

5 Diskussion

Die Untersuchung zur Funktion und Biosynthese des Sulfolipids SQDG kann als weiteres Beispiel für die Effizienz eines genetischen Ansatzes bei der Charakterisierung von Stoffwechselwegen in Modellorganismen angeführt werden. Ähnlich wie bei der Biosynthese des Vitamin B₁₂ (zusammengefaßt von Blanche *et al.*, 1995) erwies sich erst die Verbindung von genetischen, molekularbiologischen und biochemischen Methoden als Schlüssel, der zu einer weiteren Aufklärung der einzelnen Schritte der Sulfolipidbiosynthese führte. Vor allem über die Reaktion, die an der Ausbildung der ungewöhnlichen Schwefel-Kohlenstoff-Bindung im Sulfoquinovosyl-Teil des Sulfolipids beteiligt ist, konnten aus klassischen biochemischen Experimenten keine gesicherten Erkenntnisse gewonnen werden. So zeigt sich, wie in dieser Arbeit vorgestellt, daß erst die Kombination aus molekularbiologischen, biochemischen und kristallografischen Methoden einen Einblick in den Reaktionsmechanismus erlaubt.

Für die Anwendung dieses Methodenspektrums spielt die Auswahl geeigneter Modellorganismen eine entscheidende Rolle. Bei einem ersten genetischen Ansatz erwies sich das Purpurbakterium *R. sphaeroides* als besonders zweckmäßig. Einerseits konnten damit die ersten an der Sulfolipidbiosynthese beteiligten Gene isoliert werden, andererseits war es möglich, mit Hilfe von Sulfolipid-Nullmutanten dieses Bakteriums zum Verständnis des letzten Schrittes der Sulfolipidbiosynthese beizutragen. Auch die ersten Untersuchungen zur Funktion von Sulfolipid mittels Nullmutanten wurden mit *R. sphaeroides* durchgeführt. Der Modellorganismus, mit dem die Rolle von Sulfolipid in der oxygenen Photosynthese untersucht wurde, war das Cyanobakterium *Synechococcus*. Um die Biosynthese und Funktion von Sulfolipid in höheren Pflanzen zu ermitteln, wird in dieser Arbeit der Modellorganismus *Arabidopsis* als Untersuchungsobjekt gewählt, wobei mit der Verfügbarkeit des *SQD1*-Gens auch die Regulation von Sulfolipid studiert werden konnte.

5.1 Das SQD1 Protein

Der funktionelle Nachweis, daß *SQD1* an der Biosynthese von Sulfolipid in *Arabidopsis* beteiligt ist und somit das erste pflanzliche Sulfolipid-Gen darstellt, konnte mit Hilfe von transgenen Pflanzen erbracht werden, die einen reduzierten Sulfolipidgehalt aufwiesen. Die ersten Anhaltspunkte zur Funktion von SQD1 innerhalb des Biosyntheseweges wurden aus der Sequenzanalyse sowie dem Homologiemodell gewonnen. Die biochemische Charakterisierung des rekombinanten, aufgereinigten Proteins ergab, daß SQD1 an der Biosynthese von UDP-Sulfoquinovose beteiligt ist. Dieser Schluß läßt sich aus der funktionelle Homologie von SQD1 zu den orthologen SQDB Proteinen aus Bakterien nachvollziehen (Abb. 4-11).

5.1.1 Die biochemische Charakterisierung von SQD1

Durch die Analyse des dreidimensionalen Modells von SQD1 konnte eine NAD^+ -Bindungsstelle vorausgesagt werden, die mittels Sequenzanalyse - einschließlich der Analyse durch das Programm *Prosite* - nicht erkannt werden konnte. Daraufhin konnte mit einer enzymatischen Reaktion, HPLC und Massenspektrometrie nachgewiesen werden, daß NAD^+ tatsächlich als Cofaktor von SQD1 vorliegt (Abb. 4-9 & 4-10). Die Bestimmung des Cofaktor/Enzym-Verhältnisses für SQD1 ergab einen Wert von $0,5 \pm 0,1$. Der relativ geringe Fehler der Messung läßt den Schluß zu, daß ein Teil des Cofaktors in seiner reduzierten Form, als NADH, vorliegt, das durch die enzymatische Quantifizierung nicht erfaßt wird. Diese Interpretation fußt auf Daten von verwandten Enzymen wie der CDP-Glucose 4,6-Dehydratase, in der vermutlich auch die Hälfte der Bindungsstellen mit NADH besetzt ist (He *et al.*, 1996). Auch im Falle der UDP-Glucose 4-Epimerase wurde nur ein NAD^+ Molekül pro Enzym-Dimer vermutet, und erst die Aufklärung der Röntgenstruktur hat gezeigt, daß ein Equivalent NAD^+ /Mol des Epimerase-Monomers vorlag (Bauer *et al.*, 1992). Der offensichtlichste Beleg, daß ein NAD^+ pro Monomer SQD1 binden kann, wird anhand des Homologiemodells geliefert (Abb. 4-8). Das Modell weist eine NAD^+ -Bindungsstelle in SQD1 auf, die auch durch eine vorläufige Auswertung der Kristallstruktur belegt werden kann.

Das Vorhandensein einer UDP-Glucose-Bindungsstelle konnte durch die *in vitro* „Enzymreaktion“ bestätigt werden (Abb. 4-11). Bei dem beobachteten Reaktionsprodukt kann es sich um eine neue, im Enzym entstandene, Verbindung handeln, jedoch ist nicht auszuschließen, daß UDP-Glucose im Enzym nur in einer reaktiven Konformation vorliegt, die

dann erst durch das Denaturieren des Enzyms weiterreagiert. Bemerkenswert ist die Substratspezifität von SQD1/SQDB gegenüber UDP-Glucose. Diese Daten stehen in gewissem Gegensatz zu Berichten, in denen auch UDP-Galactose als Substrat der Sulfolipidbiosynthese vermutet wurde (Pugh *et al.*, 1995). Offen sind noch die Ursachen der geringen *in vitro* „Aktivität“ von SQD1 sowie die Tatsache, daß die Zugabe des Cofaktors keinen Einfluß auf die Umsatzrate hat. In ähnlichen Untersuchungen, die mit dem gleichen Expressions- und Aufreinigungssystem mit der UDP-Glucose Epimerase aus *Arabidopsis* durchgeführt wurden, konnte ein „klassisches“ Verhalten des Enzyms festgestellt werden (Dörmann & Benning, 1995). Die naheliegendste Begründung für die geringe „Aktivität“ von SQD1/SQDB wäre ein unvollständiger Reaktionsablauf, der eine Inhibierung des Enzyms zur Folge haben könnte. Der Abbruch der Reaktion könnte durch das Fehlen eines zweiten Reaktionspartners, dem Schwefel-Donor, verursacht werden. Daß es sich bei dem entstehenden Produkt um ein reaktives Zwischenprodukt handelt, zeigt sich in dem zeitlich verzögerten Auftreten eines zweiten Produktsignals, wobei die Intensität des ursprünglichen Signals entsprechend abnimmt. Eine weitere, ähnliche Erklärungsmöglichkeit bietet sich, wenn man von einem Substrat-*channeling* des Reaktionsprodukts ausgeht (Zahner & Malaisse, 1993). Der letzte Schritt der Sulfolipidbiosynthese, der von der Sulfoquinovosyltransferase katalysiert wird, findet in der inneren *envelope*-Membran der Chloroplasten statt (Tietje & Heinz 1998). Daher ist nicht auszuschließen, daß es sich bei Proteinen, die an der Biosynthese von UDP-Sulfoquinovose beteiligt sind auch um membranassoziertes Protein handelt. Diese Frage kann durch Immunolokalisation von SQD1 im Chloroplasten geklärt werden. Außerdem könnte die äußerst geringe Konzentration von UDP-Glucose im Chloroplasten von Bedeutung sein (Bligny *et al.*, 1990, Winter *et al.*, 1994).

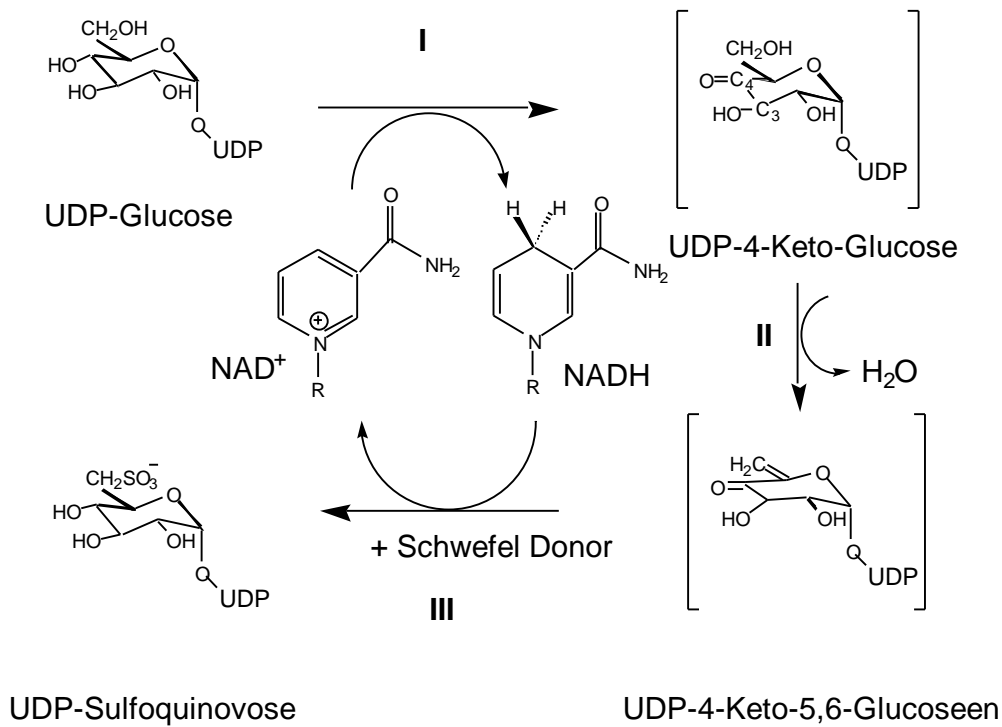
5.1.2 Der Reaktionsmechanismus

Zusammen mit der Analyse des Homologiemodells wurden die biochemischen Daten von SQD1, für den Vorschlag eines Reaktionsmechanismus ausgewertet, der die Bildung von UDP-Sulfoquinovose beschreibt.

In dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus (Abb. 5-1) wird davon ausgegangen, daß UDP-Glucose das Substrat für die Bildung von UDP-Sulfoquinovose ist. Es gibt eine Anzahl von Hinweisen, die diese Annahme unterstützen und zwingend machen. Der wichtigste ist, daß in den „Enzymreaktionen“ mit SQD1 bzw. SQDB allein UDP-Glucose „umgesetzt“ wird. Anhand des Laufverhaltens und der teilweise auswertbaren NMR-Spektren konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem „Umsatzprodukt“ auch um einen UDP-Zucker handeln muß (Abb. 4-13). Weitere Hinweise bieten die Markierungsexperimente, die mit UDP-Glucose durchgeführt wurden (Pugh *et al.*, 1995), sowie die Kristallisationsversuche, in denen UDP-Glucose einen stabilisierenden Effekt auf das SQD1-Protein hatte. Schließlich ist die Sequenzähnlichkeit von SQD1 zu Zuckernukleotid-modifizierenden Enzymen, vor allem den Epimerasen und Dehydratasen, zu erwähnen. Die Analyse der katalytischen Bindungsstelle durch den Sequenzvergleich sowie des dreidimensionalen Strukturmodells belegt, daß Thr228 aus SQD1 in der Dehydratase konserviert ist und in der Epimerase dem Ser124 entspricht. Diese Aminosäuren stellen eine isosterische Hydroxyl-Gruppe bereit, die katalytisch von Bedeutung zu sein scheint (Thoden *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997). Der Sequenzvergleich von SQD1 mit den orthologen SQDB Proteinen zeigt, daß nicht nur dieser Threoninrest sondern der ganze Bereich in diesen Proteinen hoch konserviert ist.

Hinzuzufügen ist, daß auch eine Ser124→Thr Mutante der Epimerase existiert, deren Struktur veröffentlicht wurde (Thoden *et al.*, 1997). In dieser Mutante behält NAD⁺ seine aktive *syn* Konformation, ähnlich wie sie auch in der Dehydratase beobachtet wird. Es ist anzunehmen, daß Thr228 im SQD1-Protein die gleiche Funktion wie Ser124 in der Epimerase übernimmt. Beide Aminosäuren haben die geeigneten chemischen und sterischen Eigenschaften, um die Ausbildung eines 4-Keto-Glucose Intermediates zu ermöglichen. Die zweite, katalytisch wichtige Aminosäure, Tyr257, ist innerhalb SQD1, der UDP-Glucose Epimerase und der

A



B

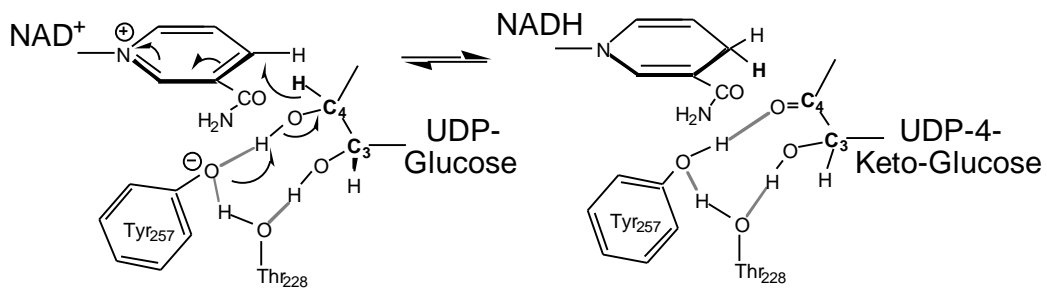


Abb. 5-1: Hypothese des SQR1 Reaktionsmechanismus

- A. Reaktionsschritte die ausgehend von UDP-Glucose zur Bildung von UDP-Sulfoquinovose führen
- B. Strukturelle Einflüsse von SQR1 bei der Bildung von UDP-4-Keto-Glucose

dTDP-Glucose-Dehydratase konserviert. In der Epimerase Mutante Ser124→Thr besitzt diese Aminosäure einen relativ niedrigen pK_α so daß die phenolische Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette deprotoniert ist (Liu *et al.*, 1997). Dieses Phenolat könnte als Akzeptor für ein Proton der C-4 Hydroxyl-Gruppe der Glucose fungieren, wobei gleichzeitig NAD⁺ der Akzeptor des C-4

Hydrids ist (Abb. 5-1 B). Diese Überlegungen lassen die Bildung des UDP-4-Keto-Glucose Intermediates vermuten, Schritt I im vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus.

Im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus läßt sich der Sequenzvergleich (Abb. 4-5 B) folgendermaßen interpretieren: Die Sequenzidentität im N-terminalen Bereich von SQD1 zu der Epimerase (26%, rotes Band in Abb. 4-8) ist auf die konservierte NAD⁺-Bindungsstelle zurückzuführen. Dagegen reflektiert die hohe Sequenzidentität des C-terminalen Bereiches zu der *Arabidopsis* Dehydratase (32%, pinkes Band in Abb. 4-8) funktionelle Ähnlichkeit in Bezug auf die UDP-Glucose-Bindung und -Reaktion. Deswegen wird als zweiter Schritt, in Analogie zum Reaktionsmechanismus der Dehydratase, eine β -Eliminierung von einem Molekül Wasser vorgeschlagen. Hierbei entsteht aus der UDP-4-Keto-Glucose das Intermediat UDP-4-Keto-Glucoseen. Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus mit einem 4-Keto-5,6-en als Intermediat wurde für dTDP-Glucose Dehydratase entdeckt und publiziert (Melo & Glaser, 1968; Gabriel & Lindquist, 1968), sowie für GDP-Mannose (Otis *et al.*, 1990) und CDP-Glucose (He *et al.*, 1996) in einer Dehydratasereaktion vorgeschlagen. Für diesen zweiten Schritt könnte His423 von SQD1 eine katalytische Funktion haben. Diese Aminosäure nimmt eine geeignete Position ein, um als Base für eine β -Eliminierung zu dienen.

Der dritte Schritt führt schließlich zur Bildung von UDP-Sulfoquinovose. Die Annahme, daß UDP-4-Keto-5,6-Glucoseen tatsächlich als Intermediat vorliegen könnte, wird durch Berichte unterstützt, in denen ein ähnliches Substrat, Glucose-5,6-en, zur Bildung von Sulfoquinovose führen kann (Lehmann & Weckler, 1972; Lehmann & Weckler, 1975). In dieser Reaktion, die in wässrigem Milieu (pH 5,6) bei Raumtemperatur stattfindet, ist Glucose-5,6-en der Akzeptor für Sulfit. Die Autoren gehen von einem radikalischen Reaktionsverlauf mit $\cdot\text{SO}_3^-$ als Startradikal aus. Eine weitere Möglichkeit ist die nukleophile Addition von Sulfit an eine mesomere Form von UDP-4-Keto-5,6-Glucoseen mit einem Carbonium Ion an der C-6 Position und einem Carbanion an C-5 (Gabriel & Lindquist, 1968). Die Entstehung von Sulfit könnte durch Reduktion aktivierter Schwefelverbindungen wie PAPS oder APS erfolgen. Die dafür verantwortlichen Enzyme, die PAPS-Reduktase bzw. die APS-Reduktase, sind in Pflanzen nicht sonderlich gut charakterisiert, und auch ihre Reaktionsprodukte konnten noch nicht identifiziert werden. Neuere Daten unterstützen jedoch den APS-abhängigen Reaktionsweg in Pflanzen, der über frei verfügbares Sulfit verläuft (Hell, 1997; Bick & Leusteck, 1998). Als möglicher

Schwefel-Donor kann aber auch Glutathion-S-SO₃, das als Zwischenprodukt der Sulfatreduktion in Pflanzen vorgeschlagen wird, diskutiert werden.

Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus für die Bildung der UDP-Sulfoquinovose basiert auf dem Homologiemodell von SQD1 und steht im Einklang mit den bisher publizierten Daten. Seine Bestätigung wird aber letztendlich durch die Kristallstruktur, die Charakterisierung der Intermediate und Identifizierung des Schwefel-Donors erfolgen.

5.1.3 Die Kristallstruktur

Durch die Kristallisation des SQD1 Proteins und einer bereits vorhandenen vorläufigen Struktur ist die Möglichkeit gegeben, auf einen großen Teil der noch offenen Fragen des SQD1 Reaktionsmechanismus in Kürze Antworten zu geben. Anhand der bis jetzt erhaltenen Daten ist eine Auflösung von 1,7 Å möglich. So konnte bereits neben der Raumgruppe und den Gitterkonstanten festgestellt werden, daß das SQD1 Protein, ähnlich der Epimerase, im Kristall als Dimer vorliegt. Der Vergleich der Kristallstruktur mit dem Homologiemodell weist eine hohe Übereinstimmung auf und bestätigt damit auch die hohe Qualität des Modells, was wiederum für den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus spricht.

Die vollständige Aufklärung der Kristallstruktur verspricht weitere Informationen zu den möglichen Intermediaten zu liefern. Eine vorläufige Analyse der UDP-Glucose-Bindungsstelle im Kristall deutet darauf hin, daß das Zuckernukleotid eine gespannte, reaktive Konformation annimmt. Die endgültige Analyse der Struktur ist jedoch noch nicht abgeschlossen. Schließlich besteht auch noch die Möglichkeit, z. B. anhand der Größe der Bindungstasche Anhaltspunkte zu dem postulierten Schwefel-Donor zu erhalten. Wie angedeutet, könnten die im Vergleich mit der Epimerase oder Dehydratase nicht konservierten Aminosäuren der UDP-Glucose-Bindungsstelle darüber Aufschluß geben.

Allgemein wäre ein genauer Vergleich mit den Strukturen der UDP-Glucose Epimerase sowie der UDP-Glucose Dehydratase, die seit kurzem in der Proteindaten Bank veröffentlicht ist, hochinteressant. Möglicherweise handelt es sich bei SQD1 um ein neues Mitglied der kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase-Superfamilie, bei denen ein Thyrosinrest als genereller Säure-Base Katalysator eine Rolle spielt (Liu *et al.*, 1997).

5.2 Funktion und Regulation von Sulfolipid

Das Fehlen von Sulfolipid in einer Anzahl anoxygener, photosynthetischer Bakterien sowie die Berichte von zwei SQDG-defizienten Mutanten zeigen eindeutig, daß SQDG nicht essentiell für das Wachstum von photosynthetischen Bakterien ist (Benning, 1998). Jedoch kann, wie Ergebnisse mit Mutanten von *Synechococcus* (Güler *et al.*, 1996) und *Chlamydomonas* (Sato *et al.*, 1995) zeigen, eine gewisse Bedeutung von SQDG für die optimale Funktion des photosynthetischen Apparats von einigen Organismen mit oxygener Photosynthese nicht ausgeschlossen werden. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, warum sich in bestimmten Organismen während der Evolution die Sulfolipidbiosynthese entwickelt und erhalten hat.

5.2.1 Die Substitutions-Hypothese

Eine naheliegende Antwort auf diese Frage geben Versuche, die mit den bakteriellen Sulfolipidmutanten unternommen wurden. Einigen, meist photosynthetischen, Organismen wird durch die Sulfolipidbiosynthese die Möglichkeit gegeben, sich spezifischen Umweltbedingungen besser anzupassen. Diese Organismen haben die Möglichkeit, Phospholipide durch Sulfolipid und/oder DGDG zu ersetzen, ohne dabei die Funktionsfähigkeit der Thylakoidmembran nennenswert einzuschränken. Um diese Hypothese zu überprüfen und zu untersuchen, ob sie auch auf Pflanzen übertragbar ist, wurde *Arabidopsis* als Untersuchungsobjekt gewählt. Das Hauptinteresse der Untersuchung liegt in der Änderung der Lipidzusammensetzung unter Phosphatmangel. Außerdem ist mit der *pho1* Mutante ein weiterer, völlig unabhängiger Ansatz möglich, um den Einfluß von Phosphat und die damit einhergehende Änderung der Lipidkomposition in *Arabidopsis* zu studieren.

Neben der Lipidkomposition unter verschiedenen Phosphatkonzentrationen wurde auch die Expression des *SQD1*-Gens, dem ersten pflanzlichen Sulfolipid-Gen, untersucht. Hiermit sollte vor allem zwischen einer aktiven Anpassung der Lipidkomposition auf Grund der Phosphat-Verfügbarkeit und einem eher passiven Prozeß, wie z. B. dem der Konzentrationseffekte, die durch Verringerung der Phospholipidbiosynthese auftreten, unterschieden werden. Es konnte im *Arabidopsis* Wildtyp eine enge Korrelation zwischen der Expression des *SQD1*-Gens, dem SQD1-Protein und dem steigenden Sulfolipidgehalt mit sinkender Phosphatkonzentration nachgewiesen werden (Abb. 4-19). Übereinstimmend damit ist

auch eine Erhöhung der *SQD1* Expression in der *pho1* Mutante (Abb. 4-17). Dies zeigt, daß der erhöhte Anteil an Sulfolipid vom internen Phosphatgehalt in den Blättern geregelt wird und somit weitgehend das Ergebnis einer aktiven Regulation ist. Diese Regulation wird offensichtlich über die Transkription eines oder mehrerer Sulfolipid-Gene gesteuert.

Im Einklang mit der vermuteten Hypothese spiegelt der Wechsel der Lipidkomposition das Bestreben des Organismus wider, den Phosphor für essentielle(re) Metabolite zu konservieren, ohne dabei die Funktion der Thylakoidmembran zu beeinträchtigen. Unter Phosphatmangel ist neben einer Änderung der Lipidkomposition auch eine erhöhte Expression von RNasen (Bariola *et al.*, 1994) sowie von Phosphat-Transportern (Muchal *et al.*, 1996) zu verzeichnen. Damit kann einerseits das in Nukleinsäuren gebundene Phosphat freigesetzt, andererseits die Aufnahme von Phosphat aus dem Medium gesteigert werden. Wenn man davon ausgeht, daß in *Arabidopsis* Blättern etwa ein Drittel des organischen Phosphats jeweils als Phospholipide, in Nukleinsäuren und anderen Phosphat-Estern gebunden ist, scheinen all diese Reaktionen der Pflanzen dem Zweck der Mobilisierung von Phosphat zu dienen.

In der Thylakoidmembran eignet sich vermutlich das anionische Sulfolipid besonders gut, das anionische Phosphatidylglycerin zu ersetzen. Dies wird dadurch gestützt, daß sowohl in der SQDG-defizienten Mutante aus *R. sphaeroides* als auch der entsprechenden cyanobakteriellen Mutante unter Phosphatmangel alle Phospholipide, außer PG, reduziert waren (Benning, 1998). Ein weiteres Argument für diese Substitutions-Hypothese ist die inverse Korrelation zwischen dem PG- und SQDG-Gehalt in den Blättern (Abb. 4-18) sowie die Tatsache, daß die Summe dieser Lipide unter den unterschiedlichsten Bedingungen gleichbleibt.

Weitere Hinweise liefert die asymmetrische Verteilung der Pigment-Protein-Komplexe. Die Ausbildung von Granathylakoiden wird mit der Anwesenheit des PSII verbunden, da die Stapelung der Membran vermutlich vor allem durch die LHCI des PSII vermittelt wird (Staehlin & van der Staay, 1996). Auf die Thylakoidlipide bezogen, wurden die anionischen Lipide PG und SQDG vermehrt in den Bereichen der LHC's von PSII gefunden; DGDG und MGDG werden hingegen mit weniger gestapelten Bereichen assoziiert (Gounaris *et al.*, 1983; Dörmann *et al.*, 1995). Dies läßt darauf schließen, daß vermutlich SQDG anstatt DGDG der geeignetere Substituent von PG sein könnte. Zusammengefaßt bestätigen diese Ergebnisse den Gedanken, daß SQDG (eher als DGDG) als Substituent von PG in der Thylakoidmembran geeignet ist.

Diese Interpretation sollte jedoch die Möglichkeit nicht ausschließen, daß DGDG auch eine Funktion des fehlenden PG's übernehmen kann.

5.2.2 Die Rolle der Lipide in der Photosynthese

Als weiterer Ansatz zur Untersuchung der Rolle von Sulfolipid in höheren Pflanzen wurde die *pho1* Mutante herangezogen. Diese Mutante kann einerseits als Modell für eine Pflanze mit einem höheren Sulfolipidgehalt gesehen werden, andererseits weist sie eine Reduktion in Phospholipiden, vor allem PG, auf. Zusätzlich wurde bei dieser Untersuchung als weiterer Parameter die Lichtintensität variiert. Die erhaltenen Daten belegen, daß die *pho1* Mutante trotz drastisch veränderter Lipidzusammensetzung, unabhängig von der Lichtintensität die gleiche Fähigkeit zur Sauerstoffentwicklung besitzt wie der Wildtyp (Abb. 4-21). Im Zusammenhang mit den vorgestellten Ergebnissen wurden auch die Pigmentverteilung, der Elektronentransfer sowie die Ultrastruktur der Chloroplasten von Wildtyp und *pho1* Mutante unter HL und LL studiert (Härtel *et al.*, 1998). Vor allem für den photosynthetischen Elektronentransfer ließ sich aus Ergebnissen mit Spinatthylakoiden, eine Rolle von PG als wesentlichem Bestandteil ableiten. Es wurde gezeigt, daß durch eine Verringerung des Phosphatidylglycerin-Gehalts in Thylakoiden um 70-80% nach Phospholipase-Verdau, sowohl die "Aktivität" vom PS II als auch die des Elektronentransfers um mehr als 50% verringert ist (Siegenthaler *et al.*, 1987). Mit der *pho1* Mutante, die unter HL eine ähnlich starke Reduktion von PG aufweist (etwa 65%), konnte jedoch kein nennenswerter Einfluß auf den photosynthetischen Elektronentransfer gemessen werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Thylakoidmembran offensichtlich die Fähigkeit besitzt, den Mangel an PG über eine langsame Anpassung, vermehrte SQDG- und DGDG-Synthese, auszugleichen. Auch die Bestimmung weiterer Chlorophyll-Fluoreszenz-Parameter, der 77 K Fluoreszenz-Emissionsspektren, Pigmentverteilung weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *pho1* Mutante auf (Härtel *et al.*, 1998). Die Interpretation dieser Daten läßt vermuten, daß zumindest ein Großteil des PG Gehalts in der Thylakoidmembran, für die Lichtanpassung des photosynthetischen Apparates nicht unbedingt notwendig ist.

Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen *pho1* und Wildtyp konnte jedoch in der Ultrastruktur der Chloroplasten festgestellt werden: Die Anzahl der Grana-Stapel in *pho1* war im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dieses Ergebnis steht in gewissem Gegensatz zu bisher publizierten Daten, in denen das Vorkommen von PG bzw. t-16:1-PG mit Grana-Stapelung

korreliert wurde (Trémolierès *et al.*, 1991, s. Abschnitt 5.2.1). Auf der anderen Seite zeigen Ergebnisse mit der *fadA* Mutante von *Arabidopsis* der t-16:1-PG fehlt, daß dies durch vermehrtes 16:0 in PG kompensiert werden kann (Browse *et al.*, 1985).

Die veränderte Thylakoid Ultrastruktur der *pho1* Mutante könnte darauf hinweisen, das SQDG und DGDG offenbar doch nicht zur exakten Substitution von PG fähig sind. Eine möglich Erklärung könnte in dem unterschiedlichen Fettsäuremuster von PG und SQDG liegen, das sich vor allem in dem relativen Gehalt an 16:1 und 16:0 unterscheidet. Wie in Tab. 3 A gezeigt wird, liegt der Fettsäureanteil in PG von 16:1 bei etwa 27% und der von 16:0 bei 25%. Im Falle von SQDG findet man nur etwa 7% 16:1 und etwa 50% 16:0 Fettsäuren (Tab. 3 B). In Anbetracht dieser unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften der Fettsäuren könnte man vermuten, daß die Unterschiede in der Ultrastruktur der *pho1* Mutante von der Veränderung der Lipidzusammensetzung, 16:0 zugunsten von 16:1, herrühren könnte. Diese Vermutung wäre ein Anhaltspunkt dafür, daß das Fettsäuremuster ein wichtiger Faktor bei der Ausbildung einer bestimmten Thylakoidstruktur sein kann.

Aus den Studien mit der *pho1* Mutante kann man zusammenfassend sagen, daß diese Mutante, der 65% des PG's fehlen, trotz Änderungen in der Chloroplasten Ultrastruktur ihre Fähigkeit zur Anpassung an veränderte Lichtbedingungen erhalten hat. Messungen zur photosynthetischen Elektronenübertragung, Sauerstoffentwicklung und Verteilung der Anregungsenergie zwischen den Photosystemen zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Diese Ergebnisse belegen, daß Pflanzen offensichtlich in der Lage sind einen PG Mangel in der Thylakoidmembran durch das zweite anionische Lipid SQDG und das neutral Lipid DGDG zu ersetzen. Dies scheint eine wichtige und verbreitete Strategie photosynthetischer Organismen zu sein, um lebenswichtige Prozesse wie die Photosynthese zu erhalten.

5.2.3 Der Einfluß von Sulfolipid auf das Pflanzenwachstum

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen waren wieder Ergebnisse mit Sulfolipid-defizienten Mutanten in Bakterien, die vermindertes Wachstum unter Phosphatmangel aufwiesen. In dem bisher verfolgtem Ansatz war zu erwarten, daß auch Pflanzen mit vermindertem Sulfolipidgehalt einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp haben sollten. Zu diesem Zweck wurden über ein *antisense*-Experiment transgene *Arabidopsis* Pflanzen mit etwa 30% vermindertem Sulfolipid

Gehalt erzeugt. Wachstumskurven mit transgenen Pflanzen unter Phosphatmangel zeigten jedoch keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 4-20). Diese Beobachtung liefert einen Hinweis darauf, dass die Verringerung des Sulfolipid Gehalts auch in höheren Pflanzen keinen nennenswerten Einfluß auf die Photosynthese haben kann. Der endgültige Beweis hierfür kann jedoch nur durch eine pflanzliche SQDG Nullmutante erbracht werden. Das vollständige Ausschalten der Sulfolipidbiosynthese ist über einen Ansatz mit *antisense*-Pflanzen jedoch nur sehr schwer möglich. Die zur Zeit erfolgversprechendste Strategie solche pflanzlichen Nullmutanten herzustellen und zu entdecken ist vermutlich das Durchsuchen T-DNA markierten Linien. Diese Strategie wird im Anhang vorgestellt. Es ist zu erwarten, daß in nächster Zeit *Arabidopsis* Samen Banken vorliegen werden, in denen das Genom gesättigt mutiert ist (Bouchez & Höfte, 1998; Meinke *et al.*, 1998). Dies bedeutet, daß mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auch das *SQDI*-Gen durch Insertion von T-DNA vollständig ausgeschaltet sein wird und so eine SQDG Nullmutante vorliegt, die charakterisiert werden kann.