehr viel stärkere Anhäufung der Fettsäure in MGDG und DGDG und auch der Pool an freien Fettsäuren war drastisch erhöht. Diese Akkumulation an toxischer  $\alpha$ -Linolensäure könnte eine Erklärung für den hypersensitiven Phänotyp der Mutante sein. In einem zweiten Versuch sollte die Anhäufung von gefütterter  $\alpha$ -Linolensäure mittels Gaschromatographie bestimmt werden. Über einen Zeitraum von 10 Stunden wurden Wildtyp und Mutanten Zellen mit  $150 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Linolensäure inkubiert und die Fettsäuren als Methylester im Gaschromatographen bestimmt. Hierbei wurden in einem Vorversuch die Peakflächen des  $\alpha$ -Linolensäurepeaks von Wildtyp und  $\Delta synabc$  Mutante verglichen (Abbildung 30). Wie schon bei der Dünnschichtchromatographie zu erkennen, zeigte sich nach 10 Stunden eine starke Anhäufung von  $\alpha$ -Linolensäure in der  $\Delta synabc$  Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 30).

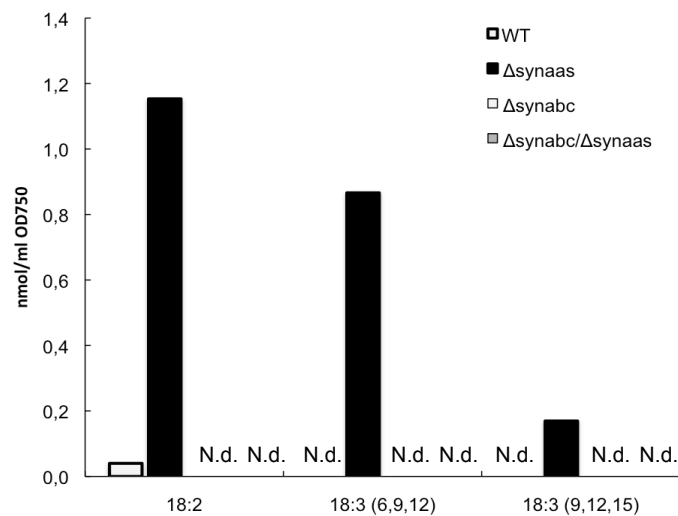
Durch diese Experimente wurden erste Hinweise dafür erbracht, dass das Gen *SynAbc* für einen möglichen Fettsäureexporter kodiert.



**Abbildung 30:  $\alpha$ -Linolensäure Anreicherung im Wildtyp und  $\Delta$ synabc.** *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta$ synabc Zellen wurden für 10 Stunden mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure inkubiert. Gesamtlipide wurden extrahiert, in die Methylester umgewandelt und quantitativ per Gaschromatographie ermittelt.

### 3.21 Die Doppelmutante $\Delta$ synaas/ $\Delta$ synabc sekretiert keine Fettsäuren ins Außenmedium

Wie bereits erwähnt, führt der Defekt im *SynAas* Gen zur Sekretion von freien, mehrfach ungesättigten Fettsäuren ins Außenmedium (Kaczmarzyk und Fulda, 2010). Im folgenden Versuch sollte festgestellt werden, ob durch einen zusätzlichen Defekt im *SynAbc* Gen eine Sekretion der Fettsäuren in der  $\Delta$ synaas Mutante verhindert werden kann. Zu diesem Zweck wurde die Doppelmutante  $\Delta$ synaas/ $\Delta$ synabc hergestellt, die mittels zweier eingebrachter Resistenzen selektiert werden konnte. Bei einer optischen Dichte von 3,0 wurden die Zellen vom Außenmedium durch Zentrifugation separiert und der Fettsäuregehalt des Mediums mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt.



**Abbildung 31: Sekretion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren der  $\Delta$ synaas Mutante.** *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta$ synaas,  $\Delta$ synabc,  $\Delta$ synabc/ $\Delta$ synaas wurden bei optimalen Bedingungen bis zu einer  $OD_{750}$  von 2,0 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Medium getrennt und die Fettsäuren aus dem Medium extrahiert. Die extrahierten Fettsäuren wurden in ihre Methylester umgewandelt und deren Menge mittels Gaschromatographie ermittelt. N.d. : nicht detektierbar.

Die quantitative Auswertung der Daten zeigte, wie bei Kaczmarzyk et al. (2010), eine Anreicherung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Außenmedium der  $\Delta$ synaas Mutante von 2,19 nmol/ml\* $OD_{750}$ . Den größten Anteil mit 1,15 nmol/ml\* $OD_{750}$  machte hierbei die zweifach ungesättigte Linolsäure aus. Interessanterweise waren in der  $\Delta$ synaas/ $\Delta$ synabc Doppelmutante keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Außenmedium detektierbar. Der Wildtyp als Kontrolle zeigte leichte Sekretion von Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure ist jedoch nicht messbar. Im Außenmedium der  $\Delta$ synabc Einzelmutante war keine mehrfach ungesättigte Fettsäure nachweisbar. Es konnte also gezeigt werden, dass durch einen Defekt im *SynABC* Gen die Fettsäuresekretion der  $\Delta$ synaas Mutante unterdrückt wird.

## 4 Diskussion

Bis heute beschränken sich die Erkenntnisse über den Fettsäuretransport auf Modelle aus *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. In höheren Pflanzen ist bislang nur der Fettsäureimport in Peroxisomen weitgehend charakterisiert. Kenntnisse über den Fettsäuretransport in photosynthetischen Cyanobakterien oder den pflanzlichen Chloroplasten basieren bis dato nur auf Hypothesen. Im folgenden Abschnitt soll die Möglichkeit des Fettsäureimports durch vektorielle Acylierung durch das Acyl-aktivierende Enzym SynAas und des Fettsäureexports durch den ABC-Transporter SynAbc diskutiert werden.

### 4.1 Der Defekt im SynAAS Gen schützt die Zelle vor dem toxischen Effekt der $\alpha$ -Linolensäure

Die Behandlung von *Synechocystis* Wildtyp Zellen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren führte zu keinem Wachstum der Zellen auf Festmedium und zu einem Ausbleichen einer grünen Flüssigkultur (Abbildungen 5 und 6). Die Toxizität der Fettsäure steht in Zusammenhang mit der Anzahl der Doppelbindung im Fettsäuremolekül. Gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren zeigten keinen Einfluss auf die Vitalität der *Synechocystis* Zellen, während sich mehrfach ungesättigte Fettsäuren stark negativ auswirkten (Abbildungen 5 bis 9). Der toxische Effekt mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die cyanobakterielle Zelle konnte schon in früheren Publikationen dargestellt werden. So zeigte eine Behandlung der Stämme *Synechococcus* s. PCC 7002 und *Anabaena* sp. PCC 7120 ebenfalls ein Ausbleichen der Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 0,5 mM Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) und  $\alpha$ -Linolensäure (C<sub>18:3</sub>), sowohl bei Belichtung als auch in Dunkelheit (Sakamoto et al., 1998). Diese Tatsache zeigt, dass die Toxizität nicht nur durch phototoxische Effekte, sondern auch durch lichtunabhängige Reaktionen hervorgerufen wird. Die in obiger Studie eingesetzten Konzentrationen überschreiten deutlich die in dieser Arbeit verwendeten  $\alpha$ -Linolensäure-Konzentrationen, zeigten aber, dass massive Konzentrationen an Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>) und Ölsäure (C<sub>18:1</sub>) nicht toxisch für die Cyanobakterien sind, was den Zusammenhang zwischen Grad der Desaturierung einer Fettsäure und deren Toxizität weiter unterstützt.

Die  $\Delta$ *synaas* Zellen ließen keinerlei Wachstumsbeeinträchtigung auf Festmedium mit 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure erkennen. Auch in der Flüssigkultur war kein Ausbleichen der  $\Delta$ *synaas* Zellen zu erkennen, sie verblieben vital und waren zum Wachstum befähigt (Abbildung 6). Da selbst höchste Konzentrationen an  $\alpha$ -Linolensäure keinen Einfluss auf die Wachstumsfähigkeit der Mutante hatten, ist eine komplette Resistenz der  $\Delta$ *synaas* gegenüber mehrfach ungesättigten Fettsäuren anzunehmen (Abbildung 7). Williams et al. (1990) konnten an dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 durch Fütterung langkettiger Fettsäuren wie Ölsäure ( $C_{18:1}$ ) und Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) zeigen, dass eine Aufnahme der Fettsäuren in die Zelle und deren Einbau in endogene Lipide stattfindet (Williams et al., 1990). Somit ist anzunehmen, dass der toxische Effekt der mehrfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb der Zelle wirkt.

Abbildungen 10 und 12 stellen dar, dass eine Anreicherung an freien Fettsäuren in den  $\Delta$ *synaas* Zellen ausblieb. Daher lässt sich die Resistenz als Folge der verhinderten Aufnahme von freien Fettsäuren aus dem Außenmedium erklären. Resistenzen gegenüber toxischen Substanzen durch Defekte in Transportmechanismen sind schon in Prokaryonten und höheren Pflanzen beschrieben. So konnte in *Escherichia coli* gezeigt werden, dass durch einen Defekt des Oligopeptid Transportsystems OppA die Aufnahme von aminoglycosidischen Antibiotika verhindert wird, wodurch eine Resistenz gegenüber Kanamycin und Gentamycin vermittelt wird (Kashiwagi et al., 1998). Ebenfalls führt die Mutation in dem plastidären MAR1 (*Multiple Antibiotics Resistance1*) Transporter in *Arabidopsis thaliana* zur Resistenz gegenüber verschiedener aminoglykosydische Antibiotika. Ein Import in den Chloroplasten, wo es durch die Antibiotika zur Hemmung der prokaryontische Translation kommt, wird durch die Mutation verhindert (Conte et al., 2009). Die Resistenz der  $\Delta$ *synaas* Mutante gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure lässt sich somit ebenfalls durch einen verhinderten Import der toxischen Substanz erklären.

Eine weitere wichtige Erkenntnis konnte aus dem Versuch mit der Doppelmutante  $\Delta$ *synaas*/ $\Delta$ *slr1736* gezogen werden. Die Insertion einer Resistenzkassette im Phytoltransferasegen *Slr1736*, welches essenziell für die Synthese von Tocopherol ist, führte zu einer Hypersensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure und Starklicht (Abbildung 17). Die Akkumulation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Zelle in Verbindung mit einem Überangebot an Lichtenergie führt zur Peroxidation von

Lipiden in *Synechocystis* (Maeda et al., 2005). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind besonders gefährdet, da Wasserstoffatome, die im Fettsäuremolekül in der Nähe von Doppelbindungen vorkommen, anfällig für oxidative Angriffe sind. Durch die im Starklicht gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies erhöht sich die Häufigkeit solcher oxidativer Angriffe. Die hierbei entstehenden Lipidradikale können in einer Kettenreaktion Lipide und Fettsäuren gleichermaßen oxidieren, was zu Membranschädigungen und zum Tod der Zelle führen kann (Niki et al., 2005). Das natürlich vorkommende Antioxidans Tocopherol dient als Radikalfänger und verhindert aufgrund der lipophilen Eigenschaften seiner Prenylgruppe insbesondere die Oxidation von Lipiden (Hunter und Cahoon, 2007). Daher führt ein Defekt in der Tocopherolbiosynthese zu einer gesteigerten Suszeptibilität gegenüber ungesättigten Fettsäuren und Starklicht (Maeda et al. 2005).

Da die Menge an dreifach ungesättigten Fettsäuren unter optimalen Bedingungen in *Synechocystis* recht niedrig war (Abbildung 12, Kontrolle EtOH) (Mironov et al., 2011), schien die alleinige Behandlung mit Starklicht keinen Einfluss auf den Wildtyp und die  $\Delta slr1736$  Mutante zu haben (Abbildung 17). Eine Erhöhung der intrazellulären  $\alpha$ -Linolensäure Konzentration offenbarte jedoch schon bei sehr geringer  $\alpha$ -Linolensäure Konzentration den hypersensitiven Phänotyp der tocopheroldefizienten  $\Delta slr1736$  Mutante. Da die detoxifizierende Wirkung des Tocopherols nur in der Zelle besteht, spricht die Resistenz der  $\Delta synaas/\Delta slr1736$  Doppelmutante bei 20  $\mu$ M dafür, dass der Einstrom der toxischen  $\alpha$ -Linolensäure durch den Defekt im *SynAAS* Gen nahezu komplett unterbunden ist (Abbildung 17). Die Umkehrung der Hypersensitivität der  $\Delta slr1736$  Mutante in eine Resistenz gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure, durch den zusätzlichen Defekt im *SynAAS* Gen ist ein starker Hinweis darauf, dass der Import von freien Fettsäuren durch das Acyl-aktivierende Enzym vermittelt wird und in der  $\Delta synaas$  Mutante ausbleibt.

Ein bemerkenswertes Detail der  $\alpha$ -Linolensäure-Resistenz ist allerdings, dass die Zelle von Außen gegen die Fettsäure geschützt zu sein scheint und dass es nur bei übermäßiger Aufnahme der toxischen Fettsäure in die Zelle zu letalen Auswirkungen kommt. Somit scheinen besonders das intrazelluläre Membransystem der Thylakoide anfällig für die Wirkung von  $\alpha$ -Linolensäure zu sein.

## Wirkung von $\alpha$ -Linolensäure auf die photosynthetische Leistung

Wenn man davon ausgeht, dass die  $\alpha$ -Linolensäure erst innerhalb der Zelle toxisch wirkt, so wären die Thylakoidmembranen für lipophile Substanzen wie Fettsäuren ein wahrscheinlicher Wirkungsort. Die Thylakoidmembranen bilden innerhalb der Zelle ein eigenes Kompartiment. Aufgrund der zwiebelschalenförmigen Stapelung bilden die Thylakoide eine Membranfläche, die die der Plasmamembran bei weitem übersteigt (Abbildung 9). Schon 1972 konnte gezeigt werden, dass ungesättigte Fettsäuren einen negativen Einfluss auf die Funktion von Spinatchloroplasten haben. So führte ein Anstieg an ungesättigten Fettsäuren während der Seneszenz der Pflanze zum Anschwellen des Chloroplasten und zu einer Inhibierung des Elektronenflusses durch die Photosysteme (Siegenthaler, 1972). Isolierte *Arabidopsis thaliana* Chloroplasten zeigten ebenfalls einen schnellen Verlust des Elektronenflusses durch Photosystem II bei Behandlung mit  $\alpha$ -Linolensäure (Kunz et al., 2009). Spezifischer konnte gezeigt werden, dass ungesättigte Fettsäuren sehr schnell an Chloroplasten binden und als guter Inhibitor der Hill Reaktion des Photosystems II dienen können (Krogmann et al., 1959).

Abbildung 8 stellt den Einfluss der  $\alpha$ -Linolensäure auf die Elektronentransportrate im *Synechocystis* Wildtyp dar. Nach vier Stunden Inkubation mit 150  $\mu$ M  $\alpha$ -Linolensäure sankt die Effizienz des Elektronentransports rapide ab. Nach 10 Stunden war kein Elektronentransport durch das Photosystem II mehr messbar. Die Kultur war nach dieser Inkubationszeit noch grün, zeigte sich jedoch nach 24 Stunden komplett ausgebleicht (Abbildungen 5 und 7). Die genaue Wirkungsweise der zur Schädigung der Photosysteme führenden  $\alpha$ -Linolensäure konnte noch nicht ermittelt werden. Es wäre zu vermuten, dass durch die Einlagerung größerer Mengen an freier Fettsäure die Membraneigenschaften stark verändert werden (Abbildung 9). Dadurch scheint eine korrekte Anordnung der Proteinkomplexe und eine ausreichende Energieleitung nicht mehr möglich (Abbildung 8). Außerdem spielt die im vorherigen Abschnitt diskutierte Peroxidation eine entscheidende Rolle.

Eine Stagnation des photosynthetischen Elektronentransports hat verheerende Folgen für die Zelle. Die Energie, die durch die Pigmentmoleküle der Lichtsammelkomplexe zu den Reaktionszentren der Photosysteme geleitet wird, kann dort nicht auf die eigentlichen Akzeptoren übertragen werden. Als Folge übertragen die angeregten Chlorophyllmoleküle Elektronen direkt auf Sauerstoff, was

zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie  $O_2^-$ ,  $^1O_2$  und HO führt (Dat et al., 2000; Van Breusegem und Dat, 2006). Diese reaktiven Sauerstoffspezies sind äußerst aggressiv und oxidieren DNA, Proteine und Lipide, was die Zelle letal schädigen kann (Richter und Schweizer, 1997). Das Ausbleichen der Zellen bei Belichtung lässt sich demnach auch als Folge des gestörten Elektronentransports erklären.

Im Gegensatz zum Wildtyp hatte die  $\alpha$ -Linolensäure jedoch keinen Effekt auf die Elektronentransportrate der  $\Delta synaas$  Mutante, was bedeutet, dass durch den Funktionsverlust des Acyl-aktivierenden Enzyms die Photosysteme vor der toxischen Fettsäure geschützt sind. Zusätzlich war deutlich eine erhöhte Elektronentransportrate der Mutante zu erkennen, wenn man die mit Ethanol (EtOH) behandelten Kontrollen vergleicht (Abbildung 8). Über den Grund kann nur spekuliert werden. So zeigten der Wildtyp und die  $\Delta synaas$  Mutante zwar die gleiche Wachstumsrate (Kaczmarzyk und Fulda, 2010), die  $\Delta synaas$  Mutante sekretierte aber gleichzeitig größere Mengen an freien Fettsäuren ins Außenmedium (Abbildung 31) (Kaczmarzyk und Fulda, 2010), was einen Energieverlust für die Zelle darstellt. Dieser Energieverlust könnte durch die erhöhte Elektronentransportrate und somit vermehrte ATP und NADPH Produktion kompensiert werden. Ein weiterer Grund könnte eine abweichende Pigmentzusammensetzung der  $\Delta synaas$  Mutante sein, wie die unterschiedliche Farbgebung der Zellen in Abbildung 6 erahnen lässt, dies könnte zu einer veränderten Elektronentransportrate führen. Zur Klärung dieser Frage müsste eine detaillierte Untersuchung der Pigmentzusammensetzung von Wildtyp und  $\Delta synaas$  Mutante in weiterführenden Experimenten durchgeführt werden.

### **4.2 Akkumulation von freien Fettsäuren und Strukturveränderung im *Synechocystis* Wildtyp**

Der graduelle Verlust der photosynthetischen Aktivität in den *Synechocystis* Wildtyp Zellen, deutet auf eine kontinuierliche Veränderung der zellulären Strukturen hin. Diese Veränderungen konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta synaas$  Zellen im Verlauf der Inkubation mit  $150 \mu M$   $\alpha$ -Linolensäure gezeigt werden (Abbildung 9). Hierbei kam es insbesondere nach 10 Stunden Inkubationszeit zu einer starken Akkumulation von elektronendichten Substanzen (Abbildung 9). Gleichzeitig war ein Anschwellen und eine Abnahme des



Ordnungsgrades der Thylakoidmembranen zu beobachten. Eine ähnliche Reaktion der Thylakoidmembranen auf  $\alpha$ -Linolensäure konnte ebenfalls an isolierten Spinat Chloroplasten beobachtet werden (Okamoto et al., 1977). Hier zeigte sich, dass der Integritätsverlust der Membranen besonders bei hohen Mengen an  $\alpha$ -Linolensäure auftrat. Nach 30 Minuten Inkubation war die Reaktion teilweise reversibel durch die Zugabe von fettsäurebindendem Bovine Serum Albumin (BSA) (Okamoto et al., 1977), was andeutet, dass die Strukturveränderung durch freie Fettsäuren und nicht durch Abbauprodukte hervorgerufen wird. Durch die Einlagerung von dreifach ungesättigten Fettsäuren wird die Membranstruktur gelockert und die Fluidität der Membran deutlich erhöht, ähnlich der Desaturierung der Lipide zur Akklimatisierung der Zelle gegenüber Kälte (Mironov et al., 2011). Wird die Fluidität der Thylakoidmembran zu stark erhöht, so kam es, wie in Abbildung 8 zu sehen zu einer Abnahme des Elektronentransports, da komplexe Proteininteraktionen gestört werden können. In der  $\Delta$ *synaas* Mutante war diese strukturelle Veränderung des Membransystems nicht zu erkennen. Die  $\Delta$ *synaas* Zellen zeigten dicht gepackte Thylakoidmembranen und keine Akkumulation an elektronendichten Substanzen nach 10 Stunden Inkubation mit  $\alpha$ -Linolensäure.

Die im Wildtyp auftretenden elektronendichten Substanzen konnten mittels einer Dünnschichtchromatographie als hauptsächlich aus freien Fettsäuren bestehend identifiziert werden (Abbildung 15). Die Dünnschichtchromatographie offenbarte zusätzlich eine Anreicherung an verschiedenen Lipidspezies im *Synechocystis* Wildtyp. So erhöhte sich der Level an MGDG, SQDG und PG über die Zeit. Eine weitere Bande einer unpolaren Lipidart erschien nach 6 Stunden über der MGDG Bande (Abbildung 15). MGDG von *Synechocystis* beinhaltet zum Großteil  $C_{18}$ -Fettsäuren an der *sn-1* Position und  $C_{16}$ -Fettsäuren an der *sn-2* Position (Wada und Murata, 1990). Williams et al. (1990) konnten allerdings in Cyanobakterien zeigen, dass bei einem Überangebot exogener  $C_{18}$ -Fettsäuren auch die *sn-2* Position des Glycerin Rückgrates mit der gefütterten Fettsäure verestert werden kann (Williams et al., 1990). Vermittelt wird diese Reaktion in *Synechocystis* durch die Lysophosphatidsäure-Acyltransferasen (LPAAT) (Okazaki et al., 2006). Durch die Inkubation mit freien  $C_{18}$ -Fettsäuren könnte es somit sein, dass sich MGDGs bilden die an beiden *sn*-Positionen  $C_{18}$ -Fettsäuren tragen und dadurch unpolarer werden als MGDG mit  $C_{18}$ -Fettsäuren an der *sn-1* Position und  $C_{16}$ -Fettsäuren an der *sn-2* Position, was die zweite unbekannte Bande erklären könnte. Eine weitere Bande

erschien nach 6 Stunden kurz über dem Auftragsort, was besagt, dass dieses Lipid sehr polar sein muss. Es könnte sich hierbei um Trigalaktosyldiacylglycerin (TGDG) handeln, da es durch die Verknüpfung mit einem dritten Galaktoserest deutlich polarer wäre als DGDG. Unter normalen Bedingungen konnte jedoch in *Synechocystis* keine TGDG nachgewiesen werden (Sakurai et al., 2006), während es in Thylakoidmembranen von Spinat zu geringen Anteilen vorkommt (Dorne et al., 1990). Die Fähigkeit Fettsäuren aufzunehmen und sie in Lipide zu integrieren könnte der Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber Zellen ohne Importmechanismus verschaffen. Die Fettsäurekonzentration im Süßwasserhabitat von *Synechocystis* wird aber höchstwahrscheinlich gering sein.

Wie bereits diskutiert, zeigte die  $\Delta$ *synaas* Mutante keine Reaktion auf die Behandlung mit  $\alpha$ -Linolensäure. Bis auf eine leichte Erhöhung an freien Fettsäuren nach 6 Stunden, gab es keine Änderung in der Lipidzusammensetzung der  $\Delta$ *synaas* Zelle (Abbildung 15). Dieses Experiment machte deutlich, dass durch die fehlende Funktion des Acyl-aktivierenden Enzyms ein Einbau der exogenen Fettsäure in die Lipide nicht möglich war und unterstreicht die Tatsache, dass freie Fettsäuren für den Metabolismus nicht zugänglich sind, solange sie nicht durch Veresterung mit Coenzym A oder dem Acyl-Carrier Protein aktiviert wurden. Diese Aussage konnte in Abschnitt 3.10 noch gestärkt werden. Hier konnte erneut gezeigt werden, dass radioaktiv markierte Fettsäuren im Wildtyp in verschiedene Lipidspezies eingebaut werden (Abbildung 14). Die  $\Delta$ *synaas* Mutante hingegen offenbarte keine Radioaktivität in den extrahierten Lipiden. Entscheidend ist hier die Erkenntnis, dass keine markierten freien Fettsäuren in der Mutante zu detektieren waren. Dies ist ein Hinweis dafür, dass das Acyl-aktivierende Enzym aus *Synechocystis* nicht nur an der Aktivierung von freien Fettsäuren beteiligt ist, sondern auch benötigt wird, um Fettsäuren in die Zelle aufzunehmen. Somit erscheint hier eine gekoppelte Reaktion mit Transfer über die Membran und Aktivierung der freien Fettsäure vorzuliegen.

Durch Fütterung von  $\alpha$ -Linolensäure und dem Stearinsäurederivat BODIPY D3823 konnte eine starke Akkumulation der jeweiligen Fettsäure in den *Synechocystis* Wildtyp Zellen nachgewiesen werden (Abbildungen 11B und 12). Die Anhäufung war so massiv, dass nach 8 Stunden Inkubation die  $\alpha$ -Linolensäure als häufigste Fettsäure in der Zelle vorlag (Abbildung 12). Mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, dass die gefütterte Fettsäure in

die Lipide integriert wurde beziehungsweise zum großen Teil als freie Fettsäure in den Zellen akkumulierte (Abbildung 15). Daraus, dass eine Anhäufung an Fettsäuren in den *ΔsynAas* Zellen ausblieb, lässt sich schließen, dass für die Aufnahme der Fettsäure in die Zelle die Aktivierung mit dem Acyl-Carrier Protein essenziell ist. Die Aktivierung mit ACP macht die Fettsäure zugänglich für enzymatische Reaktionen. *Synechocystis* scheint keine vollständige  $\beta$ -Oxidation zu besitzen, so findet sich zwar ein Homolog zur Ketoacyl-Thiolase 2 aus *Arabidopsis thaliana* (Beevers, 1961), es fehlen allerdings die restlichen  $\beta$ -Oxidationsenzyme (KEGG-Pathways). Ebenfalls existiert kein Homolog einer ACP-Thioesterase, die eine Abspaltung der Fettsäure vom Acyl-ACP katalysieren würde (Kaczmarzyk und Fulda, 2010). Somit erscheint die Einbindung in die Lipide als einzige metabolische Reaktion der aktivierten Fettsäure in *Synechocystis*. Dieser Mechanismus würde auch die Erhaltung des freien ACP Pools gewährleisten, der benötigt wird, um den anhaltenden Einstrom der Fettsäuren zu vermitteln (Abbildung 13). Denkbar wäre, dass der Organismus mit der Expression einer Lipase reagiert, um zur Erhaltung der Membraneigenschaften ungesättigte Fettsäuren aus den Lipiden zu entfernen. So wäre die starke Akkumulation von freier  $\alpha$ -Linolensäure (Abbildung 12 und 15) zu erklären. Ein deutlicher Hinweis für diese These zeigt sich in Abbildung 14. Die Tatsache, dass das radioaktiv markierte Signal zuerst in den MGDG Lipiden zu finden war und erst nach 20 Minuten als freie Fettsäure auftauchte, legt nahe, dass die Lipide der Ursprung der akkumulierten freien Fettsäuren sind. Die Ausbildung von Fetttröpfchen, die in den EM-Bildern zu sehen sind (Abbildung 15), könnten die eingelagerten Fettsäuren unzugänglich für die enzymatische Aktivierung der SynAas machen. Dies würde erklären, warum die freigesetzten Fettsäuren nicht erneut durch SynAas aktiviert werden und es nicht nach kurzer Zeit zu einer Auslastung der Enzyme kommt, was den Einstrom von freien Fettsäuren verhindert würde.

#### **4.3 Ein Defekt im Fettsäuretransportmechanismus in *Saccharomyces cerevisiae* vermittelt Resistenz gegenüber $\alpha$ -Linolensäure**

Zur weiteren Untersuchung der Eigenschaft von Acyl-aktivierenden Enzymen, freie Fettsäuren über Membranen zu transferieren wurden Hefen mit einem Defekt im Fettsäuretransportkomplex auf Toxizität gegenüber freien Fettsäuren getestet. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, besteht der Komplex aus drei Enzymen FAT1, FAA1 und FAA4. Beschrieben wurde ein Modell, in dem FAT1 den Transport der

Fettsäure über die Membran vermittelt und die beiden assoziierten Acyl-CoA Synthetasen FAA1 und FAA4 die anschließende Aktivierung der Fettsäure gewährleisten; dieser Prozess wurde vektorielle Acylierung genannt (Obermeyer et al., 2007).

Trotz der Möglichkeit von *Saccharomyces cerevisiae* die aufgenommenen Fettsäuren in der  $\beta$ -Oxidation in Energie umzuwandeln, zeigte sich hier ebenfalls eine letale Wirkung der  $\alpha$ -Linolensäure auf den *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp. Erstaunlicherweise offenbarten die Insertionsmutanten denselben Resistenzphänotyp wie die *Synechocystis*  $\Delta$ *synaas* Mutante. Abbildung 20 macht deutlich, dass die  $\Delta$ *fat1*,  $\Delta$ *faa1* und  $\Delta$ *faa4* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Aufnahme des Fettsäurederivates BODIPY D3824 aufwiesen.

Aus vorausgegangenen Studien geht hervor, dass bei Hemmung der Fettsäurebiosynthese durch Cerulenin, der Wildtyp exogenes Oleat aus dem Medium aufnehmen und zum Aufbau der Membranlipide nutzen kann (Faergeman et al., 1997). Die Mutanten  $\Delta$ *fat1*,  $\Delta$ *faa1* und  $\Delta$ *faa4*, durch den Defekt im Importmechanismus unfähig Oleat zu importieren, können nicht auf Medium mit Cerulenin und Oleat wachsen (Faergeman et al., 1997, 2001). In den hier durchgeführten Versuchen, führte der deutlich verminderte Import allerdings zu einer Resistenz gegenüber hohen Konzentrationen toxischer  $\alpha$ -Linolensäure.

#### **4.4 Überexpression von SynAAS in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu Sensitivität gegenüber $\alpha$ -Linolensäure**

Der Funktionsverlust des Hefe-Fettsäuretransportproteins FAT1 führte zu einer stark verminderten Aufnahme an freien Fettsäuren aus dem Außenmedium (Abbildung 20). Um zu zeigen, dass SynAAS befähigt ist Fettsäuren über die Plasmamembran zu transferieren ohne die Mitwirkung eines Transportproteins, wurden SynAAS Überexpressionslinien im *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp und der  $\Delta$ *fat1* Mutante hergestellt (Abbildung 21A). Der Wachstumstest auf Festmedium mit 0,1%  $\alpha$ -Linolensäure machte deutlich, dass sowohl im Wildtyp als auch in der  $\Delta$ *fat1* Mutante die Sensitivität gegenüber der toxischen Fettsäure durch die Überexpression von SynAAS erhöht wurde (Abbildung 22). Wie bereits für *Synechocystis* diskutiert, könnte auch bei diesem Versuch ein erhöhter Import der toxischen Fettsäure Grund für die Sensitivität der Zellen sein. Eine erhöhte Aufnahme des Fettsäurederivates

BODIPY D3823 durch Überexpression der „Long-chain-Acyl-CoA-Synthetasen“ LACS1, LACS2 und LACS3 aus *Arabidopsis thaliana* konnte bereits im *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp und in der  $\Delta fat1$  Mutante gezeigt werden (Pulsifer et al., 2012). Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass der Wachstumsphänotyp der  $\Delta fat1$  Mutante auf Platten, mit Oleat als einzige Fettsäurequelle und Cerulenin als Fettsäuresyntheseinhibitor, durch die Überexpression der LACS Enzyme geringfügig verbessert werden konnte (Pulsifer et al., 2012).

Durch die Zugabe von Glukose zum Festmedium, konnte der Sensitivitätsphänotyp der Überexpressionslinien abgeschwächt werden. Es ist anzunehmen, dass der Fettsäuretransport an Bedeutung verliert, sobald eine ausreichende Menge an Glukose im Medium vorhanden ist und somit die drei Fettsäuretransportkomponenten transkriptionell oder post-transkriptionell reguliert werden. Jedoch blieb besonders bei der WT/SynAAS Linie eine deutliche Sensitivität gegenüber dem Wildtyp zu erkennen. Scheinbar wird zusätzlich zu dem funktionierenden Importkomplex durch die Überexpression von SynAAS vermehrt  $\alpha$ -Linolensäure in die Zelle transportiert, was zu der beobachteten Hypersensitivität führt (Abbildung 22).

#### **4.5 In Membranen eingebettete freie Fettsäure dient als Substrat für SynAAS**

Damit der Mechanismus der vektorialen Acylierung funktioniert, muss das Substrat, in diesem Fall die Fettsäure, auf einer Seite des Gleichgewichts entzogen werden und durch Aktivierung dem Metabolismus zugänglich gemacht werden. Durch die Aufreinigung von SynAas (Abbildung 24A), konnte dessen Reaktion *in vitro* analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivität des Enzyms und Zugabe an Energie in Form von ATP, freie Fettsäuren in die wasserlöslichen Acyl-ACP Ester umgewandelt werden konnte (Abbildungen 25 und 26). Es zeigte sich eine 36-fache Erhöhung an Acyl-ACP in der wasserlöslichen Fraktion im Vergleich zum Ansatz ohne den Energielieferanten ATP oder das Co-Substrat ACP (Abbildung 25). Die Möglichkeit des Enzyms die Fettsäure in einen anderen Löslichkeitszustand zu überführen wurde durch diesen Versuch bestätigt. Dieses Ergebnis war Voraussetzung für die Entwicklung eines liposomenbasierten Versuchsansatzes, der zum Ziel hatte, die vektorielle Acylierung durch SynAas direkt zu charakterisieren.

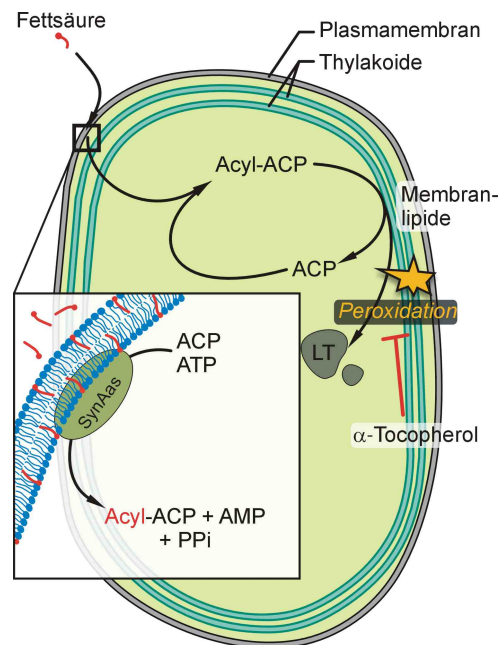
In Abschnitt 3.17 konnte mit Hilfe dieses neu entwickelten Ansatzes gezeigt werden, dass SynAAS membrangebundene freie Fettsäuren als Substrat verwenden kann (Abbildung 27). Die lipophilen Eigenschaften freier Fettsäuren sorgen für eine starke Einlagerung in liposomale Membranen (Hamilton, 1999). Bei Zugabe des Acyl-aktivierenden Enzyms und ATP zu den beladenen Liposomen stieg die Menge an gebildetem Acyl-ACP im Überstand um das fünffache an (Abbildung 27A). Komplementär dazu nahm die markierte Fettsäuremenge in der Liposomenfraktion in gleichem Maße ab, wenn ATP im Ansatz war. Diese beiden Versuche machen deutlich, dass das Acyl-aktivierende Enzym SynAAS die Grundprinzipien der vektoriellen Acylierung als Transportsystem vereint, nämlich die Fähigkeit des Entzugs der Fettsäure aus der Membran und die Überführung in ein wasserlösliches Intermediat.

### **4.6 Modell für den Import von freien Fettsäuren in *Synechocystis***

Um Fettsäuren mittels vektorieller Acylierung über die Membran zu transferieren, sind drei Eigenschaften des Acyl-aktivierenden Enzyms essenziell. Erstens muss das Enzym membranassoziiert vorliegen. In Abschnitt 3.12 konnte zum einen Acyl-aktivierende Aktivität in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Zum anderen zeigte die Überexpression des SynAAS/GFP Fusionsproteins in den Hefezellen eine Lokalisation an der Plasmamembran (Abbildung 21B). Darüber hinaus konnte SynAAS im Rahmen einer Proteom Studie in der Plasmamembranfraktion detektiert werden (Pisareva et al., 2007). Zusätzlich zeigen die SynAas Homologe AAE15 und AAE16 aus *Arabidopsis thaliana* ebenfalls keine Membranspannen, wurden aber zur Charakterisierung aus der Membranfraktion aufgereinigt (D. Kaczmarzyk Dissertation, Universität Göttingen, 2008). Als zweite Eigenschaft muss das Enzym die Fettsäure durch die Aktivierung in die wasserlösliche Phase überführen können. Die Veresterung der Fettsäure mit ACP konnte im SDS-Gel dargestellt werden (Abbildung 26). Überdies konnte eine starke Anreicherung von wasserlöslichem Acyl-ACP durch die Aktivität des Enzyms sichergestellt werden (Abbildung 25). Zusätzlich konnte Kaczmarzyk et al. (2010) zeigen, dass nicht nur  $\alpha$ -Linolensäure, sondern auch Fettsäuren variabler Länge aktiviert werden können und somit ein allgemeiner Import von Fettsäuren durch SynAas vermittelt werden kann. Als dritte Eigenschaft müssen freie Fettsäuren, die in die Membran eingebettet sind, als Substrat für das Enzym dienen können. Durch die Einbettung freier Fettsäuren in liposomale

Membranen, wurde offensichtlich das SynAAs diese Reaktion katalysieren kann (Abbildung 27).

Fasst man nun die gesammelten Ergebnisse zusammen, so ergibt sich ein Modell für den Importmechanismus freier Fettsäuren in *Synechocystis* (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Modell des Fettsäuretransports in *Synechocystis*.** Freie Fettsäuren wie  $\alpha$ -Linolensäure integrieren sich in die Plasmamembran und werden anschließend durch metabolische Aktivierung mittels SynAas (Ausschnitt) auf der cytosolischen Seite aus der Membran entfernt. Der schnelle Einbau der aktivierten Fettsäure in die Membranlipide erhält den Pool an freiem ACP. Große Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Membran führen zu Lipid Peroxidation, die zum größten Teil durch  $\alpha$ -Tocopherol verhindert werden kann. Bei übermäßiger Aufnahme an exogener Fettsäure, akkumuliert freie Fettsäure in der Zelle (LT: Lipid Tröpfchen).

Freie Fettsäuren im Außenmedium lagern sich in die Plasmamembran ein, durch die Einbettung in die Lipidmembran verändert sich die Ionisierung der Carboxygruppe was eine Protonierung der Fettsäure begünstigt ( $pK_a$  7,6) (Ptak et al., 1980). Protonierte Fettsäuren können sich extrem schnell zwischen den beiden Hälften der Lipiddoppelschicht hin- und herbewegen (Kamp et al., 1995). Somit wird die Fettsäure von der cytosolischen Seite aus erreichbar. Die enzymatische Reaktion von SynAas löst die unveresterte Fettsäure aus der Plasmamembran und etabliert durch deren kontinuierliche Aktivierung einen Konzentrationsgradienten, der den Einstrom von Fettsäuren in die Zelle begünstigt. Das lösliche Acyl-ACP wird durch Acyltransferasen in die Lipide eingebaut. Zwei putative Acyltransferasen sind im *Synechocystis* Genom codiert. SII1848 und SII1752 wurden als Lysophosphatidsäure Acyltransferase (LPAAT) charakterisiert, wobei SII1848 die Hauptaktivität zur

Veresterung der *sn*-2 Position von Lysophosphatidsäure (LPA) mit C<sub>16</sub>-Fettsäuren zukommt (Okazaki et al., 2006). Mit geringer Aktivität wird durch Sll1752 die *sn*-2 Position von LPA mit C<sub>18:0</sub> und C<sub>18:1</sub> Fettsäuren verestert (Weier et al., 2005). Eine Acyl-ACP:Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase konnte in *Synechocystis* noch nicht identifiziert werden.

Der Einbau in die Lipide erhält den Pool an freiem ACP, was einen kontinuierlichen Einstrom an Fettsäuren gewährleistet. Jedoch zeigt sich auch, dass ein übermäßiger Einbau an ungesättigten Fettsäuren zur Peroxidation der Lipide und zur Schädigung der Zelle führt. Die Peroxidation konnte teilweise durch Tocopherol verhindert werden (Abbildung 32). Es ist anzunehmen, dass die massive Anreicherung an freien Fettsäuren in der Zelle durch die Aktivität einer Lipase hervorgerufen wird, um die Eigenschaften der Thylakoidmembran zu erhalten. Eine Sekretion freier Fettsäuren zum Schutz der Zelle, wie von Kaczmarzyk beschrieben (Kaczmarzyk und Fulda, 2010), ist anzunehmen, doch scheint die Rate zu gering, um die Akkumulation in der Zelle zu verhindern. Der Mechanismus der vektorialen Acylierung hat einen Vorteil gegenüber dem Fettsäuretransport durch einen ABC-Transporter. Beim Fettsäuretransport über ABC-Transporter wird ein Molekül ATP beim Transport und ein weiteres bei der Aktivierung der Fettsäure verbraucht. Dadurch, dass der Transfer und die Aktivierung gekoppelt sind, wird bei der vektorialen Acylierung pro transportierter Fettsäure ein ATP Molekül weniger verbraucht.

### 4.7 Fettsäuretransport im Chloroplasten

Überträgt man das Modell von *Synechocystis* auf den Chloroplasten höherer Pflanzen, so könnten im Chloroplasten synthetisierte Acyl-ACP Ketten, durch die Aktivität einer Thioesterase als freie Fettsäure in die innere Chloroplastenmembran eingelagert werden. Die stromalokalisierten ACP-Thioesterasen FatA1 und FatB1 vermitteln diese Reaktion (Jones et al., 1995). Die protonierte Fettsäure wechselt die Membranschicht und ist im Intermembranraum zugänglich für Acyl-aktivierende-Enzyme. LACS9 gilt als Kandidat, um die Veresterung der freien Fettsäure mit Coenzym A zu vermitteln, jedoch kommen ebenfalls redundante LACS Enzyme in Frage (Schnurr et al., 2002; Koo et al., 2004). Der Acyl-Rest könnte im Intermembranraum durch in der Außenmembran lokalisierte Lysophosphatidylcholin Acyltransferase (LPCAT) direkt zu Phosphatidylcholin umgesetzt werden (Tjellström et al., 2011). In Blättern der „18:3- Pflanze“ Erbse konnte gezeigt werden, dass 90%



der *de novo* synthetisierten Fettsäure unmittelbar in Phosphatidylcholin auftauchen (Bates und Ohlrogge, 2007). Phosphatidylcholin kommt hauptsächlich in der äußeren Membran des Chloroplasten vor (Dorne et al., 1985) und könnte als Überträger von neusynthetisierten Fettsäuren von der Außenmembran zum endoplasmatischen Retikulum dienen. Die Identität vieler molekularer Komponenten in diesem Prozess sind noch unbekannt, jedoch könnte die vektorielle Acylierung für den Transport der Fettsäure über die innere Membran ein wichtiger Bestandteil dieses Mechanismus sein.

#### **4.8 SynABC ist ein putativer Fettsäureexporter in *Synechocystis***

Der Import von freien Fettsäuren in *Synechocystis* konnte durch die Aktivität des Acyl-aktivierenden Enzyms SynAas mittels vektorieller Acylierung erklärt werden. Von Kaczmarzyk und Fulda (2010) konnte gezeigt werden, dass bei einem Funktionsverlust von SynAas freie Fettsäuren ins Außenmedium sekretiert werden. Somit muss es einen Exportmechanismus geben, der diese Sekretion vermittelt. In *Arabidopsis thaliana* konnte PXA1 als peroxisomaler Fettsäuretransporter charakterisiert werden (Hayashi et al., 1998; 2002). In PMP1 (At1g54350) konnte zusätzlich ein plastidär lokalisierter „half size“-ABC-Transporter gefunden werden. Die Funktion von PMP1 konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

Das Homolog zu PMP1 in *Synechocystis* ist SynAbc und codiert ebenfalls für einen „half size“-ABC Transporter. Die Funktionsverlust Mutante  $\Delta synabc$  zeigte auf Platten mit  $\alpha$ -Linolensäure ein verringertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 28). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass SynAbc nicht am Import von Fettsäuren beteiligt ist wie anfangs erwartet. Vielmehr zeigten die Dünnschichtchromatographie und die Messung der zellulären Fettsäuren nach Fütterung von  $\alpha$ -Linolensäure eine verstärkte Akkumulation der Fettsäure in den  $\Delta synabc$  Zellen (Abbildung 29 und 30), was auf einen Defekt im Exportmechanismus hindeuten könnte. Weitere Hinweise, dass SynAbc am Export von Fettsäuren beteiligt ist, ergaben sich durch die Analyse der  $\Delta synaas/\Delta synabc$  Mutante. Durch den Defekt im Acyl-aktivierenden Enzym SynAas, kam es zu einer starken Sekretion an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ins Außenmedium im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 31). Kaczmarzyk und Fulda (2010) stellten die These auf, dass in der Zelle entstehende freie Fettsäuren durch SynAas aktiviert und so recycelt werden können. Bei der  $\Delta synaas$  Mutante fehlt dieser Recyclingprozess. Da die Fettsäuren nicht für den weiteren Metabolismus

zugänglich gemacht werden können, werden sie ins Außenmedium exportiert. Durch den zusätzlichen Defekt in dem ABC-Transporter SynAbc konnte diese Sekretion in der  $\Delta synaas/\Delta synabc$  Doppelmutante vollständig verhindert werden (Abbildung 31). In Zellen der  $\Delta synabc$  Einzelmutante resultierte der SynAbc Funktionsverlust in einer Akkumulation von gefütterten Fettsäuren (Abbildungen 29 und 30).

Die Einzelmutante  $\Delta synabc$  zeigte außerdem, wie der Wildtyp, keine Sekretion an freien Fettsäuren. Wird die Sekretion der  $\Delta synaas$  Mutante durch den zusätzlichen Funktionsverlust im SynAabc Gen verhindert, so sollte es zu einer Anreicherung an endogenen, freien Fettsäuren in der Zelle kommen, die in hohen Mengen toxisch wirken würden. Ein Absterben der Zellen konnte allerdings nicht beobachtet werden, was andeutet, dass die Mengen an Fettsäuren, die in der Zelle generiert werden, nicht ausreichen, um eine toxische Konzentration zu erreichen.

Es bleibt die Frage, warum ein Einzeller einen Fettsäureexporter besitzt. Die Sekretion von langkettigen Fettsäuren stellt ohne Frage einen gewaltigen Energieverlust für die Zelle dar. Im *Synechocystis* Wildtyp wird dieser Verlust durch die Reaktivierung freier, endogener Fettsäuren durch SynAas minimiert (Kaczmarzyk und Fulda, 2010), so dass es unter Normalbedingungen keine Sekretion von Fettsäuren gibt (Abbildung 31). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von Starklicht ( $300\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu einer Erhöhung an peroxidierten Fettsäuren im Außenmedium kommt (Maeda et al., 2005). Somit könnte der Sekretionsmechanismus der Zelle zum Schutz vor peroxidierten Fettsäuren in der Zelle dienen, die bei Starklicht entstehen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass hauptsächlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren sekretiert werden, welche besonders anfällig für Peroxidation sind (Abbildung 31).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Abnahme an dreifach ungesättigten Fettsäuren in der *Synechocystis* Membran kommt, sobald die Zellen von  $22^\circ\text{C}$  auf  $44^\circ\text{C}$  erwärmt wurden (Sheng et al., 2011). Da es höchst wahrscheinlich keine  $\beta$ -Oxidation in Cyanobakterien gibt, stellt sich die Frage, was mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren geschieht, wenn sich der Organismus an wärmere Bedingungen anpasst. Spekulativ könnten diese aus der Membran entfernt und durch SynAbc ins Außenmedium sekretiert werden, zum Schutz der Zelle und um die Eigenschaften der Membran zu bewahren.

Evolutionär könnte sich ein Homolog von SynAbc in höheren Pflanzen zu einem Fettsäureexporter entwickelt haben. PMP1 wäre ein guter Kandidat dafür. Die Funktion von PMP1 aus *Arabidopsis thaliana* scheint allerdings nicht essenziell zu sein, da die T-DNA Insertionsmutante *pmp1* keine Beeinträchtigung des Wachstums zeigt.

Unter biotechnologischen Gesichtspunkten, wäre die weitere Charakterisierung des SynAbc Transporters von großem Interesse. Cyanobakterien eignen sich auf Grund des schnellen Wachstums und der Möglichkeit aus Licht und CO<sub>2</sub> energiereiche Kohlenstoffverbindungen wie Fettsäuren herzustellen, als potentieller Produzent von Biodiesel.

Durch die Einführung einer ACP-Thioesterase aus *E. coli* in die  $\Delta$ *synaas* Mutante wurde eine massive Sekretion an freien Fettsäuren ins Außenmedium erreicht (Liu et al., 2010). Durch einen weiteren Methylierungsschritt können die Fettsäuren zu Biodiesel umgewandelt werden. Die Sekretion der Fettsäuren könnte eventuell durch eine Überexpression des SynABC Transporters weiter erhöht werden, und somit die Effektivität der Biodieselproduktion steigern.

## 5 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse über den Import von freien Fettsäuren im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gesammelt werden. Nähere Untersuchungen des Acyl-aktivierenden Enzyms SynAas deuten darauf hin, dass in *Synechocystis* freie Fettsäuren durch vektorielle Acylierung in die Zelle importiert werden. Zusätzlich konnte mit SynAbc ein putativer Fettsäureexporter identifiziert werden, der eine Rolle zum Schutz der Zelle vor Hydroperoxiden spielen könnte.

Interessant wäre es nun, die gesammelten Erkenntnisse auf höhere photosynthetische Organismen zu übertragen. Genannt werden kann hier zum Beispiel die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, die unter Stickstoffmangel große Mengen an industriell wertvollem Triacylglycerin (TAG) produziert (Wang et al., 2009). Das *Chlamydomonas* Genom kodiert für vier Homologe von SynAAS und nur eines enthält eine vorhergesagte plastidäre Lokalisierungs-Sequenz (ChloroP 1.1 Prediction Server). Studien an einer Funktionsverlust Mutante in diesem Acyl-aktivierenden Enzym, in Bezug auf die TAG Produktion, könnte die Bedeutung von Acyl-aktivierenden Enzymen beim Fettsäuretransport weiter unterstreichen. In einem biotechnologischen Ansatz könnte durch eine Überexpression dieses Enzyms die Akkumulation an TAG unter Stickstoffmangel möglicherweise erhöht werden.

In höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, sind die Mechanismen des Fettsäureexports des Chloroplasten weiterhin kaum bekannt. Um diesem Mechanismus näher zu kommen, könnte durch eine Blockade des „prokaryontischen-Weges“ ein erhöhter Export von freien Fettsäuren aus dem Chloroplasten erreicht werden. Diese Blockade kann durch die Mutation des plastidären Acyl-ACP:Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase Gens (*ATS1*) bewirkt werden (Kunst et al., 1988; Xu et al., 2006). Kandidaten des Fettsäure Exportmechanismus in *Arabidopsis* könnten durch eine Microarrayanalyse identifiziert werden. Hierbei sollte eine vergleichende Expressionsanalyse von Wildtyp und *ats1* Mutante in Gewebe mit hohem Bedarf an Lipid-Neusynthese, zum Beispiel junge Blätter oder sich entwickelnde Schoten untersucht werden. Des Weiteren könnten *Arabidopsis* Doppelmutanten zwischen *ats1* und *lacs9* oder dem

plastidären PXA1 Homolog *pmp1* Aufschluss über dessen Rolle im Fettsäureexport geben.

Weitere Untersuchungen des SynABC Transporters sind von Nöten um die Funktion des Fettsäureexports in *Synechocystis* zu verstehen. Beispielsweise könnte durch eine Überexpression des Transporters die Fettsäuremenge im Außenmedium gesteigert werden. Die Charakterisierung des Fettsäureexporters birgt wirtschaftliches Potential, da fettsäuresekretierende Cyanobakterien eine günstige Methode zur Biodieselproduktion darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Fettsäuretransport über biologische Membranen ist ein weitgehend uncharakterisierter Prozess. In einzelligen Organismen wie *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* wird der Mechanismus der vektorialen Acylierung durch Acyl-aktivierende Enzyme als Transportmechanismus für freie Fettsäuren diskutiert. In dieser Arbeit wurde die einzige Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetase (SynAas) im einzellige Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Bezug auf Fettsäuretransport untersucht. Interessanterweise zeigte eine Funktionsverlustmutante im SynAas Enzym in *Synechocystis* eine hochgradige Resistenz gegen hohe Konzentrationen  $\alpha$ -Linolensäure. Der Wildtyp hingegen zeigte eine starke Anreicherung an  $\alpha$ -Linolensäure in den Lipiden und als freie Fettsäure in der Zelle. Zusätzlich offenbarten sich nach 10 Stunden strukturelle Veränderungen der Thylakoidmembran und eine deutliche Verringerung der Elektronentransportrate. Nach 24 Stunden kam es zum kompletten Ausbleichen und Absterben der Wildtyp Zellen. Diese Effekte der  $\alpha$ -Linolensäure blieben bei der  $\Delta$ *synaas* Mutante aus, was darauf schließen lässt, dass eine Aufnahme der toxischen Fettsäure durch den Funktionsverlust von SynAas verhindert wird. *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp Zellen zeigten ebenfalls reduziertes Wachstum auf erhöhten  $\alpha$ -Linolensäure Konzentrationen, während der Funktionsverlust des charakterisierten Fettsäuretransporters FAT1p  $\alpha$ -Linolensäure resistentes Wachstum zeigte. Durch die Überexpression des SynAas Enzyms im Hefe Wildtyp und der  $\Delta$ *fat1* Mutante, konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure erreicht werden, was für eine zusätzliche Aufnahme der toxischen Fettsäure in die Hefezelle durch SynAas spricht. In einem neuentwickelten Liposomenassay konnte gezeigt werden, dass SynAas in Membranen eingebundene Fettsäuren als Substrat nutzen kann. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, dass das Acyl-aktivierende Enzym SynAas, Fettsäureimport durch vektorielle Acylierung vermitteln kann. Aus den erhaltenen Daten wurde ein Modell entwickelt, das die Aufnahme und den weiteren Metabolismus von  $\alpha$ -Linolensäure in *Synechocystis* beschreibt. Weiterhin konnte im ABC-Transporter SynAbc ein putativer Fettsäureexporter in *Synechocystis* gefunden werden. Die  $\Delta$ *synabc* Funktionsverlust Mutanten zeigte erhöhte Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure und akkumulierte große Mengen an exogen

aufgenommener Fettsäure im Vergleich zum Wildtyp. Die  $\Delta$ *synaas* Mutante sekretiert freie Fettsäuren ins Außenmedium. Diese Sekretion konnte durch einen zusätzlichen Defekt des *SynAbc* Gens verhindert werden, was Grund für die Annahme ist, dass *SynAbc* Fettsäureexport in *Synechocystis* vermittelt.

## 7 Abstract

Transfer of fatty acids across biological membranes is a largely uncharacterized process. In unicellular organisms, like *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae* vectorial acylation by acyl-activating enzymes is discussed as mechanism for fatty acid transport. In the present work, studies on the only acyl-acyl-carrier protein synthetase SynAas of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with regard to fatty acid transport were performed. Cells deficient in SynAas were highly resistant to externally provided  $\alpha$ -linolenic acid. Upon treatment with external  $\alpha$ -linolenic acid the wild type showed continuous accumulation of  $\alpha$ -linolenic acid in cellular lipids and as free fatty acid in the cell. Long-term incubation with  $\alpha$ -linolenic acid for 10 hours led to structural changes in the integrity of thylakoid membranes and a dramatic increase in electron transport rate (ETR) in wild type cells. After 24 hours of incubation the accumulation resulted in bleaching and dying of the wild type cells, whereas the loss of function mutant  $\Delta$ *synaas* was completely unaffected by this treatment. Furthermore, *Saccharomyces cerevisiae* wild type cells displayed sensitivity against  $\alpha$ -linolenic acid, whereas the “loss of function” mutant in the fatty acid importer FAT1p showed resistance upon  $\alpha$ -linolenic acid incubation. Heterologous expression of SynAas in yeast wild type and  $\Delta$ *fat1* mutant cells resulted in an increased sensitivity against exogenous  $\alpha$ -linolenic acid, which implies elevated levels of uptake of toxic  $\alpha$ -linolenic acid through SynAas. In addition, liposome assays provided direct evidence for the ability of purified SynAas protein to mediate [ $^{14}$ C]- $\alpha$ -linolenic acid retrieval from preloaded liposome membranes. Taken together, the data show that the acyl-activating enzyme SynAas is necessary and sufficient to mediate transfer of fatty acids across a biological membrane. These facts were used to derive a model for  $\alpha$ -linolenic acid uptake and metabolism in *Synechocystis*. In addition, the ABC-Transporter SynAbc could be identified as putative fatty acid exporter. The SynAbc “loss-of-function” mutant  $\Delta$ *synabc* exhibited increased sensitivity upon  $\alpha$ -linolenic acid treatment and massive accumulation of exogenously applied fatty acid, compared to wild type. The  $\Delta$ *synaas* mutant secreted free fatty acids into the media. A simultaneous defect in the SynAbc gene completely prevented accumulation of fatty acids in the media, which gives rise to the assumption that SynAbc facilitates fatty acid export in *Synechocystis*.



## 8 Literaturverzeichnis

- An JH, Lee GY, Jung JW, Lee W, Kim YS** (1999) Identification of residues essential for a two-step reaction by malonyl-CoA synthetase from *Rhizobium trifolii*. Biochem J **344 Pt 1**: 159–166
- Awai K, Xu C, Tamot B, Benning C** (2006) A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. Proc Natl Acad Sci USA **103**: 10817
- Babbitt, P.C., Kenyon GL, Martin BM, Charest H, Slyvestre M, Scholten JD, Chang KH, Liang PH, Dunaway-Mariano D** (1992) Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl: adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. Biochemistry **31**: 5594–5604
- Bar-Tana J, Rose G, Brandes R, Shapiro B** (1973) Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Mechanism of reaction. Biochem J **131**: 199–209
- Bates P, Ohlogge J** (2007) Incorporation of newly synthesized fatty acids into cytosolic glycerolipids in pea leaves occurs via acyl editing. J Biol Chem **282**: 31206–312106
- Beevers H** (1961) Metabolic production of sucrose from fat. Nature **191**: 433–436
- Benning C** (2008) A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. Progress in Lipid Research **47**: 381–389
- Black PN, DiRusso CC** (2003) Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. Microbiol Mol Biol Rev **67**: 454–72
- Bligh EG, Dyer WJ** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol **37**: 911–917
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248–254
- Browse J, Roughan PG, Slack CR** (1981) Light control of fatty acid synthesis and diurnal fluctuations of fatty acid composition in leaves. Biochem J **196**: 347–354
- Browse J, Somerville C** (1991) Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. Annual review of plant biology **42**: 467–506
- Conte S, Stevenson D, Furner I, Lloyd A** (2009) Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. Plant Physiol **151**: 559–573
- Conti E, Franks NP, Brick P** (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. Structure **4**: 287–298

- Dat J, Vandenameele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol Life Sci **57**: 779–795
- DiRusso CC, Connell EJ, Faergeman NJ, Knudsen J, Hansen JK, Black PN** (2000) Murine FATP alleviates growth and biochemical deficiencies of yeast fat1Delta strains. Eur J Biochem **267**: 4422–4433
- Dorne AJ, Joyard J, Block MA, Douce R** (1985) Localization of phosphatidylcholine in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. J Cell Biol **100**: 1690–1697
- Dorne AJ, Joyard J, Douce R** (1990) Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? Proc Natl Acad Sci USA **87**: 71–74
- Duronio RJ, Knoll LJ, Gordon JI** (1992) Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* long chain fatty acyl:CoA synthetase gene (FAA1) and assessment of its role in protein N-myristoylation. J Cell Biol **117**: 515–529
- Dutta-Roy AK** (2000) Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. Cell Mol Life Sci **57**: 1360–1372
- Eiert Von E, Stampfl P** (2000) Food quality for *Eudiaptomus gracilis*: the importance of particular highly unsaturated fatty acids. Freshwater Biol. **42** 189–200
- Faergeman NJ, Black PN, Zhao XD, Knudsen J, DiRusso CC** (2001) The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular Utilization. J Biol Chem **276**: 37051–37059
- Faergeman NJ, DiRusso CC, Elberger A, Knudsen J, Black PN** (1997) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* homologue to the murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids. J Biol Chem **272**: 8531–8538
- Falcone DL, Gibson S, Lemieux B, Somerville C** (1994) Identification of a gene that complements an *Arabidopsis* mutant deficient in chloroplast omega 6 desaturase activity. Plant Physiol **106**: 1453–1459
- Falkowski P** (2006) Tracing Oxygen's Imprint on Earth's Metabolic Evolution. Science **311**: 1724
- Footitt S, Marquez J, Schmuths H, Baker A** (2006) Analysis of the role of COMATOSE and peroxisomal beta-oxidation in the determination of germination potential in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany **57** 2805-2814
- Frentzen M, Heinz E** (1983) Specificities and Selectivities of Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase and Monoacylglycerol-3-Phosphate Acyltransferase from Pea and Spinach Chloroplasts. European Journal of Biochemistry **129**: 629-636
- Froehlich JE, Wilkerson CG, Ray WK, McAndrew RS, Osteryoung KW, Gage DA, Phinney BS** (2003) Proteomic Study of the *Arabidopsis thaliana* Chloroplastic Envelope Membrane Utilizing Alternatives to Traditional Two-Dimensional Electrophoresis. J Proteome Res **2**: 413–425

- Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, Heinz E, Browse J** (2004) Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell **16**: 394–405
- Fulda M, Shockey J, Werber M, Wolter FP, Heinz E** (2002) Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. Plant J **32**: 93–103
- Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, Nakamura M, Tsuchida-Iwata Y, Shimamura M, Ohnishi J, Hata S, Gowik U, Westhoff P, Bräutigam A, Weber A, and Izui K** (2011) A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. Nature **476**: 472–476
- Gardiner SE, Roughan PG, Slack CR** (1982) Manipulating the incorporation of [1-<sup>14</sup>C]acetate into different leaf glycerolipids in several plant species. Plant Physiol **70**: 1316–1320
- Goldberg I, Walker J** (1973) Inhibition of Lipid Synthesis in *Escherichia coli* Cells by the Antibiotic Cerulenin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **3**: 549–554
- Graham IA** (2008) Seed storage oil mobilization. Annual review of plant biology **59**: 115–142
- Harwood JL** (1988) Fatty Acid Metabolism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **39**: 101–138
- Hayashi H, De Bellis L, Hayashi Y, Nito K, Kato A, Hayashi M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2002a) Molecular characterization of an *Arabidopsis* acyl-coenzyme a synthetase localized on glyoxysomal membranes. Plant Physiol **130**: 2019–2026
- Hayashi M, Nito K, Takei-Hoshi R, Yagi M, Kondo M** (2002) Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. Plant and Cell Physiology **43**: 1–11
- Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Nishimura M** (1998) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. Plant Cell **10**: 183–195
- Heilmann I, Mekhedov S, King B, Browse J, Shanklin J** (2004) Identification of the *Arabidopsis* palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol delta7-desaturase gene FAD5, and effects of plastidial retargeting of *Arabidopsis* desaturases on the fad5 mutant phenotype. Plant Physiol **136**: 4237–4245
- Huang KP, Stumpf PK** (1970) Fat metabolism in higher plants. XLI. Properties of potato acetyl coenzyme A synthetase. Arch Biochem Biophys **140**: 158–173
- Hunter S, Cahoon E** (2007) Enhancing vitamin E in oilseeds: unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. Lipids **42**: 97–108

- Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, Nishimura M, Arondel V, Hugly S, Somerville C** (1993) A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem **268**: 24099–24105
- Jenks MA, Tuttle HA, Eigenbrode SD, Feldmann KA** (1995) Leaf epicuticular waxes of the *Eceriferum* mutants in *Arabidopsis*. Plant Physiol **108**: 369–377
- Jessen D, Olbrich A, Knüfer J, Krüger A, Hoppert M, Polle A, Fulda M** (2011) Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in *Arabidopsis*. Plant J **68**: 715–726
- Jones A, Davies HM, Voelker TA** (1995) Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. Plant Cell **7**: 359–371
- Kaczmarzyk D, Fulda M** (2010) Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling. Plant Physiol **152**: 1598–1610
- Kameda K, Nunn WD** (1981) Purification and characterization of acyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. J Biol Chem **256**: 5702–5707
- Kamp F, Hamilton JA** (1992) pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. Proc Natl Acad Sci USA **89**: 11367–11370
- Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA** (1995) Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. Biochemistry **34**: 11928–11937
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, et al** (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res **3**: 109–136
- Kang F, RAWSTHORNE S** (1994) Starch and Fatty-Acid Synthesis in Plastids From Developing Embryos of Oilseed Rape (*Brassica-Napus* L). Plant J **6**: 795–805
- Kashiwagi K, Tshako MH, Sakata K, Saisho T, Igarashi A, da Costa SO, Igarashi K** (1998) Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and a decrease in oligopeptide binding protein. J Bacteriol **180**: 5484–5488
- Ke J, Behal RH, Back SL, Nikolau BJ, Wurtele ES, Oliver DJ** (2000) The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds. Plant Physiol **123**: 497–508
- Kim HU, Huang AHC** (2004) Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*. Plant Physiol **134**: 1206–1216

- Klein K, Steinberg R, Fiethen B, Overath P** (1971) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible system for the uptake of fatty acids and further characterization of old mutants. *Eur J Biochem* **19**: 442–450
- Knappe S, Lottgert T, Schneider A, Voll L, Flügge U-I, Fischer K** (2003) Characterization of two functional phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) genes in *Arabidopsis*-AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J* **36**: 411–420
- Konishi T, Shinohara K, Yamada K, Sasaki Y** (1996) Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant and Cell Physiology* **37**: 117–122
- Koo AJK, Fulda M, Browse J, Ohlrogge J** (2005) Identification of a plastid acyl-acyl carrier protein synthetase in *Arabidopsis* and its role in the activation and elongation of exogenous fatty acids. *The Plant Journal* **44**: 620-632
- Koo AJK, Ohlrogge JB, Pollard M** (2004) On the export of fatty acids from the chloroplast. *J Biol Chem* **279**: 16101–16110
- Krogmann DW, Jagendorf AT, Avron M** (1959) Uncouplers of Spinach Chloroplast Photosynthetic Phosphorylation. *Plant Physiol* **34**: 272–277
- Kunst L, Browse J, Somerville C** (1988) Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 4143–4147
- Kunz H-H, Scharnewski M, von Berlepsch S, Shahi S, Fulda M, Flügge UI, Gierth M** (2010) Nocturnal energy demand in plants: Insights from studying mutants impaired in  $\beta$ -oxidation. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 842
- Kunz H-H, Scharnewski M, Feussner K, Feussner I, Flügge U-I, Fulda M, Gierth M** (2009) The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness. *Plant Cell* **21**: 2733–2749
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lee D, Ellard M, Wanner LA, Davis KR, Douglas CJ** (1995) The *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate:CoA ligase (4CL) gene: stress and developmentally regulated expression and nucleotide sequence of its cDNA. *Plant Mol Biol* **28**: 871–884
- Liedvogel B, Stumpf PK** (1982) Origin of acetate in spinach leaf cell. *Plant Physiol* **69**: 897–903
- Lightner J, Wu J, Browse J** (1994) A Mutant of *Arabidopsis* with Increased Levels of Stearic Acid. *Plant Physiol* **106**: 1443-1451
- Liu X, Brune D, Vermaas W, Curtiss R** (2010) Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* online: pnas.1008568107

- Loqué D, Lalonde S, Looger LL, Wirén von N, Frommer WB** (2007) A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. Nature **446**: 195–198
- Lü S, Song T, Kosma DK, Parsons EP, Rowland O, Jenks MA** (2009) Arabidopsis CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. Plant J **59**: 553–564
- Maeda H, Sakuragi Y, Bryant D, DellaPenna D** (2005) Tocopherols Protect *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 from Lipid Peroxidation. Plant Physiol **138**: 1422-1435
- Mangroo D, Gerber GE** (1993) Fatty acid uptake in *Escherichia coli*: regulation by recruitment of fatty acyl-CoA synthetase to the plasma membrane. Biochem Cell Biol **71**: 51–56
- McConn M, Hugly S, Somerville C** (1994) A Mutation at the *fad8* Locus of *Arabidopsis* Identifies a Second Chloroplast [omega]-3 Desaturase. Plant Physiol **106**: 1609-1614
- Miquel M, Cassagne C, Browse J** (1998) A new class of *Arabidopsis* mutants with reduced hexadecatrienoic acid fatty acid levels. Plant Physiol **117**: 923–930
- Mironov KS, Sidorov RA, Trofimova MS, Bedbenov VS, Tsydendambaev VD, Allakhverdiev SI, Los DA** (2011) Light-dependent cold-induced fatty acid unsaturation, changes in membrane fluidity, and alterations in gene expression in *Synechocystis*. Biochim Biophys Acta. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.12.011
- Nakamura Y** (1975) Fatty acid synthesis by spinach chloroplasts I. Property of fatty acid synthesis from acetate. Plant and Cell Physiology **16**: 139-149
- Neiss WF** (1983) Extraction of osmium-containing lipids by section staining for TEM. Histochemistry **79**: 245–250
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N** (2005) Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem Biophys Res Commun **338**: 668–676
- Norman HA, John JB** (1986) Metabolism of unsaturated monogalactosyl-diacylglycerol molecular species in *Arabidopsis thaliana* reveals different sites and substrates for linolenic acid synthesis. Plant Physiol **81**: 731–736
- Nunn WD, Simons RW** (1978) Transport of long-chain fatty acids by *Escherichia coli*: mapping and characterization of mutants in the *fadL* gene. Proc Natl Acad Sci USA **75**: 3377–3381
- Obermeyer T, Fraisl P, DiRusso CC, Black PN** (2007) Topology of the yeast fatty acid transport protein Fat1p: mechanistic implications for functional domains on the cytosolic surface of the plasma membrane. J Lipid Res **48**: 2354–2364
- Ohlrogge J, Browse J** (1995) Lipid biosynthesis. Plant Cell **7**: 957–970

- Ohlrogge JB, Kuhn DN, Stumpf PK** (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. Proc Natl Acad Sci USA **76**: 1194–1198
- Okamoto T, Katoh S, Murakami S** (1977) Effects of linolenic acid on spinach chloroplast structure. Plant and Cell Physiology **18**: 551–560
- Okazaki K, Sato N, Tsuji N, Tsuzuki M, Nishida I** (2006) The significance of C16 fatty acids in the sn-2 positions of glycerolipids in the photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803. Plant Physiol **141**: 546–556
- Overath P, Pauli G, Schairer HU** (1969) Fatty Acid Degradation in *Escherichia coli*. European Journal of Biochemistry **7**: 559–574
- Pakrasi HB** (1995) Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. Annu Rev Genet **29**: 755–776
- Pisareva T, Shumskaya M, Maddalo G, Ilag L, Norling B** (2007) Proteomics of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Identification of novel integral plasma membrane proteins. FEBS J **274**: 791–804
- Prabhakar V, Lottgert T, Geimer S, Dörmann P, Krüger S, Vijayakumar V, Schreiber L, Göbel C, Feussner K, Feussner I, et al** (2010) Phosphoenolpyruvate provision to plastids is essential for gametophyte and sporophyte development in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell Online **22**: 2594–2617
- Ptak M, Egret-Charlier M, Sanson A, Bouloussa O** (1980) A NMR study of the ionization of fatty acids, fatty amines and N-acylamino acids incorporated in phosphatidylcholine vesicles. Biochim Biophys Acta **600**: 387–397
- Pulsifer IP, Kluge S, Rowland O** (2012) *Arabidopsis* long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. Plant Physiol Biochem **51**: 31–39
- Raychaudhuri S** (2003) Nonorganellar Acyl Carrier Protein from Oleaginous Yeast Is a Homologue of Ribosomal Protein P2. J Biol Chem **278**: 37648–37657
- Reyes-Prieto A, Weber APM, Bhattacharya D** (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. Annu Rev Genet **41**: 147–168
- Richter C, Schweizer M** (1997) Oxidative Stress in Mitochondria. Cold Spring Harbor Monograph Archive **34**: 169–200
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury J, Herdman M, Stainer RY** (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Microbiol **111**: 1–61
- Rock CO, Cronan JE** (1981) Acyl-acyl carrier protein synthetase from *Escherichia coli*. Meth Enzymol **71 Pt C**: 163–168
- Roughan G, Slack R** (1984) Glycerolipid synthesis in leaves. Trends in Biochemical Sciences **9**: 383–386

- Sadava D, Moore K** (1987) Glycerol Metabolism in Higher-Plants - Glycerol Kinase. Biochem Biophys Res Commun **143**: 977–983
- Sakamoto T, Delgaizo V, Bryant D** (1998) Growth on Urea Can Trigger Death and Peroxidation of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 Applied and Environmental Microbiology **64**: 2361-2366
- Sakurai I, Shen J, Leng J, Ohashi S, Kobayashi M, Wada H** (2006) Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. Journal of Biochemistry **140**: 201
- Sasaki Y, Kozaki A, Hatano M** (1997) Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase. Proc Natl Acad Sci USA **94**: 11096–11101
- Savidge B, Weiss JD, Wong Y-HH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE** (2002) Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. Plant Physiol **129**: 321–332
- Scharnewski M, Pongdontri P, Mora G, Hoppert M, Fulda M** (2008) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in acyl-CoA synthetases secrete fatty acids due to interrupted fatty acid recycling. FEBS J **275**: 2765–2778
- Schnurr JA, Shockey JM, de Boer G-J, Browse JA** (2002) Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. Plant Physiol **129**: 1700–1709
- Schopf JW, Packer BM** (1987) Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. Science **237**: 70–73
- Sheng J, Kim HW, Badalamenti JP, Zhou C, Sridharakrishnan S, Krajmalnik-Brown R, Rittmann BE, Vannela R** (2011) Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis* sp. PCC6803 in a bench-top photobioreactor. Bioresource Technology **102**: 11218–11225
- Shockey J, Browse J** (2011) Genome-level and biochemical diversity of the acyl-activating enzyme superfamily in plants. Plant J **66**: 143–160
- Shockey JM, Fulda M, Browse J** (2003) *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases. Plant Physiol **132**: 1065–1076
- Shockey JM, Fulda M, Browse JA** (2002) *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. Plant Physiol **129**: 1710–1722
- Siegenthaler P** (1972) Aging of the photosynthetic apparatus zIV. Similarity between the effects of aging and unsaturated fatty acids on isolated spinach chloroplasts as expressed by volume changes. Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics **275**: 182–191



- Siegenthaler P, Murata N** (1998) Lipids in Photosynthesis: Structure, Function, and Genetics. Kluwer Academic Publishers
- Srivastava R, Pisareva T, Norling B** (2005) Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Proteomics **5**: 4905–4916
- Takei K, Haucke V, Slepnev V, Farsad K, Salazar M, Chen H, De Camilli P** (1998) Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. Cell **94**: 131–141
- Tjellström H, Yang Z, Allen DK, Ohlrogge JB** (2011) Rapid kinetic labeling of *Arabidopsis* cell suspension cultures: Implications for models of lipid export from plastids. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.111.186122
- Valentini G** (2000) The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase. Journal of Biological Chemistry **275**: 18145–18152
- Van Breusegem F, Dat JF** (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. Plant Physiol **141**: 384–390
- Wada H, Murata N** (1990) Temperature-Induced Changes in the Fatty Acid Composition of the Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. Plant Physiol **92**: 1062–1069
- Wallace DC** (1982) Structure and evolution of organelle genomes. Microbiol Rev **46**: 208–240
- Wang ZT, Ullrich N, Joo S, Waffenschmidt S, Goodenough U** (2009) Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryotic cell **8**: 1856–1868
- Weier D, Müller C, Gaspers C, Frentzen M** (2005) Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis* sp. PCC6803. Biochem Biophys Res Commun **334**: 1127–1134
- Weimar JD, DiRusso CC, Delio R, Black PN** (2002) Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues within the ATP/AMP signature motif of *Escherichia coli* FadD are required for enzyme activity and fatty acid transport. J Biol Chem **277**: 29369–29376
- Williams J, Maissan E, Mitchell K** (1990) The Manipulation of the Fatty Acid Composition of Glycerolipids in Cyanobacteria Using Exogenous Fatty Acids. Plant and Cell Physiology **31**: 495-503
- Xu C, Fan J, Froehlich JE, Awai K, Benning C** (2005) Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. Plant Cell **17**: 3094–3110
- Xu C, Yu B, Cornish AJ, Froehlich JE, Benning C** (2006) Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3- phosphate acyltransferase. Plant J **47**: 296–309

- Yu B, Wakao S, Fan J, Benning C** (2004) Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology **45**: 503–510
- Zhao L, Katavic V, Li F, Haughn G, Kunst L** (2010) Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in Arabidopsis seed oil biosynthesis. The Plant Journal **64**: 1048-1058
- Zou Z, Tong F, Faergeman NJ, Børsting C, Black PN, DiRusso CC** (2003) Vectorial acylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Fat1p and fatty acyl-CoA synthetase are interacting components of a fatty acid import complex. J Biol Chem **278**: 16414–16422

## 9 Danksagung

Hier möchte ich den Leuten danken, durch die diese Zeit der Doktorarbeit ein unvergesslicher Abschnitt meines Lebens geworden ist.

Als erstes gilt mein Dank natürlich Herrn Prof. Ulf-Ingo Flügge, der mein Projekt immer mit guten Ratschlägen und Ideen bereichert hat. Besonders hat mich gefreut, dass er obwohl sich mein Themengebiet von der Pflanze zum Cyanobakterium entwickelt hatte, immer großes Interesse gezeigt hat. Für die Möglichkeit bei ihm in der Arbeitsgruppe zu arbeiten, danke ich ihm sehr.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Sabine Waffenschmidt für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Prof. Karin Schnetz möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes danken.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer und Reisepartner Dr. Markus Gierth. Hier möchte ich noch mal an unseren Ausflug nach Galveston und San Diego erinnern, der einfach großartig war. Zusammen haben wir aus diesem Projekt echt eine gute Story gemacht, worüber ich sehr glücklich bin. Vielen Dank für die super Unterstützung und diese tollen dreieinhalb Jahre.

Zwei Jungs haben mir gezeigt was richtige Wissenschaftler ausmacht: Henning Kunz und Martin Engqvist. Einfach sau coole Jungs und dazu noch so genial. Ihnen möchte ich für die tollen Ratschläge und Freundschaft danken. Henning insbesondere danke ich für die Grundsteinlegung des Projekts und die musikalische Untermalung meiner Arbeit 😊.

Weiter möchte ich meinen Freunden Henning Lagerfeuerman Frerigmann, Nils Pils Jaspert, Pia Staehr, Annemarie Reichel, Shrini Zamani-Nour, Frank Ludewig, Katja Wester, Pascal Reisewitz für unzählige tolle Abende, Kickermatches und Tanzeinlagen danken. Danken möchte ich auch der ganzen Arbeitsgruppe Flügge.

Dani möchte ich danken dafür, dass sie immer für mich da war, mich unterstützt hat und diese Zeit so wunderbar gemacht hat.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Mutter Margot und meinem Vater Baldur.

## **10 Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I. Flügge betreut worden.

Simon von Berlepsch

## 11 Lebenslauf

Name: Freiherr von Berlepsch  
Vorname: Simon Hans Arnfrid Sittich  
Anschrift: Palanterstr. 42  
50937 Köln  
E-Mail: berlepsch@mpipz.mpg.de  
Geburtsdatum: 10.05.1982  
Geburtsort: Bremen

1988 – 2001: Gymnasium am Rübekamp, Bremen.  
Integrierte Stadtteilschule am Leibnizplatz, Bremen.  
Schulzentrum Oderstrasse, Bremen.

2001 – 2002 Zivildienst: Ambulante Krankenpflege, „Gabie Diekena“.

2002 – 2008 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität, Göttingen.  
Abschluss: Diplom Biologe  
Hauptfach: Botanik  
Nebenfach: Biochemie  
Nebenfach: Genetik  
Diplomarbeit in der Pflanzenphysiologie, Lehrstuhl:  
Prof Dr. Christiane Gatz

Seit 01.10.2009 Promotionsstudent am Lehrstuhl II des Botanischen Institutes der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Flügge