

1 Einleitung

Die Mehrzahl der heute lebenden eukaryotischen Zellen sind photosynthetische Zellen, angefangen von einzelligen Algen über Moose und Farne bis hin zu den Zellen höherer Pflanzen (Kleinig & Sitte, 1986). Die Biomasse der Pflanzen (Phytomasse) ist somit fast 1000mal größer als die der entsprechenden tierischen Organismen (Zoomasse, Strasburger, 1996). Fast alle diese Zellen enthalten einen bestimmten Typ von Plastiden, den Chloroplasten (Abb. 1-1), dessen wichtigste Funktion die Photosynthese ist. Diese findet in der photosynthetischen Membran, der Thylakoidmembran, statt. Die Thylakoidmembran besteht vor allem aus den Pigment-Protein-Komplexen des photosynthetischen Apparats, der in eine thylakoidspezifische Lipidmatrix gebettet ist. Im Raummodell stellt man sich einen einzelnen zusammenhängenden Membrankörper vor. Dieser setzt sich aus stark gestapelten Bereichen (Grana) und

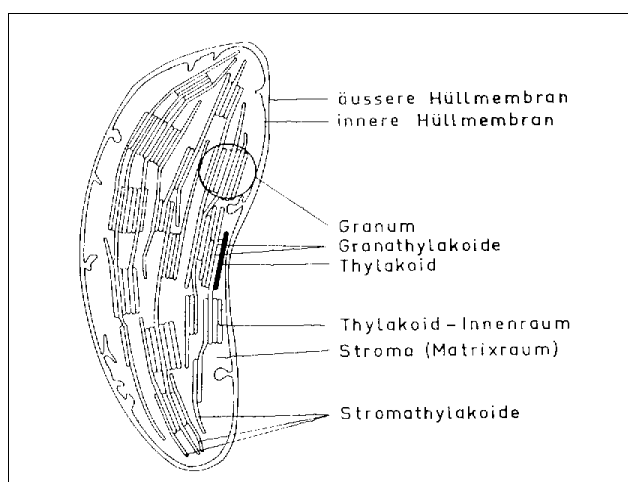


Abb. 1-1: Strukturmodell eines Chloroplasten einer höheren Pflanze. (Mohr & Schopfer, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 1992).

Membranflächen (Stromathylakoide), die die Grana verknüpfen, zusammen (Richter, 1998). Diese Thylakoide stellen die vorwiegend vorkommenden Membranen in den Blattzellen der Pflanzen dar: Sie repräsentieren mehr als 60-80% der zellulären Membranen in den Mesophyllzellen höherer Pflanzen. Somit gehören die Protein- und Lipidkomponenten der Thylakoide zu den am häufigsten vorkommenden organischen Verbindungen der Natur (Webb & Green, 1991). Der Trockenmasse-Anteil der Membranlipide allein wird in vegetativen Pflanzenzellen auf 5-10% geschätzt (Ohlrogge & Browse, 1995).

Die Funktion und der Aufbau der Pigment-Protein-Komplexe sind bereits, einschließlich der Röntgenkristallstruktur, sehr gut untersucht. So konnten neben dem Reaktionszentrum des Purpurbakteriums unter anderem auch die pflanzlichen Photosysteme I und II kristallisiert, analysiert und verglichen werden (Michel & Deisenhofer, 1988; Fromme 1997; Rhee *et al.*,

1998). Die Kenntnis der Kristallstruktur am Beispiel der ATP-Synthase, einem Enzym, das in der inneren Membran der Mitochondrien, aber auch in der Thylakoidmembran des Chloroplasten lokalisiert ist (Abrahams *et al.*, 1994), zeigt den großen Informationsgehalt, der mit dieser Analysemethoden gewonnen werden kann. Der durch die Struktur der F₁-ATPase vorausgesagte „Motor“ konnte in der Beobachtung der Rotation der γ -Untereinheit der F₁-ATPase (Noji *et al.*, 1997; Yasuda *et al.*, 1998) bestätigt werden.

Die Fülle der wissenschaftlichen Informationen über die photosynthetischen Pigment-Protein-Komplexe stehen in starkem Gegensatz zu dem noch geringen Wissen über die Funktion der sie umgebenden Matrix. So ist inzwischen zwar einiges über die biophysikalischen Eigenschaften der Thylakoidlipide bekannt (zusammengefaßt von Webb & Green, 1991). Aber man weiß relativ wenig über ihre Biosynthese und Funktion, ihre Bedeutung für die Biogenese der Membran und ihre Rolle in der Photosynthese. Dabei gibt es eine Fülle von Veröffentlichungen, die eine spezifische Assoziation zwischen bestimmten Lipiden und der heterologen Verteilung der Pigment-Protein-Komplexe (Murata *et al.*, 1985; Trémolierès *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995; Übersichtsartikel: Williams, 1994; Maréchal *et al.*, 1997) oder auch der ATP-Synthase (Pick *et al.*, 1987) in der Thylakoidmembran vermuten läßt.

1.1 Lipide in der photosynthetischen Membran

Unsere heutige Vorstellung von der Biomembran basiert auf dem Fluidmosaik-Modell, das 1972 von Singer und Nicolson formuliert wurde. Dieses Modell beschreibt das strukturelle Gerüst einer Membran als flüssig-kristalline Lipid-Doppelschicht, in der die Membranproteine lateral frei beweglich sind. Zu den Grundeigenschaften von Biomembranen, zu denen die Thylakoidmembran zählt, gehören Stabilität, Flexibilität, Fluidität und Semipermeabilität, für die sich vor allem die Membranlipide verantwortlich zeigen. Bei Membranlipiden handelt es sich um polare Lipide, die aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Schwanz bestehen.

Der Hauptanteil sowohl von eukaryotischen als auch von prokaryotischen Thylakoidmembranen wird von den beiden ungeladenen Galactolipiden Monogalactosyldiacylglycerid (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerid (DGDG) gestellt (Abb. 1-2 B). Darüber hinaus beinhalten sie als negativ geladene Lipide Sulfoquinovosyldiacylglycerid (SQDG) und Phosphatidylglycerid (PG) (Abb. 1-2 A). Diese Lipidzusammensetzung ist aus verschiedenen Gründen bemerkenswert: Zum einen weist sie einen besonders hohen Anteil (in höheren Pflanzen

~80%) an den ungeladenen Glykolipiden MGDG und DGDG auf, während in anderen Membranen zumeist die zwitterionischen oder negativ geladenen Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG) (Abb. 1-2 C) am stärksten vertreten sind (Kotyk *et al.*, 1988). Zum anderen enthält die Thylakoidmembran keine Sterole wie z. B. Cholesterin, deren Anteil in anderen Membranen oft bis zu 50% beträgt und die zu einer Verminderung der Membranfluidität führen. Die ungewöhnliche Zusammensetzung der Thylakoidmembran wirft die Frage auf, wie jedes einzelne dieser Lipide zu den besonderen Charakteristika der Membran beiträgt. Für die Membranlipidzusammensetzung der Chloroplasten bei einer höheren Pflanze, z. B. *Arabidopsis thaliana*, ergeben sich folgende Werte: MGDG: 53,7%, DGDG: 20,9%, SQDG: 3,9%, PG: 9,5%, und PC: 12,0%, wobei das zwitterionische Phosphatidylcholin (PC) ausschließlich in der äußeren Hüllmembran (*envelope*) des Chloroplasten vorkommt (Douce & Joyard, 1990). Ein Merkmal der Thylakoidmembran ist die auffallend hohe Wechselwirkung von PG mit Proteinen der beiden Photosysteme I und II, was über Elektronenspinresonanz gezeigt werden konnte (Li *et al.*, 1989). Auch Kristallisationsstudien mit dem Lichtsammelsystem des Photosystems II (LHCII) weisen auf das Vorliegen von stöchiometrischen Mengen PG und DGDG hin (Nußberger *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu PG ließ sich DGDG aber leicht entfernen und scheint für die Trimerisierung der LHC's nicht notwendig zu sein. Für die besondere Funktion von PG in der Thylakoidmembran werden zwei Gründe angeführt: Einerseits vermutet man eine Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Kopfgruppe von PG und den positiv geladenen Aminosäureresten des LHCII (Kühlbrandt, 1994), andererseits glaubt man, daß *trans*- Δ^3 -Hexadecensäure (t-16:1), die hauptsächlich mit dem Glycerin-Rückgrat von PG verestert ist (Bahl *et al.*, 1976), eine wichtige Rolle spielt.

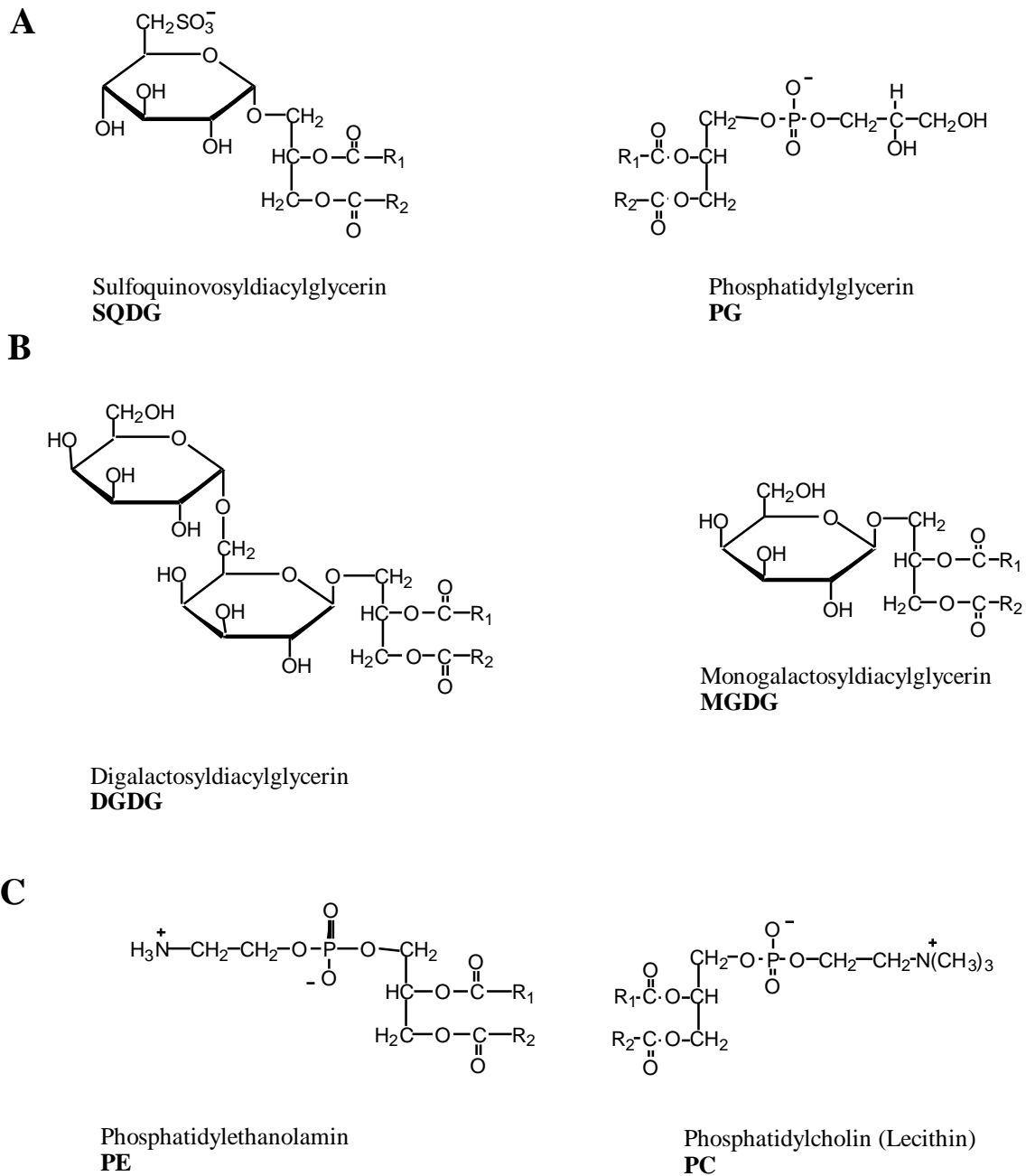


Abb. 1-2: Strukturen charakteristischer Lipide photosynthetischer Membranen.
A, anionische Lipide; B, ungeladene Glycolipide; C, zwitterionische Lipide. R_x=Alkylreste

Thylakoidlipide enthalten jeweils zwei unverzweigte Fettsäuren, die in der Regel aus 16 oder 18 Kohlenstoffatomen bestehen. Diese Fettsäuren haben üblicherweise bis zu drei nicht konjugierte *cis*-Doppelbindungen, wobei die mehrfach ungesättigten Fettsäuren besonders häufig vertreten sind. So beträgt der Anteil der ungesättigten Fettsäuren 16:3 und 18:3 in

Spinatthylakoiden zusammen fast 90% aller vorhandenen Fettsäuren (Webb & Green, 1991). Der hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren führt trotz hohen Proteingehalts zu einer relativ großen Fluidität der Thylakoidmembran. Um diese Fluidität zu bewahren, haben viele Zellen die Fähigkeit entwickelt, den Desaturierungsgrad ihrer Membranlipide entsprechend der Umgebungstemperatur zu regulieren. Ciliaten z. B. können nach dem Absenken der Temperatur zusätzliche Doppelbindungen in die Fettsäurereste ihrer bereits vorhandenen Phospholipide einfügen (Wunderlich *et al.*, 1973), während Cyanobakterien bei tieferen Temperaturen bevorzugt ungesättigte Fettsäuren neu synthetisieren (Sakamoto *et al.*, 1994).

Die Fettsäurebiosynthese findet bei Pflanzen im Gegensatz zu tierischen Systemen nicht im Cytosol, sondern in den Plastiden statt. Die anschließende Biosynthese der Glycerolipide kann, wie man aus Markierungsexperimenten (Roughan & Slack, 1982) sowie Untersuchungen mit Mutanten von *Arabidopsis* (Browse & Somerville 1991) schließt, auf zwei Reaktionswegen erfolgen: So wird ein prokaryotischer und ein eukaryotischer Weg im Chloroplasten bzw. im Endoplasmatischen Retikulum vorgeschlagen (zusammengefaßt von Ohlrogge & Browse 1995). Die Übertragung der polaren Kopfgruppen der Thylakoidlipide auf die Diacylglycerin-Einheit erfolgt wiederum im Chloroplasten.

Von besonderem Interesse sind Lipide auch in ihrer Funktion als Speicher- oder Reservestoffe, da pflanzliche Fette nicht nur als Nahrungsmittel, sondern auch als Rohstoffe für die Industrie genutzt werden können. Diesen Speicherlipiden, Triacylglyceriden, gilt unter anderem aus ökonomischen Gründen das Hauptinteresse der pflanzlichen Lipidforschung. Im Mittelpunkt steht dabei die Biosynthese und Modifizierung der Fettsäuren, wobei durch die Fortschritte der Molekularbiologie und Gentechnik Pflanzenfette maßgeschneidert werden können (Übersichtsartikel: Ohlrogge, 1994; Töpfer *et al.*, 1995).

Diese Arbeit befaßt sich in erster Linie mit der Funktion und Biosynthese eines Thylakoidlipids, dem Sulfolipid SQDG.

1.2 Das Sulfolipid

Die Entdeckung des pflanzlichen Sulfolipids vor etwa 40 Jahren beruhte auf Markierungsexperimenten mit radioaktivem Sulfat, die 1959 von Benson *et al.* mit Purpurbakterien, Algen und höheren Pflanzen durchgeführt wurden. Lipidextrakte dieser unterschiedlichen photosynthetischen Organismen zeigten ein schwefelhaltiges Lipid, dessen Strukturaufklärung ergab, daß es sich um 1,2-Di-*O*-acyl-3-*O*- α -D-6-desoxy-6-sulfo-glucoopyranosyl]-*sn*-glycerin (Sulfoquinovosyldiacylglycerin) handelte (Benson, 1963). Charakteristisch ist vor allem die Struktur der Kopfgruppe, bei der, als Derivat der Glucose, die 6-Hydroxyl-Position durch eine Sulfonatgruppe ersetzt wurde. Diese Sulfoquinovosylgruppe ist bei physiologischen pH-Werten negativ geladen.

Bemerkenswert ist, daß Sulfolipid in neuerer Zeit als vielversprechende Substanz gegen Tumore und HIV diskutiert wird (Gustafson *et al.*, 1989; Mizushina *et al.*, 1998; Otha *et al.*, 1998). Die Wirkung von Sulfolipid beruht dabei vermutlich auf einer starken Inhibierung der eukaryotischen DNA-Polymerase und der HIV-reversen Transkriptase Typ 1. Im Rahmen der Entdeckung dieser Schutzwirkung wurde Sulfolipid chemisch synthetisiert und seine antiviralen Effekte, sowie seine Struktur bestätigt (Gordon & Danishevsky, 1992).

Nach der Entdeckung des Sulfolipids wurden unterschiedlichste Organismen bezüglich ihres Gehaltes untersucht (zusammengefaßt von Haines, 1976). Der Sulfolipidanteil kann von Organismus zu Organismus stark variieren, so beträgt er 2,5% in dem Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides*, 18,6% in der Braunalge *Fucus vesiculosus* (Radunz, 1969) und erreicht in bestimmten marinen Algen über 40% der Gesamtglykolipide (Dembitsky *et al.* 1991). Höhere Pflanzen enthalten etwa 4% Sulfolipid von der Gesamtmenge an polaren Lipiden (Douce & Joyard, 1990) wobei dieser Anteil, in Abhängigkeit vom Phosphatgehalt des Mediums, stark schwanken kann (Benning, 1998). Als Thylakoidlipid ist das pflanzliche Sulfolipid nach Glutathion, Cystein und Methionin eine der in der Natur am häufigsten vorkommende schwefelorganische Verbindung. Daher wird ihm eine bedeutende Rolle im globalen Schwefelkreislauf beigemessen (Heinz, 1993).

Die Struktur der Kopfgruppe des Sulfolipids ist in allen bislang untersuchten Organismen identisch; so konnte z. B. mit Hilfe der Massenspektroskopie gezeigt werden, daß die Kopfgruppe des pflanzlichen Sulfolipids mit der aus *R. sphaeroides* übereinstimmt (Gage *et al.*, 1992). Jedoch können sich Sulfolipid-Präparationen aus unterschiedlichen Organismen

hinsichtlich der Art der mit dem Glycerinmolekül veresterten Fettsäuren deutlich unterscheiden (Tulloch *et al.*, 1973).

Sulfolipid wurde bisher, mit einer Ausnahme, in allen Organismen mit oxygener Photosynthese nachgewiesen. Die Ausnahme bildet das Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* sp. PCC7421 (Selstam & Campbell, 1996). Üblicherweise beträgt der Sulfolipidgehalt in Cyanobakterien etwa 10% (Skallal *et al.*, 1990). Dagegen scheinen mehrere anoxygene photosynthetische Organismen zu existieren, denen dieses Lipid fehlt (Imhoff & Bias-Imhoff, 1995). Es gibt zwei anoxygene Bakteriengattungen, *Ectothiorhodospira* und *Heliobacterium*, die überhaupt keine Glycolipide, also auch kein Sulfolipid enthalten (Asselineau *et al.*, 1982; Imhoff, 1988).

In nichtphotosynthetischen Organismen konnte Sulfolipid nur in wenigen Ausnahmen, z. B. dem Knöllchenbakterium *Rhizobium melilotii* (Cedergren *et al.*, 1994), identifiziert werden. Außerdem wurde Sulfolipid im Bakterium *Alicyclobacillus* (Langworthy *et al.*, 1976) sowie in Eiern und Spermien des Seeigels *Pseudocentrotus depressus* (Isono *et al.*, 1967) nachgewiesen. Deswegen kann die oft aufgestellte Behauptung, daß Sulfolipid ausschließlich in photosynthetischen Organismen vorkomme, nicht aufrecht erhalten werden.

1.2.1 Die Funktion von Sulfolipid

Aufgrund der Beobachtung, daß Sulfolipid fast ausschließlich in der Thylakoidmembran vorkommt, wurde wiederholt eine bedeutende Rolle dieses Lipids in der Photosynthese vermutet (Barber *et al.*, 1986). Experimentelle Daten, die diese Hypothese unterstützen, gewann man aus der Korrelation der Änderungen des Sulfolipidanteils mit der Änderung der Photosynthese (Leech *et al.*, 1973; Sinensky, 1977). Außerdem wurde über einen stimulatorischen Effekt berichtet, den Sulfolipid bei Rekonstitutionsexperimenten mit integralen Membranproteinen auf die photosynthetische Membran haben soll (Gounaris *et al.*, 1985; Pick *et al.*, 1987; Sigrist *et al.*, 1988). Die Notwendigkeit von stöchiometrischen Mengen Sulfolipid und anderer Lipide zur erfolgreichen Rekonstitution der Enzymaktivität läßt auf seine Funktion als wesentliches Lipid, das Proteine in die Membran einbettet (*boundary lipid*), schließen (Barber *et al.*, 1986). Basierend auf pH-Messungen an Protonen-Pumpen schlug Haines 1983 ein Modell vor, in dem die geladenen, anionischen Kopfgruppen von Phospho- oder Schwefel-Lipiden als Protonenleiter fungieren könnten. Dieses Modell impliziert, daß das Sulfolipid eine direkte Rolle beim

Elektronentransport der Photosynthese spielt. Im Einklang mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen Sulfolipid den photosynthetischen Elektronentransport inhibieren können (Menke *et al.*, 1976). Bei einer Sulfolipidmutante von *Chlamydomonas reinhardtii* konnte erhöhte Chlorophyll-Fluoreszenz beobachtet werden, die mit Veränderungen des Photosystems II auf Grund der Reduktion von Sulfolipid erklärt wurde (Sato *et al.*, 1995). Inwieweit dieser Phänotyp auf die Reduktion des Sulfolipidgehalts oder auf sekundäre Mutationen zurückzuführen ist, wurde allerdings nicht geklärt.

Neuere Experimente mit Sulfolipid-Nullmutanten des Cyanobakteriums *Synechococcus* weisen jedoch auf keine spezifische Rolle von Sulfolipid in der Photosynthese hin. So zeigte sich sowohl in der lichtinduzierten Sauerstoffentwicklung als auch in der Chlorophyll-Fluoreszenz kein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp (Güler *et al.*, 1996). In Nullmutanten des photosynthetischen Bakteriums *R. sphaeroides* konnte festgestellt werden, daß Sulfolipid keine Rolle im photosynthetischen Elektronentransport spielt (Benning *et al.*, 1993). In beiden Untersuchungen wurde eine Reduktion im Wachstum der Sulfolipid-defizienten Mutanten unter Phosphatmangel beobachtet. Außerdem war unter Phosphatmangel zu erkennen, daß sich in *Synechococcus* der Anteil an Sulfolipid erhöhte, während PG stark abnahm. Unter gleichen Bedingungen war im Falle der Sulfolipid-defizienten Mutanten nur eine geringe Erniedrigung von PG zu beobachten (Güler *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse führten zur Vermutung einer Substitution von Phospholipiden, vor allem PG, durch Sulfolipid. Der hohe Gehalt von Sulfolipid in Meeresalgen kann in die gleiche Richtung gedeutet werden, da der Phosphatanteil im Meerwasser starken räumlichen und zeitlichen Schwankungen unterworfen ist (Tardent, 1993). Im Vergleich zu Schwefel, der zum natürlichen Elektrolyteninventar von Meerwasser gehört, stammt der Phosphatanteil von Festland und kommt nur als Spurenelement vor.

1.2.2 Die Biosynthese von Sulfolipid

Seit der Entdeckung des Sulfolipids hat es unterschiedliche Vorschläge für den möglichen Biosyntheseweg gegeben, die in einer Reihe von Übersichtsartikeln diskutiert werden (z. B. Harwood, 1980; Mudd & Kleppinger-Sparace, 1987; Kleppinger-Sparace *et al.*, 1990; Heinz, 1993). Experimentelle Daten sind jedoch nur bedingt verfügbar und lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Markierungsexperimente mit radioaktivem Sulfat an isolierten Chloroplasten zeigen, daß alle für die Biosynthese von Sulfolipid benötigten Enzyme im Chloroplasten vorhanden sein müssen (Haas *et al.*, 1980; Joyard *et al.*, 1986). Der Einbau des Sulfats in die Kopfgruppe des Sulfolipids geht mit einer Änderung seiner Redoxstufe von +6 nach +4 einher. Im Rahmen der Schwefelassimilation im Chloroplasten wird Sulfat zunächst durch sequentielle Katalyse mittels ATP-Sulfurylase und Adenosin-Phosphosulfatkinase zu 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) aktiviert und der Schwefel anschließend bis auf die Redoxstufe des Sulfids reduziert. Die bisher bekannten Reaktionen der Schwefelassimilation sind von Hell (1997) sowie von Schmidt & Jäger (1992) zusammengefaßt worden.

Der sogenannte "*glycolytic pathway*", der in Anlehnung an die Glykolyse postuliert wurde, repräsentierte lange Zeit die populärste Hypothese für die Sulfolipidbiosynthese. In diesem Ansatz wird angenommen, daß Adenosin-Phosphosulfat (APS) oder Phosphoadenosin-Phosphosulfat (PAPS) höheren Pflanzen letztendlich den Schwefelanteil für das Sulfolipid liefert. Es kommt zur Bildung von C3-Verbindungen, wie 3-Sulfolactat und 3-Sulfo-D-Lactaldehyd, an denen eine Sulfonsäuregruppe gebunden ist. Durch Kondensation dieser C3-Verbindung, in Analogie zur Aldolasereaktion in der Glykolyse, entsteht 6-Sulfo-6-Desoxy-Fructose-1-Phosphat, das dann auf unbekannte Weise zu UDP-Sulfoquinovose aktiviert wird. Der letzte Schritt der Biosynthese wäre die Übertragung der Sulfoquinovose auf Diacylglycerin. Die Zwischenstufen und enzymatischen Reaktionen, die nach der Aktivierung des Schwefels zur Bildung von UDP-Sulfoquinovose führen, konnten noch nicht durch Experimente belegt werden.

Einen alternativen Biosyntheseweg stellt der "*sugar-nucleotide pathway*" dar, für den auch in dieser Arbeit Hinweise erbracht werden. Hierbei wird davon ausgegangen, daß ein Zuckernukleotid den Ausgangspunkt für die Sulfolipidbiosynthese bildet, welches mit einem

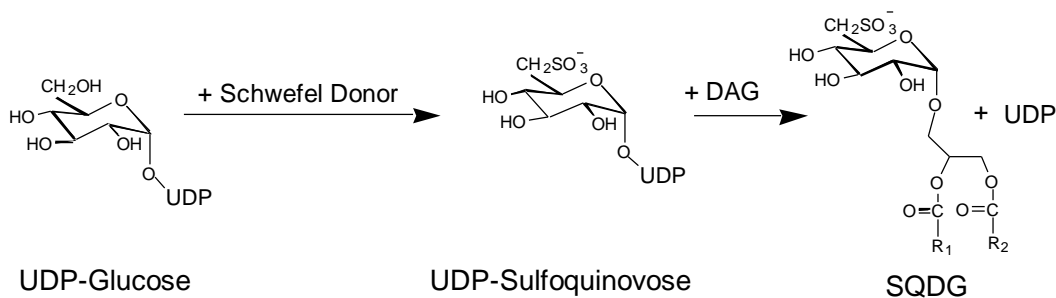


Abb. 1-3: "Sugar-nucleotide pathway" der Sulfolipidbiosynthese.

Im letzten Schritt der Reaktion wird UDP-Sulfoquinovose auf Diacylglycerin (DAG) übertragen.

Schwefeldonor zu UDP-Sulfoquinovose reagiert, die wiederum zu SQDG umgewandelt wird (Abb. 1-3). Die besten Hinweise hierfür liefert der genetische Ansatz, der von Benning verfolgt wird (Benning & Somerville, 1993).

Nach wie vor ungeklärt ist die Biosynthese der UDP-Sulfoquinovose. Einen Hinweis auf die Bildung dieser Vorstufe der Sulfolipidbiosynthese ergibt sich aus der Sequenzähnlichkeit des *sqdB*-Gens (s. u.) von *R. sphaeroides* und *Synechococcus* mit Zuckernukleotid-modifizierenden Enzymen wie UDP-Glucose Epimerase oder dTDP-Glucose Dehydratase. Für die Sulfolipidbiosynthese wurde ein Reaktionsverlauf unter Bildung eines 4-Keto-5,6-Glucoseen, dem Zwischenprodukt der Dehydratase-Reaktion (Gabriel, 1987), vorgeschlagen. Dies sollte als Ausgangssubstrat für die Ausbildung einer Bindung zwischen dem Schwefel- und dem C6-Kohlenstoffatom dienen können (Benning, 1998). Diese Arbeitshypothese wird aufgrund ähnlicher Überlegungen auch von anderen Autoren vertreten (Pugh *et al.*, 1995).

Dagegen ist der letzte Reaktionsschritt der Sulfolipidbiosynthese, der Transfer von Sulfoquinovose auf Diacylglycerin, gut charakterisiert. Bereits Benson postulierte, nach vorläufiger Identifizierung eines Sulfoquinovosyl-Nukleotides in sulfatmarkierten Extrakten aus Algen (Shibuya *et al.*, 1963), daß der letzte Schritt der Sulfolipidbiosynthese durch eine Glucosyltransferase katalysiert wird. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde gezeigt, daß chemisch synthetisierte UDP-Sulfoquinovose die Biosynthese von Sulfolipid an isolierten Chloroplastenmembranen von Spinat stimuliert (Heinz *et al.*, 1989). Andere Sulfoquinovosyl-Nukleotide zeigten diesen Effekt nicht. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte auch die UDP-Sulfoquinovosyl:Diacylglycerin-Sulfoquinovosyl-Transferase aus Chloroplasten beschrieben und näher charakterisiert werden (Seifert & Heinz, 1992; Tietje & Heinz, 1998). Der eindeutigste

Nachweis der Existenz von UDP-Sulfoquinovose konnte jedoch durch einen genetischen Ansatz erbracht werden: In einer Sulfolipid Nullmutante von *R. sphaeroides* konnte akkumulierende UDP-Sulfoquinovose aufgereinigt und charakterisiert werden (Rossak *et al.*, 1995).

1.3 Molekulargenetischer Ansatz mit Modellorganismen

Um einen genetischen Ansatz zur Klärung der Funktion und Biosynthese von Lipiden photosynthetischer Membranen durchzuführen, ist die Auswahl geeigneter Modellorganismen eine Grundvoraussetzung.

Zu den einfachsten und genetisch am besten charakterisierten photosynthetischen Organismen gehört das schwefelfreie Purpurbakterium *R. sphaeroides*. Dieses Bakterium bietet sich vor allem für eine genetische Analyse an, weil es einerseits das gleiche Sulfolipid enthält, das auch in höheren Pflanzen vorkommt, andererseits können ähnliche bakteriengenetische Methoden wie bei *E. coli* angewandt werden. Zum Aufbau eines genetischen Modellsystems für die Untersuchung der Sulfolipidbiosynthese und seiner Funktion wurden eine Reihe von Lipidmutanten von *R. sphaeroides* isoliert und charakterisiert (Benning & Somerville, 1992a). Durch genetische Komplementation der Mutanten mit individuellen Cosmiden aus einer genomischen Bank von *R. sphaeroides* konnten mehrere Gene isoliert werden (Benning & Somerville, 1992b). Insgesamt wurden bis heute aus *R. sphaeroides* vier Gene identifiziert, die an der Sulfolipidbiosynthese beteiligt sind, zwei davon - *sqdC* und *sqdD* - konnten bisher näher beschrieben und ihre Funktion in der Sulfolipidbiosynthese identifiziert werden (Abb. 1-4). Sowohl SQDC als auch SQDD scheinen für die Transferaseaktivität von UDP-Sulfoquinovose auf Diacylglycerin verantwortlich zu sein (Rossak *et al.*, 1995; Rossak *et al.*, 1996).

Cyanobakterien eignen sich besonders als Modellorganismen zur Untersuchung von Prozessen der oxygenen Photosynthese, da auch sie molekulargenetisch gut erschlossen sind. Auch hier können aktive Gene durch homologe Rekombination gegen eine inaktive Kopie des jeweiligen Gens ausgetauscht werden (Thiel, 1994). Im Rahmen der Analyse des Lipidstoffwechsels wurde dieser genetische Ansatz bereits erfolgreich auf cyanobakterielle Fettsäuresaturase-Mutanten angewandt (Wada *et al.*, 1993). Mit Nullmutanten aus *Synechococcus* wurde die Funktion von Sulfolipid in Organismen mit oxygenen Photosynthese von Güler *et al.* (1996) intensiv untersucht. In diesem Organismus konnten bisher zwei an der Sulfolipidbiosynthese beteiligten Gene isoliert werden (Abb.1-4).

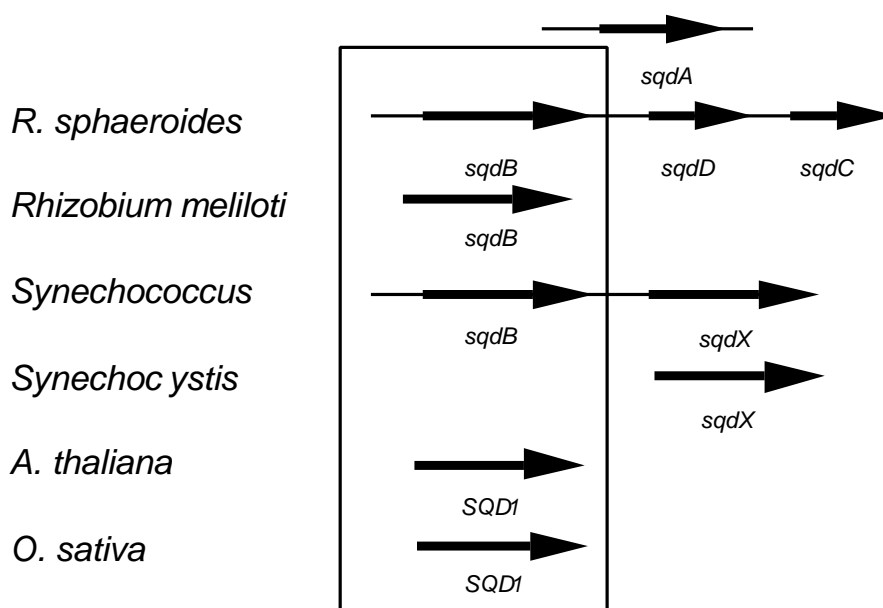


Abb. 1-4: Zusammenfassung der bekannten Sulfolipidgene aus verschiedenen Organismen.

Die Gene, die eine gewisse Homologie aufweisen, sind eingerahmt. Das Gensymbol steht für „Sulfoquinovosyl-diacylglycerin“.

Zur Untersuchung der Funktion und Biosynthese in höheren Pflanzen bietet sich *Arabidopsis thaliana* aus vielen Gründen an (Meinke *et al.*, 1998): *Arabidopsis* hat eine herausragende Stellung als Modellpflanze in Fragen der Pflanzengenetik, Molekularbiologie und der Biochemie eingenommen. Schon 1964 wurde sie von Kribben als „botanische *Drosophila*“ bezeichnet und hat seither eine ähnliche Bedeutung erlangt wie *Drosophila*, *Caenorahbditis elegans* und die Maus in der Zoologie und Medizin. Die Gründe für diesen Erfolg liegen vor allem in ihrer geringen Größe - sowohl der Pflanze selber, als auch ihres Genoms - das mit rund 120 Mb und fünf Chromosomen im haploiden Satz (Meyerowitz, 1994) zu den kleinsten im Pflanzenreich gehört. Sie bietet daher ideale Voraussetzungen von der Kultivierung bis hin zur Isolierung von Genen mit Hilfe von Mutanten. Die Möglichkeit zur Mutagenese, von chemischer Mutagenese über Bestrahlung mit γ -Strahlen bis hin zur Integration von T-DNA oder Transposons, sowie die leichte Transformierbarkeit in Zellkultur oder *in planta* machen *Arabidopsis* zu einem nahezu einmaligen Untersuchungsobjekt in der Pflanzenforschung. Ein Netzwerk von Datenbanken, Stammsammlungen, Internet-Nachrichtengruppen, Genomzentren

und Gruppen, die ihre Forschungsergebnisse der „*Arabidopsis*-Community“ zur Verfügung stellen, erleichtern die Arbeit mit *Arabidopsis* zusätzlich.

Obwohl eine Vielzahl von Mutanten von *Arabidopsis* mit Defekten im Glycerolipidstoffwechsel beschrieben wurden, betreffen diese in der Regel nur die Biosynthese der Fettsäurereste (Ohlrogge & Browse, 1995). Bisher ist erst eine pflanzliche Mutante bekannt, bei der die Biosynthese der Kopfgruppe eines Thylakoidlipids betroffen ist, eine DGDG-defiziente Mutante von *Arabidopsis*, die aus chemisch mutagenisierten Samen hervorgegangen ist (Dörmann *et al.*, 1995). Eine entsprechende Sulfolipid Mutante dieser Art gibt es nicht.

1.4 Kristallstruktur und Homologie Modelling

Zur Aufklärung der Biosynthese ermöglicht die Verfügbarkeit der Sulfolipid-Gene die Herstellung rekombinanter Proteine. Diese können biochemisch charakterisiert und für *in vitro* Assays eingesetzt werden. Den umfangreichsten Einblick in die Funktion von Proteinen und den damit verbundenen Reaktionsmechanismus erlaubt aber sicherlich die dreidimensionale Strukturanalyse.

Trotz neuerer, sehr effektiver mikroskopischer Techniken wie *scanning tunnel*- und *atomic force*-Mikroskopie gibt es heutzutage nur zwei Möglichkeiten die dreidimensionale Struktur von Proteinen aufzuklären. Die eine ist die Analyse der Röntgenstrahl-Beugung an einzelnen Proteinkristallen, die andere die NMR-Analyse kleiner Proteine in Lösung. Dank immer besserer Analysetechnik ist es möglich, auch Proteine bis zu 50 kDa mittels NMR zu untersuchen (Clare & Gronenborn, 1998). Ein Nachteil der NMR- gegenüber einer Röntgenstrukturanalyse ist die weniger genaue Auflösung, ein Vorteil ist, daß sich das Protein tatsächlich in Lösung und nicht in einem Kristallgitter befindet.

Daß die dreidimensionale Struktur letztendlich der Schlüssel zur genauen Charakterisierung eines Proteins ist, kann am Beispiel der UDP-Glucose 4-Epimerase, einem Enzym, das eine gewisse Sequenzähnlichkeit zu den *sqdB/SQD1*-Genen hat, gezeigt werden. Trotz umfangreicher biochemischer Analyse wurde davon ausgegangen, daß ein NAD^+ pro Epimerase-Dimer vorliegt. Erst über die Kristallstruktur konnte nachgewiesen werden, daß eine NAD^+ -Bindungsstelle pro Protein Monomer vorhanden ist (Bauer *et al.*, 1992). Mit der Kristallstruktur war auch der Grundstein für einen Einblick in den katalytischen Reaktionsmechanismus des Enzyms gelegt (Liu *et al.*, 1997; Thoden *et al.*, 1997).

Eine weitere Möglichkeit, Strukturinformationen über ein Protein zu erhalten, ist die computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz. Hierfür gibt es auf den unterschiedlichsten Servern eine große Anzahl von Analyseprogrammen, stellvertretend sind hier der NCBI Server (www.ncbi.nlm.nih.gov) und ExPASy Molecular Biology Server (www.expasy.ch) genannt. Die aussagekräftigste Computeranalyse ist die des Homologie-Modellings, wobei das erstellte, dreidimensionale Modell unter Umständen den gleichen Informationsgehalt wie eine Kristallstruktur haben kann. Grundvoraussetzung für die Erstellung eines Homologiemodells ist jedoch, daß die dreidimensionale Struktur eines homologen Proteins bekannt ist. Ein Beispiel für die sinnvolle und erfolgreiche Anwendung von Computer-Modelling ist der Entwurf von Serin- und Cystein-Protease Inhibitoren, die als antiparasitäre Agenzien wirksam sind. Hierbei wurden Homologiemodelle der Proteasen als Vorlagen für den Entwurf der Inhibitoren genutzt (Ring & Cohen, 1993).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte vor allem der erste Schritt der Sulfolipidbiosynthese, die Bildung von UDP-Sulfoquinovose, untersucht werden. Einer der Ansätze, der zur Untersuchung dieses Schrittes verfolgt wurde, war ein molekularbiologisch-biochemischer Ansatz. Das an der Reaktion beteiligte Gen sollte in *E. coli* kloniert und exprimiert werden. Mit Hilfe des rekombinanten Proteins sollten Antikörper für immunologische Untersuchungen gewonnen werden. Ein Enzymassay sollte entwickelt werden, der zur Identifikation von möglichen Substraten und/oder Intermediaten dieses Reaktionsschritts führen könnte. Außerdem sollte bei erfolgreicher Aufreinigung des rekombinanten Proteins ein kristallografischer Ansatz verfolgt werden, und die erhaltene Kristallstruktur sollte Einblicke in einen möglichen Reaktionsmechanismus erlauben.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit verfolgt das Ziel, Funktion und Regulation von Sulfolipid in *Arabidopsis* zu untersuchen. Basierend auf den Ergebnissen mit Bakterien, sollte vor allem der Einfluß von Phosphat auf die Biosynthese dargestellt werden. Hierfür sollten einerseits transgene Pflanzen hergestellt und untersucht, andererseits auch die *pho 1* Mutante aus *Arabidopsis* genutzt werden.