

4 Ergebnisse

Das Thema dieser Arbeit umfaßt einen biochemischen und einen physiologischen Teil. Der biochemische Teil untersucht die Biosynthese von UDP-Sulfoquinovose. Der physiologische Teil befaßt sich mit der Regulation und der Rolle von Sulfolipid in der Thylakoidmembran. Einleitend wird in den Ergebnissen zuerst das *SQD1*-Gen, die Expression und Aufreinigung des SQD1-Proteins sowie die Antikörperherstellung beschrieben (Abschnitt 4.1). Um erste Informationen über SQD1 zu sammeln, wurde vor der biochemischen Charakterisierung eine umfangreiche Computeranalyse durchgeführt, die in der Herstellung eines Homologiemodells von SQD1 mündete (Abschnitt 4.2). In Abschnitt 4.3 ist die biochemische Charakterisierung des SQD1-Proteins beschrieben, seine Kristallisation wird in Abschnitt 4.4 vorgestellt.

Im zweiten, physiologischen Teil wird mit Hilfe der gereinigten Antikörper die Regulation der Sulfolipidbiosynthese untersucht (Abschnitt 4.5). Um den Zusammenhang zwischen Regulation und Funktion von Sulfolipid zu erörtern, wurde in Abschnitt 4.6 die *pho1* Mutante aus *Arabidopsis* als Untersuchungsobjekt hinzugezogen.

4.1. Das *SQD1*-Gen

Um den ersten Schritt der Sulfolipidbiosynthese zu untersuchen, die Bildung von UDP-Sulfoquinovose, wurde ein genetischer Ansatz verfolgt. Von den unterschiedlichen an der Sulfolipidbiosynthese beteiligten Genen verschiedener Organismen bot sich für diese Untersuchung das *SQD1*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* an. *SQD1* wurde am Anfang der Arbeit von Dr. Sinan Güler (Doktorarbeit, 1996) aus einer cDNA Bank isoliert und war somit das erste verfügbare pflanzliche Sulfolipidgen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gens zeigte unter anderem Sequenzähnlichkeit zu Zuckernukleotid-modifizierenden Enzymen, was einen Hinweis auf die zu untersuchende Reaktion liefert. Orthologe Gene (die bakteriellen *sqdB*-Gene) waren vorhanden, um eventuelle Gemeinsamkeiten in der Funktion zu vergleichen. In Nullmutanten des orthologen *sqdB*-Gens von *R. sphaeroides* akkumulierten keine schwefelhaltigen Substanzen (Benning, 1998), was auf eine Rolle von SQD1/SQDB in der Biosynthese von UDP-Sulfoquinovose schließen ließ. Die Gruppe der *SQD1/sqdB*-Gene ist die einzige bisher bekannte Gruppe von Sulfolipidgenen, die innerhalb der unterschiedlichen Organismen konserviert ist. Dies läßt vermuten, daß ihr eine besondere Bedeutung zukommt. Schließlich eignet sich die Modellpflanze *Arabidopsis* aus erwähnten

Gründen vortrefflich, um eine allgemeine Funktion von Sulfolipid in der Thylakoidmembran zu untersuchen.

Durch Datenbankvergleich wurde die Position des *SQDI*-Gens im Genom von *Arabidopsis* lokalisiert (Abb. 4-1). Hierbei wurde eine 100%ige Sequenz-Übereinstimmung des BAC Klons F26P21.150 in den Exon-Bereichen mit der isolierten *SQDI* cDNA festgestellt. F26P21 kartiert auf Chromosom 4 und weist ein 82 bp großes Intron auf. Über Southern Blot wurde auch gezeigt, daß *SQDI* nur in einer einzigen Kopie im Genom

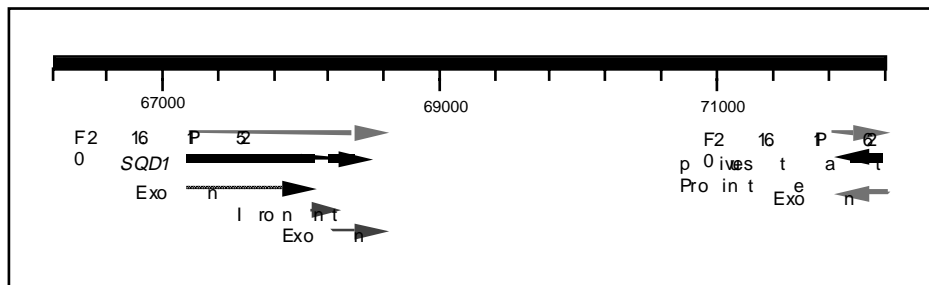


Abb. 4-1: Kartierungsposition des *SQDI*-Gens im *Arabidopsis* Genom

Das *SQDI*-Gen kartiert auf Chromosom 4, BAC Klon F26P21 (ESSAII Projekt)

vorliegt.

4.1.1 Klonierung des *SQDI*-Gens in einen Expressionsvektor

Die Klonierung des *SQDI*-Gens erfolgte über eine PCR-Strategie. Das gewünschte Genstück (1199 bp) wurde aus der cDNA amplifiziert und subkloniert (pBE1). Hierbei wurden die ersten 252 Basenpaare, die vermutlich für ein Signalpeptid kodieren (Essigmann *et al.*, 1998) und die Enzymaktivität und Faltung beeinträchtigen könnten, für die Expression des *SQDI*-Gens nicht amplifiziert. Daraufhin wurde das *SQDI*-Gen in den pQE-30 Vektor kloniert. Die korrekte Orientierung und das richtige Leseraster wurden durch Restriktionanalyse bestätigt.

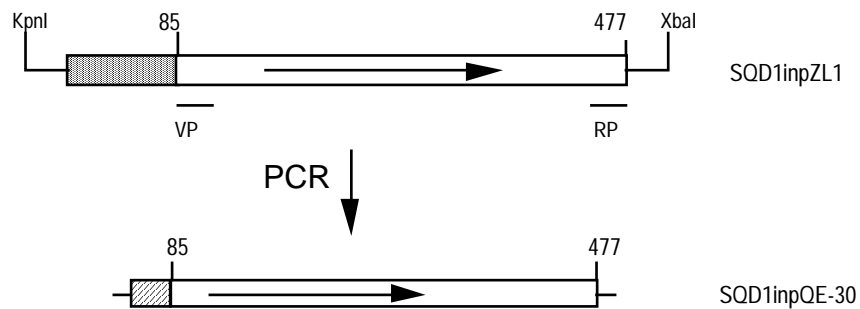


Abb 4-2: Klonierung des SQD1-Expressions Konstrukts

VP und RP bezeichnen die Primer im PCR-Ansatz, der graue Kasten steht für das Signalpeptid, der gestreifte Kasten entspricht dem 6xHis-TAG. Die Zahlen geben die Aminosäurereste des *full length*-Klones an.

4.1.2 Expression und Aufreinigung des *SQD1*-Genproduktes

Die Expression des SQD1-Proteins erfolgte im *QIAexpressionist* System von Qiagen, das vor allem die Aufreinigung des Proteins stark erleichtern sollte. Nach Induktion wurden die Zellen geerntet, aufgebrochen, die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand mit dem exprimierten SQD1-Protein über eine Ni-NTA Säule gegeben. Es folgten einige Waschschrte, bevor das SQD1-Protein in hoher Reinheit eluiert werden konnte (Abb. 4-3)

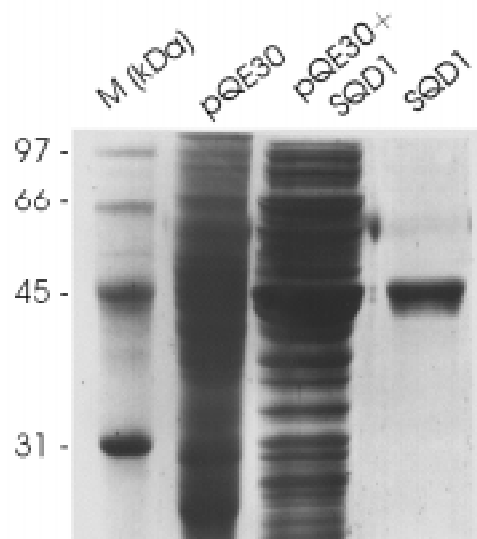


Abb. 4-3: SDS/PAGE der Aufreinigung des rekombinanten SQD1-Proteins

Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt lösliche Proteinextrakte. Spur 1. Protein Marker (kDa); 2. pQE-30 Vektor ohne Insert als Kontrolle; 3. pQE-30 + SQD1 vor der Aufreinigung und 4. aufgereinigtes SQD1-Protein

4.1.3 Produktion und Aufreinigung von Antikörpern

Zur Produktion von Antikörpern wurde das über die Ni-NTA Säule affinitätschromatografisch gereinigte SQD1-Protein genutzt. Etwa 2 mg des hochreinen Proteins dienten der Firma *Eurogentec* zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen. Da das erhaltene SQD1 Antikörperserum eine relativ breite Spezifität aufwies, wurde es über eine Antigen-Affinitätssäule gereinigt. Die so erhaltenen SQD1 Antikörper waren hoch spezifisch, sie zeigten keine Kreuzreaktion mit den homologen bakteriellen SQDB Proteinen und konnten zur Detektion von SQD1 in *Arabidopsis* eingesetzt werden (Abb. 4-4).

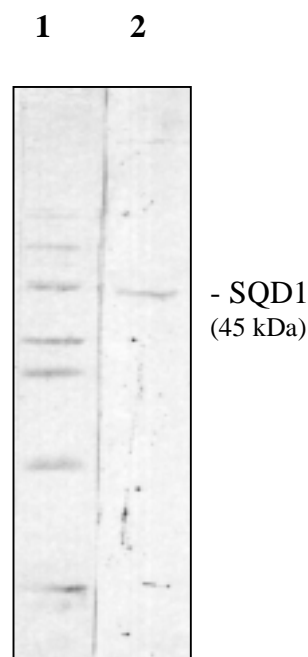


Abb. 4-4: Western Blot zur Aufreinigung des SQD1 Antiserums

Löslicher *Arabidopsis* Proteinextrakt wurde mit 1. nicht aufgereinigten und 2. aufgereinigten SQD1 Antikörpern inkubiert.

4.2 Homologiemodell von SQD1

Um Informationen über unbekannte Proteine wie SQD1 zu erhalten, kann die Aminosäuresequenz mit Hilfe von Datenbankvergleichen und Computerprogrammen analysiert werden. Die aufschlußreichste Analyse kann hierbei beim Vorhandensein eines Homologiemodells durchgeführt werden.

Grundlage für die Konstruktion eines Homologiemodells sind Untersuchungen der Beziehung von Sequenzidentität und Strukturähnlichkeit. Vergleiche zwischen über 300 Proteinen haben gezeigt, daß eine Sequenzidentität von 24,8% über eine Länge von mehr als 80 Aminosäuren sowohl eine funktionelle als auch eine strukturelle Ähnlichkeit beinhalten kann (Sanders & Schneider, 1991). Bei Vorhandensein einer geeigneten Kristallstruktur sollte diese Ähnlichkeit ausreichen, um ein dreidimensionales Modell zu erstellen und zu analysieren. Dieses Homologiemodell kann dann herangezogen werden, um mögliche mechanistische Gemeinsamkeiten zwischen den Proteinen sowie Anhaltspunkte für mögliche Cofaktoren festzustellen. Um Hinweise auf die Funktion von SQD1 in der Sulfolipidbiosynthese zu erhalten, wurde ein dreidimensionales Modell erstellt. Dieses Modell sollte bei der Charakterisierung des Proteins behilflich sein und erlauben, eventuelle Rückschlüsse auf den Mechanismus der Reaktion zu ziehen, die von SQD1 katalysiert wird.

4.2.1 Sequenzähnlichkeit von SQD1 zu Epimerasen und Dehydratasen

Ein Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz, die von dem *SQD1*-Gen aus *Arabidopsis* abgeleitet wurde, mit der *nonredundant translated GenBank*-Datenbank (NCBI) ergab eine offensichtliche Sequenzähnlichkeit von SQD1 zu Zuckernukleotid-modifizierenden Enzymen (Abb. 4-5 A). Der Vergleich zeigt, daß die ersten 84 Aminosäuren von SQD1 zu den orthologen bakteriellen SQDB Proteinen sowie zu unterschiedlichsten UDP-Glucose 4-Epimerasen und Dehydratasen keine Ähnlichkeit aufweisen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß dieser Bereich für ein mögliches Signalpeptid von SQD1 für den Chloroplastenimport kodiert. Die Anwesenheit eines Signalpeptides (~ 5 kDa) konnte durch *in vitro* Translation und Chloroplastenimport-Experimente bestätigt werden (Linke, Diplomarbeit, 1996).

Die Sequenzidentität zwischen SQD1 und den orthologen bakteriellen Genen liegt zwischen 40% und 68%. Die Identität in der Aminosäuresequenz zu den am nächsten verwandten Proteinen, UDP-Glucose 4-Epimerase und dTDP-Glucose 2,4-Dehydratase, liegt bei bis zu 28%, abhängig vom Organismus (Abb. 4-5 A).

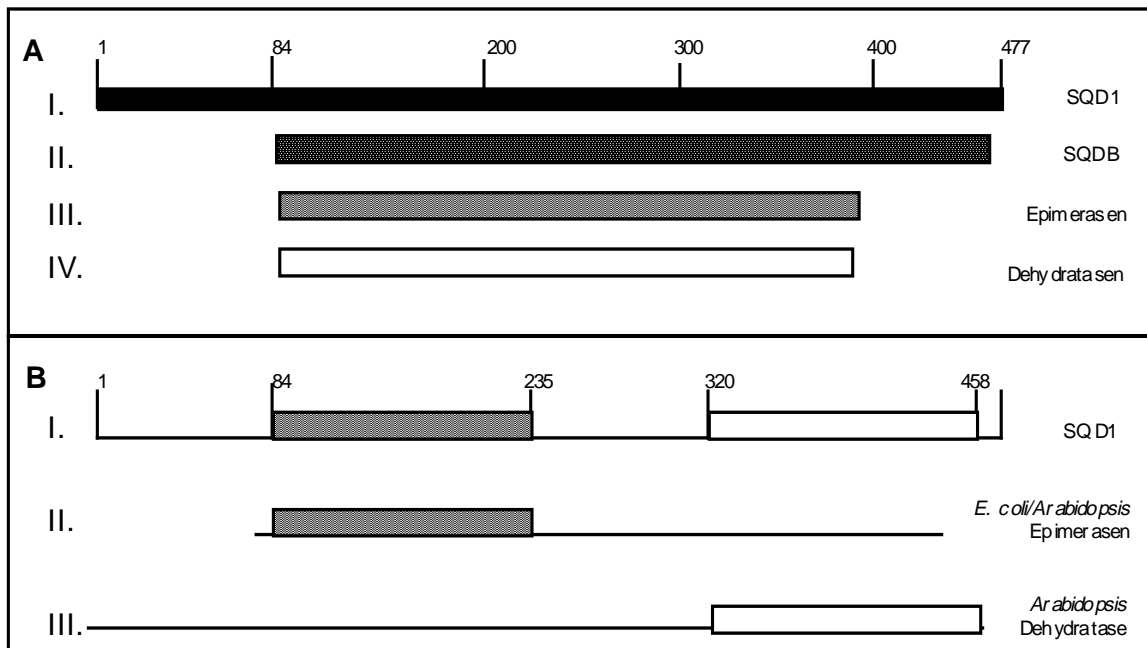


Abb. 4-5: Sequenzähnlichkeit von SQD1 zu Epimerasen und Dehydratasen

A. Vergleich der Aminosäuresequenz von SQD1 aus *Arabidopsis* zu den ähnlichsten Proteinen der *non-redundant*-Datenbank (mit dem *SIM Sequence alignment* Programm und der Matrix BLOSUM62).

I. SQD1 Sequenz. II. Bereich, der die höchste Sequenzidentität zwischen SQD1 und den bakteriellen SQDB Proteinen aufweist (68% Identität zu *Synechocystis* sp., 41% zu *R. sphaeroides* und 40% zu *Synechococcus* sp.). III. Bereich der Ähnlichkeit zwischen SQD1 und Epimerasen diverser Organismen (28% Identität mit UDP-Glucose Epimerasen von *Pasteurella haemolytica*, 27% zu *Aquifex aeolicus*, 27% zu *Saccharomyces cerevisiae*, 27% zu *Neisseria meningitidis*, 26% zu *Haemophilus influenzae*, 26% mit *Yersinia enterocolitica*, 26% mit *Lactobacillus casei*, 26% mit *Kluyveromyces lactis*, 25% mit *Bacillus subtilis* und 27% Identität mit CDP-Tyvelose Epimerase von *Yersinia pseudotuberculosis*) IV. Bereich der SQD1 Identität mit Dehydratasen unterschiedlicher Organismen (26% zu der dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase aus *Salmonella typhimurium*, 26% zu *E. coli*, 25% zu *Rhizobium* sp. NGR234, 25% zu *Haemophilus influenzae* und 24 % zu *Neisseria meningitidis*).

B. Vergleich der Bereiche der Aminosäuresequenz von SQD1 von *Arabidopsis* mit der Aminosäuresequenz von UDP-Glucose Epimerase aus *E. coli* und *Arabidopsis* sowie der dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase (mit dem *SIM Sequence alignment* Programm und der Matrix BLOSUM30).

I. Bereiche der SQD1 Sequenz, die die höchste Ähnlichkeit zu Epimerasen und Dehydratasen aufweisen. II. Bereich der *E. coli* und *Arabidopsis* UDP-Glucose Epimerase, der eine Identität von 26% aufweist. Die Identität über die vollständige Sequenz (Reste 84-469) beträgt 23% bei der *E. coli* und 22% bei der *Arabidopsis* Epimerase. III. Der Bereich in der *Arabidopsis* dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase weist 32% Identität für SQD1 auf. Die Identität zur gesamten *Arabidopsis* Sequenz (Reste 84-469) liegt bei 25 %.

Ein genauerer Sequenzvergleich der N- und C-terminalen Enden von SQD1 mit denen der UDP-Glucose 4-Epimerase und dTDP-Glucose 2,4-Dehydratase-Sequenzen von *Arabidopsis* ergab, daß die Regionen höchster Sequenzidentität mit der Epimerase im N-terminalen Bereich des SQD1-Proteins liegen. Dagegen findet man die höchste Sequenzidentität zu Dehydratasen im C-terminalen Bereich (Abb. 4-5 B).

Diese Ergebnisse weisen auf eine Ähnlichkeit von SQD1 zu beiden Typen von Enzymen hin, die ihrerseits untereinander Homologien aufweisen (27% Identität). Um die funktionelle Relevanz der Ähnlichkeit dieser Enzyme zu evaluieren, wurde ein Strukturmodell von SQD1 erstellt, das auf der Kristallstruktur der *E. coli* UDP-Glucose 4-Epimerase beruht. Kristallographische Daten der Epimerase von *Arabidopsis* oder von Dehydratasen waren zu diesem Zeitpunkt nicht veröffentlicht.

4.2.2 Dreidimensionales Strukturmodell von SQD1

Das dreidimensionale Strukturmodell des *Arabidopsis* SQD1-Proteins wurde, basierend auf seiner Sequenzähnlichkeit (Abb. 4-6) mit Hilfe der in 1,8 Å Auflösung vorliegenden Kristallstruktur der UDP-Glucose 4-Epimerase aus *E. coli* (Thoden *et al.*, 1996, PDB Code: 1xel) erstellt.

	----- Putative Chloroplast Targeting Sequence -----						
SQD1	MAHLLSASCPVSI	LSLSSSSKNSVKPFVSGQTF	FFHAQLLSRSSLKGLLFQEKKPKRSCVFRATAVPITQAPPETSTNNSSSKPKRVMVIGDGYCGWAT	100			
SQD1M	-----			VNVVIGDGYCGWAT	100		
Epim				VLVTGGSGYIGSHT			
Dehyd				ILITGGAGFIGSAL			
SQD1	ALHLSKKNYEVCIV	DNLVRRLFDHQLGLESLTP	IASIHDRISRWALKTGKSI	ELVVDICDFEFLAHSFKSFPD	SVVHFGEQRSAPYSMIDRSRAVTTQ	200	
SQD1M	ALHLSKKNYEVCIV	DNLVR-----	GLESLTPIASIHDRISRWALKTGKSI	ELVVDICDFEFLAHSFKSFPD	SVVHFGEQRSAPYSMIDRSRAVTTQ	200	
Epim	CVQLLQNGHDV	IILDNLGN	SKRSVLPVIERLG	KHPTFVEGDIRNEALMT	TEILDHAI DTVIHFAGLKA	VGESV QKPLEYYD	
Dehyd	VRYIINTSDAVV	VVDKLTAA	GHLMSLAPVAQ	SERFAFEKVDICDRAELAR	VVFTEHQD	CVMLAASH VDRS PAAFIET	
SQD1	HNWVIGTLNVLFA	IKKEFGEECHLVKLG	NGEYGTNPIDIEEGYIT	ITHNGRDITLPEFKQASSFYHLSK	VHDSHNI AFTCKAWGIRATDLN	QGVVYVKT 300	
SQD1M	HNWVIGTLNVLFA	IKKEFGEECHLVKLG	NGEYGTNPIDIEEGYIT	-----	RTDTLPEFK-----	SKVHDSHNI AFTCKAWGIRATDLN	QGVVYVKT 300
Epim	NNGTLRLISAMRAAN	VKNFIPSS	ATVYGDNKIPVESFPT	GTPQSP	PK SKLMVBEQIL	TDLQ WSIALLRYFNPVGAHPSPG	
Dehyd	NVGYITLLEAARAY	WNEDKKFRPHHIS	DEVYGD L DFFTETTPY	A PSSP	SA SKASSDHLVRAWL	LPTLITCNSNMYGP	
SQD1	DETMHBEELRNRLDY	DAVFGTALNRF	CVQAAVGHPLTVYKGGQTRGYLDIRDTVQC	VEIAIANPAKAGEFRVFNQPT	EQFSVNBELASLVTKAGSKLGLD	400	
SQD1M	DETMHBEELRN	-----	LNRF CVQAAVGHPLTVYKGGQTRGYLDIRDTVQC	VEIAIANPAKAGEFRVFNQPT	EQFSVNBELASLVTKAGSKLGLD	400	
Epim	DMGEDPQIPFN	LMPYIAQVGR	RDSLAI FGN DYPTEDGTGVRDIHVMDLADGHV	VAMKLANKP	GVHIYNL	GAGVGN SVL D	
Dehyd	YHFP EK	LIPMLHNAAGKSLPVYGN	GQQIRDWLYVEDHARALYCVATTG		VGETYINIGGHN	ERKML D	
SQD1	VKMTVPNPRVEA	EEHYYNAKHTKLMELG	LEPHYLSDSLDSLLNF	AVQPKDRVDTKQIMP	SVSWKKIGVTKSMTT	477	
SQD1M	VKMTVPNPRVEA	EEHYYNAKHTKLMELG	LEPHYLSDSLDSLLNF	AV-----	VDTRQIMP	SVSWKKIGVTKSMTT 477	
Epim	VVN AFSKACGKPV	NYHFAPR	REGDLPAYWADASKADRELNWRV	TRTLDEMAQDTWHVQSRHP	GGYPD		
Dehyd	VVE TICELLEERDLITF		RYAIDASKIARELGCVP	QETPESGMRKT	VQVYLABESW		

Abb. 4-6: Sequenzvergleich von SQD1, dem Bereich des 3-dimensionalen Modells (SQD1M), der *E. coli* UDP-Glucose Epimerasen (Epim) und der *E. coli* dTDP-Glucose Dehydratase (Dehyd).

Die katalytisch wichtigen Aminosäuren (s. Diskussion) sind grau unterlegt. Der Sequenzvergleich wurde mit *Dali structural alignment* durchgeführt. Für SQD1M bezeichnet "-" Bereiche mit sehr niedriger Homologie zur Epimerase die nicht in das Modell einbezogen wurden. " " weist auf die Bereiche in Epimerase und Dehydratase hin, die strukturell nicht mit SQD1 übereinstimmen.

Das verfeinerte Modell wurde abschließend mit dem Programm *Procheck* bewertet. Ein Ramachandran-Plot des Strukturmodells, der als Hinweis auf die Glaubwürdigkeit des Modells dient, ist in Abb. 4-7 dargestellt. Hierbei fallen alle Aminosäurereste in sterisch erlaubte und bevorzugte Bereiche. Bei der Konstruktion des Modells wurden hauptsächlich die aktiven Zentren des Proteins bearbeitet und analysiert. Das Strukturmodell von SQD1, das Ähnlichkeiten zur Struktur der Epimerase hat, weist auch mögliche Bindungsstellen für NAD^+ und UDP-Glucose auf (Abb. 4-8 A).

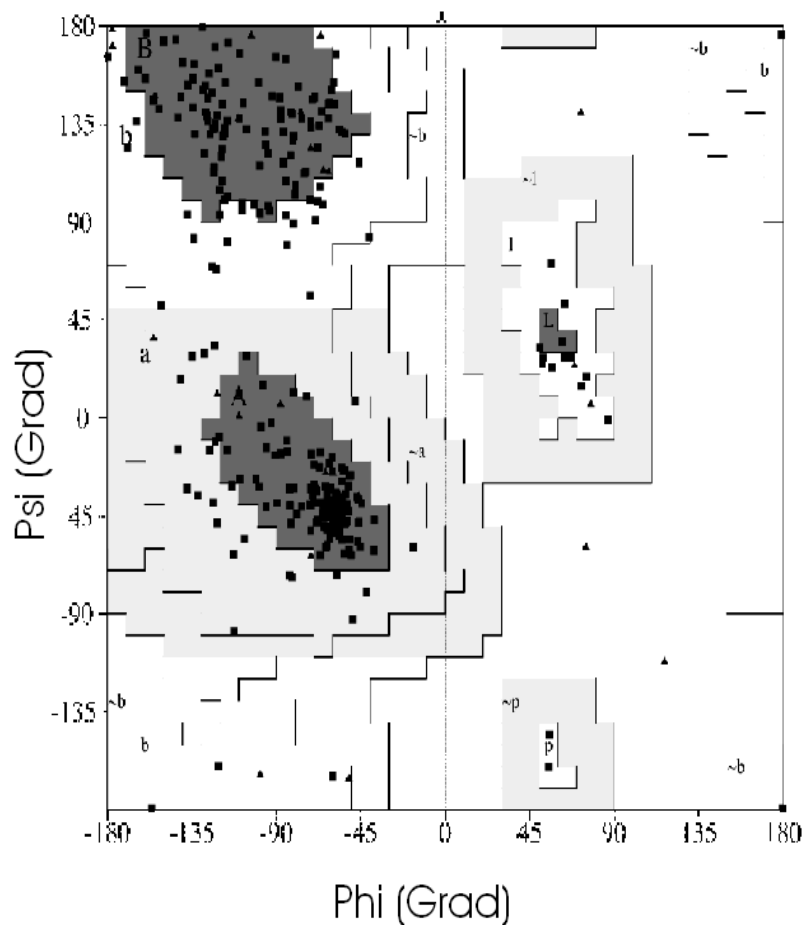


Abb. 4-7: Ramachandran Plot des SQD1 Modells

Alle Aminosäurereste (außer Glycin) liegen in den stark bevorzugten (dunkel grauen) oder bevorzugten (grauen) Regionen des Plot. Glycine, die keine sterische Behinderung aufweisen, sind als Dreiecke dargestellt.

4.2.3 Analyse der NAD⁺-Bindungsstelle

Als Vorlage zur Konstruktion der NAD⁺-Bindungsstelle im SQD1 Modell diente die NAD⁺-Bindungsstelle der Epimerase. In der Struktur der Epimerase liegen 31 Aminosäurereste in der näheren Umgebung (5,0 Å) von NAD⁺ entfernt (Tab. 4-1 A). Die entsprechenden Aminosäurereste im SQD1-Modell sind in 42% der Fälle identisch mit denen der Epimerase und in weiteren 13% handelt es sich um hoch konservierte Substituenten. Zwei der übrigen Aminosäurereste interagieren mit NAD⁺ über Atome der Polypeptidkette. Tatsächlich kann diese 'Rossmann fold'-Struktur (Creighton, 1996) zusammen mit der Nukleotid-Bindung als Beispiel für einen strukturellen und funktionellen Erhalt eines aktiven Zentrums gelten, trotz der relativ niedrigen Sequenzähnlichkeit.

Tab. 4-1: Vergleich der Aminosäurereste in der Epimerase- und der SQD1-Struktur

A. Innerhalb der NAD⁺-Bindungsstelle sind 42% der Aminosäurereste identisch (fett) und 13% konserviert.
 B. In der UDP-Glucose-Bindungsstelle sind 24% der Reste identisch (fett) und zusätzlich 29% konservierte Substituenten.

A		B	
NAD ⁺ -Bindungsstelle		UDP-Glucose-Bindungsstelle	
Epimerase	SQD1	Epimerase	SQD1
GLY:7	GLY:91	Lys:84	ARG:184
GLY:10	GLY:94	VAL:86	ALA:186
TYR:11	TYR:95	THR:124	THR:228
ILE:12	CYS:96	ALA:125	MET:229
GLY:13	GLY:97	THR:126	GLY:230
LEU:30	VAL:114	TYR:149	TYR:257
ASP:31	ASP:115	TYR:177	LEU:290
ASN:32	ASN:116	PHE:178	ASN:291
CYS:34	VAL:118	ASN:179	GLN:292
ASN:35	ARG:119	TYR:203	PHE:326
GLY:57	GLY:157	LEU:215	LEU:336
ASP:58	ASP:158	ALA:216	THR:337
ILE:59	ILE:159	ILE:217	VAL:338
ARG:60	CYS:160	PHE:218	TYR:339
PHE:80	PHE:180	GLY:229	ASP:350
ALA:81	GLY:181	ARG:231	ARG:352
GLY:82	GLU:182	TYR:233	THR:354
LEU:83	GLN:183	VAL:269	LEU:397
LYS:84	ARG:184	ASP:295	GLY:420
ASN:99	GLN:200	LEU:296	LEU:430
SER:122	LEU:226	TYR:299	HIS:433
SER:123	GLY:227		
SER:124	THR:228		
TYR:149	TYR:257		
LYS:153	LYS:269		
TYR:177	LEU:290		
PHE:178	ASN:291		
PRO:180	GLY:293		
GLU:191	GLU:304		
ASN:199	ARG:312		

Die Überlagerung des Peptidrückgrates (RMSD 0,33Å) des SQD1 Modells mit dem der Epimerase in der Region der NAD⁺ Bindungsstelle erlaubt es, Rückschlüsse auf die Bindung eines Cofaktors zu ziehen. Wasserstoffbrücken-Bindungen und Seitenketten-Konformationen, die starke Ähnlichkeit zwischen dem Modell und der Epimerase aufwiesen, wurden der Konformation der Epimerasestruktur angepaßt. Bis auf eine konnten alle Wasserstoffbrücken-Bindungen, die von der Epimerase mit NAD⁺ gebildet werden, mit dem SQD1 Modell reproduziert werden. Außerdem bildete sich in SQD1 zusätzlich eine neue Wasserstoffbrücken-Bindung mit Arg119. Die Überprüfung der *van der Waals* Überlappung zwischen den Atomen von NAD⁺ und SQD1 weisen keine sterischen Unstimmigkeiten auf.

Daraus läßt sich schlußfolgern, daß NAD^+ in SQD1 die gleiche Konformation wie in der Epimerase annehmen kann.

4.2.4 Analyse der UDP-Glucose-Bindungsstelle

Wie im Falle der NAD^+ -Bindungsstelle wurden die Aminosäurereste von SQD1, die eine mögliche Bindung zu UDP-Glucose ausbilden, durch Vergleich mit entsprechenden Resten der Epimerase analysiert. Im Falle der UDP-Glucose Bindungsstelle wurden 21 Aminosäurereste, die im Abstand von 5\AA die UDP-Glucose umgeben, ausfindig gemacht (Tab. 4-1 B). Die Überlagerung der Polypeptidrückgrate (RSMD $0,31\text{\AA}$) zeigte, daß mit SQD1 9 der 10 Wasserstoffbrücken-Bindungen der Epimerase zu UDP-Glucose reproduzierbar waren. Außerdem wurde auch hier eine zusätzliche Bindung, die in der Epimerase nicht vorhanden war, gefunden. Auch wenn die Konformation der UDP-Glucose, wie sie in der Epimerase vorliegt, ohne sterische Überlappungen in das SQD1 Modell eingefügt werden kann, zeigt der Unterschied einiger Aminosäurereste, die die UDP-Glucose umgeben, daß das Molekül auch weitere mögliche Konformationen einnehmen könnte. Alle Unterschiede in der Konformation von UDP-Glucose scheinen den Befund des Sequenzvergleiches zu bestätigen, daß die UDP-Glucose Bindungsstelle höhere Sequenzähnlichkeit zu Dehydratase als zu Epimerasen aufweist.

Daß UDP-Glucose ein mögliches Substrat für SQD1 ist, wird durch den Enzymtest (Abschnitt 4.3.3), sowie durch die Beobachtung unterstützt, daß Zugabe von UDP-Glucose auf SQD1 eine stabilisierende Wirkung hat (Abschnitt 4.4.1). Des weiteren erfordert die postulierte Reaktion einen Schwefel-Donor, was bedeuten könnte, daß einige der Aminosäurereste für die Bindung dieses Donors verantwortlich sind. So könnte man postulieren, daß die konservierten Aminosäurereste der Bindungsstelle an der Bindung von UDP-Glucose, die nicht konservierten an der Bindung des Schwefel-Donors beteiligt sind.

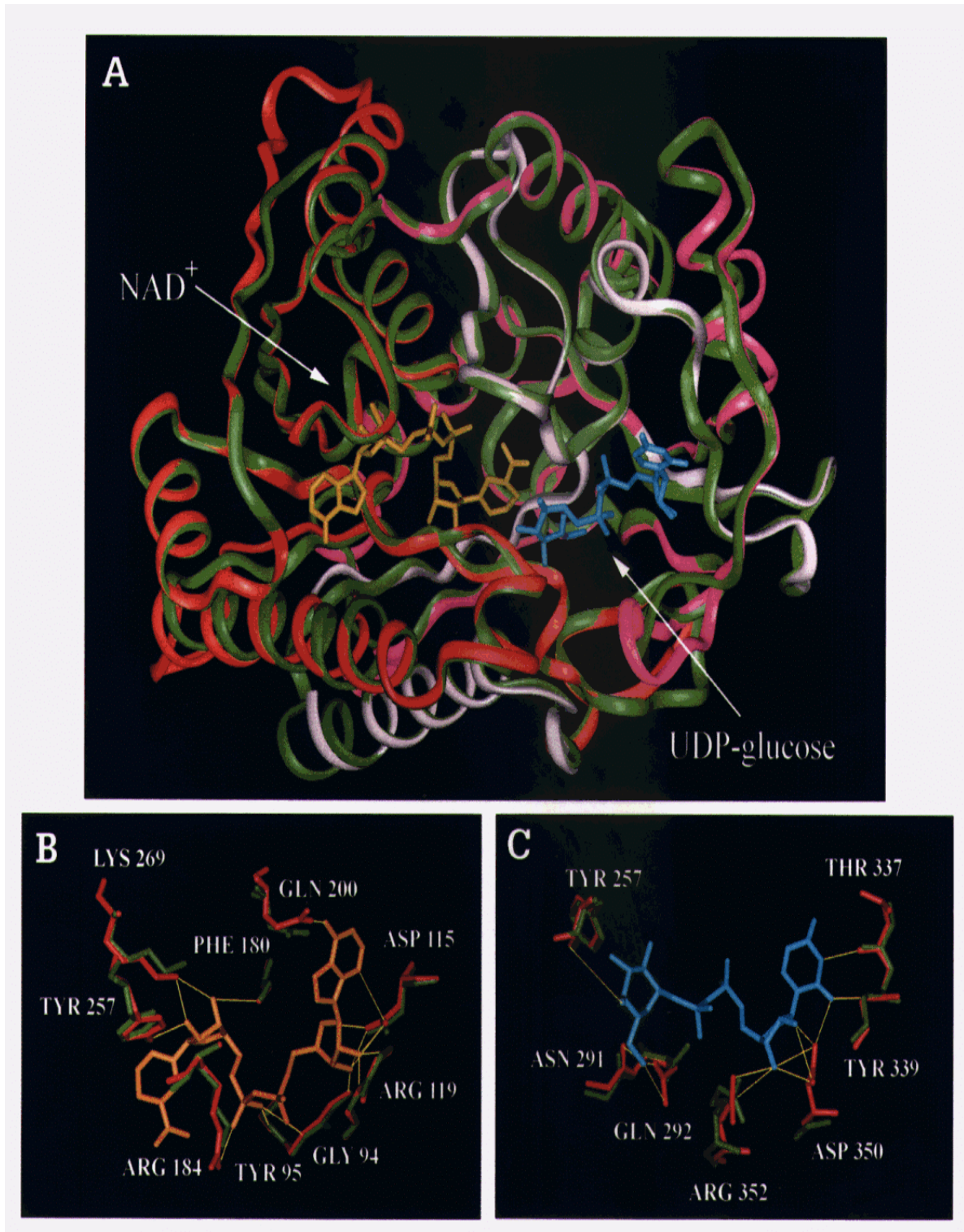


Abb. 4-8: Überlagerung des SQD1 Homologiemodells mit der Struktur der UDP-Glucose 4-Epimerase.
 A. Überlagerung des Polypeptidrückgrates des SQD1 Modells (Aminosäurereste 87-239, rot; 240-323, grau; 324-441, rosa) mit dem der UDP-Glucose Epimerase (Thoden *et al.*, 1996; PDB file: 1xel), grün.
 B. Darstellung der NAD⁺ (goldgelb) Bindungsstelle von SQD1 (rot). Gezeigt sind nur diejenigen Aminosäurereste, die Wasserstoffbrückenbindungen (gelbe Linien) zum Cofaktor ausbilden können. Die entsprechenden Reste der Epimerase sind grün.

C. Darstellung der UDP-Glucose (blau) Bindungsstelle von SQD1 (rot), wobei nur diejenigen Reste dargestellt sind, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden; die Reste in der Epimerase sind grün dargestellt.

4.3 Biochemische Charakterisierung von SQD1

Die biochemische Analyse sollte zur Aufklärung der Reaktion, die das SQD1-Protein katalysiert, beitragen. Ausgangspunkt der Charakterisierung waren Informationen, die anhand der Sequenzähnlichkeit von SQD1 zu anderen Proteinen und aus dem Homologie-modell erhalten wurden.

4.3.1 Identifizierung von NAD^+ als Cofaktor von SQD1

Um die durch das dreidimensionale Modell von SQD1 vorhergesagte NAD^+ Bindung zu überprüfen, wurde eine biochemische Analyse des SQD1 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das rekombinante, gereinigte Protein dialysiert und denaturiert, danach abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Das Chromatogramm zeigte einen Hauptbestandteil, der bei 22 min eluiert (UV Absorption bei 254 nm). Die Injektion von NAD^+ Standard (99,9% rein, Boehringer Mannheim) ergab eine einzige Komponente bei gleicher Retentionszeit (Abb. 4-9).

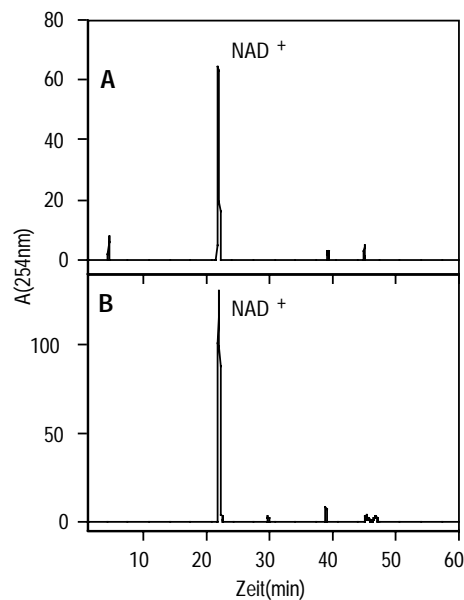


Abb. 4-9: Bestimmung von NAD^+ als Cofaktor von SQD1 mittels HPLC

A. UV Detektion nach Injektion des Überstandes des denaturierten SQD1-Proteins. B. UV Detektion von NAD^+ Standard in Protein Puffer.

Dies Ergebnis ließ vermuten, daß es sich bei der Verbindung im Protein-Überstand um ehemals gebundenes NAD^+ handelt. Um die Struktur der freigesetzten Verbindung zu bestätigen, wurde die HPLC-Fraktion des entsprechenden Signals aufgefangen und mit Hilfe von MALDI-MS analysiert. Das MALDI-MS Spektrum dieser Probe zeigte ein vorherrschendes Signal, das dem Masseion MH^+ von $m/z=664,2$ entspricht (Abb. 4-10). Als Kontrolle wurde reines NAD^+ mit MALDI-MS untersucht, was ein identisches Spektrum ergab.

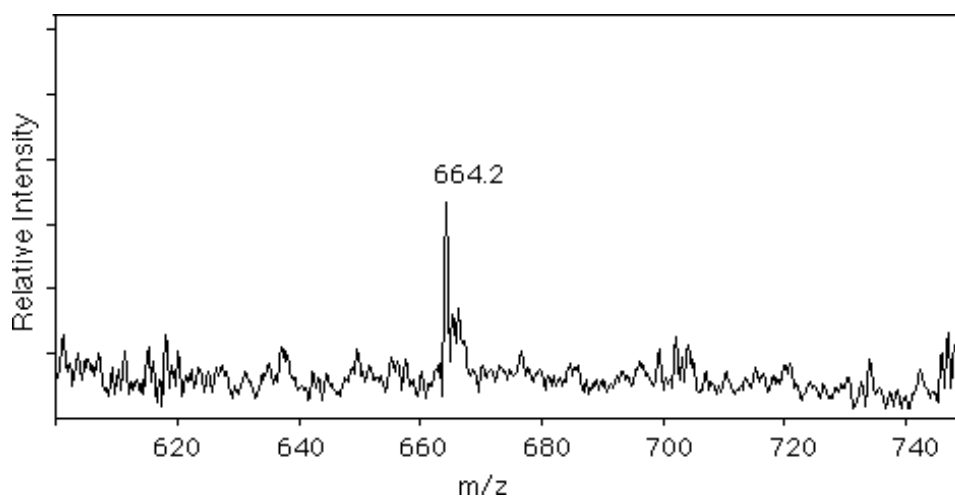


Abb. 4-10: Identifizierung von NAD^+ mittels MALDI/MS

MALDI-Massenspektrum (im hohen Massenbereich) des aufgefangenen HPLC Signals.

4.3.2 Bestimmung der $\text{NAD}^+:\text{SQD1}$ Stöchiometrie

Zusätzlich zu der Charakterisierung von NAD^+ mittels HPLC wurde das stöchiometrische Verhältnis von NAD^+ zu dem aufgereinigten SQD1-Protein bestimmt. Dazu wurde das denaturierte Protein abzentrifugiert und der Überstand mit einem photometrischen Enzymtest untersucht. Aufgrund dieser Messungen wurde ein Verhältnis von $0,5 \pm 0,1$ Äquivalenten NAD^+ pro Mol SQD1-Protein errechnet. Im Gegensatz dazu konnte mit nicht denaturiertem Protein mit dem gleichen Verfahren kein NAD^+ nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß NAD^+ mit SQD1 assoziiert ist und außerdem denaturierende Bedingungen notwendig sind, um NAD^+ aus dem Protein loszulösen. Diese Tatsache ist dahingehend zu interpretieren, daß der Cofaktor relativ stark an SQD1 gebunden ist.

4.3.3 Untersuchung der Enzymaktivität des SQD1-Proteins

Ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung des letzten Schrittes der Sulfolipidbiosynthese konnte mittels Nullmutanten verschiedener Sulfolipidgene in *R. sphaeroides* geleistet werden (Rossak *et al.*, 1995; Rossak *et al.*, 1997). Die entsprechenden Mutanten wurden mit radioaktivem Sulfat markiert und die wasserlöslichen Bestandteile der Zellextrakte aufgetrennt. Über Autoradiographie konnten, im Vergleich zu Wildtypzellen, schwefelmarkierte, akkumulierende Substanzen sichtbar gemacht werden. Diese wurden aufgereinigt und charakterisiert.

Die Identifikation von Intermediaten, die an der Biosynthese von UDP-Sulfoquinovose beteiligt sind, kann mit einem entsprechenden Ansatz nicht verfolgt werden. Mutanten in Genen, die an der Biosynthese von UDP-Sulfoquinovose beteiligt sind, können nicht mit radioaktivem Sulfat markiert werden, da keine schwefelmarkierte Substanz akkumulieren würde. Eine entsprechende Markierung mit radioaktivem Kohlenstoff würde an der sich ergebenden Komplexität der entstehenden Produkte scheitern.

Um den Nachweis zu erbringen, daß es sich bei SQD1 tatsächlich um ein Protein handelt, das am ersten Schritt der Sulfolipidbiosynthese beteiligt ist, wurde versucht, ein *in vitro* „Enzymassay“ zu entwickeln.

Sowohl Proteinextrakte des gereinigten SQD1-Proteins, als auch Proteinextrakte des orthologen SQDB (rekombinante Expression s. Essigmann, Diplomarbeit, 1995) wurden bei der Untersuchung der Enzymaktivität eingesetzt. Um mögliche entstehende Reaktionsprodukte oder Intermediate zu trennen wurden unterschiedliche Dünnschichtchromatographie- und HPLC-Systeme getestet. Das erfolgversprechendste Verfahren war die Trennung von radioaktiv markierten Zuckernukleotiden über eine *reversed Phase* Säule mittels Ionenpaar-HPLC.

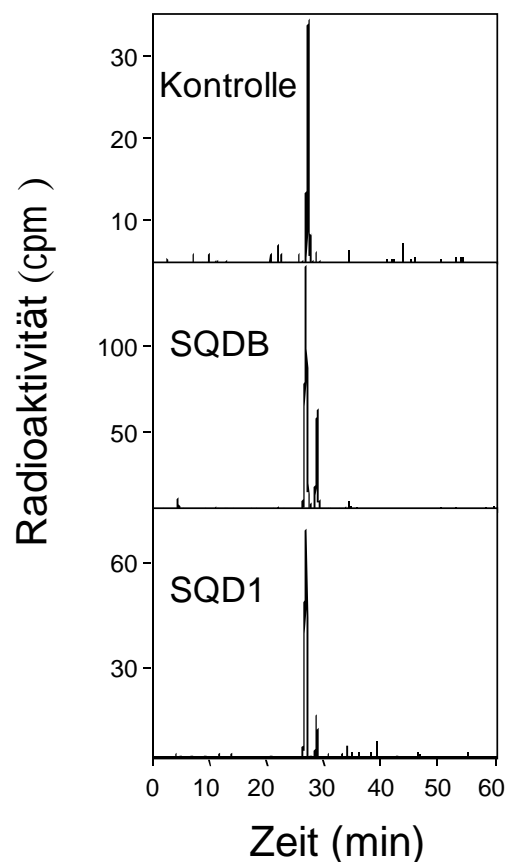
4.3.3.1 UDP-Glucose ist das Substrat für SQD1/SQDB

Mit Hilfe des erwähnten Detektionssystems war es möglich, UDP-Glucose als Substrat der SQD1/SQDB-Reaktion zu identifizieren. Die Enzymreaktion wurde bei 37 °C durch Zugabe radioaktiver UDP-Glucose gestartet und durch Denaturierung des Proteins abgebrochen. Das denaturierte Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand in die HPLC injiziert. Die Untersuchung zeigt, daß sowohl in dem Enzymansatz, in dem das gereinigte SQD1-Protein eingesetzt wurde, als auch im Ansatz mit dem rekombinanten SQDB Gesamtprotein-Extrakt die Entstehung einer neuen Verbindung zu beobachten ist. In beiden Enzymreaktionen weist

die entstandene Verbindung die gleiche Retentionszeit von etwa 28 min auf. Dies kann als Beweis der funktionellen Homologie der beiden Proteine interpretiert werden (Abb. 4-11). Dagegen zeigt ein Reaktionsansatz mit einer Kontrolle (Proteinextrakt von *E. coli*) unter gleichen Bedingungen nur das Signal von UDP-Glucose.

Abb. 4-11 : HPLC-Auftrennung der Enzymreaktionen mit UDP-Glucose

Oben, Reaktion des *E. coli* Kontrolleextrakts, mitte, Proteinextrakt, in dem das *sqdB*-Gen exprimiert wurde, unten Enzymreaktion mit dem aufgereinigten und dialysierten SQD1-Protein. Die Detektion erfolgte mittels *on line* Messung der Radioaktivität in einem Festphasenisotopendetektor.



Bei dem beschriebenen Reaktionsansatz konnte kein wirklicher Enzymassay etabliert werden, da sowohl das gereinigte SQD1-Protein als auch der SQDB Proteinextrakt kein „klassisches“ Verhalten aufwies. Es konnte festgestellt werden, daß während der Reaktion kein Produkt freigesetzt wird. Die Freisetzung der neu auftretenden Substanz erfolgt erst durch die Denaturierung des Proteins, ein Hinweis, daß eine nicht vollständig abgelaufene Reaktion vorliegt. Ein weiterer Hinweis, daß es sich bei der beobachteten „Umsetzung“ um eine Teil- oder Halbreaktion handelt, ist die Beobachtung, daß die „umgesetzte“ Menge an

UDP-Glucose in der Größenordnung der vorliegenden Proteinmenge liegt. So konnte auch durch eine Erhöhung der Substratkonzentration keine Produkterhöhung erzielt werden.

Um mögliche Nebenreaktionen anderer *E. coli* Proteine auszuschließen, wurde für die weiteren Untersuchungen vornehmlich das gereinigte SQD1-Protein eingesetzt. Bei der weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde festgestellt, daß sich mit zunehmender Reaktionsdauer eine zweite unbekannte Substanz bildet (Abb. 4-12). Die Entstehung dieser zweiten Substanz läuft mit der Abnahme der ersten einher, was auf ein Zerfallsprodukt oder eine Folgereaktion der ersten Substanz schließen läßt.

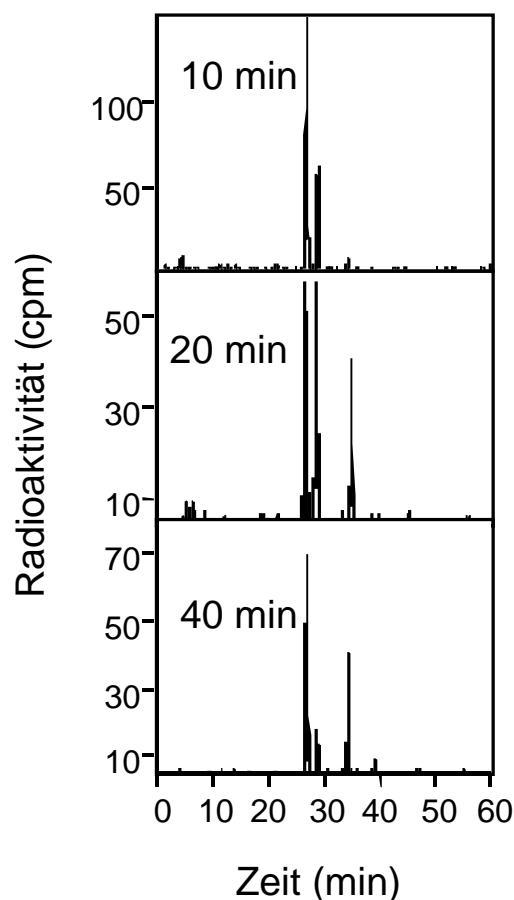


Abb. 4-12 : Zeitlicher Verlauf der SQD1 Enzymreaktionen mit UDP-Glucose

SQD1-Reaktion, die nach 10 min, 20 min und 40 min abgestoppt wurde. Auch hier erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Festphasen-isotopendetektors.

Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, daß SQD1 und SQDB *in vitro* durch die Bildung des „Reaktionsproduktes“ für einen weiteren Umsatz von UDP-Glucose gehemmt wird. Hierfür bieten sich unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten an: Einerseits könnte ein zweiter Reaktionspartner für ein UDP-Glucose Intermediat von Nöten sein, um die Enzymreaktion zu Ende zu führen und freigelassen zu werden. Diese Vermutung stände in Einklang mit einem für die Bildung von UDP-Sulfoquinovose postulierten Schwefel-Donor. Andererseits könnte die Bildung von UDP-Sulfoquinovose auch über *substrat channeling* von statten gehen, was ein oder mehr weitere Proteine benötigen würde. Es sollte betont werden, daß in unabhängigen Expressionssystemen sowohl mit dem gereinigten SQD1 als auch für SQDB eine stark begrenzte Reaktionsfähigkeit beobachtet wurde.

4.3.3.2 Zugabe von NAD⁺ oder Sulfit haben keinen Einfluß auf die Reaktivität

Um die vermutete Teil- oder Halb-Reaktion möglicherweise doch vollständig ablaufen zu lassen, wurde der Einfluß von Cofaktoren sowie potentielle Schwefel-Donoren getestet. Die Zugabe von NAD⁺, ATP, FADH und MgCl₂ (je 1µM, 10µM, 1mM) und auch Sulfat, Thiosulfat oder Sulfit zeigte keinen Einfluß auf den „Umsatz“ des SQD1 Enzyms.

4.3.3.3 UDP-Galactose ist kein kompetitiver Inhibitor

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit von SQD1 zu Epimerasen wurde vermutet, daß UDP-Galactose neben UDP-Glucose ein mögliches Substrat des Proteins sein könnte. Einen weiteren Hinweis liefern Berichte, in denen auch UDP-Galactose die Biosynthese von Sulfolipid stimulieren soll (Pugh *et al.*, 1995b).

Die Durchführung des Enzymassays mit radioaktiv markierter UDP-Galactose wies kein Umsetzungsprodukt auf. Auch der Versuch der Inhibition der UDP-Glucose-Reaktion durch 20fachen Überschuß an kalter UDP-Galactose zeigte keinen Einfluß von UDP-Galactose. Dieses Ergebnis belegt die hohe Selektivität von SQD1 bezüglich seines Substrates UDP-Glucose.

4.3.4 Aufreinigung des Reaktionsproduktes

Bei dem durchgeführten Reaktionsansatz handelt es sich um eine *in vitro* Reaktion, bei der die erhaltenen Daten darauf hinweisen, daß es sich bei dem beobachteten Reaktionsprodukt um ein mögliches Intermediat der UDP-Glucose handelt. Die radioaktive Verbindung wurde aus mehreren HPLC Läufen isoliert, vereinigt und wiederum über HPLC gereinigt. Die so gereinigte Substanz wurde dann zur Strukturaufklärung eingesetzt.

4.3.5 Strukturaufklärung des Reaktionsproduktes

Zur Charakterisierung des Reaktionsproduktes wurde dieses massen- und NMR-spektroskopisch untersucht. Die massenspektroskopische Analyse führte im Rahmen der Arbeit zu keinem Ergebnis, da weder MALDI/MS noch negative oder positive FAB-(*fast atom bombardment*) Spektrometrie in dem erwarteten Massenbereich von m/z 500 bis m/z 700 ein signifikantes Signal aufwiesen. Die Analyse der ^1H -NMR-Spektren sowie der DQF-COSY-Spektren (Abb. 4-13) konnte über einen großen Teil des Moleküls Aufschluß geben.

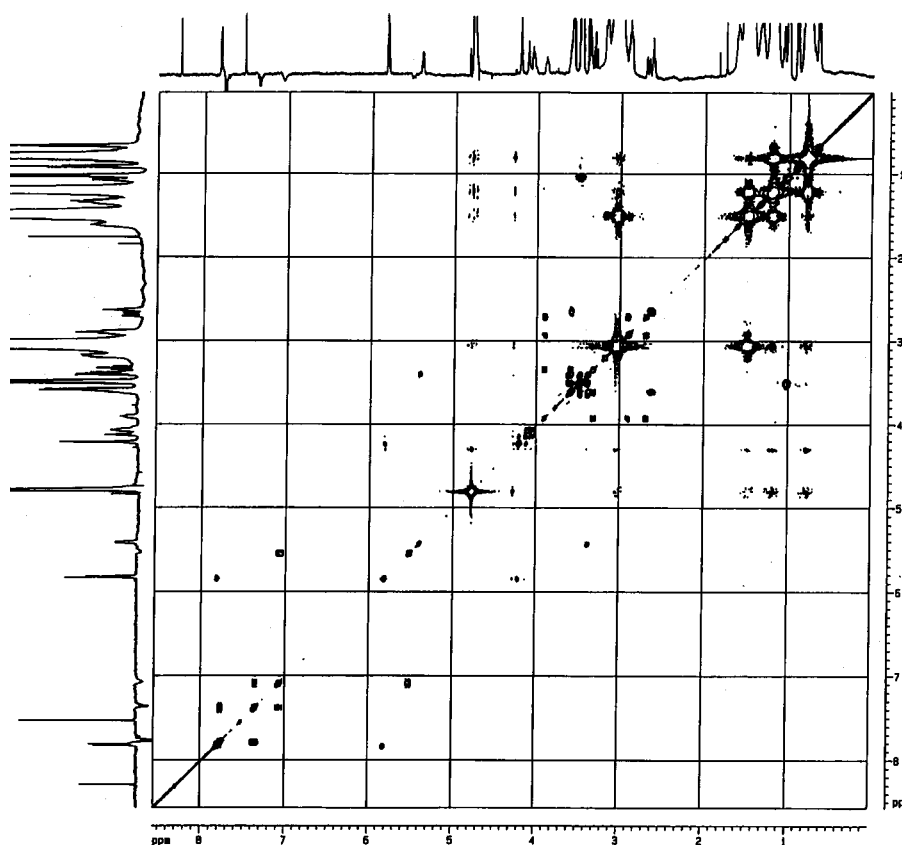


Abb. 4-13: Cosy Spektrum des SQD1 Reaktionsproduktes

Das Spektrum wurde freundlicher Weise von Dr. Schäfer, FU Berlin aufgenommen.

Hierfür wurde die chemische Verschiebung des SQD1 Reaktionsproduktes mit den Daten von chemisch synthetisierter UDP-Sulfoquinovose verglichen (Hoch *et al.*, 1989). Die Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums belegt, daß der Großteil des Reaktionsproduktes identisch mit dem der UDP-Sulfoquinovose ist. So können die Signale des UDP-Teils sowie die H-1 bis H-3 des Zuckerteils eindeutig zugeordnet werden (Tab. 4-2). Eine vollständige Charakterisierung des Reaktionsproduktes konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da die restlichen Signale des Zuckeranteils durch die des HPLC Laufmittels verdeckt werden. Bisher war es nicht möglich, das im Laufmittel vorhandene Tetrabutylammonium von der zu untersuchenden Substanz zu trennen.

Tab. 4-2: Auswertung des ^1H -NMR des SQD1 Reaktionsproduktes

Vergleich der chemischen Verschiebung und der Kopplungskonstanten des SQD1 Reaktionsproduktes mit denen, die für UDP-Sulfoquinovose (Hoch *et al.*, 1989) ermittelt wurden. J, Kopplungskonstante; n. d., nicht bestimmt oder nicht bestimmbar

SQD1 Reaktionsprodukt			UDP-Sulfoquinovose	
Proton	chem. Verschiebung (ppm)	Kopplungskonstante (Hz)	chem. Verschiebung (ppm)	Kopplungskonstante (Hz)
Uridin-				
H-5	5,81-5,84	n. d.	5,80-5,82	n. d.
H-6	7,82	$J_{5,6}$ 8,0	7,80	$J_{5,6}$ 8,1
Ribose-				
H-1	5,81-5,84	n. d.	5,80-5,82	n. d.
H-2	4,21	n. d.	4,23	n. d.
H-3	4,21	n. d.	4,23	n. d.
H-4	4,02-4,15	n. d.	4,04-4,14	n. d.
H-5	4,02-4,15	n. d.	4,04-4,14	n. d.
H-5'	4,02-4,15	n. d.	4,04-4,14	n. d.
Sulfoquinovose				
H-1	5,41	$J_{1/2}$ 3,6	5,45	n. d.
H-2	3,30-3,41	n. d.	3,34-3,42	$J_{2/3}$ 9,5
H-3	3,58-3,63	$J_{3/4}$ 9,6	3,61	$J_{3/4}$ 9,5
H-4	n. d.	n. d.	3,34-3,42	n. d.
H-5	n. d.	n. d.	4,04-4,14	n. d.
H-6	n. d.	n. d.	3,04	$J_{6/6}$ 14,9
H-6'	n. d.		3,22	

Zusammenfassend kann man sagen, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt der SQD1/SQDB katalysierten Reaktion um ein Derivat der UDP-Glucose handeln muß. Sowohl das Laufverhalten, als auch das Absorptionsvermögen und schließlich das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum weisen darauf hin, daß bei dem Reaktionsprodukt ein Nukleotid-Zucker vorliegt.

4.4 Kristallstruktur von SQD1

Als weiterer Ansatz, Daten über den möglichen Reaktionsmechanismus von SQD1 zu sammeln, wurde das SQD1-Protein kristallisiert. Durch die Kristallstruktur sollte einerseits die Qualität des Homologiemodells bestätigt, andererseits aber auch wertvolle Informationen bezüglich der Umsetzungsprodukte gewonnen werden.

4.4.1 Kristallisation

Da eine Kristallisation von SQD1 oder homologer Proteine noch nicht durchgeführt wurde, mußten die Kristallisationsbedingungen neu ausgelotet werden. In Vorversuchen wurde die Reinheit des Proteins auf einer Gelfiltrationssäule bestätigt. Da für Proteinkristallisation Proteinkonzentrationen von 5-25 mg ml⁻¹ am erfolgversprechendsten sind, wurde versucht, SQD1 so weit wie möglich zu konzentrieren. Für diese Versuche wurden unterschiedliche Puffersysteme bei unterschiedlichen pH-Bedingungen, verschiedene Salzkonzentrationen sowie unterschiedliche Detergentien getestet. Die Bedingung, bei denen sich das SQD1-Protein am weitesten konzentrieren ließ, war eine Pufferlösung, die 300 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 enthielt. Unter diesen Bedingungen war eine 7 mg ml⁻¹ SQD1-Lsg. bei 4°C über mehrere Tage stabil, bevor das Protein auszufallen begann. Hierbei konnte auch festgestellt werden, daß UDP-Glucose (10 mM) das Protein stabilisierte. Des Weiteren schien das Protein bei Raumtemperatur stabiler als bei 4°C zu sein. Mit diesen Informationen wurde ein erster grober Kristallisationsversuch in einem Kristallisationsraum bei 22°C, mit einer frischen 5 mg ml⁻¹ Proteinlösung (in 300 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5) durchgeführt. Dabei wurde das Prinzip des Überdampfens als *hanging drop*-Methode mit dem *Crystal Screen I* und *Crystal Screen II* der Firma *Hampton Research* angewandt.

In 32 von 98 dieser Ansätze wurde Kristallwachstum beobachtet. In den meisten Fällen handelte es sich um Mikrokristalle, in einigen Fällen konnten jedoch auch Kristalle bis zu 0,1 mm gezogen werden (Abb. 4-13). Die Zugabe von Additiven (z.B. Dioxan oder Glycerin) sowie eine Erhöhung der Salzkonzentration führten zu keinem größeren Kristallwuchs.

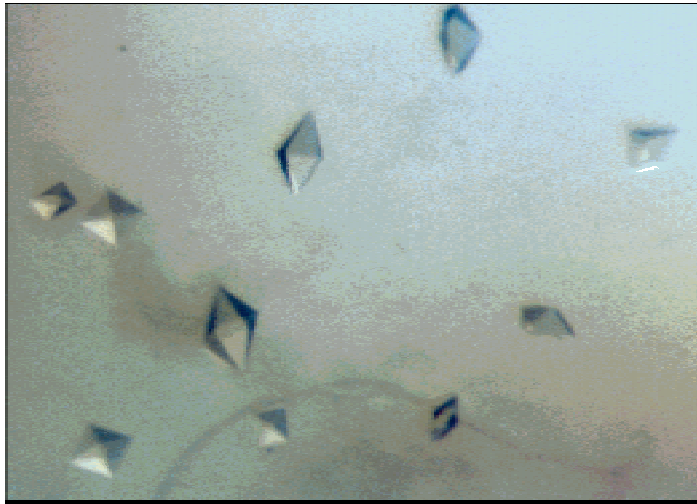


Abb. 4-14: SQD1-Proteinkristalle

Die größten Kristalle (0,4-0,5 mm) wurden mit der Optimierung der Wachstumsbedingungen und Anwendung der *sitting drop*-Methode erhalten, wobei die Mutterlauge aus 0,1 M MES (pH 6,5), 0,75 bis 2,0 M Ammoniumsulfat und die gefilterte (0,22 μm) Proteinlösung 0,4 mg ml⁻¹ SQD1 in 300 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM UDP-Glucose, 5 mM NAD⁺ betrug. Nach Mischen von 10 μl Mutterlauge und 10 μl Proteinlösung setzte ein sichtbares Kristallwachstum ab dem 3. Tag ein. Es dauerte etwa 1 Monat, um 0,4-0,5 mm große Kristalle zu erhalten. Für Schwermetallderivate wurden die Kristalle mit unterschiedlichen Schwermetallverbindungen (s. Methoden) inkubiert. Bei der Kristallisation von SQD1 zeigt sich zudem, daß ein zusätzlicher His-Tag die Kristallbildung nicht zwangsläufig erschwert.

4.4.2 Datenaufnahme und Auswertung

Zur Vermessung der SQD1 Kristalle, die typischerweise 0,3 mm in der ersten und zweiten und 0,1 mm in der dritten Dimension waren, sowie der unterschiedlichen Schwermetall-derivate wurden diese in 25% Glycerin/Mutterlauge für einen Tag inkubiert und blitzartig eingefroren. Die Aufnahme der röntgenkristallographischen Daten und ihre Bearbeitung wurden von Michael J. Thiesen und Prof. Dr. R. Michael Garavito durchgeführt. Die Auswertung der Daten ließ auf die ergebene tetragonale Raumgruppe **I4₁22** schließen. Die Bestimmung der asymmetrischen Einheit ergab, daß es sich um ein Dimer pro Elementarzelle handelt, deren Dimensionen 159,5 x 159,5 x 99,8 Å in einem Winkel von 90° sind.

Röntgenbeugung der Kristalle konnte bis zu einer Auflösung von 1,7 Å beobachtet werden. Des weiteren wurden Schwermetallderivate von SQD1 erzeugt und vermessen. Mit Hilfe der zusätzlichen Datensätze der Schwermetallderivate war es Dr. Garavito möglich, eine vorläufige Struktur des SQD1-Proteins zu erstellen (Abb. 4-15). Die Struktur zeigt, daß SQD1 im Kristall als Dimer vorliegt.

Die vollständige Strukturaufklärung wird in Kürze beendet sein und an anderer Stelle veröffentlicht .

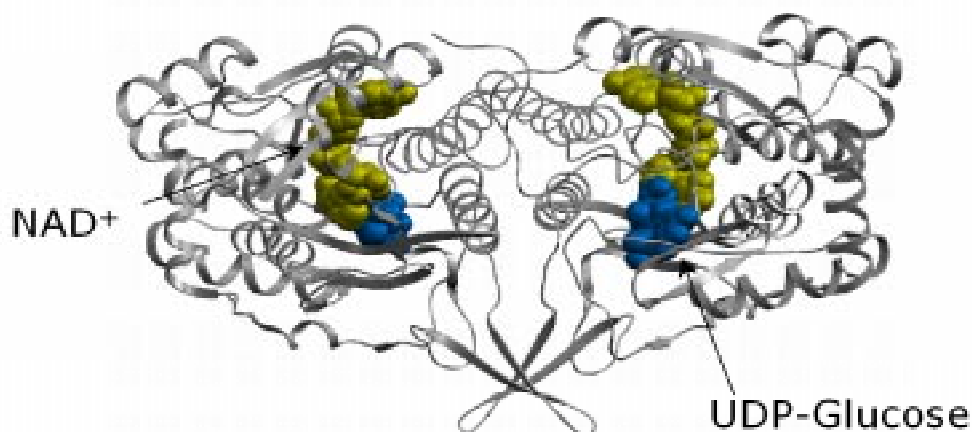


Abb. 4-15 : Vorläufige Kristallstruktur des SQD1-Proteins
NAD⁺ ist in grüner Farbe, UDP-Glucose in blauer Farbe dargestellt.

4.5 Untersuchungen zur spezifischen Funktion von Sulfolipid in höheren Pflanzen

In bisherigen Arbeiten wurde die Funktion von Sulfolipid vor allem in Bakterien untersucht. Es konnte von Benning *et al.*, 1993 in *R. sphaeroides* und Güler *et al.*, 1996 in *Synechococcus* gezeigt werden, daß das Fehlen von Sulfolipid die Photosynthese nicht oder kaum zu beeinflussen scheint. Diese Untersuchungen belegen jedoch auch, daß in Sulfolipid-Mutanten das Bakterienwachstum unter Phosphatmangel-Bedingungen beeinträchtigt ist.

Der Prozeß der oxygenen Photosynthese in Pflanzen ist dem der Cyanobakterien grundsätzlich gleich, es gibt jedoch zwei wichtige Unterschiede. Zum einen unterscheiden sich Aufbau und Pigmentzusammensetzung der Antennenkomplexe des PS II, zum anderen befindet sich die photosynthetische Membran der Pflanze in einem Kompartiment, dem Chloroplasten. In dieser Arbeit sollte die Rolle von Sulfolipid in *Arabidopsis* untersucht und mit den Ergebnissen aus Bakterien verglichen werden. Ein Hinweis, daß der Sulfolipidgehalt in diesen Organismen tatsächlich die Photosynthese beeinflussen kann, wurde vor kurzem von Sato *et al.*, 1995b veröffentlicht. Mit der Verfügbarkeit des *SQDI*-Gens besteht außerdem erstmals die Gelegenheit, auch die Regulation von Sulfolipidgenen unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zu studieren. Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung besteht im Vergleich von *Arabidopsis* Mutanten, die mehr oder weniger Sulfolipid als der Wildtyp enthalten. Deswegen wurden einerseits transgene Pflanzen konstruiert und untersucht, andererseits die *pho1* Mutante aus *Arabidopsis* herangezogen.

4.5.1 Die *pho 1* Mutante von *Arabidopsis thaliana*

Die *pho1* Mutante (Abb. 4-16) weist eine Störung in der Phloem/Xylemladung von Phosphat auf, so daß der Anteil anorganischen Phosphats in Blättern auf etwa 5% des Wildtyp-Anteils reduziert ist (Poirier *et al.* 1991). Außerdem wurde mit dieser Mutante gezeigt, daß die Expression von *RNSI*, einem Gen, das für eine RNase kodiert, in gleichem Maße induziert wird wie in Wildtyppflanzen unter Phosphatstreß. Dadurch eignet sich diese Mutante besonders als genetisches Modell, um einen Zusammenhang zwischen vermindertem Phosphatgehalt in Blättern und subzellulären Prozessen, die auf diese Verminderung anschlagen, zu studieren. Um den Einfluß von vermindertem Phosphat in Blättern auf die Lipidzusammensetzung zu untersuchen, wurden Lipidextrakte von Wildtyp und *pho 1* über DC aufgetrennt und mittels GC quantifiziert (Tab. 4-3). Der relative Gehalt an Phospholipiden in der *pho 1* Mutante ist um etwa 50% verringert, während der Gehalt des

nicht-phosphathaltigen Sulfolipides sowie Digalactosyldiacyl-glycerin auf etwa 250% beziehungsweise 160% ansteigt. Dagegen ändert sich der Gehalt des dritten nicht-phosphathaltigen Lipides, dem Monogalactosyl-diacylglycerin, kaum.



Abb. 4-16: *Arabidopsis* Wildtyp und *pho1* Mutante

Tab. 4-3: Quantitative Lipidanalyse aus Blattextrakten vom Wildtyp und der *pho1* Mutante von *Arabidopsis*.

Lipide	Wildtyp	<i>pho1</i>
MGDG	50.4 ± 5.2	56.9 ± 4.0
PG	7.5 ± 0.4	3.5 ± 0.4
DGDG	14.3 ± 1.0	23.3 ± 1.3
SQDG	1.8 ± 0.3	4.5 ± 0.2
PE	8.6 ± 1.7	4.1 ± 0.4
PC	17.4 ± 4.2	7.7 ± 0.8

Die Werte sind in Mol % angegeben und der Standardfehler stammt aus mindestens drei unabhängigen Messungen. DGDG, Digalactosyldiacylglycerin; MGDG, Monogalactosyldiacylglycerin; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerin; SQDG, Sulfoquinovosyldiacylglycerin.

4.5.2 Vergleich von *Arabidopsis* Wildtyp, *pho1* Mutante und *SQD1-antisense* Pflanzen

Um den Einfluß von Sulfolipid auf das Pflanzenwachstum zu untersuchen, und nachzuweisen, daß das *SQD1*-Gen tatsächlich an seiner Biosynthese beteiligt ist, wurden transgene *SQD1-antisense* Linien konstruiert. Diese transgenen *antisense* Linien sowie *Arabidopsis* Wildtyp und *pho1* Mutante wurden bezüglich Expression des *SQD1*-Gens auf RNA- und Protein-Ebene sowie auf ihren Lipidgehalt hin untersucht (Abb. 4-17).

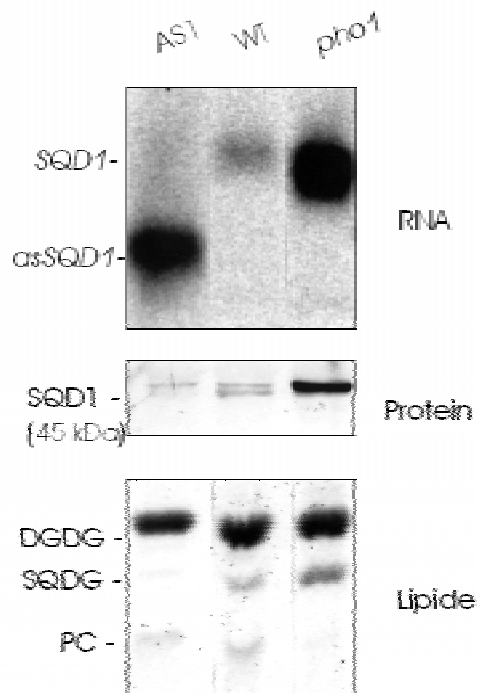


Abb. 4-17 : Expression des *SQD1* Gens in Blättern von *Arabidopsis*.

Gezeigt sind die stärkste *SQD1 antisense* Linie AS1, Wildtyp und die *pho1* Mutante. (Oben) Northern Blot, der mit der *SQD1* cDNA hybridisiert wurde. (Mitte) Western Blot. (Unten) Teil eines mit Iod angefärbten Lipid-Chromatogramms. RNA, Proteine und Lipide wurden von dem gleichen Pflanzenmaterial isoliert und in gleichen Mengen aufgetragen

Das Ergebnis sollte einen indirekten Beweis dafür liefern, daß das *SQD1*-Gen tatsächlich an der Sulfolipidbiosynthese in *Arabidopsis* beteiligt ist. Im Northern Blot der stärksten *antisense* Linie AS1 ist das *SQD1* mRNA Signal (1,4 kB) im Vergleich zum Wildtyp kaum detektierbar. Dagegen kann ein deutliches Signal beobachtet werden, das der *antisense* RNA (0,7 kB) zuzuordnen ist, die erwartungsgemäß kürzer als die mRNA ist. Die immunologische Untersuchung mit affinitätsgereinigten Antikörpern weist in Protein-extrakten von *Arabidopsis* Wildtyp zwei Banden ähnlicher molekularer Masse (45 kDa) auf. Diese beiden Banden repräsentieren vermutlich zwei Formen des *SQD1*-Proteins in unterschiedlichen

Modifikationen. Der Immunoblot der *antisense* Linie zeigt vor allem in der unteren der beiden Banden eine deutliche Reduktion an SQD1-Protein im Vergleich zum Wildtyp.

Die DC-Lipidanalyse der *antisense* Linie weist auf Höhe von Sulfolipid eine schwache, aber noch immer detektierbare Bande auf. Die Quantifizierung dieser Bande über GC ergibt eine 30%ige Reduktion von Sulfolipid in der Linie AS1 im Vergleich zum Wildtyp. Der relative Gehalt von Phosphatidylglycerin blieb innerhalb der statistischen Grenzen unverändert. Als unabhängige Gegen-Kontrolle, eine Pflanze mit deutlich erhöhtem Sulfolipidanteil, wurde die *pho1* Mutante untersucht. Diese zeigt eine starke Erhöhung der *SQD1*-Gen Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eindeutig die Beteiligung von SQD1 an der Sulfolipidbiosynthese.

4.5.3 Regulation der Sulfolipidbiosynthese durch Phosphat

Die Ergebnisse mit der *pho1* Mutante weisen auf eine drastische Veränderung des Lipidmusters in *Arabidopsis* unter Phosphatstreß hin. Zur genaueren Untersuchung dieses Effekts wurden *Arabidopsis* Wildtyppflanzen auf definiertem Medium unter verschiedenen Phosphatkonzentrationen angezogen. Lipide wurden extrahiert, über DC aufgetrennt und mittels GC quantifiziert. Die Veränderungen im Lipidmuster sind in Abb. 4-18 dargestellt.

Es zeigte sich, daß mit abnehmender Phosphatkonzentration im Medium der relative Gehalt an Digalactosyldiacylglycerin und Sulfolipid zunimmt, wobei der Gehalt aller Phospholipide abnimmt. Einzig im Gehalt von Monogalactosyldiacylglycerin ist im Rahmen der Messgrenzen keine Veränderung zu beobachten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Lipiddaten der *pho1* Mutante. Darüber hinaus zeichnet sich eine inverse Beziehung zwischen dem relativen Lipidgehalt der beiden anionischen Thylakoidlipide Phosphatidylglycerin und Sulfolipid ab. Die Summe beider Lipide lag unter den gewählten Bedingungen, unabhängig der Phosphatkonzentration, bei etwa 16%.

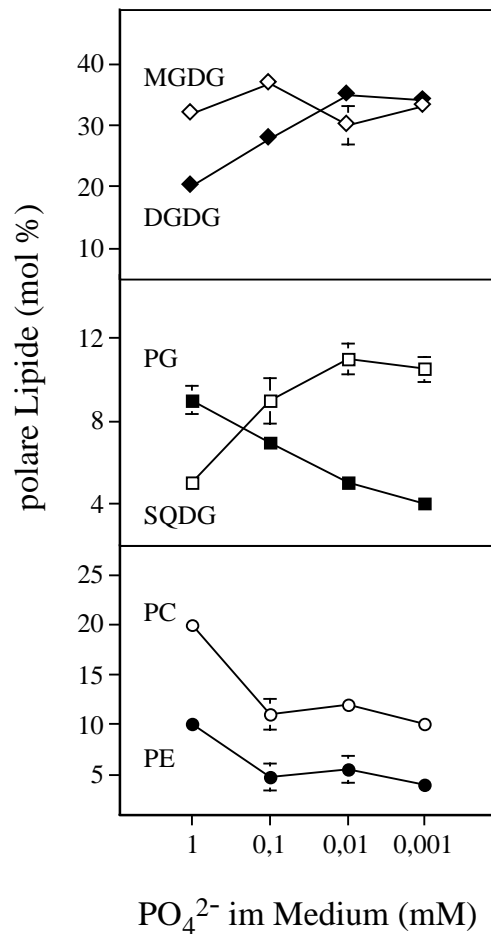


Abb. 4-18: Änderung der Lipidkomposition mit abnehmender Phosphatkonzentration.

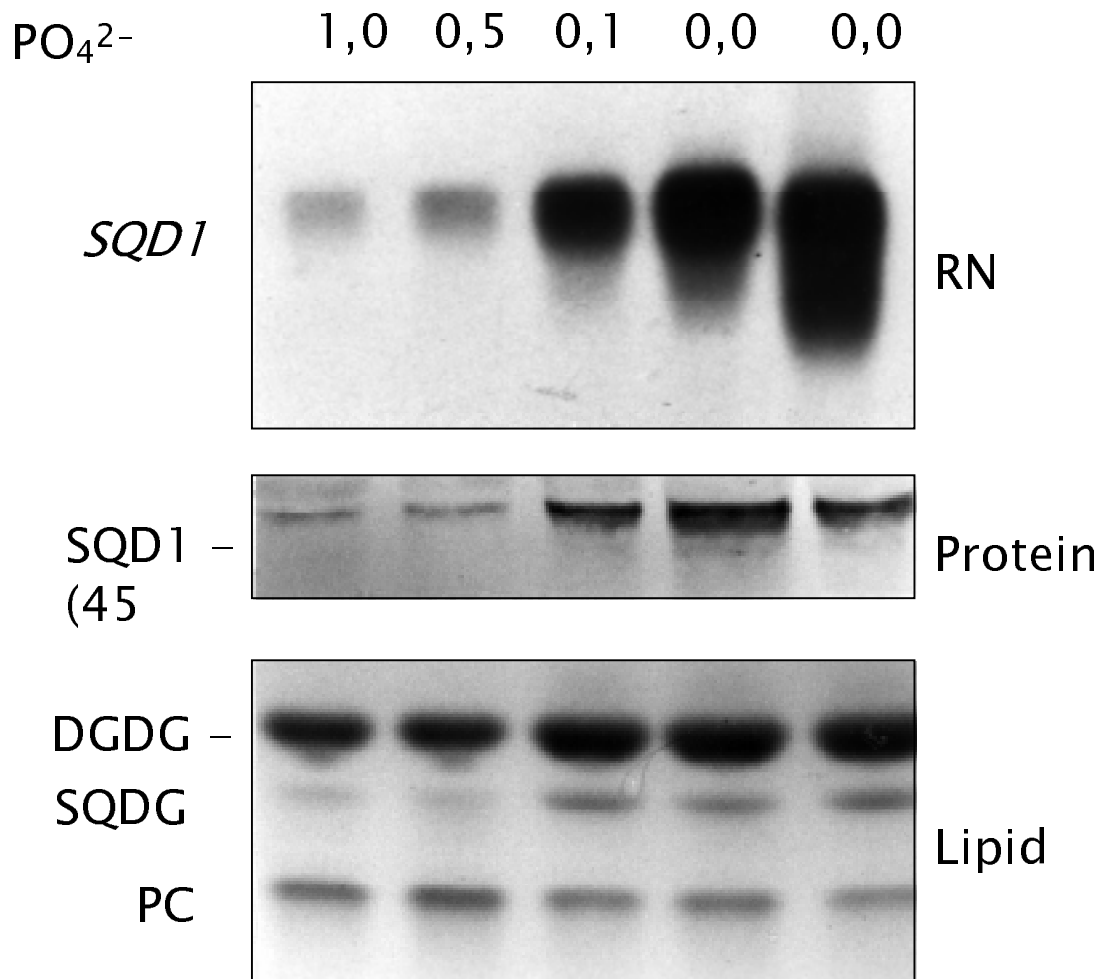
Diese Messung wurde freundlicherweise von Prof. C. Benning durchgeführt. Die Werte sind in mol % angegeben und der Standardfehler stammt aus mindestens drei unabhängigen Messungen. DGDG, Digalactosyldiacylglycerin; MGDG, Monogalactosyldiacylglycerin; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerin; SQDG, Sulfoquinovosyldiacylglycerin.

Um die molekularen Grundlagen des Anstiegs an Sulfolipid in den phosphatgestreßten *Arabidopsis* Pflanzen zu untersuchen, wurden sowohl der mRNA-Gehalt als auch der Gehalt an SQD1-Protein in den Pflanzen bestimmt. Abb. 4-19 zeigt, wie der *SQD1*-mRNA Gehalt unter Verringerung des Phosphatgehalts im Medium drastisch zunimmt.

Die Quantifizierung der mRNA über *Phosphorimaging* ergab eine 15fache Erhöhung des *SQD1* mRNA Gehalts in Pflanzen bei 0,01 mM Phosphat, im Vergleich zu Pflanzen bei 1 mM Phosphat. Außerdem konnte ein paralleler Anstieg im Proteingehalt anhand von Western-Blots festgestellt werden. Die Lipidanalyse der Blattextrakte, die auch für den Northern- und Western-Blot verwendet wurden, weisen einen Anstieg an Sulfolipid bei sinkendem Phosphatgehalt auf.

Diese enge Korrelation zwischen dem SQD1-Proteingehalt und dem relativen Sulfolipidgehalt läßt vermuten, daß SQD1 eine der limitierenden Reaktionen in der Sulfo-

lipidbiosynthese katalysiert.. Die Regulation dieser Reaktion scheint auf der Ebene der RNA stattzufinden, die wiederum von der Verfügbarkeit von Phosphat im Blatt gesteuert wird.



#

Abb. 4-19: Phosphatregulation von *SQD1*

Arabidopsis Wildtyp wurde 7 Tage auf MS Medium gezogen und dann für 7 Tage in Mineral Medium mit unterschiedlichen Phosphatbedingungen umgesetzt. (Oben) Northern Blot, der mit der *SQD1* cDNA hybridisiert wurde. (Mitte) Western Blot. (Unten) Iod angefärbtes Lipid-Chromatogramm. F, Lauffront, O, Auftragspunkt, DGDG, Digalactosyldiacylglycerin; MGDG, Monogalactosyldiacylglycerin; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerin; SQDG, Sulfoquinovosyldiacylglycerin.

4.5.4 Einfluß von Phosphat auf das Wachstum der *SQDI-antisense* Linien

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die *SQDI-antisense* Linie im Vergleich zum Wildtyp unter den unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen (1; 0,5 ; 0,1; 0,05 und 0,01 mM) ein vermindertes Wachstum aufweist. Ausgangspunkt dieser Vermutung sind Beobachtungen mit bakteriellen Sulfolipidmutanten, die einen Wachstumsnachteil unter Phosphatstress aufweisen. Bei diesen Experimenten konnte bei den *Arabidopsis SQDI-antisense* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied beobachtet werden. Zwar konnte ein allgemeiner Einfluß des Phosphatmangels beobachtet werden, jedoch waren die *SQDI-antisense* Pflanzen von denen des Wildtyps weder phänotypisch (Abb. 4-20) noch im Frischgewicht zu unterscheiden.



Abb. 4-20: Vergleich von Wildtyp und *SQDI-antisense* Linien von *Arabidopsis* unter Phosphatmangel-Bedingungen. Hier handelt es sich um 15 Tage alte Pflanzen, die auf 0,1 mM P_i gezogen wurden. In der oberen Hälfte der Petrischale wachsen Wildtyp-, in der unteren *SQDI-antisense* Pflanzen.

Dieses Experiment ist ein weiteres Beispiel dafür, daß mittels eines *antisense*-Ansatzes oft nur eine graduelle Verringerung eines Genproduktes möglich ist. Im Falle des *SQDI*-Gens führt dies zu einer Erniedrigung des Sulfolipidgehaltes um 30%. Die semi-quantitative Detektion der Lipide über DC ergab, daß auch bei der *antisense* Linie die Regulation von Sulfolipid unter Phosphatmangel stattfindet (ähnlich wie beim Wildtyp). Eine eindeutige Aussage läßt sich vermutlich erst beim Vorliegen einer *Arabidopsis* Sulfolipid-Nullmutante treffen.

4.6 Untersuchungen zur Rolle von Lipiden bei der Photosynthese anhand der *pho1* Mutante von *Arabidopsis*

Wie in Abschnitt 4.5 gezeigt, kann der Phosphatgehalt die Lipidzusammensetzung der Thylakoidmembran in hohem Maße beeinflussen und zu einer drastischen Reduktion der Phospholipide führen. Vor allem PG wird eine besondere Rolle beim Zusammenbau (*assembly*) und der richtigen Funktion der Thylakoidmembran zugeschrieben (Paulsen, 1995). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, inwieweit SQDG und DGDG zur Substitution von PG im photosynthetischen Apparat befähigt sind. Die *pho1* Mutante eignet sich für diese Frage in besonderem Maße als Untersuchungsobjekt.

Um Informationen über die Rolle der Lipide bezüglich ihrer strukturellen und funktionellen Integrität im photosynthetischen Apparat zu erhalten, wurde *Arabidopsis* Wildtyp und *pho1* Mutante unter normalem Tageslicht (LL), Photonenflußdichte (PPFD) von $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und hoher Lichtintensität (HL), mit einer PPFD von $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gezogen. Hintergrund dieser Untersuchungen ist es, weitere strukturelle Änderungen des photosynthetischen Apparates zu erzwingen, da bekannt ist, daß seine Zusammensetzung hoch sensitiv auf langzeitige Lichtänderungen reagiert. So weiß man, daß sich das Wachstum unter unterschiedlichen Lichtintensitäten in dramatischen Änderungen der Chloroplastenarchitektur widerspiegeln kann (Anderson *et al.*, 1988; Walters & Horton, 1994).

4.6.1 Lipidanalyse unter verschiedenen Lichtbedingungen

In einer ersten Untersuchung wurde eine genaue Quantifizierung der Lipidkomposition von Wildtyp und *pho1* Mutante, die unter HL und LL gezogen wurden, durchgeführt. Die Daten sind in Tab. 4-4 dargestellt.

Tab. 4-4 : Lipidzusammensetzung von *Arabidopsis* Wildtyp und *pho1* Mutante, die unter normaler (LL) und hoher Lichtintensität (HL) gezogen wurden. Die Werte sind in mol % angegeben. Der Standardfehler stammt aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Lipide	LL		HL	
	Wildtyp	<i>pho1</i>	Wildtyp	<i>pho1</i>
MGDG	50.4 ± 5.2	56.9 ± 4.0	48.4 ± 3.5	53.8 ± 5.1
PG	7.5 ± 0.4	3.5 ± 0.4	7.1 ± 0.4	2.5 ± 0.3
DGDG	14.3 ± 1.0	23.3 ± 1.3	15.5 ± 0.7	28.1 ± 3.0
SQDG	1.8 ± 0.3	4.5 ± 0.2	1.9 ± 0.4	5.7 ± 0.2
PE	8.6 ± 1.7	4.1 ± 0.4	10.0 ± 1.4	3.0 ± 0.4
PC	17.4 ± 4.2	7.7 ± 0.8	17.1 ± 2.3	6.9 ± 1.5

Die Ergebnisse zeigen, daß die Lipidzusammensetzung des Wildtyps unter wechselnden Lichtbedingungen weitgehend unverändert bleibt. Dagegen reagiert die *pho1* Mutante auf die veränderten Lichtbedingungen: Der Gehalt an PG verringert sich von 45% unter LL Bedingungen auf etwa 35% unter HL Bedingungen, während SQDG und in geringerem Maße DGDG ansteigen. Unabhängig von den Änderungen in der Lipidzusammensetzung bleibt die Summe von SQDG und PG fast unverändert. Vergleicht man die Summe dieser Lipide im Wildtyp und der *pho1* Mutante, ergeben sich Werte von 9,3% versus 8,0% unter LL und 9,0% versus 8,2% unter HL Bedingungen.

Die quantitative Analyse des Fettsäuremusters von PG und SQDG ergab nur leichte Unterschiede in den relativen Verhältnissen (Tab. 4-5 A und 4-5 B). Bei SQDG ist eine geringe Erhöhung der dreifach ungesättigten Fettsäure 18:3 in *pho1* unter HL zu beobachten. Das Fettsäuremuster der beiden neutralen Lipide, MGDG und DGDG, zeigte weder im Wildtyp noch in der Mutante Veränderungen unter den verschiedenen Lichtintensitäten.

Tab. 4-5 A: Fettsäurezusammensetzung von PG aus *Arabidopsis* Wildtyp und *pho1* Mutante, die unter normaler (LL) und hoher Lichtintensität (HL) gezogen wurden. Die Werte sind in mol % angegeben. Der Standardfehler stammt aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Fettsäuren	LL		HL	
	Wildtyp	<i>pho1</i>	Wildtyp	<i>pho1</i>
16:0	26.7 ± 1.8	25.8 ± 1.3	24.6 ± 0.6	21.7 ± 4.9
16:1	28.4 ± 4.9	27.2 ± 6.0	25.6 ± 3.8	26.8 ± 5.0
16:2	1.9 ± 0.9	2.8 ± 1.4	n.d. ¹	2.4 ± 0.7
16:3	2.7 ± 1.8	2.5 ± 1.2	3.4 ± 1.1	3.4 ± 1.6
18:0	1.3 ± 0.3	3.3 ± 0.7	1.3 ± 0.3	3.2 ± 1.3
18:1	6.2 ± 1.6	12.0 ± 2.4	7.5 ± 1.8	12.1 ± 4.3
18:2	7.1 ± 0.6	7.4 ± 1.7	6.1 ± 2.0	6.1 ± 1.3
18:3	25.7 ± 4.0	19.0 ± 3.8	31.5 ± 1.4	24.3 ± 5.0

¹ nicht detektierbar

Tab. 4-5 B: Fettsäurezusammensetzung von SQDG aus *Arabidopsis* Wildtyp und *pho1* Mutante, die unter normaler (LL) und hoher Lichtintensität (HL) gezogen wurden. Die Werte sind in mol % angegeben. Der Standardfehler stammt aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Fettsäuren	LL		HL	
	Wildtyp	<i>pho1</i>	Wildtyp	<i>pho1</i>
16:0	54.5 ± 7.2	51.8 ± 0.6	48.8 ± 3.5	47.8 ± 2.4
16:1	6.3 ± 1.1	6.7 ± 1.4	7.8 ± 2.1	5.8 ± 2.0
16:2	3.4 ± 1.2	2.4 ± 0.9	4.1 ± 1.4	2.3 ± 0.6
16:3	n.d. ¹	n.d.	n.d.	n.d.
18:0	3.9 ± 1.6	3.5 ± 0.3	4.9 ± 1.6	3.1 ± 0.4
18:1	8.1 ± 1.5	5.6 ± 0.6	8.3 ± 1.6	5.6 ± 1.2
18:2	4.1 ± 2.2	5.5 ± 0.9	6.1 ± 2.9	4.8 ± 0.9
18:3	19.3 ± 4.9	24.4 ± 3.0	20.1 ± 5.9	30.6 ± 6.3

¹ nicht detektierbar

4.6.2 Sauerstoffentwicklung unter verschiedenen Lichtbedingungen

Die Messung der Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Photonenflußdichte ergab im wesentlichen identische Lichtsättigungskurven für Wildtyp und *pho1* Mutante (Abb. 4-21). Jedoch zeigen HL akklimatisierte Pflanzen im Vergleich zu den LL Pflanzen eine etwa 2-fach erhöhte maximale O_2 -Entwicklungsrate. Dieses Ergebnis belegt, daß sich sowohl Wildtyp als auch *pho1* Mutante durch Erhöhung der photosynthetischen Effizienz an die höhere PPFD in gleichem Maße anpassen können.

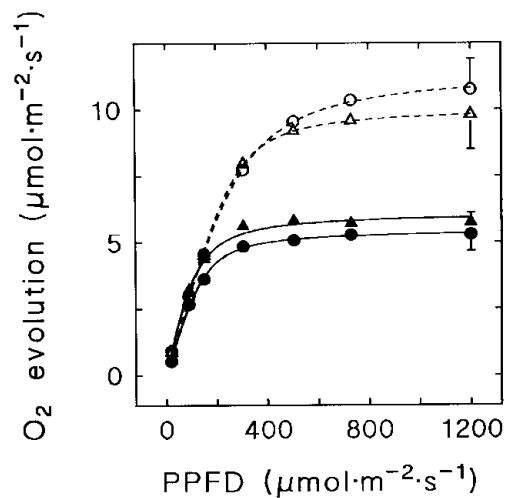


Abb. 4-21 : Sauerstoffentwicklung von Wildtyp und *pho 1* Mutante

Sauerstoffentwicklung als Funktion der Photonenflußdichte aus Blättern von *Arabidopsis* Wildtyp (Δ) und *pho1* (O) die unter normaler (LL, schwarze Symbole) oder hoher (HL, weiße Symbole) Lichtintensität kultiviert wurden. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von mindestens acht unabhängigen Messungen. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. H. Lockstein durchgeführt.