

Paper zum Praktikum
im
Max-Planck-Institut
für molekulare Pflanzenphysiologie
bei der AG Doermann

Analyse der Lipidzusammensetzung
in Blättern der *Ackerschmalwand*
(*Arabidopsis thaliana*)

Pflanzliche Membranen enthalten im hohen Grade die Galactolipide Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG). Das Enzym UDP-Glucose-Epimerase (UGE), dessen Gen im Genom von *Arabidopsis thaliana* an fünf verschiedenen Loci zu finden ist, katalysiert einen entscheidenden Schritt im Stoffwechsel der Galactolipide. Die im folgenden beschriebene Untersuchung von den bis jetzt entdeckten Mutanten der verschiedenen uge-Loci mittels DC und GC ergab keine großen Unterschiede in deren Lipidzusammensetzung. Jedoch ergab sich bei der Untersuchung, der genetisch fast identischen Wildtyplinien Col-0 und Col-2 ein signifikant abweichendes Lipidmuster.

Leben beruht in allen Organismen auf einer funktionierenden Plasmamembran, die jede einzelne Zelle umschließt. In Tieren und Pilzen bestehen diese hauptsächlich aus Phospholipiden wie z.B. Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamin(PE) und Phosphatidylglycerol (PG). In Pflanzen findet man zusätzlich die Galactolipide Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG).

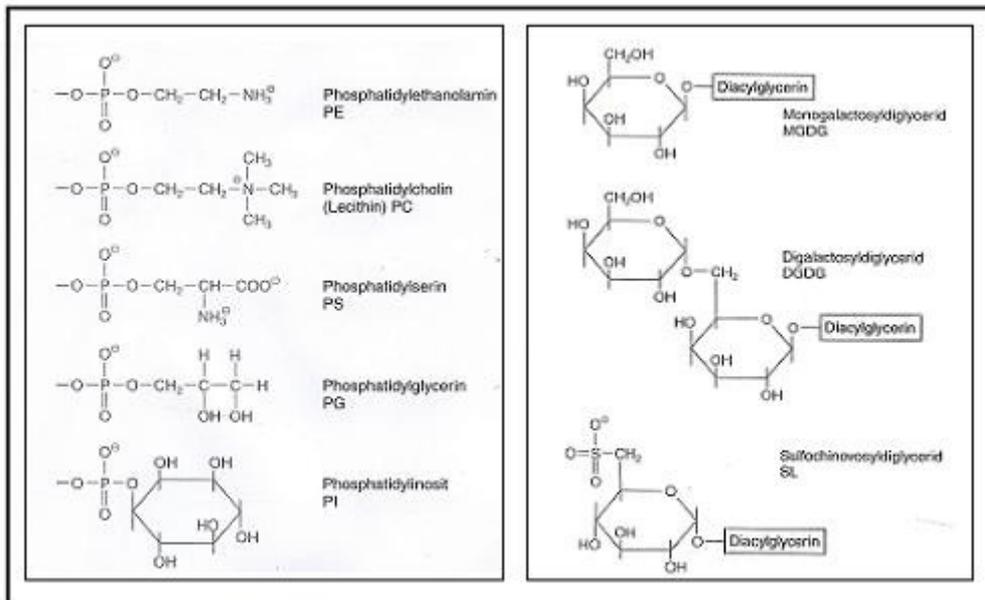


Abb. 1.01 Die Strukturen, der Kopfgruppen von in Pflanzen häufig zu findenden Phospho- (links) bzw. Galactolipiden (rechts).

Die Aufgaben der Galactolipide sind bis jetzt noch nicht restlos geklärt. Bis jetzt ist bekannt, dass sie feste Bestandteile der Photosysteme sind. Weiterhin beobachtet man einen erheblichen Anstieg ihrer Konzentration bei Pflanzen, die unter Phosphatstress stehen. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass dieser Anstieg eine Anpassung an die neue Umweltbedingung ist und die Pflanze so trotz des Stress überleben kann. Weiterhin muss erwähnt werden, dass bei *Arabidopsis* dem Phosphatestress nur mit einem Anstieg der DGDG-Konzentration und nicht der MGDG-Konzentration entgegen gewirkt wird.

Epimerisierung von UDP-Glucose - ein Verzweigungspunkt im Galactosestoffwechsel

Nach dem Glucose über UDP-Glucose aktiviert worden ist kann sie über das Enzym UDP-Glucose-4-Epimerase in UDP Galctose umgewandelt werden. Dies ist nun ein wichtiger Verzweigungspunkt. Von hier aus kann die UDP-Galactose hauptsächlich 4 Wege bestreiten.

Sie kann Bestandteil der Zellwand oder glycosylierter Proteine werden sowie in Galactose-1-Phosphat umgewandelt werden. Der Schritt der im folgenden aber von Interesse ist, ist der Einbau in Galactolipide.

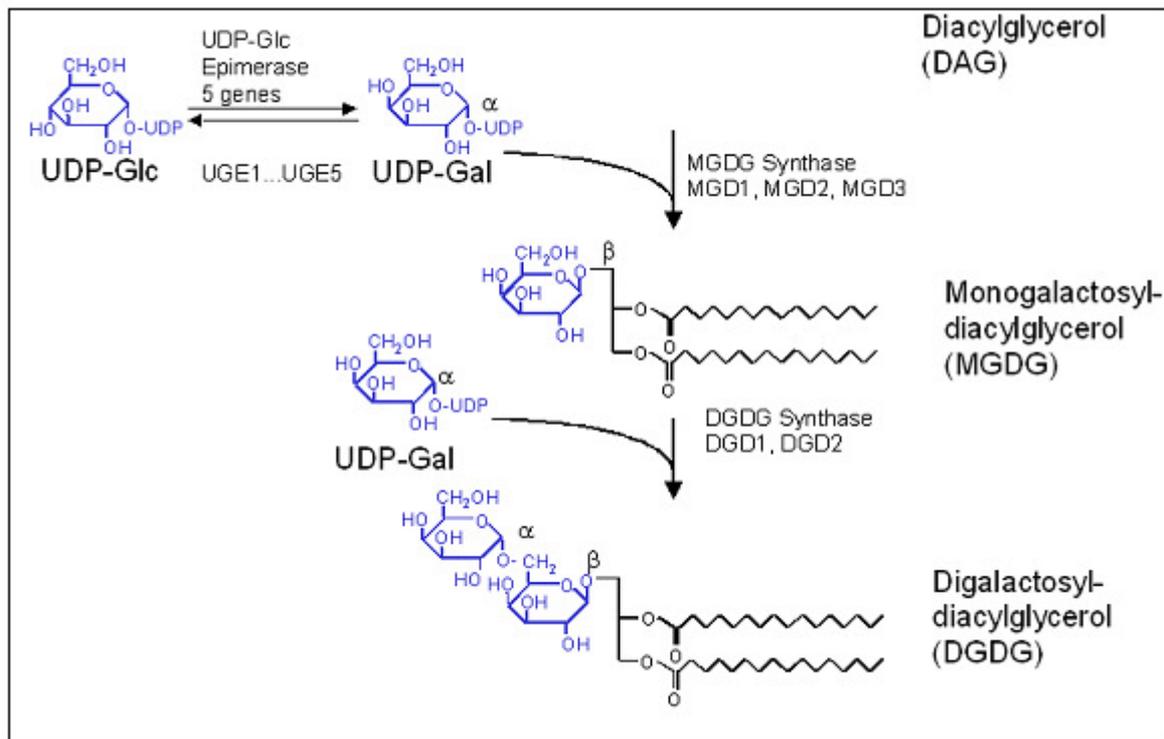


Abb. 1.02 Weg von UDP-Glucose zu den Galactolipiden.

Das entsprechende Gen, welches UGE genannt wird, liegt auf 5 verschiedenen Loci im Genom von *Arabidopsis thaliana*.

Tab. 1.01 Vergleich der verschiedenen UGE-Loci

Name des Genes	Länge des Proteins in AS	Chromosomale Lokalisation	vermutete Anzahl von Exons	Transkriptionsaktivität
UGE1	351	Chromosom I	8	+++
UGE2	350	Chromosom IV	9	+
UGE3	353	Chromosom I	9	+
UGE4	348	Chromosom I	9	++
UGE5	351	Chromosom IV	9	-

Zur Zeit sind erst 3 K.O.-Mutanten von diesen Genen erzeugt bzw. entdeckt worden. (uge1, uge 2, uge 4). Zusätzlich wurden durch Kreuzungsversuche 2 Kombinationen dieser Mutationen erzeugt (uge1/4 und uge 2/4). Da also höchstens 2 der 5 Gene versagen sind keine großen Veränderungen im Phänotyp zu erwarten.

Methoden zur Analyse der Lipidzusammensetzung

1. Extraktion

Der erste notwendige Schritt zur Lipidquantifizierung ist die Lipidextraktion.

Dies sorgt dafür, dass die Lipide von Lipasen getrennt werden und so haltbarer werden.

Zu Beginn der Extraktion wird das entsprechende Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser, der auch flüssigen Stickstoff enthält mechanisch aufgebrochen. Der Stickstoff verhindert den Abbau der Lipide.

Das gemörserte Pflanzenmaterial wird dann in ein Flacongefäß, welches 3 mL KCl (1M) / H₃PO₄ (0,2M) und 6mL CHCl₃ / CH₃OH / HCOOH (1:1:0,1) enthält. Es wird Kaliumchlorid und Phosphorsäure verwendet um die Hypophase äußerst polar zu gestalten, damit sich kein Lipid darin löst. Dieses Gemisch wird dann kräftig geschüttelt und anschließend bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wird die Epiphase abgenommen und in ein Glasröhrchen überführt. Nun kann erneut Chloroform/ Methanol (diesmal 2:1) hinzugegeben werden und erneut geschüttelt und zentrifugiert werden. Die beiden Extrakte werden darauf hin vereinigt, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt und daraufhin in 6mL Chloroform/Methanol wieder aufgenommen zu werden.

Dieser Extrakt kann nun bei 253 K gelagert werden.

2. Dünnschichtchromatographie (DC bzw. TLC)

Bei der Auftrennung von Lipiden wird die polare DC durchgeführt. Die Besonderheit hierbei ist, dass die Sillicapplatten vor dem auftragen speziell behandelt werden müssen. Sie müssen möglichst mehrere Wochen vor dem Gebrauch für 10 Sekunden mit 0,15 M Ammoniumsulfatlösung getränkt. Weiterhin müssen sie kurz vor dem Gebrauch 2,5 Stunden bei 393K aktiviert werden. Die Prozesse die bei dieser aktivierung ablaufen sind noch nicht restlos geklärt. Es ist aber bereits erforscht, dass beim lagern der Platten im Ofen das Ammoniumsulfat zerfällt und dabei Ammoniak verdunstet. Es bleibt Schwefelsäure auf den Platten zurück. Damit sind diese leicht angesäuert. Nun werden die stärker polaren Lipide PE und PG während des Laufes protoniert und zeigen ein besseres Laufverhalten.

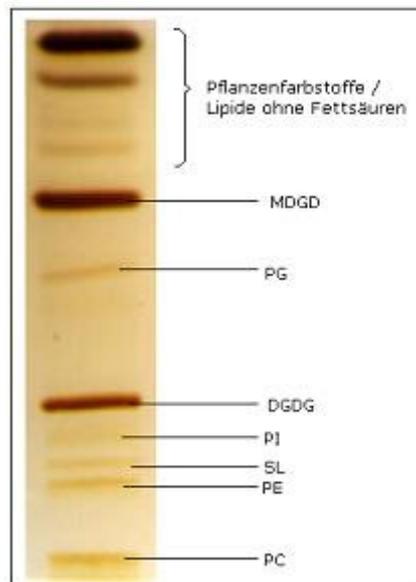


Abb. 1. 03 Auftrennung der Lipide bei polarer DC Im oberen Bereich der Platte sind die Chlorophylle, Carotinoide und einige Lipide, die keine Fettsäuren haben, welche schwer quantifizierbar sind. Weiter gilt das PG trotz Aktivierung im Bereich zwischen MGDG und DGDG „verschmieren“ kann. Weiter werden PI und SL meist zusammen quantifiziert, weil sie nicht immer so gut getrennt werden können.

Als Laufmittel wird Aceton/Toluol/Wasser (91/30/8) verwendet.

Um die Lipide sichtbar zu machen wird eine Färbung mit Iod vorgenommen. Dieses lagert sich in die Doppelbindungen der Fettsäuren ein und zerstört diese damit.

Um die Galactolipide eindeutig zu identifizieren kann auch mit Naphtol gefärbt werden.

Für die Quantifizierung der Lipide werden nur am Rand aufgetragene Markerspuren gefärbt und die einzelnen Lipide werden daraufhin mit Hilfe einer Rasierklinge ausgekratzt

und in Reagenzgläser überführt.

3. FAME und Quantifizierung mittels GC

Lipide haben oft hohe Schmelz- und Siedetemperaturen und zerfallen sehr leicht bei höheren Temperaturen. Damit können sie nur schwer mittels GC quantifiziert werden. Allerdings gilt, dass jedes der betrachteten Lipide genau zwei Fettsäuren hat, die aber nicht unbedingt bei gleichen Lipiden gleich sein müssen. Diese Fettsäuren lassen sich leicht mit schwachen Säuren vom Glycerin abtrennen und mit Methanol derivatisieren. Dies verhindert das erneute Verestern mit Glycerin und setzt die Siedetemperatur herab, weil die polare Carboxyl- in eine nicht mehr ganz so polare Methoxygruppe umgebaut wurde. Diese Reaktion wird FAME (Fatty Acid Methyl Ester) genannt.

Dazu wird die Lipidprobe in ein dicht verschraubbares Glasröhrchen gefüllt und 1 mL 1 N HCl gelöst in Methanol hinzugegeben. Weiter wird der fest definierter Fettsäurestandard Pentadecansäure (15:0) zusätzlich in das Gläschen gebracht. Dieser ist für die Auswertung der GC äußerst wichtig. Es wird dieser Standard verwendet, weil er etwa die Größe der anderen Fettsäuren hat und in der Natur aufgrund der Betaoxidation nicht gebildet werden kann.

Dieses Gemisch wird kurz geschüttelt und dann für 20-25 Minuten in ein 353 K heißes Wasserbad gebracht. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Röhrchen möglichst fest verschlossen sind, damit die Flüssigkeit nicht verdampft. Danach müssen die Röhrchen etwa auf Handwärme abkühlen. Nun erfolgt die Extraktion der Fettsäuremethylester von den polaren Kopfgruppen. Dazu wird in das Röhrchen jeweils 1 mL Hexan und 0,9 % NaCl gegeben. Dieses Gemisch muss nun äußerst kräftig und lange geschüttelt werden. Danach wird es 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Epiphase wird abgenommen, auf etwa 100 μ L eingengt und in GC-Röhrchen überführt.

Die Auswertung der GC erfolgt dadurch, dass das Integral von 15:0 gleich 5,288 μ g gesetzt wird und alle anderen Integrale dazu ins Verhältnis gesetzt werden.

Durchführung des Versuches

Es wurden vorerst 12 Linien untersucht. (WT Col2, uge1, uge2, uge4, uge4/1 und uge4/2 jeweils einmal mit und einmal ohne Phosphatstress aufgewachsen). Zu Übungszwecken wurden zusätzlich WT Col0-Pflanzen untersucht. Von all diesen Pflanzen wurden Lipidextrakte der Blattrosetten und Wurzeln erstellt und diese bei 253 K gelagert. Diese Gesamtlipidextrakte wurden im Anschluss zur Konzentrationsbestimmung einer FAME-Reaktion unterzogen und per GC quantifiziert. Darauf hin wurden jeweils 400 nmol Extrakt auf Schauplatten aufgetragen und diese ganzheitlich mit Iod gefärbt um große Unterschiede gleich sichtbar zu machen. Da aber die Iodfärbung nicht quantitativ genug ist wurden vorerst alle Blattproben ohne Phosphatstress über DC, FAME und GC untersucht.

Es folgten Untersuchungen, der beiden Wildtypen im Vergleich und in Abhängigkeit der Dauer der Lagerung.

Ergebnisse der Untersuchungen

Die Betrachtung der Schauplatten bringt keine Ergebnisse. Da die Unterschiede auf den Platten nicht groß genug sind um Aussagen machen zu können reichen die Platten nicht zur Quantifizierung aus.

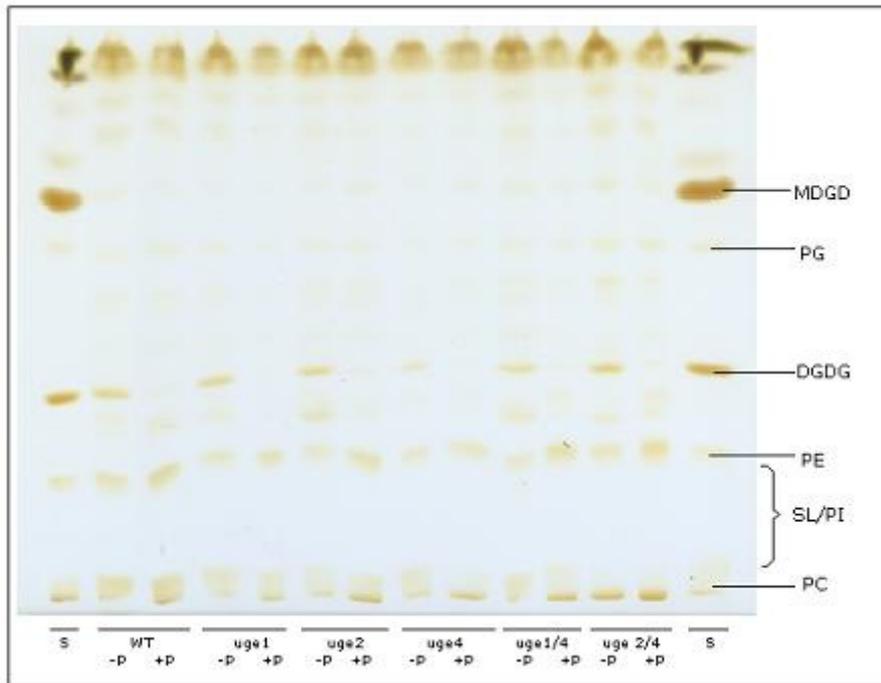


Abb. 1.04 Schauplatte Wurzeln. Hierbei wurden an den Rädern Blattstandards aufgetragen um die Lipide zu identifizieren. Weiterhin wurden abwechselnd Phosphat gestresste Pflanzen den genetisch identischen, nicht gestressten Pflanzen gegenüber gestellt. Die Mutanten zeigen kaum signifikante Unterschiede außer dem erwarteten Anstieg der DGDG-Konzentration bei den gestressten Pflanzen.

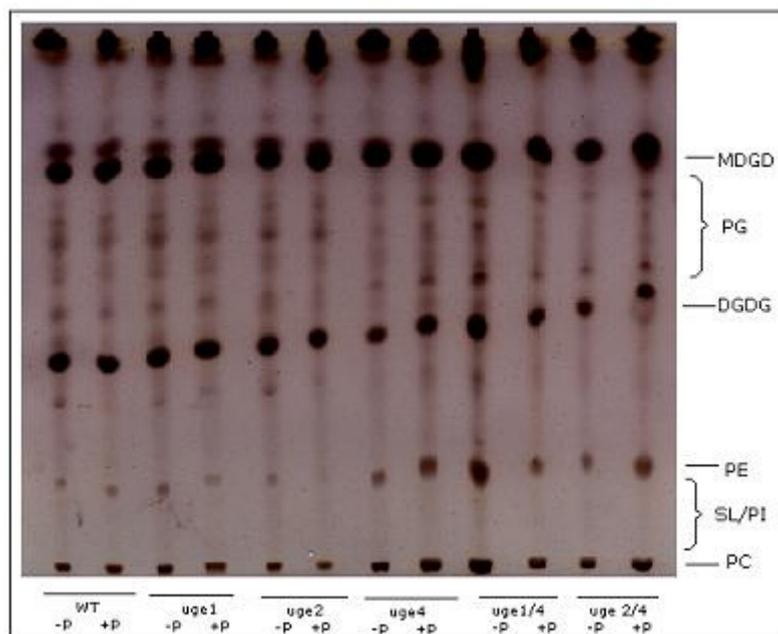


Abb 1.05 Schauplatte Blätter. Trotz des seltsamen Laufverhaltens dieser Platte können auch hier keine Aussagen gemacht werden.

Die folgenden Tabellen zeigen, die Fettsäurezusammensetzungen der einzelnen Mutanten Blätter. Diese Daten stammen aus den Daten der GC. Diese wurden noch dahin bearbeitet, das offensichtliche Artefakte wie Fettsäuren mit mehr als 20 Kohlenstoffatomen keine Beachtung fanden, weil diese nur in Samen vorkommen, nicht aber in Blättern.

Tab 1.02 Fettsäurezusammensetzung Diese Tabelle geht aus einer Dreifachbestimmung des Wildtyps Col- 2 hervor. Selbst wenn der Ausfall der UGE-Gene einen Einfluss auf die Konzentration der Galactolipide haben sollte. Darf sich keine dieser Fettsäurezusammensetzungen großartig ändern.

Lipid	MGD		PG		DGD		SL		PE		PC	
Fettsäure	AVG	STDS										
	mol%											
14:0	0,2	0,1	1,4	0,3	0,4	0,3	2,1	0,4	0,7	0,2	0,5	0,1
16:0	2,3	0,7	23,3	1,9	10,1	1,9	32,6	3,4	26,8	0,3	24,2	5,1
16:1	0,6	0,1	21,8	0,6	0,2	0,4	1,3	1,2	0,7	0,6	1,1	0,2
16:2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,6	0,0	0,0
18:0	0,3	0,1	2,5	0,4	1,2	0,1	4,5	1,0	2,2	0,0	2,5	0,4
16:3	26,3	1,2	2,5	0,5	1,4	0,3	0,0	0,0	0,5	0,8	0,0	0,0
18:1	0,3	0,5	4,5	0,5	1,1	0,2	0,0	0,0	2,3	0,3	3,3	0,3
18:2	4,2	0,6	13,6	0,4	5,4	1,0	21,6	2,5	32,3	0,9	25,1	1,2
18:3	65,8	0,5	30,4	2,0	69,9	14,0	37,8	1,1	34,2	0,1	43,2	4,9

Tab. 1.03 Fettsäurekomposition der Mutanten im Vergleich

Pflanzentyp	WT Col2	uge1	uge2	uge4	uge1/4	uge 2/4
Lipid	Anteil mol%					
MDGDG	45,6	41,9	41,1	45,4	39,4	46,2
PG	5,3	5,4	5,4	7,2	7,7	7,6
DGDG	16,8	21,6	22,1	15,7	15,2	12,2
SL/PI	3,2	3,9	4,4	3,9	4,7	4,4
PE	10,5	10,6	9,8	10,7	11,8	11,9
PC	18,7	16,7	17,1	17,0	21,2	17,8

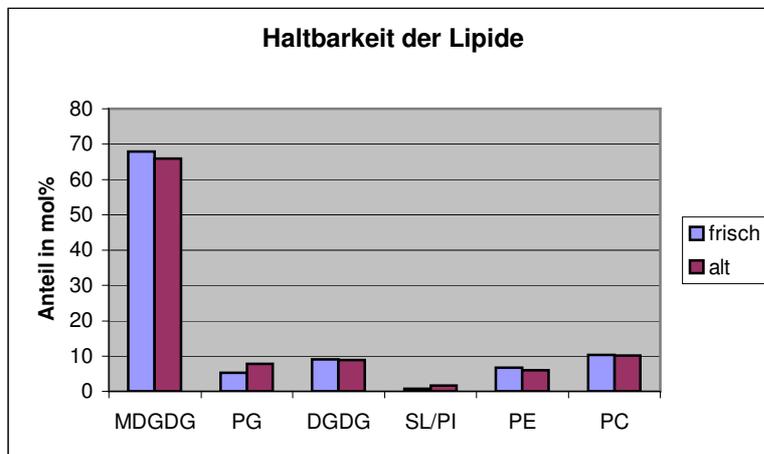


Abb. 1.06 Vergleich eines 3 Wochen bei 253 K gelagerten Lipidextraktes von Col 0 mit einem frischen.

Tab 1.04 Vergleich der genetisch identischen Wildtypstämme Col-0 und Col -2

Pflanzentyp	WT Col 0	WT Col 2
Lipid	Anteil mol%	Anteil mol%
MDGDG	67,9	48,5
PG	5,2	8,6
DGDG	9,1	15,5
SL/PI	0,8	2,1
PE	6,7	8,7
PC	10,3	16,5

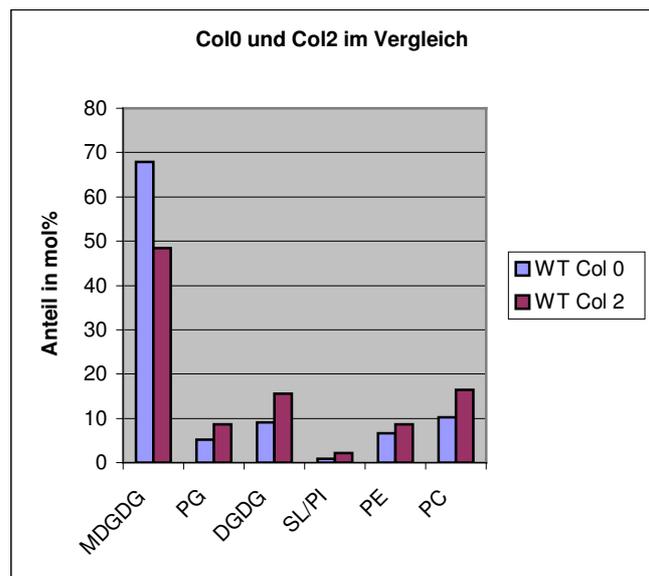


Abb. 1.07 Visualisierung der Daten aus Tabelle 1.04

Diskussion der Ergebnisse

Im Vergleich der Mutantenlinien mit der Wildtyplinie ergeben sich keine dramatischen Abweichungen. Die größte Diskrepanz ist bei *uge1/4* zu sehen. Diese beiden Gene sind auch die mit der höchsten Transkriptionsrate (siehe Tab. 1.01). Dabei ist zu beachten dass der Abfall der MGDG-Konzentration auch mit einem Anstieg der PC-Konzentration zusammenhängt. Obwohl die Pflanzen rein optisch kaum unterscheidbar sind. Müsste es zumindest der *uge1/4* Mutante schlecht gehen. Dem ist aber nicht so. Eine Schlussfolgerung könnte daraus sein, dass es noch weitere UGE-Gene gibt. Die 5 entdeckten Gene basieren nur auf Sequenzalignments.

Bei der Haltbarkeit der Lipide kam heraus, dass Lipide wahrscheinlich unbegrenzt in Chloroform/ Methanol bei 253 K aufbewahrt werden können. Die Diskrepanz der Werte ist hier so gering, dass sie auf die technische Variabilität zurückzuführen ist.

Bedeutend interessanter ist der Vergleich der beiden Wildtyp Linien Col-0 und Col-2. Die Abweichung der Lipidkonzentration ist hier signifikant. Diese Werte basieren nicht nur auf einer Dreifachbestimmung, sondern auf einer Neunfachbestimmung, in der auch die biologische Variabilität der Pflanzen mitbetrachtet wurde. Die genetisch fast identischen Pflanzen sind im Phänotyp nicht identisch. Col-2 ist nur durch einige Selbstungen aus Col-0 hervorgegangen. Es dürfte keine solche Diskrepanz auftreten, wenn die Pflanzen nur durch einige wenige zufällige Mutationen Unterschiede im Genom aufweisen. Dies bringt die Betrachtung weiterer phänotypischer Merkmale näher, da der gefundene Unterschied sicher nicht der einzige ist, obwohl die Pflanzen äußerlich kaum unterscheidbar sind.