

## Abstract

Fatty acid synthesis in plant cells takes place exclusively in plastids. For extraplastidic lipid synthesis, large amounts of fatty acids need to be transferred across plastid envelope membranes. This export of *de novo* synthesised fatty acids from plastids is a fundamental, yet largely uncharacterized process in plant cells. Especially the mode of fatty acid transport across the inner envelope membrane of plastids is still unknown. In this work, a potential role of the so far uncharacterized ABC protein gene *PMP1* of *Arabidopsis thaliana* in this transport process was investigated. To this end, the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 was used as a model organism for the situation in chloroplasts. The genome of *Synechocystis* contains a close homologue to *PMP1*, the putative ABC transporter gene *SynABC*. Subcellular localisation studies verified the membrane localisation of SynABC protein. A knockout mutant of *SynABC* was found to exhibit a hypersensitive growth phenotype in the presence of externally provided  $\alpha$ -linolenic acid. *Synechocystis* cells overexpressing *SynABC* were shown to be more resistant to the fatty acid, compared to the wild type. These phenotypes were found to be caused by a reduced secretion of  $\alpha$ -linolenic acid into the surrounding media by  $\Delta$ *synabc* cells and an increased secretion by *SynABC* overexpressing cells. This was furthermore accompanied by a lower accumulation of  $\alpha$ -linolenic acid within *SynABC* overexpressors. These results provided conclusive evidence that SynABC acts as a transporter within the membrane of *Synechocystis* and mediates export of  $\alpha$ -linolenic acid from the cell. Heterologous expression of *PMP1* devoid of its chloroplast signal peptide, designated *PMP1 without signal peptide*, in *Synechocystis* recapitulated the results obtained for *SynABC* overexpressing cells. This indicated a likewise fatty acid transport activity of PMP1w/osp in *Synechocystis* cells. Experiments on amino acid exchange mutants identified the conserved lysine of the Walker A motif to be vital for function of both proteins, thereby underpinning the role of SynABC and PMP1w/osp as ABC transport proteins in *Synechocystis*. Heterologous expression of *SynABC* and *PMP1* in yeast cells was as well found to increase resistance to  $\alpha$ -linolenic acid, which further substantiated the function of SynABC and PMP1 as fatty acid exporters. Together, these results not only provided proof for a fatty acid export activity of SynABC as ABC transporter of the *Synechocystis* cell, but also implicated a corresponding function of PMP1 in the *Arabidopsis* chloroplast. Accordingly, PMP1 protein was found to be localised in chloroplast envelopes, being the site of fatty acid export activity. However, knockout of *PMP1* in *Arabidopsis* did not lead to reduced growth or any other phenotypic abnormalities of the plants. A likely explanation for this is a redundancy in genes involved in fatty acid export from the chloroplast, being such a fundamental process of the plant cell, hence compensating for the loss of *PMP1*.

## Zusammenfassung

Fettsäuren sind essentielle Bestandteile der Pflanzenzelle, u. A. als Teil von Membranlipiden, Energiespeicherlipiden oder den Wachsauflagerungen der Kutikula. Die Synthese der Fettsäuren findet in Pflanzenzellen ausschließlich in den Plastiden statt. Für die Produktion von komplexeren Lipiden außerhalb der Plastiden müssen große Mengen an Fettsäuren aus diesen exportiert werden. Der Transport von *de novo* synthetisierten Fettsäuren über die Plastidenmembranen ist daher ein fundamentaler Prozess, der jedoch nicht vollständig verstanden ist. Im Besonderen der Transport über die innere Plastidenmembran ist immer noch unbekannt. In der hier vorgestellten Arbeit wurde die potentielle Rolle des bisher nicht charakterisierten ABC Proteins PMP1 aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modellorganismus für die Gegebenheiten im Chloroplasten genutzt. Das Genom von *Synechocystis* enthält ein Gen welches eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *PMP1* aufweist, das mutmaßliche ABC Transporter-Gen *SynABC*. Lokalisationsstudien bestätigten eine Membranlokalisierung des *SynABC* Proteins in *Synechocystis*. Die Untersuchung einer *Synechocystis knockout* Mutante von *SynABC* zeigte ein hypersensitiv gehemmtes Wachstum der Zellen in Gegenwart von  $\alpha$ -Linolensäure. Die Überexpression von *SynABC* unter der Kontrolle des endogenen *psbAII* Promotors in *Synechocystis* führte hingegen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der Fettsäure. Als ursächlich für diese Phänotypen wurde festgestellt, dass  $\Delta$ *synabc* *Synechocystis* Zellen eine verringerte Exportaktivität von  $\alpha$ -Linolensäure in das umgebene Medium aufwiesen und *SynABC* überexprimierende Zellen sich durch eine erhöhte Exportaktivität auszeichneten. Dieser gesteigerte Export wurde außerdem begleitet von einer geringeren Anreicherung von  $\alpha$ -Linolensäure im Zellinneren von *psbAII::SynABC* Zellen. Die heterologe Expression von *PMP1* ohne N-terminales Signalpeptid (*PMP1 without signal peptide*) in *Synechocystis* führte zu annähernd identischen Ergebnissen wie die Überexpression von *SynABC*. Dies deutete auf eine ähnliche Funktion von *PMP1w/osp* als Fettsäureexporter in *Synechocystis* hin. Durch die gezielte Mutation einzelner Aminosäuren wurde das konservierte Lysin des Walker A Sequenzmotivs als eine für die Proteinfunktion unerlässliche Aminosäure identifiziert. Dadurch konnte wiederum die Aktivität von *SynABC* und *PMP1w/osp* als ABC Proteine in der *Synechocystis* Zelle bestätigt werden. Die Heterologe Expression von *SynABC* und *PMP1* in *Saccharomyces cerevisiae* führte ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure. Dieser Umstand untermauerte zusätzlich die Funktion von *SynABC* und *PMP1* als Fettsäureexporter. Zusammen genommen erbrachten die gewonnenen Ergebnisse nicht nur Beweise für eine Fettsäureexport-Funktion von *SynABC* als ABC Transporter in der

*Synechocystis* Zelle, sondern wiesen zudem auf eine entsprechende Funktion von PMP1 als Fettsäureexporter im *Arabidopsis* Chloroplasten hin. Dementsprechend konnte eine Lokalisation des PMP1 Proteins in den Chloroplastenmembranen, dem Ort des Fettsäureexports aus dem Plastiden, nachgewiesen werden. Die Untersuchung einer *Arabidopsis* knockout Mutante von *PMP1* zeigte jedoch kein vermindertes Pflanzenwachstum oder andere phänotypische Abweichungen. Da es sich beim Fettsäureexport aus den Chloroplasten um einen fundamentalen Prozess der Pflanzenzelle handelt, ist davon auszugehen, dass mögliche Defekte durch redundante Gene ausgeglichen werden können, was eine mögliche Erklärung für den unveränderten Phänotyp der *pmp1* Mutante ist.